

**Entwicklung spezialisierter Bioreaktoren für die  
gezielte Differenzierung von Stammzellen und ihr  
Einsatz im *Tissue Engineering***

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

Dipl.-Chem. Stefanie Böhm  
geboren am 23.03.1983 in Höxter

2011

Referentin: PD Dr. Cornelia Kasper  
Institut für Technische Chemie  
Callinstraße 5  
30167 Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper  
Institut für Technische Chemie  
Callinstraße 5  
30167 Hannover

Tag der Promotion: 06.06.2011

**Erklärung**

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, April 2011

## Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau PD Dr. Cornelia Kasper und Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit, am Institut für Technische Chemie über ein aktuelles und hochinteressantes Thema promovieren zu können. Außerdem bedanke ich mich bei Ihnen für die Übernahme der Referate. Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Cornelia Kasper für ihre Einsatzbereitschaft, Unterstützung und Förderung während meiner Promotion.

Herrn Prof. Dr. Ralf Hass möchte ich vor allem für die Übernahme der Rolle des Drittprüfers ausdrücklich danken.

Für die Bereitstellung von BMP-2 danke ich Herrn Prof. Dr. Walter Sebald, Dr. Anja Peterbauer (Österreichisches Rotes Kreuz, Linz) und Prof. Dr. Ralf Hass danke ich für die Überlassung humaner mesenchymaler Stammzellen.

Dem Arbeitskreis von Prof. Marcelle Machluf am Technion, insbesondere Yael Lupu, danke ich für die tolle Zusammenarbeit, die immer pünktliche Bereitstellung von Mikrosphären und die tolle Gastfreundschaft.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Projektpartnern für die Zusammenarbeit und die Unterstützung, insbesondere bei der Firma Suwelack Skin & Health Care AG und der Firma Zellwerk GmbH.

Den Teams aus der Feinmechanikwerkstatt und der Elektronikwerkstatt danke ich für die Realisierung jeglicher Ideen und Wünsche meinerseits und die tatkräftige Unterstützung bei jeglichen Problemen technischer Art. Martin danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei Arbeiten im RNA Labor.

Sonja, Antonina und der gesamten Zellkulturmannschaft danke ich für die tolle Zusammenarbeit im Labor in den letzten 3 Jahren.

Bei Dr. Stefanie Röker und bei Dr. Dana Marten möchte ich mich für die Hilfestellungen bei sämtlichen Reaktorläufen bedanken.

Ein großer Dank geht an meine Mädels, Ladys es war schön mit euch!!!!

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung jeglicher Art in den letzten Jahren, insbesondere bei meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und bei meinem Mann Mark, der mich während dieser Zeit immer unterstützt und motiviert hat!!!

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

## Inhalt

<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>IV</b>
<b>INHALT</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>XV</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIX</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN</b> .....	<b>5</b>
3.1 MESENCHYMALE STAMMZELLEN AUS DEM FETTGEWEBE UND DER NABELSCHNUR .....	5
3.1.1 <i>Isolierung mesenchymaler Stammzellen</i> .....	5
3.1.2 <i>Proliferationskapazität und Seneszenz</i> .....	6
3.1.3 <i>Differenzierungspotential der mesenchymalen Stammzellen</i> .....	8
3.2 BIOREAKTOREN FÜR DAS KNOCHEN <i>TISSUE ENGINEERING</i> .....	11
3.2.1 <i>Reaktortypen</i> .....	12
3.3 SIGNALTRANSDUKTION ÜBER DEN WNT/B-CATENIN-SIGNALWEG.....	16
3.3.1 <i>Wnt-Protein Biogenese und Sekretion</i> .....	17
3.3.2 <i>Extrazellulärer Transport der Wnt-Proteine</i> .....	20
3.3.3 <i>Wnt Rezeption</i> .....	21
3.3.4 <i>Agonisten und Antagonisten in der Wnt-Signaltransduktion</i> .....	22
3.3.5 <i>Einfluss des Wnt/<math>\beta</math>-Catenin-Signalweges auf die osteogene Differenzierung</i> .....	23
<b>4 EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	<b>28</b>
4.1 STATISCHE DIFFERENZIERUNG MESENCHYMALER STAMMZELLEN AUS DEM FETTGEWEBE UND DER NABELSCHNUR.....	32
4.1.1 <i>Osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in Kulturplatten</i> .....	32
4.1.2 <i>Osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen auf verschiedenen Trägermaterialien</i> .....	35
4.2 MECHANISCHE STIMULATION MESENCHYMALER STAMMZELLEN .....	41
4.2.1 <i>Entwicklung eines Messsystems zur online Überwachung der Sauerstoffkonzentration während der mechanischen Stimulation</i> .....	42

4.2.2	<i>Stimulation mesenchymaler Stammzellen</i> .....	45
4.3	KULTIVIERUNG MESENCHYMALER STAMMZELLEN IM DREHBETTREAKTOR.....	64
4.3.1	<i>Kultivierung der ucMSC mit osteogenem Differenzierungsmedium im Bioreaktor</i> .....	70
4.3.2	<i>Kultivierung der ucMSC auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® im Bioreaktor</i> ..	74
4.3.3	<i>Kultivierung der ucMSC mit osteogenem Differenzierungsmedium auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® im Bioreaktor</i> .....	78
4.3.4	<i>Kultivierung adMSCc mit osteogenem Differenzierungsmedium im Bioreaktor</i> .....	83
4.3.5	<i>Kultivierung von adMSC auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® im Bioreaktor</i> .	88
4.3.6	<i>Kultivierung adMSC mit osteogenem Differenzierungsmedium auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® im Bioreaktor</i> .....	93
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>118</b>
7.1	STATISTISCHE ÜBERPRÜFUNG VON MESSWERTEN .....	118
7.2	VERWENDETE ZELLEN .....	118
7.3	VERWENDETE BIOMATERIALIEN .....	120
7.3.1	<i>Matritypt</i> .....	120
7.3.2	<i>Sponceram®</i> .....	120
7.3.3	<i>Mikrosphären</i> .....	121
7.4	MATERIAL.....	123
7.4.1	<i>Kulturmedien und Lösungen</i> .....	123
7.4.2	<i>Geräte und Laborausstattung</i> .....	126
7.4.3	<i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	127
7.4.4	<i>Verwendete Reagenzien</i> .....	128
7.5	METHODEN .....	130
7.5.1	<i>Bestimmung der Zellzahl</i> .....	130
7.5.2	<i>Statische Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen</i> .....	131
7.5.3	<i>Mechanische Stimulation der mesenchymalen Stammzellen</i> .....	132
7.5.4	<i>Dynamische Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen im Drehbettreaktor Z®RPD</i> .136	
7.5.5	<i>Viabilitätsassay</i> .....	138
7.5.6	<i>Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase</i> .....	139
7.5.7	<i>Histologische Färbungen</i> .....	141
7.5.8	<i>Immunfluoreszenz Färbung</i> .....	145
7.5.9	<i>RT-PCR</i> .....	147
7.5.10	<i>Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen</i> .....	150
7.5.11	<i>μCT Aufnahmen und Hartschliffe</i> .....	151
7.6	ERGEBNISSE .....	152
7.6.1	<i>Mechanische Stimulation mesenchymaler Stammzellen</i> .....	152

7.6.2 *Kultivierung mesenchymaler Stammzellen im Bioreaktor* ..... 156



## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 3-1: PRINZIP DES PERFUSIONSREAKTORS. DAS MEDIUM STRÖMT DURCH DAS MIT ZELLEN BESIEDELTE GERÜSTMATERIAL .....	13
ABBILDUNG 3-2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER BIOGENESE UND SEKRETION VON WNT-PROTEINE . 19	
ABBILDUNG 3-3: MODELL DES KANONISCHEN WNT/B-CATENIN-SIGNALTRANSDUKTIONSWEGS. ....	21
ABBILDUNG 3-4: WNT-ANTAGONISTEN (LINKE ABBILDUNG) UND AGONISTEN (RECHTE ABBILDUNG).....	23
ABBILDUNG 3-5: DIE UNTERSCHIEDLICHEN MECHANISMEN, DURCH DIE DER WNT/B-CATENIN-SIGNALWEG DIE OSTEOGENESE REGULIERT.....	24
ABBILDUNG 4-1: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME DER PLGA MIKROSPHÄREN AUF SPONCERAM® .....	29
ABBILDUNG 4-2: STRUKTUR DES PLGA.....	30
ABBILDUNG 4-3: KUMULATIVE FREISETZUNG DES BMP-2 AUS PLGA MIKROSPHÄREN.....	31
ABBILDUNG 4-4: VON KOSSA FÄRBUNG DER ADMSC (LINKS) UND DER UCMSC (RECHTS) .....	33
ABBILDUNG 4-5: DIE ABBILDUNGEN ZEIGEN EINE CALCEIN FÄRBUNG (LINKS) UND EINE VON KOSSA FÄRBUNG (RECHTS) DER UCMSC. ....	34
ABBILDUNG 4-6: AKTIVITÄT DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE IM KULTURÜBERSTAND (LINKS) UND DAS ERGEBNIS DER CALCEIN FÄRBUNG (RECHTS) .....	34
ABBILDUNG 4-7: ALIZARINROT FÄRBUNG DER UCMSC NACH 28 TAGEN STATISCHER KULTIVIERUNG AUF SPONCERAM® .....	36
ABBILDUNG 4-8: ALIZARINROT FÄRBUNG DER ADMSC NACH 28 TAGEN STATISCHER KULTIVIERUNG.....	36
ABBILDUNG 4-9: ERGEBNIS DER AKTIVITÄTSMESSUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE ÜBER 28 TAGE STATISCHER KULTIVIERUNG AUF SPONCERAM® .....	37
ABBILDUNG 4-10: ALIZARINROT FÄRBUNG DER ADMSC (LINKS) UND DER UCMSC (RECHTS) NACH 28 TAGEN STATISCHER KULTIVIERUNG.....	38
ABBILDUNG 4-11: ALIZARINROT FÄRBUNG DER ADMSC (LINKS) UND DER UCMSC (RECHTS) NACH 28 TAGEN STATISCHER KULTIVIERUNG.....	38
ABBILDUNG 4-12: ERGEBNIS DER AKTIVITÄTSMESSUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE ÜBER 28 TAGE STATISCHER KULTIVIERUNG.....	39
ABBILDUNG 4-13: DEFORMATION EINER ZELLE HERVORGERUFEN DURCH FLÜSSIGKEITSSCHERSTRESS (OBEN) UND MECHANISCHE DEHNUNG(UNTEN) .....	42
ABBILDUNG 4-14: SAUERSTOFFGEHALT DES MEDIUMS WÄHREND EINER 3 X4 H STIMULATION.....	44
ABBILDUNG 4-15: SAUERSTOFFGEHALT DES MEDIUMS WÄHREND EINER 3 X8 H STIMULATION.....	44
ABBILDUNG 4-16: ZELLVIABILITÄT DER ADMSC (LINKS) UND UCMSC (RECHTS).....	47
ABBILDUNG 4-17: ERGEBNIS DER RT-PCR DER ADMSC NACH EINER 15 MINUTEN STIMULATION.....	48
ABBILDUNG 4-18: ERGEBNIS DER RT-PCR DER UCMSC NACH EINER 15 MINUTEN STIMULATION.....	50

ABBILDUNG 4-19: AKTIVITÄTSMESSUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE DER ADMSC (LINKS) UND DER UCMSC (RECHTS).....	52
ABBILDUNG 4-20: DAPI/AP DOPPELFÄRBUNG DER ADMSC DER 15 MINUTEN KONTROLLE (LINKS) UND DAPI/BSP-2 DOPPELFÄRBUNG NACH EINER KONTINUIERLICHEN STIMULATION (RECHTS).....	53
ABBILDUNG 4-21: DAPI/AP DOPPELFÄRBUNG DER UCMSC NACH EINER 1X4 H STIMULATION(LINKS) UND DAPI/BSP-2 DOPPELFÄRBUNG NACH EINER 3X4 H STIMULATION (RECHTS).....	53
ABBILDUNG 4-22: ZELVIABILITÄT DER ADMSC (LINKS) UND UCMSC (RECHTS).....	54
ABBILDUNG 4-23: ERGEBNIS DER RT-PCR DER ADMSC NACH EINER 15 MINUTEN STIMULATION IN EINEM MIT PLGA MIKROSPHÄREN BELADENEN KOLLAGEN-NETZWERK. ....	55
ABBILDUNG 4-24: ERGEBNIS DER RT-PCR DER UCMSC NACH EINER KONTINUIERLICHEN STIMULATION IN EINEM MIT PLGA MIKROSPHÄREN BELADENEN KOLLAGEN-NETZWERK.....	56
ABBILDUNG 4-25: DIE AKTIVITÄT DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE DER ADMSC (LINKS) UND DER UCMSC (RECHTS).....	59
ABBILDUNG 4-26: DAPI/AP DOPPELFÄRBUNG DER ADMSC NACH EINER 1X4 H STIMULATION (LINKS) UND NACH EINER 3X4 H STIMULATION (RECHTS).....	60
ABBILDUNG 4-27: DAPI/AP DOPPELFÄRBUNG DER UCMSC NACH EINER 3X15 MINUTEN STIMULATION (LINKS) UND DAPI/BSP-2 DOPPELFÄRBUNG NACH EINER 1X15 MINUTEN STIMULATION(RECHTS). ..	61
ABBILDUNG 4-28: Z <sup>®</sup> RPD SYSTEM: DIE EINHEIT BESTEHT AUS EINER GMP KONFORMEN STERILWERKBANK, IN DER SICH DER DREHBETT-BIOREAKTOR BEFINDET, EINER STEUEREINHEIT UND EINEM COMPUTER ZUR ONLINE ANALYTIK.....	64
ABBILDUNG 4-29: Z <sup>®</sup> RPD REAKTORSYSTEM MIT VIER BIOREAKTOREN IM PARALLEL BETRIEB (QUELLE: FRANKE, TCI). ....	66
ABBILDUNG 4-30: BMP-2 KONZENTRATION IM MEDIUM EINES BIOREAKTORS (R4) WÄHREND DER KULTIVIERUNG DER ADMSC AUF, MIT PLGA MIKROSPHÄREN BESCHICHTETEM, SPONCERAM <sup>®</sup> .....	70
ABBILDUNG 4-31: DAPI FÄRBUNG DER UCMSC NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG IM BIOREAKTOR. ABGEBILDET SIND PROBEN AUS REAKTOR 1 (LINKS) UND 2 (RECHTS). ....	71
ABBILDUNG 4-32: ALIZARINROT FÄRBUNG DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG IM BIOREAKTOR.....	71
ABBILDUNG 4-33: ERGEBNISSE DER SEMIQUANTITATIVEN PCR DER UCMSC AUF SPONCERAM <sup>®</sup> .....	73
ABBILDUNG 4-34: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG.....	73
ABBILDUNG 4-35: TOLUIDIN BLAU FÄRBUNG DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG. ....	75
ABBILDUNG 4-36: HISTOLOGISCHE FÄRBUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG IM BIOREAKTOR. ....	76
ABBILDUNG 4-37: ALIZARINROT FÄRBUNG DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG IM BIOREAKTOR. ....	76

ABBILDUNG 4-38: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG..... 77

ABBILDUNG 4-39: TOLUIDIN BLAU UND DAPI FÄRBUNG DER UCMSC NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG IM BIOREAKTOR. .... 79

ABBILDUNG 4-40: HISTOLOGISCHE FÄRBUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG IM BIOREAKTOR. .... 79

ABBILDUNG 4-41: ALIZARINROT FÄRBUNG DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG IM BIOREAKTOR. .... 80

ABBILDUNG 4-42: ERGEBNISSE DER SEMIQUANTITATIVEN PCR VON UCMSC AUF SPONCERAM® NACH DER DYNAMISCHEN KULTIVIERUNG IM Z®RPD-SYSTEM ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 28 TAGEN..... 81

ABBILDUNG 4-43: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG..... 82

ABBILDUNG 4-44: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG..... 82

ABBILDUNG 4-45: DAPI FÄRBUNG DER ZELLKERNE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG. ABGEBILDET SIND PROBEN AUS REAKTOR 1 (LINKS) UND 2 (RECHTS). .... 84

ABBILDUNG 4-46: ALIZARINROT FÄRBUNG DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG. .... 85

ABBILDUNG 4-47: ERGEBNISSE DER SEMIQUANTITATIVEN PCR DER ADMSC AUF SPONCERAM® NACH DER DYNAMISCHEN KULTIVIERUNG IM Z®RPD-SYSTEM ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 28 TAGEN..... 85

ABBILDUNG 4-48: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN EINES ZELL-KERAMIK KONSTRUKTES NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG. .... 86

ABBILDUNG 4-49: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG..... 86

ABBILDUNG 4-50: HARTSCHLIFFE (LINKS) UND  $\mu$ CT AUFNAHME (RECHTS) DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG..... 87

ABBILDUNG 4-51: TOLUIDIN BLAU UND DAPI FÄRBUNG DER ZELLEN BZW. ZELLKERNE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG. .... 89

ABBILDUNG 4-52: ALIZARINROT FÄRBUNG DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG. .... 90

ABBILDUNG 4-53: ERGEBNISSE DER SEMIQUANTITATIVEN PCR DER ADMSC AUF SPONCERAM® NACH DER DYNAMISCHEN KULTIVIERUNG IM Z®RPD-SYSTEM ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 28 TAGEN..... 91

ABBILDUNG 4-54: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG..... 92

ABBILDUNG 4-55: DAPI FÄRBUNG FÄRBUNG DER ZELLKERNE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG. .... 94

ABBILDUNG 4-56: ALIZARINROT FÄRBUNG DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG. .... 95

ABBILDUNG 4-57: HISTOLOGISCHE FÄRBUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG IM BIOREAKTOR. ....	95
ABBILDUNG 4-58: ERGEBNISSE DER SEMIQUANTITATIVEN PCR DER ADMSC AUF DEM KOMPOSITMATERIAL SPONCERAM®/PLGA MIKROSPHÄREN NACH DER DYNAMISCHEN KULTIVIERUNG IM Z®RPD-SYSTEM ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 28 TAGEN. ....	96
ABBILDUNG 4-59: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHME EINES ZELL-KERAMIK KONSTRUKTES NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG. ....	97
ABBILDUNG 4-60: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON ZELL-KERAMIK KONSTRUKTEN NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER KULTIVIERUNG. ....	97
ABBILDUNG 7-1: REM- AUFNAHME VON MATRISTYPT. VERGRÖßERUNG: 500-FACH.....	120
ABBILDUNG 7-2: MAKROPORÖSE STRUKTUR VON SPONCERAM® .....	121
ABBILDUNG 7-3: HERSTELLUNG VON MIKROSPHÄREN DURCH LÖSUNGSMITTELEVAPORATION .....	122
ABBILDUNG 7-4: SILIKONSCHALE MIT EINGEBAUTEM KOLLAGEN-NETZWERK.....	133
ABBILDUNG 7-5: PRINZIP DER DYNAMISCHEN STOßLÖSCHUNG DURCH SAUERSTOFF .....	134
ABBILDUNG 7-6: SCHALTBILD DES Z®RP-REAKTORSYSTEMS.....	136
ABBILDUNG 7-7: TECHNISCHE ZEICHUNG DES Z®RPD-REAKTORS, .....	137
ABBILDUNG 7-8: REAKTION DES GELBEN TETRAZOLIUM-REAGENZ ZUM BLAUEN FORMAZAN IN DEN MITOCHONDRIEN (ADAPTIERT AUS: SCUDIERO ET AL., 1988) <sup>136</sup> .....	139
ABBILDUNG 7-9: UMSETZUNG VON P-NITROPHENYLPHOSPHAT ZUR P-NITROPHENOL .....	140
ABBILDUNG 7-10: HYDROLYSE VON BCIP MIT ANSCHLIEßENDER OXIDATION ZUM UNLÖSLICHEN INDIGOFARBSTOFF.....	141
ABBILDUNG 7-11: REDUKTION VON NBT .....	142
ABBILDUNG 7-12: STRUKTUR VON ALIZARINROT S.....	143
ABBILDUNG 7-13: STRUKTUR VON 4',6-DIAMIDINO-2-PHENYLINDOL (DAPI).....	144
ABBILDUNG 7-14: STRUKTUR VON 3-AMINO-7-DIMETHYLAMINO-2-METHYLPHENOTHIAZIN-5- IUMCHLORID (TOLUIDINBLAU) .....	145
ABBILDUNG 7-15: ERGEBNIS DER RT-PCR DER ADMSCNACH EINER 4 H STIMULATION. ....	152
ABBILDUNG 7-16: ERGEBNIS DER RT-PCR DER ADMSCNACH EINER KONTINUIERLICHEN STIMULATION. .	152
ABBILDUNG 7-17: ERGEBNIS DER RT-PCR DER UCMSC NACH EINER 4 H STIMULATION. ....	153
ABBILDUNG 7-18: ERGEBNIS DER RT-PCR DER UCMSC NACH EINER KONTINUIERLICHEN STIMULATION..	153
ABBILDUNG 7-19: ERGEBNIS DER RT-PCR DER ADMSCNACH EINER 4 H STIMULATION IN EINEM MIT PLGA MIKROSPHÄREN BELADENEM KOLLAGEN-NETZWERK. ....	154
ABBILDUNG 7-20: ERGEBNIS DER RT-PCR DER ADMSCNACH EINER KONTINUIERLICHEN STIMULATION IN EINEM MIT PLGA MIKROSPHÄREN BELADENEM KOLLAGEN-NETZWERK.....	154
ABBILDUNG 7-21: ERGEBNIS DER RT-PCR DER UCMSC NACH EINER 15 MINUTEN STIMULATION IN EINEM MIT PLGA MIKROSPHÄREN BELADENEM KOLLAGEN-NETZWERK.....	155
ABBILDUNG 7-22: ERGEBNIS DER RT-PCR DER UCMSC NACH EINER 4 H STIMULATION IN EINEM MIT PLGA MIKROSPHÄREN BELADENEM KOLLAGEN-NETZWERK. ....	155

ABBILDUNG 7-23: HISTOLOGISCHE FÄRBUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE NACH 28 TAGEN  
 DYNAMISCHER KULTIVIERUNG ..... 156

ABBILDUNG 7-24: VON KOSSA FÄRBUNG VON ZELL-KERAMIK KONSTRUKTEN AUS DEN BIOREAKTOREN 156

ABBILDUNG 7-25: VON KOSSA FÄRBUNG VON ZELL-KERAMIK KONSTRUKTEN AUS DEN BIOREAKTOREN 156

ABBILDUNG 7-26: VON KOSSA FÄRBUNG VON ZELL-KERAMIK KONSTRUKTEN AUS DEN BIOREAKTOREN 157

ABBILDUNG 7-27: VON KOSSA FÄRBUNG DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER  
 KULTIVIERUNG. .... 157

ABBILDUNG 7-28: HISTOLOGISCHE FÄRBUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE NACH 28 TAGEN  
 DYNAMISCHER KULTIVIERUNG IM BIOREAKTOR. .... 157

ABBILDUNG 7-29: VON KOSSA FÄRBUNG DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER  
 KULTIVIERUNG. ABGEBILDET SIND PROBEN AUS DEN BIOREAKTOREN ..... 158

ABBILDUNG 7-30: VON KOSSA FÄRBUNG DER ZELL-KERAMIK KONSTRUKTE NACH 28 TAGEN DYNAMISCHER  
 KULTIVIERUNG. ABGEBILDET SIND PROBEN AUS DEN BIOREAKTOREN ..... 158

## Tabellenverzeichnis

<b>TABELLE 1:</b> DURCHGEFÜHRTE STIMULATIONSMUSTER.....	46
<b>TABELLE 2:</b> GENEXPRESSION DER ADMSC NACH EINER MECHANISCHEN STIMULATION.....	49
<b>TABELLE 3:</b> GENEXPRESSION DER UCMSC NACH EINER MECHANISCHEN STIMULATION.....	49
<b>TABELLE 4:</b> POSITIVE ANTIKÖRPER FÄRBUNG VON AP UND BSP-2 DER ADMSC UND UCMSC.....	52
<b>TABELLE 5:</b> GENEXPRESSION DER ADMSC NACH EINER MECHANISCHEN STIMULATION.....	56
<b>TABELLE 6:</b> GENEXPRESSION DER UCMSC NACH EINER MECHANISCHEN STIMULATION.....	57
<b>TABELLE 7:</b> POSITIVE ANTIKÖRPER FÄRBUNG VON ALKALISCHER PHOSPHATASE UND BSP-2.....	60
<b>TABELLE 8:</b> GLUKOSEVERBRAUCH UCMSC WÄHREND DER DYNAMISCHEN KULTIVIERUNG.....	71
<b>TABELLE 9:</b> GLUKOSEVERBRAUCH DER UCMSC WÄHREND DER DYNAMISCHEN KULTIVIERUNG.....	75
<b>TABELLE 10:</b> GLUKOSEVERBRAUCH DER UCMSC WÄHREND DER DYNAMISCHEN KULTIVIERUNG.....	78
<b>TABELLE 11:</b> GLUKOSEVERBRAUCH DER ADMSC WÄHREND DER DYNAMISCHEN KULTIVIERUNG.....	84
<b>TABELLE 12:</b> GLUKOSEVERBRAUCH DER ADMSC WÄHREND DER DYNAMISCHEN KULTIVIERUNG.....	89
<b>TABELLE 13:</b> GLUKOSEVERBRAUCH DER ADMSC WÄHREND DER DYNAMISCHEN KULTIVIERUNG.....	93
<b>TABELLE 14:</b> MINERALISIERUNG UND AP PRODUKTION IN DEN UNTERSCHIEDLICHEN.....	100
<b>TABELLE 15:</b> EIGENSCHAFTEN VON SPONCERAM®.....	121
<b>TABELLE 16:</b> SEQUENZEN DER VERWENDETEN PRIMERPAARE FÜR DIE RT-PCR.....	150

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
adMSC	<i>adipose mesenchymal stem cells</i>
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5- Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>
c	Konzentration
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
° C	Grad Celcius
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s modified eagle`s medium
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ECM	extrazelluläre Matrix

EL-Puffer	Erythrozyten Lysis Puffer
FCS	fetales Kälber Serum
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
L	Liter
mL	Milliliter
mg	Milligramm
mM	Millimolar
μL	Mikroliter
M	Molar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	Tetrazoliumbromid
nm	Nanometer
OC	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion <i>Polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
PLGA	Polylactid-co-Glycolid



REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure <i>Ribonucleic acid</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute <i>revolutions per minute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TSA	<i>Tyramide signal Amplification</i>
ucMSC	<i>umbilical cord mesenchymal stem cells</i>
UV	Ultraviolett

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

## Zusammenfassung

Bei einer Fraktur des Knochens, die mit einem hohen Verlust an Knochengewebe verbunden ist, bedarf es oft einer Transplantation von Ersatzgewebe. Autologes Gewebe ist allerdings nur in begrenztem Maße verfügbar. Daher wird in der Regel auf allogenes oder xenogenes Transplantationsmaterial zurückgegriffen. Diese Methodik ist kritisch zu betrachten, da körperfremdes Gewebe einige Risiken in sich birgt. Um diese Problematik zu lösen, wird im Bereich des Knochen *Tissue Engineerings* nach Methoden gesucht, *in vitro* ein funktionelles und bioartifizielles Knochenkonstrukt zu produzieren, das anschließend in den Defekt eingesetzt werden kann.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der dynamischen Kultivierung mesenchymaler Stammzellen auf einem keramischen Trägermaterial in einem Drehbettreaktor zur Herstellung eines funktionalen Knochenersatzmaterials. Die Zellen wurden in einem System der Firma Zellwerk GmbH kultiviert, welches eine parallele Kultivierung in 4 Bioreaktoren ermöglicht. Ziel der parallelen Kultivierung war, die Reproduzierbarkeit der Synthese eines künstlich hergestellten Knochenkonstruktes zu untersuchen. Nach vierwöchiger Kultivierung waren die Keramiken mit einer dicht besiedelten Zellschicht überwachsen, wobei die einzelnen Zellen in eine mineralisierte extrazelluläre Matrix eingebettet waren. Vor Beginn der dynamischen Kultivierungen wurde das osteogene Differenzierungspotential der mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe und der Whartonschen Sulze der Nabelschnur zunächst unter statischen Bedingungen, sowohl in zweidimensionaler als auch in dreidimensionaler Umgebung untersucht. Weiterhin wurden die mesenchymalen Stammzellen mechanischen Stimulationen ausgesetzt, um den Einfluss mechanischer Dehnung auf die mesenchymalen Stammzellen zu ermitteln. Dafür wurden die Zellen in ein dreidimensionales Kollagen-Netzwerk eingebracht und in unterschiedlichen Zeitmustern bei 1 Hz und 5 % Dehnungsamplitude mechanisch stimuliert. Dabei konnte schon bei kurzzeitigen Stimulationen eine Reaktion der Zellen auf die Stimulation ermittelt werden.

Schlagworte: adulte mesenchymale Stammzellen, osteogene Differenzierung, mechanische Stimulation, dynamische Kultivierung, Reproduzierbarkeit

## Abstract

A bone fracture with high loss of bone tissue often requires a transplantation of substitute tissue. Since the use of autologous tissue is limited, generally allogenic or xenogenic material is used. These foreign materials implicated some risks and have to be seen critically. To solve this problem, tissue engineering try to produce bioartificial functional bone constructs *in vitro*, which can be implanted into bone defects *in vivo*.

The focus of this work was the dynamic cultivation in a rotating bed bioreactor of mesenchymal stem cells on a ceramic material to produce a functional bone substitute material. The cells were cultivated in system, developed by Zellwerk GmbH, which allows a parallel cultivation of four bioreactors. The aim of this parallel cultivation was, to test the reproducibility of an *in vitro* produced functional bone construct. After four weeks of dynamic cultivation in the rotating bioreactors the ceramics were settled with a high density of cells, which were embedded in a mineralized extracellular matrix.

Before the dynamic cultivations, the mesenchymal stem cells were cultivated and differentiated into the osteogenic lineage under static conditions in two-dimensional and three-dimensional environment. In this work the osteogenic potential of adipose and umbilical cord mesenchymal stem cells was determined. Furthermore, the cells were exposed to mechanical strain to determine the effect of mechanical elongation on to the differentiation capacity of the cells. Therefore the cells were placed in a three-dimensional Collagen-network and were stimulated for different timetables with 1 Hz and 5 % elongation amplitude. Already a short stimulation time evoked a response of the cells.

Keywords: adult mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, mechanical stimulation, dynamic cultivation, reproducibility



## 1 Einleitung

Knochengewebe besitzt die Fähigkeit sich nach einer Verletzung oder Krankheit bis zu einer gewissen Größe des Defektes selber zu regenerieren. Verletzungen hingegen, welche mit einem hohen Verlust an Knochengewebe verbunden sind, wie schwere Frakturen oder Tumorentfernungen, stellen bis heute ein großes Problem dar, da der Körper nicht in der Lage ist, diese Defekte selber zu regenerieren. Die bisherigen Behandlungsmethoden beruhen auf dem Einsatz von autologem, also körpereigenem, oder allogem und xenogenem Knochenmaterial. Diese Ersatzgewebe sind allerdings aufgrund der Menge an verfügbarem körpereigenem Material bzw. Immunreaktionen auf allogene und xenogene Spenden, kritisch zu betrachten.<sup>1</sup>

Ein wichtiges und weitreichendes Forschungsgebiet im Bereich der Regenerativen Medizin, welches sich mit dieser Problematik beschäftigt ist das *Tissue Engineering*. Ziel des *Tissue Engineerings* ist es, *in vitro* ein bioartifizielles Gewebe herzustellen, welches *in vivo* das beschädigte Gewebe ersetzen kann. Das *Tissue Engineering* ist ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, welches sich aus verschiedenen Teilbereichen zusammensetzt. Zum einen werden geeignete Gerüstmaterialien benötigt. Diese synthetisch hergestellten Materialien sollten in ihrer Struktur und den mechanischen Eigenschaften dem Zielorgan möglichst ähnlich sein. Dies ist eine große Herausforderung, da beispielsweise Knochengewebe eine starre Form aufweist, dennoch aber eine hochporöse Struktur besitzt und mit Kapillargefäßen durchzogen ist. Weiterhin sollte das Gerüstmaterial resorbierbar sein, sodass sich nach dem Einsetzen des Konstruktes in den Defekt im Körper, das künstliche Gerüst langsam auflöst und durch nachwachsendes körpereigenes Gewebe ersetzt wird. Die Schwierigkeit liegt darin die Resorptionsgeschwindigkeit des Gerüstmaterials dem Aufbauprozess des körpereigenen Gewebes anzupassen. Wird es zu schnell abgebaut, ist erneut ein Defekt vorhanden, bei einem zu langsamen Abbau kann es zu einem unkontrollierten Wachstum der Zellen kommen.

Eine weitere wichtige Komponente sind die Zellen, die auf dem Gerüstmaterial kultiviert werden und in das jeweilige Zielgewebe ausdifferenzieren sollen, um das

beschädigte Gewebe zu ersetzen. Dabei liegt der Fokus auf der Verwendung von Stammzellen, welche in der Lage sind, in verschiedene Zellarten des Organismus auszudifferenzieren. Erste Studien zeigen Hinweise darauf, dass einige Stammzelltypen, insbesondere die Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe, keine oder nur wenige Immunreaktionen auslösen.<sup>2, 3</sup> Dies hätte zur Folge, dass nicht zwingend autologe Zellen verwendet werden müssten, sondern es bestünde die Möglichkeit, allogene Zellen, also Zellen bei denen der Spender und Empfänger zur gleichen Art gehören, einzusetzen.

Die Konstrukte aus Zellen und Gerüstmaterial werden meist in einem, eigens für das entsprechende Zielgewebe konstruierten, Bioreaktor kultiviert. Ein Bioreaktor ermöglicht neben dem Einstellen physiologischer Bedingungen und deren kontinuierlicher Kontrolle auch die Applikation von physikalischer Stimulation auf das Zell-Material Konstrukt, welches auf diese Weise physikalischen Bedingungen ausgesetzt wird, die den *in vivo* Bedingungen des Zielorgans möglichst ähnlich sind. Ein weiterer Vorteil einer dynamischen Kultivierung in einem Bioreaktor gegenüber einer statischen Kultivierung besteht darin, dass die Zellen durch die Bewegung des Mediums oder des Zell-Matrix-Konstruktes optimal mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Im Bereich des Knochen *Tissue Engineerings* werden meist physikalischen Stimulationen in Form von Dehnung, Scherstress oder Druckapplikation angewendet, wobei im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf der physikalischen Stimulation in Form von Scherstress und Dehnungsapplikation lag. Eine Stimulation kann jedoch auch chemisch in Form eines Wachstumsfaktors, der die Differenzierung der Zellen in die gewünschte Richtung induziert, erfolgen. Das mit ausdifferenzierten Zellen besiedelte Gerüstmaterial soll schließlich in den Defekt im Körper eingebaut werden, um nicht regenerierbares Knochengewebe infolge einer Fraktur oder einer Tumorentfernung zu ersetzen.

Weiterhin kann das Prinzip des *Tissue Engineerings* zum einen dadurch genutzt werden dreidimensionale Testsysteme aufzubauen, die im Bereich der Pharmaforschung in einigen Jahren in der Lage sein könnten, Tierversuche zu ersetzen oder ihre Anzahl weiter zu minimieren. Zum anderen könnten diese Testsysteme in der Kosmetik- und Chemiebranche zur Biokompatibilitätstestung herangezogen werden.

## 2 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit soll die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe und der Nabelschnur untersucht werden, wobei die Isolierung der Stammzellen aus der Whartonschen Sulze der Nabelschnur am Institut für Technische Chemie selbst erfolgen soll. Der große Vorteil bei der Verwendung dieser beiden Zelltypen liegt darin, dass sie bei der Geburt bzw. bei Liposuktionen als Abfallprodukte in dem jeweiligen Gewebe anfallen und in unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen.

Die Zellen sollen zunächst statisch sowohl in zweidimensionaler Umgebung auf Kulturplatten als auch auf dreidimensionalen porösen Gerüstmaterialien kultiviert und in die osteogene Richtung differenziert werden. Weiterhin sollen die Auswirkungen mechanischer Stimulation in Form von zyklischer Dehnung auf die Zellen untersucht werden. Dafür werden die Zellen in ein dreidimensionales Kollagen-Netzwerk eingebracht und in Stimulationsapparaturen, die am Institut für Technische Chemie entwickelt und gebaut wurden, mechanisch gedehnt. Dabei sollen zeitlich verschiedene Stimulationsmuster zum Einsatz kommen, um die Auswirkungen von kurzzeitiger und langzeitiger Dehnungsapplikation auf die Proliferation und die Differenzierung der Zellen zu ermitteln.

Der Schwerpunkt der Arbeit soll die dynamische Kultivierung der Zellen in einem Drehbettreaktor (Z<sup>®</sup>RPD) sein, um nach dem Prinzip des *Tissue Engineerings* funktionales Knochenersatzgewebe zu generieren. Dabei dient ein poröses Aluminiumoxid als Gerüstmaterial. Dieses soll mit den mesenchymalen Stammzellen besiedelt werden und in dem Drehbettreaktor Langzeitkultivierungen unterworfen werden. Durch die Rotation des Trägermaterials in dem Bioreaktor sind die Zellen während der Kultivierung Flüssigkeitsströmen ausgesetzt, welche durch den Mediumfluss verursacht werden. Alle Langzeitkultivierungen werden in 4 parallel betriebenen Bioreaktoren durchgeführt, wobei in jedem einzelnen Bioreaktor die gleichen Bedingungen herrschen, um die Reproduzierbarkeit des Systems zu untersuchen.

Des Weiteren sollen in allen Experimenten die Auswirkungen der physikalischen Stimulation durch Wachstumsfaktoren auf die osteogene Differenzierung der Zellen ermittelt werden. Dafür werden die Gerüstmaterialien mit PLGA Mikrosphären beladen, die als *release system* fungieren und den Wachstumsfaktor BMP-2 freisetzen.

Der Grad der osteogenen Differenzierung der Zellen soll nach den Experimenten mit histologischen Färbungen untersucht werden. Weiterhin sollen Genexpressionsanalysen und Antikörper Färbungen durchgeführt werden, um den Zustand der Zellen nach den Kultivierungen im Bioreaktor zu ermitteln.



### 3 Theoretische Grundlagen

#### 3.1 Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe und der Nabelschnur

##### 3.1.1 *Isolierung mesenchymaler Stammzellen*

In den letzten Jahren wurden mesenchymale Stammzellen aus unterschiedlichen Ursprungsgeweben isoliert und charakterisiert. Die am intensivsten erforschten und bekanntesten mesenchymalen Stammzellen stammen aus dem Knochenmark und wurden schon 1976 von Friedenstein et al. publiziert.<sup>4</sup> Aber auch mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe<sup>5</sup>, dem peripheren Blut<sup>6</sup>, der Lunge<sup>7</sup>, der Nabelschnur<sup>8</sup> oder dem Herzgewebe<sup>9</sup> zeigen vielversprechende Eigenschaften in Bezug auf ihre Proliferation und Differenzierbarkeit in unterschiedliche Zelltypen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe (adMSC) und der Whartonschen Sulze der Nabelschnur (ucMSC) verwendet. Ein großer Vorteil dieser Zellen gegenüber den mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark ist die relative einfache Isolierung der Zellen ohne Risiken für den Patienten. Knochenmarkstammzellen werden üblicherweise mittels Punktion aus dem Knochenmark des Beckenkamms entnommen und anschließend mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation isoliert.<sup>10</sup> Dieser Eingriff ist für den Patienten mit einem Infektionsrisiko und Schmerzen verbunden. AdMSC können durch eine Liposuktion gewonnen werden. Dabei werden dem Patienten unter Lokalanästhesie kleine Mengen (100-200 mL) Fettgewebe entnommen, aus dem anschließend durch einen enzymatischen Verdau die adMSC gewonnen werden.<sup>5</sup> Dieser Eingriff birgt weniger Risiken als eine Beckenkampnpunktion. Völlig risikofrei können die ucMSCs isoliert werden. Direkt nach der Geburt wird die Nabelschnur in eine Antibiotika-haltige Nährlösung überführt. Die Isolierung erfolgt nach dem Entfernen der Blutgefäße durch einen enzymatischen Verdau oder durch Herauswachsen der Zellen aus dem Nabelschnurgewebe.<sup>11-14</sup>

Des Weiteren können durch eine Liposuktion des Fettgewebes und durch die Isolierung aus der Nabelschnur deutlich mehr mesenchymale Stammzellen gewonnen werden, da sowohl die Anzahl der MSCs im Knochengewebe sehr gering ist, als auch die Entnahme von Knochenmark limitiert ist. Fettgewebe und Nabelschnurgewebe hingegen stehen in großer Menge zur Verfügung. Im Knochenmark sind lediglich 0,001-0,1 % des entnommenen Gewebes mesenchymale Stammzellen.<sup>10</sup> Aus 1 g Fettgewebe hingegen können bis zu  $5 \times 10^3$  MSC isoliert werden, was der 500-fachen Menge an Knochenmarkstammzellen entspricht.<sup>15</sup> Lu et al isolierten Zellen aus der Nabelschnur und dem Knochenmark. Dabei war zwar die Menge der isolierten Zellen aus dem Knochenmark signifikant höher, die Zahl der Zellen jedoch die nach dem Ausplattieren adhärirten, war nahezu identisch ( $8.6 \times 10^5$ /cm Nabelschnur vs.  $8.4 \times 10^5$ /mL Knochenmark).<sup>16</sup>

### 3.1.2 Proliferationskapazität und Seneszenz

Eine wichtige Eigenschaft, die mesenchymale Stammzellen charakterisiert, ist deren Selbsterneuerungspotential. Sie sind in der Lage über gewisse Zeiträume identische Kopien ihrer selbst zu generieren.<sup>17</sup> Die Proliferationskapazität spielt eine wichtige Rolle für die Anwendung der Zellen im Bereich des *Tissue Engineerings*, da dabei *in vitro* in einem möglichst geringen Zeitraum sehr viele Zellen gezüchtet werden müssen. Die Proliferation von ucMSC ist im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark deutlich erhöht.<sup>18, 19</sup> Lu et al. untersuchten die Proliferation von ucMSC und MSC aus dem Knochenmark und stellten fest, dass die Verdopplungsraten der ucMSC signifikant höher waren. Die Verdopplungszeit der ucMSC in Passage 1 betrug 24 h und blieb bis Passage 10 nahezu konstant. Die Knochenmarkstammzellen hingegen wiesen in Passage 1 eine Verdopplungszeit von 40 h auf, die sich erst nach Passage 6 deutlich erhöhte.<sup>16</sup> Baksh et al. beobachteten die Verdopplungsraten von perivaskulären Zellen aus der Nabelschnur (UCPVC) und Knochenmarkstammzellen über einen Zeitraum von 20 Tagen. Ab dem siebten Tag der Kultivierung zeigten die UCPVC eine signifikant höhere Verdopplungszeit, als die Knochenmarkstammzellen. Des Weiteren stellten sie fest, dass die UCPVC nach

Erreichen der Konfluenz mehrschichtig weiterwachsen, während die Knochenmarkstammzellen ihre Proliferation aufgrund von Kontaktinhibitionen einstellen.<sup>18</sup> Auch die adMSC zeigen im Vergleich zu den Knochenmarkstammzellen eine höhere Proliferation.<sup>20</sup> Peng et al. publizierten Verdopplungszeiten von 45,2 h für adMSC und 61,2 h für Stammzellen aus dem Knochenmark. Außerdem stellten sie fest, dass die Knochenmarkstammzellen sich in ihrer Morphologie von den adMSC unterschieden und größer waren.<sup>21</sup> Allerdings gibt es bei den adMSC Unterschiede hinsichtlich der Verdopplungszeiten, je nach Ursprung der Zellen.<sup>22</sup> AdMSC aus dem subkutanen Fettgewebe weisen eine Verdopplungszeit von 4 Tagen auf, während Zellen aus dem omentalen Fettgewebe eine Verdopplungszeit von 5 Tagen aufweisen.<sup>23</sup>

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der für die Anwendung mesenchymaler Stammzellen im *Tissue Engineering* betrachtet werden muss, ist die Zellalterung. Dieser vorprogrammierte Alterungsprozess der Zellen, nach einer bestimmten Anzahl von Teilungen, wird als Seneszenz bezeichnet. Der Prozess der Seneszenz wird durch die Länge der Telomere (griech. *telos*: Ende), die die Chromosomenenden bilden, kontrolliert. Telomere sind guaninreiche DNA Stränge, die aus mehreren hundert Wiederholungen einer Sequenz aufgebaut sind.<sup>24</sup> Nach der Replikation bei jeder Zellteilung werden die Telomere verkürzt. Sobald die Telomere eine bestimmte Länge erreicht haben, werden die Zellen von der DNA-Polymerase als seneszent erkannt und ihre Proliferation wird eingeschränkt.<sup>25, 26</sup> Der Aufbau der Telomere wird enzymatisch durch Telomerase reguliert. Bei embryonalen Zellen zeigt Telomerase eine hohe Aktivität, so dass die Telomerlänge bei der Zellteilung vollständig wieder hergestellt wird. Die Aktivität nimmt nach der Geburt allerdings ab. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass sich humane MSC 30 bis 120mal teilen können, bevor ein Aktivitätsverlust der Telomerase eintritt. Eine Hochregulierung der Telomerase und eine damit verbundene verlängerte Lebensdauer der Zellen können *in vitro* durch Wachstumsfaktoren erreicht werden.<sup>26</sup>

UcMSC zeigen über mehrere Passagen keinerlei Anzeichen von Seneszenz.<sup>27, 28</sup> Conconi et al. kultivierten ucMSC über 16 Passagen ohne Variation in der Zellmorphologie und Anzeichen von Seneszenz.<sup>29</sup> Die Arbeitsgruppe Mitchell et al.

konnte nach 80 Zellteilungen keinerlei Veränderung in der Morphologie und den Verdopplungsraten von ucMSC, sowie Anzeichen für eine Seneszenz der Zellen feststellen.<sup>30</sup> AdMSC beginnen im Vergleich deutlich früher zu altern. Kern et al. kultivierten adMSC über mehrere Passagen und konnten seneszente Zellen ab der achten Passage nachweisen.<sup>20</sup> Dieses unterschiedliche Verhalten der Zellen, bezüglich der Seneszenz, könnte auf die Herkunft der Zellen zurückzuführen sein. Die ucMSC stammen aus dem Nabelschnurgewebe und sind daher sehr „juvenile“ Zellen, mit einem hohen Proliferationsvermögen und noch sehr hohen Telomerase Aktivität. Die adMSC hingegen stammen aus dem Fettgewebe adulter Spender aufgrund dessen sowohl das Proliferationsvermögen, als auch die Aktivität der Telomerase geringer ist.

### *3.1.3 Differenzierungspotential der mesenchymalen Stammzellen*

Dominici et al. publizierten 2006 die Minimalkriterien für humane mesenchymale Stammzellen, welche Zellen erfüllen müssen, um als mesenchymale Stammzellen definiert zu werden. Diese Kriterien umfassen drei wichtige Punkte. Mesenchymale Stammzellen müssen die Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90 exprimieren, dürfen aber nicht die Marker CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 $\alpha$  oder CD19 und HLA-DR Oberflächenmoleküle exprimieren. Des Weiteren müssen sie unter Standardkulturbedingungen auf Plastikculturoberflächen adhärieren und sich gezielt in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenzieren.<sup>31</sup>

Die Expressionsmuster der Oberflächenmarker von adMSC und ucMSC wurden vielfach publiziert, wobei die Ergebnisse der einzelnen Veröffentlichungen teilweise stark voneinander abweichen. Schaffler et al. untersuchten adMSC und stellten fest, dass die Zellen die Marker CD9, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166 und HLA I exprimieren, die Expression der Moleküle CD14, CD31, CD34, CD45, CD133, CD144, STRO-1 und HLA II konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.<sup>32</sup> Auch die Gruppe Kern et al. konnten eine Expression von CD44, CD73, CD29 und CD90 in adMSC nachweisen. CD14, CD34, CD45, CD133 und CD144 wurden wiederum nicht exprimiert.<sup>20</sup> UcMSC exprimieren die Marker CD45, CD105,

CD29 und CD73. Die Expression von CD34 und CD45 konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.<sup>33</sup> Hou et al. publizierten die Expression von CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105. Die Marker CD45 CD34 und HLA-II wurden nicht exprimiert.<sup>34</sup> Lu et al. konnten die Expression der Oberflächenmarker CD13, CD29, CD44, CD105, CD106, CD73, CD166 sowie HLA-ABC in ucMSC nachweisen, die Expression von CD14, CD34, CD38, CD45 CD31 und HLA-DR hingegen nicht.<sup>16</sup>

Die Differenzierbarkeit von adMSC und ucMSC in die osteogene, adipogene und chondrogene Richtung konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden. Des Weiteren wurde die Differenzierung der beiden Zelltypen in Kardiomyozyten,<sup>33, 35</sup> Endothel Zellen<sup>36, 37</sup> und neuronale Zellen publiziert.<sup>11, 38</sup>

Eine erfolgreiche adipogene Differenzierung von Zellen wird üblicherweise über die, mit einer *oil red* Färbung nachweisbaren, Bildung intrazellulärer Lipidmoleküle gezeigt. Für eine Induzierung der adipogenen Differenzierung von adMSC sind verschiedene bioaktive Wirkstoffe, wie FGF-2, Troglitazon, Pioglitazon, Rosiglitazon, Dexamethason, Transferrin, Insulin und 17- $\beta$ -Estradiol bekannt.<sup>39-42</sup> Hou et al differenzierten erfolgreich ucMSC in Adipozyten durch Supplementierung von Dexamethason und Insulin.<sup>34</sup> Auch die Differenzierung mit Ascorbat, Dexamethason und Indomethazin wurde publiziert.<sup>33</sup>

Die Ausbildung glänzender Zellkugeln mit Kollagen II Expression in der extrazellulären Matrix charakterisieren eine chondrogene Differenzierung. Durch Konzentrationsmessung von Glukosaminglykan (GAG), ein Bestandteil der extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe, und durch immunhistologische Färbungen von Kollagen II und Aggrecan kann eine chondrogene Differenzierung nachgewiesen werden. Eine Differenzierung von adMSC und ucMSC in die chondrogene Richtung wird durch die Supplementation von dem Wachstumsfaktor  $\beta$ 1, Ascorbat-2-phosphat und Dexamethason erzielt.<sup>34, 43</sup> Feng et al. differenzierten adMSC mit dem Wachstums- und Differenzierungsfaktor-5 (GDF5).<sup>44</sup> Auch die Stimulation der Zellen mit FGF-2 oder BMP-6 wurde publiziert.<sup>45, 46</sup>

Die osteogene Differenzierung von Zellen wird durch eine erhöhte Expression Alkalischer Phosphatase und durch die Mineralisation der extrazellulären Matrix, welche durch eine von Kossa oder Alizarinrot Färbung nachweisbar ist,

charakterisiert. Die Supplementation von Dexamethason,  $\beta$ -Glycerolphosphat und Ascorbat resultiert bei adMSC und ucMSC in einer Differenzierung der Zellen in die osteogene Richtung.<sup>20, 34</sup> Auch die Medienzugabe von 1,25-dihydroxyvitamin D3 und *Bone morphogenic proteins* (BMPs) wurde publiziert.<sup>47-49</sup>

Zusammenfassend konnten unterschiedliche Studien die Minimalkriterien für mesenchymale Stammzellen für adMSC und ucMSC hinreichend belegt werden. Die Expression bzw. fehlende Expression der relevanten Oberflächenmarker für mesenchymale Stammzellen konnte in verschiedenen Arbeiten für beide Zelltypen erfolgreich nachgewiesen werden und auch die Differenzierbarkeit der Zellen in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich dargelegt.

### 3.2 Bioreaktoren für das Knochen *Tissue Engineering*

Die Entwicklung neuer Bioreaktoren für den Einsatz im Knochen *Tissue Engineering* ist in den letzten Jahren stark vorangeschritten und stellt ein interdisziplinäres Forschungsgebiet dar, an dem Wissenschaftler aus unterschiedlichen Fachgebieten (z.B. Medizin, Chemie, Biologie und Maschinenbau) zusammen arbeiten. Dabei wurden die unterschiedlichsten Modelle entwickelt, um die *in vivo* Bedingungen, die im menschlichen Körper vorliegen, nachzuahmen und Zellen *in vitro* auf einem Gerüstmaterial zu Knochenzellen zu differenzieren.

