

**Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert

**Einfluss der Eisenoxidpartikel-Markierung auf das Verhalten von humanen
mesenchymalen Stammzellen (MSZ) auf Polylaktid-Trägern**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Andreas Lutz Heinrich Gerken

aus Mainz

Würzburg, Juli 2013

Referent: Prof. Dr. med. Ulrich Nöth

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 1. August 2014

Der Promovend ist Arzt

Meiner Ehefrau Lea Bergild Annerose Helga gewidmet.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Leukozytenphosphatase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BMP	Bone Morphogenic Protein
Bp	Basenpaare
BSP	Bone Sialo Protein
Cbfa-1	Core Binding Factor Alpha-1
cDNA	Copy (komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
CFU	Colony Forming Units
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL I A2	Kollagen I A2
CT	Computertomographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Foetal Bovine Serum
FCS	Foetal Calf Serum
FDM	Fused Deposition Modeling
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
H/E	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O	Wasser
HA	Hydroxylapatit
HCl	Salzsäure
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
HS	Heparinsulfat
IFP	Iron Fluorescent Particles
IGF	Insulin-like Growth Factor
MDB	Membrane Desalting Buffer
Min	Minute
MRT	Magnetresonanztomographie
MSZ	Mesenchymale Stammzelle
NaCl	Natriumchlorid
OC	Osteokalzin
ON	Osteonektin
OP	Osteopontin
OPLA	Open-Cell Polylactic Acid
O ₂	Sauerstoff
Pa	Pascal (N/m ²)
PBS	Phosphat Buffer Saline
PCL	Polycaprolacton

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDLA	Poly-D-Laktid
PDLLA	Poly-D-L-Laktid
PET	Positronen Emissions Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PGA	Polyglykolid
PLA	Polylaktid
PLGA	Polylaktid-co-Glykolid
PLL	Poly-L-Lysin
PLLA	Poly-L-Laktid
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
S	Sekunde
SD	Standard Deviation
SFF	Solid Freeform Fabrication
SPECT	Single-Photon Emissions Computertomographie
SPIO	Superparamagnetic Iron Oxide Particles
SRM	Standard Response Mean
SZM	Stammzellmedium
TBE	Puffer aus Tris, Borsäure und EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TGF	Transforming Growth Factor
U/min	Umdrehungen pro Minute
USPIO	Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSOP	Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Particles
β -TCP	β -Trikalziumphosphat
μ CT	Mikro-Computertomographie
3DP	Dreidimensionales Printing

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Tissue Engineering.....	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Knochendefekte und Rekonstruktion durch Tissue Engineering	2
1.1.3 Tiermodelle	3
1.2 Stammzellen und Konstrukte	4
1.2.1 MSZ und osteogene Differenzierung	4
1.2.2 Dreidimensionale Trägermaterialien und Konstrukte	8
1.2.3 Zell-Markierungsmethoden und Detektion	12
1.3 Fragestellung und Versuchsaufbau.....	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Humane mesenchymale Stammzellen (MSZ).....	18
2.1.1 Isolierung aus dem Knochenmark und Kultivierung in vitro	18
2.1.2 Ablösung der Zellen und Zellzahlbestimmung	21
2.1.3 VSOP-Markierung der MSZ	21
2.1.4 Aufbereitung der Zellen für die weitere Verwendung	22
2.2 Polylaktid-Scaffolds	23
2.2.1 OPLA-Scaffolds.....	23
2.2.2 Bearbeitung der Polylaktid-Scaffolds	24
2.2.3 Aussähen der Zellen auf die Scaffolds.....	24
2.3 Histologie von MSZ-besiedelten Polylaktid-Scaffolds	25
2.3.1 Konservierungsmethoden der Scaffolds	25
2.3.2 Schneideverfahren	25
2.3.3 Histologische Färbungen	26
2.4 Zellproliferationsmessung.....	27
2.4.1 Quant-iT dsDNA BR Assay Kit.....	27
2.4.2 Zelllyse	28
2.4.3 DNA-Quantifizierung	28
2.4.4 Grafische Darstellung und Statistik	29

2.5 Untersuchung der Zelldifferenzierung.....	30
2.5.1 Osteogene Marker	30
2.5.2 Zelllyse	30
2.5.3 Dispergierung der Proben	31
2.5.4 RNA-Isolierung.....	31
2.5.5 Bestimmung der RNA-Konzentration	32
2.5.6 cDNA-Synthese.....	33
2.5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
2.5.8 Gelelektrophorese.....	35
3. Ergebnisse	37
3.1 Morphologie der zellbesiedelten Konstrukte	37
3.2 Vitalität der MSZ in den Konstrukten.....	42
3.3 Osteogene Differenzierung der MSZ in den Konstrukten.....	44
4. Diskussion	46
4.1 Methodische Überlegungen und Diskussion.....	46
4.1.1 Zellen und Kulturbedingungen	46
4.1.2 Trägermaterial.....	49
4.1.3 Eisenoxid-Markierung	53
4.1.4 Histologische Methoden und Morphologie der Konstrukte.....	56
4.1.5 DNA-Quantifizierung und Vitalität der MSZ in den Konstrukten.....	58
4.1.6 RT-PCR und Differenzierung der MSZ in den Konstrukten	59
4.2 Zukunftsperspektiven	62
5. Zusammenfassung	64
6. Literaturverzeichnis	67
7. Abbildungsverzeichnis	77

1. Einleitung

1.1 Tissue Engineering

1.1.1 Definition

Der Begriff „Tissue Engineering“ bedeutet aus dem Englischen übersetzt „Gewebezüchtung“. Eine in der Literatur oftmals zitierte Definition stammt ursprünglich von Skalak und Fox aus dem Jahre 1988 und wurde durch Langer und Vacanti modifiziert: „Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and the life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain and or improve tissue function“ (Langer und Vacanti, 1993).

Aus dieser Definition geht hervor, dass Tissue Engineering Bestandteil unterschiedlicher Wissenschaften, Forschungsgebiete und Anwendungen ist, darunter auch die der Regenerativen Medizin, die sich mit der „Wiederherstellung oder dem Ersatz der normalen Funktion von erkrankten (menschlichen) Zellen, Geweben oder Organen beschäftigt“ (Mason und Dunnill, 2008). Als Techniken der Regenerativen Medizin sind neben dem Tissue Engineering die Gen- bzw. Zell-Therapie und die Molekulare Medizin etabliert. Die Regenerative Medizin beinhaltet z.B. den Ersatz von Gewebe durch Implantate und Biomaterialien, die Transplantation und den Einsatz von Stammzellen.

Langer und Vacanti haben in einer Veröffentlichung im Jahre 1993 die heute noch gültigen Prinzipien des Tissue Engineering formuliert und definierten drei Grundbestandteile für das Schaffen von künstlichem Gewebe: Zellen, Moleküle und Matrix (Langer und Vacanti, 1993). Ein durch Tissue Engineering hergestelltes Produkt besteht aus vitalen oder avitalen Zellen von humaner oder tierischer Herkunft, deren Produkten und ggf. zur Anzüchtung, Kultur und Differenzierung der Zellen notwendigen Biomaterialien (z.B. Matrix, Scaffolds), Biomolekülen (z.B. Wachstumsfaktoren) und chemischen Substanzen (z.B. Nährmedienzusätze) (Botta und Migliaccio, 2011). Als Zellquellen dienen adulte

oder fetale Gewebe. Meist werden Stammzellen als Grundlage des Tissue Engineering verwendet.

1.1.2 Knochendefekte und Rekonstruktion durch Tissue Engineering

In unterschiedlichen chirurgischen Fächern, die sich mit Knochengewebe beschäftigen, stellt sich die Frage nach alternativen Methoden der Rekonstruktion von Knochendefekten. Knochendefekte entstehen durch unterschiedliche Mechanismen, z.B. ischämisch (idiopathische Knochennekrosen), metabolisch (Osteochondrosis dissecans, Osteomalazie, Osteoporose), resorptiv, traumatisch oder iatrogen (nach Knochenresektion bei Tumorbefall oder Infektion). Neben isolierten Knochendefekten existieren Gelenkknorpeldefekte, welche entweder mit Beteiligung des subchondralen Knochens (osteocondrale Defekte), oder isoliert als Knorpeldefekte (chondrale Defekte) vorkommen (Berner et al., 2010). In der Orthopädie sind die Rekonstruktion von großen segmentalen Knochendefekten (Cancedda et al., 2003; Reichert et al., 2011), die Heilungsoptimierung von Pseudarthrosen oder Wirbelkörperfusionen (Petite et al., 2011) und in der Mund-Kiefer und Gesichtschirurgie die Ersatzplastik von Mandibuladefekten (Lohberger et al., 2012) von großer klinischer Bedeutung.

Der Goldstandard des Knochenersatzes ist die autologe Knochengewebstransplantation, die mit Nachteilen der Morbidität von Donor-Stellen (Blutung, Bluterguss, Entzündung, Schmerz), der limitierten Verfügbarkeit des Materials (Cancedda et al., 2003; Kneser et al., 2006; Petite et al., 2011) und der nicht immer passenden Geometrie des Entnahmematerials an der Empfängerstelle behaftet sind (Schumann et al., 2007). In manchen Fällen stehen Ersatz durch Implantate/Biomaterialien/Prothesen und die Distractionsosteotomie zur Verfügung.

Die Methode des Tissue Engineerings eröffnet alternative Ansätze für die Knochenrekonstruktion, wie z.B. den Knochenersatz durch künstlich hergestellte Knochenmatrix (Trägermaterialien, Scaffolds) oder Konstrukte aus Zellen, Trägermaterialien und/oder Wachstumsfaktoren. Dazu ist die Kultivierung und Differenzierung von Zellen wie z.B. Osteoblasten oder

mesenchymalen Stammzellen (MSZ) in dreidimensionalen Kultursystemen in vitro mit nachfolgender Implantation in den Defekt notwendig.

1.1.3 Tiermodelle

Tiermodelle dienen der Untersuchung einer wissenschaftlichen Fragestellung im Versuchstier, bevor sie im Menschen Anwendung findet. Bezogen auf die Rekonstruktion von Knochendefekten mit Hilfe von Tissue Engineering Konstrukten, werden ektope und orthotopie Tiermodelle unterschieden.