Die dynamische Kultivierung von Zellen in einem Bioreaktor für die gezielte Differenzierung der Zellen in einen spezifischen Gewebetyp weist im Vergleich zu der statischen Kultivierung deutliche Vorteile auf. Bei der statischen Kultivierung wird in der Regel in Plastikkulturflaschen kultiviert, in denen die Zellen in einer zweidimensionalen Umgebung wachsen. Dabei wird allerdings, auf Grund der geringen Oberfläche, schnell die Konfluenz der Zellen erreicht, das heißt die Zellen kommen in Kontakt mit benachbarten Zellen. Die Zellen stellen bei Erreichen einer hohen Zelldichte ihr Wachstum in Folge der Kontaktinhibierung ein. Ein weiterer Nachteil ist, dass durch eine 2D Kultur keine dreidimensionalen Gewebestrukturen erhalten werden, wie sie für die Anwendung im *Tissue Engineering* benötigt werden. Daher werden die Zellen auf dreidimensionalen Gerüstmaterialien kultiviert. Zudem besitzen diese Materialien auf Grund ihrer porösen Struktur eine sehr große Oberfläche, so dass eine Kontaktinhibierung nach kurzer Zeit ausgeschlossen werden kann. Diese Zell-Material Konstrukte können sowohl statisch als auch dynamisch kultiviert werden. Allerdings birgt die statische Kultivierung auch hierbei einen großen Nachteil. Die Vermischung des Kulturmediums in dem statischen Behälter findet lediglich diffusionskontrolliert statt, so dass die Zellen, die im Inneren des Konstrukts wachsen, nur unzureichend mit frischem Medium versorgt werden und durch Nährstoffmangel und Aufkonzentration toxischer Stoffwechselprodukte langsam absterben. Durch eine dynamische Kultivierung hingegen wird das Kulturmedium durch Umpumpen oder *fluid flow* Systeme immer gleichmäßig durchmischt und die Zellen auf dem gesamten Konstrukt können gleichmäßig mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Ein weiterer Vorteil

der dynamischen Kultivierung in einem Bioreaktor ist, dass die Zellen gewissen Stimulationen, wie hydrostatischem Druck, Scherstress oder bestimmten Gaskonzentrationen von Sauerstoff und CO<sub>2</sub> ausgesetzt werden können, um die *in vivo* Umgebung des Gewebes, welches man in dem Bioreaktor durch gezieltes Ausdifferenzieren der Zellen auf dem Gerüstmaterial erzielen möchte, nachzuahmen. Auf diese Weise können die Zellen aus einer Kombination aus mechanischer Stimulation und definierter Medienzusammensetzung unter Bedingungen, die den *in vivo* Konditionen ähneln, gezielt differenziert werden.

Ein Bioreaktorsystem, welches im Bereich des *Tissue Engineerings* eingesetzt wird, sollte einige wichtige funktionale Eigenschaften besitzen. Dazu gehört ein Computersystem für die ständige online Überwachung und Aufnahme der wichtigsten Parameter wie Temperatur, Sauerstoffgehalt und pH-Wert. Des Weiteren sollte die sterile Probenentnahme von Medium möglich sein und eine kontinuierliche Zugabe von frischem Kulturmedium unter sterilen Bedingungen. Diese Anforderungen sind die Grundvoraussetzung, um unter definierten und kontrollierten Bedingungen reproduzierbar in einem Bioreaktor kultivieren zu können. Weiterhin sind diese Anforderungen unabdingbar, um in der Zukunft unter GMP (Good Manufacturing Practice) Bedingungen Gewebe für die klinische Anwendung zu produzieren.<sup>50</sup>

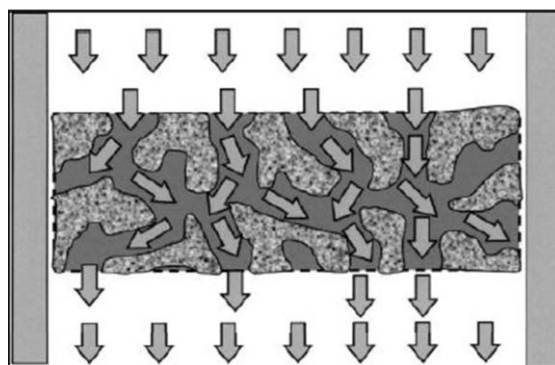
### 3.2.1 Reaktortypen

Die Vielfalt der verschiedenen Bioreaktoren, die im Bereich des *Tissue Engineerings* entwickelt und angewendet werden, ist groß. Die Funktionalität der einzelnen Reaktoren hängt davon ab, was für ein Gewebekonstrukt, z.B. Haut, Knochen, Knorpel oder Herzgewebe, in dem Bioreaktor gezüchtet werden soll. Um einen gewebespezifischen Bioreaktor zu entwickeln, sind umfangreiche Informationen über das biologische und mechanische Umfeld des Zielgewebes von Nöten.<sup>50</sup> Im Bereich des Knochen *Tissue Engineerings* wurden verschiedene Reaktoren entwickelt, die z.B. Scherstress, *in vivo* hervorgerufen durch Flüssigkeitsströme in den Blutgefäßen der Knochen, auf die Zellen ausüben oder die durch mechanische Dehnung der Zellen die Auswirkungen der Muskelspannungen und der Bewegung



auf den Knochen nachahmen.<sup>51, 52</sup> Der am häufigsten angewendete Basistyp der Bioreaktoren im Knochen *Tissue Engineering* ist der Perfusionsreaktor.

Ein Perfusionsreaktor wird durch einen kontinuierlichen Fluss von Medium über ein zwei- oder dreidimensionales Zellkonstrukt oder durch ein mit Zellen besiedeltes Gerüstmaterial charakterisiert. In Abbildung 3-1 ist ein Perfusionsreaktor schematisch abgebildet. Das Medium durchströmt das Gerüstmaterial mit den darauf adhärierenden Zellen. Durch die kontinuierliche Strömung des Mediums werden die Zellen stets mit frischem Medium versorgt und toxische Stoffwechselprodukte kontinuierlich entfernt. In einem Perfusionsreaktor sind nur minimale Konzentrationsgradienten zu beobachten.<sup>53</sup> Bei der Kultivierung im Perfusionsreaktor muss darauf geachtet werden, dass die Balance zwischen Nährstoff- und Abfalltransport zu bzw. von den Zellen weg, die Retention synthetisierter extrazellulärer Matrix und der induzierte Scherstress in den Poren des Gerüstmaterials erhalten bleibt. Bei zu geringen Strömungen findet nicht genügend Mediumtransfer in dem Gerüstmaterial statt, ist die Strömung zu hoch, lösen sich die Zellen von dem Material oder bilden keine extrazelluläre Matrix.<sup>54</sup> Janssen et al. verglichen unterschiedliche Flussraten von 0,4 mL/Minute bis zu 40 mL/Minute und stellten fest, dass bei geringen Flussraten die Zellzahl nach der Kultivierung auf dem Gerüstmaterial deutlich höher ist.<sup>55</sup>



**Abbildung 3-1:** Prinzip des Perfusionsreaktors. Das Medium strömt durch das mit Zellen besiedelte Gerüstmaterial (adaptiert aus: Bancroft et al.)<sup>56</sup>

Bei einer interstitiellen Flussgeschwindigkeit von 400  $\mu\text{m/s}$  wurde nach 5 Wochen Kultivierung im Perfusionsreaktor eine osteogene Differenzierung von humanen adMSC nachgewiesen.<sup>57</sup> Li et al. kultivierten Knochenmarkstammzellen im Perfusionsreaktor mit unterschiedliche Flussgeschwindigkeiten und variierten

zusätzlich die Größe des Scherstress, indem sie die Viskosität des Mediums veränderten. Dabei stellten sie fest, dass eine Erhöhung des Scherstress die osteogene Differenzierung der Knochenmarkstammzellen beschleunigt und die Mineralisierung der extrazellulären Matrix verbessert. Eine Erhöhung der Flussgeschwindigkeit wiederum hatte zur Folge, dass die Mineralisierung der extrazellulären Matrix verhindert wurde. Eine optimale osteogene Differenzierung der Zellen wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 mL/Minute und einem Scherstress von 0,015 Pa erreicht.<sup>58</sup>

Die Applikation von mechanischer Dehnung ist eine weitere Möglichkeit mesenchymale Stammzellen in die osteogene Richtung zu differenzieren. Die Bioreaktoren, die in diesem Bereich entwickelt wurden, üben eine Stimulation in Form von uniaxialer oder biaxialer Dehnung auf die Zellen aus. Um eine Dehnung der Zellen zu erreichen, werden diese entweder in eine dehnbare Matrix eingebettet oder adhären auf einer dehnbaren Oberfläche, z.B. biokompatible Silikone. Ignatius et al. verwendeten Kollagen als Zellträger und mischten die Zellsuspension mit einer flüssigen Kollagenlösung, die nach gewisser Zeit geliert, und erhielten so ein dreidimensionales, dehnbare und zellbeladenes Kollagen-Gel.<sup>59</sup> Am Institut für Technische Chemie wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Martijn van Griensven Stimulationsmaschinen für die uniaxiale Dehnung von Zellen entwickelt. In diesen Reaktoren können die Zellen sowohl auf zweidimensionalen Silikonoberflächen, als auch in dreidimensionalen Kollagen-Netzwerken stimuliert werden.<sup>60</sup> Die publizierten Stimulationsbedingungen bezüglich der Dauer und der Frequenz der mechanischen Dehnung weichen allerdings teilweise stark voneinander ab. Jagodzinski stimulierten Knochenmarkzellen dreimal täglich für zwei Stunden mit einer Ausdehnung von 8 % und einer Frequenz von 1 Hz über drei Tage.<sup>61</sup> Aber auch Stimulationen mit 7 % Ausdehnung und einer Frequenz von 0,25 Hz wurden durchgeführt.<sup>62</sup> Stimulationen bei 1 Hz und einer Dehnungsamplitude von 1 % über 21 Tage einer osteoblastären Zelllinie mit einer mechanischer Stimulation von 30 Minuten pro Tag resultieren in einer erhöhten Genexpression osteogener Marker. Des Weiteren konnte durch die Stimulation die Proliferation erhöht werden und die Zellen orientierten sich entlang der Dehnungsrichtung.<sup>59</sup> Institutseigene Arbeiten haben ergeben, dass Stimulationen mit einer Dehnungsamplitude von 5 % bei einer Frequenz von 1 Hz die größtmöglichen Auswirkungen auf adMSC haben.<sup>63</sup>

Auch die Stimulation von Zellen durch mechanische Kompression in einem Bioreaktor wurde publiziert. Jagodzinski et al. stimulierten humane Knochenmarkstammzellen durch zyklische Kompression und konnten eine erhöhte Genexpression von Osteocalcin, einem wichtigen Bestandteil der nicht-kollagenen extrazellulären Matrix des Knochens, nachweisen.<sup>64</sup> Allerdings liegt der Fokus bei dieser Art von Stimulation im Bereich des Knorpel *Tissue Engineerings*.

Die jüngsten Entwicklungen auf dem Gebiet der Bioreaktorentwicklung sind sogenannte *disposable* Bioreaktoren. Diese werden für den einmaligen Gebrauch produziert und stellen den Übergang der Standardbioreaktoren zu einem unter GMP Bedingungen arbeitenden System dar. Die Firma Zellwerk GmbH hat den Bioreaktor Z<sup>®</sup>RPD entwickelt. Dieses System beruht auf einem Perfusionsbioreaktor, der in einem GMP konformen Breeder betrieben werden kann. Das System ist so ausgelegt, dass die gesamte Steuereinheit mehrfach verwendet werden kann, da sie mit den Zellen nicht in Kontakt kommt. Lediglich die Bioreaktoren selber werden nach jeder Verwendung ausgetauscht. Die Firma Tissue Growth Technologies entwickelt Systeme (DynaGen<sup>®</sup> Series) für die 3D Kultivierung von Stammzellen und die Gewebezüchtung. Für den Einsatz im Knochen *Tissue Engineering* wurde ein Perfusionsreaktor entwickelt, bei dem sowohl die Perfusion als auch der Druck gemessen und kontrolliert werden und optional eine Stimulation durch hydrostatischen Druck hinzu geschaltet werden kann. Janssen et al. kultivierten humane Knochenmarkstammzellen erfolgreich in einem semi-automatischen *disposable* Perfusionsreaktor, der für die Produktion von klinisch relevanten Mengen an künstlich gezüchtetem Knochengewebe entwickelt wurde.<sup>65</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen durch mechanische Stimulation untersucht. Dabei wurden die Auswirkungen mechanischer Dehnung in einem dreidimensionalen Kollagen-Netzwerk und die Kultivierung in einem Drehbettreaktor ermittelt. Nähere Details zu den verwendeten Reaktoren befinden sich im Experimenterteil (siehe S. 28).

### 3.3 Signaltransduktion über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Stimulationsmethoden angewendet, um mesenchymale Zellen in die osteogene Richtung zu differenzieren. Dazu gehörten die mechanische Dehnung und Scherstress, hervorgerufen durch Flüssigkeitsströme. Alle Methoden wurden entwickelt, um die mechanischen Reize, die im menschlichen Körper auf das Knochengewebe einwirken, nachzuahmen. Um diese von außen einwirkenden Kräfte in Zellsignale umzuwandeln und im Knochen an die Stellen weiterzuleiten, an denen die Zellantwort auf den mechanischen Reiz hervorgerufen wird, existieren unterschiedliche Signaltransduktionswege im menschlichen Körper. Ein System, was maßgebliche Bedeutung bei der Differenzierung von Zellen in die osteogene Richtung besitzt, ist der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg.

Signaltransduktionen über die Wnt-Familie spielen eine fundamentale Rolle in der Zellproliferation, Zellpolarität und der Determinierung des Zellschicksals während der embryonalen Entwicklung und der adulten Homöostase. Mutationen des Signalweges führen daher in vielen Fällen zu Krebs oder Geburtsfehlern.<sup>66</sup> Wnt-Proteine sind Cystein-reiche Proteine, die aus 350 bis 400 Aminosäuren bestehen, ein Gewicht von ungefähr 40 kDa aufweisen und ein N-terminales Signalpeptid besitzen.<sup>67</sup> Aufgrund der primären Struktur der Aminosäuren sollten Wnt Proteine wasserlöslich sein, die Mehrheit ist jedoch hydrophob, was auf eine Anlagerung eines Palmitats an ein Cystein und an ein Serinmolekül im Protein zurückzuführen ist.<sup>68</sup> Der Name Wnt setzt sich zusammen aus *Wingless* und *Int-1*. Mutationen im *wingless*-Gen führen bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* zu Flügellosigkeit. Das *Int-1* Gen fördert bei Mäusen die Entwicklung von Brustkrebs, wenn seine Expression aktiviert wird. Beim Menschen sind 19 verschiedene Wnt-Proteine (Wnt1-Wnt19) bekannt.

Die unterschiedlichen Wnt-Proteine wirken über drei unterschiedliche Signalkaskaden. Es gibt die beiden nicht-kanonischen Signalwege, dazu gehört der PCP-Weg (Planar Cellpolarity Pathway) und der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg und den kanonische Signalweg, der auch als Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg bezeichnet wird. Der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg verläuft über einen Anstieg der intrazellulären

Calciumkonzentration als Folge einer Aktivierung durch Wnt-Proteine und dadurch zu einer Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten Signalmolekülen. Der PCP-Signalweg verläuft über die Aktivierung von bestimmten Signalmolekülen durch Wnt-Proteine, welche mit der Organisation des Zytoskeletts in Verbindung stehen. Der kanonische Signalweg wird im Folgenden detaillierter beschrieben.

### 3.3.1 *Wnt-Protein Biogenese und Sekretion*

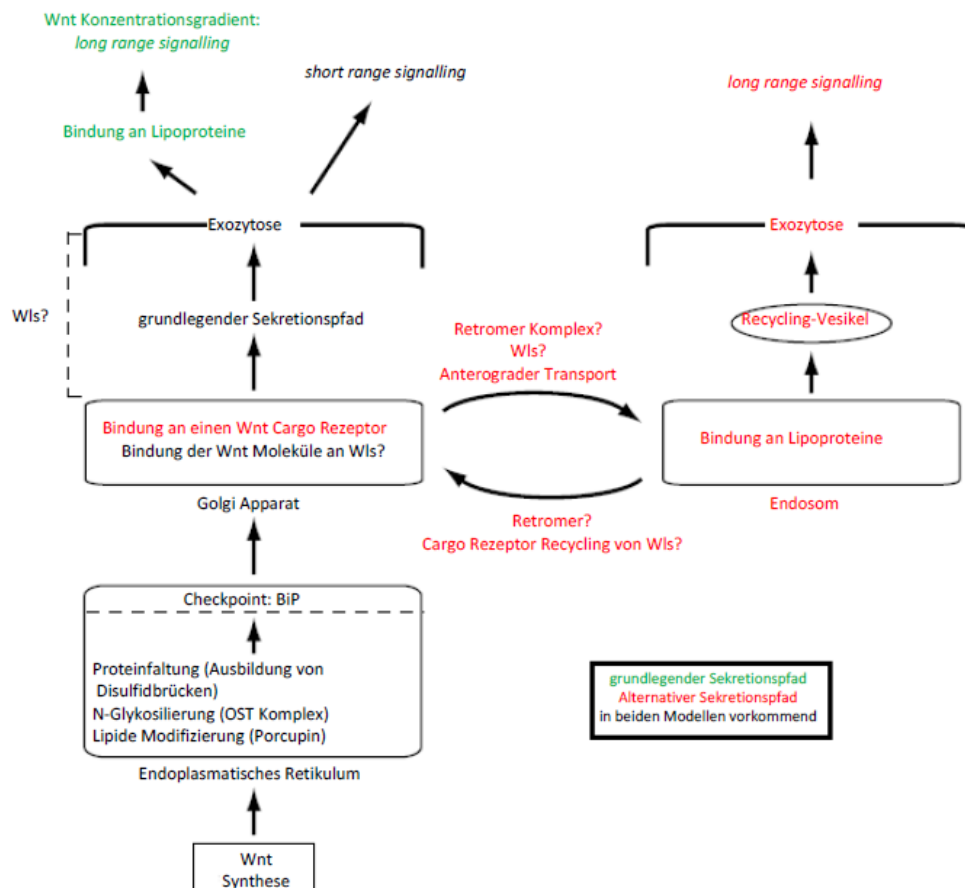
Die Sequenz der Wnt-Signalmoleküle wird zunächst im Kern der produzierenden Zelle exprimiert, anschließend erfolgt die Translation der Moleküle. Im Endoplasmatischen Retikulum werden die Proteine dann modifiziert und schließlich aus der Zelle sekretiert. Mehrere Proteine bzw. Proteinkomplexe, die an der Biogenese und Sekretion von Wnt-Proteinen beteiligt sind, wurden bis heute identifiziert, die genauen Funktionen der einzelnen Proteine in der Biogenese und Sekretion von Wnt-Molekülen wurden allerdings noch nicht abschließend für alle Proteine geklärt.<sup>67</sup>

Im endoplasmatischen Retikulum werden die Wnt-Moleküle zunächst post-translational modifiziert. Durch einen Oligosaccharyltransferase Komplex (OST) erfolgt eine N-Glykolisierung der Wnt-Moleküle. *In Vitro* Experimente deuten darauf hin, dass diese Glykolisierung entscheidend für die spätere Sekretion der Moleküle ist.<sup>69</sup> Des Weiteren ist das Protein Porcupine (Porc) an der post-translationalen Modifikation von Wnt-Proteinen beteiligt und für die kovalente Anbindung von Fettsäuren an die Wnt-Moleküle mitverantwortlich. Diese kovalente Anbindung von Signalmolekülen wird als lipide Modifikation bezeichnet und ist ein wichtiger Mechanismus, um die biologische Aktivität von Proteinen zu steuern, indem die Stabilität ihrer Struktur, der Membran und der Protein-Protein Interaktionen beeinflusst wird.<sup>70, 71</sup> Wnt-Signalmoleküle werden besonders häufig mit einer Palmitat Gruppe, die an ein Cystein, das im N-terminalen Teil der Wnt-Moleküle lokalisiert ist, modifiziert.<sup>72</sup> Die Funktion dieser Modifikation ist nicht abschließend geklärt. Es existieren unterschiedliche Theorien über die Aufgabe der hydrophoben Lipid-Gruppe. Die Palmitation der Wnt-Moleküle könnte verhindern, dass Cystein-Moleküle unerwünschte Disulfidbrücken bilden und damit die Struktur des Proteins

zerstören. Des Weiteren sind Palmitat Gruppen als intrazelluläre Ordnungssignale bekannt. Die Modifikation der Wnt-Moleküle könnte zur Folge haben, dass die Wnt-Proteine auf einem genau definierten Weg die Zelle verlassen.<sup>67</sup> Eine weitere Aufgabe der Lipid-Gruppe könnte die spätere Bindung der Wnt-Moleküle an die Membranen der Zielzellen sein. Der Mechanismus könnte die Verteilung der Wnt-Proteine in der extrazellulären Umgebung beeinflussen und eine lokale Erhöhung der Wnt-Konzentration an den Wnt-Rezeptoren hervorrufen, um auf diese Weise eine effiziente Signaltransduktion zu ermöglichen.<sup>72</sup> Der letzte Schritt der post-translationalen Modifikation ist die Faltung der Wnt-Proteine durch die Ausbildung von Disulfidbrücken. BiP (Binding immunoglobulin protein), ein Mitglied der Hsp70-Proteinfamilie (Hitzeschockproteine), fungiert in diesem Schritt als Chaperon und sortiert nicht korrekt gefaltete und falsch strukturierte Wnt-Proteine aus, so dass diese das Endoplasmatische Retikulum nicht verlassen können.<sup>67</sup>

Bevor die Wnt-Moleküle ihre Herkunftszelle verlassen, passieren sie den Golgi Apparat und unterschiedliche subzelluläre Einheiten.<sup>73</sup> *Wntless* (Wls), auch bekannt als *Evenness interrupted* (Evi) oder *Sprinter* (Srt), ist ein Transmembranprotein, das im Golgi-Apparat und in der Plasmamembran nachgewiesen wurde. Bis heute ist die Funktion von Wls bei der Wnt-Sekretion nicht abschließend geklärt. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass das Wls-Protein als Cargo-Rezeptor für die Wnt-Proteine fungiert und diese Wnt-Proteine aus dem Golgi-Apparat in die Plasmamembran eskortiert, von wo sie schließlich aus der Zelle sekretiert werden.<sup>66, 74</sup> Bartscherer et al. wiesen nach, dass in Wg (ein Wnt-Protein) produzierenden Zellen, in denen kein Wls vorhanden ist, keine Wg-Moleküle an der Zelloberfläche lokalisiert sind.<sup>74</sup>

Eine weitere wichtige Funktion in der Sekretion der Wnt-Proteine übernimmt der Retromer-Komplex. Dieser Multiproteinkomplex besteht aus fünf Untereinheiten: Vps35, Vps29, Vps26, Vps5 und Vps17 (*Vascular protein sorting*) und überführt Proteine aus den Endosomen in den Golgi-Apparat und ist somit für das Recycling von Rezeptoren verantwortlich.<sup>75</sup> Nachdem die Wnt-Proteine durch den Cargo-Rezeptor Wls aus dem Golgi-Apparat in die Plasmamembran gelangt sind, wird das Wls-Protein in das Endosom internalisiert und entweder in den Lysosomen degradiert oder durch den retromeren Komplex abgefangen und wieder in den Golgi Apparat überführt, um dort erneut Wnt-Proteine aus der Zelle zu sekretieren.<sup>67, 75, 76</sup>



**Abbildung 3-2:** Schematische Darstellung der Biogenese und Sekretion von Wnt-Proteinen (adaptiert aus: Coudreuse et al.)<sup>67</sup>

In Abbildung 3-2 ist der Ablauf der Wnt-Protein Sekretion schematisch dargestellt. Dabei sind unterschiedliche, mögliche Modelle der Sekretionswege aufgezeigt. Die linke Hälfte des Schemas beschreibt den grundlegenden Sekretionspfad. Die Moleküle binden nach der Translation und Modifikation im Golgi-Apparat an das Wls-Molekül und werden durch Exozytose aus der Zelle sekretiert. In der rechten Hälfte der Abbildung ist ein mögliches Modell für die intrazelluläre lipide Modifikation der Wnt-Moleküle gezeigt. Dabei ist der Retromer-Komplex nicht nur für das Recycling des Wls-Proteins verantwortlich, sondern überführt Wnt-Moleküle aus dem Golgi-Apparat in die Endosomen, wo sie an Plasma-Lipoprotein-Partikel (LPPs) binden und anschließend über Recycling Vesikel an die Zellmembran transportiert und dort sekretiert werden.<sup>67</sup> LPPs sind Aggregate, bestehend aus Lipiden und Proteinen, die micellenähnliche Moleküle mit einem unpolaren Kern aus Cholesterinestern und Triglyceriden bilden. Diese Moleküle besitzen eine zur sie umgebenden, wässrigen Phase gerichtete Hülle mit polaren, hydrophilen

Anteilen, bestehend aus Proteinen, Phospholipiden und den Hydroxygruppen unveresteter Cholesterine. Sie dienen dem Transport wasserunlöslicher Lipide.

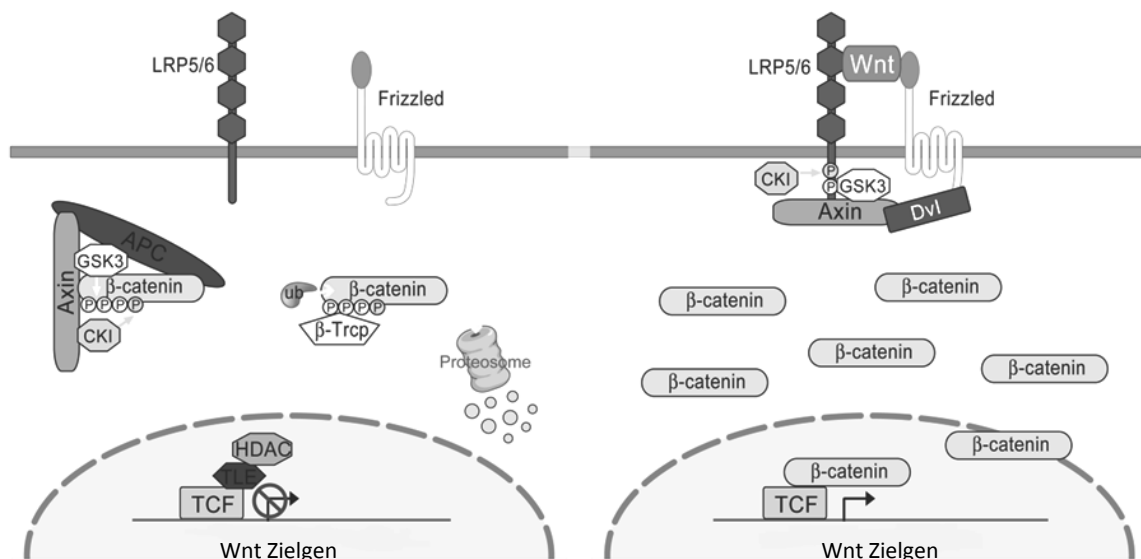
### 3.3.2 Extrazellulärer Transport der Wnt-Proteine

Die sekretierten Wnt-Moleküle binden nach ihrer Freisetzung in die extrazelluläre Umgebung an bestimmte Rezeptoren benachbarter Zielzellen. Dabei fungieren die Wnt-Proteine als Morphogene und bilden in der extrazellulären Umgebung einen Konzentrationsgradienten aus. Sie sind in der Lage sowohl über weite als auch über kurze Bereiche Signale weiterleiten.<sup>66</sup> Dabei wird zwischen einem *long range signaling* und einem *short range signaling* unterschieden. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Wnt-Moleküle in der Lage sind, an Zellen zu binden, die mehrere Zelldurchmesser entfernt von der Wnt produzierenden Zelle lokalisiert sind. Um Signale über hohe Entfernungen (>20 Zelldurchmesser) weiterleiten zu können, müssen die hydrophoben Wnt-Moleküle frei durch die wässrige extrazelluläre Umgebung diffundieren.<sup>74</sup> Es existieren unterschiedliche Ansätze, die dieses Phänomen erklären. Ein Modell sieht vor, dass die Wnt-Moleküle Micellen bilden und die hydrophoben Anteile der Moleküle dabei in das Innere der Micelle zeigen und somit nicht mit der wässrigen Umgebung in Kontakt treten. Diese Form der Fortbewegung wurde bei Hedgehog, einem anderen hydrophoben Morphogen, das sowohl strukturelle als auch funktionelle Ähnlichkeiten mit den Wnt-Molekülen aufweist, beobachtet.<sup>77</sup> Auch die Anbindung der Wnt-Moleküle an LPPs (siehe Abbildung 3-2) könnte eine Möglichkeit darstellen, Signale über weite Bereiche weiterzuleiten. Panakova et al. zeigten, dass bei Verlust von Lipophorin die Anzahl der Wnt-Signale geringer ist.<sup>78</sup> Die Anzahl der Wnt-Moleküle auf den LPPs steuert schließlich die Diffusion und das Streuverhalten in der wässrigen extrazellulären Umgebung.<sup>79, 80</sup>



### 3.3.3 Wnt Rezeption

In Abbildung 3-3 ist schematisch die Signaltransduktion über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg dargestellt. Dieser Signalweg steuert die embryonale Entwicklung und die adulte Homöostase, und verläuft über die Regulierung der Konzentration des Co-Aktivators  $\beta$ -Catenin, welcher in der Lage ist, grundlegende Genexpressionsmuster zu steuern.<sup>66</sup> In der linken Abbildung sind keine Wnt-Proteine vorhanden. Intrazelluläres  $\beta$ -Catenin wird von einem Axin-Komplex, bestehend aus dem Protein Axin, dem Tumorsuppressor *adenomatous polyposis coli* (APC), Casein Kinase 1 (CK1) und Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), abgebaut. Dabei wird zunächst die N-terminale Region des  $\beta$ -Catenins durch CK1 und GSK3 phosphoryliert, wodurch das  $\beta$ -Catenin von  $\beta$ -Trcp, einer E3 ubiquitären Ligase Untereinheit, erkannt und ubiquitiniert wird, um schließlich proteasomal degradiert zu werden.<sup>81</sup> Durch den kontinuierlichen Abbau des  $\beta$ -Catenins gelangt dieses nicht in den Zellkern und die Gene, die über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg gesteuert werden, werden durch einen Komplex aus dem DNA gebundenen Transkriptionsfaktor TCF (*T cell factor*), dem Co-Repressor TLE (*transducin-like Enhancer of split* und dem Enzym HDAC (Histon-Deacetylase) gehemmt und nicht transkribiert.



**Abbildung 3-3:** Modell des kanonischen Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktionswegs. Linke Abbildung: keine Wnt-Proteine an die Zelle gebunden, rechte Abbildung: Wnt-Proteine binden an den Frizzled-Rezeptor und die Co-Rezeptoren LRP5 und LRP6. (adaptiert aus: Mac Donald et al., 2010)<sup>66</sup>

Auf dem rechten Bild von Abbildung 3-3 binden Wnt-Proteine an der Oberfläche der Zielzelle, indem sie an den Transmembranen-Rezeptor der Frizzled-Familie (Fz) und dessen Co-Rezeptoren *low-density lipoprotein receptor related protein*, LRP5 und LRP6, binden. Dieser Rezeptor-Komplex leitet nun, hervorgerufen durch die Anbindung der Wnt-Proteine, ein Signal in das Innere der Zelle an das intrazelluläre Gerüstprotein Dishevelled (Dsh). Daraus resultiert eine Phosphorylierung und Aktivierung von LRP6, wodurch der Axin-Komplex, bestehend aus Axin, CK1 und GSK3, an die LRP5 und LRP6-Rezeptoren bindet. Auf diese Weise wird der durch den Axin-Komplex herbeigeführte Abbaumechanismus von  $\beta$ -Catenin inhibiert.  $\beta$ -Catenin reichert sich in der Zelle an, bildet im Zellkern Komplexe mit dem Transkriptionsfaktor TCF und aktiviert so die Gen Transkription der Wnt-Zielgene.

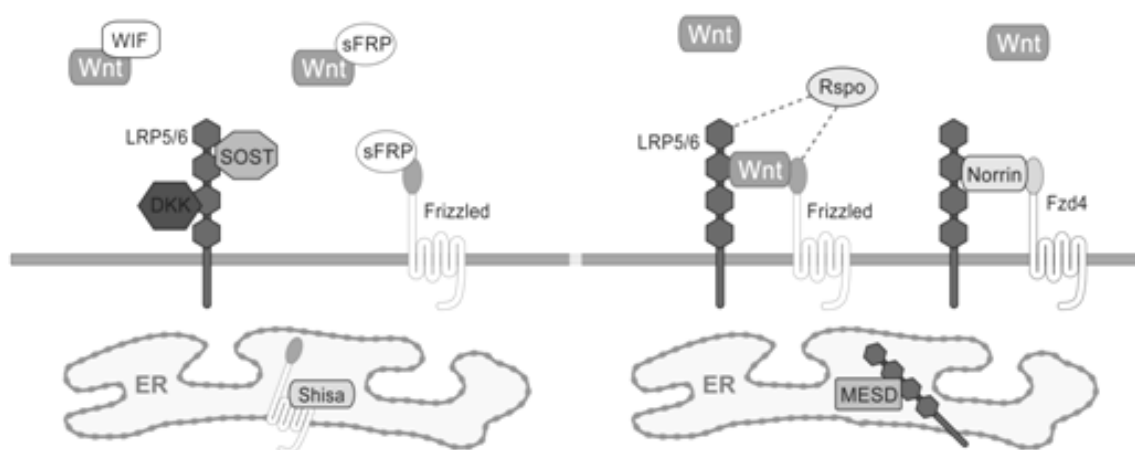
82,66

#### 3.3.4 Agonisten und Antagonisten in der Wnt-Signaltransduktion

Es existieren eine Reihe verschiedener Agonisten und Antagonisten, die die Wnt-Signaltransduktion beeinflussen können. Die Antagonisten *Wnt inhibitory protein* (WIF) und *secreted Frizzled related protein* (sFRP) binden direkt an die Wnt-Proteine oder die Fz-Proteine und fungieren auf diese Weise als Wnt-Antagonisten, sowohl im kanonischen als auch in den nicht-kanonischen Signalwegen.<sup>83</sup> Weitere Antagonisten sind Proteine der Dickkopf-Familie (Dkk) und der SOST/WISE-Familie. SOST bindet an die extrazelluläre Domäne der Wnt-Co-Rezeptoren LRP5 und LRP6 und verhindert so die Bildung des Wnt induzierten Fz-LRP6-Komplex.<sup>84</sup> Dkk1 ist ein LRP6-Antagonist, wobei zwei unterschiedliche Modelle über die Wirkweise von Dkk1 bestehen.<sup>85, 86</sup> Zum einen existiert die Theorie, dass Dkk1 die Internalisierung und Degradation von LRP6 fördert und auf diese Weise die Anzahl der LRP6-Moleküle an der Zelloberfläche verringert. Das zweite Modell geht davon aus, dass Dkk1 an den LRP6-Rezeptor bindet und so die Bildung des Fz-LRP6-Komplexes verhindert. Neuere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass das zweite Modell zutrifft.<sup>87</sup> Eine weitere Gruppe wichtiger Wnt-Antagonisten sind die Shisa-Proteine. Diese binden das Fz-Protein direkt im Endoplasmatischen Retikulum und

verhindern so, dass das Protein an die Zelloberfläche gelangt und dort an Wnt-Moleküle aus der extrazellulären Matrix binden kann.<sup>88</sup>

Wichtige Agonisten in der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion sind Norrin und R-spondin (Rspo)-Proteine. Norrin zeigt eine ähnliche Wirkung wie Wnt und ist in der Lage Norrin-Fz-LRP-Komplexe auszubilden, obwohl es keinerlei Ähnlichkeit mit den Wnt-Proteinen in Bezug auf die Sequenz besitzt. Es bindet allerdings spezifisch nur an das Fz4-Protein.<sup>89</sup> Das Rspo2-Protein ist in der Lage den Wnt-Signalweg zu aktivieren. Allerdings ist der Mechanismus nicht abschließend geklärt.<sup>90</sup> Ein weiterer Agonist ist das Chaperon MESD, es wird für die Maturation von den Rezeptoren LRP5 und LRP6 im Endoplasmatischen Retikulum benötigt.

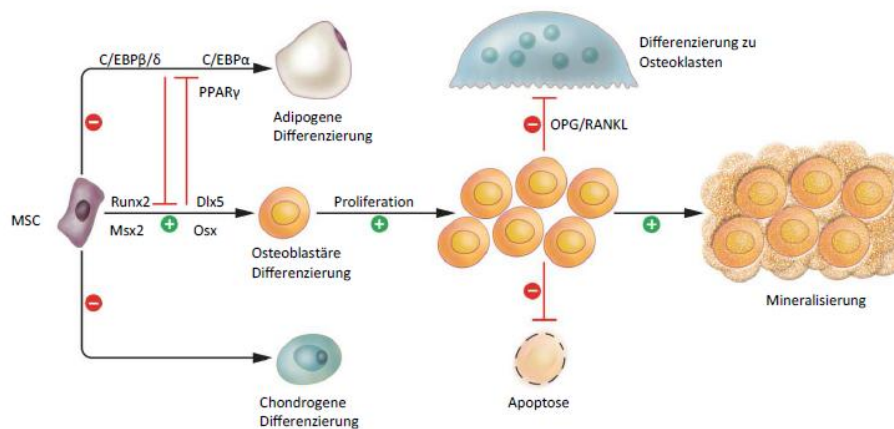


**Abbildung 3-4:** Wnt-Antagonisten (linke Abbildung) und Agonisten (rechte Abbildung) (adaptiert aus: MacDonald et al.)<sup>66</sup>

### 3.3.5 Einfluss des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges auf die osteogene Differenzierung

Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist in die Entwicklung des Knochengewebes und die Osteoblastengnese aus mesenchymalen Stammzellen involviert und kann durch eine Reihe verschiedener Mechanismen die Masse des Knochengewebes beeinflussen. Dazu gehören die Induzierung der Osteoblastengnese, die Stimulation der Präosteoblasten Replikation, die Inhibierung der Osteoklastengnese und die Inhibierung der Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten.<sup>91</sup> In Abbildung 3-5 sind die einzelnen Schritte der osteogenen Differenzierung einer mesenchymalen

Stammzelle und die möglichen positiven bzw. negativen Regulierungen dieser Schritte durch den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg schematisch dargestellt,



**Abbildung 3-5:** Die unterschiedlichen Mechanismen, durch die der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg die Osteogenese reguliert. (adaptiert aus: Krishnan et al.)<sup>91</sup>

Verschiedene Wnt-Proteine sind in den Prozess der Osteogenese involviert. Wnt7b beispielsweise wird während der Osteoblastengnese erzeugt.<sup>92</sup> Ein weiteres wichtiges Wnt-Molekül dieses Prozesses ist Wnt10. Bennett et al. untersuchten FABP4-Wnt10b Mäuse, die Wnt10 im Knochenmark exprimieren und stellten fest, dass diese Mäuse die vierfache Menge an Knochenmasse in der distalen Metaphyse aufwiesen und die Knochenmasse mechanisch stabiler war, als die der Kontrollmäuse, die kein Wnt10 im Knochenmark exprimierten. Sie konstatierten, dass Wnt10 die Osteoblastengnese von mesenchymalen Vorläuferzellen fördert, indem es die Expression der osteogenen Transkriptionsfaktoren Runx2, Dlx5, und Osterix induziert (siehe Abbildung 3-5).<sup>93</sup>

GSK3 ist an dem intrazellulären Abbau von  $\beta$ -Catenin beteiligt und kann mit Lithiumchlorid gehemmt werden, wodurch die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Osteoblasten stimuliert wird.<sup>93, 94</sup> Lacroix et al. untersuchten die Auswirkungen von Lithiumchlorid auf den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg und die damit verbundenen Veränderungen in der Osteogenese. Dazu wurde der Knochen Metabolismus drei verschiedener Mäusestämme (*Lrp5*<sup>-/-</sup>, SAMP6, und C57BL/6) nach vierwöchiger oraler Gabe von Lithiumchlorid untersucht. *Lrp5*<sup>-/-</sup> Mäusen fehlt das Co-Rezeptor-Protein LRP5 und diese Tiere haben deutlich weniger Knochenmasse. Die Gabe von Lithiumchlorid führte zu einer Zunahme an Knochenmasse, die fast das Niveau des Wildtyps (C57BL/6) erreichte. In C57BL/6

Mäusen, die an Osteoporose leiden, wurde sowohl eine erhöhte Bildung von Knochenmasse als auch eine erhöhte Anzahl an Osteoblasten festgestellt. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte die Inhibierung von GSK3 und eine damit verbundene höhere intrazelluläre Konzentration von  $\beta$ -Catenin sein. Diese These wird durch die erhöhte Expression von Wnt-Zielgenen in Knochenmarkzellen der mit Lithiumchlorid behandelten Mäuse gestützt.<sup>95</sup>

Mutationen des Co-Rezeptors LRP5, der mit für die extrazelluläre Anbindung der Wnt-Proteine und die Signalweiterleitung in das Zellinnere verantwortlich ist, können sowohl zu einer geringen Dichte des Knochens, als auch zu einer Erhöhung der Knochenmasse führen. *Loss of function* Mutationen des humanen LRP5-Rezeptors treten bei dem Osteoporose-pseudogliom-Syndrom auf, welches durch eine geringe Dichte des Knochens und Knochenbrüchigkeit charakterisiert ist.<sup>96</sup> Auch Studien mit Mäusen, bei denen LRP5 inaktiviert wurde, haben ergeben, dass bei Inaktivierung von LRP5 die Knochenmasse signifikant geringer ist, als bei Kontrollmäusen ohne Inaktivierung des Rezeptors.<sup>97</sup> Mutationen am N-Terminus des LRP5-Rezeptors hingegen, führen zu einer Erhöhung der Knochenmasse. Boyden et al. untersuchten Patienten mit dieser Mutation (LRP5<sub>V171</sub>) und führten *in vitro* Studien dazu durch, indem sie Blutproben der Patienten untersuchten und deren Knochendichte maßen. Dabei stellten sie fest, dass bei den Patienten mit dieser Mutation die Expression von Genen, die in die Resorption des Knochens involviert sind, in normalen Konzentrationen vorlagen, während Gene, die den Knochenaufbau steuern, deutlich hochreguliert waren. Des Weiteren war die Konzentration von Fibronectin, ein Zielgen des Wnt-Signalweges, deutlich erhöht. *In vitro* Studien ergaben weiterhin, dass in Zellen mit der LRP5<sub>V171</sub> Mutation der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg nicht durch den Antagonisten Dickkopf1 (Dkk1) inhibiert werden konnte, was zu einer erhöhten Signaltransduktion in Folge hoher Wnt-Aktivität führte.<sup>98,99</sup>

Des Weiteren kann über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg eine Inhibierung der adipogenen und chondrogenen Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen herbeigeführt werden.<sup>99-101</sup> Der Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  (Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor), ein intrazellulärer Rezeptor, der nach Bindung eines Liganden dessen Gentranskription aktiviert, induziert die adipogene

Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und inhibiert gleichzeitig die osteogene Differenzierung. Eine Signaltransduktion über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg inhibiert die mRNA Expression von PPAR $\gamma$  und somit die adipogene Differenzierung.<sup>102</sup> Bennett et al. stellten fest, dass Wnt10 die Adipogenese hemmt, indem es die adipogenen Transkriptionsfaktoren C/EBP $\alpha$  und PPAR $\gamma$  unterdrückt (siehe Abbildung 3-5).<sup>93, 99, 100</sup> Day et al. untersuchten die Auswirkungen von  $\beta$ -Catenin auf die osteogene und chondrogene Differenzierung mesenchymaler Progenitorzellen. Dabei stellten sie fest, dass die chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen durch  $\beta$ -Catenin inhibiert und die osteogene Differenzierung gesteigert wurde (siehe Abbildung 3-5). Durch eine Inaktivierung des  $\beta$ -Catenins in den mesenchymalen Progenitorzellen *in vitro* wiederum differenzierten die Zellen zu Chondrozyten, auch unter osteogenen Kulturbedingungen. Dieses Phänomen lässt den Schluss zu, dass  $\beta$ -Catenin die Richtung der Differenzierung, osteogen oder chondrogen, von mesenchymalen Stammzellen im hohen Maße mitbestimmt.<sup>101</sup>

Auch die Mineralisierung von neu gebildetem Knochengewebe wird über den kanonischen Signalweg reguliert (siehe Abbildung 3-5). Li et al. stellten fest, dass die Expression des Wnt-Antagonisten Dickkopf2 (Dkk2) in Osteoblasten über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg hochreguliert wird und dieser in die Mineralisierung der Osteozyten involviert ist. Mäuse, die kein Dkk2 exprimierten, wiesen eine hohe Menge an Osteoid, also weicher, nicht mineralisierter Knochenmatrix, sowie einen geringeren Mineralisierungsgrad auf.<sup>103</sup>

Zelluläre und molekulare Untersuchungen haben gezeigt, dass die Differenzierung der Osteoblasten in Osteoklasten, die im Knochen für die Resorption von Knochensubstanz verantwortlich sind, durch den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg inhibiert werden kann. Die Masse der gesamten Knochensubstanz ist abhängig von der Balance zwischen den Osteoblasten und den Osteoklasten.  $\beta$ -Catenin reguliert gemeinsam mit dem DNA gebundenen Transkriptionsfaktor TCF (siehe Abbildung 3-3) die Expression von Osteoprotegerin (OPG), einen Inhibitor der Osteoklastengenese. OPG antagonisiert das RANKL-Protein (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand), welches an Osteoblasten bindet und damit die Differenzierung zu

Osteoklasten einleitet. Durch die Hochregulierung der OPG Expression wird das Mengenverhältnis zwischen OPG und RANKL geringer und die Differenzierung von Osteoblasten in Osteoklasten reduziert (siehe Abbildung 3-5).<sup>104</sup>.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass durch den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg die Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten inhibiert werden kann und auch dadurch die Knochenmasse beeinflusst werden kann (siehe Abbildung 3-5). sFRP-1 ist ein Antagonist des Wnt-Signalweges (Abbildung 3-4). Es besitzt eine Cystein-reiche Domäne (CRD) an dem Amino-terminalen Ende, die an die Wnt-Proteine bindet und somit die Bindung der Proteine an den Fz-Rezeptor/LRP Komplex verhindert. Außerdem ist sFRP-1 in der Lage direkt an den Fz-Rezeptor zu binden, was möglicherweise eine Inhibierung des intrazellulären Signalweges zur Folge hat.<sup>105</sup> In humanen Osteoblasten korreliert eine erhöhte Expression von sFRP-1 mit einer Inaktivierung des kanonischen Signalweges und einer vorzeitigen Apoptose.<sup>106, 107</sup> Bodine et al. untersuchten sFRP-1<sup>-/-</sup> Mäuse, die kein sFRP-1 exprimierten und stellten eine Reduzierung der Apoptose im Vergleich mit Mäusen, die sFRP-1 exprimierten, fest.<sup>107</sup> Babij et al. untersuchten den Einfluss einer Mutation (G171V) des Co-Rezeptors LRP 5, die bei Männern zu einer hohen Knochenmasse führt, auf die Apoptose von Osteoblasten in Mäusen, die diese Mutation exprimierten. Dabei konnten sie eine 60-70 % ige Reduzierung der Apoptose der Osteoblasten nachweisen. Auch die Apoptose der Osteozyten war geringer, im Vergleich zu den Kontrollen.<sup>108</sup>

Die Signaltransduktion über den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg ist ein komplexes System, das bis dato noch nicht abschließend aufgeklärt werden konnte. Den Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von Stammzellen, insbesondere der osteogenen Differenzierung konnte in vielen Studien belegt werden und ein Überblick der verschiedenen Mechanismen wurde in dem letzten Abschnitt zusammengestellt. Allerdings sind noch viele Fragen nicht abschließend geklärt und einige Mechanismen noch nicht hinreichend belegt.

## 4 Experimenteller Teil

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potential mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe und der Whartonschen Sulze der Nabelschnur in die osteogene Richtung zu differenzieren, untersucht. Dabei wurden verschiedene Aspekte betrachtet und analysiert. Die Zellen wurden zunächst unter statischen Bedingungen kultiviert. Dabei wurde die osteogene Differenzierung der Zellen sowohl auf Plastikkulturplatten als auch auf dreidimensionalen Trägermaterialien untersucht.

Des Weiteren wurden die Zellen in ein dreidimensionales Kollagen-Netzwerk (Matritypt®), welches im feuchten Zustand eine gute Formbarkeit und Stabilität aufweist, eingebracht und in dem Kollagen-Netzwerk in einem am Institut für Technische Chemie entwickelten System mechanisch durch Dehnung stimuliert. Auf diese Weise wurden die Zellen einer simulierten physiologischen Stimulation ausgesetzt, wie sie auch im Knochengewebe des menschlichen Körpers durch Flüssigkeitsströme und Muskelkontraktionen hervorgerufen wird.

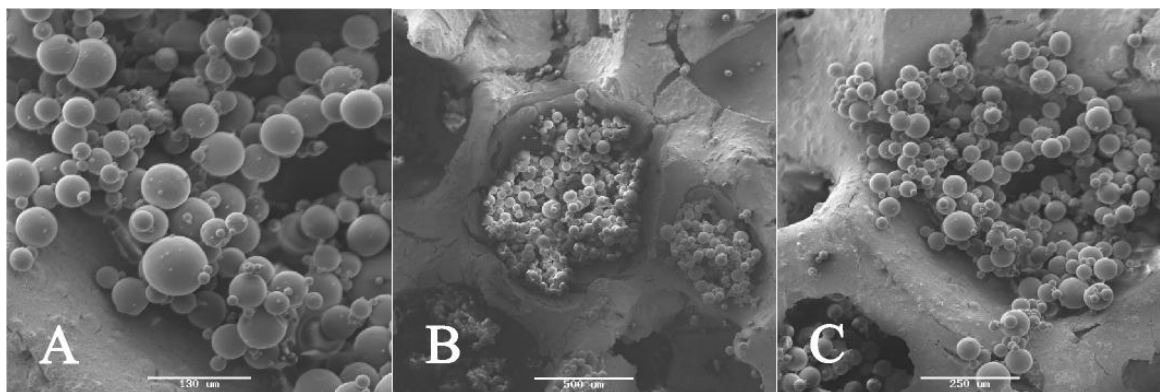
Weiterhin wurden die Zellen in einem Bioreaktor (Z®RPD) dynamisch kultiviert. Dafür wurden die Zellen auf eine dreidimensionale, poröse Aluminiumoxid-Keramik (Sponceram®) aufgebracht. Auch während der Kultivierung im Bioreaktor wurden die Zellen Flüssigkeitsscherstress, hervorgerufen durch eine Rotation der Keramik durch das Kulturmedium in dem Bioreaktor, ausgesetzt. Mit dem Z®RPD System war eine Langzeitkultivierung der Zellen über mehrere Wochen möglich. Durch die Entwicklung und Integration eines speziellen Aufbaus konnten 4 Bioreaktoren parallel kultiviert werden. Auf diese Weise konnte die Reproduzierbarkeit künstlich hergestellter Knochenkonstrukte unter dynamischen Bedingungen untersucht werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war es, die Auswirkungen des Wachstumsfaktors BMP-2 auf die osteogene Differenzierbarkeit der mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe und dem Nabelschnurgewebe zu untersuchen. BMP-2 ist ein Signalprotein, welches zur TGF- $\beta$ -Superfamilie gehört und unter anderem in die Heilung von Frakturen involviert ist. Dabei ist es für die Rekrutierung von Stammzellen, die zu Osteoblasten differenzieren, verantwortlich.<sup>109</sup> Des weiteren



wurden die positiven Auswirkungen von BMP-2 auf die osteogene Differenzierung unterschiedlicher Vorläuferzellen *in vitro* mehrfach publiziert.<sup>110-112</sup>

In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Machluf am *Institute for Technology* am Technion in Haifa wurden Mikrosphären aus PLGA entwickelt, die als ein *release* System fungieren und BMP-2 freisetzen. Diese Mikrosphären wurden vor der Zellkultivierung auf das jeweilige Trägermaterial aufgebracht und adsorptiv gebunden. In Abbildung 4-1 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Kompositmaterials, bestehend aus den PLGA Mikrosphären und Sponceram® abgebildet.



**Abbildung 4-1:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der PLGA Mikrosphären auf Sponceram®. Die Aufnahmen wurden am Technion in Haifa angefertigt und bei einer 200fachen (A), 50fachen (B) bzw. 100fachen (C) Vergrößerung aufgenommen.

PLGA, Polylactid-co-Glycolid, ist ein biokompatibles und degradierbares Polymer geringer Toxizität und Immunogenität, welches aus den Monomeren Lactid und Glycolid aufgebaut ist. Durch Variation des Mengenverhältnisses der beiden Monomere zueinander können PLGA-Polymere hergestellt werden, die unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Je höher der Anteil des Glycolid-Monomers ist, desto geringer ist die Degradationszeit des Polymers. PLGA eignet sich besonders für *in vitro* und *in vivo* Anwendungen, da es hydrolytisch abgebaut wird und die dabei entstehenden Abbauprodukte Milchsäure und Glycolsäure keine toxischen Eigenschaften aufweisen und als Nebenprodukte von metabolischen Reaktionen im Körper über den Citratzyklus als CO<sub>2</sub> sowie im Urin als Wasser ausgeschieden werden<sup>113, 114</sup>. Dies ist ein großer Vorteil, da einige Polymere, wie z.B. PLA und PGA in saure Abbauprodukte zerfallen, die *in vivo* zu Entzündungsreaktionen führen können.<sup>115</sup>

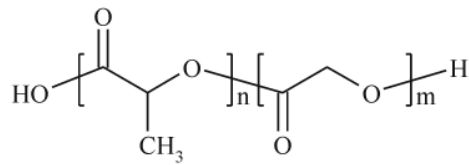
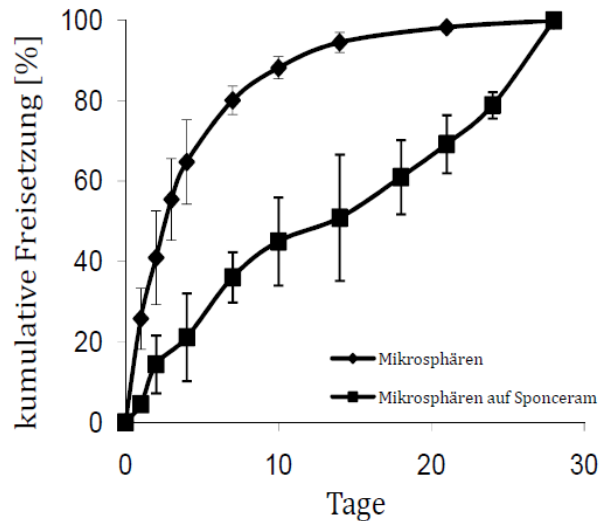


Abbildung 4-2: Struktur des PLGA

Der Abbau von PLGA in wässriger Umgebung erfolgt über *bulk erosion*. Bei diesem Quellungsabbau nimmt das Polymer Wasser auf und beginnt aufzuquellen. Dadurch werden in dem gesamten Polymer die Esterbindungen hydrolytisch gespalten und das Polymer degradiert. Durch diese Eigenschaft eignet sich PLGA besonders gut als Basis für ein Freisetzungssystem von Wirkstoffen. Diese werden durch die Degradation des PLGA über einen bestimmten Zeitraum kontinuierlich freigesetzt<sup>116</sup>.