Bei ektopen Tiermodellen erfolgt die Implantation des Konstruktes in ein knochenfremdes Gewebe, z.B. Muskel oder subkutanes Fettgewebe. Sie sind mit geringerem Aufwand durchführbar, jedoch fehlt der charakteristische mechanische Reiz auf das implantierte Gewebe. Dadurch eignen sie sich als Vorversuche zur Etablierung eines Modells (Jones und Yang, 2011). Als Versuchstiere werden häufig Mäuse oder Ratten benutzt (Cancedda et al., 2003).

Bei orthotopen Tiermodellen wird ein artifizieller Knochendefekt durch das Konstrukt ersetzt. Dieses Modell ist realitätsnäher, erfordert jedoch eine entsprechende initiale biomechanische Stabilität des Konstrukts. Besonders die Verbesserung der Heilung von Knochendefekten mit kritischer Größe (critical size bone defects) ist ein wissenschaftlich interessantes Thema. Eine kritische Größe liegt dann vor, wenn der Knochendefekt nicht aus eigener Kraft heilen kann (Reichert et al., 2011). Als Versuchstiere dienen Ratten, Kaninchen, Pferde, Hunde, Schweine und Schafe (Berner et al., 2010; Pearce et al., 2007), wobei Hunde und Schweine bezogen auf den Knochenaufbau die größte Ähnlichkeit mit dem Menschen haben.

In der orthopädischen Forschung werden Schafe und Ziegen immer häufiger als Versuchstiere verwendet, weil das Körpergewicht und das Einwachsen von Knochen in implantierte Biomaterialien mit dem Menschen vergleichbar sind und die Tiere ethisch und praktisch einfacher gehandhabt werden können als Haustiere (Pearce et al., 2007). In aktuellen Publikationen wird die Rekonstruktion von großen Tibia- und Femur-Segmentdefekten durch unterschiedliche Tissue Engineering Konstrukte im Tiermodell als Alternative

zur autogenen Knochen transplantation thematisiert (Cancedda et al., 2003; Vögelin et al., 2005; Reichert et al., 2011). Das bis in den Mikrometerbereich auflösende μ CT bietet eine Möglichkeit, den Heilungserfolg anhand des in das Konstrukt bzw. den Leerdefekt einwachsenden Knochengewebes nicht-invasiv zu überprüfen (Jones et al., 2007).

Neben der Untersuchung von Knochendefekten kritischer Größe werden in der orthopädischen Forschung besonders die Anwendung von MSZ-besiedelten Trägermaterialien (Konstrukte) für die Heilung von Pseudarthrosen, Wirbelkörperfusionen und kranio-maxillofazialen Defekten anhand von Tiermodellen untersucht (Mauney et al., 2005).

1.2 Stammzellen und Konstrukte

1.2.1 MSZ und osteogene Differenzierung

MSZ wurden laut Mauney et al. (2005) zunächst durch Friedenstein und Owen beschrieben (siehe hierzu Friedenstein, 1976; Owen und Friedenstein, 1988), die sie aus dem bindegewebigen Anteil (Stroma) des Knochenmarks von Säugetieren isoliert haben. In der englisch-sprachigen Literatur sind sie unter dem Namen „marrow stromal cells“, „mesenchymal stromal cells“ oder „mesenchymal stem cells“ (MSCs) bekannt. Der Begriff „mesenchymal stromal cells“ betont den heterogenen Charakter von MSZ, die sich nicht nur aus Stammzellen zusammensetzen (Keating, 2006). Die Definition dieser Zellgruppe war zunächst sehr ungenau (Zandstra und Nagy, 2001), bis Pittenger et al. (1999) die bis heute gültigen Charakteristika von MSZ aufstellten:

- (1) Adhärenz an polymere Kunststoffe bei Kultur mit serumhaltigen Nährmedien (FCS, FBS)
- (2) Expression folgender Oberflächenmarker: SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124 und fehlende Expression hämatologischer Stammzellmarker, darunter CD14, CD34 (Lipopolysaccharid-Rezeptor) und CD45 (leukocyte common antigen)

(3) Nachweis der osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierungsfähigkeit in vitro in entsprechenden Nährmedien.

Die drei Oberflächenmarker CD73 (Ecto-5'-Nucleotidase, SH3, SH4), CD90 und CD105 (Endoglin, SH2) werden zur Definition als Minimalkriterien benutzt (Ketating, 2006; Wagner und Ho, 2007). Als Ausschlusskriterien für MSZ werden zusätzlich zu den oben genannten Markern auch CD11 und HLA-DR erwähnt (Keating, 2006; Wagner und Ho, 2007; Lohberger et al., 2012). MSZ wurden nicht nur aus dem Knochenmark, sondern auch aus anderen Kompartimenten des menschlichen Körpers isoliert: aus trabekulärem Knochen (Nöth et al., 2002a), Synovia, Periost, Perizyten, Blut, Haut, Muskel, Fettgewebe (Tuan et al., 2003), Nabelschnur, Plazenta, fetalen Geweben (Keating, 2006), Gehirn, Weisheitszähnen, Bauchspeicheldrüse (Tonti und Mannello, 2008), Darm und Leber (Zandstra und Nagy, 2009).

Die embryologische Abstammung aus dem mittleren Keimblatt, Mesoderm oder Mesenchym, verleiht ihnen den Namen. Im Gegensatz zur totipotenten Zygote, deren Tochterzellen sich in alle menschlichen Körperzellen und die Trophoblastzellen differenzieren können, und zur embryonalen Stammzelle (ESC), deren pluripotente Abkömmlinge Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Entoderm) bilden können (Mitalipov und Wolf, 2009), sind MSZ, wie auch hämatogene Stammzellen (HSCs), multipotent (Tuan et al., 2003; Wagner und Ho, 2007), d.h. sie sind Stammzellen mit beschränkter Differenzierungsfähigkeit. Die Differenzierungsfähigkeit von MSZ bezieht sich hauptsächlich auf das mittlere Keimblatt. MSZ können neben Knochen-, Knorpel- und Fettzellen auch Muskel-, Bänder- und Sehnenzellen (Pittenger, 1999; Mauney, 2005), Nieren- und Herzmuskelzellen sowie Zellen des Ektoderms, z.B. Leber- und Nervenzellen (Wagner und Ho, 2007; Tonti und Mannello, 2008) bilden. Wie jede Stammzelle haben sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Mesenchymale Stammzellen haben eine etwa 500-fache Expansionsmöglichkeit in vitro (Keating, 2006).

In lichtmikroskopischer Betrachtung sind MSZ in Kultur aufgrund ihrer Heterogenität verschieden geformt. Es existieren fibroblastoid (spindelförmig)

wirkende, kleine sowie große, flache Zellpopulationen (Wagner und Ho, 2007). In Abb. 1 ist ein lichtmikroskopisches Bild einer Monolayer-Kultur von humanen MSZ aus dem Knochenmark nach 28-tägiger Kultur in Stammzellmedium (SZM) gezeigt. Hier überwiegen spindelförmige Zellen, die teilweise lange Fortsätze ausbilden. Raimondo et al. (2006) untersuchten die ultrastrukturelle Morphologie von adulten GFP-markierten Ratten-MSZ in Kultur (P6, Tag 18-24) und beschrieben einen radständigen, irregulären Nucleolus, Prominenz der Mitochondrien und des GOLGI-Apparates im Zytoplasma, Dilatationen innerhalb von GOLGI-Apparat und endoplasmatischem Retikulum, sowie pseudopodienartige Zytoplasmaausläufer. Die beiden erstgenannten Punkte stellen insbesondere die Abgrenzung zu Fibroblasten dar und deuten auf eine hohe Proteinbiosyntheseleistung hin.

MSZ stehen im Fokus der Regenerativen Medizin (Tonti und Mannello, 2008; Keating, 2006). Vor allem in der Rekonstruktiven Chirurgie (z.B. Orthopädie, Plastische Chirurgie, Mund-Kiefer und Gesichtschirurgie), in der Kardiologie, Pharmakologie und Immunologie wird der Einsatz von MSZ untersucht. Die therapeutische Anwendung von MSZ in Knorpelersatzmaterialien als Alternative zur autologen Chondrozytentransplantation ist bereits etabliert (Nöth et al., 2007; Khademhosseini et al., 2009). Weitere Forschungsschwerpunkte sind die Anwendung von MSZ zum Knochenersatz und zur Therapie von metabolischen Störungen, sowie Erkrankungen, die mit verminderter Knochenmineralisierung einhergehen, wie die Osteogenesis Imperfecta und Osteoporose (Mauney, 2005; Oreffo et al., 2005; Keating, 2006).

Neuste Erkenntnisse der Forschung sind die Hypoimmunogenität und die immunsupprimierende Wirkung von MSZ in Kokultur mit verschiedenen Zellen des Immunsystems. Ein potentieller Einsatz ist in der Therapie der Graft-versus-Host-Disease (GvHD) zu sehen, bei der es nach allogener Knochenmarktransplantation zur Attacke der Wirtzellen durch die transplantierten Zellen kommt. Hier könnten MSZ eine immunmodulatorische Wirkung auf die transplantierten Zellen ausüben. Hypoimmunogenität bedeutet, dass MSZ durch ein fremdes Immunsystem schlecht erkannt werden. Als Mechanismus wird eine durch Interferon-gamma induzierbare Minderexpression

des MHC I Moleküls angenommen (Keating, 2006). Dies könnte eine allogene MSZ-Transplantation ohne Notwendigkeit einer Immunsuppression ermöglichen. Weitere Anwendungen in der Therapie von Wundheilungsstörungen, Herzinfarkten, Bleomycin-Lungen und Rückenmarksschädigung wurden veröffentlicht (Keating, 2006).