Der Freisetzungsverlauf von Molekülen, die in PLGA-Polymeren eingeschlossen werden, kann in drei Phasen unterteilt werden. Zunächst erfolgt eine hohe Freisetzung des Wirkstoffes (*initial burst effect*), durch Moleküle, welche sich an der Oberfläche des Polymers befinden. In der zweiten Phase wird nur wenig Wirkstoff freigesetzt, da Moleküle, die sich im Inneren des Polymers befinden, erst an die Oberfläche diffundieren müssen. Durch die vollständige Degradation des Polymers erhöht sich schließlich wieder die Freisetzung<sup>117</sup>.

Die Freisetzung von BMP-2 aus den in dieser Arbeit verwendeten PLGA Mikrosphären ist in Abbildung 4-3 dargestellt. Der Prozess wurde über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet, dabei wurde sowohl die Freisetzung aus freien Mikrosphären als auch aus Mikrosphären, die auf Sponceram® aufgebracht worden sind, mit einem BMP-2 ELISA (Quantikine®, BMP-2 Immunoassay) bestimmt. Nach 30 Tagen wurde in beiden Fällen das gesamte BMP-2 freigesetzt. Allerdings verläuft die Freisetzung des BMP-2 anders, wenn die Mikrosphären an der Oberfläche des Sponcerams® gebunden sind. Bei den freien Mikrosphären werden in den ersten 8 Tagen ca. 80 % des BMP-2 freigesetzt, während die Mikrosphären, die an Sponceram® gebunden sind eine deutlich homogenere Freisetzung aufweisen.



**Abbildung 4-3:** Kumulative Freisetzung des BMP-2 aus PLGA Mikrosphären. Die Freisetzung wurde über einen Zeitraum von 30 Tagen am Institute of Technology am Technion in Haifa gemessen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mikrosphären mit einem molaren Co-Polymer-Verhältnis des PLGA von 50:50 (Lactid:Glycolid) verwendet, deren Durchmesser zwischen 20 und 100  $\mu\text{m}$  lag. Die Konzentration des BMP-2 in den Mikrosphären betrug 0,05  $\mu\text{g}/\text{mg}$  PLGA.

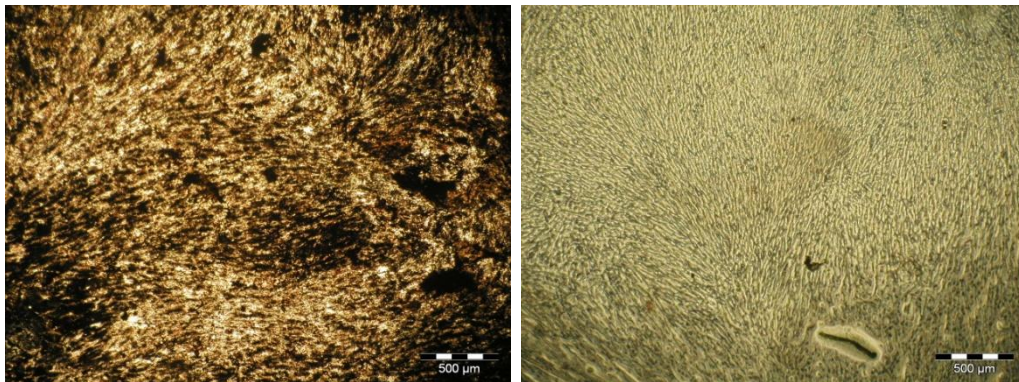
## 4.1 Statische Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe und der Nabelschnur

### 4.1.1 Osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in Kulturplatten

Um das Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe (adMSC) und der Whartonschen Sulze (ucMSC) in die osteogene Richtung zu ermitteln und vergleichen zu können, wurden die Zellen in Passage 4 zunächst unter statischen Bedingungen in 24-Well Kulturplatten über einen Zeitraum von 28 Tagen kultiviert. Das verwendete Medium enthielt Zusätze, welche die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen induzieren. Um die osteogene Differenzierung der Zellen zu analysieren, wurden Zellen an verschiedenen Tagen der Kultivierung fixiert und anschließend eine Calcein und eine von Kossa Färbung durchgeführt, um Calciumeinlagerungen in der extrazellulären Matrix nachzuweisen. Des Weiteren wurden dreimal pro Woche Proben des Mediums entnommen, um in dem Kulturüberstand die Aktivität der Alkalischen Phosphatase zu bestimmen. Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, welches in der Lage ist anorganisches Pyrophosphat aufzuspalten. Das dadurch gewonnene Phosphat bildet beim Knochenaufbau zusammen mit Calcium neues Hydroxylapatit. Der Nachweis Alkalischer Phosphatase ist daher ein Indiz für eine erfolgreiche Differenzierung der Zellen.

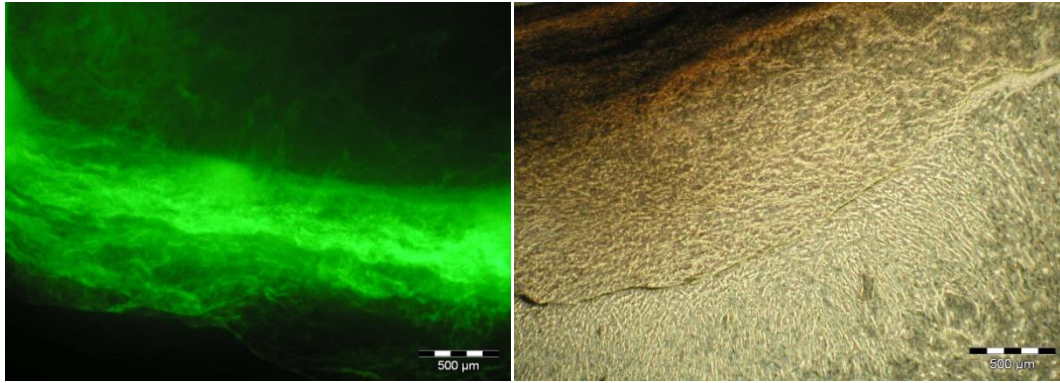
Die adMSC wurden bei Versuchsbeginn mit einer Dichte von 4000 Zellen/cm<sup>2</sup> in die Kulturplatten ausplattiert und zeigten im Laufe der Kultivierung eine osteogene Differenzierung. Sowohl mit der von Kossa Färbung als auch mit der Calcein Färbung konnte die Mineralisierung der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden. In Abbildung 4-4 ist die von Kossa Färbung der Zellen abgebildet. Dabei sind die schwarz eingefärbten Bereiche, in denen eine Calciumeinlagerung in die extrazelluläre Matrix stattgefunden hat, sehr gut erkennbar. Die ucMSC hingegen konnten nicht eindeutig osteogen differenziert werden. Die Zellen wurden lediglich mit einer Dichte von 2000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert, wiesen jedoch eine extrem hohe Proliferationsrate auf, so dass die Zellen nach 1 Woche begannen, sich von dem Boden der einzelnen Wells zu lösen und sich am Rand der einzelnen Wells eine dicke

Zellschicht bildete. Weiterhin konnte während der Kultivierung die Bildung von extrazellulärer Matrix beobachtet werden und eine Kontraktion der in der Mitte der Wells wachsenden Zellen. Diese Kontraktion der Zellen könnte auch zu dem Ablösen der Zellen beitragen haben. Auch die Beschichtung des Plattenbodens mit Gelatine konnte das Ablösen der Zellen nicht verhindern. Nach dem Ablösen wuchsen die Zellen aus dieser äußeren Zellschicht wieder in das Innere der Wells hinein, so dass an Tag 12 wieder eine konfluente Zellschicht vorhanden war, in der jedoch keine Calciumeinlagerung nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4-4).



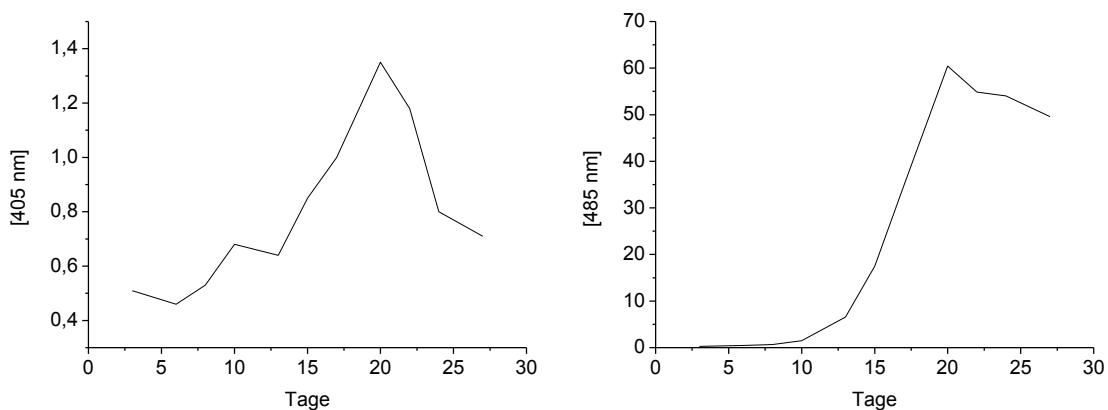
**Abbildung 4-4:** von Kossa Färbung der adMSC (links) und der ucMSC (rechts) nach 28 Tagen statischer Kultivierung.

In Abbildung 4-5 sind eine Calcein Färbung und eine von Kossa Färbung der ucMSC gezeigt. Die Calcein Färbung wurde nach 23 Tagen Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium durchgeführt. Abgebildet ist ein dicker Zellstrang, der aus einer sich ablösenden Zellschicht gebildet wurde. Die starke Fluoreszenz der Zellen ist gut erkennbar. Auch die von Kossa angefärbten Zellen in Abbildung 4-5 nach 21 Tagen Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium zeigen im oberen Bildausschnitt eine Schwarzfärbung. Weiterhin ist in der Abbildung das Herauswachsen neuer Zellen aus der abgelösten, am Rand des Wells befindlichen, Zellschicht gut erkennbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die ucMSC das Potential besitzen in die osteogene Richtung zu differenzieren, allerdings auf Grund ihres hohen Proliferationsvermögens eine große Oberfläche benötigen, um das Ablösen der Zellen zu verhindern.



**Abbildung 4-5:** Die Abbildungen zeigen eine Calcein Färbung (links) und eine von Kossa Färbung (rechts) der ucMSC. Dabei sind die abgelösten und zu Zellklumpen zusammengeschrumpften Zellen gut erkennbar.

In Abbildung 4-6 ist das Ergebnis der Aktivitätsbestimmung der Alkalischen Phosphatase im Kulturüberstand der adMSC abgebildet. Ein stetiger Anstieg bis zu Tag 20 und anschließend ein abrupter Abfall der Aktivität sind zu beobachten. Auffällig dabei ist, dass die Aktivität in dem Zeitraum sinkt, in dem die Mineralisierung der extrazellulären Matrix ihren Maximalwert erreicht hat. Dies deutet auf eine erfolgreiche osteogene Differenzierung. Alkalische Phosphatase wird während der Differenzierung der Stammzellen zu Knochengewebe vor der Mineralisierungsphase gebildet. Dabei steigt ihre Aktivität kontinuierlich an, bevor sie zu Beginn der Mineralsierung der extrazellulären Matrix wieder absinkt.<sup>118, 119</sup>



**Abbildung 4-6:** Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Kulturüberstand (links) und das Ergebnis der Calcein Färbung (rechts) der adMSC nach statischer Kultivierung über 28 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium. Die Intensität der Fluoreszenzfärbung wurde bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 535 nm vermessen.

#### 4.1.2 *Osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen auf verschiedenen Trägermaterialien*

Um die Problematik des Ablösens der mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe zu umgehen und die Zellen in einer Umgebung zu kultivieren, die dem Knochengewebe ähnlich ist, wurden die Zellen auf porösen, dreidimensionalen Trägermaterialien kultiviert. Dafür wurde zum einen Sponceram® verwendet, eine aus Aluminiumoxid bestehende Keramik und zum anderen Osseolive®, eine resorbierbare Bioglaskeramik. Die Kultivierungen wurden auf Sponceram®-Minidiscs und Osseolive®-Minidiscs mit einem Durchmesser von 10 mm in 24-Well Kulturplatten durchgeführt.

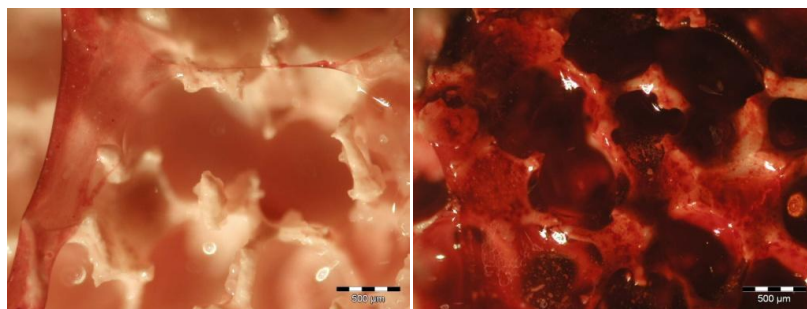
Um neben den dreidimensionalen Trägermaterialien auch die Auswirkungen des in PLGA Mikrosphären eingeschlossenen Wachstumsfaktors BMP-2 zu untersuchen, wurden die Zellen auch auf Trägermaterialien, die mit Mikrosphären beladen worden sind, kultiviert. Dabei wurden pro Trägermaterial 1 mg PLGA Mikrosphären verwendet. Um die Zellträger für *in vitro* Testungen einsetzen zu können, wurden diese im Autoklaven bei 121 °C für 30 min sterilisiert, bzw. im Falle der mit Mikrosphären beladenen Trägermaterialien 1 h unter UV Licht sterilisiert.

Die Kultivierung erfolgte bei den unbeschichteten Trägermaterialien mit osteogenem Differenzierungsmedium. Die mit Mikrosphären beladenen Materialien wurden sowohl mit Kulturmedium ohne die Osteogenese induzierende Zusätze, als auch mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen kultiviert, wobei zu Beginn der Experimente pro Trägermaterial 50.000 Zellen ausplattiert wurden. Der Nachweis der Mineralisierung der extrazellulären Matrix erfolgte mit einer Alizarinrot Färbung. Des Weiteren wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Kulturüberstand bestimmt.

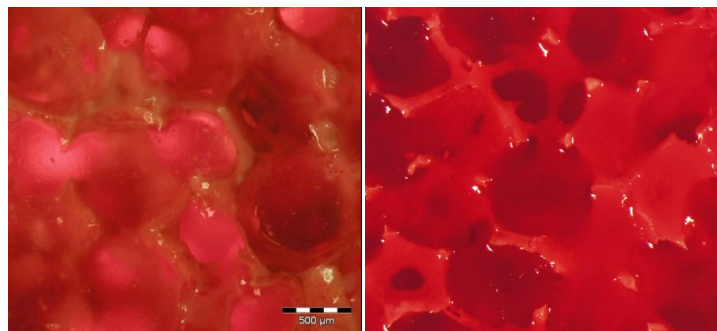
In Abbildung 4-7 und Abbildung 4-8 sind die Alizarinrot Färbungen der Zellen abgebildet, die auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® ohne Zusatz von Supplementen, die die Osteogenese induzieren, kultiviert worden sind. Als Vergleich sind Zell-Keramik Konstrukte abgebildet, die ohne Mikrosphären in osteogenem



Differenzierungsmedium kultiviert worden sind. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Falle der ucMSC die Freisetzung von BMP-2 aus PLGA Mikrosphären nicht ausreicht, um die Zellen osteogen zu differenzieren. Es ist keine intensive Rotfärbung erkennbar. Des Weiteren scheinen die Zellen auch auf dem dreidimensionalen Trägermaterial eine so hohe Proliferation zu besitzen, dass die Zellschicht sich bereits von dem Gerüst löst. Durch Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium wiederum scheint die Proliferation zu sinken, die Zellen haben eine homogene Zellschicht gebildet und die intensive Rotfärbung weist auf eine Mineralisierung der extrazellulären Matrix (ECM) hin.



**Abbildung 4-7:** Alizarinrot Färbung der ucMSC nach 28 Tagen statischer Kultivierung auf Sponceram® mit Mikrosphären beladen (links) und ohne Mikrosphären mit osteogenem Differenzierungsmedium (rechts).

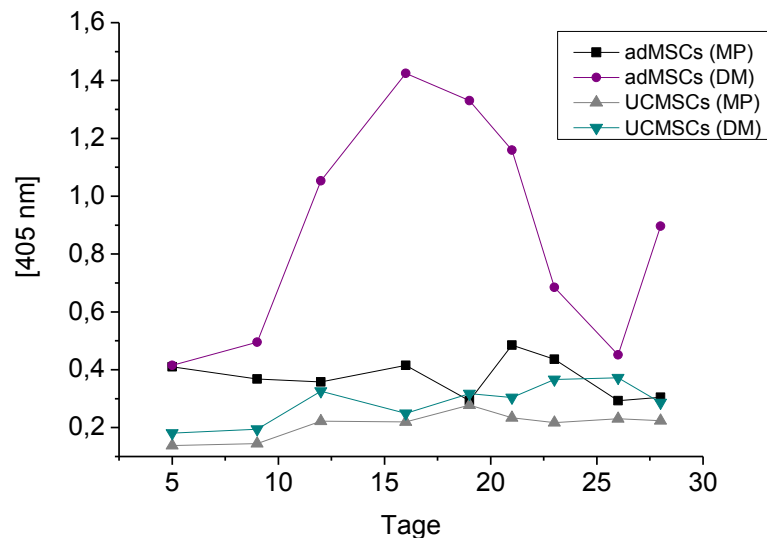


**Abbildung 4-8:** Alizarinrot Färbung der adMSC nach 28 Tagen statischer Kultivierung auf Mikrosphären beladenem Sponceram® (links) und ohne Mikrosphären mit osteogenem Differenzierungsmedium (rechts).

Die adMSC haben sowohl auf den mit PLGA Mikrosphären beschichteten Sponceram® als auch auf dem unbeschichteten eine homogene Zellschicht gebildet, wobei auch hier die Alizarinrot Färbung bei den Zellen, die in osteogenem Medium kultiviert worden sind, deutlich intensiver ist. Die Mineralisierung der ECM ist bei den Zellen, die auf Mikrosphären beladenem Sponceram® kultiviert wurden, nur sehr schwach ausgeprägt.



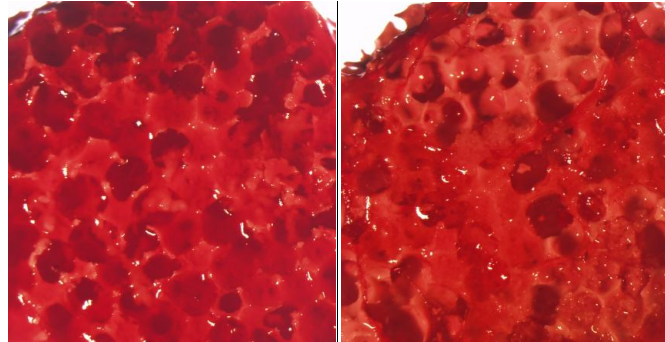
Die Ergebnisse der Alizarinrot Färbung konnten durch die Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase im Kulturüberstand bestätigt werden. Lediglich der Aktivitätsverlauf der AP-Kurve der adMSC, die in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert wurden, zeigte einen typischen Verlauf mit einem starken Anstieg der Aktivität zu Beginn der Differenzierung und einem Aktivitätsabfall zu Beginn der Mineralisierungsphase. Der Überstand der Zellen, die ohne osteogene Zusätze im Kulturmedium, auf PLGA Mikrosphären beschichtetem Sponceram® kultiviert worden sind, zeigte keinerlei Erhöhung bezüglich der AP-Aktivität. Im Überstand der ucMSC konnte allerdings auch durch die Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium keine Aktivitätserhöhung der Alkalischen Phosphatase festgestellt werden.



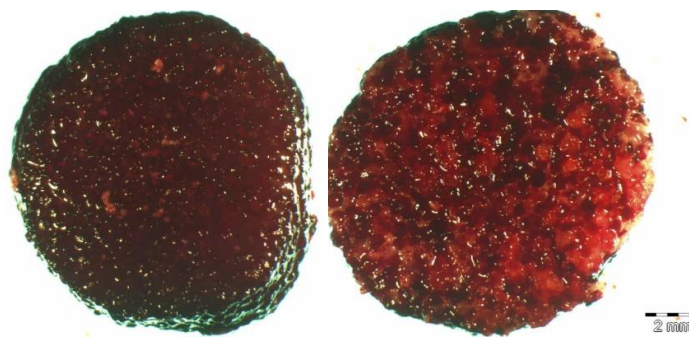
**Abbildung 4-9:** Ergebnis der Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase über 28 Tage statischer Kultivierung auf Sponceram®. Abgebildet sind die Ergebnisse beider Zelltypen auf Mikrosphären beladenen Sponceram (MP) und ohne Mikrosphären unter Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium (DM).

Um die osteogene Differenzierung zu optimieren, wurden die mit PLGA Mikrosphären beladenen Trägermaterialien und die Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium miteinander kombiniert. Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Alizarinrot Färbung nach 28 Tagen Kultivierung der Zellen auf PLGA beschichteten Mikrosphären unter Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium auf Sponceram® (Abbildung 4-10) und Osseolive® (Abbildung 4-11). Auf beiden Materialien ist eine homogene, intensive

Rotfärbung erkennbar. Lediglich die auf Sponceram® kultivierten ucMSC haben sich an einigen Stellen teilweise abgelöst. Auf dem Osseolive® ist allerdings keinerlei Ablösung der Zellen erkennbar.

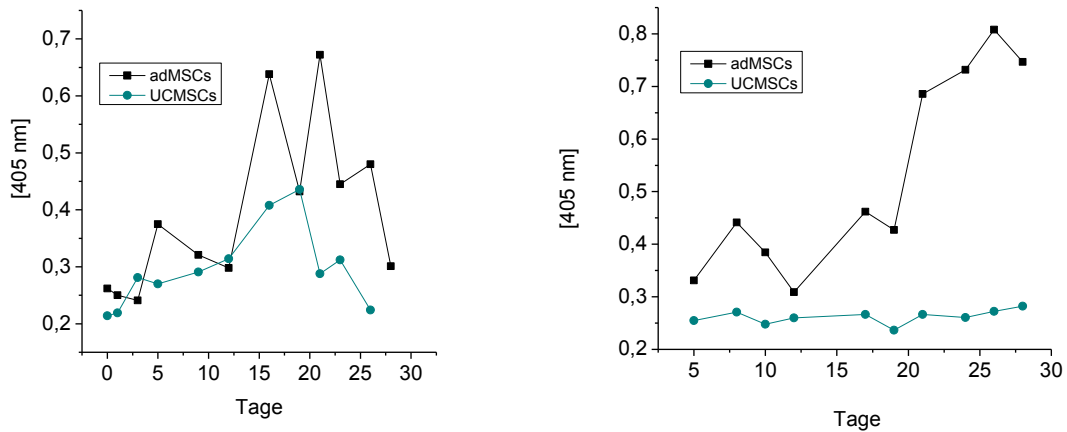


**Abbildung 4-10:** Alizarinrot Färbung der adMSC (links) und der ucMSC (rechts) nach 28 Tagen statischer Kultivierung auf Mikrosphären beladenem Sponceram® mit osteogenem Differenzierungsmedium.



**Abbildung 4-11:** Alizarinrot Färbung der adMSC (links) und der ucMSC (rechts) nach 28 Tagen statischer Kultivierung auf Mikrosphären beladenem Osseolive® mit osteogenem Differenzierungsmedium.

Der Aktivitätsverlauf der Alkalischen Phosphatase deutet auf eine erfolgreiche Differenzierung der adMSC hin. Sowohl der Überstand der auf Sponceram® als auch der auf Osseolive® kultivierten Zellen weist eine typische AP-Aktivitätskurve auf, wobei die Konzentration bei den auf Sponceram® kultivierten Zellen an Tag 20 deutlich geringer ist, als an den Tagen zuvor und den Folgetagen danach. Der Kulturüberstand der ucMSC weist zwar eine geringere AP-Aktivität auf als die adMSC, jedoch ist bei den auf Sponceram® kultivierten Zellen ein typischer Kurvenverlauf mit einem Konzentrationsanstieg bis zu Tag 20 erkennbar, wohingegen der Überstand der auf Osseolive® kultivierten Zellen eine konstant niedrige AP-Aktivität aufweist.



**Abbildung 4-12:** Ergebnis der Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase über 28 Tage statischer Kultivierung auf Sponceram®. Abgebildet sind die Ergebnisse beider Zelltypen auf Mikrosphären beladenen Sponceram® (links) und Osseolive® (rechts) unter Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium.

### Fazit

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass sowohl die adMSC als auch die ucMSC unter statischen Bedingungen osteogen differenzierbar sind. Die Differenzierung der Zellen aus der Nabelschnur erwies sich allerdings als schwieriger, da die Zellen von Natur aus ein extrem hohes Proliferationspotential besitzen, welches auch auf den dreidimensionalen Trägermaterialien dazu geführt hat, dass sich die Zellen teilweise in Form einer gesamten Zellschicht von dem Material abgelöst haben. Die Zellen scheinen intensive Signale, in Form von Osteogenese induzierenden Faktoren, zu benötigen, um in die osteogene Richtung zu differenzieren und gleichzeitig die Proliferation zu senken. Die Kombination von BMP-2 freisetzenden Mikrosphären auf Sponceram® und Kulturmedium, welches mit Osteogenese induzierenden Zusätzen versehen wurde, haben dabei die vielversprechendsten Ergebnisse geliefert. Unter diesen Bedingungen konnte für beide Zelltypen sowohl eine typische Aktivitätskurve für AP nachgewiesen werden, als auch die Mineralisierung der extrazellulären Matrix. Diese Beobachtung wurde auch von Panetta et al. publiziert. Sie kultivierten adMSC in osteogenem Differenzierungsmedium unter Zugabe von rekombinanten BMP-2 und stellten eine erhöhte Expressionsrate knochenspezifischer Gene fest. Auch die Mineralisierung der ECM war höher, als bei der Kultivierung ohne Zugabe von BMP-2.<sup>120</sup>

Die adMSC konnten allerdings auch schon in zweidimensionaler Umgebung osteogen differenziert werden, da die Zellen ein eingeschränktes Proliferationspotential aufweisen und die Problematik des Ablösens nicht auftrat. Die Kultivierung der Zellen auf den mit BMP-2 freisetzenden Mikrosphären modifizierten Trägermaterialien ohne Zugabe von weiteren Supplementen, die die Osteogenese induzieren, führte hingegen bei beiden Zelltypen nicht zu einer erfolgreichen Differenzierung. Die histologischen Färbungen belegten nur ein sehr schwach positives Ergebnis für die Einlagerung von Calcium in die extrazelluläre Matrix und die gemessene AP-Aktivität war über den gesamten Kultivierungszeitraum beider Zelltypen konstant niedrig.

In den folgenden Kapiteln wurden neben den dreidimensionalen Trägermaterialien die Auswirkungen mechanischer Stimulation auf die osteogene Differenzierung der beiden Zelltypen untersucht.

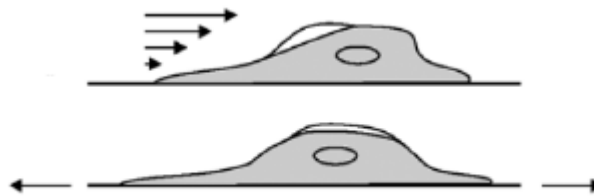
## 4.2 Mechanische Stimulation mesenchymaler Stammzellen

Mechanische Belastungen und Stimulationen in Form von Flüssigkeitsströmen in den Blutgefäßen oder durch Muskelkontraktionen spielen *in vivo* sowohl bei der Entwicklung von neuem Knochengewebe als auch bei der Regeneration des Knochengewebes nach einer Fraktur eine wichtige Rolle. Schon Wolff postulierte 1870, dass Knochengewebe die Fähigkeit besitzt Form und Masse zu ändern, um die mechanische oder metabolische Funktion zu optimieren. Dieses Phänomen wird auch als funktionale Adaptation bezeichnet und kann unter anderem durch mechanische Über- oder Unterbelastung des Knochens hervorgerufen werden.<sup>121-123</sup> Auch *in vitro* wurde eine physiologische Reaktion von Zellen auf mechanische Stimulationen, in Form erhöhter Genexpression knochenspezifischer Proteine oder Mineralisierung der Knochenmatrix, nachgewiesen.<sup>59, 60, 124</sup> Daher ist es naheliegend den Prozess der mechanischen Stimulation im Bereich des *Tissue Engineerings* anzuwenden und die osteoblastäre Differenzierung von Stammzellen durch mechanische Reize zu beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe und der Whartonschen Sulze der Nabelschnur in Stimulationenmaschinen, welche am Institut für Technische Chemie in Zusammenarbeit mit Prof. Martijn van Griensven (Ludwig Boltzmann Institut für Traumatologie, Wien) entwickelt worden sind, uniaxial gedehnt. Die Zellen wurden dafür in ein Kollagen-Netzwerk (Matristypt®) eingebracht, um sie in einem dreidimensionalen Umfeld zu stimulieren und auf diese Weise die natürliche Umgebung der Zellen nachzuahmen und die osteogene Differenzierung anzuregen. Das Kollagen-Netzwerk wurde ausgewählt, da das Knochengewebe zu 20 % aus organischen Substanzen besteht und dieser Anteil zu 95 % Kollagen I enthält. Das Kollagen-Netzwerk wurde vor der Besiedlung mit Zellen in eine dehnbare Silikonschale eingebettet (siehe Abschnitt 7.5.3.2). Diese wurde mit Hilfe einer Klemmvorrichtung in der Stimulationenmaschine befestigt und gedehnt, wodurch auch das Kollagen-Netzwerk und die darin befindlichen Zellen der mechanischen Dehnung ausgesetzt waren. Mit Hilfe einer eigens am Institut für Technische Chemie entwickelten Software können die Stimulationenmaschinen elektronisch gesteuert

werden und die Zellen wurden zeitlich unterschiedlichen Stimulationsmustern ausgesetzt.

Bei einer mechanischen Dehnung wird die Stimulation direkt von der Gerüstsubstanz auf die anhaftenden Zellen übertragen. Darüber hinaus sind die Zellen während der mechanischen Dehnung Flüssigkeitsscherstress, hervorgerufen durch die Bewegung des Kulturmediums, ausgesetzt. Im Vergleich zur mechanischen Dehnung wird hier die ausgeübte Kraft aber nur auf die Zellmembran übertragen.<sup>125</sup> Der auf diese Weise induzierte Flüssigkeitsscherstress ist nicht so intensiv, wie direkte Stimulationen mit Flüssigkeitsscherstress. You et al. haben jedoch gezeigt, dass die Stimulation durch das Kulturmedium signifikante Auswirkungen auf die Differenzierung von humanen fötalen Osteoblasten hat.<sup>126</sup>



**Abbildung 4-13:** Deformation einer Zelle hervorgerufen durch Flüssigkeitsscherstress (oben) und mechanische Dehnung(unten) (adaptiert aus Mullender et al.<sup>125</sup>).

#### 4.2.1 Entwicklung eines Messsystems zur online Überwachung der Sauerstoffkonzentration während der mechanischen Stimulation

Um eine online Überwachung der Sauerstoffkonzentrationen in dem Kulturmedium während einer mechanischen Stimulation zu ermöglichen, wurden die Silikonschalen, in denen die Stimulationen der Zellen durchgeführt wurden, modifiziert. Dazu wurden optische Sensoren der Firma PreSens GmbH in die Silikonschalen eingebaut und die Schalen und die Stimulationsmaschinen so umgebaut (siehe Abschnitt 7.5.3.1), dass eine Messung der Sauerstoffkonzentration während der Stimulationsversuche möglich war. Hierdurch soll die Möglichkeit geschaffen werden, Rückschlüsse auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen während einer mechanischen Stimulation zu erzielen.

Die Fluorophore auf dem Sauerstoffsensoren wurden mittels einer LED über ein Glasfaserkabel bei 505 nm angeregt. Durch Zusammenstöße der Fluorophore mit

Sauerstoffmolekülen wird die absorbierte Energie strahlungslos von den Fluorophoren auf die Sauerstoffmoleküle übertragen. Die Fluorophore werden dabei entladen und emittieren ein Licht geringerer Intensität, verglichen mit der Intensität der anregenden Strahlung. Die Fluoreszenzintensität bzw. die Lebensdauer des angeregten Zustandes der Fluorophore hängt dabei von der Konzentration des Sauerstoffs im Kulturmedium ab. Je mehr Sauerstoff in dem Medium vorhanden ist, desto schneller und desto mehr Fluorophore werden entladen. Es resultiert eine verringerte Fluoreszenzintensität.

Die Messungen des Sauerstoffgehaltes erfolgten während der mechanischen Stimulation von ucMSC und wurden von Bilyana Suvandzieva im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt. Für die Etablierung des Systems wurden die Messungen in zweidimensionalen Silikonschalen ohne Kollagen-Netzwerk durchgeführt. Dafür wurden 200.000 Zellen pro Silikonschale verwendet. Diese wurden auf dem Boden der Schalen ausplattiert und 1 Woche in den Silikonschalen mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert und anschließend mechanisch gedehnt. Die Zellen wurden in den gezeigten Ergebnissen einer dreimal vierstündigen und einer dreimal achtstündigen Stimulation unterworfen. Dabei wurden die Zellen dreimal über die genannten Zeiträume gedehnt. Zwischen den drei einzelnen Stimulationen wurde jeweils eine Pause eingelegt, die doppelt so lang war, wie die durchgeführte Stimulation. Der Sauerstoffgehalt wurde während der mechanischen Stimulation einmal pro Minute gemessen. Der höchste Wert der jeweiligen Messung wurde gleich 100 % gesetzt. Da der Sauerstoffgehalt der Luft ca. 20 % beträgt, wurde der höchste Wert jeder Messung dem Sauerstoffgehalt der Luft gleichgesetzt. Der Sauerstoffgehalt, der während der Experimente gemessen wurde, lag zwischen 85-95 %, was einem Luftsauerstoffgehalt von 17-19 % entspricht.

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen exemplarisch die Ergebnisse der Messungen. Eine Veränderung des Sauerstoffgehalts durch die mechanische Stimulation konnte sowohl bei der dreimal vierstündigen Stimulation als auch bei der dreimal achtstündigen Stimulation festgestellt werden. Zunächst war bei beiden Messungen ein starker Abfall der Sauerstoffkonzentration in den ersten fünf Stunden zu beobachten, der sich nach dem ersten Stimulationsdurchlauf in der ersten Pause normalisierte. Anschließend stieg die Sauerstoffkonzentration in beiden Messungen während des zweiten Stimulationsdurchlaufes wieder leicht um

1-2 % an. Während nächsten Pausen zwischen den vier- bzw. achtstündigen Dehnungen wurde wieder eine geringe Abnahme des Sauerstoffs festgestellt und die darauf folgenden Stimulationen riefen einen erneuten Anstieg der Sauerstoffkonzentration hervor.

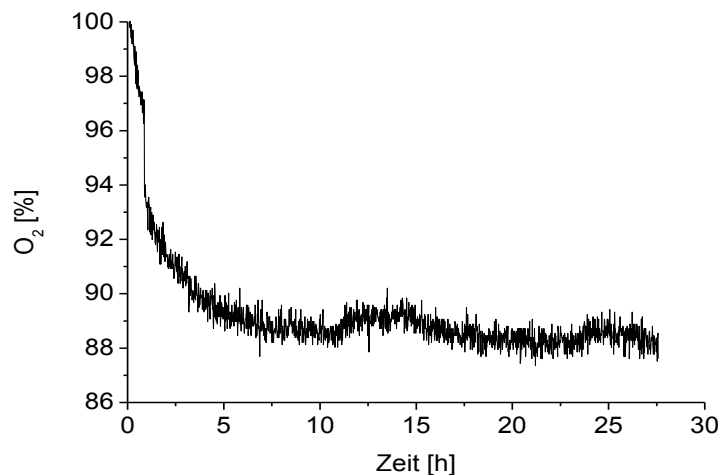


Abbildung 4-14: Sauerstoffgehalt des Mediums während einer 3 x4 h Stimulation.

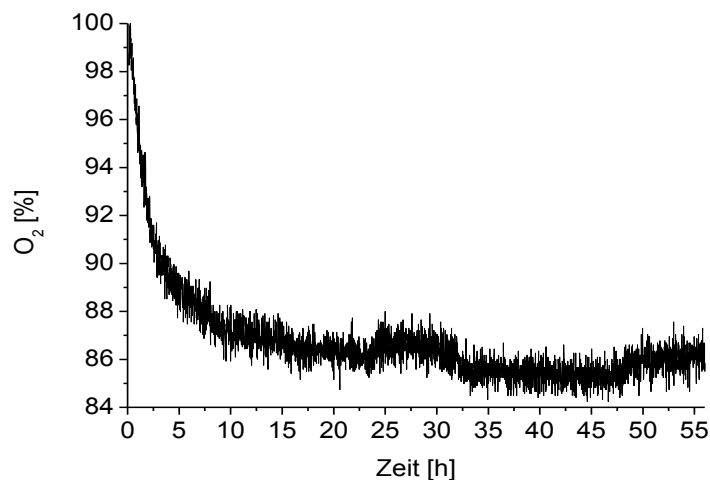


Abbildung 4-15: Sauerstoffgehalt des Mediums während einer 3 x8 h Stimulation.

Eine schnelle Abnahme des Sauerstoffgehalts zu Beginn der mechanischen Stimulation wurde bei den übrigen Experimenten ebenfalls beobachtet. Eine Entgasung fand vermutlich infolge der zyklischen Bewegung statt. Die Reaktion der Zellen auf die mechanische Stimulation in Form einer Verstärkung des Metabolismus ist dabei allerdings nicht ausgeschlossen. Die Energieversorgung der eukaryotischen Zellen erfolgt in den Mitochondrien über einen aeroben Abbau der Glucose zu CO<sub>2</sub> und Wasser, wobei Adenosintriphosphat (ATP) aus



Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P) gebildet wird. Die freiwerdende Energie wird in Form von ATP gespeichert. Der Sauerstoff dient als Oxidationsmittel, wobei pro Glukosemolekül sechs Sauerstoffmoleküle verbraucht werden. Der intensive Sauerstoffverbrauch am Anfang der Experimente konnte auch auf einen intensiven Stoffwechsel zurückzuführen sein. Während der ersten und der zweiten Pause wiesen die Zellen einen nahezu konstanten Sauerstoffgehalt auf. Es fand vermutlich eine Anpassung des Zellmetabolismus statt. Die zweite und die dritte Stimulation bewirkten eine Zunahme der Sauerstoffkonzentration. Die Zellen reagierten vermutlich auf eine wiederholte Stimulation mit einem Absenken des Metabolismus. Dies konnte als ein Zeichen für die Anpassung der Zellen an die physikalisch aktive Umgebung gedeutet werden.

#### 4.2.2 *Stimulation mesenchymaler Stammzellen*

Um die Auswirkungen der mechanischen Stimulation auf das Differenzierungsverhalten der mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen, wurden verschiedene Stimulationsmuster durchlaufen. Die Zellen wurden jeweils über verschiedene Zeiträume mechanisch gedehnt, wobei jedes Experiment aus drei Versuchsreihen bestand und pro Versuchsreihe sechs Silkonschalen (sechsfach Bestimmung) verwendet wurden. Bei der ersten Versuchsreihe wurde die entsprechende Stimulation einmal durchgeführt, bei der zweiten Versuchsreihe wurden die Zellen dreimal stimuliert, wobei zwischen den einzelnen Stimulationen immer eine Pause eingelegt wurde, die doppelt so lange war, wie die jeweilige Stimulationsdauer. Eine dritte Versuchsreihe diente als Kontrolle und wurde mechanisch nicht stimuliert. Es wurden Stimulationsmuster über 15 Minuten und 4 h untersucht. Des Weiteren wurde eine „ansteigende“ Stimulation durchgeführt. Dabei wurden die Zellen einer Stimulation unterworfen, in der die Zellen zunächst 15 Minuten, dann 60 Minuten, 2 Stunden, vier Stunden und schließlich acht Stunden stimuliert wurden. Zwischen den einzelnen Stimulationen wurden Pausen eingelegt, die doppelt so lang waren, wie die direkt zuvor durchgeführte Stimulation. Auch hier wurden Zellen zum Vergleich mechanisch nicht stimuliert. Alle Experimente wurden bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Dehnungsamplitude von 5 % durchgeführt, da

sich diese Werte in vorherigen Arbeiten als besonders erfolgsversprechend bewährt haben.<sup>63</sup>

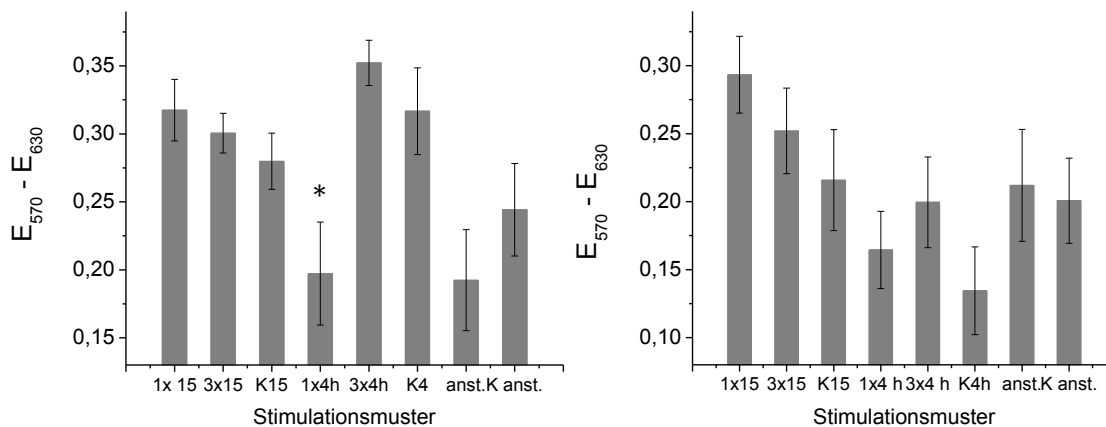
**Tabelle 1:** Durchgeführte Stimulationsmuster

	Einmalige Stimulation	Dreimalige Stimulation
15 Minuten	1x15 Min.	15 Min.-30 Min. Pause-15 Min.-30 Min. Pause-15 Min.
4 h	1x4 h	4 h - 8 h Pause- 4 h - 8 h Pause - 4 h
„ansteigend“	15 Min.-30 Min. Pause-1h-2h Pause-2h-4h Pause-4h-8h Pause-8h	

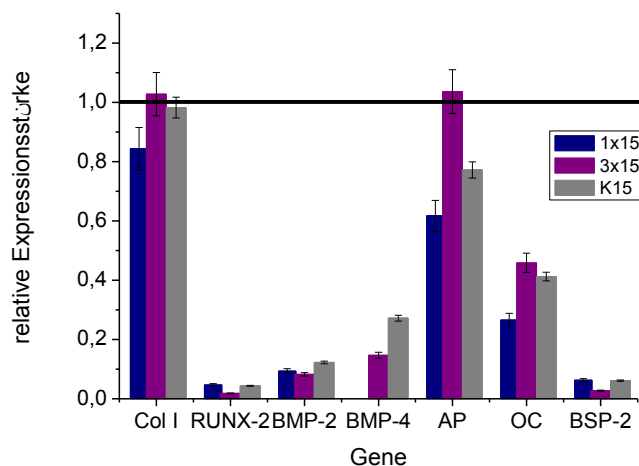
Die Zellen wurden 1 Woche vor Beginn des jeweiligen Experiments in das Kollagen-Netzwerk injiziert, dabei wurden pro Silikonschale (50mm × 3 mm) 500.000 Zellen verwendet. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in osteogenem Differenzierungsmedium. 24 h vor Beginn der Stimulation wurde das Medium gewechselt und Reduktionsmedium mit einem Serumanteil von 1 % verwendet, um alle Zellen in die G0 Phase zu überführen. In der G0 Phase wird die Proliferation herabgesetzt und die DNA- und Proteinsynthese sind minimal. Durch die Kultivierung in Reduktionsmedium war der Zellzyklus der Zellen zu Beginn der Stimulation annähernd synchron. Direkt vor der Stimulation wurde erneut das Medium gewechselt und die Zellen wurden während der mechanischen Dehnung in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Auch die Kontrollzellen, welche auch in Silikonschalen auf Matristypt® kultiviert aber nicht stimuliert wurden, wurden den Medienwechseln unterzogen. Nach Beendigung der Experimente wurden, nach dreimaligem Waschen mit PBS, Proben aus der Kollagen-Matrix ausgestanzt und für einen Viabilitätsassay, Aktivitätsmessung der membrangebundenen Alkalischen Phosphatase und Gefrierschnitte für eine Antikörperfärbung präpariert. Dabei wurden das Enzym Alkalische Phosphatase welches in die osteogene Differenzierung von Zellen involviert ist, mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt. Der Nachweis von BSP-2, einem weiteren wichtigen Protein welches während der osteogenen Differenzierung von Stammzellen einmal zu Beginn der Differenzierung und am Ende der Differenzierung synthetisiert wird, wurde ebenfalls mittels einer Antikörper Färbung durchgeführt. Die übrige Kollagen-Matrix wurde in Lysis Puffer eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt RT-PCR durchzuführen.

## 4.2.2.1 Stimulation der mesenchymalen Stammzellen in einem Kollagen-Netzwerk

Zunächst wurde direkt nach der mechanischen Stimulation ein MTT Test durchgeführt, um zu ermitteln, ob die mechanische Dehnung einen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hatte. Im Falle der adMSC konnte jedoch kein Einfluss auf die Viabilität in Folge der mechanischen Dehnung festgestellt werden. Lediglich die 1x4 h stimulierten Zellen wiesen eine signifikant geringere Viabilität auf, als die Zellen die als Kontrolle ohne mechanische Stimulation kultiviert worden sind. Die Zellen nach 15 Minuten Stimulation und die 3x4 h stimulierten Zellen wiesen sogar minimal höhere Viabilitäten auf, als die Kontrollzellen, jedoch ohne statistische Signifikanz. Während bei der kontinuierlich ansteigenden Stimulation die Kontrollzellen eine höhere Viabilität aufwiesen, als die stimulierten Zellen. Auch hier jedoch bestand keine statistische Signifikanz. Auch im Falle der ucMSC führten die mechanischen Stimulationen zu keinerlei statistisch signifikanten Veränderungen bezüglich der Viabilität der Zellen. Dennoch waren in allen Stimulationsexperimenten die Viabilitäten der mechanisch stimulierten Zellen höher, als die der jeweiligen parallel kultivierten Kontrollen, insbesondere die einmal 15 Minuten und dreimal vier Stunden stimulierten Zellen



**Abbildung 4-16:** Zellviabilität der adMSC (links) und ucMSC (rechts). Die Stimmulationsversuche wurden mit einer Applikationsdauer von 15 Min, 4h einmal (1xS) oder dreimal (3xS) und zeitlich ansteigend (anst.) durchgeführt. Zu den Experimenten wurde parallel eine Kontrollreihe ohne mechanische Stimulation kultiviert (K15, K4 h, K anst.). Angegeben sind die Mittelwerte aus sechs Experimenten  $\pm$  Standardfehler. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Experiment und Kontrolle ( $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.



**Abbildung 4-17:** Ergebnis der RT-PCR der adMSC nach einer 15 Minuten Stimulation. Dargestellt sind die biologischen Mittelwerte aus 6 Experimenten  $\pm$  der Standardfehler bezogen auf die Expression von GAPDH, welche als Linie dargestellt ist.

In Abbildung 4-17 ist das Genexpressionsmuster der adMSCs, die einer 15 Minuten Stimulation unterworfen worden sind, dargestellt. Die Ergebnisse der Zellen, die 4 h bzw. mit einem zeitlich ansteigenden Muster stimuliert worden sind, befinden sich im Anhang (7.6.1). Die einmal 15 Minuten Stimulation ergab keine deutlichen Abweichungen bezüglich der Expression typischer Knochenmarker im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Kollagen I, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin wurden in geringerem Maße exprimiert und BMP-4 wurde von den stimulierten Zellen nicht exprimiert. Die dreimal stimulierten Zellen hingegen wiesen eine höhere AP-Expression auf als die Kontrollzellen, die BMP-4 Expression hingegen war im Vergleich geringer. Die dreimal 4 h Stimulation der adMSC ergab kaum Unterschiede im Bezug auf die relativen Expressionsstärken der Marker im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Lediglich BMP-4 wurde in geringerem Maße exprimiert und BSP-2 konnte nicht nachgewiesen werden. Die einmal 4 h stimulierten Zellen hingegen wiesen eine höhere Expression von Kollagen I und Alkalischer Phosphatase auf. Nach der zeitlich ansteigenden Stimulation war im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen die Expression von Kollagen I und Osteocalcin geringer, während die Expression von AP und BSP-2 hochreguliert war. RUNX2, BMP-2 und BMP-4 konnten nicht nachgewiesen werden. In Tabelle 2 sind Genexpressionen der adMSC nach den verschiedenen Stimulationsmustern zusammengefasst.

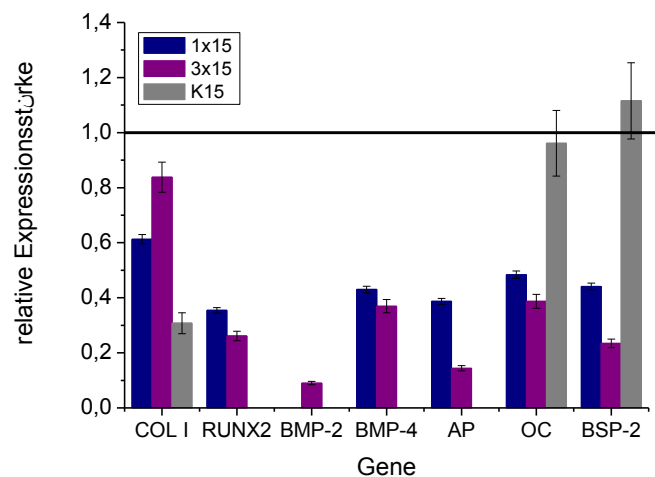
**Tabelle 2:** Genexpression der adMSC nach einer mechanischen Stimulation. Eine Expression des entsprechenden Gens ist mit +, eine nicht nachgewiesene Expression mit – gekennzeichnet. Die Genexpressionen sind nacheinander angegeben für die einmal stimulierten, die dreimal stimulierten und die nicht stimulierten Zellen.

	Col I	RUNX2	BMP-2	BMP-4	AP	OC	BSP-2
15 Minuten	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
„ansteigend“	++	--	--	--	++	++	++

Die mechanisch stimulierten ucMSC wiesen im Gegensatz zu den adMSC eine deutlichere Reaktion im Bezug auf das Expressionsmuster typischer Knochenmarker auf. In Abbildung 4-18 ist das Ergebnis der RT-PCR nach der 15 Minuten Stimulation dargestellt. In beiden Stimulationsmustern war die Expression von Kollagen I im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen hochreguliert, während die Expression von Osteocalcin und BSP-2 geringer war. Für die nicht stimulierten Zellen konnte die Expression von RUNX2, BMP-2, BMP-4 und AP nicht nachgewiesen werden, BMP-2 wurde auch von den einmal 15 Minuten stimulierten Zellen nicht exprimiert. Die ucMSC, die dem vierstündigen Stimulationsmuster unterzogen wurden, zeigten ähnlich der adMSC kaum Abweichungen im Expressionsmuster verglichen mit den nicht stimulierten Zellen. Lediglich die Expression von Kollagen I der einmal stimulierten Zellen und die Expression von AP der dreimal stimulierten Zellen waren im Vergleich geringer. Nach der zeitlich ansteigenden Stimulation ergab sich ein ähnliches Expressionsmuster wie bei adMSC, die einer zeitlich ansteigenden Stimulation unterzogen wurden. Lediglich die Expression von Kollagen I, AP, Osteocalcin und BSP-2 konnten nachgewiesen werden. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen nach den Stimulationen zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Genexpression der ucMSC nach einer mechanischen Stimulation. Eine Expression des entsprechenden Gens ist mit +, eine nicht nachgewiesene Expression mit – gekennzeichnet. Die Genexpressionen sind nacheinander angegeben für die einmal stimulierten, die dreimal stimulierten und die nicht stimulierten Zellen.

	Col I	RUNX2	BMP-2	BMP-4	AP	OC	BSP-2
15 Minuten	+++	++-	--	++-	++-	+++	+++
4 h	+++	+++	---	+++	+++	+++	+++
„ansteigend“	++	--	--	--	++	++	++



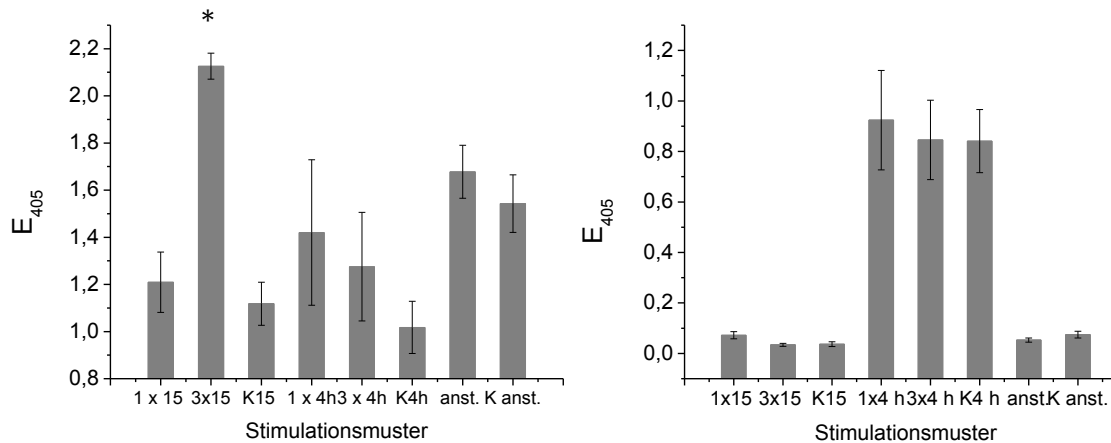
**Abbildung 4-18:** Ergebnis der RT-PCR der ucMSC nach einer 15 Minuten Stimulation. Dargestellt sind die biologischen Mittelwerte aus 6 Experimenten  $\pm$  der Standardfehler bezogen auf die Expression von GAPDH, welche als Linie dargestellt ist.

Der Expressionsnachweis knochentypischer Markerproteine ist ein Indiz dafür, dass beide Zelltypen in die osteogene Richtung ausdifferenziert sind, was allerdings maßgeblich auf die Kultivierung der Zellen in Medium mit osteoinduktiven Zusätzen zurückzuführen ist, da auch bei den nichtstimulierten Zellen eine Genexpression knochentypischer Markerproteine nachgewiesen wurde. Den Differenzierungsfortschritt der Zellen anhand der Genexpressionsanalyse zu bestimmen, ist schwierig, da sowohl die adMSC als auch die ucMSC in allen Stimulationsexperimenten Gene der frühen als auch der späten Differenzierungsphase exprimierten. Die Expression von Osteocalcin in allen Stimulationsexperimenten deutet aber darauf hin, dass sich schon Zellen in einem weit fortgeschrittenen Differenzierungsstadium befinden. Dennoch hatte die mechanische Stimulation durchaus Einfluss auf die Genexpression. Die ucMSC exprimierten nach 15 minütiger Stimulation Kollagen I stärker als die Kontrollzellen. Da Kollagen I die Hauptkomponente des organischen Anteils der Knochenmatrix darstellt, könnte eine erhöhte Expression auf eine erhöhte Matrixbildung, hervorgerufen durch die mechanische Stimulation, deuten. Auch die einmal 4 h stimulierten Zellen zeigen dieses Phänomen. Während die dreimal 4 h stimulierten Zellen keine erhöhte Kollagen I Expression aufweisen, was für eine Gewöhnung der Zellen an die mechanische Stimulation nach längeren Stimulationsmustern spricht. Bei den adMSC konnte dieses Verhalten nicht festgestellt werden, die Zellen

scheinen nicht so sensibel auf die mechanische Stimulation reagiert zu haben wie die ucMSC.

Als Reaktion der Zellen auf eine mechanische Stimulation wird die Expression bestimmter Gene reguliert und die jeweilige Proteinsynthese in der Zelle ausgelöst. Um eventuelle Auswirkungen der mechanischen Stimulation auf Proteinebene zu untersuchen wurde die Aktivität der membrangebundenen Alkalischen Phosphatase mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion, in der das farblose p-Nitrophenylphosphat in gelbes p-Nitrophenol umgesetzt wird, untersucht. Die Intensität der Färbung wurde photometrisch vermessen und ist direkt proportional zur Aktivität von AP. Weiterhin wurden AP und BSP-2 immunhistochemisch nachgewiesen. Dafür wurden Gefrierschnitte der Zell-Matrix Konstrukte angefertigt und diese mit einer sekundären Antikörper Färbung angefärbt. Dabei bindet zunächst ein primärer Antikörper spezifisch an AP bzw. BSP-2. Ein zweiter fluoreszenzmarkierter Antikörper bindet dann spezifisch an den ersten Antikörper. Die Zellkerne wurden parallel mit einer DAPI Färbung sichtbar gemacht.

Die Aktivität der membrangebundenen Alkalischen Phosphatase ist in Abbildung 4-19 dargestellt. Sie variierte bei den adMSC je nach Stimulationsmuster. Besonders die 3x15 Minuten stimulierten Zellen wiesen eine hohe Aktivität auf, die statistisch signifikant höher war, als die der einmal stimulierten Zellen und der Kontrolle. Auch die einmal und dreimal vier Stunden stimulierten Zellen wiesen eine höhere Aktivität als die Kontrollzellen auf, jedoch war diese Erhöhung nicht signifikant. Mit Hilfe der Antikörper Färbung von AP konnten jedoch nur in der 3x15 Minuten Stimulation, deren Kontrolle und der zeitlich ansteigenden Stimulation positive Zellen nachgewiesen werden. Auch hier war die Anzahl der positiven Zellen nach der 3x15 Minuten Stimulation am höchsten. Dieses Ergebnis passt zu den Resultaten der Genexpressionsanalyse, die eine erhöhte AP-Expression der dreimal 15 Minuten stimulierten Zellen und der zeitlich ansteigend stimulierten Zellen gegenüber den nicht stimulierten Kontrollzellen ergab. Allerdings war auch die AP-Expression der Zellen, die einer 4 h Stimulation unterworfen wurden, relative hoch, es konnte jedoch keine Alkalische Phosphatase mit der Antikörper Färbung nachgewiesen werden.



**Abbildung 4-19:** Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase der adMSC (links) und der ucMSC (rechts). Die Stimulationsversuche wurden mit einer Applikationsdauer von 15 Min, 4h einmal (1xS) oder dreimal (3xS) und kontinuierlich ansteigend (anst.) durchgeführt.

Zu den Experimenten wurde eine Kontrollreihe ohne mechanische Stimulation parallel kultiviert (K). Angegeben sind die Mittelwerte aus sechs Experimenten  $\pm$  Standardfehler. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Experiment und Kontrolle ( $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

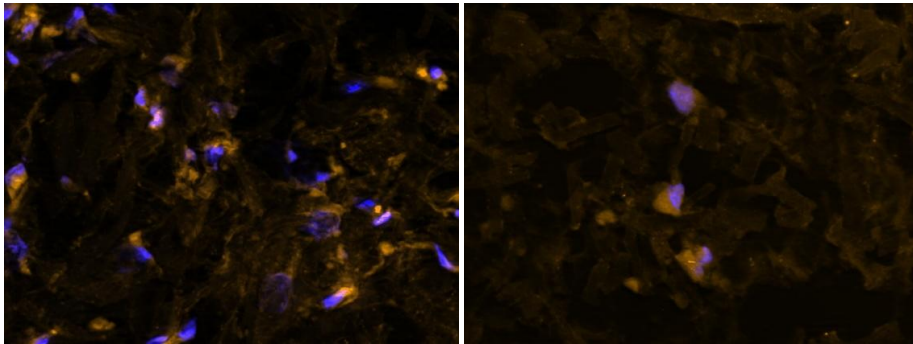
Bei den ucMSC war die Aktivität der AP im Vergleich zu den adMSC insgesamt geringer. Zwischen den einzelnen Stimulationen konnten jedoch keinerlei statistisch relevante Unterschiede nachgewiesen werden. Allerdings war die AP-Aktivität der Zellen der 15 Minuten Stimulation sowie der zeitlich ansteigenden Stimulation und deren Kontrollen mit Werten  $< 0,1$  sehr gering, während die Zellen der 4 h Stimulationen deutlich höhere Werte aufwiesen. Dieses Ergebnis konnte durch die AP-Antikörper Färbung bestätigt werden (Tabelle 4). Lediglich bei den einmal und den dreimal vier Stunden stimulierten Zellen konnte ein positiver AP-Nachweis festgestellt werden (Abbildung 4-21). Die Genexpressionsanalyse der Zellen hingegen ergab für alle Stimulationsmuster eine relativ geringe Expression der Alkalischen Phosphatase im Verhältnis zu der Expression des *house keeping* Gens. In Tabelle 4 sind die Stimulationsmuster aufgelistet, nach denen ein positiver Nachweis von Alkalischer Phosphatase bzw. BSP-2 gezeigt werden konnte.

**Tabelle 4:** Positive Antikörper Färbung von AP und BSP-2 der adMSC und ucMSC.

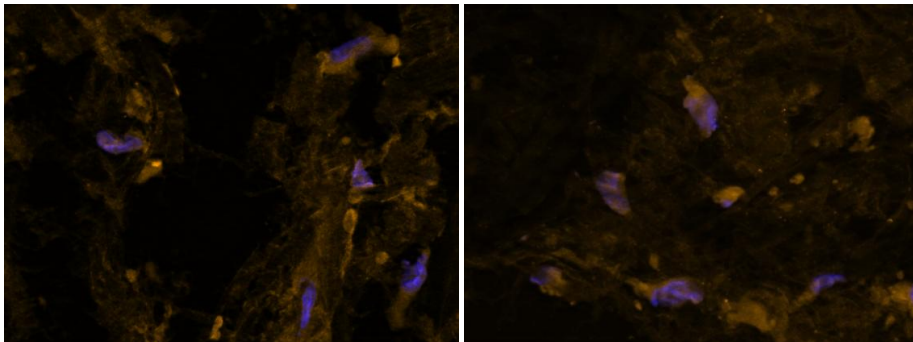
	adMSCs	ucMSC
AP	3x15 Min., K15 Min., ansteigende Stimulation	1x4 h, 3x4 h
BSP-2	ansteigende Stimulation Kontrolle ansteigende Stimulation	K15, 3x4 h, K4 h



Im Falle der adMSC konnte das BSP-2 lediglich bei den zeitlich ansteigend stimulierten Zellen (Abbildung 4-20) und deren Kontrollzellen nachgewiesen werden, während bei den ucMSC der BSP-2 Nachweis für die Kontrollzellen der 15 Minuten und 4 h Stimulation, sowie für die dreimal 4 h stimulierten Zellen (Abbildung 4-21) positiv war. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der Genexpressionsanalyse, wo lediglich die zeitlich ansteigend stimulierten adMSC BSP-2 stark exprimierten. Bei den ucMSC war die Expression von BSP-2 in den Kontrollzellen der 15 Minuten Stimulation besonders hoch.



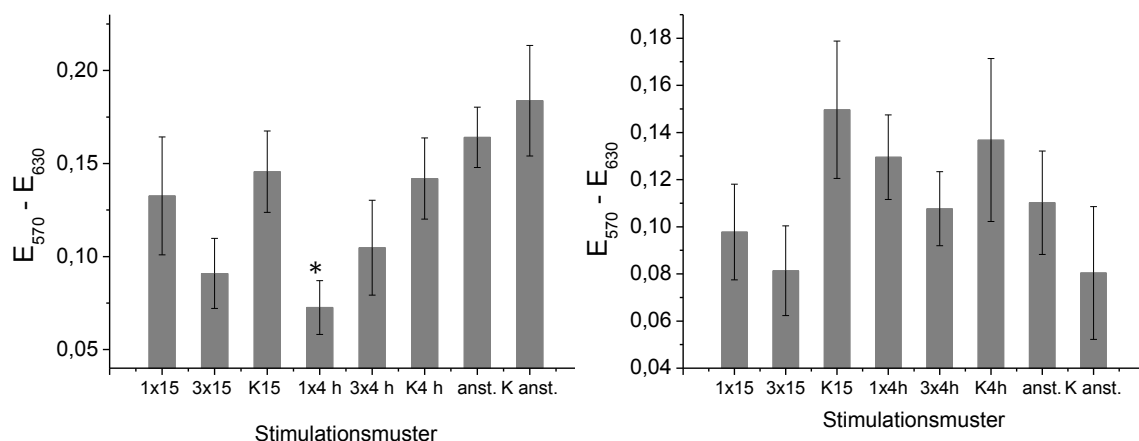
**Abbildung 4-20:** DAPI/AP Doppelfärbung der adMSC der 15 Minuten Kontrolle (links) und DAPI/BSP-2 Doppelfärbung nach einer zeitlich ansteigenden Stimulation (rechts).



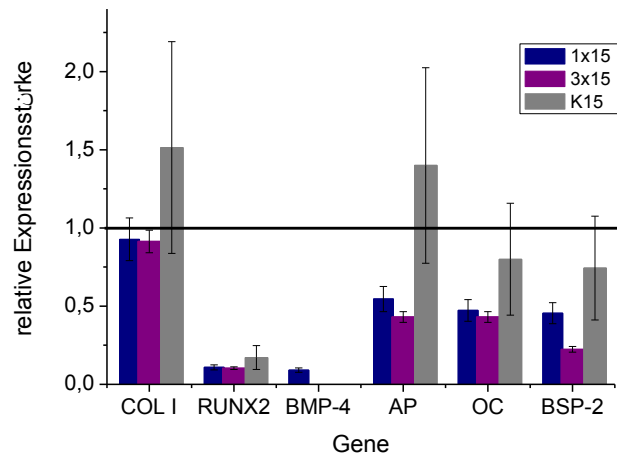
**Abbildung 4-21:** DAPI/AP Doppelfärbung der ucMSC nach einer 1x4 h Stimulation (links) und DAPI/BSP-2 Doppelfärbung nach einer 3x4 h Stimulation (rechts).

#### 4.2.2.2 Mechanische Stimulation der mesenchymalen Stammzellen in einem mit PLGA Mikrosphären beladenen Kollagen-Netzwerk

Die Ergebnisse der Viabilitätsmessungen der Zellen, welche in einem, mit BMP-2 freisetzenden Mikrosphären beladenem, Kollagen-Netzwerk mechanisch gedehnt worden sind, sind in Abbildung 4-22 dargestellt. Sie weichen bis auf die adMSC, die 1x4 h stimuliert worden sind, nicht statistisch signifikant von den Viabilitäten der parallel kultivierten Kontrollen ab. Die verringerte Viabilität der 1x4 h stimulierten adMSC wurde auch schon bei dem Stimulationsexperiment ohne BMP-2 freisetzende Mikrosphären beobachtet. Scheinbar reagieren die adMSC nach einem Zeitraum von ca. 4 h auf eine Dehnungsapplikation mit einer zeitweilig geringeren Viabilität. Da die Viabilitäten der dreimal vier Stunden stimulierten Zellen keinerlei Abweichungen bezüglich der Viabilität im Vergleich mit den nicht stimulierten Zellen zeigen, scheinen die Zellen sich nach einer gewissen Zeit an die Stimulation zu gewöhnen, was sich in einem erneuten Viabilitätsanstieg widerspiegelt. Auch die Viabilitäten der dreimal 15 Minuten stimulierten adMSC und ucMSC wichen deutlich von denen der Kontrollzellen ab, jedoch ohne statistische Signifikanz. Auch die einmal 15 Minuten stimulierten ucMSC wiesen eine geringere Viabilität als die nicht stimulierten Zellen auf, jedoch auch hier bestand keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 4-22:** Zellviabilität der adMSC (links) und ucMSC (rechts). Die Stimulationsversuche wurden mit einer Applikationsdauer von 15 Min, 4h einmal (1xS) oder dreimal (3xS) und zeitlich ansteigend (anst.) durchgeführt. Zu den Experimenten wurde parallel eine Kontrollreihe ohne mechanische Stimulation kultiviert (K15, K4 h, K anst.). Angegeben sind die Mittelwerte aus sechs Experimenten  $\pm$  Standardfehler. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Experiment und Kontrolle ( $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.



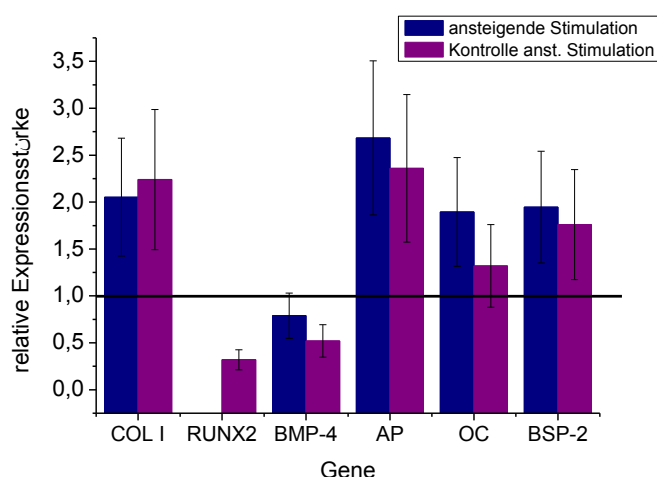
**Abbildung 4-23:** Ergebnis der RT-PCR der adMSC nach einer 15 Minuten Stimulation in einem mit PLGA Mikrosphären beladenen Kollagen-Netzwerk. Dargestellt sind die biologischen Mittelwerte aus 6 Experimenten  $\pm$  der Standardfehler bezogen auf die Expression von GAPDH, welche als Linie dargestellt ist.

Die Genexpressionsanalyse der adMSC nach der 15 minütigen Stimulation (Abbildung 4-23) in einem modifizierten Kollagen-Netzwerk resultierte in beiden Stimulationsmustern in einer deutlich geringeren Expression der analysierten Marker im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Allerdings waren die Abweichungen der Messwerte der Genexpressionen von den Kontrollzellen sehr groß. BMP-2 konnte in keiner der drei Versuchsreihen nachgewiesen werden und BMP-4 nur bei den einmal stimulierten Zellen, die Expression war jedoch sehr gering. Auch RUNX2 wurde von allen Zellen nur in sehr geringem Maße exprimiert. Nach der vierstündigen Stimulation (Abbildung 7-19) konnte lediglich die Expression von Kollagen I, RUNX2 und BSP-2 nachgewiesen werden. Kollagen I wurde von den einmal stimulierten Zellen etwas hochreguliert und von den dreimal stimulierten Zellen etwas geringer exprimiert, als von den nicht stimulierten Zellen, wobei der Fehler bezüglich der Expression bei den dreimal stimulierten Zellen sehr hoch war. RUNX2 wurde von allen Zellen in sehr geringem Maße exprimiert. Lediglich bei der BSP-2 Expression waren deutliche Unterschiede erkennbar, die Expression der stimulierten Zellen war stark herunter reguliert im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Die kontinuierliche Stimulation der adMSC (Abbildung 7-20) hingegen führte zu einer starken Hochregulierung aller Knochenmarker im Vergleich zu den Kontrollzellen. Allerdings konnte die Expression von BMP-2 und BMP-4 in keiner der beiden Versuchsreihen nachgewiesen werden und die

Expression von RUNX2 nur bei den Kontrollzellen, allerdings auch nur sehr schwach. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen nach den Stimulationen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5:** Genexpression der adMSC nach einer mechanischen Stimulation in einem mit Mikrosphären beladenen Kollagen-Netzwerk. Eine Expression des entsprechenden Gens ist mit +, eine nicht nachgewiesene Expression mit – gekennzeichnet. Die Genexpressionen sind nacheinander angeben für die einmal stimulierten, die dreimal stimulierten und die nicht stimulierten Zellen.

	Col I	RUNX2	BMP-2	BMP-4	AP	OC	BSP-2
15 Minuten	+++	+++	---	+--	+++	+++	+++
4 h	+++	+++	---	---	---	---	+++
„ansteigend“	++	++	--	--	++	++	++



**Abbildung 4-24:** Ergebnis der RT-PCR der ucMSC nach einer zeitlich ansteigenden Stimulation in einem mit PLGA Mikrosphären beladenen Kollagen-Netzwerk. Dargestellt sind die biologischen Mittelwerte aus 6 Experimenten  $\pm$  der Standardfehler bezogen auf die Expression von GAPDH, welche als Linie dargestellt ist.

Die zeitlich ansteigende Stimulation der ucMSC in einem mit Mikrosphären modifizierten Kollagen-Netzwerk (Abbildung 4-24) führte hingegen zu keinerlei Hochregulierung der Genexpression der untersuchten Knochenmarker im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Lediglich die Expression von BMP-2 konnte in keiner der drei Versuchsreihen nachgewiesen werden und die Expression von RUNX2 nur bei den Kontrollzellen. Die 15 minütige Stimulation der ucMSC in dem mit PLGA Mikrosphären beladenem Kollagen-Netzwerk (Abbildung 7-21) führte

auch nur zu geringen Änderungen im Genexpressionsmuster. Die einmalige Stimulation führte zu einer Runterregulierung der Kollagen I und RUNX2 Expression im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen, während die dreimalige Stimulation eine Hochregulierung der Kollagen I, RUNX2 und BMP-4 Expression zur Folge hatte. Osteocalcin wurde in beiden Stimulationsmustern geringer exprimiert als bei den Kontrollzellen und die Expression von BMP-2 konnte in keiner der Versuchsreihen nachgewiesen werden. Die vierstündige Stimulation der ucMSC (Abbildung 7-22) führte in beiden Stimulationsmustern zu einer stark herunter regulierten Expression von Kollagen I, insbesondere bei den dreimal 4 h stimulierten Zellen im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen, während die Expression von BSP-2 in den stimulierten Zellen, insbesondere in den einmal 4 h gedehnten Zellen, stärker exprimiert wurde. AP und Osteocalcin wurden von den einmal 4 h stimulierten Zellen stärker exprimiert als in den Kontrollzellen und in den dreimal vierstündig stimulierten Zellen war die Expression geringer. Auch BMP-4 wurde in der einmaligen Stimulation stärker als in den Kontrollzellen exprimiert, während nach der dreimaligen Stimulation die Expression von BMP-4 und RUNX2 nicht nachweisbar waren. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen nach den verschiedene Stimulationsmustern zusammengefasst.

**Tabelle 6:** Genexpression der ucMSC nach einer mechanischen Stimulation in einem mit Mikrosphären beladenen Kollagen-Netzwerk. Eine Expression des entsprechenden Gens ist mit +, eine nicht nachgewiesene Expression mit – gekennzeichnet. Die Genexpressionen sind nacheinander angebenen für die einmal stimulierten, die dreimal stimulierten und die nicht stimulierten Zellen.

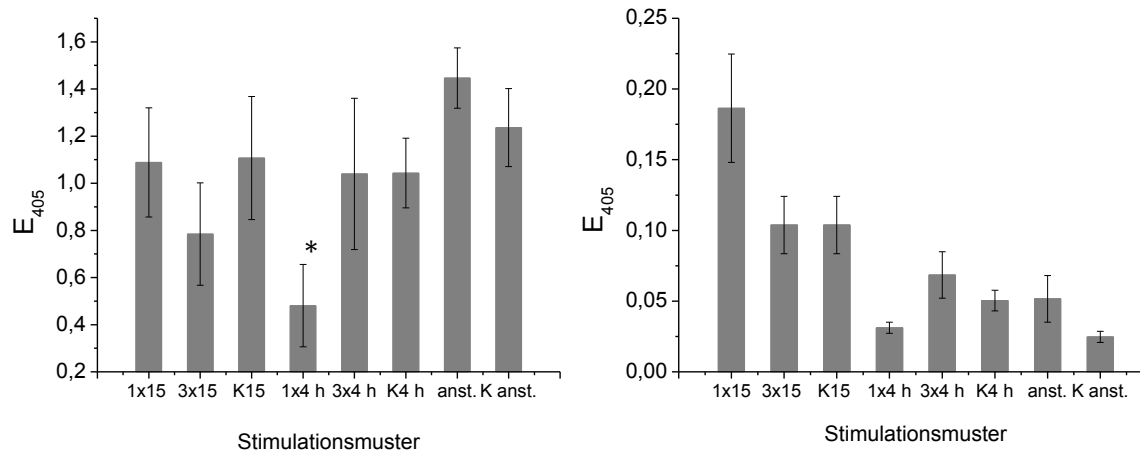
	Col I	RUNX2	BMP-2	BMP-4	AP	OC	BSP-2
15 Minuten	+++	+++	---	+++	+++	+++	+++
4 h	+++	+--	---	+--	+++	+++	+++
„ansteigend“	++	-+	--	++	++	++	++

Die mechanischen Stimulationen der mesenchymalen Stammzellen in einem mit BMP-2 freisetzenden Mikrosphären modifiziertem Kollagen-Netzwerk haben zu einer Expression knochenspezifischer Markerproteine geführt. Wie auch schon bei den Experimenten ohne BMP-2 wurden auch hier Marker der frühen als auch der späten Differenzierungsphase nachgewiesen, was eine Einordnung der Zellen in ein bestimmtes Differenzierungsstadium schwer macht. Bei den adMSC wurden sowohl bei der 15 minütigen Stimulation als auch bei der zeitlich ansteigenden Stimulation

deutliche Abweichungen bezüglich der relativen Expressionsstärke knochenspezifischer Marker im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen festgestellt. Die stimulierten Zellen wiesen eine deutlich geringere Expression auf als die Kontrollzellen, während die adMSC ohne BMP-2 während der 15 Minuten Stimulation kaum Abweichungen im Vergleich zu den nichtstimulierten Zellen bezüglich der Expressionsstärke zeigten. Die zeitlich ansteigend stimulierten Zellen wiederum zeigten eine stark erhöhte Expression, was im Falle der zeitlich ansteigend stimulierten Zellen ohne BMP-2 nicht der Fall war. Scheinbar hat die Kombination aus zeitlich ansteigender Stimulation und BMP-2 zu einer beschleunigten Differenzierung geführt, was in einer verstärkten Expression knochenspezifischer Marker resultierte. Die ucMSC zeigten insbesondere bei der dreimal 15minütigen Stimulation Abweichungen bezüglich der Expressionsstärke der stimulierten Zellen verglichen mit den nicht stimulierten Zellen. Die Hochregulierung von Kollagen I deutet auf eine erhöhte Matrixbildung infolge der Stimulation hin. Auch die erhöhte Expression von RUNX2, welches die Transkription von verschiedenen Genen, die mit der osteogenen Differenzierung in Verbindung stehen, reguliert, spricht für eine verbesserte Differenzierung infolge der mechanischen Stimulation.

Die Aktivität der membrangebundenen AP der Zellen in einem PLGA Mikrosphären beladenem Kollagen-Netzwerk zeigte im Falle der einmal 4 h stimulierten adMSC eine statistisch signifikant geringere Aktivität als die Kontrollzellen (Abbildung 4-25), dieses Ergebnis stimmt mit der statistisch signifikanten geringeren Viabilität der Zellen nach der Stimulation überein. Die übrigen Stimulationsexperimente zeigten keinerlei statistisch relevante Abweichungen bezüglich der AP-Aktivität im Vergleich zu den jeweiligen nicht stimulierten Kontrollzellen. Bei den adMSC war die AP-Aktivität der dreimal 15 Minuten stimulierten Zellen geringer als die der nicht stimulierten Zellen und die Aktivität der zeitlich ansteigend stimulierten Zellen etwas höher als die der nicht stimulierten Zellen, jedoch in beiden Fällen ohne statistische Relevanz. Die einmal 15 Minuten stimulierten ucMSC wiesen eine deutlich höhere AP-Aktivität auf im Vergleich zu den parallel kultivierten, nicht stimulierten Zellen. Dies war auch bei den zeitlich ansteigend stimulierten Zellen der Fall, während die einmal 4 h stimulierten Zellen eine geringere Aktivität wie die

nicht stimulierten Zellen aufwiesen. Alle Abweichungen waren jedoch ohne statistische Signifikanz. Insgesamt waren die AP-Aktivitäten der ucMSC, wie in den Stimulationsexperimenten ohne PLGA Mikrosphären auch, deutlich geringer als die der adMSC.



**Abbildung 4-25:** Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase der adMSC (links) und der ucMSC (rechts). Die Stimulationsversuche wurden mit einer Applikationsdauer von 15 Min, 4h einmal (1xS) oder dreimal (3xS) und zeitlich ansteigend (anst.) durchgeführt. Zu den Experimenten wurde eine Kontrollreihe ohne mechanische Stimulation parallel kultiviert (K). Angegeben sind die Mittelwerte aus sechs Experimenten  $\pm$  Standardfehler. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Experiment und Kontrolle ( $p < 0,05$ ) sind mit \* gekennzeichnet.

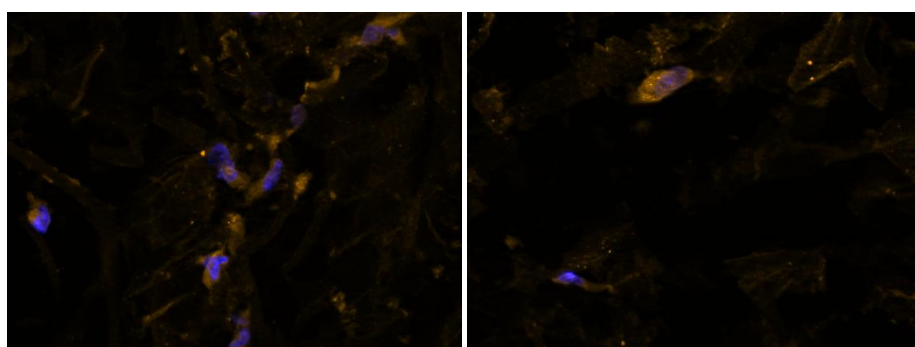
Tabelle 7 zeigt die Stimulationsmuster nach deren Applikation mit Hilfe der Antikörperfärbung ein positiver Nachweis von AP bzw. BSP-2 in den Zellen gezeigt werden konnte. Die AP-Antikörper Färbung ergab einen positiven Nachweis der Alkalischen Phosphatase für die Kontrollzellen der 15 Minuten Stimulation, sowie der kontinuierlichen Stimulation und für die einmal und dreimal 4 h stimulierten Zellen (Abbildung 4-26). Trotz der geringen Aktivität der membrangebundenen AP konnte in den Zellen der einmal 4 h Stimulation AP durch eine Färbung mit einem gelabelten Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 4-26). Bei den ucMSC wurde bei allen Zellen der Stimulationsversuche, bis auf die nicht stimulierten Kontrollen der 15 Minuten Stimulation AP mittels der Antikörper Färbung nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu den sehr geringen Werten der Aktivitätsmessung der membrangebundenen AP.

**Tabelle 7:** Positive Antikörper Färbung von Alkalischer Phosphatase und BSP-2.

	adMSC	ucMSC
AP	K15, 1x4 h, 3x4 h, Kontrolle anst. Stimulation	1x15 Min., 3x15 Min., 1x4 h, 3x4 h, K4 h, Ansteigende Stimulation, Kontrolle anst. Stimulation
BSP-2	K 15, 1x4 h, Kontrolle anst. Stimulation	1x15 Min., K15 Min., 1x4 h, Ansteigende Stimulation

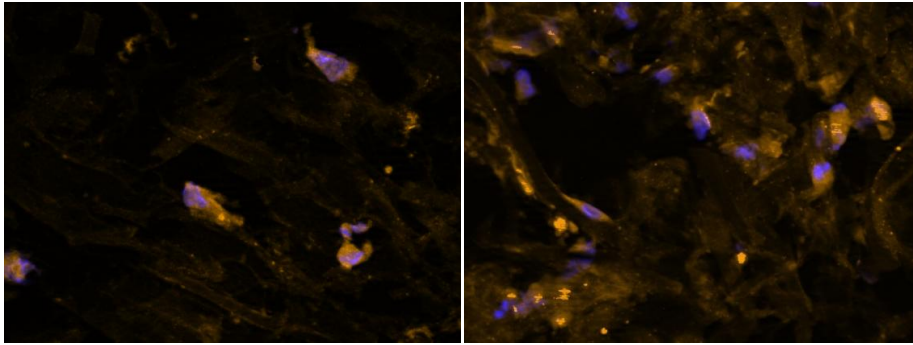
Ein positiver Nachweis von BSP-2 wurde für die stimulierten adMSC lediglich in dem einmal 4 h Experiment, sowie den nicht stimulierten Kontrollen der 15 Minuten und der zeitlich ansteigenden Stimulation erbracht. Bei den ucMSC konnte BSP-2 in den Zellen, der einmal 15 Minuten Stimulation (Abbildung 4-27), deren Kontrolle, sowie der einmal 4 h und der zeitlich ansteigenden Stimulation nachgewiesen werden. Die einmal vier Stunden stimulierten ucMSC zeigten schon in der Genexpressionsanalyse eine dreimal so hohe BSP-2 Expression im Vergleich mit den nicht stimulierten Zellen.

Insgesamt hat die mechanische Stimulation in Kombination mit den BMP-2 freisetzenden Mikrosphären in Bezug auf die Proteinsynthese von AP und BSP-2 im Falle der ucMSC zu einer deutlichen Verbesserung geführt, im Vergleich zu den ohne PLGA Mikrosphären stimulierten Zellen.



**Abbildung 4-26:** DAPI/AP Doppelfärbung der adMSC nach einer 1x4 h Stimulation (links) und nach einer 3x4 h Stimulation (rechts).





**Abbildung 4-27:** DAPI/AP Doppelfärbung der ucMSC nach einer 3x15 Minuten Stimulation (links) und DAPI/BSP-2 Doppelfärbung nach einer 1x15 Minuten Stimulation (rechts).

### Fazit

Die Interpretation dieser Daten ist sehr komplex. Die Reaktionen der Zellen auf die mechanischen Stimulationen resultierten sowohl in geringeren Expressionen als auch in stärkeren Expressionen knochenspezifischer Marker im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Auch Variationen bezüglich der Proteinsynthese durch die Dehnungsapplikationen wurden beobachtet. Die adMSC reagierten insbesondere in der zeitlich ansteigenden Stimulation mit einer hohen Expression von AP und BSP-2, beide Proteine wurden auch synthetisiert, ein Indiz dafür, dass die Differenzierung der Zellen durch die Stimulation gesteigert wurde. Auch die einmalig vierstündige Stimulation führte zu einer verbesserten Differenzierung der adMSC. Darauf deutet eine schwache Expression von BSP-2 im Zusammenhang mit einem positiven BSP-2 Nachweis mit der Antikörper Färbung, ein Indiz dafür, dass die Zellen die Expression des BSP-2 Gens bereits runterreguliert haben, da das Protein ausreichend synthetisiert wurden und sie in der Differenzierung fortgeschritten sind.

Die ucMSC reagierten bei der Dehnungsapplikation ohne PLGA Mikrosphären insbesondere auf die vierstündige Stimulation. Die verminderte Expression von AP in beiden Stimulationen im Zusammenhang mit der Proteinsynthese von AP sowie von BSP-2 weist auf eine fortgeschrittene Differenzierung im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen hin. Die Kombination von Dehnungsapplikation und BMP-2 führte im Falle der zeitlich ansteigend stimulierten ucMSC zu keinerlei Unterschied bezüglich der Expression der knochentypischen Markerproteine im Vergleich zu den nichtstimulierten Zellen, was auf eine Gewöhnung der Zellen an die mechanische Stimulation hindeuten kann. Die Zellen scheinen allerdings sehr schnell auf die Stimulationen zu reagieren, worauf eine geringere Expression der

knochenspezifischen Markerproteine verglichen mit den Kontrollzellen und dem positiven Nachweis von AP und BSP-2 bei der einmaligen 15 Minuten Stimulation deutet. Die Zellen sind schon in die Phase der Proteinsynthese übergegangen und haben die Genexpression bereits runterreguliert. Weiterhin scheinen die 15 Minuten Stimulationen zu einer erhöhten Matrixbildung zu führen, induziert durch eine erhöhte Kollagen I Stimulation. Dies konnte bei den adMSC nicht beobachtet werden, ein Indiz dafür, dass die ucMSC sensibler auf die mechanische Stimulation reagiert haben. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Applikation von Dehnung die osteogene Differenzierung beeinflusst. Besonders die ucMSC scheinen auf die Applikation mechanischer Stimulation zu reagieren. Die Kombination von BMP-2 und Dehnungsapplikation hat dabei zu den vielversprechendsten Ergebnissen geführt, wobei schon kurzzeitige Stimulationen eine verbesserte Differenzierung induzierten.

In der Literatur sind die unterschiedlichsten Ansätze mechanischer Stimulation beschrieben. Sumanasinha et al. stimulierten Knochenmarkstammzellen in einem dreidimensionalen Kollagen-Netzwerk mit uniaxialer Dehnung von 10 % und 1 Hz und stellten nach 7 und nach 14 Tagen eine signifikante Erhöhung der BMP-2 Expression fest.<sup>124</sup> Kearney et al. stellten fest, dass bei einer Dehnungsamplitude von 2,5 % bei 0,17 Hz über einen Zeitraum von 14 Tagen sich die Proliferation von Knochenmarkstammzellen auf einem Kollagen beschichtetem Silikon signifikant reduzierte. Weiterhin wurde eine erhöhte Expression knochenspezifischer Marker festgestellt, wobei eine signifikante Erhöhung der RUNX2 Expression bereits nach 3 Tagen festgestellt wurde, während die Expression von Kollagen I und Osteocalcin erst nach sechs Tagen und die Expression von BMP-2 nach 14 Tagen signifikant erhöht waren.<sup>127</sup> Huang et al. untersuchten die Auswirkungen verschiedener Proteine der extrazellulären Matrix kombiniert mit mechanischer Stimulation. Die Knochenmarkstammzellen wurden in dem Flexcell® System (Flexcell International Corporation) bei 0,1 Hz und 3 % Dehnungsamplitude stimuliert. Die Stimulationen resultierten in einer verstärkten RUNX2 Expression und einer Erhöhung der AP-Aktivität und der Mineralisierung der ECM.<sup>128</sup> Am Institut für Technische Chemie wurden adMSC auf zweidimensionalen Silikonoberflächen bei 1 Hz und einer Dehnungsamplitude von 5 % mechanisch stimuliert. Dabei wurde eine Erhöhung der

Genexpression knochenspezifischer Marker bei kurzzeitigen Stimulationsmustern festgestellt.<sup>63</sup>

Im Hinblick auf diese publizierten Daten und die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse kann die Theorie bestätigt werden, dass mechanische Stimulation mittels Dehnungsapplikationen die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen beeinflusst. Sehr unterschiedliche Zeitmuster wurden untersucht, wobei die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe und der Nabelschnur jedoch teils sehr unterschiedliche Reaktionen auf die unterschiedlichen Zeitmustern aufwiesen.

### 4.3 Kultivierung mesenchymaler Stammzellen im Drehbettreaktor

Das osteogene Differenzierungspotential und die Reaktion auf mechanische Stimulation der mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe und der Whartonschen Sulze der Nabelschnur konnte in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt werden. Um die Problematik der Nährstoffversorgung in statischen Kulturen zu umgehen und die Zellen über einen langen Zeitraum mechanisch zu stimulieren, wurden die Zellen in einem Drehbettreaktor (Z<sup>®</sup>RPD) kultiviert. Dabei wurden die Zellen auf ein dreidimensionales, poröses Gerüstmaterial aufgebracht und kultiviert. Auf diese Weise sollte ein festes, dreidimensionales Zell-Keramik Konstrukt synthetisiert werden, welches im Rahmen des *Tissue Engineerings* als Knochenersatzgewebe verwendet werden könnte. Als Gerüstmaterial wurde Sponceram<sup>®</sup>, eine poröse Keramikscheibe aus Aluminiumoxid (160 Al 30 130 Al), verwendet. Die Keramik ist biokompatibel und nicht degradierbar und eignet sich hervorragend als Test- und Anschauungsmaterial bei der Einführung neuer Bioreaktoren und der Testung unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen für die optimale Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen.



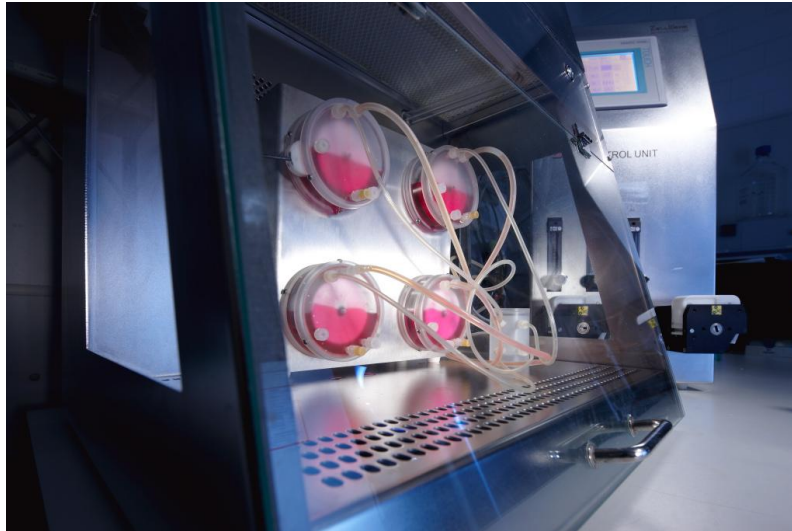
**Abbildung 4-28:** Z<sup>®</sup>RPD System: Die Einheit besteht aus einer GMP konformen Sterilwerkbank, in der sich der Drehbett-Bioreaktor befindet, einer Steuereinheit und einem Computer zur online Analytik. (adaptiert aus: Betriebsanweisung Z<sup>®</sup>RP Technologie)<sup>129</sup>

In Abbildung 4-28 ist das gesamte Bioreaktorsystem abgebildet. Der Drehbett-Bioreaktor ist in einer beheizbaren, GMP-konformen Sterilwerkbank untergebracht und ist über ein Schlauchsystem mit Vorrats- und Abfallflaschen verbunden, so dass

die Versorgung der Zellen mit frischem Medium und der Abtransport von altem Medium gewährleistet sind. Der in Abbildung 4-28 gezeigte Reaktor Z<sup>®</sup>RP500 ist das Vorgängermodell des in dieser Arbeit verwendeten Z<sup>®</sup>RPD (Z<sup>®</sup>RP *disposable*). Der Z<sup>®</sup>RP500 besitzt ein größeres Volumen als der Z<sup>®</sup>RPD, besteht aus Glas und ist mehrfach verwendbar. Der Z<sup>®</sup>RPD wiederum besteht aus Kunststoff und ist für den einmaligen Gebrauch entwickelt worden. *Disposable* Reaktoren besitzen den großen Vorteil, dass durch den einmaligen Gebrauch die Sterilisation entfällt und keine Kreuzkontaminationen auftreten können. Des Weiteren sind durch das verringerte Volumen deutlich geringere Mengen an Kulturmedium nötig.

Der Bioreaktor wird über eine Heizung, die in die Sterilwerkbank integriert ist, konstant auf 37 °C temperiert. Des Weiteren sind eine sterile Probenentnahme und das Wechseln der Versorgungs- bzw. Abfallflaschen in der Sterilwerkbank möglich. Auch Anschlüsse für die Gasversorgung des Bioreaktors sind darin vorhanden. Durch eine angeschlossene Steuereinheit können die Temperatur, der Sauerstoff-, Stickstoff- und CO<sub>2</sub> Gehalt, sowie der pH Wert in dem Bioreaktor sensorisch gemessen und gesteuert werden. Weiterhin kann über die Steuereinheit die Menge an frischem Kulturmedium, die dem Bioreaktor zugeführt werden soll, reguliert und die Rotationsgeschwindigkeit der Gerüstmaterialien, die als Drehbett der kultivierenden Zellen dienen, eingestellt werden. Der angeschlossene Computer nimmt dabei die gemessenen Daten auf und erstellt Kurven für die einzelnen Messparameter.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Weiterentwicklung des Z<sup>®</sup>RPD Systems getestet, etabliert und zur Anwendung gebracht. Mit dem neu entwickelten System besteht die Möglichkeit vier einzelne Z<sup>®</sup>RPD Reaktoren parallel zu betreiben. In Abbildung 4-29 ist das System abgebildet. Ziel dieser Weiterentwicklung war es, durch eine parallele Kultivierung in vier identischen Bioreaktoren die Reproduzierbarkeit des Systems zu untersuchen, da für eine klinische Anwendung im Rahmen des *Tissue Engineerings* eine reproduzierbare und qualitativ hochwertige Produktion nach GMP Richtlinien unumgänglich ist.



**Abbildung 4-29:** Z®RPD Reaktorsystem mit vier Bioreaktoren im parallel Betrieb (Quelle: Franke, TCI).

Es wurde eine spezielle Halterung entwickelt, an der die Bioreaktoren über- bzw. nebeneinander angebracht werden können. Die einzelnen Bioreaktoren verfügen jeweils über ein Gesamtvolumen von 100 mL, wobei die Bioreaktoren zur Hälfte mit Medium aufgefüllt werden und sich darüber eine Gasphase befindet. Das Medium wird während der Kultivierung kontinuierlich umgewälzt, so dass keine Konzentrationsgradienten innerhalb eines Bioreaktors auftreten. Die Experimente wurden im Perfusionsbetrieb durchgeführt, es erfolgte also eine kontinuierliche Versorgung der Zellen mit frischem Kulturmedium. Bei Zufuhr von neuem Kulturmedium wird überschüssiges Medium über einen, mittig an den Bioreaktoren angebrachten, Abfallschlauch abgeleitet. Die Zufuhr von Kulturmedium erfolgte in den Experimenten über eine Versorgungsflasche für alle vier Bioreaktoren, kann aber auch über einzelne Flaschen erfolgen. Weiterhin ist jeder einzelne Reaktor mit einer eigenen Abfallflasche verbunden. Die Kontrolle der pH-Werte und des Sauerstoffgehalts in den Bioreaktoren erfolgt über eine Steuereinheit, die allerdings nur an einen der Bioreaktoren angeschlossen ist. Die Gasphase der Bioreaktoren wird kontinuierlich mit synthetischer Luft versorgt, zusätzlich kann bei Bedarf Stickstoff oder Sauerstoff zugeführt werden. Auch die pH Wert Regelung erfolgt über den Kopfraum der Bioreaktoren. Es wird zusätzlich mit CO<sub>2</sub> begast, wenn der pH Wert über 7,3 steigt. Der in der Sterilwerkbank für die Gasversorgung vorhandene Anschluss, wurde mit einer Vorrichtung versehen, die den Gasstrom gleichmäßig auf vier Schläuche, die mit den einzelnen Bioreaktoren verbunden sind, aufteilt. Die

Sponceramscheiben, welche einen Durchmesser von 65 mm und eine Dicke von 3 mm aufweisen, werden auf einer Längsachse in den Bioreaktoren verankert und fungieren als Drehbett für die Zellen. Über einen Magnetantrieb wird diese Achse während der Bioreaktorkultivierung in Bewegung gesetzt, so dass die Sponceramscheiben rotieren und die darauf adhärierenden Zellen sich alternierend in dem Kulturmedium bzw. in dem Kopfraum der Bioreaktoren befinden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen wurden alle über einen Zeitraum von 28 Tagen beobachtet. Die Besiedlung der Sponceramscheiben mit den Zellen vor dem Beginn der Kultivierungen erfolgte unterschiedlich. Wurden die Zellen auf unbehandeltem Sponceram® kultiviert, erfolgte eine interne Besiedlung. Das bedeutet die Sponceramscheiben wurden mit den Bioreaktoren zusammen sterilisiert und die Zellen wurden mittels einer Spritze durch das Septum in den Reaktor auf die Scheiben aufgebracht. Wurde das Sponceram® mit PLGA Mikrosphären modifiziert, war es nicht mehr autoklavierbar und die Zellen wurden außerhalb der Bioreaktoren auf die Sponceramscheiben aufgebracht und anschließend in die sterilen Bioreaktoren eingebaut. Zu Beginn der Kultivierungen wurde in jeden Bioreaktor 50 mL Kulturmedium gepumpt und die Rotation der Sponceramscheiben auf 0,5 rpm eingestellt. Die Zirkulationspumpe wurde so eingestellt, dass das gesamte Medium des Bioreaktors in einer Stunde einmal komplett umgewälzt wurde (50 mL/h). Während der Kultivierungen wurden eine Temperatur von 37 °C und ein pH Wert von 7,3 in den Bioreaktoren aufrechterhalten. Die Luftzufuhr wurde auf 100 mL/Minute eingestellt, so dass jedem einzelnen Reaktor 25 mL synthetische Luft pro Minute zugeführt wurden. Dieser Luftdruck ist nötig, um das überschüssige, ablaufende Medium durch den Schlauch bis in die Abfallflasche zu drücken. Bei zu geringem Luftdruck verstopft der Abfallschlauch und die Bioreaktoren laufen bei eingeschalteter Zufuhr von neuem Medium voll. Das verwendete Kulturmedium besaß eine Glukosekonzentration von 1 g/L und die Menge an Glukose und Laktat in dem Kulturmedium wurde durch tägliche Probenentnahme gemessen. Bei sehr hoher Laktatkonzentration oder geringer Glukosekonzentration wurde die kontinuierliche Medienzufuhr eingeschaltet bzw. erhöht.

Um die osteogene Differenzierung der Zellen während der dynamischen Kultivierung zu stimulieren, wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Die Zellen wurden unter drei verschiedenen Bedingungen kultiviert und deren Einfluss auf die osteogene Differenzierung anschließend verglichen. Zum einen wurden die Zellen mit Kultivierungsmedium kultiviert, dem Zusätze beigefügt wurden, die die osteogene Differenzierung stimulieren. Weiterhin wurden die Zellen auf Sponceram® kultiviert, das zuvor mit PLGA Mikrosphären beladen worden ist, die das Signalprotein *bone morphogenic protein 2* (BMP-2) freisetzen, welches an der Osteogenese von Zellen beteiligt ist. Im dritten Ansatz wurden die beiden vorigen Kultivierungsbedingungen miteinander kombiniert. Die Zellen wurden in Kulturmedium mit Zusätzen, die die Osteogenese induzieren, auf Mikrosphären beladenem Sponceram® kultiviert. Diese drei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen wurden mit zwei verschiedenen Zelltypen durchgeführt, mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe und aus der Whartonschen Sulze der Nabelschnur. Da immer in vier Bioreaktoren parallel kultiviert worden ist, wurde eine dementsprechend große Menge an Zellmaterial zur Besiedlung der Keramiken benötigt. Um dies zu gewährleisten, wurden die Zellen über eine Passage in Wannenstapeln (*cell factory*) mit einer sehr hohen Oberfläche vermehrt. Als Kulturmedium wurde  $\alpha$ -MEM mit 5 % Humanserum verwendet. Als Zusätze, die die osteogene Differenzierung der Zellen induzieren wurden Dexamethason, L-Ascorbat und  $\beta$ -Glycerolphosphat verwendet.

Auf eine parallele Kultivierung der Zellen auf dem Gerüstmaterial unter statischen Bedingungen wurde in dieser Arbeit verzichtet. In vorangegangenen Arbeiten von Dr. Stefanie Röker und Dr. Dana Marten konnte für beide Zelltypen eindeutig gezeigt werden, dass die dynamische Kultivierung im Hinblick auf die Proliferation und die osteogene Differenzierung der Zellen zu deutlich besseren Ergebnissen führt, als eine statische Kultivierung in der Petrischale. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf die dynamische Kultivierung und die Untersuchung der reproduzierbaren Synthese künstlicher Knochenkonstrukte gelegt.

Vor Beginn der Kultivierungen mit Mikrosphären modifiziertem Sponceram® wurden die Sponceramscheiben mit PLGA Mikrosphären, die BMP-2 freisetzen, beladen. Dafür wurden pro Sponceramscheibe 50 mg Mikrosphären verwendet, wobei 1 mg PLGA Mikrosphären 0,05  $\mu$ g BMP-2 enthielten. Somit wurden pro

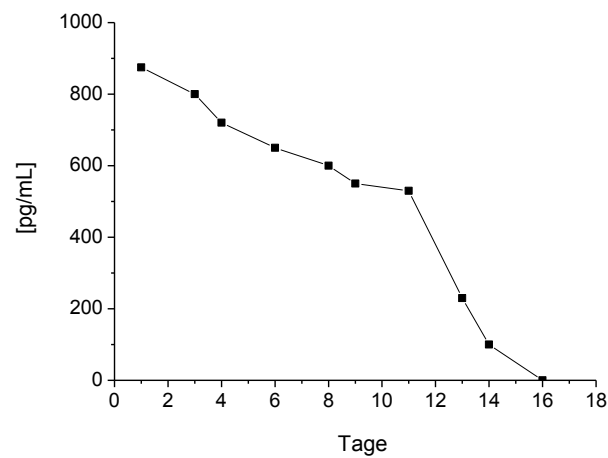


Sponceramscheibe insgesamt 2,5 µg BMP-2 verwendet. Die Mikrosphären wurden durch eine Inkubation von 1 Minute über Dichlormethan adsorptiv an das Sponceram® gebunden.

Nach Beendigung der jeweiligen Kultivierung wurde das Medium komplett aus den Bioreaktoren abgepumpt. Anschließend wurden sie von den Versorgungsschläuchen getrennt, unter der Sterilwerkbank auseinandergelöst und die mit Zellen besiedelten Sponceramscheiben wurden in Petrischalen 3x mit PBS gewaschen und in einzelne Stückchen zerbrochen. Anschließend wurden verschiedene Analysen durchgeführt, um den Grad der osteogenen Differenzierung der Zellen nach der Kultivierung im Bioreaktor bewerten zu können. Zunächst wurden die Zellen durch Anfärben mittels DAPI und Toluidin Färbung auf dem Sponceram® visualisiert. Die Mineralisierung der extrazellulären Matrix wurde durch von Kossa und Alizarinrot Färbungen nachgewiesen. Der Nachweis Alkalischer Phosphatase erfolgte sowohl über eine histologische Färbung, als auch über eine Genexpressionsanalyse mittels der Polymerasen-Kettenreaktion (RT-PCR). Die Expression weiterer Gene, die an der Osteoblastengnese beteiligt sind, wurden mit Hilfe der RT-PCR verifiziert. Weiterhin wurden Aufnahmen der Konstrukte mit dem Rasterelektronen Mikroskop (REM) angefertigt, um die Zellen und eventuelle Matrixdepositionen zu visualisieren. Von einer Kultivierung im Bioreaktor war es möglich µCT Aufnahmen und Hartschliffe am Ludwig Boltzmann Institut in Wien anfertigen zu lassen und damit den Mineralisierungsgrad der extrazellulären Matrix festzustellen.