Die Differenzierung von MSZ zu Osteoblasten unter bestimmten Kulturbedingungen wurde erstmals von Friedenstein (1979) beschrieben. Jaiswal et al. (1997) beschäftigten sich näher mit den dazu nötigen Kulturbedingungen und erarbeiteten ein reproduzierbares Protokoll. Durch das Zusetzen von Dexamethason, L-Ascorbat-2-Phosphat und β -Glycerophosphat konnte die Differenzierung von MSZ zu Osteoblasten anhand der Morphologie, des Nachweises einer mineralisierten Matrix und der Genexpression von alkalischer Leukozytenphosphatase (ALP) und Osteokalzin (OC) nachgewiesen werden. Als Promotoren der Osteogenese wurden neben Dexamethason eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren beschrieben, insbesondere FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) und BMP-2 (Bone Morphogenic Protein-2) (Marie und Fromigué, 2006). Durch die osteogene Stimulation kommt es zur Hochregulation von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Cbfa-1 (Core binding factor alpha-1) und Runx2. Osteogen differenzierte MSZ exprimieren sogenannte osteogene Markergene stärker als native MSZ. Als osteogene Markergene gelten, neben ALP und OC auch Osteonektin (ON), Osteopontin (OP), Bone Sialo Protein (BSP) und Kollagen I (COL I) (Nöth et al., 2002a; Tuan et al., 2003; Marie und Fromigué, 2006). Ein unspezifischer Zellaktivitätsmarker ist das Housekeeping Gen EF1 α (Elongationsfaktor 1 α).

In der vorliegenden Arbeit wurden undifferenzierte MSZ verwendet, die aus dem Knochenmark von adulten Patienten isoliert wurden (marrow-derived human mesenchymal stromal cells, mhMSC).

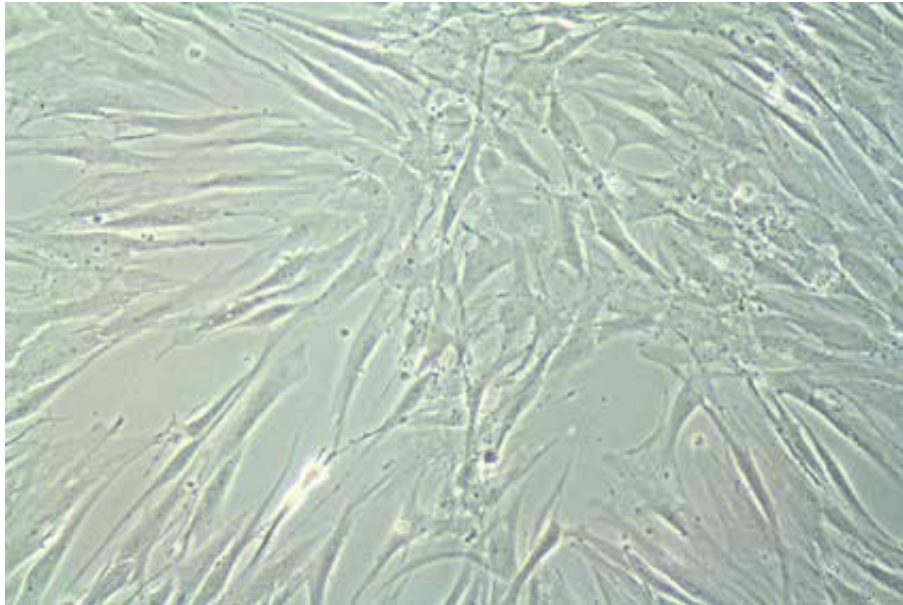


Abb. 1: Humane MSZ aus dem Knochenmark in Monolayer-Kultur. Lichtmikroskopische Aufnahme in 20-facher Vergrößerung.

1.2.2 Dreidimensionale Trägermaterialien und Konstrukte

Künstlich hergestellte oder natürlich vorkommende, dreidimensionale Träger, in der englischsprachigen Literatur als „Scaffolds“ bezeichnet, werden im Bereich des Tissue Engineering für die Anzucht und den Ersatz verschiedener Gewebearten benutzt. Vor allem für die Rekonstruktion von Knochen- und Knorpelgewebe, auf dem das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit liegt, sind Scaffolds als Alternative zur Organtransplantation Gegenstand der derzeitigen Forschung (Mauney et al., 2005; Kneser et al., 2006; Reichert et al., 2011). Sie sind Teil der extrazellulären Matrix (EZM) und können als Träger für Zellkulturen dienen. Scaffolds müssen nach Hutmacher (2000) unterschiedliche Bedingungen erfüllen, um für Ihren Einsatz geeignet zu sein:

- Sie sollten gerüstartig aufgebaut sein und miteinander verbundene Poren enthalten, um die Diffusion von Nährstoffen zu den Zellen und den Abtransport von Stoffwechselendprodukten zu ermöglichen.

- Die Oberfläche sollte geeignet sein, um Haftung, Proliferation und Differenzierung der Zellen zu ermöglichen.
- Die mechanischen Eigenschaften der Scaffolds oder Scaffold-Zellkonstrukte sollten den mechanischen Erfordernissen an der Implantationsstelle entsprechen.
- Sie sollten biologisch kompatibel und abbaubar sein.

Für den Knochenersatz verwendete Biomaterialien lassen sich nach Mauney et al. (2005) in folgende Gruppen einteilen:

- (1) Natürlich vorkommende Polymere, z.B. demineralisierter Knochen, Seidenfasern, Kollagen, Chitin
- (2) Synthetische Polymere, z.B. Polylaktid (PLA), Polyglykolid (PGA), Polylaktid-co-Glykolid (PLGA), Polycaprolacton (PCL)
- (3) Keramiken, z.B. Hydroxylapatit (HA), Trikalziumphosphat (β -TCP)
- (4) Metalle, z.B. Legierungen auf Aluminium- und Titanbasis.

Weitere nicht für die Anwendung im Menschen zugelassene Scaffolds bestehen aus Polyorthoester (POE) und Polyanhydriden (Hutmacher, 2000). Eine Mischung aus Keramiken und Polymeren (z.B. PLA + β -TCP) werden als Komposit-Scaffolds bezeichnet (Gardin et al., 2012).

Für den Gelenkknorpelersatz werden Gele aus Kollagen, Hyaluron, Gelatin, Alginate oder ebenfalls poröse Scaffolds verwendet (Nöth et al., 2002b).

Materialien und Produktionstechnik bestimmen die Oberflächeneigenschaften des Scaffolds (z.B. Topographie, Rauheit, Chemie, Energie) und beeinflussen dadurch Stoffwechsel, Haftung, Proliferation und Differenzierung der Zellen (Hee et al., 2006).

Zur Charakterisierung eines Scaffolds gehören neben Material, Porosität und Porengröße auch die mechanischen Eigenschaften, wie z.B. Elastizitätsmodul und Zugfestigkeit. Ein generelles Problem bei der Scaffold-Herstellung für den Knochenersatz ist die Diskrepanz zwischen der für die Zellfunktion notwendigen schwammartigen, porösen Struktur auf der einen Seite und der für die Stabilität

erforderlichen mechanischen Eigenschaften auf der anderen Seite. Die schwammartige Struktur ermöglicht Nährstoffversorgung der Zellen, Abtransport von Stoffwechselprodukten, Vaskularisierung und Hydrolyse des Scaffolds (Hutmacher, 2000). Dabei dürfen die Poren nicht zu groß sein, damit Zell-Zell-Interaktionen gewährleistet sind.

Scaffolds werden auf verschiedene Weisen hergestellt. In der Literatur sind Lösungsmittel-abhängige Guß-Techniken (solvent casting, extrusion, particulate leaching), Phasenseparation durch Emulsions-Gefriertrocknung (emulsion freeze drying, thermally induced phase separation, melt moulding), Webtechniken (fibre bonding) und die Gas-Aufschäumungs-Methode (supercritical gas-foaming) beschrieben (Hutmacher, 2000; Sachlos und Czernuszka, 2003; Montjovent et al., 2005). Neben diesen konventionellen Techniken existieren neuere Techniken, wie das zufällige Spinnen von Fasern im elektrischen Feld (Electrospinning) und freie Formtechniken (Solid Freeform Fabrication, SFF), wie z.B. 3D-Printing (3DP) und Fused Deposition Modelling (FDM). Letztere ermöglichen die Scaffold-Produktion in horizontalen Schichten anhand von Schichtbildvorlagen (CT, MRT), sodass die Scaffold-Architektur im Gegensatz zu den davor genannten Techniken, bei denen sich die Porenstruktur zufällig ergibt, willkürlich geplant werden kann (Hutmacher, 2000; Sachlos und Czernuszka, 2003; Schumann et al., 2007).

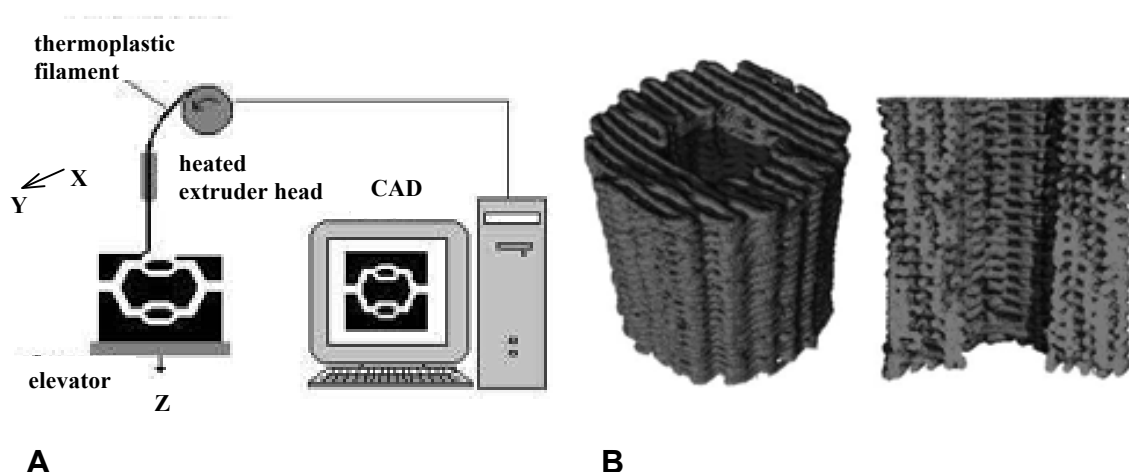


Abb. 2 (A und B): SFF als neue Techniken der Scaffold-Produktion. (A) Schematische Darstellung des FDM (aus Sachlos und Czernuszka, 2003) (B) μ CT Darstellung eines mittels FDM hergestellten PDLLA-TCP-PCL-Scaffolds (aus Reichert et al., 2011).