Um einen Eindruck über die Freisetzungsgeschwindigkeit des BMP-2 aus den Mikrosphären und über den Konzentrationsverlauf des BMP-2 während der Kultivierungen in den Bioreaktoren zu erhalten, wurden die täglich zur Überprüfung der Glukosekonzentration im Medium entnommenen Proben verwendet, um einen BMP-2 ELISA durchzuführen. In Abbildung 4-30 ist das Ergebnis aus der Kultivierung der adMSC auf PLGA Mikrosphären beschichtetem Sponceram® unter Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium dargestellt. Das BMP-2 wurde im Laufe der ersten 2 Wochen aus den Mikrosphären freigesetzt, und die Konzentration nahm in den ersten 16 Tagen fast linear ab, dabei betrug die Anfangskonzentration von BMP-2 im Medium 875 pg/mL und sank anschließend ab, bis an Tag 16 der

dynamischen Kultivierung kein BMP-2 mehr in dem Medium nachweisbar war. Insgesamt wurden pro Bioreaktor 2,5 µg BMP-2 verwendet.



**Abbildung 4-30:** BMP-2 Konzentration im Medium eines Bioreaktors (R4) während der Kultivierung der adMSC auf, mit PLGA Mikrosphären beschichtetem, Sponceram®.

#### 4.3.1 Kultivierung der ucMSC mit osteogenem Differenzierungsmedium im Bioreaktor

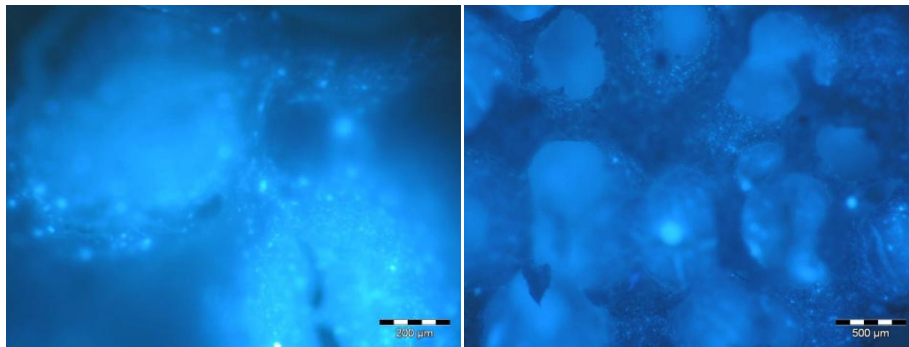
Die mesenchymalen Zellen aus dem Nabelschnurgewebe wurden in Passage 5 direkt in die einzelnen Reaktoren per Injektion durch das Septum tropfenweise auf die Sponceramscheiben gegeben. Dabei wurden pro Sponceramscheibe 5 Mio Zellen verwendet. Nach einer Inkubation von 45 Minuten wurden die Bioreaktoren langsam mit Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden über den gesamten Kultivierungszeitraum in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Tabelle 8 zeigt den Glukoseverbrauch der Zellen während der Kultivierung in den einzelnen Bioreaktoren. Der Verbrauch war in den Bioreaktoren 1,2 und 4 ähnlich, in dem Bioeaktor 1 verbrauchten die Zellen 7 mg weniger Glukose als in Bioreaktor 4. Die Zellen in Bioreaktor 2 verbrauchten lediglich 3 mg weniger als die Zellen in Bioreaktor 4. In Bioreaktor 3 hingegen war der Glukoseverbrauch deutlich geringer, die Zellen haben nur ca.64 mg Glukose über den gesamten Kultivierungszeitraum verbraucht. Dieser geringe Wert deutet darauf hin, dass die Zellen teilweise abgestorben sind während der Kultivierung oder aber sich von dem Sponceram® abgelöst haben. Diese Theorie wird durch die einzelnen Messwerte der Glukose bekräftigt. Nach 2 Wochen Kultivierung konnte kein Glukoseverbrauch mehr

nachgewiesen werden, ein Indiz dafür, dass die Zellen sich von der Keramik abgelöst haben und abgestorben sind.

**Tabelle 8:** Glukoseverbrauch ucMSC während der dynamischen Kultivierung

Reaktor 1	Reaktor 2	Reaktor 3	Reaktor 4
93,4 mg	104,76 mg	63,88 mg	101,11 mg

Um einen Eindruck von der Zelldichte auf den Keramiken zu erhalten, wurde als Übersichtsfärbung eine DAPI Färbung durchgeführt. Diese unterstützt die Theorie des Ablösens der Zellen während der dynamischen Kultivierung. In einigen Bereichen waren auf dem Sponceram® durchaus dicht beinander liegende Zellverbände zu erkennen, aber es wurden auch große Bereiche detektiert, in denen keine Zellen auf dem Sponceram® nachweisbar waren.



**Abbildung 4-31:** DAPI Färbung der ucMSC nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung im Bioreaktor. Abgebildet sind Proben aus Reaktor 1 (links) und 2 (rechts).



**Abbildung 4-32:** Alizarinrot Färbung der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung im Bioreaktor. Abgebildet sind Proben aus den Reaktoren 1,2 ,3 und4 und der Blindwert (von links nach rechts).

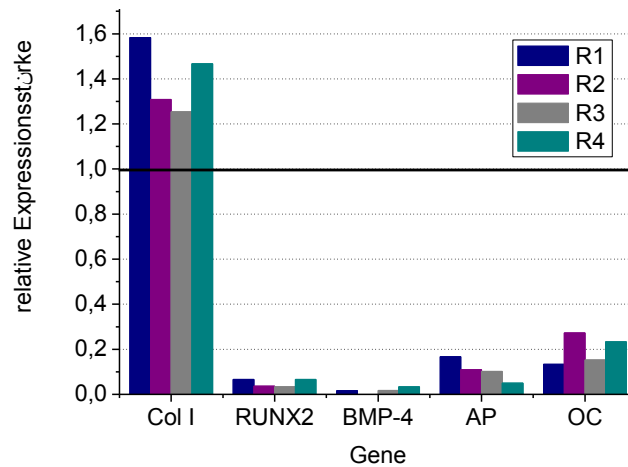
Die anschließende Analytik der Zellen mittels einer Alizarinrot Färbung zeigte unterschiedliche Ergebnisse für die Zell-Keramik Konstrukte aus den einzelnen Reaktoren. Die in Abbildung 4-32 gezeigten Proben weisen unterschiedliche Intensitäten bezüglich der Rotfärbung und der damit nachgewiesenen

Mineralisierung der extrazellulären Matrix auf. Während die Konstrukte aus Reaktor 1 und 2 kaum und in Reaktor 4 nur wenige Bereiche schwach rot angefärbt sind, weist die Probe aus Reaktor 3 eine homogene Färbung auf. Da aber auch in Reaktor 3 mit der Übersichtsfärbung keine gleichmäßig mit Zellen besiedelte Keramik nachweisbar war, liegt die Vermutung nahe, dass per Zufall sich auf der Probe, die für die Alizarinrot Färbung präpariert wurde, noch nicht abgelöste Zellen befanden.

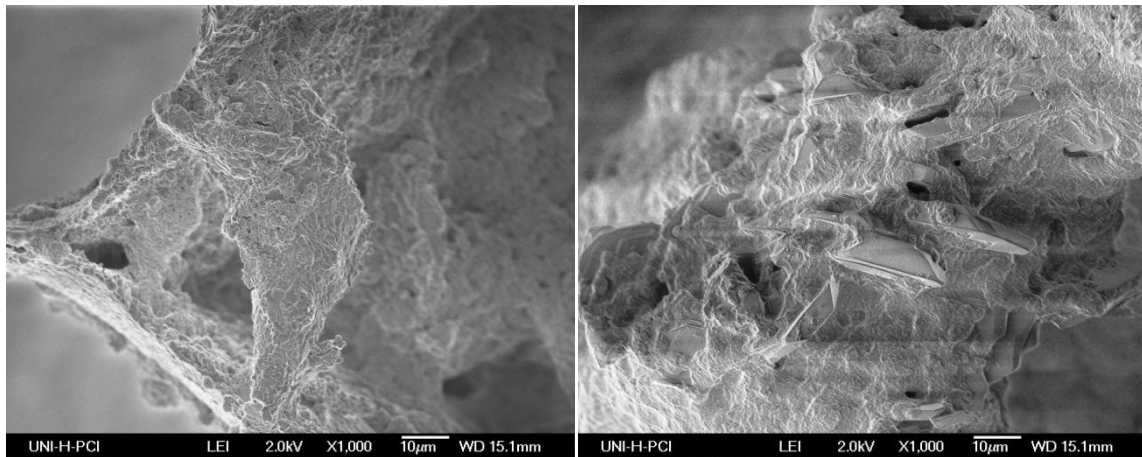
Mit der durchgeführten RT-PCR wiederum, die dem Nachweis typischer osteogener Differenzierungsmarker diente, konnten keine gravierenden Unterschiede bezüglich der Expressionsintensität der Gene zwischen den vier parallel kultivierten Zell-Konstrukten nachgewiesen werden. Alle Zellen exprimierten die Gene Kollagen I, RUNX2, BMP-4, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin in gleichem Maße. Die Expression von BMP-2 und BSP-2 konnte nicht nachgewiesen werden. Auffallend war, dass alle Zellen Kollagen I in hohem Maße exprimierten, während die Expression der übrigen Gene sehr gering war. Die hohe Expressionsrate von Kollagen I weist darauf hin, dass sich die Zellen am Ende der Proliferationsphase befinden und durch eine verstärkte Kollagen I Expression die Bildung der extrazellulären Matrix einleiten. Dafür spricht auch die geringe Expression von RUNX2, dessen Expression zu Beginn der osteogenen Differenzierung hochreguliert wird, aber am Ende der Proliferationsphase nur geringfügig exprimiert wird. Auch die Expression von Alkalischer Phosphatase deutet darauf hin, dass die Zellen sich noch in der Proliferationsphase befinden, da die Expression der Alkalischen Phosphatase am Ende der Proliferationsphase beginnt und während der Phase des Matrixaufbaus stark ansteigt. Diese These wird auch durch den histologische Nachweis der Alkalischen Phosphatase (siehe Abbildung 7-23) bestätigt. Eine leichte Blaufärbung lässt den Schluss zu, dass die Zellen schon Alkalische Phosphatase produzieren, jedoch in sehr geringem Maße.

Die Expression von Osteocalcin, einem Protein welches erst in der dritten Phase der osteogenen Differenzierung während der Mineralisierung der extrazellulären Matrix gebildet wird, lässt den Schluss zu, dass sich ein kleiner Teil der Zellen im fortgeschrittenen Stadium der osteogenen Differenzierung befindet. Dies ist möglich, da die verwendeten Zellen durch Herauswachsen aus der Nabelschnur isoliert worden sind und daher eine Mischpopulation vorliegt, in der die Zellen

möglicherweise ein unterschiedliches Verhalten in Bezug auf ihr osteogenes Differenzierungspotential zeigen.



**Abbildung 4-33:** Ergebnisse der semiquantitativen PCR der ucMSC auf Sponceram® nach der dynamischen Kultivierung im Z®RPD-System über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Intensitäten der einzelnen Geneexpressionen sind relativ zu der gemessenen Intensität von GAPDH (interner Standard), welches als Linie dargestellt ist.



**Abbildung 4-34:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 1 (links) und 2 (rechts). Die Bilder wurden bei einer 1000fachen Vergrößerung aufgenommen.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (REM) bestätigen die Vermutung, dass die Zellen sich während der Kultivierung von den Keramiken gelöst haben. Nur in einzelnen Poren befanden sich Zellen, ein großer Teil der Keramik war nicht mit Zellen besiedelt. Des Weiteren konnten auf den REM Aufnahmen kein zusammenhängender Zellverband auf den Keramiken nachgewiesen werden. Auch

konnten keinerlei Hinweise auf eine Mineralisierung der extrazellulären Matrix festgestellt werden.

### Fazit

Zusammenfassend konnten in dieser Kultivierung im Bioreaktor die ucMSC osteogen differenziert werden. Auf zwei Keramiken wurde die Einlagerung von Calcium in die extrazelluläre Matrix mittels Alizarinrot Färbung nachgewiesen und auch die Expression knochentypischer Marker wurde bestätigt. Allerdings trat in dieser dynamischen Kultivierung das Problem des Ablösens der Zellen von den Keramiken, welches schon während der statischen Kultivierung der Zellen festgestellt worden ist, erneut auf. Es konnten zwar Zellen mittels DAPI Färbung auf den Keramiken nachgewiesen werden und auch für die RT-PCR mittels Enzymlyse Zellen nach der Kultivierung abgelöst werden, aber die Anzahl der erhaltenen Zellen war deutlich geringer als erwartet. Des Weiteren konnte die Reproduzierbarkeit des Systems anhand dieser Kultivierung nur mit Einschränkungen gezeigt werden. Sowohl der Glukoseverbrauch, als auch die RT-PCR zeigten ein ähnliches Verhalten der Zellen in allen vier Reaktoren, jedoch gab es teilweise auch deutliche Abweichungen, welche besonders bei der Alizarinrot Färbung deutlich wurden.

#### *4.3.2 Kultivierung der ucMSC auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® im Bioreaktor*

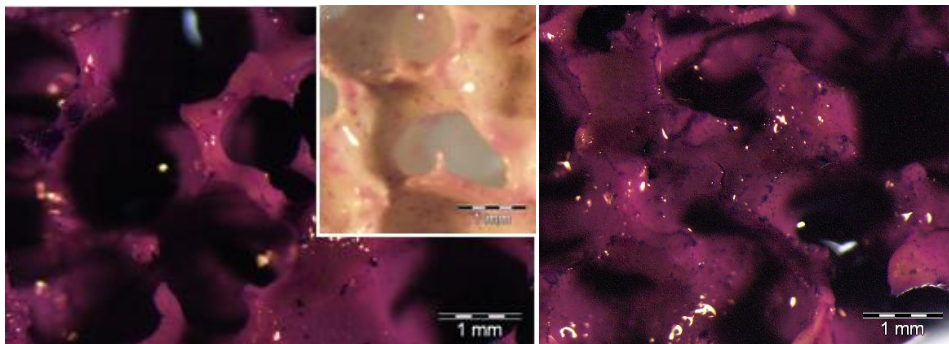
Die mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe wurden einen Tag vor Beginn der Kultivierung im Bioreaktor auf das modifizierte Sponceram® aufgebracht und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es wurden fünf Sponceramscheiben mit Zellen besiedelt, wobei pro Keramik 3,7 Mio Zellen in Passage 5 verwendet wurden. Nach 24 h wurden vier Sponceramscheiben mit den darauf adhärierenden Zellen in die einzelnen Bioreaktoren eingebaut und die Kultivierung wurde gestartet. Die Zellen wurden in Kulturmedium ohne osteogene Zusätze kultiviert.

Nach drei Tagen wurde die Mediumzugabe im Perfusionsbetrieb eingeschaltet. Dabei wurden jedem Bioreaktor 5,4 mL Kulturmedium pro Tag zugeführt. In Tabelle 9 sind die Mengen an Glukose, die während der dynamischen Kultivierung von den Zellen verbraucht worden sind, angegeben. Die Zellen haben deutlich mehr Glukose verbraucht, als die ucMSC, die in osteogenem Differenzierungsmedium dynamisch kultiviert worden sind. Des Weiteren betragen die Unterschiede bezüglich des Glukoseverbrauchs der Zellen aus den einzelnen Reaktoren weniger als 16 mg, was einer prozentualen Abweichung von ca. 10 % entspricht.

**Tabelle 9:** Glukoseverbrauch der ucMSC während der dynamischen Kultivierung

Reaktor 1	Reaktor 2	Reaktor 3	Reaktor 4
140,97 mg	152,46 mg	137,15 mg	142,5 mg

Die Toluidin Blau Färbung in Abbildung 4-35 weist auf eine homogene Verteilung der Zellen auf den einzelnen Keramiken hin. Es wurden keine Bereiche ausgemacht, in denen sich die Zellen von den Keramiken abgelöst haben. Allerdings ist die Blaufärbung nicht intensiv ausgeprägt, was auf eine geringe Besiedlungsdichte der Zellen deutet.

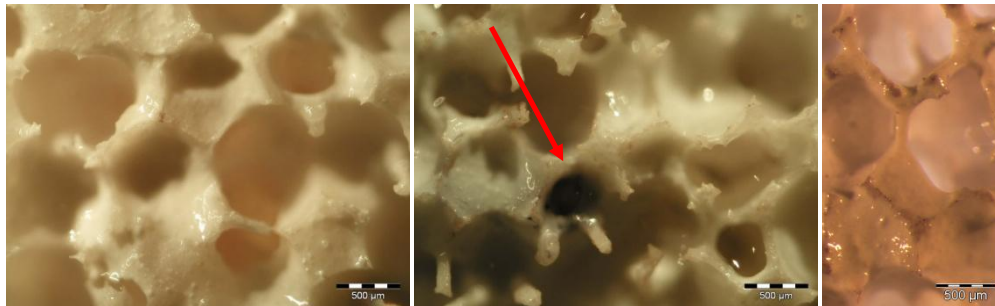


**Abbildung 4-35:** Toluidin Blau Färbung der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Links ist eine Probe aus Reaktor 1 und rechts aus Reaktor 2 abgebildet. In der Mitte ist der Blindwert abgebildet.

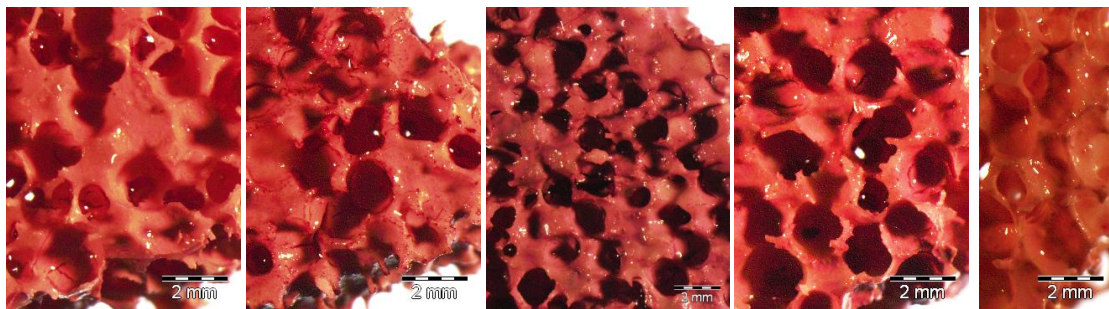
Mit Hilfe der histologischen Färbungen der Zell-Keramik Konstrukte konnte keine Alkalische Phosphatase nachgewiesen werden. Abbildung 4-36 zeigt exemplarisch zwei Proben aus den Bioreaktoren 1 und 2, wobei klar erkennbar ist, dass in Bioreaktor 1 keinerlei Alkalische Phosphatase synthetisiert worden ist, während in Bioreaktor 2 eine Pore mit Alkalische Phosphatase produzierenden Zellen identifiziert wurde. Der Nachweis der Mineralisierung der extrazellulären Matrix



durch Calciumeinlagerungen mit einer Alizarinrot Färbung ergab ebenfalls nur ein schwach positives Ergebnis. Die Keramiken sind zwar homogen rot eingefärbt, die Rotfärbung ist jedoch nicht intensiv, was darauf hindeutet, dass kaum Calciumeinlagerungen in die extrazelluläre Matrix stattgefunden haben.



**Abbildung 4-36:** Histologische Färbung der Alkalischen Phosphatase nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung im Bioreaktor. Abgebildet sind Proben aus Reaktor 1 (links) und 2 (rechts). Rechts ist der Blindwert abgebildet



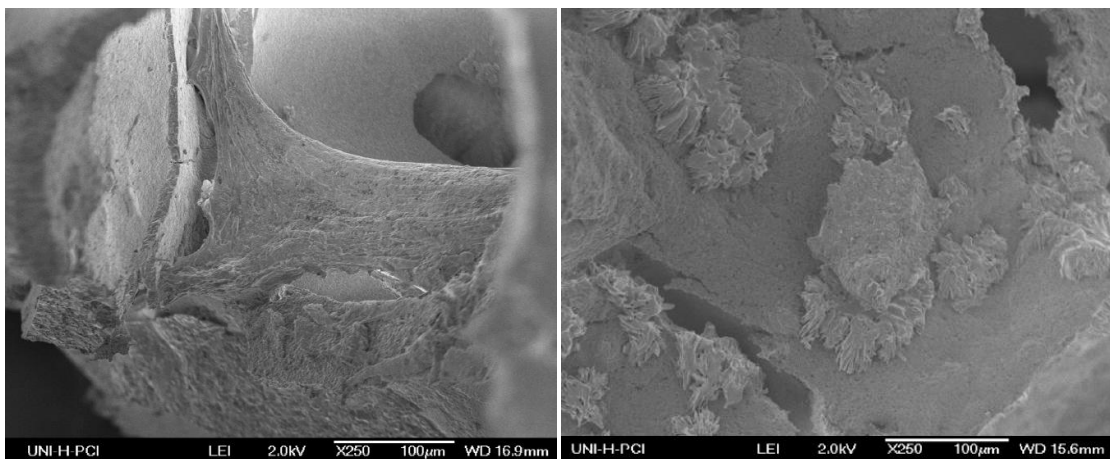
**Abbildung 4-37:** Alizarinrot Färbung der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung im Bioreaktor. Abgebildet sind Proben aus den Reaktoren 1,2, 3 und 4 (von links nach rechts). Rechts ist der Blindwert abgebildet.

Eine Genexpressionsanalyse mittels einer RT-PCR konnte nach dieser Kultivierung nicht durchgeführt werden, da die isolierte RNA der enzymatisch abgelösten Zellen qualitativ sehr schlecht war und die daraufhin durchgeführte RT-PCR keine auswertbaren Ergebnisse lieferte. Da die Zellen sich nach der dynamischen Kultivierung nur sehr schwer von den Keramiken ablösten, wurde sie relativ lange mit Enzymlösung inkubiert. Dies hat wahrscheinlich zu einer Schädigung der Zellen geführt.

Die REM Aufnahmen der Zell-Keramik Konstrukte (Abbildung 4-38) zeigen eine dicht gewachsene Zellschicht auf der Keramik. Des Weiteren ist in der rechten Abbildung gut erkennbar, dass die Zellen punktuell direkt auf den PLGA Mikrosphären gewachsen sind und nicht unmittelbar auf dem Sponceram®. Dieses



Phänomen wurde bei allen vier parallel kultivierten Keramiken beobachtet. Diese scheinbare Affinität der Zellen in Bezug auf die PLGA Mikrosphären könnte eine Erklärung für die erfolgreiche dynamische Kultivierung über einen Zeitraum von 28 Tagen ohne jegliches Ablösen der Zellen von den Keramiken sein. Dabei könnten mehrere Gründe ausschlaggebend für diese Beobachtung sein. Zum einen könnte die Oberfläche der PLGA Mikrosphären die Adhärenz der Zellen beeinflussen und somit das Ablösen verhindern. Unterschiedliche Oberflächeneigenschaften, wie Rauigkeit oder Materialzusammensetzung können erheblichen Einfluss auf das Verhalten von Zellen, in Bezug auf ihr Proliferations- und Differenzierungsvermögen, ausüben. Zum anderen könnte aber auch die Freisetzung des BMP-2 die Zellen bezüglich ihres Proliferationsvermögens beeinflussen



**Abbildung 4-38:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 2 (links) und 3 (rechts). Die Bilder wurden bei einer 250fachen Vergrößerung aufgenommen.

### Fazit

Die Kultivierung der ucMSC auf modifiziertem Sponceram® hat zu keinem befriedigenden Ergebnis bezüglich der osteogenen Differenzierung der Zellen geführt. Durch die Kombination von dynamischer Kultivierung und aus PLGA Mikrosphären freierwirdendem BMP-2 konnte jedoch die Problematik des Ablöses der Zellen von den Keramiken während der dynamischen Kultivierung behoben werden. Allerdings konnten nur minimale Calciumeinlagerungen in die extrazelluläre Matrix nachgewiesen werden. Weiterhin produzierten die Zellen keine Alkalische Phosphatase. Eine genauere Interpretation ist aufgrund der fehlenden Genexpressionsanalyse nicht möglich, aber die histologischen Färbungen

lassen den Schluss zu, dass die Stimulation der Zellen mit BMP-2 auch unter den dynamischen Bedingungen nicht ausreicht um eine osteogene Differenzierung zu induzieren.

#### *4.3.3 Kultivierung der ucMSC mit osteogenem Differenzierungsmedium auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® im Bioreaktor*

Die mesenchymalen Zellen aus dem Nabelschnurgewebe wurden einen Tag vor Beginn der Kultivierung im Bioreaktor auf das modifizierte Sponceram® aufgebracht und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es wurden vier Sponceramscheiben mit Zellen besiedelt, wobei pro Keramik 6Mio Zellen in Passage 5 verwendet wurden. Nach 24 h wurden vier Sponceramscheiben mit den darauf adhätierenden Zellen in die einzelnen Bioreaktoren eingebaut und die Kultivierung wurde gestartet. Die Zellen wurden in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert.

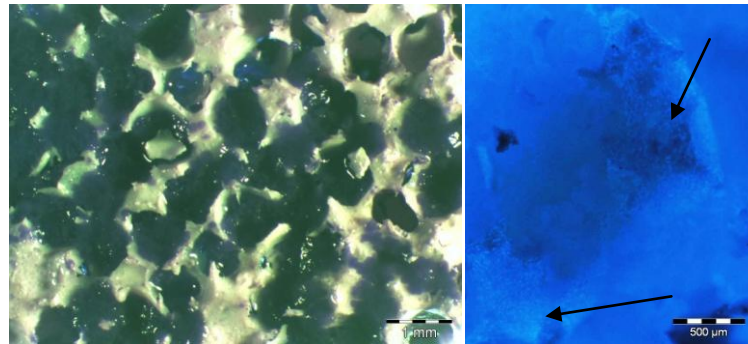
Nach zwei Kultivierungstagen wurde die Zufütterung im Perfusionsbetrieb eingeschaltet, wobei pro Reaktor 5,4 mL/Tag frisches Medium zugepumpt wurde. Nach drei Tagen wurde die Fütterung noch einmal auf 10,8 mL/Tag erhöht. Nach 28 Tagen wurde die Kultivierung abgebrochen. Bei der Aufarbeitung der Zell-Keramik Konstrukte für verschiedene Analysen, lösten sich bei zwei Keramiken die Zellen in einem Zellrasen von dem Konstrukt, was auf einen sehr dichten Bewuchs der Keramiken deutete.

Der Glukoseverbrauch in den einzelnen Bioreaktoren (Tabelle 10) war annähernd gleich. Die größte Differenz betrug der Verbrauch in den Bioreaktoren 3 und 4, wobei der Unterschied 3 mg betrug, was einer prozentualen Abweichung von 2 % entspricht. Des Weiteren war der Glukoseverbrauch höher, als in den beiden vorangegangenen dynamischen Kultivierungen der ucMSC.

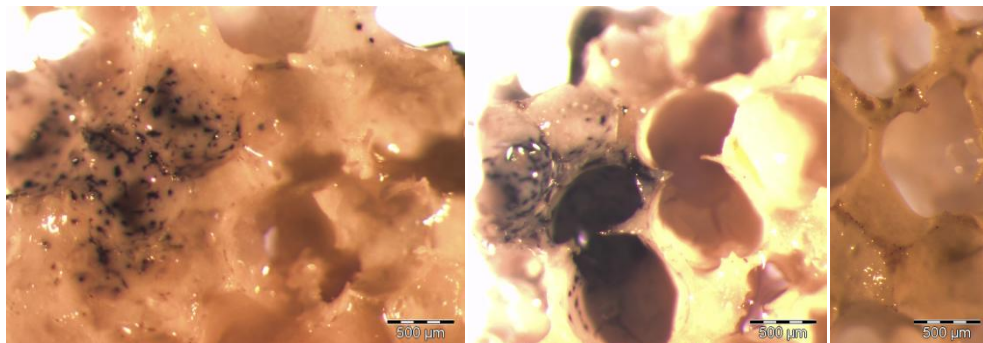
**Tabelle 10:** Glukoseverbrauch der ucMSC während der dynamischen Kultivierung

Reaktor 1	Reaktor 2	Reaktor 3	Reaktor 4
158,68 mg	156,67 mg	159,18 mg	156,44 mg

Abbildung 4-39 zeigt Übersichtsfärbungen in Form einer Toluidin Blau und einer DAPI Färbung aus den Reaktoren 2 und 3. Die linke Abbildung zeigt die Toluidin Blau Färbung, wobei gut erkennbar ist, dass die Zellen ausschließlich direkt in den Poren der Keramik gewachsen sind. Die intensive Blaufärbung deutet darauf hin, dass eine hohe Zelldichte vorlag. Die rechte Abbildung zeigt die DAPI Färbung. Darauf ist eine hohe Anzahl an Zellkernen erkennbar, die, eingebettet in extrazelluläre Matrix, eine gesamte Pore der Keramik ausfüllen.



**Abbildung 4-39:** Toluidin Blau und DAPI Färbung der ucMSC nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung im Bioreaktor. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 3 (links) und 2(rechts).



**Abbildung 4-40:** Histologische Färbung der Alkalischen Phosphatase nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung im Bioreaktor. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 1 (links) und 4 (rechts). Oben rechts ist der Blindwert abgebildet.

Der Nachweis der Alkalischen Phosphatase war im Vergleich zu der vorangegangenen Kultivierung ohne osteogenes Kulturmedium erfolgreich. In Abbildung 4-40 sind Zell-Keramik Konstrukte aus den Bioreaktoren 1 und 4 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass nicht alle Zellen Alkalische Phosphatase produziert haben. Auf den Keramiken waren kleine, einzelne Bereiche blau angefärbt. In der linken Abbildung sind die einzelnen blau gefärbten Zellen sehr gut erkennbar.

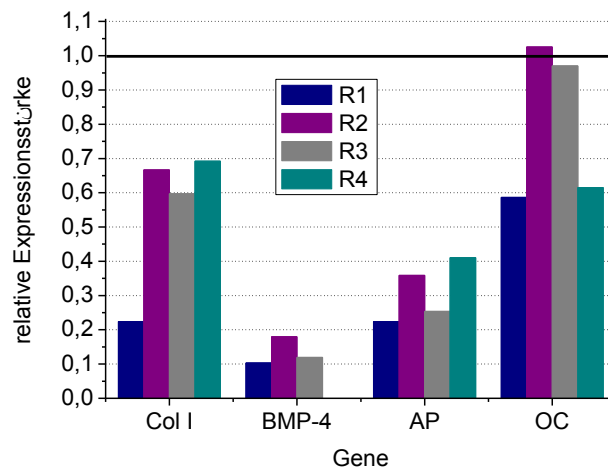
Auch der Nachweis eingelagerter Calciumionen in die extrazelluläre Matrix mittels einer Alizarinrot Färbung war erfolgreich. Auf allen vier Zell-Keramik Konstrukten war eine Rotfärbung ersichtlich. Allerdings waren nicht die gesamten Konstrukte rot eingefärbt, sondern einzelne Poren, was erneut darauf hindeutet, dass die Zellen in den Poren gewachsen sind und dort Calciumionen in die extrazelluläre Matrix eingelagert haben.



**Abbildung 4-41:** Alizarinrot Färbung der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung im Bioreaktor. Abgebildet sind Proben aus den Reaktoren 1, 2, 3 und 4 (von links nach rechts). Rechts ist der Blindwert abgebildet.

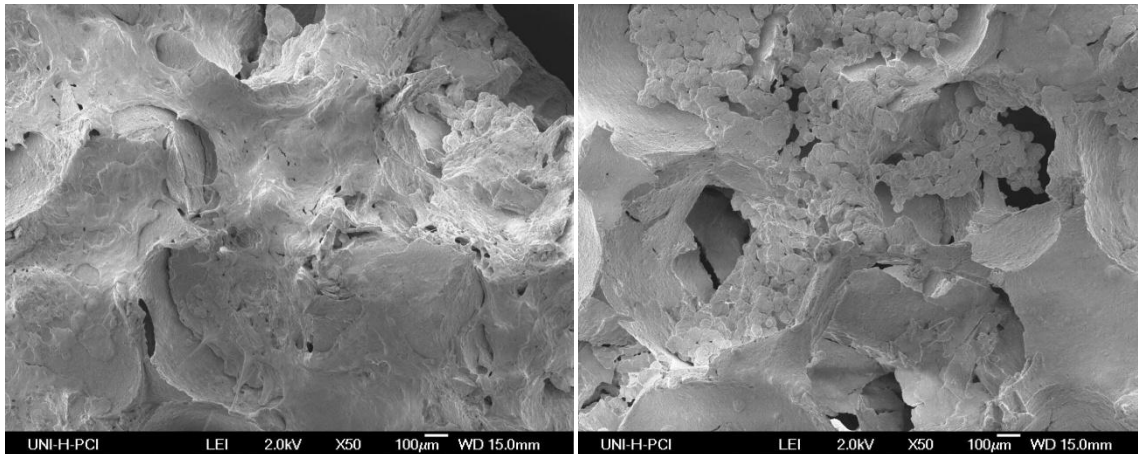
Mittels RT-PCR wurde die Expression von Kollagen I, BMP-4, Osteocalcin und Alkalischer Phosphatase nachgewiesen. RUNX2 und BMP-2 wurde von den Zellen nicht exprimiert. Dabei ist die Expression von Kollagen I in allen vier Proben, insbesondere der Zellen aus Reaktor 1, im Verhältnis zu Osteocalcin weniger stark ausgeprägt, als bei den Zellen, die nur in osteogenem Differenzierungsmedium ohne BMP-2 freisetzenden Mikrosphären kultiviert wurden. Die ungefähr gleich stark ausgeprägte Expression von Kollagen I und Osteocalcin lässt aber auch hier den Schluss zu, dass es sich bei den verwendeten Zellen um eine Mischpopulation handelt, in der die Zellen ein unterschiedliches Verhalten bezüglich ihres Potenzials in die osteogene Richtung zu differenzieren, aufweisen. Zum einen wurde die im Verhältnis hohe Expression von Kollagen I und eine geringe Expression von BMP-4, welches das Expressionsmaximum während der Matrixreifung aufweist, nachgewiesen, ein Indiz dafür, dass die Zellen sich am Ende der Proliferationsphase befinden und gerade beginnen extrazelluläre Matrix zu bilden. Zum anderen wurde Osteocalcin, welches erst in der Mineralisierungsphase exprimiert wird, im Vergleich zu BMP-4 und Alkalischer Phosphatase sehr stark exprimiert, insbesondere von den Zellen in den Bioreaktoren 2 und 3, was den Schluss zulässt, dass sich die Zellen bereits in der Mineralisierungsphase der extrazellulären Matrix befinden. Die geringe Expression der Alkalischen Phosphatase unterstützt beide Annahmen, da Alkalische Phosphatase während des Aufbaus der zelleigenen

Matrix stark exprimiert wird, jedoch in der Proliferationsphase davor und in der Mineralisierungsphase danach nicht bzw. nur schwach exprimiert wird.

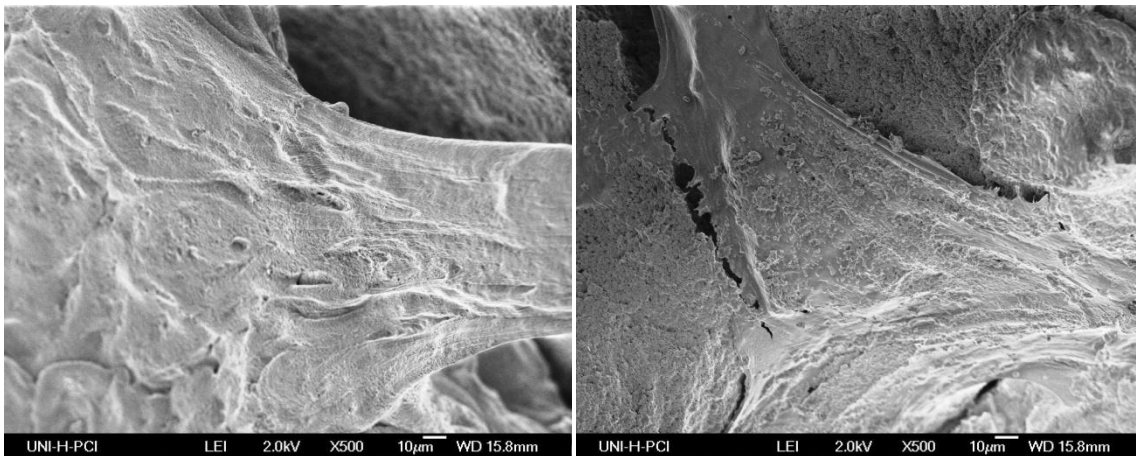


**Abbildung 4-42:** Ergebnisse der semiquantitativen PCR von ucMSC auf Sponceram® nach der dynamischen Kultivierung im Z®RPD-System über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Intensitäten der einzelnen Genexpressionen sind relativ zu der gemessenen Intensität von GAPDH (*house keeping Gen*), welches als Linie dargestellt ist.

In Abbildung 4-43 sind exemplarisch rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen aus den Reaktoren 1 und 2 abgebildet. Diese zeigen einen dichten Zellrasen, der sich über die gesamte Keramik erstreckt. In der rechten Aufnahme ist weiterhin erkennbar, dass die Zellen auch direkt auf den PLGA Mikrosphären wachsen. Die Abbildung 4-44 zeigt stark vergrößerte Aufnahmen der Zellen auf den Keramiken. In der linken Abbildung ist gut erkennbar, dass die in extrazelluläre Matrix eingebetteten Zellen in eine Richtung ausgerichtet sind. In der rechten Abbildung befinden sich kleine Knötchen oder kugelförmige Strukturen auf dem Zellrasen. Eine genaue Analyse dieser Ablagerungen war zwar nicht möglich, aber eine mögliche Erklärung könnte die Mineralisierung der extrazellulären Matrix sein. Im Verlauf der osteogenen Differenzierung bilden die ausdifferenzierenden Zellen zunächst Alkalische Phosphatase und lagern Calciumionen in die extrazelluläre Matrix ein. Die Alkalische Phosphatase setzt anschließend enzymatisch Phosphat frei, welches mit dem Calcium zu Hydroxylapatit reagiert. Die abgelagerten Kügelchen könnten also Calciumeinlagerungen oder Hydroxylapatit sein.



**Abbildung 4-43:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 1 (links) und 2 (rechts). Die Bilder wurden bei einer 50fachen Vergrößerung aufgenommen.



**Abbildung 4-44:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 1 (links) und 3 (rechts). Die Bilder wurden bei einer 500fachen Vergrößerung aufgenommen.

Die osteogene Differenzierung der ucMSC konnte mit dieser dynamischen Kultivierung erfolgreich gezeigt werden. Durch die Kombination von dynamischer Kultivierung, osteogenem Differenzierungsmedium und BMP-2 freisetzenden Mikrosphären, konnte ein vorzeitiges Ablösen der Zellen verhindert werden, so dass vier Zell-Keramik Konstrukte mit einer homogenen Zellschicht erhalten wurden. Weiterhin wurde die Alkalische Phosphatase, welche in den beiden vorigen dynamischen Kultivierungen nur minimal nachgewiesen werden konnte, synthetisiert. Typische Knochenmarker wurden exprimiert, wobei anhand der Expression die Einordnung der Zellen in eine Differenzierungsphase schwierig ist,

da Marker aus frühen und späten Phasen exprimiert wurden. Die Alizarinrot Färbung und die REM Aufnahmen deuten auf eine erfolgreiche Mineralisierung der extrazellulären Matrix hin. Außerdem konnte mit dieser dynamischen Kultivierung die Reproduzierbarkeit eines künstlich hergestellten Knochenkonstruktes gezeigt werden. Sowohl die Verbrauchswerte für Glukose, die nur minimal voneinander abwichen, als auch die Ergebnisse der histologischen Färbungen und die REM Aufnahmen stimmten in dieser Kultivierung deutlich besser überein, als in den vorangegangenen Experimenten.

#### 4.3.4 Kultivierung adMSCc mit osteogenem Differenzierungsmedium im Bioreaktor

Während dieser Kultivierung wurden die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe in Passage 5 mit osteogenem Differenzierungsmedium in den Z<sup>®</sup>RPD Reaktoren kultiviert. Pro Sponceramscheibe wurden 9Mio Zellen verwendet, die per Injektion durch das Septum tropfenweise direkt auf die Keramiken in den Reaktoren gegeben wurden. Nach einer Inkubation von 45 Minuten bei 37 °C wurden die Reaktoren langsam mit Medium aufgefüllt.

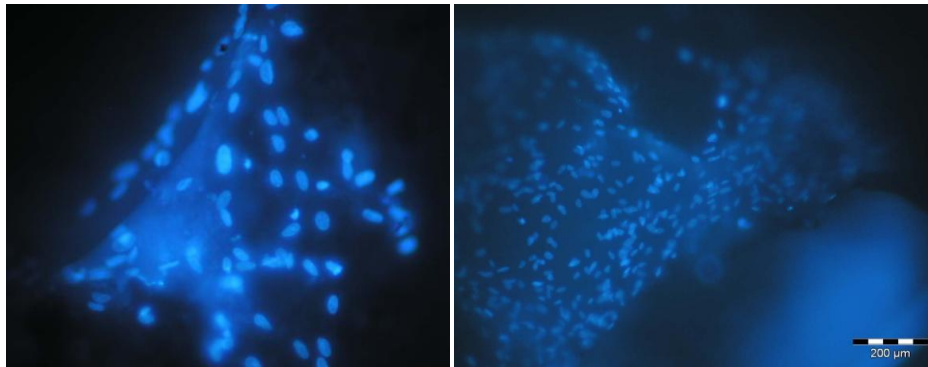
Ab dem dritten Tag der Kultivierung wurde kontinuierlich Medium zugeführt. Jeder Bioreaktor wurde am Tag mit 10,8 mL frischem Medium versorgt. Der gesamte Glukoseverbrauch der Zellen in den einzelnen Bioreaktoren betrug zwischen 323 mg und 344 mg (siehe Tabelle 11). Somit haben die Zellen mehr als doppelt so viel Glukose verbraucht, als die dynamisch kultivierten Zellen aus dem Nabelschnurgewebe. Allerdings wurden auch deutlich mehr Zellen auf die Sponceram<sup>®</sup> Scheiben besiedelt. Die Schwankungen bezüglich der verwendeten Zellzahl zum Besiedeln der Keramiken, resultiert daher, dass die Zellen vor den Kultivierungen in den Bioreaktoren in Wannenstapeln (*cell factory*) vermehrt worden sind. Allerdings ist eine mikroskopische Überwachung der Zellen in den einzelnen Schichten der Wannenstapel nicht möglich. Daher konnte nicht immer sichergestellt werden, dass die Zellen beim Ausplattieren in die Wannenstapel komplett homogen verteilt worden sind und sich in jeder Schicht Zellen befanden.



**Tabelle 11:** Glukoseverbrauch der adMSC während der dynamischen Kultivierung

Reaktor 1	Reaktor 2	Reaktor 3	Reaktor 4
331,48 mg	341,81 mg	323,79 mg	344,44 mg

In Abbildung 4-45 ist eine Übersichtsfärbung von Zell-Keramik Konstrukten aus den Bioreaktoren 1 und 2 abgebildet. Es ist eine sehr hohe Dichte der Zellkerne erkennbar, die im Falle der rechten Abbildung in mehreren Schichten vorliegen und daher nicht scharf fokussiert werden konnten. Weiterhin ist in der linken Abbildung gut erkennbar, dass die Zellen einen kompletten Zellrasen auf dem Sponceram® gebildet haben. Der starke Bewuchs bestätigt auch den hohen Glukoseverbrauch.



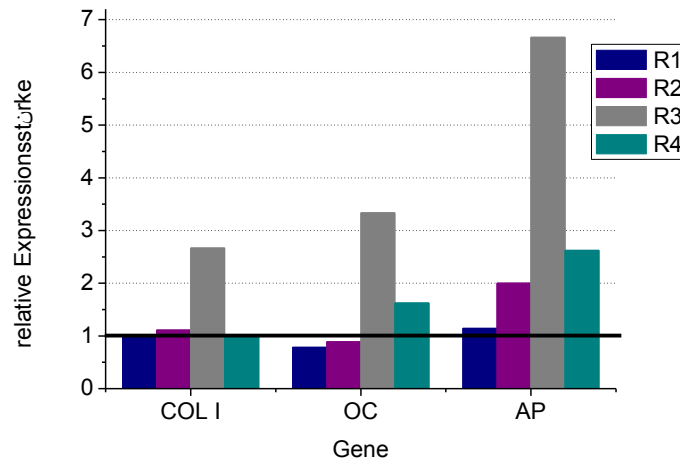
**Abbildung 4-45:** DAPI Färbung der Zellkerne nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus Reaktor 1 (links) und 2 (rechts).

Die histologische Färbung der Zell-Keramik Konstrukte zeigt eine Einlagerung von Calcium in die extrazelluläre Matrix der Zellen. Auffällig dabei ist, dass sich die intensive Rotfärbung nur in den Poren der Keramik befindet. Auch die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe scheinen bevorzugt direkt in den Poren zu wachsen. Weiterhin ist die Färbung bei der Probe aus Bioreaktor 3 deutlich intensiver, als die der anderen Proben. Die Zellen scheinen hier mehr Calcium eingelagert zu haben. Diese Vermutung wird durch die von Kossa Färbung, welche sich im Anhang (siehe Abbildung 7-27) befindet bestätigt. Auch hier zeigt das Zell-Keramik Konstrukt aus Reaktor 3 eine deutlich intensivere Färbung.



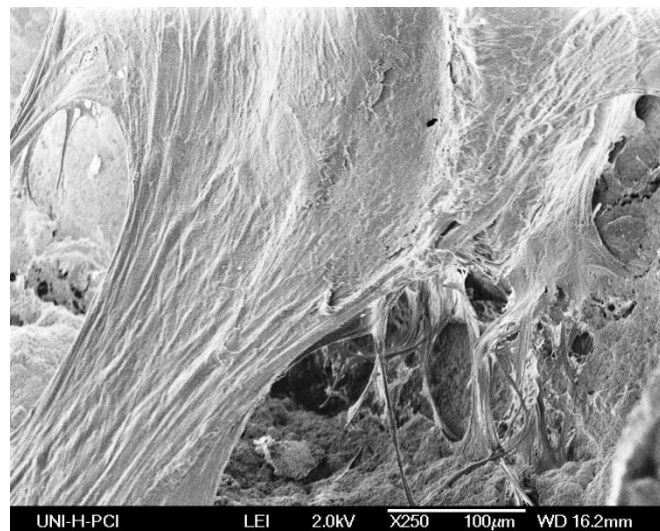


**Abbildung 4-46:** Alizarinrot Färbung der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den den Reaktoren 1-4 und der Blindwert (von links nach rechts).

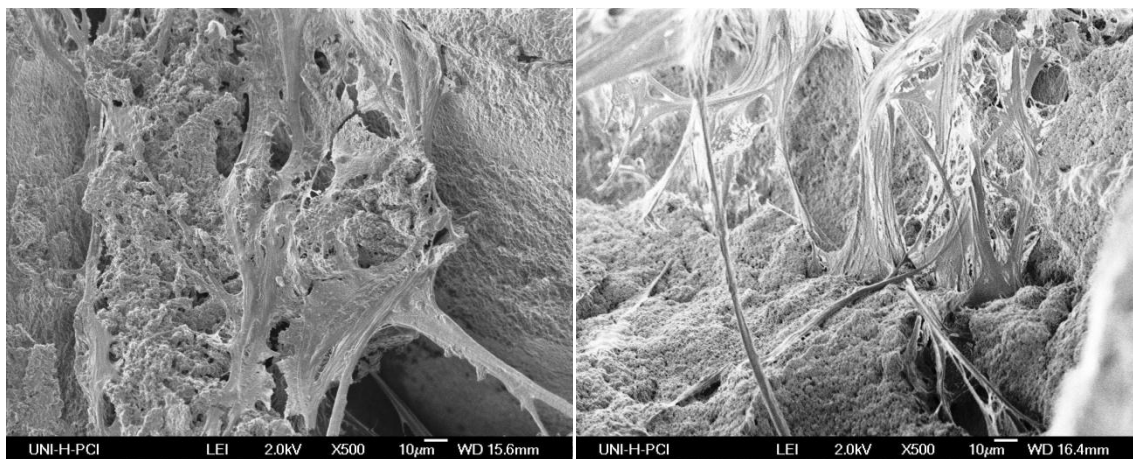


**Abbildung 4-47:** Ergebnisse der semiquantitativen PCR der adMSC auf Sponceram® nach der dynamischen Kultivierung im Z®RPD-System über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Intensitäten der einzelnen Genexpressionen sind relativ zu der gemessenen Intensität von GAPDH (*house keeping Gen*), welches als Linie dargestellt ist.

Die Expression von Kollagen I, Osteocalcin und Alkalischer Phosphatase wurde nachgewiesen, während die Expression von RUNX2, BMP-2 und BMP-4 nicht nachgewiesen werden konnte. Die Expression von Kollagen I und Osteocalcin ist dabei im Verhältnis zu der Expression von Alkalischer Phosphatase etwas geringer. Wie in den histologischen Färbungen, weicht auch die Genexpression knochentypischer Marker in den Zellen aus Bioreaktor 3 von den Ergebnissen der übrigen Proben ab, die Zellen zeigen zwar das gleiche Expressionsmuster, es ist jedoch im Verhältnis zu den übrigen 3 Proben stark erhöht. Das ermittelte Genexpressionsmuster lässt den Schluss zu, dass sich die Zellen in der Phase der Matrixsynthese befinden. In diesem Stadium wird die Expression der Alkalischen Phosphatase hochreguliert, was in diesem Fall besonders bei den Zellen aus Reaktor 3 der Fall ist. Die Expression von Kollagen I wird langsam wieder runter reguliert und die Expression von Osteocalcin beginnt am Ende der Phase der Matrixsynthese.



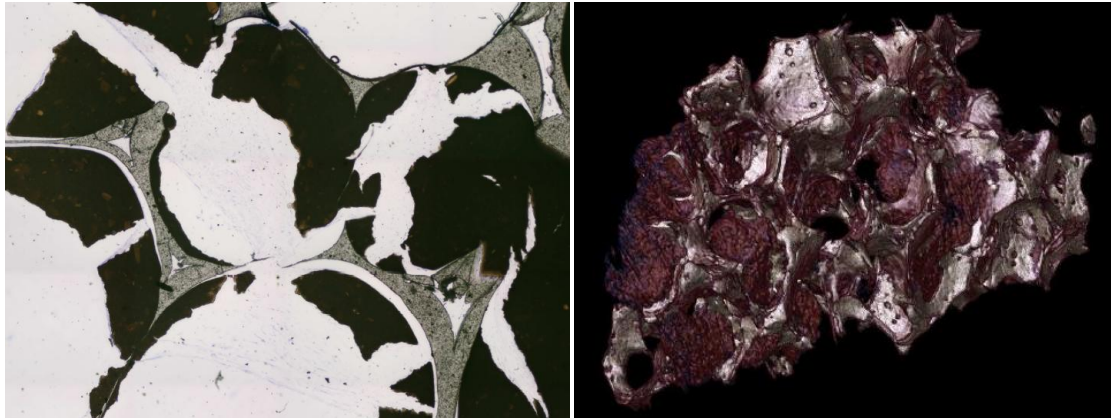
**Abbildung 4-48:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Zell-Keramik Konstruktes nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet ist eine Probe aus dem Bioreaktor 2. Das Bild wurde bei einer 250fachen Vergrößerung aufgenommen.



**Abbildung 4-49:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 1 (links) und 2 (rechts). Die Bilder wurden bei einer 500fachen Vergrößerung aufgenommen.

Die REM Aufnahmen der Zell-Keramik Konstrukte zeigen, dass die Zellen einen kompletten Zellrasen auf dem Sponceram® ausgebildet haben. Besonders am unteren Bildausschnitt von Abbildung 4-48 ist dabei das gerichtete Wachstum der Zellen in eine Richtung gut erkennbar. Im rechten unteren Bildabschnitt sind weiterhin einzelne Zellen zu sehen, die aus dem Zellrasen herausragen und diesen scheinbar mit der Keramik verbinden. In Abbildung 4-49 sind zwei vergrößerte Bildausschnitte dieser „Ankerzellen“ dargestellt. Diese Zellen bilden lange, dünne Stränge aus und sind darüber scheinbar in der Lage, eine große zusammenhängende

Zellschicht mit dem der Keramik zu verbinden. Im Falle des linken Bildes in Abbildung 4-49 scheinen die Zellen mit dieser Technik einen Hohlraum, hervorgerufen durch eine Pore oder durch einen Riss in der Keramik, zu überbrücken. Die Zellen überwinden diesen Hohlraum durch Ausstreckung der Zellen, die an der gegenüberliegenden Seite des Hohlraums an der Keramik anwachsen.



**Abbildung 4-50:** Hartschliffe (links) und  $\mu$ CT Aufnahme (rechts) der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung

Abbildung 4-50 zeigt die Ergebnisse der Hartschliffanalysen und der  $\mu$ CT Aufnahmen des mit adMSC besiedelten Sponceram<sup>®</sup> nach der Kultivierung im Bioreaktor. Das Sponceram<sup>®</sup>, welches in der linken Abbildung schwarz dargestellt ist, verzeichnet eine poröse Struktur mit einigen interkonnektiven Poren. Auch die Zellen sind in der Abbildung eindeutig zu identifizieren, sie haben eine eigene Matrix (grau) gebildet, welche einen guten Kontakt mit dem Sponceram<sup>®</sup> (schwarz) hat. Die Zellen liegen in kleiner Anzahl vor und verteilen sich in der neugebildete Matrix. In der linken Abbildung ist erkennbar, dass die Zellen eine kleinere Pore komplett aufgefüllt haben. Diese Verteilung ist ähnlich wie man sie in physiologischem Knochen vorfindet. Dabei ersetzen die Poren des Sponcerams<sup>®</sup> die Lakunen im Knochen.

In der  $\mu$ CT Aufnahme ist die poröse Struktur von Sponceram<sup>®</sup> gut ersichtlich. Die mineralisierte extrazelluläre Matrix ist „pink“ angefärbt. Es ist offenbar, dass die Calciumeinlagerungen in die ECM zunächst an den Rändern der Poren stattfinden. Es scheint auch so zu sein, dass der Anfang meistens bei Porenübergängen anfängt. Von dort aus werden die Poren aufgefüllt. Die neugebildete Matrix ist dicht und zeigt

einen hohen Anteil an Calcium. Insbesondere auf der linken Seite der Aufnahme ist ein großes Volumen an neugebildeter mineralisierter Matrix zu erkennen.

### Fazit

Mit der Kombination aus dynamischer Kultivierung und dem Zusatz von osteogenem Differenzierungsmedium konnte eine erfolgreiche osteogene Differenzierung der adMSC gezeigt werden und dicht besiedelte Zell-Keramik Konstrukte synthetisiert werden. Durch die Ermittlung des Glukoseverbrauchs und der Übersichtsfärbung konnte ein Wachstum der Zellen auf dem Sponceram® nachgewiesen werden. Die Ausbildung einer zelleigenen extrazellulären Matrix und die Einlagerung von Calcium in diese Matrix wurden durch histologische Färbungen und Hartschliffanalysen nachgewiesen und die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Zellen in einem fortgeschrittenen Differenzierungsstadium befinden. Diese These wurde durch die Analyse der Genexpression knochentypischer Marker bekräftigt. Die Reproduzierbarkeit der Kultivierung konnte anhand dieses Beispiels jedoch nicht gezeigt werden. Die Zellen aus Reaktor 3 wiesen eine deutlich höhere Einlagerung von Calcium in die extrazelluläre Matrix auf und auch die Genexpressionsanalyse ergab eine deutlich stärkere Expression der knochenspezifischen Marker im Verhältnis zu dem *house keeping* Gen.

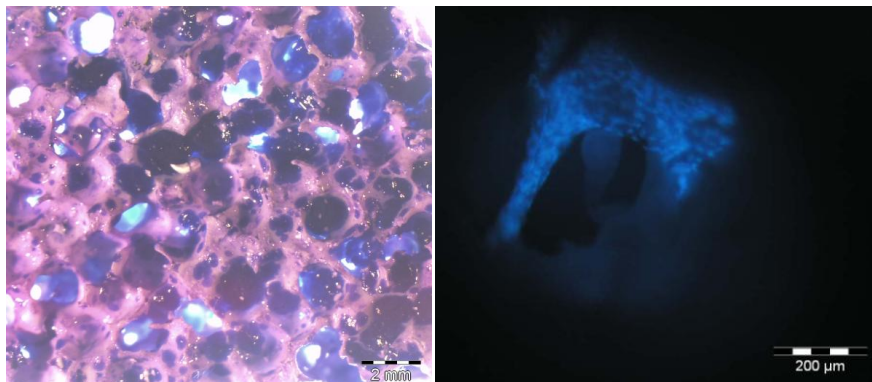
#### *4.3.5 Kultivierung von adMSC auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® im Bioreaktor*

Die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe wurden einen Tag vor Beginn der Kultivierung im Bioreaktor auf das modifizierte Sponceram® aufgebracht und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es wurden vier Sponceramscheiben mit Zellen besiedelt, wobei pro Keramik 8,5Mio Zellen in Passage 5 verwendet wurden. Nach 24 h wurden vier Sponceramscheiben mit den darauf adhärierenden Zellen in die einzelnen Bioreaktoren eingebaut und die Kultivierung wurde gestartet. Die Zellen wurden in Kulturmedium ohne osteogene Zusätze kultiviert.

Die Zufütterung mit Kulturmedium im Perfusionsbetrieb wurde nach einem Tag eingeschaltet, wobei pro Bioreaktor 5,4 mL Medium pro Tag verwendet wurden. Nach drei Tagen wurde die Fütterung auf 10,8 mL Medium pro Tag und nach 10 Tagen auf 16,2 mL Medium pro Tag erhöht. Der gesamte Glukoseverbrauch in den einzelnen Bioreaktoren ist in Tabelle 12 dargestellt. Die Zellen haben in allen vier Bioreaktoren ungefähr die gleiche Menge Glukose verbraucht, die größte Differenz beträgt 15 mg zwischen Bioreaktor 1 und Bioreaktor 4, wobei das bei einem Gesamtverbrauch von über 200 mg einer Abweichung von ca. 7 % entspricht. Im Vergleich zu der vorherigen dynamischen Kultivierung haben die adMSC in diesem Lauf weniger Glukose verbraucht, als die in osteogenem Medium kultivierten Zellen, jedoch haben sie 50–100 mg mehr Glukose verbraucht, als die ucMSC in den 3 gezeigten Kultivierungen verbraucht haben.

**Tabelle 12:** Glukoseverbrauch der adMSC während der dynamischen Kultivierung

Reaktor 1	Reaktor 2	Reaktor 3	Reaktor 4
206,13 mg	218,7 mg	212,18 mg	221,78 mg



**Abbildung 4-51:** Toluidin Blau und DAPI Färbung der Zellen bzw. Zellkerne nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus dem Bioreaktor 4.

Die Übersichtsfärbung in Abbildung 4-51 zeigt im rechten Bild eine hohe Zellkerndicht, die auf ein gutes Zellwachstum deuten. Allerdings sind nicht die gesamten Keramiken mit Zellen besiedelt. Dies wird auch in der linken Abbildung deutlich. Die unterschiedliche Intensität der Toluidin Blau Färbung zeigt, dass sowohl die adMSC, als auch die ucMSC bevorzugt in den Poren wachsen. Allerdings weist die leichte Blaufärbung auf der gesamten Keramik darauf hin, dass auch Zellen außerhalb der Poren auf der Keramik gewachsen sind.

Auf jedem Zell-Keramik Konstrukt aus den vier parallel kultivierten Bioreaktoren wurde eine Einlagerung von Calcium in die extrazelluläre Matrix nachgewiesen. Die histologische Färbung ergab eine intensive Rotfärbung aller Konstrukte. Es wurden dabei keine auffälligen Unterschiede zwischen den einzelnen Proben bezüglich der Intensität der Färbung festgestellt. Die Menge an eingelagertem Calcium war also in jeder der vier dynamischen Kultivierungen vergleichbar. Das Ergebnis wird durch die Ergebnisse der von Kossa Färbung (siehe Abbildung 7-29) bestätigt. Allerdings ist in der von Kossa Färbung die Intensität der Schwarzfärbung auf den Keramiken nicht so homogen wie die Alizarinrot Färbung. In den Poren der Keramiken, die auch schon in der Übersichtsfärbung auf eine hohe Zelldichte schließen ließen, war die Färbung intensiver, dies deutet darauf hin, dass dort mehr Calcium in die extrazelluläre Matrix eingelagert worden ist.



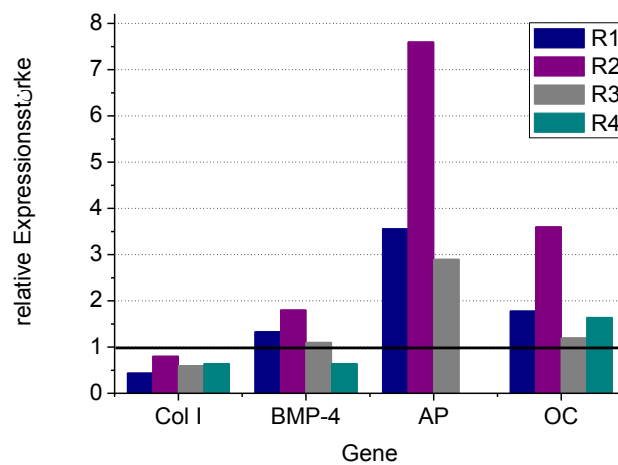
**Abbildung 4-52:** Alizarinrot Färbung der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den den Reaktoren 1-4 (von links nach rechts) und der Blindwert (in der rechten Abbildung, oben links).

Alkalische Phosphatase wiederum konnte nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden, nur vereinzelte Zellen scheinen Alkalische Phosphatase synthetisiert zu haben (siehe Abbildung 7-28).

Die Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR ergab bei dieser Kultivierung eine Expression von Kollagen I, BMP-4, Alkalischer Phosphatase und Osteocalcin, wobei die Expression von Alkalischer Phosphatase in den Zellen, die in Bioreaktor 3 kultiviert worden sind, nicht nachgewiesen werden konnte. Auffällig bei dem Vergleich der Expressionsintensitäten der Zellen aus den vier parallel kultivierten Bioreaktoren untereinander war, dass die Zellen aus Bioreaktor 2 Alkalische Phosphatase und Osteocalcin deutlich stärker exprimierten, als die Zellen aus den übrigen Bioreaktoren. Die Intensitäten der vier exprimierten Knochenmarker deuten darauf hin, dass die Zellen sich in der Phase des Matrixaufbaus bzw. im Übergang zur Mineralisierungsphase der extrazellulären Matrix befinden. Kollagen I



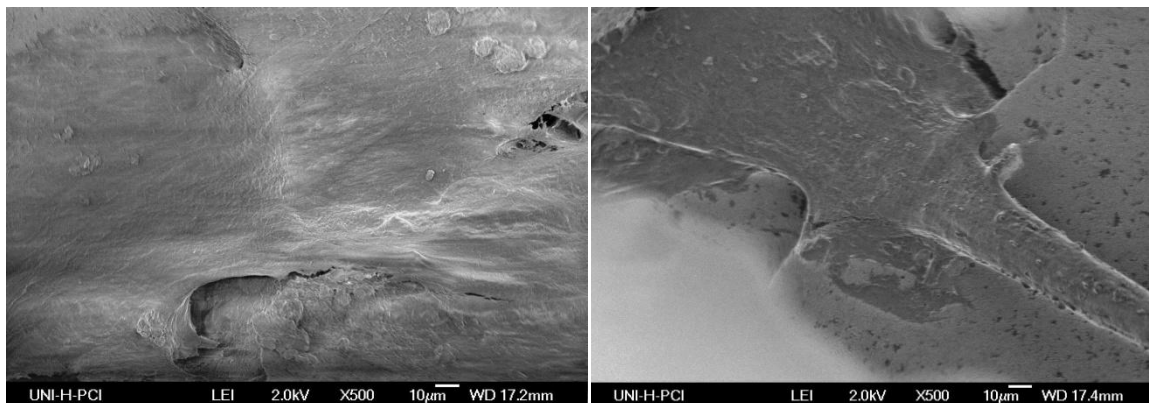
und BMP-4 werden am Ende der Matrixreifung kaum noch exprimiert, die Expression von Osteocalcin hingegen wird zu diesem Zeitpunkt hochreguliert, um die Mineralisierung der ECM einzuleiten. Weiterhin wurde zwar die Expression der Alkalischen Phosphatase nachgewiesen, allerdings wurden bei der histologischen Färbung (siehe Abbildung 7-28) kaum Zellen, die Alkalische Phosphatase auch tatsächlich synthetisieren, identifiziert. Entweder die Expression der Alkalischen Phosphatase wurde zum Zeitpunkt der RT-PCR gerade erst begonnen oder ein interner Zellmechanismus hat nach der Expression die Synthese verhindert.



**Abbildung 4-53:** Ergebnisse der semiquantitativen PCR der adMSC auf Sponceram® nach der dynamischen Kultivierung im Z®RPD-System über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Intensitäten der einzelnen Genexpressionen sind relativ zu der gemessenen Intensität von GAPDH (*house keeping* Gen), welches als Linie dargestellt ist.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 4-54) zeigen einen Zellverband auf den Keramiken. Das linke Bild ist direkt in eine Pore hinein aufgenommen worden. Am vorderen Bildrand sieht die Zellschicht aus, als wäre dort etwas abgerissen. Durch die Probenpräparation für die REM Aufnahmen werden die Proben mehrfach gewaschen und anschließend getrocknet. Dadurch kann es an einigen Stellen, an denen die Zellen möglicherweise nicht so stabil an die Keramik gebunden sind oder die Zellschicht sehr dünn ist, zu Bruchkanten kommen. In der rechten Aufnahme ist eine starke Vergrößerung eines Zellstranges abgebildet, der aus einem Zellrasen herausragt. Auf dem Zellstrang sind kleine Kügelchen oder Knötchen zu erkennen, wie sie auch schon auf den REM Aufnahmen der dynamisch kultivierten ucMSC auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® in osteogenem Differenzierungsmedium zu sehen waren. Die Knötchen könnten

Matrixinlagerungen aus Calcium oder Hydroxylapatit sein, was für eine erfolgreich osteogene Differenzierung der kultivierten Zellen sprechen würde.



**Abbildung 4-54:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 2 (links) und 4 (rechts). Die Bilder wurden bei einer 500fachen (rechts) Vergrößerung aufgenommen.

### Fazit

Die osteogene Differenzierung der adMSC konnte mit BMP-2 freisetzenden Mikrosphären auf Sponceram® in Kombination mit einer dynamischen Kultivierung im Drehbettreaktor erfolgreich induziert werden. Eine hohe Proliferation der Zellen hat zu einer hohen Zelldichte auf den Keramiken geführt, wobei die Übersichtsfärbung gezeigt hat, dass die Zellen bevorzugt in den Poren von Sponceram® gewachsen sind. Die Einlagerung von Calcium in die extrazelluläre Matrix konnte mit histologischen Färbungen belegt werden. Des Weiteren wurde die Expression verschiedener Gene, die am Knochenaufbau beteiligt sind, erfolgreich nachgewiesen. Allerdings synthetisierten nur vereinzelte Zellen Alkalische Phosphatase. Die Reproduzierbarkeit künstlich hergestellter Knochenkonstrukte konnte in dieser Kultivierung in Ansätzen gezeigt werden. Die Abweichungen bezüglich des Glukoseverbrauchs lagen bei <10 % und auch bei den Calciumeinlagerungen in die extrazelluläre Matrix konnten keine Unterschiede festgestellt werden zwischen den vier Kultivierungen. Allerdings wies das Genexpressionsmuster der Zellen aus Reaktor 2 deutliche Unterschiede in Bezug auf die relativen Intensitäten im Vergleich mit den übrigen Proben auf.



#### 4.3.6 Kultivierung adMSC mit osteogenem Differenzierungsmedium auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® im Bioreaktor

Die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe wurden einen Tag vor Beginn der Kultivierung im Bioreaktor auf das modifizierte Sponceram® aufgebracht und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es wurden vier Sponceramscheiben mit Zellen besiedelt, wobei pro Keramik 5 Mio Zellen in Passage 5 verwendet wurden. Nach 24 h wurden vier Sponceramscheiben mit den darauf adhärierenden Zellen in die einzelnen Reaktoren eingebaut und die Kultivierung wurde gestartet. Die Zellen wurden in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert.

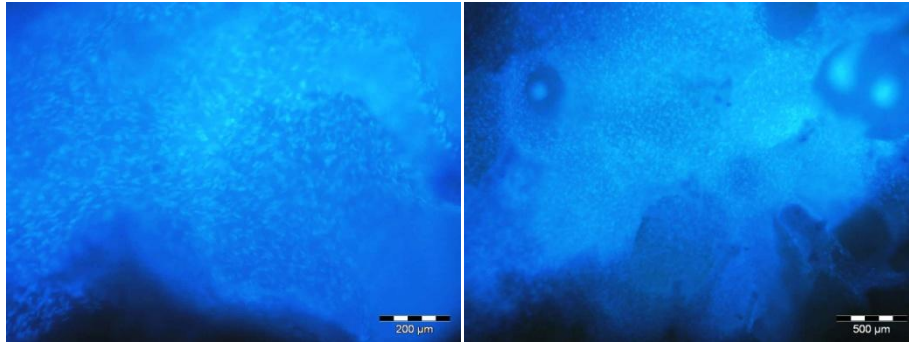
Nach 24 h wurde die kontinuierliche Mediumzufuhr eingeschaltet, wobei pro Reaktor 5,4 mL/Tag frisches Medium zugepumpt wurde. Nach vier Tagen wurde die Fütterung noch einmal auf 10,8 mL/Tag erhöht. Nach 28 Tagen wurde die Kultivierung abgebrochen. Die Gesamtmenge an Glukose, die die Zellen über die 28 Tage Kultivierung benötigt haben, ist in Tabelle 13 dargestellt. Die Menge der verbrauchten Glukose über den gesamten Zeitraum der dynamischen Kultivierung variierte in den einzelnen Bioreaktoren. Während die Zellen in Bioreaktor 3 258 mg Glukose verbrauchten, lagen die Werte der übrigen 3 Bioreaktoren deutlich darunter. Die Zellen in Bioreaktor 1 verbrauchten 204 mg, die Zellen in Bioreaktor 2 195 mg und in Bioreaktor 4 218 mg. Die Abweichung in Bezug auf den Glukoseverbrauch liegt im Falle von Bioreaktor 2 und 4 bei etwas über 20 %.

**Tabelle 13:** Glukoseverbrauch der adMSC während der dynamischen Kultivierung

Reaktor 1	Reaktor 2	Reaktor 3	Reaktor 4
204,8 mg	195,3 mg	258,8 mg	218,1 mg

Die Übersichtsfärbungen der Zell-Keramik Konstrukte aus den vier parallel kultivierten Bioreaktoren zeigen eine dichte Zellschicht auf allen vier Proben. In Abbildung 4-55 sind exemplarisch zwei Proben abgebildet. Die DAPI Färbung zeigt dabei eine sehr hohe Zellkerndichte, die einzelnen Poren der Keramiken sind komplett mit Zellen ausgefüllt. Im Vergleich zu den vorherigen gezeigten

Ergebnissen ist diese Kultivierung mit Abstand die mit der höchsten Zelldichte auf den Keramiken ohne Anzeichen des Ablösens der Zellen von dem Sponceram®.

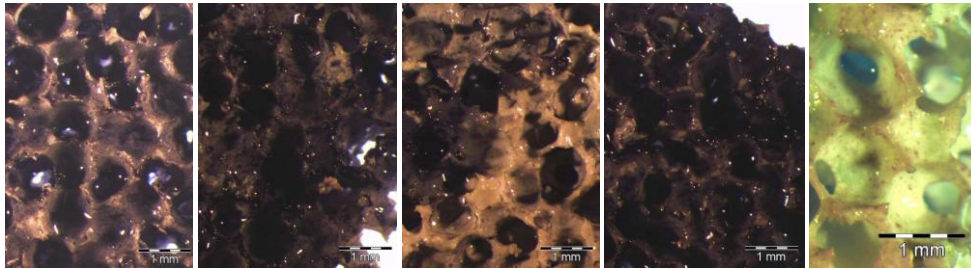


**Abbildung 4-55:** DAPI Färbung Färbung der Zellkerne nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus dem Bioreaktor 1 (links) und 3 (rechts).

Die histologischen Färbungen belegen eine Einlagerung von Calcium bei jedem der vier Zell-Keramik Konstrukte, wobei die Intensität der Rotfärbung besonders bei den Proben aus den Bioreaktor 2 und 4 sehr hoch ist (Abbildung 4-57). Weiterhin ist bei diesen Proben die gesamte Keramik mit einer rot eingefärbten Schicht überzogen, die Zellen scheinen hier also nicht nur in den Poren gewachsen zu sein. Weiterhin scheinen alle Zellen Calcium in die extrazelluläre Matrix eingelagert zu haben. Bei dem Zell-Keramik Konstrukt aus Bioreaktor 3 und 1 ist die Einlagerung des Calciums allerdings inhomogen. Bei der Probe aus dem Bioreaktor 3 ist an einer Ecke der Probe eine intensiv dunkelrot gefärbte Zellschicht erkennbar, während die übrige Probe nur schwach rot eingefärbt ist. Dies ist auch bei der Probe aus Bioreaktor 1 der Fall. In einzelnen Poren ist eine intensive Rotfärbung sichtbar, die übrige Keramik ist jedoch nur schwach eingefärbt. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte, neben einem inhomogenen Zellwachstum auf den Keramiken, die Präparation der Proben nach der dynamischen Kultivierung sein. Durch mehrfaches Waschen und die Lagerung in PBS für 1-2 Tage bis zum Durchführen der Färbungen, kann es bei sehr hohen Zelldichten zum Ablösen des gesamten Zellrasens kommen.

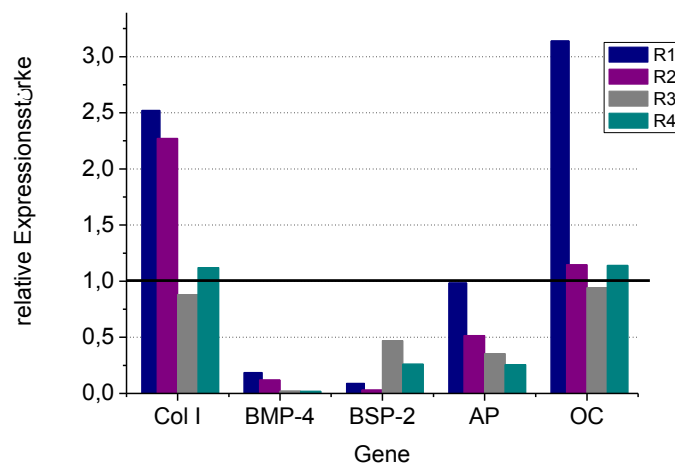


**Abbildung 4-56:** Alizarinrot Färbung der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den den Reaktoren 1-4 und der Blindwert (von links nach rechts).



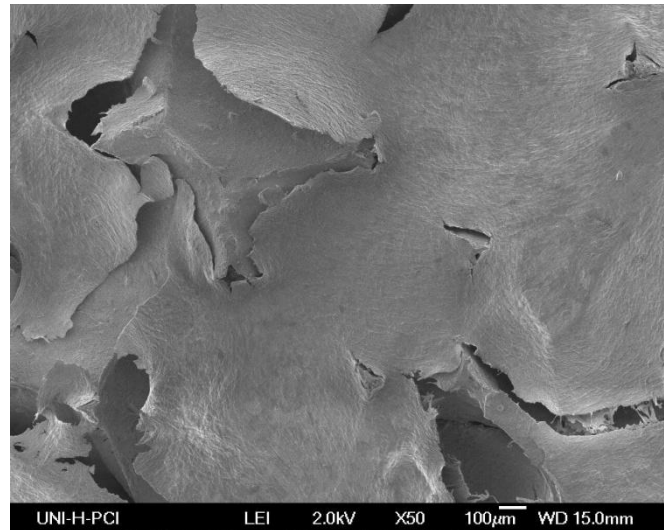
**Abbildung 4-57:** Histologische Färbung der Alkalischen Phosphatase nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung im Bioreaktor. Abgebildet sind Proben aus Reaktor 1, 2, 3 und 4(von links nach rechts).

Auch der Nachweis von Alkalischer Phosphatase durch histologische Färbungen war erfolgreich. Die hohe Intensität der Blaufärbung deutet auf eine hohe Konzentration an Alkalischer Phosphatase. Des Weiteren lässt die Homogenität der Färbung auf den Keramiken den Schluss zu, dass alle Zellen Alkalische Phosphatase synthetisiert haben. Lediglich das Zell-Keramik Konstrukt aus dem Bioreaktor 3 zeigt erneut Inhomogenitäten in Bezug auf die Intensität der Färbung. Im Vergleich zu den vorherigen Kultivierungen war die Synthese der Alkalischen Phosphatase in diesem Experiment deutlich ausgeprägter, was auf der einen Seite auf die deutlich höhere Zellzahl zurückzuführen ist, aber auch auf eine fortgeschrittene osteogene Differenzierung aller Zellen deutet.

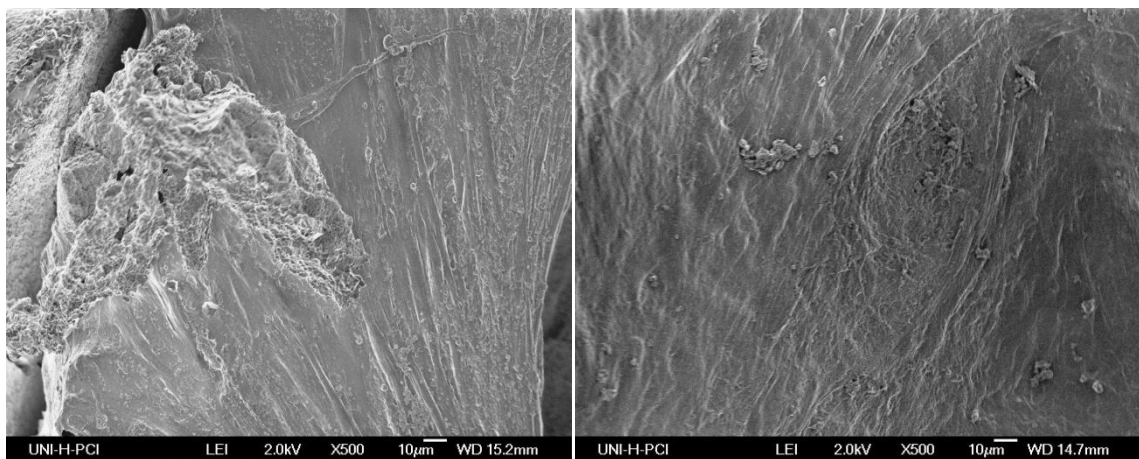


**Abbildung 4-58:** Ergebnisse der semiquantitativen PCR der adMSC auf dem Kompositmaterial Sponceram®/PLGA Mikrosphären nach der dynamischen Kultivierung im Z®RPD-System über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Intensitäten der einzelnen Genexpressionen sind relativ zu der gemessenen Intensität von GAPDH (*house keeping* Gen), welches als Linie dargestellt ist.

Die Genexpressionsanalyse der Zellen (Abbildung 4-58) nach der dynamischen Kultivierung zeigt eine Expression der Gene Kollagen I, BMP-4, BSP-2, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin. Auffällig bei der Analyse war, dass in der Probe aus Bioreaktor 1 Kollagen I, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin deutlich höher reguliert waren, als die Zellen aus den übrigen Bioreaktoren. Auch die Zellen aus Bioreaktor 2 zeigen eine hohe Kollagen I Expression. Insgesamt deutet das Expressionsmuster der Zellen auf eine späte Phase in der Differenzierung hin. Der Nachweis der Expression von Osteocalcin und BSP-2, beides Marker die spät im Verlauf einer osteogenen Differenzierung exprimiert werden, unterstützt die Annahme, dass die Mineralisierungsphase bereits erreicht wurde. Weiterhin wurde die Alkalische Phosphatase im Verhältnis deutlich weniger exprimiert als Osteocalcin. Da die Expression der Alkalischen Phosphatase zu Beginn der Mineralisierungsphase runter reguliert wird und die Alkalische Phosphatase bereits von den Zellen nachweislich synthetisiert wurde, spricht auch dies für eine späte Differenzierungsphase. Auch die nur minimale Expression von BMP-4, welches während der Matrixreifung am stärksten exprimiert wird, unterstützt diese These. Lediglich die hohe Expression von Kollagen I, das früh während der osteogenen Differenzierung exprimiert wird, passt nicht zu den übrigen Ergebnissen.



**Abbildung 4-59:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Zell-Keramik Konstruktes nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet ist eine Probe aus dem Bioreaktor 3. Die Abbildung wurde bei einer 50fachen Vergrößerung aufgenommen.



**Abbildung 4-60:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Zell-Keramik Konstrukten nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 1 (links) und 4 (rechts). Die Bilder wurden bei einer 500fachen Vergrößerung aufgenommen.

Die REM Aufnahmen in Abbildung 4-59 und Abbildung 4-60 bestätigen die Ergebnisse der Übersichtsfärbungen. Die Keramiken sind mit einem zusammenhängenden Zellrasen bewachsen, in dem die Zellen in die extrazelluläre Matrix eingebettet sind. In Abbildung 4-59 ist der Zellrasen mit den, in einer Richtung ausgerichteten, Zellen darin, gut zu erkennen. An den Kanten der Porenöffnungen in der Keramik ist der Zellrasen teilweise gerissen und zeigt Abbruchkanten, dies kann allerdings auch die Probenpräparation nach der dynamischen Kultivierung zurückzuführen sein. Auf den beiden Aufnahmen in

Abbildung 4-60 sind auf dem Zellrasen kleine kugelförmige Knötchen zu erkennen. Diese könnten Calciumeinlagerungen in der extrazellulären Matrix oder Hydroxylapatit sein, was auf ein fortgeschrittenes Stadium der osteogenen Differenzierung der adMSC hinweisen würde. Weiterhin ist besonders in der linken Aufnahme in Abbildung 4-60 die parallele Ausrichtung der Zellen gut zu erkennen.

#### Fazit

Die Kombination von BMP-2 freisetzenden Mikrosphären mit osteogenem Differenzierungsmedium hat bei den adMSC zu einer fortgeschrittenen Differenzierung geführt. Die Keramiken waren nach der dynamischen Kultivierung mit einer dicken Schicht aus Zellen, die in extrazelluläre Matrix eingebettet waren, bedeckt. Die Mineralisierung der extrazellulären Matrix konnte mit histologischen Färbungen belegt werden. Die Synthese Alkalischer Phosphatase und der Expressionsnachweis typischer Knochenmarker sind weitere Belege für die erfolgreiche Differenzierung.

#### Zusammenfassung und Fazit

Die Menge an Glukose, die die beiden Zellen während den dynamischen Kultivierungen verbraucht haben, variierte zwischen den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Allerdings variierten auch die Zellzahlen, mit denen die verschiedenen Kultivierungen gestartet wurden. Dies ist auf die Vermehrung der Zellen, für die Kultivierungen in den Bioreaktoren, in Wannenstapeln (*cell factory*) zurückzuführen. Die Beobachtung der Zellen in allen Schichten der Wannenstapel mit dem Mikroskop war nicht möglich, und somit ist es nicht immer gelungen den optimalen Zeitpunkt der Zellernte zu bestimmen. Daher wurden die Zellen bei einigen Kultivierungen 1-2 Tage zu früh geerntet und die Zellzahl war geringer, als bei den übrigen Kultivierungen. Die adMSC haben bei der Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium mit im Schnitt ca. 300 mg die größte Menge Glukose verbraucht, was auf eine hohe Zellzahl auf den Keramiken deutet. Diese These wurde durch die Übersichtsfärbungen bestätigt, die Keramiken waren mit einem geschlossenen Zellrasen besiedelt. Die adMSC, die auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® sowohl mit osteogenem Differenzierungsmedium als auch mit Kulturmedium kultiviert worden sind, haben durchschnittlich ca. 220 mg Glukose verbraucht. Dies entspricht prozentual einer Differenz von 30 % zu der

Kultivierung ohne PLGA Mikrosphären. Die Übersichtsfärbungen der beiden Kultivierungen zeigten allerdings Unterschiede bezüglich der Besiedlungsdichte der Keramiken. Die Zellen, die in Kulturmedium ohne osteogene Zusätze kultiviert wurden, wiesen eine inhomogene Besiedlung der Keramiken auf, wobei die Zellen bevorzugt in den Poren der Keramiken gewachsen sind. Die Keramiken der dynamischen Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium hingegen waren komplett mit Zellen besiedelt. Die Übersichtsfärbung dieser Kultivierung ließ sogar darauf schließen, dass die Zelldichte in der Kultivierung höher war, als bei der dynamischen Kultivierung mit osteogenen Zusätzen ohne PLGA Mikrosphären, obwohl dort der Glukoseverbrauch höher war. Die ucMSC hingegen haben in allen drei Kultivierungen deutlich weniger Glukose verbraucht als die adMSC. Während der dynamischen Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium lösten sich die Zellen von den Keramiken teilweise ab. Dies führte zu einem sehr niedrigen Verbrauch an Glukose von ca. 100 mg, was 30 % des Gesamtverbrauchs der adMSC unter identischen Kultivierungsbedingungen entspricht. Bei der Kultivierung der Zellen auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® trat die Problematik des Ablösens der Zellen nicht mehr auf. Dadurch stieg auch der Glukoseverbrauch. Dennoch verbrauchten die Zellen im Durchschnitt nur ca. 150 mg Glukose pro Kultivierung, was im Vergleich zu den adMSC einem geringeren Verbrauch von 30 % entspricht. Die Übersichtsfärbungen zeigten dennoch homogene, wenn auch nicht sehr dicht, mit Zellen besiedelte Keramiken. Durch die Kombination von PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® und osteogenen Zusätzen im Kulturmedium konnte der Glukose Verbrauch der ucMSC nochmals leicht gesteigert werden. Die Zellen verbrauchten ca. 160 mg Glukose während der dynamischen Kultivierung und auch die Übersichtsfärbungen zeigten eine hohe Zelldichte auf den Keramiken, wobei die Zellen bevorzugt in den Poren wuchsen. Dennoch lag auch hier der Verbrauch an Glukose deutlich unter dem der adMSC bei der Kultivierung unter den gleichen Bedingungen.

Alkalische Phosphatase, ein Enzym welches in der Phase des extrazellulären Matrix Aufbaus synthetisiert wird, konnte nur bei drei Kultivierungen eindeutig nachgewiesen werden. Die ucMSC synthetisierten Alkalische Phosphatase auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® unter Zusatz von osteogenen Additiven zum

Kulturmedium. Jedoch wurde AP nur von einem Teil der Zellen synthetisiert, nur vereinzelt waren positiv gefärbte Zellen auf den Keramiken ersichtlich. Die adMSC synthetisierten AP in den dynamischen Kultivierungen auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram®, sowohl bei der Kultivierung ohne als auch mit osteogenen Zusätzen, wobei bei der Kultivierung ohne osteogene Zusätze nur ein sehr kleiner Teil der Zellen AP synthetisierte, während die Kultivierung mit osteogenem Zusatz zu einer sehr hohen AP-Synthese aller Zellen geführt hat.

Die Einlagerung von Calcium in die extrazelluläre Matrix der Zellen, ein Indiz für eine fortgeschrittene Differenzierung der Zellen, wurde bei allen durchgeführten Kultivierungen nachgewiesen, allerdings in unterschiedlichem Maße. Bei der Kultivierung der ucMSC war der Nachweis der Calcium Einlagerung bei Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium und bei der Kultivierung auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® nur schwach positiv. Bei der Kombination aus osteogenem Medium und modifiziertem Sponceram® war die Färbung intensiver, was auf eine vermehrte Einlagerung von Calcium deutet. Die adMSC wiederum zeigten in den drei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen eine intensive Färbung der extrazellulären Matrix, besonders die Kombination von PLGA Mikrosphären und osteogenem Differenzierungsmedium führte zu einer starken Mineralisierung der ECM. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der verschiedenen Kultivierungen bezüglich der Calciumeinlagerung in die extrazelluläre Matrix und der Synthese von Alkalischer Phosphatase zusammengefasst.

**Tabelle 14:** Mineralisierung der ECM und Synthese von AP der Zellen in den verschiedenen Kultivierungen im Drehbettreaktor. Ein positiver Nachweis ist mit +, ein negativer Nachweis mit – gekennzeichnet. (OD: osteogenes Differenzierungsmedium, MP: Mikrosphären)

	OD ucMSC	MP ucMSC	OD+MP ucMSC	OD adMSC	MP adMSC	OD+MP adMSC
Mineralisierung	+	+	++	++	++	+++
AP	+	-	++	n. durchgeführt	+	+++

Obwohl es sehr schwierig ist, anhand eines Genexpressionsmusters den Differenzierungszustand der Zellen festzustellen, da die durchschnittliche Genexpression der gesamten Zellpopulation ermittelt wird, lassen sich dennoch Tendenzen erkennen. Die ucMSC, die in osteogenem Medium kultiviert worden sind,



scheinen sich am Ende der Proliferationsphase zu befinden, während bei den Zellen, die auf PLGA Mikrosphären beladenem Sponceram® unter Zugabe von osteogenen Supplementen kultiviert wurden, Zellen sich noch in der Proliferationsphase befinden, aber auch Zellen bereits das Ende des Matrixaufbaus erreicht haben. Bei den adMSC wiederum deutet die Genexpressionsanalyse auf eine, im Vergleich zu den ucMSC, weiter fortgeschrittene Differenzierung hin. Die Zellen, die in osteogenem Medium und die Zellen, die auf Mikrosphären beladenem Sponceram® kultiviert worden sind, scheinen sich bereits am Ende der Phase des Matrixaufbaus zu befinden. Die Kombination aus Mikrosphären und osteogenem Medium bei der Kultivierung der adMSC hat auch bei der Genexpressionsanalyse die vielversprechendsten Ergebnisse geliefert. Die Zellen scheinen die Mineralisierungsphase bereits erreicht zu haben.

Unter den hier angewendeten Kultivierungsbedingungen ist es gelungen die osteogene Differenzierung der Zellen einzuleiten und ein Knochengewebe herzustellen. Hierbei hat die Kombination von BMP-2 freisetzenden PLGA Mikrosphären und die Zugabe von osteogenen Supplementen bei beiden Zelltypen die vielversprechendsten Ergebnisse geliefert haben. Eine schnellere Differenzierung der Zellen durch die Kombination von osteogenen Supplementen und BMP-2 wurde bereits publiziert.<sup>120</sup> Die adMSC zeigten dabei die besten Ergebnisse in Bezug auf den fortgeschrittenen Differenzierungsgrad der Zellen. Die ucMSC scheinen stärkere Signale von außen in Form osteoinduktiver Supplemente und mechanischer Stimulation zu benötigen, um osteogen zu differenzieren.

Wie schon in den statischen Differenzierungsversuchen gezeigt, weisen die Zellen ein sehr hohes Proliferationspotential auf. Im Gegensatz zu den adMSC, welche einem erwachsenen Spender entnommen wurden, stammen die ucMSC aus der Nabelschnur, also einem sehr jungen Gewebe, was ein höheres Wachstumspotential aufweist als adultes Gewebe. Um erfolgreich eine osteogene Differenzierung der ucMSC einzuleiten, muss gleichzeitig dieses Proliferationspotential eingeschränkt werden. Dies konnte durch die Kombination der mechanischen Stimulation im Drehbettreaktor mit osteoinduktiven Mediumsupplementen und dem Wachstumsfaktor BMP-2 erreicht werden.

Die dynamische Kultivierung von Zellen für das Knochen *Tissue Engineering* unter Nutzung verschiedener Bioreaktorsysteme wurde bereits vielfach publiziert. Poertner et al. haben einen Übersichtsartikel über die notwendigen Informationen, Daten und Kenngrößen publiziert für die Entwicklung eines Bioreaktors, in dem reproduzierbar und kontrolliert Gewebekonstrukte hergestellt werden können.<sup>50</sup> Die dynamische Kultivierung speziell von adMSC und ucMSC auf einem Gerüstmaterial, für die Produktion von Knochenersatzgewebe wurde bisher jedoch kaum publiziert. Arbeiten, die auch am Institut für Technische Chemie entstanden sind, haben sich mit dem Thema beschäftigt. Roeker et al. kultivierten adMSC in einem Z<sup>®</sup>RP Reaktor und konnten sowohl die Expression typischer Knochenmarker als auch die Einlagerung von Calcium in die ECM zeigen.<sup>130</sup> Marten et al. kultivierten ucMSC in einem Z<sup>®</sup>RPD System unter verschiedenen Bedingungen bezüglich der Gasphasenzusammensetzung. Dabei stellten sie fest, dass unter hypoxischen Bedingungen die Proliferation der Zellen stark erhöht war verglichen mit der Zellproliferation unter normoxischen Bedingungen. Die Zellen verbrauchten unter hypoxischen Bedingungen die vierfache Menge an Glukose und bildeten deutlich mehr extrazelluläre Matrix. Die Expression knochenspezifischer Marker wiederum war unter normoxischen Bedingungen stärker. (Zur Publikation eingereicht)

Die reproduzierbare Synthese eines Knochengewebes im Bioreaktor konnte anhand der sechs, unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführten, Kultivierungen nur eingeschränkt belegt werden. In den sechs unterschiedlichen Kultivierungen in jeweils vier parallelen Bioreaktoren konnten jeweils übereinstimmende Ergebnisse gezeigt werden. Bei genauerer Betrachtung allerdings waren Unterschiede zwischen den einzelnen, parallel kultivierten Zell-Keramik Konstrukten erkennbar. In der Bioreaktorkultivierung der adMSC in osteogenem Medium beispielsweise wiesen die Zellen aus dem Bioreaktor 3 eine deutlich stärkere Expression der untersuchten Knochenmarker auf, als die Zellen aus den 3 anderen Bioreaktoren. Auch waren die Calciumeinlagerungen in die ECM auf der Keramik aus diesem Reaktor intensiver als bei den übrigen Proben. Das Bioreaktorsystem sollte in Bezug auf die Reproduzierbarkeit noch optimiert werden.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Selbstregeneration von Knochengewebe ist nur bis zu einer gewissen Größe eines Defektes oder einer Verletzung möglich. Daher sind bei großen Knochenverlusten Transplantationen von allogenen oder xenogenem Material von Nöten. Um diese in Zukunft zu vermeiden und die damit verbundenen Risiken zu umgehen, wird im Bereich des Knochen *Tissue Engineerings* versucht, *in vitro* Knochenersatzgewebe zu züchten, welches in den Knochendefekt eingesetzt werden kann. Dafür werden Zellen auf einem Gerüstmaterial in einer dynamischen Umgebung kultiviert und mit Hilfe von Wachstumsfaktoren und mechanischer Stimulation, hervorgerufen durch die dynamische Kultivierung, in Knochenzellen differenziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das osteogene Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe und der Nabelschnur unter verschiedenen statischen und dynamischen Bedingungen, in Bezug auf ihre Eignung für den Einsatz im *Tissue Engineering*, untersucht. Die Zellen wurden zunächst statisch in zweidimensionaler Umgebung als auch auf verschiedenen 3D-Trägermaterialien kultiviert. Die adMSC zeigten sowohl auf der 2D-Oberfläche als auch auf den 3D-Trägermaterialien eine erfolgreiche Differenzierung. Die ucMSC hingegen konnten in zweidimensionaler Umgebung nicht erfolgreich differenziert werden. Während der Kultivierung auf Sponceram® mit BMP-2 freisetzenden Mikrosphären und unter Zugabe von osteoinduktivem Medium konnten die Zellen erfolgreich osteogen differenziert werden.

Des Weiteren wurden die Auswirkungen mechanischer Stimulation in Form von Dehnungsapplikationen auf die osteogene Differenzierung der Zellen untersucht. Dabei zeigten die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe und der Nabelschnur jedoch teils sehr unterschiedliche Reaktionen auf die zeitlich unterschiedlichen Applikationsmuster, wobei die ucMSC sensitiver auf die mechanische Stimulation reagierten, was besonders bei der Proteinsynthese von Alkalischer Phosphatase und BSP-2 deutlich wurde.

Mit Hilfe eines Bioreaktorsystems, welches über eine eigene Steuereinheit zur Online Überwachung der Kultivierungen verfügt und der Möglichkeit vier Bioreaktoren parallel zu betreiben, wurden die ucMSC und die adMSC auf einer porösen Keramik kultiviert, um *in vitro* ein Knochenersatzgewebe zu produzieren. Dabei wurden verschiedene Kultivierungsbedingungen untersucht. Für beide Zelltypen stellte sich die dynamische Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium, kombiniert mit BMP-2 freisetzenden Mikrosphären beladenem Sponceram® als besonders effektiv heraus. Es wurden dicht bewachsene Konstrukte erhalten, die eine starke Calciumeinlagerung in der ECM aufwiesen. Weiterhin konnte die Expression knochenspezifischer Marker nachgewiesen werden, welche auf Grund ihrer relativen Expressionsstärke auf eine fortgeschrittene Differenzierungsphase deuteten.

Weiterhin haben die hier gezeigten Ergebnissen die Vermutung unterstrichen, dass die ucMSC zum Erreichen der finalen osteogenen Differenzierung eine stärkere Induktion benötigen als die adMSC, z.B. in Form einer Kombination verschiedener Osteogenese-induzierenden Supplementen und einer mechanischen Stimulation. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die in dieser Arbeit verwendeten Zellen aus einer Mischpopulation bestehen, deren Subpopulationen ein unterschiedliches Potential aufweisen bezüglich ihrer Fähigkeit osteogen zu differenzieren. Majore et al. untersuchten aus der Whartonschen Sulze der Nabelschnur isolierte Zellen und identifizierten zwei Subpopulationen, die sich in ihrer Größe unterschieden. Zellen beider Subpopulationen exprimierten typische Stammzellmarker, die Expression war jedoch in der Population der Zellen, die einen kleineren Durchmesser aufwiesen, stärker.<sup>12</sup> Eine Sortierung der in dieser Arbeit verwendeten ucMSC nach ihrer Größe und eine erneute Differenzierung der möglichen Subpopulationen könnten zu einem verbesserten Ergebnis bezüglich der osteogenen Differenzierung führen.

Des Weiteren wurde anhand der gezeigten Kultivierungen in den Bioreaktoren die reproduzierbare Synthese von künstlichem Knochenersatzgewebe untersucht. Im Hinblick auf die klinische Anwendung eines Bioreaktorsystems im Rahmen des *Tissue Engineerings* ist die reproduzierbare Herstellung der künstlichen Knochenkonstrukte von großer Bedeutung. Die Konstrukte müssen für den

klinischen Einsatz unter GMP-Bedingungen (*Good manufacturing practise*) hergestellt werden. In den hier gezeigten, parallel durchgeführten, dynamischen Kultivierungen konnte eine vergleichbare „Qualität“ der Zell-Keramik Konstrukte nicht in vollem Umfang gezeigt werden. Um die klinische Anwendung dieses Bioreaktorsystems voranzutreiben, muss die Online Überwachung des Systems optimiert werden. In den gezeigten Kultivierungen wurde lediglich jeweils in einem Bioreaktor der pH Wert und die Sauerstoffkonzentration gemessen und anschließend in allen Bioreaktoren in gleichem Maße, durch Erhöhung der CO<sub>2</sub> Zufuhr, korrigiert. Weiterhin wurde die Temperatur in den Bioreaktoren nicht direkt gemessen, sondern über die Bestimmung der Temperatur im *Breeder*, in dem sich die Bioreaktoren befanden, geregelt. Für eine klinische Anwendung muss jeder einzelne Bioreaktor über eine Online Überwachung spezifischer Messwerte, wie pH-Wert, Sauerstoffkonzentration und Temperatur, verfügen. Weiterhin sollte über eine Automatisierung der Besiedlung der Trägermaterialien nachgedacht werden, um möglichst geringe Abweichungen beim Einsatz der Zellzahl und eine homogene Verteilung der Zellen beim Besiedeln zu gewährleisten. Erste Arbeiten bezüglich einer GMP konformen Isolierung und Expansion von mesenchymalen Stammzellen zur anschließenden Differenzierung der Zellen wurden bereits publiziert.<sup>131</sup> Im Rahmen dieser Arbeit Knochenersatzgewebe konnte hergestellt werden, was jedoch für die klinische Anwendung optimiert werden muss.

Die Entwicklungen im Bereich des *Tissue Engineerings* haben in den letzten Jahren rasant zugenommen. Auch die Anzahl der Publikationen in den einzelnen Teilbereichen dieses Forschungsgebietes sind stark angestiegen. Die Erforschung der verschiedenen Zellquellen ist dabei weit fortgeschritten. Allerdings bedarf es insbesondere bei den ucMSC weiterer Forschung bezüglich ihres Differenzierungspotentials. Die Zellen verfügen darüber hinaus nämlich über eine sehr geringe Immunogenität, was wahrscheinlich auf ihre Herkunft aus der Nabelschnur zurückzuführen ist. Diese Eigenschaft ist für den Einsatz im Bereich des *Tissue Engineerings* von unschätzbarem Vorteil, da allogene Transplantationen des neu entstandenen Gewebes ohne Immunsuppressiva durchgeführt werden könnten. Ebenso sind in der Fachliteratur zahlreiche Biomaterialien beschrieben, die sich für das *Tissue Engineering* eignen. Dennoch gibt es verschiedene Gründe dafür, dass

*Tissue Engineering* Produkte noch nicht oder nur vereinzelt am Markt verfügbar sind. Zum einen fehlen momentan noch die Möglichkeiten einer ausreichenden Produktion unter GMP-Bedingungen, zum anderen sind 4 Wochen zur Herstellung eines Ersatzmaterials zu lang für den Einsatz in der Therapie, da der Defekt möglichst schnell versorgt werden muss. Außerdem sind derzeit die Zulassungen und auch die Kostenerstattung der Behandlung mit *Tissue Engineering* Produkten Gegenstand intensiver Diskussion, auch auf politischer Ebene. Denkbar wäre z.B. eine kurzzeitige Kultivierung der Zellen auf einem geeigneten Trägermaterial in einem Bioreaktor, um die osteogene Differenzierung zu induzieren und, um die vollständige Ausdifferenzierung der Zellen zur Bildung von neuem Knochengewebe *in vivo* zu ermöglichen.

## 6 Literatur

1. Schmidt-Rohlfing T, Menzel, Pape. Tissue engineering of bone tissue Principles and clinical applications. *SpringerLink*. 2009:785 ff.
2. Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*. 2009;11(4):377-391.
3. Najar M, Raicevic G, Boufker HI, et al. Adipose-tissue-derived and Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells suppress lymphocyte responses by secreting leukemia inhibitory factor. *Tissue Eng Part A*. Nov;16(11):3537-3546.
4. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. Sep 1976;4(5):267-274.
5. Jörn W, Kuhbier BW, Christine Radtke, Peter M. Vogt, Cornelia Kasper, Kerstin Reimers. Isolation, Characterization, Differentiation, and Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*. 2010;123:55-105.
6. Cao C, Dong Y. [Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. Aug 2005;19(8):642-647.
7. Griffiths MJ, Bonnet D, Janes SM. Stem cells of the alveolar epithelium. *Lancet*. Jul 16-22 2005;366(9481):249-260.
8. Ennis J, Sarugaser R, Gomez A, Baksh D, Davies J. Isolation, Characterization, and Differentiation of Human Umbilical Cord Perivascular Cells (HUCPVCs). *Methods Cell Biol*. 2008;86:121-136.
9. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. Sep 19 2003;114(6):763-776.
10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. Apr 2 1999;284(5411):143-147.
11. Fu YS, Shih YT, Cheng YC, Min MY. Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro. *J Biomed Sci*. Sep-Oct 2004;11(5):652-660.
12. Majore I, Moretti P, Hass R, Kasper C. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun Signal*. 2009;7:6.
13. Hatlapatka T, Moretti P, Lavrentieva A, et al. Optimization of Culture Conditions for the Expansion of Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem or Stromal Cell-Like Cells Using Xeno-Free Culture Conditions. *Tissue Eng Part C Methods*. Jan 19.

14. Moretti P, Hatlapatka T, Marten D, et al. Mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissues: primitive cells with potential for clinical and tissue engineering applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*123:29-54.
15. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* Apr 2006;24(4):150-154.
16. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica.* Aug 2006;91(8):1017-1026.
17. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* Jul-Sep 2004;8(3):301-316.
18. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells.* Jun 2007;25(6):1384-1392.
19. Wu LF, Wang NN, Liu YS, Wei X. Differentiation of Wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* Oct 2009;15(10):2865-2873.
20. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* May 2006;24(5):1294-1301.
21. Peng L, Jia Z, Yin X, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* Aug 2008;17(4):761-773.
22. Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg.* May 2008;60(5):538-544.
23. Van Harmelen V, Rohrig K, Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism.* May 2004;53(5):632-637.
24. J.M. Berg JLT, und L. Stryer. Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.* 2003.
25. M. Eblenkamp SN-S, S. Salber, V.R. Jacobs, und E. Wintermantel. Stammzellen. *Medizintechnik.* 2009;4:443-471.
26. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer.* Apr 10 2007;96(7):1020-1024.



27. La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, et al. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol.* Feb 2009;131(2):267-282.
28. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells.* Mar 2006;24(3):781-792.
29. Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, et al. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med.* Dec 2006;18(6):1089-1096.
30. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells.* 2003;21(1):50-60.
31. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317.
32. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* Apr 2007;25(4):818-827.
33. Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 2004;22(7):1330-1337.
34. Hou T, Xu J, Wu X, et al. Umbilical Cord Wharton's Jelly: A New Potential Cell Source of Mesenchymal Stromal Cells for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A.* Feb 18 2009.
35. Ohnishi S, Ohgushi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Int J Hematol.* Jul 2007;86(1):17-21.
36. Fraser JK, Schreiber R, Strem B, et al. Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* Mar 2006;3 Suppl 1:S33-37.
37. Chen MY, Lie PC, Li ZL, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* May 2009;37(5):629-640.
38. Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, et al. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* Oct 2008;17(5):909-916.
39. Kakudo N, Shimotsuma A, Kusumoto K. Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 27 2007;359(2):239-244.

40. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. Apr 1998;47(4):507-514.
41. Hong L, Colpan A, Peptan IA, Daw J, George A, Evans CA. 17-Beta estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng*. Jun 2007;13(6):1197-1203.
42. Hemmrich K, von Heimburg D, Cierpka K, Haydarlioglu S, Pallua N. Optimization of the differentiation of human preadipocytes in vitro. *Differentiation*. Feb 2005;73(1):28-35.
43. Awad HA, Halvorsen YD, Gimble JM, Guilak F. Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng*. Dec 2003;9(6):1301-1312.
44. Feng G, Wan Y, Balian G, Laurencin CT, Li X. Adenovirus-mediated expression of growth and differentiation factor-5 promotes chondrogenesis of adipose stem cells. *Growth Factors*. Jun 2008;26(3):132-142.
45. Estes BT, Wu AW, Storms RW, Guilak F. Extended passaging, but not aldehyde dehydrogenase activity, increases the chondrogenic potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol*. Dec 2006;209(3):987-995.
46. Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. May 5 2006;343(2):644-652.
47. Malladi P, Xu Y, Yang GP, Longaker MT. Functions of vitamin D, retinoic acid, and dexamethasone in mouse adipose-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng*. Jul 2006;12(7):2031-2040.
48. Kroeze RJ, Knippenberg M, Helder MN. Osteogenic differentiation strategies for adipose-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*. 702:233-248.
49. Bessa PC, Cerqueira MT, Rada T, et al. Expression, purification and osteogenic bioactivity of recombinant human BMP-4, -9, -10, -11 and -14. *Protein Expr Purif*. Feb 2009;63(2):89-94.
50. Portner R, Nagel-Heyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM. Bioreactor design for tissue engineering. *J Biosci Bioeng*. Sep 2005;100(3):235-245.
51. Diederichs S, Roker S, Marten D, et al. Dynamic cultivation of human mesenchymal stem cells in a rotating bed bioreactor system based on the Z RP platform. *Biotechnol Prog*. Nov-Dec 2009;25(6):1762-1771.
52. Sikavitsas VI, Bancroft GN, Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with

- increasing fluid shear forces. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 9 2003;100(25):14683-14688.
53. Ellis J-S, Chaudhuri Bioreactor Systems for Tissue engineering: A four-dimensional challenge. *Springer*. 2005:1-18.
  54. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol*. Feb 2004;22(2):80-86.
  55. Janssen FW, Hofland I, van Oorschot A, Oostra J, Peters H, van Blitterswijk CA. Online measurement of oxygen consumption by goat bone marrow stromal cells in a combined cell-seeding and proliferation perfusion bioreactor. *J Biomed Mater Res A*. Nov 2006;79(2):338-348.
  56. Bancroft GN, Sikavitsas VI, Mikos AG. Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications. *Tissue Eng*. Jun 2003;9(3):549-554.
  57. Frohlich M, Grayson WL, Marolt D, Gimble JM, Kregar-Velikonja N, Vunjak-Novakovic G. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture. *Tissue Eng Part A*. Jan;16(1):179-189.
  58. Li D, Tang T, Lu J, Dai K. Effects of flow shear stress and mass transport on the construction of a large-scale tissue-engineered bone in a perfusion bioreactor. *Tissue Eng Part A*. Oct 2009;15(10):2773-2783.
  59. Ignatius A, Blessing H, Liedert A, et al. [Effects of mechanical strain on human osteoblastic precursor cells in type I collagen matrices]. *Orthopade*. Dec 2004;33(12):1386-1393.
  60. van Griensven M, Diederichs S, Roeker S, et al. Mechanical Strain Using 2D and 3D Bioreactors Induces Osteogenesis: Implications for Bone Tissue Engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. Sep 26 2008.
  61. Jagodzinski M, Drescher M, Zeichen J, et al. Effects of cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Eur Cell Mater*. Apr 16 2004;7:35-41; discussion 41.
  62. Simmons CA, Nikolovski J, Thornton AJ, Matlis S, Mooney DJ. Mechanical stimulation and mitogen-activated protein kinase signaling independently regulate osteogenic differentiation and mineralization by calcifying vascular cells. *J Biomech*. Oct 2004;37(10):1531-1541.
  63. Solvig Diederichs 1 2 \* SB, Anja Peterbauer 1, Cornelia Kasper 2, Thomas Schepfer 2, Martijn van Griensven 1. Application of different strain regimes in two-dimensional and three-dimensional adipose tissue-derived stem cell cultures induces osteogenesis: Implications for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010;94 A(3): 927 - 936.

64. Jagodzinski M, Breitbart A, Wehmeier M, et al. Influence of perfusion and cyclic compression on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells in 3-dimensional culture. *J Biomech.* 2008;41(9):1885-1891.
65. Janssen FW, van Dijkhuizen-Radersma R, Van Oorschot A, Oostra J, de Bruijn JD, Van Blitterswijk CA. Human tissue-engineered bone produced in clinically relevant amounts using a semi-automated perfusion bioreactor system: a preliminary study. *J Tissue Eng Regen Med.* Jan;4(1):12-24.
66. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* Jul 2009;17(1):9-26.
67. Coudreuse D, Korswagen HC. The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development.* Jan 2007;134(1):3-12.
68. Nusse R. Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res.* May 2008;18(5):523-527.
69. Mason JO, Kitajewski J, Varmus HE. Mutational analysis of mouse Wnt-1 identifies two temperature-sensitive alleles and attributes of Wnt-1 protein essential for transformation of a mammary cell line. *Mol Biol Cell.* May 1992;3(5):521-533.
70. Ching W, Hang HC, Nusse R. Lipid-independent secretion of a Drosophila Wnt protein. *J Biol Chem.* Jun 20 2008;283(25):17092-17098.
71. Miura GI, Treisman JE. Lipid modification of secreted signaling proteins. *Cell Cycle.* Jun 2006;5(11):1184-1188.
72. Willert K, Brown JD, Danenberg E, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature.* May 22 2003;423(6938):448-452.
73. Gonzalez F, Swales L, Bejsovec A, Skaer H, Martinez Arias A. Secretion and movement of wingless protein in the epidermis of the Drosophila embryo. *Mech Dev.* Aug 1991;35(1):43-54.
74. Bartscherer K, Boutros M. Regulation of Wnt protein secretion and its role in gradient formation. *EMBO Rep.* Oct 2008;9(10):977-982.
75. Eaton S. Retromer retrieves wntless. *Dev Cell.* Jan 2008;14(1):4-6.
76. Belenkaya TY, Wu Y, Tang X, et al. The retromer complex influences Wnt secretion by recycling wntless from endosomes to the trans-Golgi network. *Dev Cell.* Jan 2008;14(1):120-131.
77. Chen MH, Li YJ, Kawakami T, Xu SM, Chuang PT. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev.* Mar 15 2004;18(6):641-659.
78. Panakova D, Sprong H, Marois E, Thiele C, Eaton S. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature.* May 5 2005;435(7038):58-65.

79. Coudreuse DY, Roel G, Betist MC, Destree O, Korswagen HC. Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells. *Science*. May 12 2006;312(5775):921-924.
80. Han C, Yan D, Belenkaya TY, Lin X. Drosophila glypicans Dally and Dally-like shape the extracellular Wntless morphogen gradient in the wing disc. *Development*. Feb 2005;132(4):667-679.
81. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*. Apr 2004;131(8):1663-1677.
82. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810.
83. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci*. Mar 15 2008;121(Pt 6):737-746.
84. Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem*. Jul 22 2005;280(29):26770-26775.
85. Semenov MV, Tamai K, Brott BK, Kuhl M, Sokol S, He X. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol*. Jun 26 2001;11(12):951-961.
86. Mao B, Wu W, Davidson G, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature*. Jun 6 2002;417(6889):664-667.
87. Semenov MV, Zhang X, He X. DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. *J Biol Chem*. Aug 1 2008;283(31):21427-21432.
88. Yamamoto A, Nagano T, Takehara S, Hibi M, Aizawa S. Shisa promotes head formation through the inhibition of receptor protein maturation for the caudalizing factors, Wnt and FGF. *Cell*. Jan 28 2005;120(2):223-235.
89. Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, et al. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell*. Mar 19 2004;116(6):883-895.
90. Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stanek P, Niehrs C, Wu W. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. *Dev Cell*. Oct 2004;7(4):525-534.
91. Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*. May 2006;116(5):1202-1209.
92. Zhang Y, Wang Y, Li X, et al. The LRP5 high-bone-mass G171V mutation disrupts LRP5 interaction with Mesd. *Mol Cell Biol*. Jun 2004;24(11):4677-4684.

93. Christina N. Bennett\* KAL, Wendy S. Wright\*, Larry J. Suva†, Timothy F. Lane‡, Kurt D. Hankenson§, MacDougald aOA. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2005;102(9):3324-3329.
94. Kulkarni NH, Onyia JE, Zeng Q, et al. Orally bioavailable GSK-3alpha/beta dual inhibitor increases markers of cellular differentiation in vitro and bone mass in vivo. *J Bone Miner Res.* Jun 2006;21(6):910-920.
95. Philippe Clement-Lacroix\*† MA, Frederic Morvan†, Sergio Roman-Roman\*, Beatrice Vayssiere\*, Cecille Belleville\*, Kenneth Estrera, Matthew L. Warman‡, Roland Baron\*, and Georges Rawadi. Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 2005;102(48):17406-17411.
96. Gong Y, Slee RB, Fukai N, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* Nov 16 2001;107(4):513-523.
97. Kato M, Patel MS, Lévassieur R, et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol.* Apr 15 2002;157(2):303-314.
98. Boyden LM, Mao J, Belsky J, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* May 16 2002;346(20):1513-1521.
99. Ross SE, Hemati N, Longo KA, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science.* Aug 11 2000;289(5481):950-953.
100. Bennett CN, Ross SE, Longo KA, et al. Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem.* Aug 23 2002;277(34):30998-31004.
101. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell.* May 2005;8(5):739-750.
102. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* Aug 2009;5(8):442-447.
103. Li X, Liu P, Liu W, et al. Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat Genet.* Sep 2005;37(9):945-952.
104. Glass DA, 2nd, Bialek P, Ahn JD, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* May 2005;8(5):751-764.
105. Bafico A, Gazit A, Pramila T, Finch PW, Yaniv A, Aaronson SA. Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem.* Jun 4 1999;274(23):16180-16187.

106. Bodine PV, Billiard J, Moran RA, et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 controls osteoblast and osteocyte apoptosis. *J Cell Biochem.* Dec 15 2005;96(6):1212-1230.
107. Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol.* May 2004;18(5):1222-1237.
108. Babij P, Zhao W, Small C, et al. High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res.* Jun 2003;18(6):960-974.
109. Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res.* May 1995;13(3):357-367.
110. Kim IS, Song YM, Cho TH, Kim JY, Weber FE, Hwang SJ. Synergistic action of static stretching and BMP-2 stimulation in the osteoblast differentiation of C2C12 myoblasts. *J Biomech.* Dec 11 2009;42(16):2721-2727.
111. Park JS, Yang HN, Jeon SY, Woo DG, Na K, Park KH. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using RGD-modified BMP-2 coated microspheres. *Biomaterials.* Aug;31(24):6239-6248.
112. Shen H, Hu X, Yang F, Bei J, Wang S. An injectable scaffold: rhBMP-2-loaded poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite microspheres. *Acta Biomater.* Feb;6(2):455-465.
113. Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev.* Oct 13 1997;28(1):5-24.
114. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release.* Jul 31 2003;90(3):261-280.
115. Santavirta S, Konttinen YT, Saito T, et al. Immune response to polyglycolic acid implants. *J Bone Joint Surg Br.* Jul 1990;72(4):597-600.
116. von Burkersroda F, Schedl L, Gopferich A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials.* Nov 2002;23(21):4221-4231.
117. Batycky RP, Hanes J, Langer R, Edwards DA. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. *J Pharm Sci.* Dec 1997;86(12):1464-1477.
118. Owen, Aronow, Shalhoub, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990;143:420-430.

119. Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, et al. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* Oct 1 1999;75(1):22-35.
120. Panetta NJ, Gupta DM, Lee JK, Wan DC, Commons GW, Longaker MT. Human adipose-derived stromal cells respond to and elaborate bone morphogenetic protein-2 during in vitro osteogenic differentiation. *Plast Reconstr Surg.* Feb;125(2):483-493.
121. Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci.* 1998;3(6):346-355.
122. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials.* Oct 2001;22(19):2581-2593.
123. Burger EH, Klein-Nulend J, van der Plas A, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone--their role in mechanotransduction. *J Nutr.* Jul 1995;125(7 Suppl):2020-2023.
124. Sumanasinghe RD, Bernacki SH, Lobo EG. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen matrices: effect of uniaxial cyclic tensile strain on bone morphogenetic protein (BMP-2) mRNA expression. *Tissue Eng.* Dec 2006;12(12):3459-3465.
125. Mullender M, El Haj AJ, Yang Y, van Duin MA, Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction of bone cells in vitro: mechanobiology of bone tissue. *Med Biol Eng Comput.* Jan 2004;42(1):14-21.
126. You J, Yellowley CE, Donahue HJ, Zhang Y, Chen Q, Jacobs CR. Substrate deformation levels associated with routine physical activity are less stimulatory to bone cells relative to loading-induced oscillatory fluid flow. *J Biomech Eng.* Aug 2000;122(4):387-393.
127. Kearney EM, Farrell E, Prendergast PJ, Campbell VA. Tensile strain as a regulator of mesenchymal stem cell osteogenesis. *Ann Biomed Eng.* May;38(5):1767-1779.
128. Huang CH, Chen MH, Young TH, Jeng JH, Chen YJ. Interactive effects of mechanical stretching and extracellular matrix proteins on initiating osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* Dec 15 2009;108(6):1263-1273.
129. Zellwerk G. Betriebsanweisung ZRP Technologie. 2007.
130. Roeker S, Bohm S, Diederichs S, et al. 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 B Appl Biomater.* Apr 28 2009.



131. Grisendi G, Anneren C, Cafarelli L, et al. GMP-manufactured density gradient media for optimized mesenchymal stromal/stem cell isolation and expansion. *Cytotherapy*. Jul;12(4):466-477.
132. Scheler S. Polymermikropartikel. *Pharmazie Lehrbuch*. 2009;Kapitel 1.7.
133. Stangelmayer A. Instruction Manual, Fibox 3-trace v3. *PreSens GmbH*. 2006.
134. Zellwerk G. A Down-Scale Disposable System for the ZRP Technology. 2007.
135. Berridge. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*. 1996;4:14-19.
136. D.A. Scudiero RHS, K.D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T.H. Nofziger, M.J. Currens, D., Seniff uMRB. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res*. 1988;48:4827-4833.
137. Rick H. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 1965:267-268.
138. McGadey J. A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie*. 1970;23(2):180-184.
139. Moriguchi T, Yano K, Nakagawa S, Kaji F. Elucidation of adsorption mechanism of bone-staining agent alizarin red S on hydroxyapatite by FT-IR microspectroscopy. *J Colloid Interface Sci*. Apr 1 2003;260(1):19-25.
140. Puchtler H, Meloan SN. Demonstration of phosphates in calcium deposits: a modification of von Kossa's reaction. *Histochemistry*. Jul 12 1978;56(3-4):177-185.
141. Koburg E, Steinbach E. [Vital staining with toluidine blue for early diagnosis and delineation of malignant laryngeal tumors]. *Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd*. Dec 22 1969;194(2):320-323.
142. B. Glick JP. *Molekulare Biotechnologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 1995.

## 7 Anhang

### 7.1 Statistische Überprüfung von Messwerten

Für die Ergebnisse des MTT-Tests und des AP-Aktivitäts-Tests wurden die Mittelwerte und die Standardfehler berechnet. Für die Berechnung der Standardfehler der mechanischen Stimulationsversuche wurden die Mittelwerte von jeweils 6 Experimenten verwendet. Die Ergebnisse wurden auf Normalverteilung und gleiche Varianzen getestet, bevor ein studentischer t-Test durchgeführt wurde. Mit Hilfe dieses Tests wurde über die statistische Signifikanz der beobachteten Unterschiede geurteilt, wobei ein signifikanter Unterschied der Ergebnisse bei  $p < 0,05$  angenommen wurde.

Bei den Ergebnissen der PCR wurde der Standardfehler mit Hilfe der Werte der einzelnen Proben für die Expression der GAPDH berechnet.

### 7.2 Verwendete Zellen

Für die Experimente wurden humane primäre mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe und dem Nabelschnurgewebe verwendet. Die mesenchymalen Zellen aus dem Fettgewebe (adMSC) wurden am Österreichischen Roten Kreuz in Linz isoliert. Die Spenderin war zum Zeitpunkt der Isolation 24 Jahre alt, die Zellen wurden bei einer Operation an der Bauchdecke entnommen und isoliert. Die mesenchymalen Stammzellen aus der Nabelschnur (ucMSC) wurden aus der Whartonschen Sulze am Institut für Technische Chemie selber isoliert. Die Nabelschnur wurde dem Institut von Prof. Dr. Hass aus der Frauenklinik der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Direkt nach der Geburt wurde die Schnur zum Transport in eine Antibiotika-haltige Nährlösung überführt.

### 7.2.1.1 Isolierung von adMSC

Die adMSC wurden aus dem Gewebe der Bauchdecke isoliert. Das Fettgewebe wurde zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Kollagenase- Lösung für 60 Minuten bei 37 °C unter starkem Schütteln aufgeschlossen. Nach anschließender Zentrifugation (10 Minuten, 1200 *g*) wurde das resultierende Pellet in EL-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die enthaltenen Erythrozyten zu lysieren. Nach Zugabe von PBS wurden die Zellen mit Hilfe eines 100 µm-Nylonnetzes filtriert und in EGM-2 Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 7.2.1.2 Isolierung der ucMSC

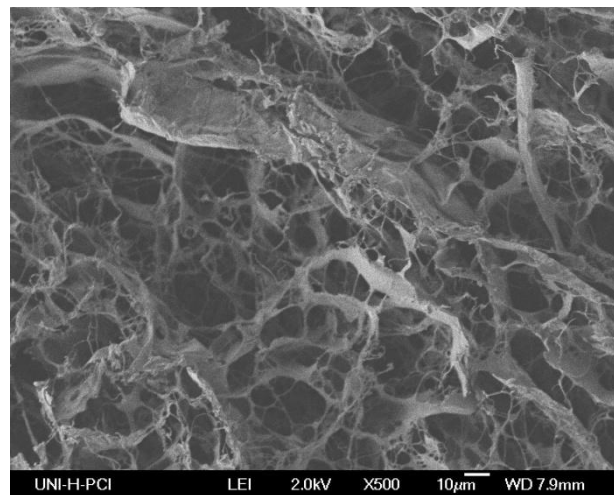
Die Nabelschnur wurde in dem Cord Puffer transportiert und bis zur Präparation im Kühlschrank aufbewahrt. Das gesamte Nabelschnurgewebe (ohne das Entfernen von Blutgefäßen) wurde in ca. 10 cm lange Stücke zerteilt, die mit Hilfe einer Schere und Pinzette in ca. 0,5 cm<sup>3</sup> große Stückchen weiter zerkleinert wurden. Anschließend wurden die Gewebestückchen aus jedem 10 cm-Stück in zwei 75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen überführt, mit 30ml Kulturmedium beschichtet und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nachfolgend wurde der Mediumwechsel 3-mal pro Woche durchgeführt.

Das Auswachsen der Zellen aus dem zerkleinerten Gewebe begann nach ca. 7 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt waren in den Flaschen die ersten vereinzelt, noch sehr kleinen, Zellkolonien zu beobachten. In den darauffolgenden Tagen wurde ein kontinuierlich voranschreitendes Herauswachsen der Zellen aus dem Nabelschnurgewebe registriert. Nach 17 Tagen wurden die Gewebestückchen endgültig verworfen und die zurückgebliebenen Zellen kryokonserviert.

## 7.3 Verwendete Biomaterialien

### 7.3.1 *Matritypt*

Für die mechanischen Stimulationsversuche in einer dreidimensionalen Umgebung wurde Matritypt als Gerüst für die Zellen verwendet. Matritypt wird von der Firma Dr. Suwelack Skin & Health Care AG produziert und vertrieben. Es besteht aus bovinem Kollagen und kann vom Körper vollständig resorbiert werden. Es besitzt eine fein vernetzte Struktur und ist somit als Gerüstsubstanz für Zellen hervorragend geeignet.



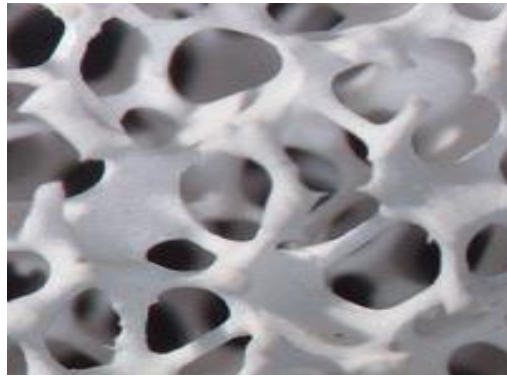
**Abbildung 7-1:** REM- Aufnahme von Matritypt.

### 7.3.2 *Sponceram*<sup>®</sup>

Für die Kultivierungen im Drehbettreaktor und die statischen Kultivierungen in dreidimensionaler Umgebung wurde Sponceram<sup>®</sup> als Gerüstmaterial verwendet. Dieses auf Aluminiumoxid basierende Biomaterial wurde von der Firma Zellwerk GmbH entwickelt. Es ist nicht degradierbar und besitzt eine makroporöse Struktur mit einer mikroporösen Oberfläche. Die Poren weisen eine Größe bis zu 600 µm auf.

Tabelle 15: Eigenschaften von Sponceram®

Sponceram	Al 160-30-130Al
Porösität	30ppi
Dichte der Keramikscheiben	(Kreisring) 0,69g/cm <sup>3</sup>
BET Oberfläche	1,082m <sup>2</sup> /g (Ø von 4 Proben)

**Abbildung 7-2:** Makroporöse Struktur von Sponceram®

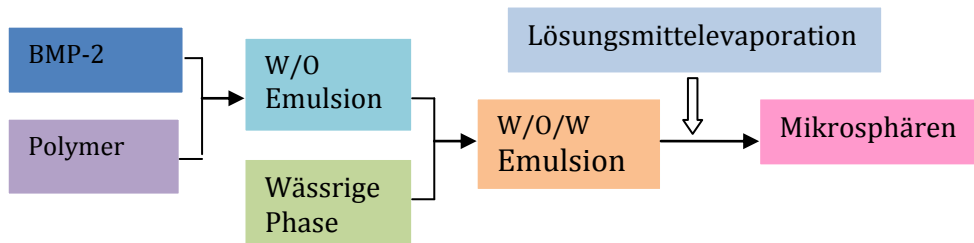
### 7.3.3 Mikrosphären

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikrosphären wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Marcelle Machluf vom Technion in Israel entwickelt. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines *release* Systems für Wachstumsfaktoren und Proteine, die an der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen beteiligt sind.

#### 7.3.3.1 Herstellung der mit BMP-2 beladenen PLGA Mikrosphären

Die mit BMP-2 beladenen PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid)) Mikrosphären wurden durch Lösungsmittelveaporation hergestellt. In diesem Verfahren werden die Polymere zunächst in einer organischen Phase vorgelegt. Der gewünschte Wirkstoff, der in den Mikrosphären eingeschlossen werden soll, in diesem Fall das BMP-2, wird in wässriger Lösung unter Rühren dazugegeben. Dadurch entsteht eine organisch-wässrige Emulsion (W/O). Zu dieser Emulsion wird eine wässrige Lösung gegeben, wodurch sich eine Doppemulsion bildet (W/O/W). Diese Doppemulsion wird nun in eine organische Phase getropft, in der das Lösungsmittel des Polymers löslich ist.

Auf diese Weise wird das Lösungsmittel aus den Emulsionstropfen extrahiert und durch Entzug des Polymer-Lösungsmittels mit z.B. Lyophilisation werden die gebildeten Tröpfchen schließlich in Mikrosphären überführt. Als Emulsionsstabilisator wird während des Prozesses Polyvinylalkohol eingesetzt.<sup>132</sup>



**Abbildung 7-3:** Herstellung von Mikrosphären durch Lösungsmittelveaporation

Die Polymere wurden in L- $\alpha$ -phosphatidilcholin-dichlormethan gelöst, anschließend wurde das BMP-2 in wässriger Lösung zugegeben und die Lösung wurde bei 56 Watt für 30 Sekunden auf Eis sonifiziert, um eine Emulsion herzustellen (W1/O). Unter starkem Rühren wurde eine 1 %ige wässrige PVA (Polyvinylalkohol) Lösung, gesättigt in Dichlormethan, zu der Emulsion gegeben (W1/O/W2). Unter kontinuierlichem Rühren wurde die erhaltene Doppelemulsion in 0,1 %ige, wässrige PVA Lösung getropft. Dazu wurde eine 0,1 %ige PVA Lösung, die mit 10 % 2-Propanol versehen wurde, gegeben und die gesamte Lösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden die erhaltenen Mikrosphären abzentrifugiert, dreimal gewaschen und lyophilisiert.

### 7.3.3.2 Herstellung von Kompositen aus Sponceram® und PLGA Mikrosphären

Die gewünschte Menge an Mikrosphären wurde abgewogen und vorsichtig auf das Sponceram® gegeben. Dabei wurde das Polymer möglichst homogen auf dem Sponceram® verteilt. Anschließend wurde das Sponceram® mit dem Polymer 30 Sekunden dicht über die Flüssigkeitsoberfläche von Dichlormethan gehalten. Vor der Besiedelung mit Zellen wurden die Komposite unter UV Licht sterilisiert.

## 7.4 Material

### 7.4.1 Kulturmedien und Lösungen

#### **$\alpha$ -MEM**

10,08 g  $\alpha$ -MEM Pulver mit 2,2 g Natriumbicarbonat in 1 L ddH<sub>2</sub>O gelöst und sterilfiltriert.

#### **DMEM**

DMEM Pulver mit 37 g Natriumbicarbonat in 10 L ddH<sub>2</sub>O gelöst und mit 1 M HCl ein pH-Wert von 7,2 eingestellt.

#### ***EL-Puffer (Erythrozyten Lysis Puffer)***

154 mM NH<sub>4</sub>Cl; 10 mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM EDTA in ddH<sub>2</sub>O

#### **Kollagenase Lösung für die HuF53 Isolierung**

1,5 mg/mL Kollagenase I; 20 mg/mL BSA; 25 mM HEPES in PBS

#### **Kultivierungsmedium**

$\alpha$ -MEM mit 5 % humanem Serum und Gentamicin (50  $\mu$ g/mL) versetzt.

#### **osteogenes Differenzierungsmedium**

$\alpha$ MEM wurde mit 10 nM Dexamethason, 50 mg/mL  $\alpha$ -Ascorbat, 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat, Gentamicin und 5 % humanem Serum versetzt.

#### **Reduktionsmedium**

$\alpha$ -MEM mit 1 % humanem Serum und Gentamicin versetzt.

#### ***Transportmedium***

*Cord Puffer (PBS + 0,5 % Glucose + Gentamicin 50  $\mu$ g/mL + Amphotericin 2,5  $\mu$ g/mL + Streptomycin 100  $\mu$ g/mL + Penicillin 100 U/mL))*

**2 × Ladefarbe**

In 9,5 mL Formamid wurden 25 µL 10%iges SDS, 2,5 mg Bromphenolblau, 2,5 mg Xylencyanol FF, 250 µL 1 %iges Ethidiumbromid und 10 µL 0,5 M EDTA gelöst.

**PBS**

0,2 g/L KCl, 0,24 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,42 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 8 g/L NaCl in 1 Liter ddH<sub>2</sub>O gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

**AP-Lösung für die Messung der AP-Aktivität des Zellrasens**

1 Tablette des SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl phosphate in 20 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst.

**AP-Lösung für die Messung der AP-Aktivität im Kulturüberstand**

1 Tablette des SIGMAFAST™ p-Nitrophenyl phosphate in 5 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst.

**DAPI Stammlösung**

500 µg/mL DAPI in ddH<sub>2</sub>O

**DAPI Färbepuffer**

100 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Nonidet-P40 in ddH<sub>2</sub>O

**MTT-Lösung**

5 mg/mL MTT in 1× PBS gelöst und die Lösung anschließend sterilfiltriert.

**0,06× SSC-Lösung**

3 mL 20× SSC und 1 mL 10 %iges SDS mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt und mit einem 0,22 µm Filter sterilfiltriert.

**1× TAE-Lösung**

50 × TAE-Lösung mit DEPC Wasser 1:50 verdünnt.



**50× TAE-Lösung**

242 g Tris-Base, 57,1 mL Eisessig, 100 mL 0,5 M EDTA pH-Wert 8,0 mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 Liter aufgefüllt.

**TN-Puffer**

1,576 g Tris-HCl und 0,8766 g NaCl in 100 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt und die Lösung mit einem 0,22 µm Filter sterilfiltriert.

**TNB-Puffer**

In 100 mL TN-Puffer bei 60 °C 0,5 g Blocking Reagenz gelöst. Die Lösung anschließend mit einem 0,22 µm Filter sterilfiltriert.

**TNB-G Puffer**

9 mL TNB-Puffer mit 1 mL *Goat* Serum versetzt.

**TNT-Puffer**

15,76 g Tris-HCl, 8,766 g NaCl und 500 µL *Tween 20* in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf 7,5 eingestellt, die Lösung mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 L aufgefüllt und mit einem 0,22 µm Filter sterilfiltriert.

**NaSO<sub>3</sub>-Lösung**

2,09 g KPP (Konzentration: 12mMol/L) und 5 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> in 1 L ddH<sub>2</sub>O gelöst. Der pH-Wert wird mit 50 %iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 8 eingestellt.

**Cacodylatpuffer**

0,2 M Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat in ddH<sub>2</sub>O, pH = 7,3

**Karnovsky-Puffer**

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

## 7.4.2 Geräte und Laborausstattung

**Geräte**

Analysenwaage „Analytik AC 210S“

Biochemischer Analysator

Fibox 3

Fluoreszenzmikroskop

Fluoreszenzplattenlesegerät

Gefrierschneider „HM 560“

Gelstation „Classic™“

Inkubator „Hera Cell 240“

Microplate Reader

Benchmark“Model680”

Phasenkontrastmikroskop

Trockenschrank

P×2 Thermal Cycler

pH-1 mini

Photospektrometer „Multiskan“

Photospektrometer „ND1000“

Pipettierhilfe „Accu Jet® Pro“

Plattenlesegerät

Rasterelektronenmikroskop

Schüttler „Thermomixer comfort“

Speedvac Concentrator „5301“

Sterilbank „Technoflow 2F150- II GS“

Ultraschallbad „super RK510 H“

**Hersteller**

Sartorius AG, Göttingen

YSI 2700 Select™, YSI Incorporated, Yellow Springs, USA

PreSens GmbH, Regensburg

Olympus IX 50 Olympus Corporation, Tokio, Japan

Fluoroskan Ascent Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Microm, Walldorf

Thermo Fisher Science, Inc., Waltham

Heraeus Holding GmbH, Hanau

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Olympus BX 41Olympus Corporation, Tokio, Japan

Memmert GmbH &amp; Co KG, Schwabach

Thermo Fisher Science, Inc., Waltham

PreSens GmbH, Regensburg

Thermolab Systems, Langenselbold

Nano Drop Technologies, Wilmington

Brand GmbH &amp; Co KG, Wertheim

Absorbance Microplate Reader Model 680

Bio-Rad Laboratories GmbH, München,

Deutschland Multiskan Spektrum Thermo

Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

JSM-6700F

Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf

Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf

Integra Bioscience AG, Zürich

Bandelin electronic, Berlin

UV-Lampe	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Voltmeter "EC105"	Thermo Fisher Science, Inc., Waltham
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zählkammer	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Zentrifuge „centrifuge 5415 R“	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf

### 7.4.3 Verbrauchsmaterialien

#### Materialien

#### Hersteller

Deckgläschen	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Einmalhandschuhe Latex	Semperguard, Semperit AG Holding, Wien
Einmalhandschuhe Nitril	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Einmalpipetten	corning incorporated, Corning, New York
Einmalspritzen, Norm- Ject®	Henkel Sass/ Wolf, Tuttlingen
Non-Invasive oxygen Sensors	PreSens GmbH, Regensburg
Non-Invasive pH Sensors	PreSens GmbH, Regensburg
Objektträger	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Parafilm, „M“ Laboratory Film	American National Can™, Chicago
Pipettenspitzen	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Reagiergefäße 1,5 mL; 2 mL	Sarstedt AG, Nümbrecht
Skalpelle „Chirurgische Einmalpipetten“	Braun Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen
Spritzenvorsatzfilter „Minisart“	Sartorius stedim, Göttingen
Vakuumfilter	Sartolab 0,2 µm Sartorius AG, Göttingen
Wannenstapel	Wannenstapel Easy Fill™Nunc GmbH & Co KG, Langenselbold
96-Well Platten	Sarstedt AG, Nümbrecht
24-Well Platten	Sarstedt AG, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (T 75, T 175)	Sarstedt AG, Nümbrecht

7.4.4 *Verwendete Reagenzien*

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Alexa Fluor 680	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alizarinrot S	Fluka Chemie AG, Buchs,
$\alpha$ -MEM	GIBCO®
AP- Antikörper	Dianova GmbH, Hamburg
$\alpha$ -Ascorbat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
$\beta$ -Glycerolphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs
BMP-2	Prof. Seebald, Würzburg
BMP-2 <i>Immunoassay</i>	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
BSP-2- Antikörper	Immundiagnostik AG, Bensheim
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Collagenase I	Biochrom GmbH, Berlin
DAPI	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München,
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dexamethason-21	
-di-Natrium-Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dichlormethan	Fluka Chemie AG, Buchs
Direktrot 80	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
DMEM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNA ladder "Gene Ruler™"	Fermentas, St. Leon- Rot
dNTPs	Fermentas, St. Leon- Rot
Ethanolamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Formaldehyd	Fluka Chemie AG, Buchs
Gentamicin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glycolid	Boehringer Ingelheim, Biberach
Humanes Serum	Transfusionsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover

Hyaluronidase	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Hybridisierungspuffer	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Lactid	Boehringer Ingelheim, Biberach
Magnesiumchlorid	Promega Cooperation, Madison
Matristypt <sup>®</sup>	Dr. Suwelack Skin & Health Care AG, Billerbeck
MTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumcarbonat	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Natriumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Neg 50 frozen section Medium</i>	Richard-Allan Scientific, Kalamzoo MI
<i>Oligo(dT) Primer</i>	Promega Cooperation, Madison
Pikrinsäurelösung (gesättigt)	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
Polymerase, omni-taq-OLS	omni life science GmbH & Co KG, Hamburg
10 × PCR Puffer	omni life science GmbH & Co KG, Hamburg
PCR Purification Kit "QIAquick <sup>®</sup> "	Qiagen GmbH, Hilden
p-Nitrophenylphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs
PCR Primer	MWG- Biotech AG, Ebersberg
Reverse Transkriptase	Promega Cooperation, Madison
Polyvinylalkohol	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München
RNA tidy G	AppliChem GmbH, Darmstadt
Roti Histokitt	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
5× RT Puffer	Promega Cooperation, Madison
Silicon, Elastosil <sup>®</sup> RT 60 1 A, B	Wacker, Riemerling
SIGMAFAST <sup>™</sup> BCIP <sup>®</sup> /NBT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SIGMAFAST <sup>™</sup> p-Nitrophenyl phosphate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tegaderm <sup>™</sup> Roll	3 M Health Care, Neuss
Texas Red T 862	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Toluidinblau	Fluka Chemie AG, Buchs
Topblock	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

TSA™ *Labeling and Detection Kit*

Perkin Elmer life science, Boston

*Tween 20*

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

*Vectorshield*

Vector laboratories, Burlingame

## 7.5 Methoden

### 7.5.1 Bestimmung der Zellzahl

Das Zählen der Zellen wurde unter dem Mikroskop mit Hilfe eines so genannten Haemocytometers, einem speziellen Objektträger, in den kleine Quadrate eingraviert sind, die ein Raster ergeben, durchgeführt. Wird auf diese Rasterfläche ein Deckgläschen gelegt, beträgt der Abstand zwischen den beiden Glasplatten 0,1 mm. Die eingravierten Quadrate besitzen jeweils eine Fläche von 1 mm<sup>2</sup>. Mit der Anzahl der Zellen in den Quadraten lässt sich so die Anzahl der Zellen pro Milliliter bestimmen, indem die gezählte Anzahl an Zellen mit 10<sup>4</sup> multipliziert wird. Der Objektträger und das Deckgläschen sollten vor dem Zählen sauber sein und das Deckgläschen muss fest auf dem Objektträger sitzen.

Um Zellen zählen zu können, wurden sie mit Hilfe von Accutase aus der Kulturflasche gelöst. Anschließend wurde Kultivierungsmedium zugegeben und gründlich auf- und abpipettiert, um die Zellen zu vereinzeln. 25 µL der Zellsuspension wurden mit 25 µL Trypanblau vermischt und mit einer Pipette wurden 10 µL der gut durchmischten Zelllösung an den Rand des Deckelgläschens pipettiert. Die Flüssigkeit zog durch die Kapillarkräfte sofort zwischen die beiden Glasschichten und unter dem Mikroskop konnte dann die Anzahl der Zellen in den Quadraten bestimmt werden.

## 7.5.2 *Statische Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen*

### 7.5.2.1 Kultivierung mesenchymaler Stammzellen in Kulturplatten

Für die statischen Differenzierungsversuche wurden die Zellen in 24-Well Platten ausplattiert. Pro Well wurden 4000 Zellen/cm<sup>2</sup> verwendet. Die Zellen wurden 28 Tage in osteogenem Medium kultiviert, dabei wurde dreimal pro Woche ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei die Menge an verwendetem Medium so berechnet wurde, dass den Zellen pro Tag 200 µL Medium zur Verfügung stand. Bei jedem Mediumwechsel wurden Proben des entnommenen Mediums gesammelt, um die Konzentration der Alkalischen Phosphatase darin zu bestimmen. Einmal pro Woche wurden Zellen fixiert, um eine Calcein Färbung und eine von Kossa Färbung durchzuführen. Um die Zellen zu fixieren, wurden sie zuvor dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit eiskaltem, absoluten Ethanol überschichtet und 30 Minuten im Eisfach gelagert. Wenn die Färbungen nicht sofort durchgeführt wurden, wurden die Zellen bei 4 °C in PBS gelagert

### 7.5.2.2 Kultivierung mesenchymaler Stammzellen auf verschiedenen Biomaterialien

Die Biomaterialien wurden vor der Besiedlung mit Zellen bei 121 °C für 30 Minuten zur Sterilisation autoklaviert. Die Materialien, die mit Mikrosphären beschichtet wurden, wurden stattdessen 1 h unter UV Licht sterilisiert. Anschließend wurde die Materialien in 24- Well Platten überführt. Pro Stück wurden 50.000 Zellen verwendet, die in 100 µL Medium suspendiert auf die Materialien pipettiert wurden. Anschließend wurden die Biomaterialien 45 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, damit die Zellen auf den Materialien adhäreren konnten. Anschließend wurden 600 µL Medium pro Well zugegeben. Dreimal pro Woche wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei die Menge an verwendetem Medium so berechnet wurde, dass den Zellen pro Tag 300 µL Medium zur Verfügung stand. Die Zellen wurden 28 Tage auf den Materialien kultiviert. Bei jedem Mediumwechsel wurden Proben des entnommenen Mediums gesammelt, um die Konzentration der

Alkalischen Phosphatase darin zu bestimmen. Einmal pro Woche wurden die Zellen auf den Biomaterialien fixiert, um eine von Kossa und Alizarin Rot Färbung durchzuführen. Vor dem Fixieren wurden die besiedelten Materialien dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten durch Zugabe von eiskaltem, absolutem Ethanol fixiert und danach erneut mit PBS gewaschen. Wurden die Färbungen nicht sofort durchgeführt, wurden die Konstrukte mit PBS beschichtet und bei 4 °C gelagert.

### 7.5.3 *Mechanische Stimulation der mesenchymalen Stammzellen*

#### 7.5.3.1 Herstellung der Silikonschalen

Die Silikonschalen wurden aus einem Flüssigsilikon und einem Vernetzer hergestellt. Das Silikon wurde mit dem Vernetzer im Verhältnis 9:1 gemischt und in eine Kunststoffform gegossen. Anschließend wurde die Form mit dem Silikon in eine Vakuumapparatur gegeben und bei 500 mbar 20 Minuten evakuiert, um Luftblasen aus den Schalen zu entfernen. Um das Silikon zu polymerisieren wurde es anschließend über Nacht bei 70 °C in den Ofen gestellt.

#### 7.5.3.2 Herstellung der dreidimensionalen Silikonschalen mit Matristypt® als Kollagen-Netzwerk

Die Silikonschalen wurden wie im Absatz zuvor beschrieben hergestellt. Allerdings wurden diese Schalen ohne Boden gebaut, da dieser aus einer Matristypt® Matrix bestehen sollte und diese sich bei zu langem Kontakt mit flüssigem Silicon mit diesem vollsaugt. Das Matristypt® wurde auf der Unterseite mit einer festen Silikonplatte versehen und mit Hilfe von flüssigem Silicon unter die Schale geklebt. Die Schalen wurden vor dem Ausplattieren der Zellen zur Sterilisation eine Nacht unter UV-Licht gelagert

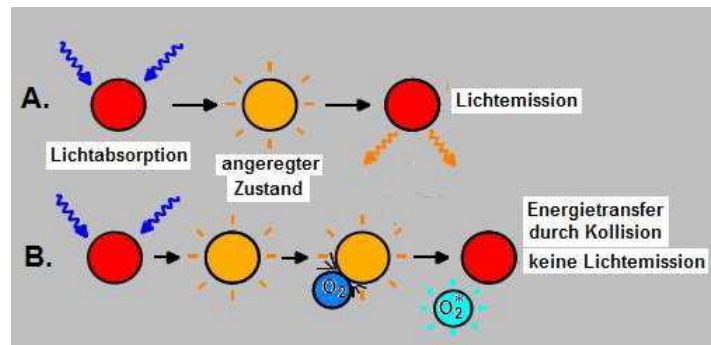




**Abbildung 7-4:** Silikonschale mit eingebautem Kollagen-Netzwerk

### 7.5.3.3 Messung der Sauerstoffkonzentration während der mechanischen Stimulation

Über die Konzentrationen des gelösten Sauerstoffs im Medium können Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität der kultivierten Zellen gezogen werden. Der Sauerstoffgehalt im Kultivierungsmedium wurde in einer Silikonschale mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten optischen Sensorsystems (PreSens GmbH, Regensburg) gemessen. Das Prinzip dieser Messung beruht auf der Verringerung der Fluoreszenzintensität von Fluorophoren (Fluoreszenz-Farbstoffe) in Anwesenheit von Sauerstoff. Der optische Sensor besteht aus einer Matrix, auf der ein Fluoreszenz-Farbstoff immobilisiert ist. Als Fluorophore werden aromatische Kohlenwasserstoffe, Übergangsmetallkomplexe sowie Porphyrine mit Pt (II)- oder Pd (II) als Zentralionen verwendet. Der Sensor wird auf der Innenseite des Kultivierungsbehältnisses fixiert und über eine Glasfaser mithilfe einer LED bei 505 nm angeregt. Gemessen wird die resultierende Emission. Bei Abwesenheit von Sauerstoff wird die absorbierte Energie in Form von Strahlung wieder emittiert. Findet dagegen eine Kollision des angeregten Fluorophors mit einem Sauerstoff-Molekül statt, wird die Energie des absorbierten Photons strahlungslos auf das Sauerstoff-Molekül übertragen. Der Sauerstoff wird von seinem Grundzustand (Triplet-Zustand) in den angeregten kurzlebigen Singulett-Zustand überführt. Der Prozess wird als *quenching* und das Sauerstoff-Molekül als *Quencher* bezeichnet. Die Fluorophore werden dabei entladen und emittieren ein Licht geringerer Intensität, verglichen mit der Intensität der anregenden Strahlung.<sup>133</sup>



**Abbildung 7-5:** Prinzip der dynamischen Stoßlöschung durch Sauerstoff (adaptiert aus: Stangelmayer, 2006)<sup>133</sup>. A: Abwesenheit von Sauerstoff. B: Anwesenheit von Sauerstoff.

Für die Experimente wurden die Stimulationenmaschinen und die Gießform für die Silikonschalen modifiziert. In die Stimulationenmaschinen wurden zwei Löcher gebohrt, durch die die Lichtleiterkabel an die Sensoren angeschlossen werden konnten. Die Löcher dienten gleichzeitig als Fixierung für die Lichtleiterkabel. In den Silikonschalen wurden an einer der kurzen Seiten zwei Vertiefungen eingelassen, so dass an diesen Stellen die Silikonwand nur 2-3 mm dick war und die Intensität der Lichtsignale zwischen Lichtleiterkabel und Sensor ausreichend hoch war, um die gemessenen Werte auszuwerten.

#### 7.5.3.4 Kalibrierung der Sensoren

Die Sauerstoffsensoren wurden in den Silikonschalen kalibriert, nachdem sie mit einem Silikonkleber in die Schalen geklebt wurden. Die Kalibrierung wurde im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> durchgeführt, da dort auch die Stimulationsexperimente durchgeführt wurden. Für die Kalibrierung der Sensoren wurde das Kalibrierungsprogramm der PreSens Software verwendet und eine Zweipunktkalibrierung durchgeführt. Der Nullpunkt der Messung wurde mit Hilfe einer Natriumsulfitlösung bestimmt. Der im Wasser vorhandene Sauerstoff wird durch Sulfit-Ionen unter Ausbildung von Sulfat reduziert und aus dem Gleichgewicht entzogen. Als Wert für die 100 %ige Sauerstoffsättigung wurde ein Kulturmedium vermessen, das über Nacht mit Luft durchströmt wurde. Der 100 % Wert von Sauerstoff entsprach in diesen Messungen also dem Wert von Sauerstoff in der Atmosphäre. Nach der Kalibrierung wurden die Silikonschalen mit dem eingebauten Sensor in 70 %igem Isopropanol sterilisiert.

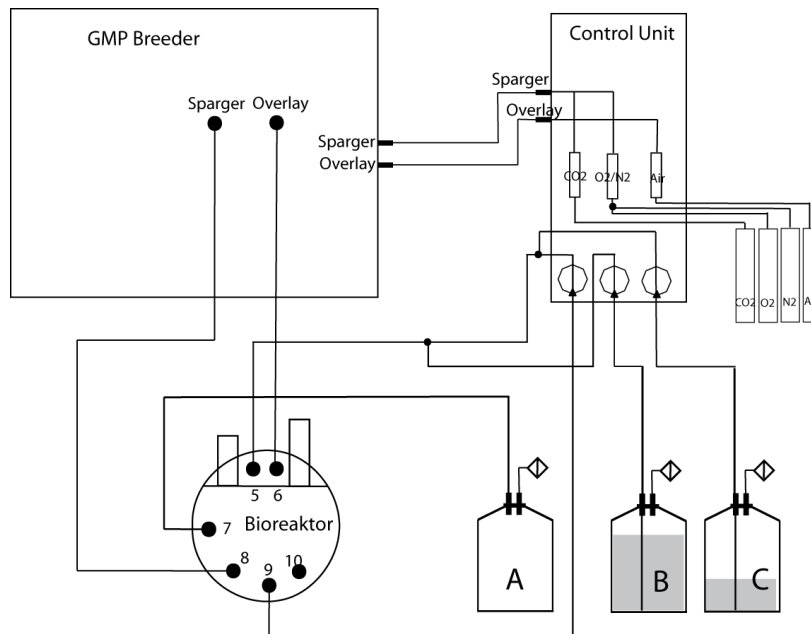
### 7.5.3.5 Ausplattieren der Zellen in den Silikonschalen

Für die Sauerstoffmessungen wurden die mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurgewebe verwendet. Diese wurden acht Tage vor Versuchsbeginn in die Silikonschalen ausplattiert. Dabei wurden 200.000 Zellen pro Silikonschale verwendet. Die Zellen wurden mit 3 mL osteogenem Differenzierungsmedium versehen.

Für die Experimente in dem dreidimensionalen Kollagen-Netzwerk wurden 500.000 Zellen pro Silikonschale verwendet. Um zu gewährleisten, dass die Zellen nicht nur auf der Kollagen-Oberfläche adhären, wurden sie in 1 mL Zellsuspension mit einer Kanüle direkt in das Material eingespritzt. Die Silikonschalen wurden für 45 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um zu gewährleisten, dass die Zellen in dem Matristypt® adhären. Anschließend wurden die Zellen mit 4 mL osteogenem Differenzierungsmedium versehen.

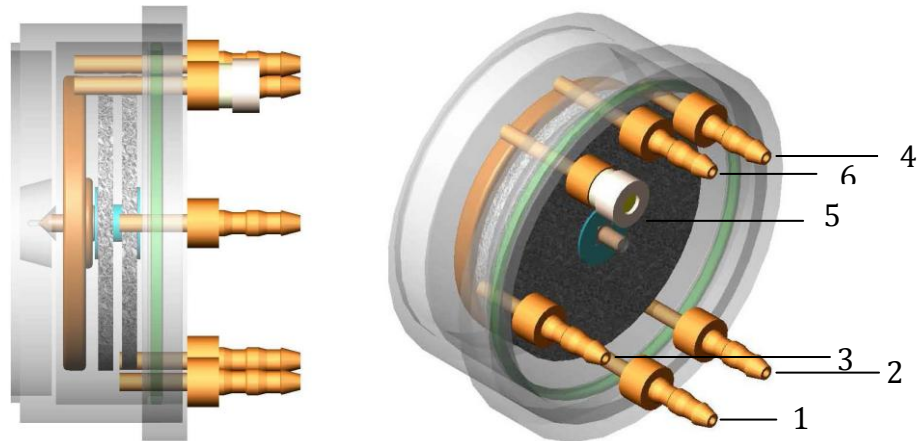
Nach vier Tagen wurde bei allen Experimenten ein Mediumwechsel mit osteogenem Differenzierungsmedium durchgeführt. Nach sieben Tagen wurden die Zellen für 24 h in Reduktionsmedium kultiviert. Anschließend wurde erneut ein Mediumwechsel durchgeführt, den Zellen wurde wieder Differenzierungsmedium zugeführt und das Experiment wurde gestartet. Während des Versuches waren die Schalen mit Tegaderm™ Roll, einem in der Humanmedizin verwendeten Wundpflaster, das vorher eine Nacht unter UV-Licht sterilisiert worden war, zugeklebt, um die Sterilität zu gewährleisten.

### 7.5.4 Dynamische Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen im Drehbettreaktor Z<sup>®</sup>RPD



**Abbildung 7-6:** Schaltbild des Z<sup>®</sup>RPD-Reaktorsystems. A: Flasche für Überlaufmedium, B: Flasche für frisches Medium, C: Flasche für Base, 5: Anschluss Eingang Zirkulation, 6: Anschluss Kopfraumbegasung, 7: Anschluss Überlaufschlauch, 8: Anschluss Gaszufuhr Sparger, 9: Anschluss Ausgang Zirkulation, 10: Blindstopfen (adaptiert aus: Betriebsanweisung Z<sup>®</sup>RPD Technologie)<sup>129</sup>

Vor Beginn der Kultivierung im 4er Z<sup>®</sup>RPD-System wurde die einzelnen Reaktoren mit dem gesamten Schlauchsystem, Septum für die Probenentnahme sowie die Mediumzufuhr- und Abfallflaschen bei 121 °C 30 min autoklaviert. Des Weiteren wurden die Messzellen für die pH- und pO<sub>2</sub>-Elektroden und die O<sub>2</sub>-Elektrode selber unter den gleichen Bedingungen autoklaviert. Die O<sub>2</sub>-Elektrode wurde anschließend zur Polarisation für mindestens 8 Stunden vor Beginn der Kultivierung an die Steuereinheit angeschlossen. Die Probenentnahme-Septen der einzelnen Z<sup>®</sup>RPD und die pH-Elektrode wurden durch Inkubation in 70 %igem Isopropanol über Nacht sterilisiert. Die Elektroden und Pumpen wurden mit Hilfe der Steuereinheit kalibriert. Die CO<sub>2</sub>-Begasung wurde über den Kopfraum der einzelnen Reaktoren durchgeführt.



**Abbildung 7-7:** Technische Zeichnung des Z®RPD-Reaktors, 1: Medienrohr (Anschluss Eingang Zirkulation), 2: Mediendüsenrohr (Anschluss Kopfraumbegasung), 3: Anschluss Überlaufschlauch, 4: Anschluss Ausgang Zirkulation, 5: Blindstopfen, 6: Probenentnahme-Septum (adaptiert aus Betriebsanweisung Z®RPD Produktinformation)<sup>134</sup>

Die Sponceram® Scheiben wurden je nach Experiment in die einzelnen Reaktoren eingebaut und mit autoklaviert oder, bei Kultivierungen im Bioreaktor mit Mikrosphären, einzeln autoklaviert. Wurden keine Mikrosphären in der Bioreaktorkultivierung verwendet, wurden die Sponceram® Scheiben intern besiedelt, indem 1 mL Zellsuspension mit einer langen Kanüle durch das Probeentnahme-Septum direkt in den einzelnen Reaktoren auf die Sponceram® Scheiben getropft wurde. Anschließend wurden, nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten in der die Zellen auf den Keramiken adhärten, die Reaktoren mit Medium befüllt. Bei Kultivierungen auf Kompositen aus Sponceram® und BMP-2 beladenen PLGA Mikrosphären wurden die autoklavierten Sponceram® mit den Mikrosphären beschichtet, wobei pro Scheibe 50 mg Mikrosphären verwendet wurden. Anschließend wurden die Komposite 2 h unter UV Licht sterilisiert und mit Zellen besiedelt. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten wurden die Konstrukte mit Medium versehen und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert. Am nächsten Tag wurden die Konstrukte unter der Sterilwerkbank in die autoklavierten Reaktoren eingebaut und die Bioreaktorkultivierung wurde gestartet.