Die Arbeitsgruppe Mathieu et al. (2006) hat sich mit dem Aufschäumen von PLA-Scaffolds durch Kohlenstoffdioxid (CO₂) beschäftigt (supercritical gas foaming). Diese Methode hat den Vorteil, dass keine Lösungsmittel verwendet werden müssen. PLA-Pulver wird geschmolzen und mit flüssigem CO₂ vermischt. Unter Abkühlung und Druckentlastung wird das verwendete CO₂ gasförmig, und es entstehen miteinander vernetzte Poren. In Abb. 3 sind mikrocomputertomographische (μCT) Rekonstruktionen von spongiösem Knochen und durch CO₂-Aufschäumung hergestellte PLA-Scaffolds im Vergleich abgebildet. Die Parameter Sättigungsdruck, Druckentlastungsrate und Abkühlrate wurden variiert, um Scaffolds mit verschiedener Porosität, Porenausrichtung, Interkonnektivität und Wanddicke zu produzieren. Es entstehen Trabekel von platter bis stabförmiger Struktur, die eine unterschiedliche Spongiosaarchitektur nachempfinden.

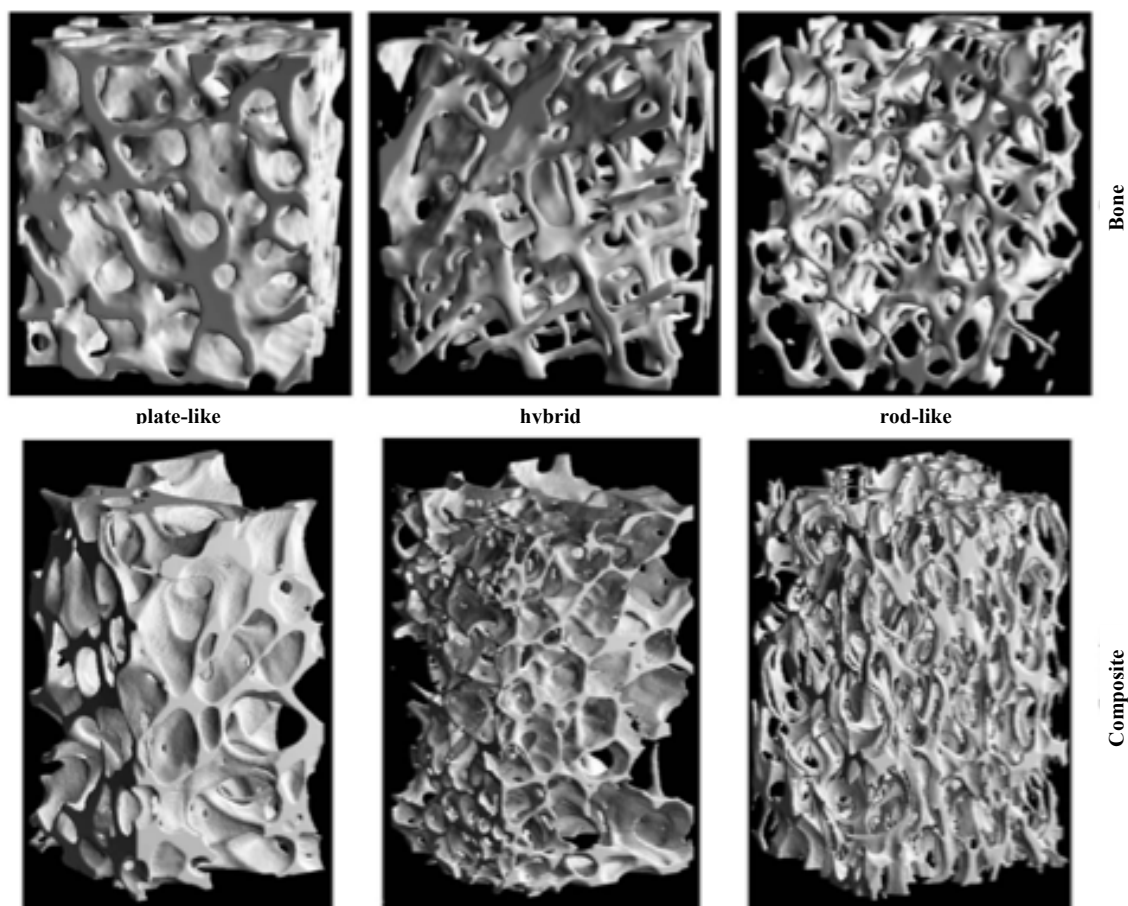


Abb. 3: Struktureller Vergleich von spongiösem Knochen (oben) und PLA-Scaffolds (unten) im μCT (aus Mathieu et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden Open-Cell Polylactic Acid (OPLA) Scaffolds der Firma BD Biosciences als Trägermaterial benutzt. OPLA-Scaffolds sind synthetische Polymere aus PLA (Polylaktidsäure, Poly-(α -Hydroxyl)-Säureester). PLA-Scaffolds lassen sich im Allgemeinen nach den Moleküleigenschaften der Milchsäure einteilen in Poly-L-Laktid (PLLA) und Poly-D-Laktid (PDLA). Bei den OPLA-Scaffolds liegt eine Mischung aus L- und D-Laktid vor.

OPLA-Scaffolds werden durch körpereigene Synthesewege abgebaut, sind damit bioresorbierbar und geben durch ihre makroporöse Struktur gute Bedingungen für die Knochengewebszüchtung im Sinne einer Osteokonduktion (Brekke und Toth, 1998).

1.2.3 Zell-Markierungsmethoden und Detektion

Grundsätzlich gibt es verschiedene Möglichkeiten Zellen zu markieren (Zell-Labeling). Bei der Auswahl der Markierungsmethode spielt das Ziel der Zellmarkierung eine Rolle. Also stellt sich folgende Frage: Sollen Zellen in vitro oder in vivo durch die Markierung nachgewiesen werden?

Zur Zellmarkierung in vitro sind beispielsweise immunhistochemische Methoden etabliert, bei denen Antikörper gegen Oberflächenantigene der Zelle in Zellkultur oder einem Gewebeschnitt mittels Fluoreszenz oder spezieller Färbungen im konfokalen Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden können. Außerdem können bestimmte fluoreszierende Proteine, wie z.B. GFP (green fluorescent protein), mikroskopisch nachgewiesen werden. Der Gencode dieses Proteins wird mittels viraler Vektoren (z.B. Adenovirus) in das Genom der Zelle eingebracht und via Proteinbiosynthese exprimiert, wodurch sich das Genprodukt im Zytoplasma der Zellen anreichert. Diese Methode lässt sich für die Zellkultur anwenden oder im Rahmen von transgenen Tiermodellen durchführen, wobei in diesem Fall alle, von diesen Tieren verwendeten Zellen, grün fluoreszieren. Verwendet man die markierten Zellen z.B. zur Implantation von Scaffold-Zell-Konstrukten in ein Versuchstier, so muss das Tier vor der Anfertigung von histologischen Schnitten zur Detektion der Zellen getötet werden. Eine Detektion der Partikel in vivo, also im lebenden Tier, ist nicht

möglich. Im Menschen kann diese Methode nicht angewendet werden, weil erstens nur eine in vivo detektierbare Markierung in Frage kommt und zweitens der Gencode verändert würde. Der Vorteil dieser Methode besteht allerdings darin, dass die Signalstärke des Markierungsagens nicht abnimmt, weil die Gene ständig exprimiert werden.

Es existieren alternative fluoreszenzbasierte Markierungsmethoden ohne die Verwendung von genetischen Vektoren. Die Farbstoffe werden per Endozytose in die Zellen aufgenommen und können im Mikroskop nachgewiesen werden. Tautzenberger et al. (2010) markierten humane MSZ mit an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Polystyrol-Nanopartikeln mit Vinyl-Phosphonsäure (VPA) als Copolymer. Der Nachweis des Farbstoffes gelang 23 Tage nach Labeling. Die Verwendung des rot auto-fluoreszierenden Farbstoffes Chloromethylbenzamido-Dil (CM-Dil) ist eine alternative Methode der Zell-Markierung, die den Gencode nicht verändert. Der Farbstoff wird von den Zellen aufgenommen und lässt sich bis zu sechs Wochen lang nachweisen (Weir et al., 2008).

Im Zeitalter der Stammzelltransplantation wird die Zellmarkierung und deren geeignete Detektion in vivo im Bereich der Regenerativen Medizin immer wichtiger, um den Therapieerfolg zu kontrollieren und die eingebrachten Stammzellen zu lokalisieren (Raimondo et al., 2006). Besonders in der Kardiologie, wo der Einsatz von Stammzellen zur Verbesserung der Heilungschancen nach Myokardinfarkt schon experimentell am Menschen durchgeführt wird, werden geeignete Methoden zur Detektion der eingebrachten Stammzellen, die die Zellen in ihrem Heilungspotential nicht ungünstig beeinflussen (Bengel et al., 2005; Bulte und Kraitchman, 2004), untersucht. Auch im Bereich der Knorpel-Knochenrekonstruktion besteht ein großes Interesse an der in vivo Lokalisation von eingebrachten Stammzellen (Farrell et al. , 2008; Heymer et al., 2008).

Dabei werden folgende Bedingungen gestellt: Die Markierungsmethode muss möglichst wenig schädlich für die Zellen sein und die Detektion wiederholt, evtl. auch über einen längeren Zeitraum und nicht-invasiv möglich sein. Als Markierungsmethoden dienen also Moleküle, die über die in der Medizin

gängigen nicht-invasiven bildgebenden Verfahren dargestellt werden können (molekulare Bildgebung). Zur direkten Zellmarkierung werden zum Einen Radionukleotide (wie z.B. Indium-111, ^{18}F -FDD oder $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO) verwendet, die über szintigraphische Methoden, wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT) sichtbar gemacht werden können, oder zum Andern Eisenoxidpartikel (wie z.B. SPIO, USPIO, VSOP, IFP), die über die Magnetresonanztomographie (MRT) detektiert werden können. Als indirekte Markierungsmethode werden Reporter-Gene beforscht, die über Vektoren in das Genom der zu markierenden Zelle eingebracht werden und einen für ein bestimmtes Radionukleotid spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche exprimieren. Dieses Nukleotid kann dann systemisch verabreicht werden und bindet nur an diejenigen Zellen, die den Rezeptor exprimieren. Diese Methode hat den Vorteil, dass nur vitale Zellen markiert werden und die Signalintensität potentiell mit der Zellaktivität korreliert (Bengel et al., 2005).

Ein Nachteil der Verwendung von Nukleotiden ist die von ihnen ausgehende radioaktive Strahlung, die für die Bildentstehung benötigt wird. Radioaktive Strahlung hat einen mutagenen Effekt auf DNA und kann damit nicht nur auf die markierten Zellen selbst, sondern auch auf umliegende Zellen schädigend wirken. Radionukleotide, die bei der Verwendung der Reporter-Gen Methode systemisch appliziert werden, müssen renal oder hepatisch ausgeschieden werden und sind damit potentiell organotoxisch. Ein weiterer Nachteil ist das durch den radioaktiven Zerfall gleichzeitige Nachlassen der Signalstärke. Die markierten Zellen können also nicht beliebig lang im PET oder SPECT nachgewiesen werden. Eisenoxid-markierte Zellen lassen sich ebenfalls nicht beliebig lang im MRT nachweisen, denn bei Zellteilungen wird der Marker verdünnt (Bengel et al., 2005). Bezüglich der Toxizität von Eisenoxidpartikeln gibt es in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. Die Größe der Partikel und die Verwendung von Transfektionsagentien für den Transport über die Zellmembran scheint eine Rolle zu spielen (Heymer et al., 2008).

Eisenoxidpartikel (Superparamagnetic Iron Oxide Particles), in der englischsprachigen Literatur unter dem Akronym „SPIO“ bekannt, bestehen aus

einem Eisenoxid-Kern und einer Hülle z.B. aus Dextran, Polyethylenglycol, Mannose, Kationen, viralen Proteinen oder Antikörpern (Syková et al., 2009; Wang et al., 2009). Der Kern hat einen Durchmesser von 5-30 nm. Die Hülle bestimmt die Größe des Gesamtpartikels und die Lokalisation der Zellmarkierung, d.h. entweder wird die Zelle durch intrazelluläre Aufnahme der Nanopartikel oder durch extrazelluläre Bindung an die Zellmembran markiert (Syková et al., 2009).

SPIO haben einen Durchmesser von 120 nm (Syková et al., 2009). Besonders kleine SPIO werden als USPIO (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles) bezeichnet. Sie haben einen Durchmesser von unter 50 nm und ihre Hülle besteht meist aus Dextran (Bonnemain, 2008; Heymer et al., 2008). Sie sind allerdings noch so groß, dass der Transport über die Zellmembran mittels Transfektionsagentien (wie z.B. Liposomen, Poly-L-Lysin, Transferin oder Antikörper) unterstützt werden muss. VSOP (very small superparamagnetic iron oxide particles) hingegen werden ohne Transfektionsagentien durch adsorptive Endozytose über die Zellwand transportiert. Sie haben einen Durchmesser von 10 nm oder weniger, sind z.B. Citrat-umhüllt und negativ (anionisch) geladen. SPIO kommen in T2 gewichteten MR Bildern hypointens zur Darstellung, weil sie durch ihre magnetische Ladung die T2-Relaxationszeit (Spin-Spin Relaxation) der umliegenden Wasser-Protonen verlängern (Syková et al., 2009; Heymer et al., 2008; Wang et al., 2009).

Die Detektionsmethoden für Radionukleotide und Eisenoxidpartikel unterscheiden sich in Ihrer Sensitivität. PET und SPECT haben eine höhere Sensitivität als das MRT, das dafür eine höhere Bildauflösung bietet.

Eine Limitierung beider beschriebenen Verfahren der direkten Zellmarkierung und Detektion in vitro ist, dass die Detektion nicht an das Vorhandensein des Markers in der Zelle gebunden ist (Bengel et al., 2005). Durch Apoptose oder Exozytose frei gewordene Marker werden ebenfalls detektiert.

Duales Labeling bezeichnet die Eignung eines Markers zum Nachweis sowohl in vitro als auch in vivo. SPIO beispielsweise kommen in vitro (Zellkultur, histologische Schnitte) elektronenmikroskopisch oder mittels Berliner Blau

Färbung zur Darstellung. In vivo (Tiermodell) können sie mittels MRT nachgewiesen werden.

1.3 Fragestellung und Versuchsaufbau

Die Rekonstruktion von Knochendefekten ist nach wie vor ein klinisches Problem. Der Goldstandard für die Rekonstruktion ist die autologe Knochentransplantation, die insbesondere mit Nachteilen der Morbidität der Donorstellen und der limitierten Verfügbarkeit verknüpft ist. Hierzu eröffnet der Einsatz von Tissue Engineering Konstrukten zum Gewebeersatz neue Perspektiven. Die Verwendung von Stammzellen gewinnt in diesem Rahmen zunehmend an Bedeutung. MSZ werden klinisch bereits erfolgreich zur Rekonstruktion von Knorpeldefekten verwendet. Zur Erforschung der Zellmigration nach Applikation von Stammzellen in einem Tissue Engineering Konstrukt, stellt die Detektion der Zellen in vivo ein unzureichend gelöstes Problem dar. Eine Möglichkeit der direkten Stammzellmarkierung ist die Eisenoxidpartikel-Markierung, die den Nachweis einzelner Zellen mittels MRT ermöglicht. Die VSOP-Markierung wurde in Monolayer-Kultursystemen von anderen Arbeitsgruppen bereits als sicher beschrieben.

Vor der Anwendung der VSOP-Markierung von MSZ in vivo muss die sichere Durchführbarkeit in dreidimensionaler Kultur in vitro gewährleistet sein. Das Ziel der vorliegenden Versuchsreihen war die Erforschung der Auswirkungen der Eisenoxidpartikel-Markierung auf MSZ in dreidimensionaler Kultur auf Polylaktid-Trägermaterialien in vitro als mögliche Grundlage für ein Tiermodell zur Regeneration von Knochendefekten. Dazu wurden OPLA-Scaffolds mit VSOP-markierten und nicht-markierten humanen adulten MSZ aus dem Knochenmark besiedelt und über einen Zeitraum von 28 Tagen in Bezug auf Morphologie, Vitalität und Differenzierung untersucht. Der Vergleich der Zell-Morphologie in den beiden Gruppen wurde mittels histologischer Schnitte durch die besiedelten Konstrukte und anschließender H/E- bzw. Berliner Blau Färbung mikroskopisch angestellt. Zur Erforschung der Vitalität der MSZ in den Konstrukten wurde eine DNA-Quantifizierung an unterschiedlichen Versuchstagen durchgeführt. Die MSZ-Differenzierung wurde mittels RT-PCR

Analyse zur Bestimmung der Expression unterschiedlicher osteogener Markergene der Stammzellen in den Konstrukten untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Humane mesenchymale Stammzellen (MSZ)

2.1.1 Isolierung aus dem Knochenmark und Kultivierung in vitro

Mesenchymale Stammzellen wurden aus dem Hüftkopf eines Patienten isoliert, der vor dem Einsetzen einer Hüftendoprothese reseziert worden war. Dabei wurde nach dem modifizierten Protokoll von Nöth et al. (2002b) vorgegangen.

Der Hüftkopf wurde steril verpackt aus dem Operationssaal angeliefert. Unter der sterilen Werkbank (HERA safe Klasse 1, Heraeus, Hanau) wurde zunächst die Trabekelstruktur des Knochens mit einem scharfen Löffel aufgebrochen und in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen) überführt. Die Röhrchen wurden dann mit DMEM/HAM'S F-12 Medium (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) aufgefüllt und die Trabekelreste durch Schwenken des Röhrchens mit dem Medium vermischt. Die nächsten Schritte dienten dazu, die soliden Bestandteile und Zellen vom Fett und Serum zu trennen. Dazu wurden die Röhrchen verschlossen, in eine Zentrifuge (Laborfuge 400R, Heraeus, Hanau) überführt und bei 1200 U/min 5 min zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde mit einer Pasteurpipette (Hartenstein, Würzburg) abgesaugt. Am Boden des Röhrchens verblieben Zellen und solide Knochenbestandteile. Diese wurden unter Verwendung einer 25 ml Kunststoff Einmalpipette (Pipettenspitzen Cellstar, 2, 5, 10, 25 ml, Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit dem oben beschriebenen Medium versehen und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Nachdem sich die soliden Bestandteile gesenkt hatten, wurde diesmal der flüssige Überstand mit den darin gelösten Zellen abpipettiert. Die soliden Bestandteile wurden verworfen und die Flüssigkeit in neuen Röhrchen gesammelt. Nun folgten Waschschrte, in welchen die Zellen abermals von Fett und anderen Serumbestandteilen getrennt wurden: Die Röhrchen wurden zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das übrig gebliebene Zellpellet mit neuem Medium durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt, bis die Flüssigkeit in den Röhrchen klar erschien. Am

Ende wurde das Zellpellet in 40 ml SZM durch Auf- und Abpipettieren vermischt und die Zellzahl in den Röhrchen bestimmt (Abschnitt 2.1.2, zweiter Absatz).

Das verwendete SZM bestand aus DMEM/HAM'S F12 Kulturmedium mit L-Glutamin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), welches mit 10% FCS (Foetal Calf Serum, PAA Laboratories, Pasching, Österreich), 1% Penicillin/Streptomycin (Penicillin/Streptomycin 100x, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 0,1% Ascorbat-2-Phosphat (L-Ascorbat-2phosphat, Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt wurde.