Nach beendeter Kultivierung wurden die Sponceram®-Scheiben entnommen und für die folgenden Analysen vorbereitet (s. Anhang 7.5.6 ff.). Die Reaktoren wurden zur

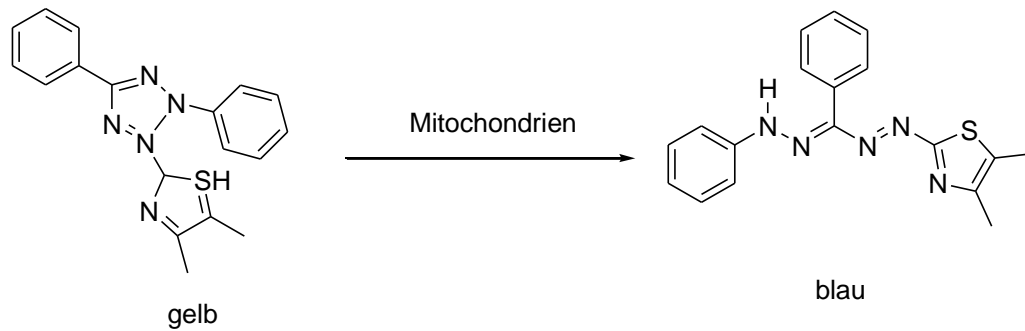
Sterilisation 30 Minuten bei 121 °C autoklaviert und anschließend entleert. Das Z<sup>®</sup>RPD System wurde aus ökonomischen Gründen mehrfach verwendet.

Zur Vorbereitung der Sponceram<sup>®</sup>-Scheiben für die histologischen Färbungen wurde ein Teil der Konstrukte nach der Entnahme aus dem Z<sup>®</sup>RP-System zunächst mit PBS gewaschen und bei -20 °C mindestens 30 Minuten mit absolutem Ethanol fixiert. Vor den jeweiligen Färbungen wurden die Scheiben dreifach mit ddH<sub>2</sub>O oder PBS gewaschen. Für die Isolierung der RNA wurde ein Stück jeder kultivierten Keramik in 10 mL einer Mixtur aus Kollagenase und Hyaluronidase (Kollagenase 200 U/mL, Hyaluronidase 80 U/mL in PBS) 45 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen enthaltende Enzymlösung wurde 5 Minuten bei 200 *g* abzentrifugiert, das erhaltene Pellet wurde mit 1 mL *RNA tidy G* überschichtet und bei -20 °C aufbewahrt. Für die REM Aufnahmen wurde ein Teil der Konstrukte dreimal mit PBS gewaschen und anschließend bei 4 °C in Karnovsky Puffer gelagert. Für die µCT Aufnahmen wurden ein Stück der Scheiben nach dreimaligem Waschen mit PBS in Paraformaldehyd fixiert und in PBS gelagert.

### 7.5.5 Viabilitätsassay

Die Viabilität der Zellen nach der mechanischen Stimulation wurde mit Hilfe eines MTT-Tests gemessen. Das Prinzip des MTT-Tests beruht auf der Messung der mitochondrialen Aktivität der Zellen.

MTT ist ein gelbes wasserlösliches Salz aus der Klasse der Tetrazolium-Salze. In den Mitochondrien lebender Eukaryotenzellen wird das zugegebene MTT von dem Succinat- Tetrazolium-Reduktase-System unter Spaltung des Tetrazolium Ringes in ein violette Formazan-Salz umgewandelt (Abbildung 7-8). Da das MTT-Formazan wasserunlöslich ist, bilden sich in den Zellen Formazan-Kristalle. Durch Natriumdodecylsulfat Zugabe gehen die Formazan-Kristalle in Lösung. Die Absorption des Farbstoffs kann bei 570 nm, dem Absorptionsmaximum des Formazans, photometrisch mit einem Plattenlesegerät bestimmt werden. Die erhaltene Intensität des Farbstoffs entspricht nun der Aktivität der Mitochondrien und kann als relatives Maß für die Viabilität der Zellen angesehen werden.<sup>135</sup>



**Abbildung 7-8:** Reaktion des gelben Tetrazolium-Reagenz zum blauen Formazan in den Mitochondrien (adaptiert aus: Scudiero et al., 1988)<sup>136</sup>.

Nach Beendigung des Versuchs in 2D Umgebung wurden die Zellen mit Accutase aus den Silikonschalen gelöst und in 800  $\mu\text{L}$  Medium resuspendiert. Zur Durchführung des MTT-Tests wurden 50  $\mu\text{L}$  Zellsuspension aus den jeweiligen Schalen in 96 Wellplatten überführt und mit einer Mischung aus 50  $\mu\text{L}$  Medium und 10  $\mu\text{L}$  MTT versehen. Für den Viabilitätstest nach der mechanischen Stimulierung in 3D Umgebung wurde aus der Matristypt<sup>®</sup> Matrix ein kleines Stück ( $\varnothing$  0,9 cm) ausgestanzt und in eine 96-Lochplatte überführt. Jedes Well wurde mit 110  $\mu\text{L}$  MTT-Lösung (10  $\mu\text{L}$  MTT + 100  $\mu\text{L}$  Medium) versehen.

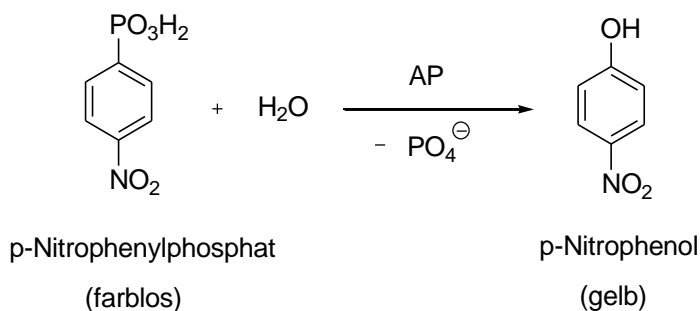
Nach vier Stunden im Inkubator wurde auf jedes Well 100  $\mu\text{L}$  SDS-Lösung gegeben und die Platten wurden über Nacht bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Der Test wurde am nächsten Tag mit Hilfe des Mikroplateraders am Computer ausgelesen

### 7.5.6 Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Die Aktivität der membrangebundenen und freien Alkalischen Phosphatase wurde mit Hilfe eines optisch-kinetischen Tests untersucht (SIGMAFAST<sup>™</sup>). Die Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das in der Lage ist, Phosphatgruppen aus einer Reihe verschiedener Moleküle abzuspalten. Das pH-Optimum der Alkalischen Phosphatase liegt im alkalischen Bereich.

Für die Aktivitätsbestimmung wird die enzymatische Wirkung der AP genutzt. In dem AP-Test wird zu den Zellen das farblose p-Nitrophenylphosphat gegeben, aus diesem entfernt die Alkalische Phosphatase die Phosphatgruppe und es entsteht

gelbes p-Nitrophenol (Abbildung 7-9). Dessen Konzentration kann anschließend bei 405 nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden.<sup>137</sup>



**Abbildung 7-9:** Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat zur p-Nitrophenol

#### 7.5.6.1 Messung der AP Aktivität im Kulturüberstand

Für die Messung der Konzentration von AP im Kulturüberstand wurde das Medium aus den Kulturplatten abgenommen bzw. bei den Kultivierungen im Bioreaktor wurde täglich eine Mediumprobe entnommen, die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der Überstand eingefroren. Die gesammelten Mediumproben wurden in eine 96-Well Platte pipettiert, wobei pro Well 80 µL Probe verwendet wurden. Dazu wurden 20 µL Lösung des SIGMAFast Kits pipettiert. Dabei wurde eine vierfach konzentrierte Stocklösung verwendet (1 Tablette SIGMAFast auf 5 mL ddH<sub>2</sub>O). Die Lösung wurde 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, anschließend wurde die Intensität der Färbung bei 405 nm im Mikroplattenlesegerät vermessen. Es wurde immer eine dreifach-Bestimmung durchgeführt.

#### 7.5.6.2 Messung der Aktivität membrangebundener Alkalischer Phosphatase

Für die Messung der membrangebundenen AP wurde die Zellschicht mit PBS gewaschen und mit 200 µL SIGMAFast kit Lösung inkubiert. Für die Messung wurden 50 µL der Lösung abgenommen und bei 405 nm im Mikroplattenlesegerät vermessen.

Nach den Stimulationsversuchen wurden nach dem Ablösen der Zellen aus den Silikonschalen aus jeder Silikonschale jeweils 50 µL Zellsuspension entnommen, in 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µL AP-Substratlösung versehen. Die



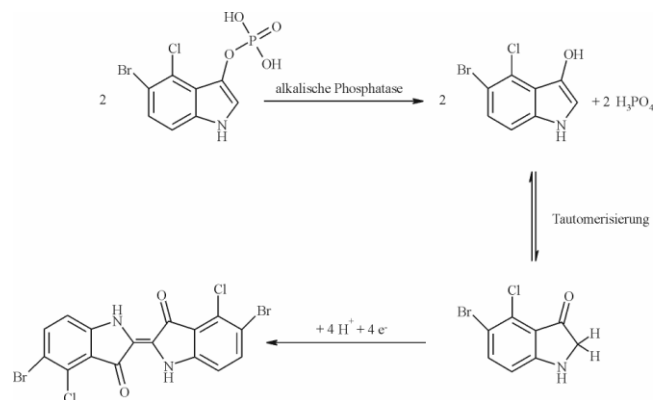
Reaktionsgefäße wurden in einen Thermoschüttler überführt und im Dunkeln bei 37 °C und 400 rpm 3-4 Stunden inkubiert. Die Reaktionszeit wurde genau protokolliert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, je 50 µL vom Überstand in 96 Wellplatte überführt und die Absorption bei 405 nm gemessen.

Bei der mechanischen Stimulation in einem Kollagengerüst, wurde aus dem Matritypt® ein Stück (Ø 0,9 cm) herausgestanzt, in eine 96-Well Platte überführt und mit 200 µL Substratlösung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. 50 µL des Überstands wurden anschließend in eine 96 Wellplatte überführt und die Absorption bei 405 nm gemessen

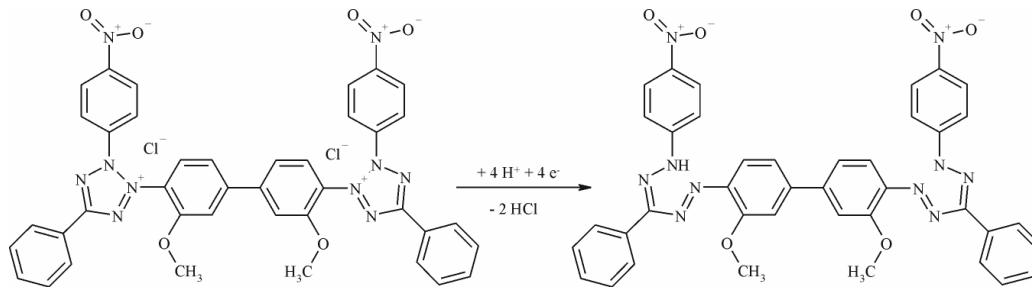
### 7.5.7 Histologische Färbungen

#### 7.5.7.1 Alkalische Phosphatase Färbung

Der histologische Nachweis von alkalischer Phosphatase wurde einer Substratkombination bestehend aus 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) und einem Tetrazoliumsalz, Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) (SIGMAFAST™ BCIP®/NBT), erbracht. Durch enzymatisches Einwirken der alkalischen Phosphatase wird BCIP hydrolysiert. Die daraus resultierende dephosphorylierte Form wird durch Sauerstoff zu einem unlöslichen Indigofarbstoff oxidiert (Abbildung 7-10). Gleichzeitig wird das NBT zu einem blauen Diformazanfarbstoff reduziert (Abbildung 7-11). Beide Farbstoffe zusammen ergeben ein blauvioletttes Produkt.<sup>138</sup>



**Abbildung 7-10:** Hydrolyse von BCIP mit anschließender Oxidation zum unlöslichen Indigofarbstoff



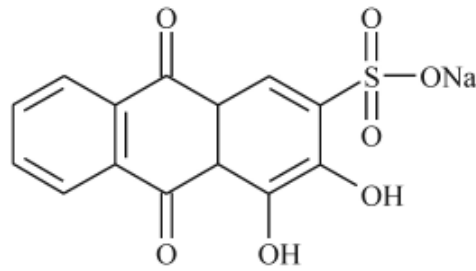
**Abbildung 7-11:** Reduktion von NBT

Zum histologischen Nachweis synthetisierter alkalischer Phosphatase wurden die Biomaterialien dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend 15 – 60 Minuten bei 37 °C in Färbereagenz inkubiert. Der keramische Untergrund wurde durch mehrmaliges Waschen mit ddH<sub>2</sub>O entfärbt.

#### 7.5.7.2 Alizarinrot S Färbung

Alizarinrot S ist ein Antrachinonderivat, das für den Nachweis von Calciumionen verwendet wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode für den Nachweis von Calciumionen in der extrazellulären Matrix verwendet. Bei der Reaktion von Alizarinrot S mit Calciumionen entsteht ein rot gefärbtes Produkt, dessen Struktur noch nicht eindeutig geklärt ist.

Moriguchi et al. schlägt zwei mögliche Strukturen für den an Hydroxylapatit adsorbierten Farbstoff Alizarinrot S vor. Bei der hauptsächlich vorkommenden Salzform bildet sich eine Ionenbindung zwischen den Calciumionen des Hydroxylapatits und den vicinalen 1,2- Hydroxygruppen des Farbstoffs aus. Bei der Chelatform sind die 9-Carboxylgruppe und die 1-Hydroxygruppe an einer Komplexbildung beteiligt (Abbildung 7-12). Dabei können die 2- Hydroxygruppe und die 3-Sulfonsäuregruppe sowohl als freie Säure als auch als Natriumsalz vorliegen. Bei der Salzform trifft dies nur für die Sulfonsäuregruppe zu. In welcher Form beide Gruppen vorliegen, hat nach Moriguchi keinen Einfluss auf das Adsorptionsverhalten des Farbstoffs.<sup>139</sup>



**Abbildung 7-12:** Struktur von Alizarinrot S

Für die Anfärbung der Calciumionen wurden die mit PBS gewaschenen Sponceram®-Scheiben für 15 Minuten in Alizarinrot-Lösung (0,5 % in ddH<sub>2</sub>O) inkubiert. Anschließend wurde mehrmals mit PBS gewaschen, um den keramischen Untergrund zu entfärben

#### 7.5.7.3 Von Kossa-Färbung

Die von Kossa-Färbung wird für den histologischen Nachweis von Calciumverbindungen verwendet und beruht auf einer Reaktion mit Silbernitrat. Der Mechanismus der Reaktion ist nicht abschließend geklärt, jedoch deutet vieles darauf hin, dass Calciumionen in Calciumphosphat oder -carbonat durch Silberionen ersetzt werden. Die Silberionen der resultierenden Salze werden in einer nachfolgenden Reaktion zu metallischem Silber reduziert. Dadurch entsteht eine dunkelbraune bis schwarze Färbung.<sup>140</sup>

Zum Nachweis von Calcium in der extrazellulären Matrix wurden die Sponceram®-Scheiben dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend 30 Minuten unter Lichtausschluß in Silbernitratlösung (5 % in ddH<sub>2</sub>O) inkubiert und wieder dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde mit einer wässrigen 5 %igen Natriumcarbonatlösung, die zusätzlich 0,2 % Formaldehyd enthielt, inkubiert. Je nach Intensität der Färbung wurde die Reaktion durch erneutes Waschen mit ddH<sub>2</sub>O nach ca. 2 Minuten gestoppt. Die Zellen wurden unter dem Phasenkontrastmikroskop fotografiert.

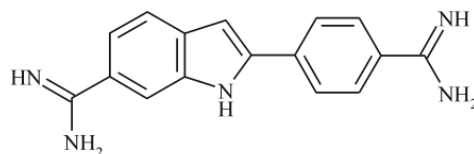
#### 7.5.7.4 Nachweise der Mineralisierung der extrazellulären Matrix mittels Calcein Test

Calcein ist ein Fluorescein-Derivat mit einem Anregungsmaximum von 495 nm (Extinktion) und einem Emissionsmaximum von 515 nm. Es bildet Chelatkomplexe mit Calciumionen in der ECM aus und kann somit als Nachweis für die Mineralisierung der ECM während der osteogenen Differenzierung von Zellen herangezogen werden.

Für die Calcein Färbung wurden die Zellen zunächst mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, mit eiskaltem, absolutem Ethanol fixiert, erneut mit PBS gewaschen und anschließend mit Calcein-Lösung (5 µg/mL in ddH<sub>2</sub>O) über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

#### 7.5.7.5 DAPI-Färbung

Zur Visualisierung der auf den Keramiken adhären Zellen wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. DAPI bindet selektiv an DNA und RNA, wobei sich die Emissionsmaxima der jeweiligen Komplexe unterscheiden. Mit DNA bildet DAPI stark fluoreszierende Komplexe mit hoher Spezifität aus, so dass die Zellkerne fluoreszieren. DAPI wird von fixierten Zellen schnell aufgenommen, Das Absorptionsmaximum der DNA-DAPI Komplexe liegt bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm.



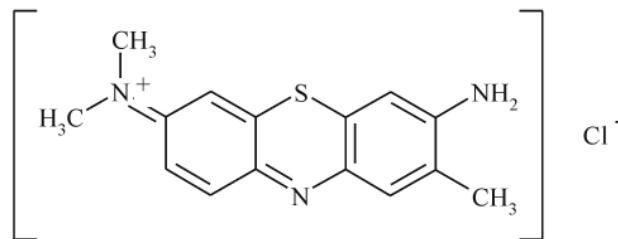
**Abbildung 7-13:** Struktur von 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

Um die Zellkerne anzufärben, werden die auf den Keramiken fixierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 15 Minuten bei 37 °C mit DAPI-Lösung inkubiert (2 µL Stammlösung in Färbepuffer). Anschließend werden die

Keramiken dreifach mit PBS gewaschen und mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

#### 7.5.7.6 Toluidinblau-Färbung

Zur Visualisierung der adhärenierten Zellen kann der basische Thiazinfarbstoff Toluidinblau verwendet werden. Aufgrund seiner Basizität bindet er selektiv an saure Moleküle wie z.B. DNA und RNA.<sup>141</sup>



**Abbildung 7-14:** Struktur von 3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenothiazin-5-iumchlorid (Toluidinblau)

Zur Anfärbung der Zellen werden die dreifach mit PBS gewaschenen Sponceram®-Scheiben 10 Minuten bei Raumtemperatur in Färbelösung (0,1 % Toluidinblau in ddH<sub>2</sub>O) inkubiert. Anschließend werden die Keramiken mehrmals mit PBS waschen, um den Untergrund zu entfärben. Die angefärbten Zellen werden mit dem Auflichtmikroskop betrachtet

#### 7.5.8 Immunfluoreszenz Färbung

##### 7.5.8.1 Präparation der mit Zellen besiedelten Kollagen-Netzwerk für die Immunhistologie

In ein Reagiergefäß (2 mL Volumen) wurde ca. 0,5 mL *frozen section Medium* vorgelegt. In diese Lösung wurde mit Hilfe einer Pipette direkt nach Beendigung des mechanischen Stimulationsexperimentes ein ca. 1 cm<sup>2</sup> Matristypt®-Stück aufrecht

hineingestellt und mit etwas Gel aufgefüllt. Das Reagiergefäß wurde bei  $-80\text{ °C}$  in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Die Matrices wurden direkt vor dem Schneiden mit der Gefrierschneidemaschine (Cryostat) auf  $-20\text{ °C}$  aufgetaut und in  $15\text{ }\mu\text{m}$  dicke Proben geschnitten. Die dünnen Schnitte wurden unmittelbar nach dem Schneiden auf einen Objektträger gebracht und bei  $-20\text{ °C}$  eingefroren.

#### 7.5.8.2 Immunfluoreszenz

Mit der Immunfluoreszenz ist es möglich in Gewebeschnitten bestimmte Proteine in den Zellen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu binden und dadurch sichtbar zu machen. Dafür wurde in diesen Versuchen die indirekte Methode verwendet. Bei dieser Methode bindet zunächst ein unmarkierter Primärantikörper an das Antigen. An diesen Primärantikörper bindet dann ein Sekundärantikörper. Diese Sekundärantikörper sind mit einem Fluorochrom gekoppelt und können so durch Anregung der Fluorochrome sichtbar gemacht werden. Für das BSP-2-Protein wurde als primärer Antikörper monoklonal-Maus-anti-human- BSP-2 verwendet. Für die Alkalische Phosphatase wurde monoklonal-Maus-anti-human-AP verwendet. Als Sekundärantikörper wurde für BSP-2 Anti-Maus gekoppelt an ALEXA862 verwendet und für die Alkalische Phosphatase Anti-Maus gekoppelt an Texas Red 546 verwendet.

Neben den Schnitten, die angefärbt wurden, wurden auch Kontrollschnitte verwendet. Bei den Kontrollschnitten wurde nur der zweite Antikörper auf die Zellen gegeben, um sicherzugehen, dass dieser nicht ohne den ersten Antikörper bindet. Unter dem Mikroskop darf bei diesen Proben nichts zu sehen sein, sonst ist der zweite Antikörper unspezifische Bindungen eingegangen und die Färbung ist nicht aussagekräftig.

Die Schnitte wurden zunächst auf dem Objektträger mit Paraformaldehyd fixiert. Dazu wurde ca.  $200\text{ }\mu\text{L}$  Paraformaldehyd auf den Gefrierschnitt pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit deionisiertem Wasser gewaschen und für vier Minuten mit 0,1 %igem Triton-

X100 demaskiert, um unspezifische Bindungen des ersten Antikörpers zu vermeiden. Dann wurden die Proben wieder dreimal mit deionisiertem Wasser gewaschen und mit ca. 200 µL 2 %iger FCS-Lösung in PBS geblockt. Das Blocken mit FCS ist nötig, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Nach 30 Minuten wurde die Lösung abgenommen und der erste Antikörper aufgetragen. Die Antikörper wurden dafür 1:100 mit 1%iger FCS-Lösung in PBS verdünnt. Auf die Kontrollsnitte wurde eine 1 %ige FCS-Lösung in PBS aufgetragen. Die Proben wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> 1 h inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Proben dreimal mit deionisiertem Wasser gewaschen, um den ersten Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der zweite Antikörper aufgetragen. Diese wurden 1:1000 mit 1 %iger FCS-Lösung in PBS verdünnt. Pro Objektträger wurden 200 µL Lösung verwendet. Die Proben wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit deionisiertem Wasser gewaschen und im Ofen bei 37 °C getrocknet. Auf die trockenen Proben wurde ein Tropfen Vectorshield gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. In dem Vectorshield befand sich zusätzlich DAPI-Lösung zum Färben der Zellkerne. Die Färbungen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 305 nm (DAPI-Färbung), 862 nm (AP-Färbung) und 680 nm BSP-2 -Färbung) fotografiert.

### 7.5.9 RT-PCR

#### 7.5.9.1 RNA-Isolierung

Nach den Stimulationsexperimenten und den Kultivierungen in den Drehbetteaktoren wurde immer eine RT-PCR durchgeführt, um das Expressionsmuster der Zellen nach den Experimenten zu ermitteln. Dazu wurde aus den Zellen der einzelnen Experimente zunächst die RNA isoliert.

Nach den Stimulationsexperimenten wurde das mit Zellen besiedelte Kollagen-Netzwerk direkt nach dem Versuch mit 750 µL RNA *tidy* G versetzt und in einem Reagiergefäß 30 Sekunden homogenisiert. Anschließend wurde die Probe zum Abtrennen von Zelltrümmern, Membranen, Polysacchariden und hochmolekularer

DNA zehn Minuten bei  $12.000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt. Die Probe wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Dissoziation von Nucleoproteinkomplexen zu gewährleisten. Anschließend wurde pro eingesetztem Milliliter RNA *tidy* G 200  $\mu\text{L}$  Chloroform zugegeben, kräftig geschüttelt und erneut 15 Minuten bei  $12.000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die obere RNA-haltige, wässrige Phase wurde abgenommen und in einem neuen Reagiergefäß mit 500  $\mu\text{L}$  Isopropanol vermischt, um die RNA auszufällen. Die Chloroform-Phase und die Protein und DNA enthaltende Interphase wurden verworfen. Die Lösung wurde bei  $12.000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für zehn Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 750  $\mu\text{L}$  75%igem Ethanol (in DEPC-Wasser) gewaschen. Die Lösung wurde homogenisiert und bei  $12.000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet vorsichtig getrocknet und anschließend erneut in 20  $\mu\text{L}$  DEPC-Wasser (0,1 %, pH = 7,5) aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit Hilfe des Photometers. 260 nm und 280 nm

Die RNA der Zellen aus den Bioreaktorkultivierungen wurden nach dem gleichen Verfahren isoliert. Lediglich die Homogenisation zu Beginn wurde nicht durchgeführt.

#### 7.5.9.2 cDNA-Synthese

Aus der isolierten RNA wurde mit Hilfe von oligo(dT) *Primer*, die cDNA der mRNA synthetisiert, um mit dieser dann eine PCR durchzuführen. Die mRNA kann durch eine PCR nicht amplifiziert werden, so dass sie erst durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden muss. Dies erfolgt mit Hilfe eines Enzyms, der Reversen Transkriptase. Um nur die messenger RNA in cDNA umzuschreiben, werden *Oligo-dT-Primer* verwendet, die an den Poly(A)-Schwanz der mRNA-Moleküle binden. Ribosomale sowie andere zellspezifische RNA besitzen diese aus bis zu 200 Adeninresten bestehende Kette am 3'-Ende nicht und werden somit nicht



umgeschrieben. Somit repräsentiert die synthetisierte cDNA nur Gene, die zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung in den Zellen exprimiert wurden.<sup>142</sup>

Die RNA wurde mit 3  $\mu\text{L}$  oligo(dT) *Primer* (100  $\mu\text{M}$ ) versetzt und die Lösung mit DEPC-Wasser auf 21  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Das Gemisch wurde homogenisiert, kurz zentrifugiert und 5 Minuten bei 65 °C denaturiert und anschließend zwei Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden 8  $\mu\text{L}$  5 $\times$  RT-Puffer, 4  $\mu\text{L}$  einer Desoxynucleosidtriphosphat-Mischung (dNTP, 2,5 mM), 6  $\mu\text{L}$  DEPC-Wasser und 1  $\mu\text{L}$  Reverse Transkriptase zugefügt. Die Lösung wurde erneut homogenisiert, kurz zentrifugiert und 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde h fünf Minuten bei 65 °C inkubiert, um die cDNA Synthese zu stoppen.

### 7.5.9.3 RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR können spezifische DNA Sequenzen vervielfältigt werden. Ist die Zielsequenz, die vervielfältigt werden soll, bekannt, können durch *Primerpaare*, die mit dieser Sequenz hybridisieren, Millionen von Kopien der Sequenz angefertigt werden. Eine PCR besteht aus drei Schritten: Strangtrennung, Hybridisierung der *Primer* und DNA-Synthese. Im ersten Schritt werden die beiden Stränge der DNA durch Erhitzen auf 95 °C getrennt. Anschließend folgt die Hybridisierung der *Primer*. Dies erfolgt bei einer niedrigeren Temperatur. Die *Primer* hybridisieren mit den 3'-Enden der Zielsequenzen. Dabei hybridisiert ein *Primer* immer an den gleichen Strang. Darauf folgt die DNA-Synthese. Diese findet bei 72 °C statt, dem Temperaturoptimum der *taq*-Polymerase. Dieses hitzestabile Enzym verlängert nun die *Primer* in Richtung der Zielsequenz.

Bei der Verwendung des goTaq Enzyms wurden 10  $\mu\text{L}$  5 $\times$  PCR-Puffer, 4  $\mu\text{L}$  dNTP-Mix (2,5  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  sense *Primer*, 1  $\mu\text{L}$  antisense *Primer*, 0,25  $\mu\text{L}$  goTaq-Polymerase und 100 ng DNA mit DEPC Wasser auf 50  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Die RT-PCR wurde bei 59 °C durchgeführt. Die Reaktionsmischung wurde nach einem Denaturierungszyklus für die Dauer von 35 Zyklen amplifiziert.

Die Produkte der RT-PCR wurden in einem 1,5 %igem Agarose-Gel ihrer Größe nach aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Bandenstärke wurde densitometrisch (semiquantitativ) mit der alpha digi doc Software ausgewertet.

**Tabelle 16:** Sequenzen der verwendeten Primerpaare für die RT-PCR

Gen	Primer Sequenz	PCR Produkt Größe (bp)
GAPDH	<i>sense:</i> 5'- ACA GTCA GCC GCA TCT TCT T -3'	259
	<i>antisense:</i> 5'- GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG -3'	
Collagen I	<i>sense:</i> 5'- ACG TCC TGG TGA AGT TGG TC -3'	172
	<i>antisense:</i> 5'- ACC AGG GAA GCC TCT CTC TC -3'	
BMP-4	<i>sense:</i> 5'- GCT TCC ACC ACG AAG AAC AT -3'	273
	<i>antisense:</i> 5'- TCA CAT TGT GGT GGA CCA GT -3'	
BSP-2	<i>sense:</i> 5'- CAA CAG CAC AGA GGC AGA AA -3'	262
	<i>antisense:</i> 5'- GAC GCC CGT GTA TTC GTA CT -3'	
Alkaline Phosphatase	<i>sense:</i> 5'- CCA CGT CTT CAC ATT TGG TG -3'	196
	<i>antisense:</i> 5'- AGA CTG CGC CTG GTA GTT GT -3'	
Osteocalcin	<i>sense:</i> 5'- GTG CAG AGT CCA GCA AAG GT -3'	175
	<i>antisense:</i> 5'- TCA GCC AAC TCG TCA CAG TC -3'	

#### 7.5.10 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) werden Objekte mit Hilfe von Elektronenstrahlen vergrößert abgebildet. Ein hochenergetischer, gebündelter Elektronenstrahl rastert die Oberfläche der zu untersuchenden Probe ab. Durch das Auftreffen des Elektronenstrahls (Primärelektronen) auf die Probe wird durch Wechselwirkungen mit der Materialoberfläche ein Spektrum von Elektronen unterschiedlicher Energie emittiert. Diese Sekundärelektronen entstehen durch inelastische Wechselwirkungen der Primärelektronen mit der Atomhülle der Probe. Sie stammen aus einer dünnen Oberflächenschicht, ihre Energie liegt unterhalb von 50 eV. Elektronen mit einer Energie größer als 50 eV werden als Rückstreuelektronen bezeichnet, sie stammen aus tiefer liegenden Bereichen der Probe. Beide Elektronenarten sind entscheidend für die Bildgebung im Rasterelektronenmikroskop. Die Rückstreuelektronen geben eine Auskunft über den Materialkontrast; Sekundärelektronen über die Oberflächentopographie. Der REM-Prozess findet im Hochvakuum statt, um Wechselwirkungen zwischen dem Elektronenstrahl und Atomen und Molekülen in der Luft zu vermeiden.

Um elektronenmikroskopische Aufnahmen der besiedelten Sponceram®-Scheiben machen zu können, wurden kleine Stücke der Keramiken zunächst dreifach mit PBS gewaschen und dann 24 Stunden bei 4 °C in Karnovsky-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreifach mit Cacodylatpuffer gewaschen und bei 4 °C darin eingelegt. Bevor die Proben mit dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet werden konnten, mussten diese vollständig trocken sein. Dazu wurden die Keramiken bei Raumtemperatur 2 Wochen getrocknet. Die Aufnahmen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 2 kV durchgeführt.

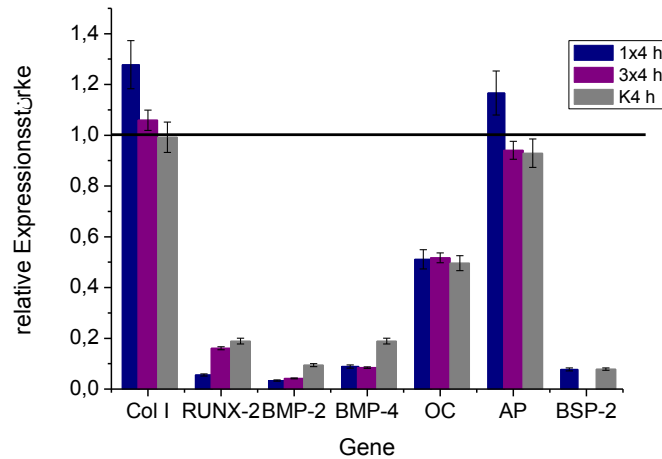
#### *7.5.11 $\mu$ CT Aufnahmen und Hartschliffe*

Um die Mineralisierung der extrazellulären Matrix der im Bioreaktor kultivierten Zellen und deren Wachstum auf dem Sponceram® zu visualisieren, wurden die Zell-Keramik Konstrukte nach Beendigung der Kultivierung dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 24 h zum Fixieren der Zellen auf der Keramik in 4 %iges Para-Formaldehyd eingelegt. Anschließend wurden die Proben erneut mit PBS gewaschen und, in PBS eingelegt, versandt.

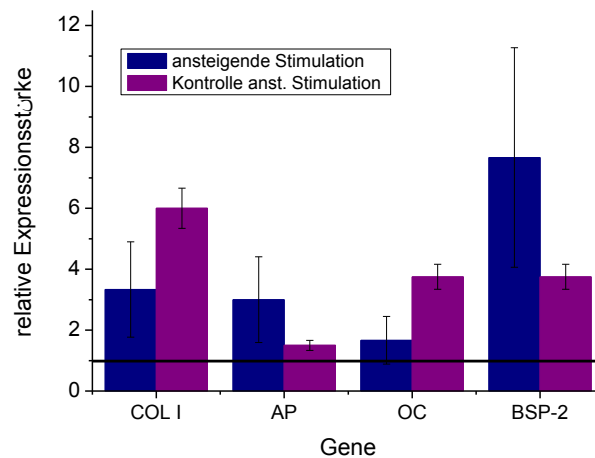
Am Ludwig Boltzmann Institut in Wien wurden die Proben schließlich präpariert und angefärbt, um Mineralisierungszonen zu visualisieren.

## 7.6 Ergebnisse

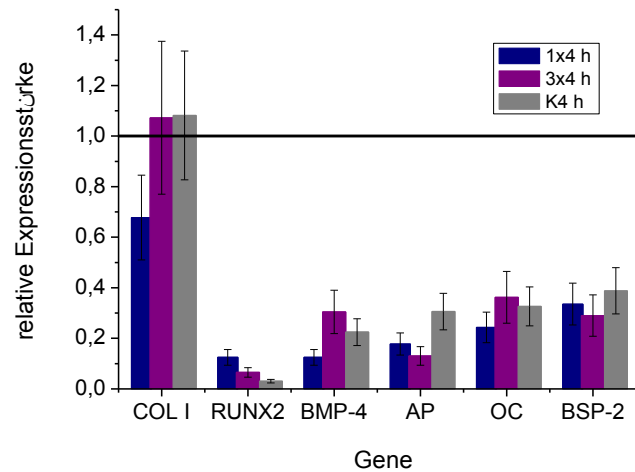
### 7.6.1 Mechanische Stimulation mesenchymaler Stammzellen



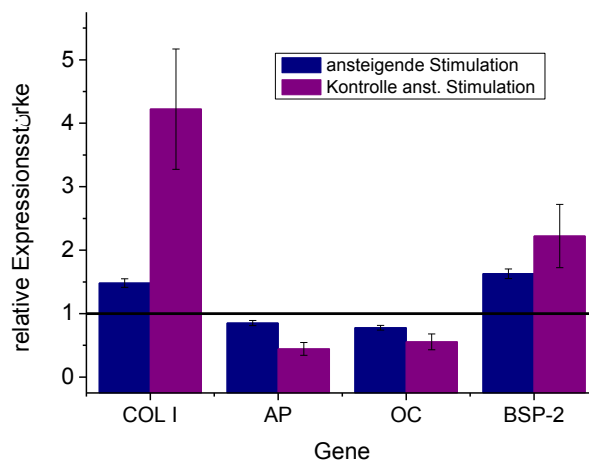
**Abbildung 7-15:** Ergebnis der RT-PCR der adMSC nach einer 4 h Stimulation. Dargestellt sind die biologischen Mittelwerte aus 6 Experimenten  $\pm$  der Standardfehler bezogen auf die Expression von GAPDH, welche als Linie dargestellt ist.



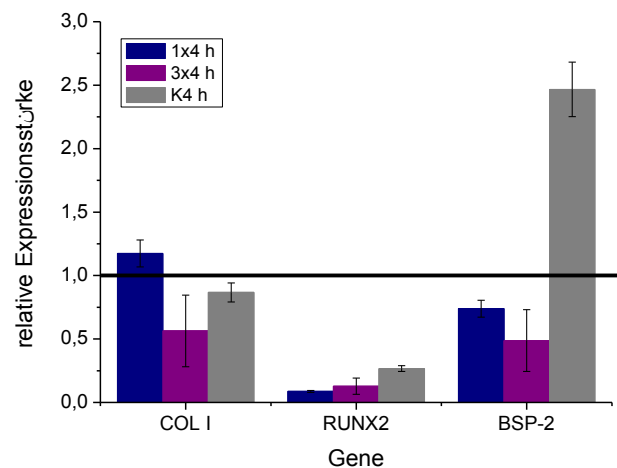
**Abbildung 7-16:** Ergebnis der RT-PCR der adMSC nach einer zeitlich ansteigenden Stimulation. Dargestellt sind die biologischen Mittelwerte aus 6 Experimenten  $\pm$  der Standardfehler bezogen auf die Expression von GAPDH, welche als Linie dargestellt ist.



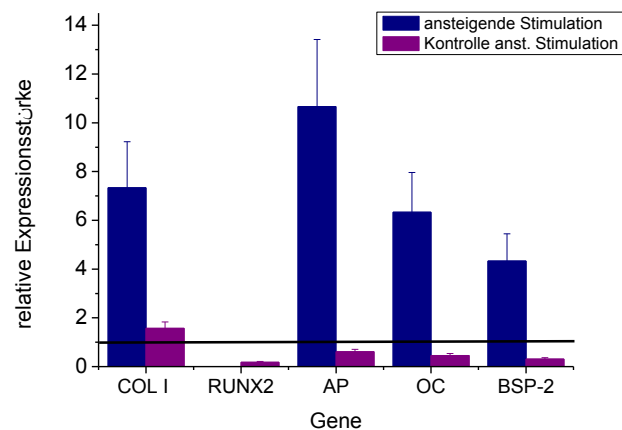
**Abbildung 7-17:** Ergebnis der RT-PCR der UCMSC nach einer 4 h Stimulation. Dargestellt sind die biologischen Mittelwerte aus 6 Experimenten  $\pm$  der Standardfehler bezogen auf die Expression von GAPDH, welche als Linie dargestellt ist.



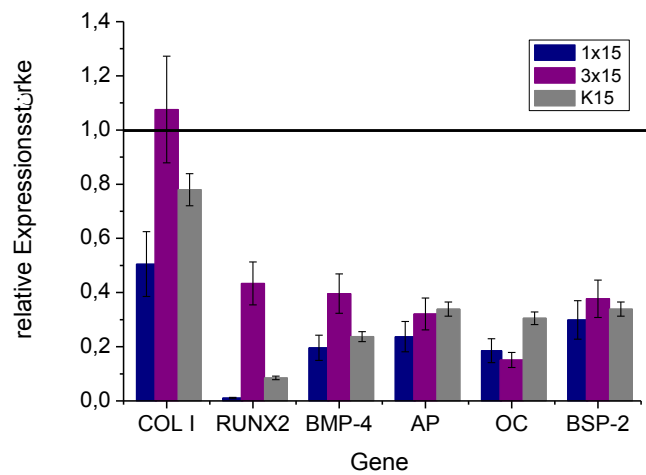
**Abbildung 7-18:** Ergebnis der RT-PCR der UCMSC nach einer zeitlich ansteigenden Stimulation. Dargestellt sind die biologischen Mittelwerte aus 6 Experimenten  $\pm$  der Standardfehler bezogen auf die Expression von GAPDH, welche als Linie dargestellt ist.



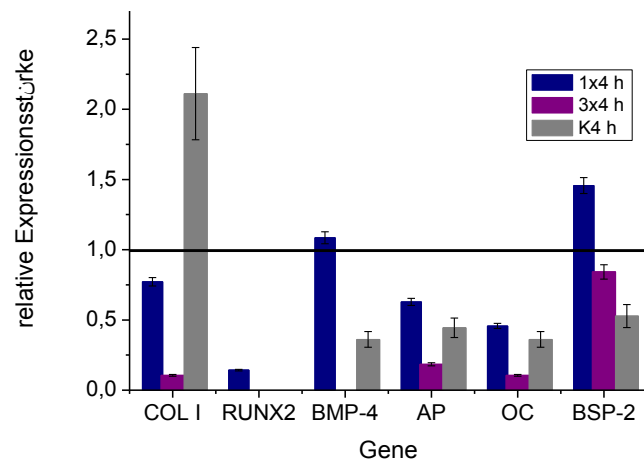
**Abbildung 7-19:** Ergebnis der RT-PCR der adMSC nach einer 4 h Stimulation in einem mit PLGA Mikrosphären beladenem Kollagen-Netzwerk. Dargestellt sind die biologischen Mittelwerte aus 6 Experimenten  $\pm$  der Standardfehler bezogen auf die Expression von GAPDH, welche als Linie dargestellt ist.



**Abbildung 7-20:** Ergebnis der RT-PCR der adMSC nach einer kontinuierlichen Stimulation in einem mit PLGA Mikrosphären beladenem Kollagen-Netzwerk. Dargestellt sind die biologischen Mittelwerte aus 6 Experimenten  $\pm$  der Standardfehler bezogen auf die Expression von GAPDH, welche als Linie dargestellt ist.



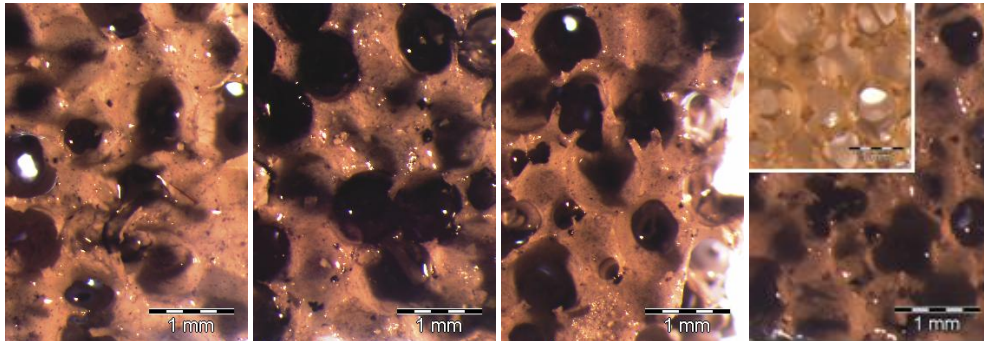
**Abbildung 7-21:** Ergebnis der RT-PCR der UCMSC nach einer 15 Minuten Stimulation in einem mit PLGA Mikrosphären beladenem Kollagen-Netzwerk. Dargestellt sind die biologischen Mittelwerte aus 6 Experimenten  $\pm$  der Standardfehler bezogen auf die Expression von GAPDH, welche als Linie dargestellt ist.



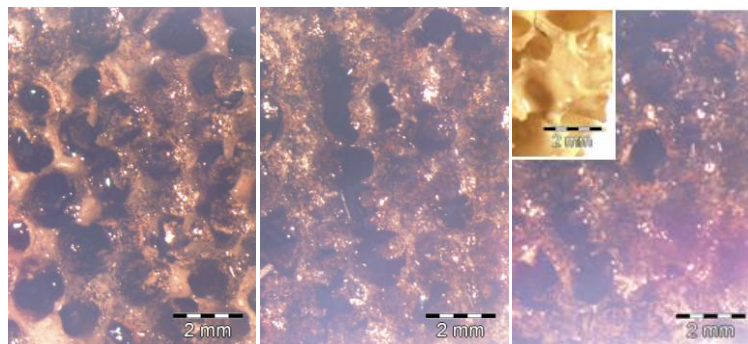
**Abbildung 7-22:** Ergebnis der RT-PCR der UCMSC nach einer 4 h Stimulation in einem mit PLGA Mikrosphären beladenem Kollagen-Netzwerk. Dargestellt sind die biologischen Mittelwerte aus 6 Experimenten  $\pm$  der Standardfehler bezogen auf die Expression von GAPDH, welche als Linie dargestellt ist.

## 7.6.2 Kultivierung mesenchymaler Stammzellen im Bioreaktor

### 7.6.2.1 Kultivierung UcmSC mit osteogenem Differenzierungsmedium

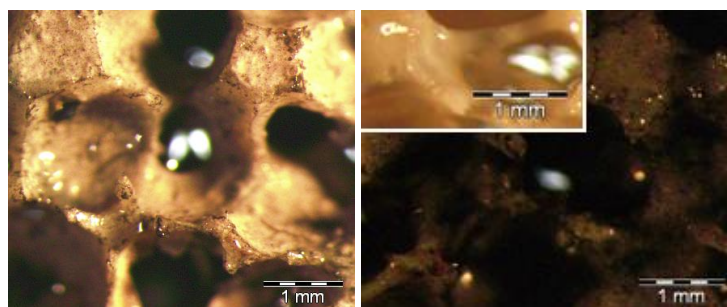


**Abbildung 7-23:** Histologische Färbung der Alkalischen Phosphatase nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 1, 2, 3 und 4 (von links nach rechts). Oben rechts ist der Blindwert abgebildet.



**Abbildung 7-24:** Von Kossa Färbung von Zell-Keramik Konstrukten aus den Bioreaktoren 1 (links), 2 (Mitte) und 4 (rechts) nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Oben rechts ist der Blindwert abgebildet.

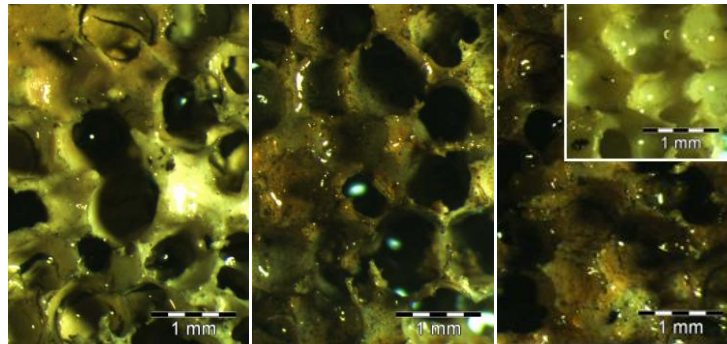
### 7.6.2.2 Kultivierung der UcmSC auf PLGA Mikrosphären beschichtetem Sponceram®



**Abbildung 7-25:** Von Kossa Färbung von Zell-Keramik Konstrukten aus den Bioreaktoren 1 (links), 2 (Mitte) nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung und der Blindwert (oben rechts).



### 7.6.2.3 Kultivierung der UcmSC auf PLGA Mikrosphären beschichtetem Sponceram® mit osteogenem Differenzierungsmedium



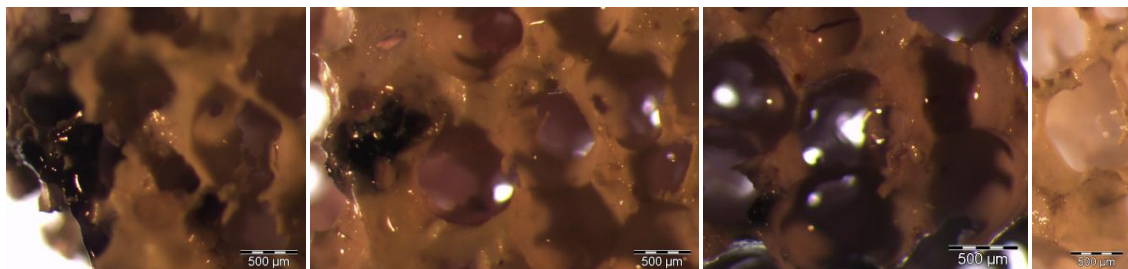
**Abbildung 7-26:** Von Kossa Färbung von Zell-Keramik Konstrukten aus den Bioreaktoren 1 (links), 2 (Mitte) und 3 (rechts) nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Oben rechts ist der Blindwert abgebildet.

### 7.6.2.4 Kultivierung adMSC mit osteogenem Differenzierungsmedium

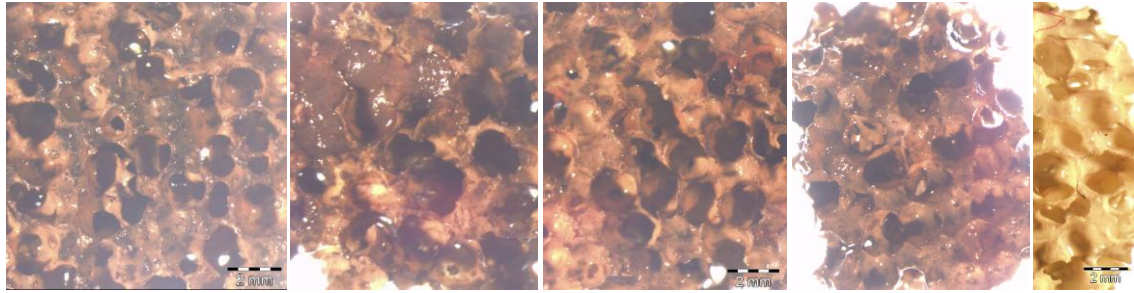


**Abbildung 7-27:** von Kossa Färbung der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 1-4 und der Blindwert (von links nach rechts).

### 7.6.2.5 Kultivierung adMSC auf PLGA Mikrosphären beschichtetem Sponceram®

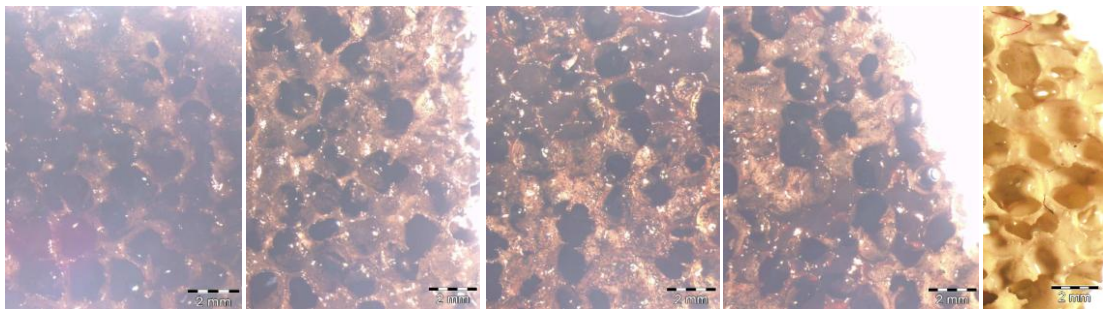


**Abbildung 7-28:** Histologische Färbung der Alkalischen Phosphatase nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung im Bioreaktor. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 2 (links), 3 (Mitte) und 4 (rechts).



**Abbildung 7-29:** von Kossa Färbung der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 1-4 (von links nach rechts).

#### 7.6.2.6 Kultivierung der adMSCauf PLGA Mikrosphären beschichtetem Sponceram® mit osteogenem Differenzierungsmedium



**Abbildung 7-30:** von Kossa Färbung der Zell-Keramik Konstrukte nach 28 Tagen dynamischer Kultivierung. Abgebildet sind Proben aus den Bioreaktoren 1-4 und der Blindwert (von links nach rechts).

## LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name	Stefanie Böhm
Geburtstag	23.03.1983
Nationalität	deutsch

## Schulbildung

1989-1993	Wilhelm Raabe Grundschule, Eschershausen
1993-1995	Wilhelm Raabe Orientierungsschule, Eschershausen
1995-2002	Goethe Gymnasium, Einbeck, Abschluss Abitur

## Studium

2002-2008	Studium der Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
2008-2011	Promotion am Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

PUBLIKATIONSLISTE

**Cell Communication and Signaling, 2011**

*Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC*

R. Hass, C. Kasper, S. Böhm, R. Jacobs

**Journal of Biomedical Material Research: Part A, 2010**

*Application of different strain regimes in two-dimensional and three-dimensional adipose tissue derived stem cell cultures induce osteogenesis; implications for bone tissue engineering*

S. Diederichs, S. Böhm, A. Peterbauer, C. Kasper, T. Scheper, M. van Griensven

**Journal of Biomedical Materials Research: Part B, Applied Biomater., 2009**

*A study on the influence of biocompatible composites with bioactive ligands towards their effect on cell adhesion and growth for the application in Bone Tissue Engineering*

S. Röker, S. Böhm, S. Diederichs, F. Bode, A. Quade, V. Korzhikov, M. van Griensven, T. Tennikova, C. Kasper

**Adv Biochem Eng Biotechnol, 2009**

*Mechanical Strain Using 2D and 3D Bioreactors Induces Osteogenesis: Implications for Bone Tissue Engineering*

M. van Griensven, S. Diederichs, S. Röker, S. Böhm, A. Peterbauer, S. Wolbank, D. Riechers, F. Stahl, C. Kasper

**BIOforum, 2009**

*Kultivierungsstrategien für Stammzellen: Entwicklungen zur Bereitstellung von Zell- und Gewebestrukturen für die regenerative Medizin*

M. Tomala, S. Böhm, C. Kasper

**Biomaterials, Essen, 2008**

*Neue Kollagen- und Keramikbasierte 3D-Biomaterialien für das Tissue Engineering*

S. Röker, S. Diederichs, Y. Stark, S. Böhm, I. Ochoa, J.A. Sanz, J. M. García-Aznar, M. Doblaré, M. van Griensven, T. Scheper, C. Kasper