Für die Isolierung der MSZ wurden durchgängig sterile Einmalpipetten aus Kunststoff verwendet, für die weiteren Schritte hingegen autoklavierte Glaspipetten. Als Pipettierhilfe diente der Accujet (Braun, Melsungen).

Die Kultivierung der MSZ erfolgte in 150 cm² Zellkulturflaschen (TPP AG, Trasdingen, Schweiz). Pro Flasche wurden 1×10^9 Zellen in 20 ml SZM ausgesät. Die Flaschen wurden im Brutschrank (Brutschrank BB 5060, Heraeus, Hanau) bei 37°C, 95% O₂ und 5% CO₂ kultiviert. Nach zwei Tagen wurden die Flaschen dreimal mit PBS (Phosphat Buffer Saline DULBECCO, 1x, in Aqua dest., pH = 7,4) (Biochrom, Berlin) gewaschen, um die nicht-adhärenen Zellen zu entfernen. Der Wechsel des SZM erfolgte im Weiteren alle 3 bis 4 Tage mit im Wasserbad (GFL, Burgwedel) auf 37°C angewärmtem SZM. Die MSZ wurden in den Flaschen bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert und dann weiter verwendet. Abb. 4 zeigt einen Überblick über den Versuchsaufbau.

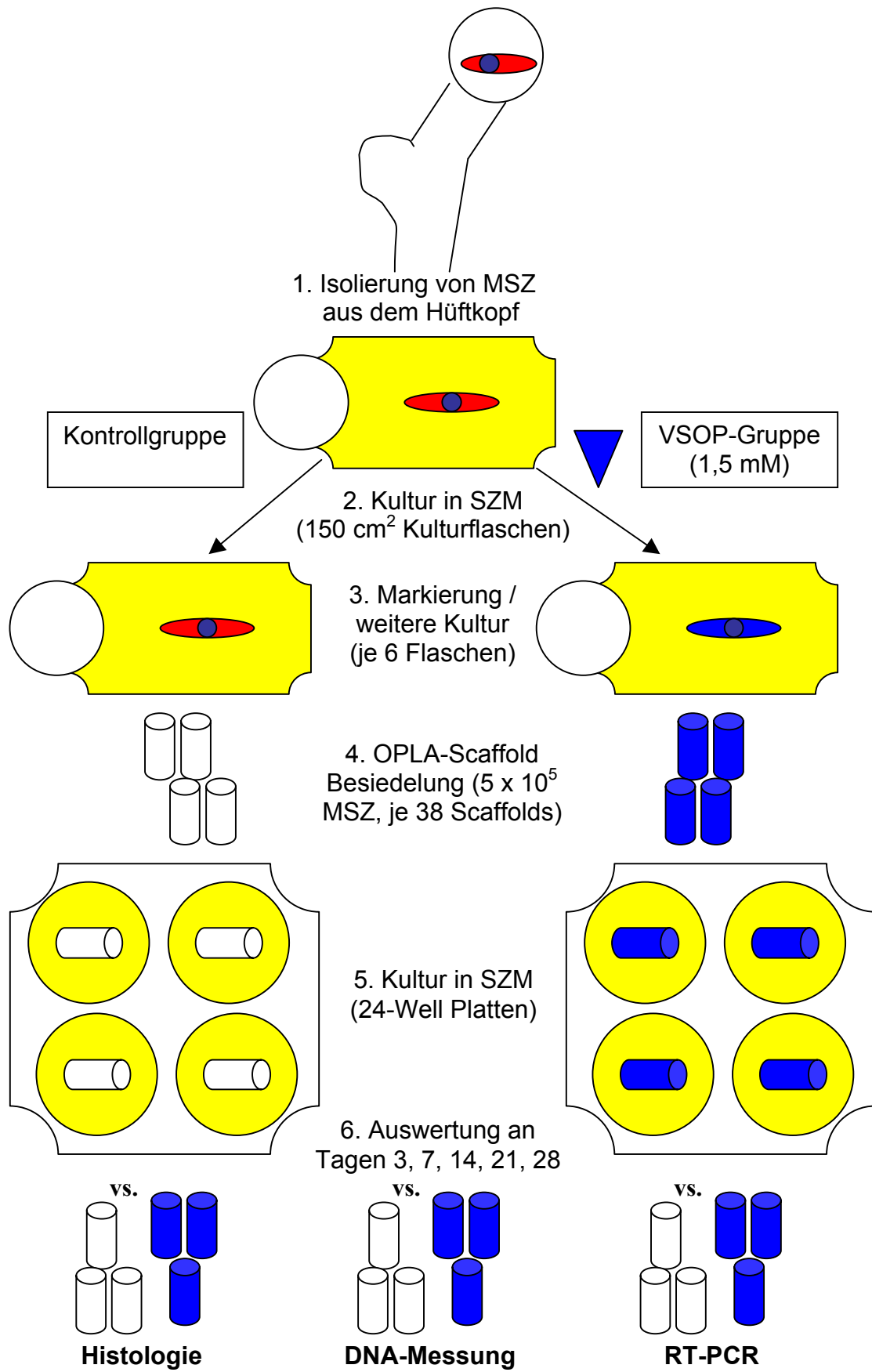


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

2.1.2 Ablösung der Zellen und Zellzahlbestimmung

Um mit den MSZ in den weiteren Schritten arbeiten zu können, mussten diese von den Zellkulturflaschen abgelöst werden. Dazu wurde das Enzym Trypsin verwendet. Zunächst wurde das Nährmedium abgesaugt, dann wurden 10 ml PBS zum Waschen in die Flaschen pipettiert und abgesaugt. Zum Ablösen der Zellen wurden die Flaschen im Brutschrank für 5 min mit 5 ml 0,25%-igem Trypsin (Trypsin/EDTA, 1x, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) inkubiert, welches danach mit 5 ml SZM inaktiviert wurde. Die Zellen hatten dadurch mikroskopisch eine runde Form und waren in der Flüssigkeit gelöst. Die Suspension mehrerer Flaschen wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt, bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand mittels einer Pasteurpipette abgesaugt. Das am Boden verbliebene Zellpellet wurde durch Auf- und Abpipettieren mit einer 25 ml Glaspipette in SZM resuspendiert.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zellzählkammer (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) bestimmt. Dazu wurden 50 µl Zellsuspension aus den Zentrifugenröhrchen entnommen und in einem Eppendorf-Gefäß mit 50 µl Trypanblau (0,4% Trypanblau, Sigma-Aldrich, Steinheim in 0,9% NaCl) vereinigt. Dies entspricht einem Mischungsverhältnis von 1:1 und einem Verdünnungsfaktor von 2. Von dieser Lösung wurden 10 µl in eine Kammer der Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Formel für die absolute Zellzahl in den Zentrifugenröhrchen ergibt sich laut Herstellerangaben aus $\text{absolute Zellzahl} = (\text{Zellzahl im Großquadrant} / 4) \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{ml Resuspension}$.

2.1.3 VSOP-Markierung der MSZ

Die MSZ wurden mit VSOP C200 (0,5 mmol/ml, Ferrofarm, Teltow) nach Heymer et al. (2008) markiert. VSOP C200 haben laut Herstellerangaben einen Eisenoxidkern von 5 nm im Durchmesser und sind Citrat-umhüllt. Damit haben sie einen Gesamtdurchmesser von 12 nm. Zur Markierung wurden die in Abschnitt 2.1.1 beschriebenen, nahezu konfluenten Zellkulturflaschen benutzt. Das SZM wurde abgesaugt und die Flaschen zunächst mit PBS gewaschen.

Dann wurden 29 μl der angelieferten VSOP Lösung in 10 ml SZM verdünnt. Dies entspricht einer VSOP Konzentration von 1,5 mM. Mit dieser Lösung wurden die Zellen in den Flaschen für 90 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen nehmen die Eisenpartikel per Endozytose auf. Nach der Inkubation wurde die Lösung abgesaugt und die Flaschen wurden zweimal mit PBS gewaschen, um die in der Lösung verbliebenen Eisenpartikel zu entfernen.

2.1.4 Aufbereitung der Zellen für die weitere Verwendung

Im Weiteren wurden zwei Versuchsgruppen gebildet. Die nahezu konfluenten MSZ der ersten Passage (Abschnitt 2.1.1) dienten als Kontrollgruppe und die mit Eisenoxidpartikeln markierten MSZ (Abschnitt 2.1.3) stellten die VSOP-Gruppe dar.

Für beide Gruppen wurden sechs Zellkulturflaschen verwendet. Die Zellen wurden gemäß Abschnitt 2.1.2 abgelöst, in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen in 40 ml SZM resuspendiert und gezählt. Dann wurde unter Anwendung des Dreisatzes dasjenige Volumen bestimmt, welches eine Zellzahl von 22×10^6 Zellen enthielt. Dieses Volumen wurde entnommen, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben zentrifugiert. Das nach Absaugen des Überstandes gewonnene Zellpellet wurde in 660 μl SZM resuspendiert. So enthielten 15 μl Suspension 5×10^5 Zellen. Auf diese Weise konnten 44 dieser Einheiten entnommen werden, wovon 38 für die Besiedlung von Scaffolds verwendet wurden (Abschnitt 2.2.3). Sechs Einheiten wurden in Eppendorf-Gefäße (Reaktionsgefäße, 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg) überführt. Dabei wurden drei Einheiten für die DNA-Quantifizierung (Abschnitt 2.4) in drei separate Gefäße platziert, sodass jedes einzelne Gefäß 5×10^5 MSZ enthielt.

Drei weitere Einheiten wurden für die RNA Isolation (Abschnitt 2.5) in einem Gefäß vereinigt, sodass dieses 15×10^5 MSZ enthielt. Die vier Eppendorf-Gefäße wurden zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und direkt mit dem jeweiligen Lysepuffer inkubiert.

2.2 Polylaktid-Scaffolds

2.2.1 OPLA-Scaffolds

Als avitale Trägerstruktur für die Zellbesiedlung dienen OPLA-Scaffolds der Firma BD Biosciences (Katalog Nr. 354614). Laut Firmenangaben im technischen Datenblatt (BD Biosciences, 2002) besteht das Scaffold mikroskopisch aus einem dreidimensionalen, synthetisch hergestellten D-, D-L-, L-Polylaktid-Gerüst (Polymer) mit einem Porendurchmesser zwischen 100 und 200 μm . Abbildung 5 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme, in der die poröse Struktur des OPLA-Scaffolds erkennbar ist. Das Scaffold ist nach zwölf Monaten *in vivo* komplett resorbiert. Der Elastizitätsmodul beträgt $0,92 \pm 0,03$ MPa bei einer maximalen Zugfestigkeit von $63,1 \pm 2,4$ N. Angaben zur Porosität lassen sich dem technischen Datenblatt nicht entnehmen. Die Scaffolds waren steril verpackt und haben makroskopisch eine zylindrische Form mit einem Durchmesser von $4,2 - 5,2$ mm ($4,7$ mm) und einer Höhe von $3,9 - 4,5$ mm ($4,2$ mm). Das Zylindervolumen (berechnet aus den in den Klammern aufgeführten Mittelwerten der Höhe und des Durchmessers) beträgt 73 mm^3 , wenn man von einem massiven Körper ausgeht. Der Hersteller gibt ein Volumen von 39 mm^3 und eine Hydratations-Kapazität von $30 \mu\text{l}$ an.

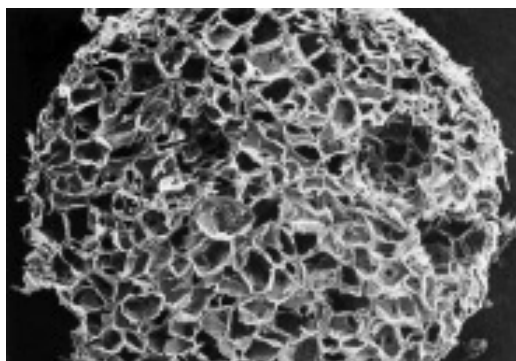


Abb. 5: Elektronenmikroskopische Struktur des OPLA-Scaffolds der Firma BD Biosciences (Quelle: http://www.bdbiosciences.ca/image_library/Faceted_OPLA3.jpg).

2.2.2 Bearbeitung der Polylaktid-Scaffolds

Unter sterilen Bedingungen wurden die Scaffolds zylinderförmig verkleinert. Dazu wurde eine Kronenfräse (K4plus Anlage mit Tischgerät und Handstück, KaVo Dental GmbH, Biberach) mit einem Stanzbohraufsatz, der einen Innendurchmesser von 2 mm aufweist, verwendet (Abb. 6). Dieser wurde zuerst 5 min in 70%-igem Ethanol (AppliChem, Darmstadt) sterilisiert und dann 5 min frei unter der sterilen Werkbank getrocknet. Die Scaffolds wurden mit einer im Dampfsterilisator (Dampfsterilisator Varioklav VI 400EP, H+P Labortechnik, Oberschleißheim) autoklavierten Pinzette auf einem Edelstahltablett in der sterilen Werkbank fixiert und mit 20.000 U/min gefräst.

Die zylinderförmigen Innenteile wurden mit einer sterilen Kanüle (Serican Kanüle, 20 G, Braun, Melsungen) aus dem Bohraufsatz gedrückt und jeweils einzeln auf 24-Well Kulturplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) verteilt und eine Stunde mit UV-Licht (Hera safe, Typ KS12, Thermo Scientific, Langenselbold) bestrahlt, um potentielle Keimbesiedlung zu verhindern. Die von den originalen Scaffolds nach dem Fräsen übrig gebliebenen äußeren Reste wurden verworfen.

Das solide Volumen der verkleinerten Scaffolds berechnet sich theoretisch bei gleich bleibender Höhe und einem Durchmesser von 2 mm als 13 mm^3 , was einer Reduktion um das 5,5-fache des Originalvolumens entsprach. Die verkleinerten Scaffolds nahmen $15 \mu\text{l}$ SZM auf.

2.2.3 Aussähen der Zellen auf die Scaffolds

Die zuvor isolierten, kultivierten und Eisenoxid-markierten bzw. nicht-markierten MSZ wurden direkt, d.h. nur in SZM gelöst, auf die Scaffolds ausgesät in Analogie zur Methode, die im technischen Datenblatt der OPLA-Scaffolds als „statische Besiedlung“ beschrieben ist (BD Three Dimensional OPLA Scaffold – Guidelines for use, Seite 4, Abschnitt i). Für die im Abschnitt 2.2.2 beschriebenen, verkleinerten Scaffolds wurden, wie in Abschnitt 2.1.4 beschrieben, 5×10^5 MSZ in $15 \mu\text{l}$ SZM suspendiert und mit einer Pipette langsam auf das Scaffold getropft. Dieses wurde währenddessen mit einer

Pinzette fixiert und 30 min auf den 24-Well Platten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Kulturplatten mit jeweils 2,5 ml SZM aufgefüllt und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Auf diese Weise wurden initial 76 Scaffolds besiedelt, die zu definierten Zeitpunkten über einen Zeitraum von 28 Tagen untersucht wurden. Der Nährmedienwechsel wurde alle zwei bis drei Tage durchgeführt.

2.3 Histologie von MSZ-besiedelten Polylaktid-Scaffolds

2.3.1 Konservierungsmethoden der Scaffolds

Die MSZ-besiedelten Scaffolds wurden zur histomorphologischen Beurteilung konserviert, geschnitten und gefärbt. Da sich die Polylaktid-Scaffolds während einer konventionellen Paraffineinbettung auflösen, wurde die Methode der Kryokonservierung gewählt. Dazu wurden die Scaffolds mit einer sterilen Pinzette aus den 24-Well Kulturplatten gehoben und mit PBS gewaschen. Dann wurde der Boden von Konservierungsgefäßen (Probebehälter, 10 ml, Kartell, Italien) mit Einbettmedium (Tissue Tek, Sakura, Zoeterwoude, NL) angefüllt, jeweils ein Scaffold hineingelegt und die Gefäße mit Einbettmedium ausgefüllt. Die Gefäße wurden verschlossen und ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur belassen, damit das Medium in die Scaffolds einziehen konnte. Danach wurden die befüllten Gefäße mit einer Pinzette in flüssigen Stickstoff (Airliquide, Düsseldorf) gehalten, 15 min darin schockgefroren und danach bei -20°C bis zum Schneiden gelagert.

Zur makroskopischen Beurteilung wurden einige Scaffolds in PFA-Lösung (4% Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt in PBS, hergestellt bei 60°C für 5 min, pH= 7,4) fixiert. Diese sind in Abb. 6 dargestellt. Dazu wurden die Scaffolds wie oben gewaschen, in herkömmlichen, verschließbaren Glasgefäßen in PFA-Lösung überführt und darin aufbewahrt.

2.3.2 Schneideverfahren

Die kryokonservierten Scaffolds (Abschnitt 2.3.1) wurden im Kryotom (Mikrotom-Kryostat HM500 OM, Microm, Wallendorf) bei -39°C geschnitten. Es

wurden 5 bis 7 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger (Super Frost Objektträger, Menzel GmbH, Braunschweig) gelegt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.3 Histologische Färbungen

Die kryokonservierten und geschnittenen Scaffolds (Abschnitt 2.3.1 und 2.3.2) wurden unter dem Abzug (Abzug 1500, Waldner, Wangen) auf den Objektträgern auf zwei verschiedene Weisen gefärbt. Vor der Färbung wurde das Einbettmedium durch 10-minütige Lagerung der Objektträger in destilliertem Wasser (Carl Roth, Karlsruhe) entfernt. Zur Lagerung der Objektträger während der Färbung wurden Färbeküvetten aus Glas (Schott, Mainz) verwendet.

H/E-Färbung

Die H/E-Färbung ist eine Standardfärbung und dient der Darstellung von Gewebestrukturen. Zunächst wurden die Präparate 9 min in Hämalaun nach Mayer (1,2 g Hämatoxylin, Carl Roth, Karlsruhe + 1000 ml Aqua dest. + 0,2 g NaJO₃, AppliChem, Darmstadt + 20 g Kalium, Merck, Darmstadt + 20 g Chloralhydrat, Merck, Darmstadt + 1 g Zitronensäure, Merck, Darmstadt) gefärbt. Dieser Farbstoff färbt saure Zellbestandteile, wie z.B. Nukleinsäure und Ribosomen, blau-violett. Danach wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gespült, dann 3 s in einer 50%-igen Ethanol und 0,25%-igen HCl (Salzsäure, Carl Roth, Karlsruhe) Lösung differenziert und erneut mit destilliertem Wasser gespült. Danach erfolgte ein 10-minütiges Bläuen in Leitungswasser. Im nächsten Schritt wurden die Präparate 1-2 min mit 1%-iger Eosin-Lösung (1 g Eosin, Merck, Darmstadt + 100 ml Aqua dest. + 1 Tropfen Eisessig, Carl Roth, Karlsruhe) gefärbt. Eosin färbt basische Bestandteile, wie z.B. Zytoplasmaproteine, rot. Der überschüssige Farbstoff wurde anschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen. Dann erfolgte eine Entwässerung der Präparate mit Ethanol in aufsteigender Reihe (70% - 95%) für jeweils 3 s und 100%-igem Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe) zwei Mal für jeweils 5 min. Die entwässerten Schnitte wurden mit dem Lösungsmittel Xylol (Carl Roth,

Karlsruhe) in 2 Etappen jeweils 5 min behandelt. Zuletzt wurden die gefärbten Präparate mit organischem Eindeckmittel (Entellan Neu, Merck, Darmstadt) und Deckgläsern (Deckgläser 24 x 50 mm, Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) unter Vermeidung von Luftblasenbildung eingedeckt.

Berliner Blau Färbung

Berliner Blau ist ein nicht natürlich vorkommendes Pigment mit einer besonders hohen blauen Farbintensität, welches mit Eisen Komplexe bildet und sich dadurch sehr gut zu dessen Nachweis eignet. Zunächst wurde eine Lösung aus 2%-iger Kaliumferrocyanidlösung (Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat, Merck, Darmstadt) und 2% HCl in destilliertem Wasser hergestellt. Die Objektträger wurden 30 min in dieser Lösung behandelt und danach mit Aqua dest. gespült. Die Gegenfärbung der übrigen Zellbestandteile, insbesondere des Zellkerns, erfolgte mit Kernechtrot (0,1 g Kernechtrot, Merck, Darmstadt + 100 ml Aluminiumsulfat 5%, Merck, Darmstadt) für 5 min. Dann wurde erneut mit Aqua dest. gespült. Die Entwässerung der Schnitte mit Ethanol und Isopropanol sowie die Behandlung mit Xylol und das Eindecken erfolgten in analoger Weise zur H/E-Färbung.

Die H/E- und Berliner Blau gefärbten Schnitte wurden über Nacht getrocknet und anschließend mikroskopiert (Axioskop 2 MOT, Zeiss, Jena) und abfotografiert (AxioCam MRc, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen). Zur weiteren Bearbeitung wurde die Software Axiovision (Axiovs 40, V 4.7.2.0, Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Halbergmoos) verwendet.

2.4 Zellproliferationsmessung

2.4.1 Quant-iT dsDNA BR Assay Kit

Die Zellproliferation wurde über die Bestimmung des DNA-Gehaltes in den Proben untersucht. Dazu wurde das Quant-iT dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) benutzt. Hierbei wird doppelsträngige DNA aus lysierten Zellen in Flüssigkeit mit einem für DNA spezifischen Reagent inkubiert. Dieses erzeugt ein fluoreszierendes Signal, das im Qubit-Fluorometer (Invitrogen) quantifiziert wird. Als Proben dienten am Tag der Scaffold-Besiedlung (Tag 0) Zellpellets in

Eppendorf-Gefäßen mit einer Zellzahl von 5×10^5 MSZ. Zu allen weiteren Zeitpunkten wurden die oben beschriebenen MSZ-besiedelten Scaffolds benutzt (Abschnitt 2.2.3).

2.4.2 Zellyse

Die Zellen wurden mit Hilfe des Enzyms Papain lysiert. Zur Herstellung des Zellysepuffers wurden 100 µg Papain (Papain from Papaya, Sigma-Aldrich, Steinheim) in 500 µl Puffer (0,1 M Natriumacetat, Merck, Darmstadt + 0,01 M Cystein HCL, + 0,05 M EDTA, AppliChem, Darmstadt, pH = 6) gelöst.

Die besiedelten Scaffolds wurden mit einer sterilen Pinzette aus den 24-Well Kulturplatten gehoben, in PBS gewaschen und dann jeweils einzeln in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße zusammen mit 510 µl Zellysepuffer platziert. Dann erfolgte die mechanische Zerkleinerung der Scaffolds mit einer sterilen Schere, die nach jeder Benutzung in HPLC-Wasser (Carl Roth, Karlsruhe) gereinigt wurde. Für die Zerkleinerung der Scaffolds mit VSOP-markierten und mit nicht-markierten Zellen wurden unterschiedliche Scheren benutzt.

Die Zellpellets wurden direkt in den Eppendorf-Gefäßen mit 510 µl Zellysepuffer durch Auf- und Abpipettieren vermischt.

Der Papain-Verdau erfolgte bei 60°C über 8 Stunden in den Eppendorf-Gefäßen. Dann wurden die Zellyseproben bei -20°C über den gesamten Versuchsverlauf im Gefrierschrank (Kühl-Gefrier-Kombination Economic, Bosch, Stuttgart) gelagert. So konnten die Proben der verschiedenen Zeitpunkte am Ende zusammen gemessen werden (Abschnitt 2.4.3).

2.4.3 DNA-Quantifizierung

Zunächst wurden die Zellyseproben von allen untersuchten Zeitpunkten in den Eppendorf-Gefäßen auf Raumtemperatur gebracht. Dann wurden die Proben und zwei Standards nach dem Kurzprotokoll von Invitrogen für die Fluoreszenz-Messung vorbereitet.

Zunächst wurde ein Ansatz (Quant-iT-Working Solution) hergestellt. Der Amplifikationsfaktor wurde berechnet, indem zu der Anzahl der Zellyseproben

zwei Standards addiert wurden. Also wurden 199 μ l Puffer (Quant-iT dsDNA BR buffer) und 1 μ l Reagent (Quant-iT dsDNA BR reagent) jeweils mit dem Amplifikationsfaktor multipliziert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Im nächsten Schritt wurden die Messproben und Standards hergestellt. Dazu wurden 10 μ l der Zellyseprobe bzw. der beiden Standards (Quant-iT dsDNA BR standard #1 und #2) und 190 μ l des Ansatzes in von Invitrogen mitgelieferte, dünnwandige 0,5 ml PCR-Röhrchen (Qubit assay tubes) pipettiert, anschließend gevortext und mindestens 2 min lang vor der Messung inkubiert. Im letzten Schritt wurde das Fluorometer mit den beiden Standards kalibriert und dann jede Probe nacheinander gemessen. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Flüssigkeit in den PCR-Röhrchen blasenfrei sein muss. Zwischen jeder Messung wurde eine Pause von 30 s eingelegt, um sicherzustellen, dass im Fluorometer Raumtemperatur herrscht.

Die vom Fluorometer angegebenen Werte wurden mit dem Verdünnungsfaktor (200 μ l / x) multipliziert, wobei x für die Größe der Zellyseprobe 10 μ l steht, um die tatsächliche DNA-Konzentration im Zellysepräparat in der Einheit μ g/ml zu erhalten.

2.4.4 Grafische Darstellung und Statistik

Zunächst wurden die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen aus den drei unabhängig voneinander gemessenen DNA-Konzentrationen der Zellysepräparate in den PCR-Röhrchen (Abschnitt 2.4.3) an den Tagen 0, 3, 7, 14, 21, 28 bestimmt. Diese Mittelwerte (nicht-markiert vs. VSOP-markiert) wurden mit den jeweiligen Standardabweichungen graphisch über den Zeitverlauf gegeneinander aufgetragen (Abb. 10). Dazu wurde das Programm Excel (Excel 2004 for Mac, Microsoft, Seattle, USA) verwendet.

Die DNA-Konzentrationen der beiden Gruppen an den oben genannten Versuchstagen wurden statistisch miteinander verglichen. Dazu wurden zwei Gruppen gebildet (-VSOP vs. VSOP). Bei fehlender Normalverteilung der Daten und geringer Stichprobengröße wurde die Effektstärke (SRM) berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte auf einem handelsüblichen Personalcomputer

mit den Programmen SPSS (SPSS für Windows, Version 19.0.0, SPSS Inc., München) und Excel (Excel 2008, Microsoft, Seattle, USA).

2.5 Untersuchung der Zelldifferenzierung

2.5.1 Osteogene Marker

Die Zelldifferenzierung wurde durch die Bestimmung der Expression der osteogenen Marker ALP, BSP, OP, ON, OC, COL I A2, Cbfa-1 und des Housekeeping Gens EF1 α mit Hilfe einer RT-PCR untersucht. Eine Übersicht der Marker mit den jeweiligen Primern befindet sich in Tab. 1. Um eine ausreichende Menge an RNA zu gewinnen, wurden jeweils drei Proben gepoolt. Als Proben dienten am Tag der Scaffold-Besiedlung (Tag 0) Zellpellets in Eppendorf-Gefäßen mit einer Zellzahl von 15×10^5 MSZ (Abschnitt 2.1.4). Zu allen weiteren Zeitpunkten wurden die oben beschriebenen MSZ-besiedelten Scaffolds benutzt (Abschnitt 2.2.3).

2.5.2 Zellyse

Zur Zellyse der in den Scaffolds befindlichen MSZ wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß 700 μ l einer 1:100 verdünnten Lösung aus 2-Mercapto-Ethanol (Carl Roth, Karlsruhe) und RA 1 Puffer (NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel – 11/2005/ Rev 05, Düren) vorgelegt.

Nun wurden die besiedelten Scaffolds analog zum Abschnitt 2.4.2 aus den Kulturplatten gehoben, in PBS gewaschen und in die Eppendorf-Gefäße platziert. Hierbei wurden zu jedem Zeitpunkt jeweils drei Scaffolds aus separaten Well-Platten in einem Eppendorf-Gefäß vereinigt und dann mit einer sterilen Schere zerkleinert. Für die Zerkleinerung der Scaffolds mit VSOP-markierten und nicht-markierten Zellen wurden unterschiedliche Scheren benutzt.

Zur Lyse der in den Pellets befindlichen MSZ wurden nur 350 μ l der oben beschriebenen Lösung aus 2-Mercapto-Ethanol und RA 1 Puffer in die Eppendorf-Gefäße pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren gemischt.

Die Lagerung der Zellyseproben erfolgte im Gefrierschrank (Nunc, Ilshin Lab. Co, Yangju-si Gyeonggi-do, Korea) bei -80°C bis zur weiteren Verwendung.

2.5.3 Dispergierung der Proben

Zunächst wurden die Zellyseproben (Abschnitt 2.5.2) in den Eppendorf-Gefäßen auf Raumtemperatur gebracht und dann auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurde aus Scaffolds (Feststoff) und Zellyselösung (Flüssigkeit) eine Suspension hergestellt. Dieses wurde mit dem Dispergiergerät ULTRA-TURRAX (T10 basic ULTRA-TURRAX, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) in den Eppendorf-Gefäßen auf Eis vorgenommen. Dazu wurde das Dispergiergerät in die vorgesehene Halterung geklemmt und die Proben bei kleinster Umdrehungszahl von 8000 U/min 5 s lang dispergiert. Nach jedem Vorgang wurde die Spitze des Gerätes mit RNaseZAP (Sigma-Aldrich, Steinheim), HPLC-Wasser und DEPC-Wasser (Carl Roth, Karlsruhe) dekontaminiert, um RNA Reste nicht in andere Proben zu verschleppen. Die Proben ohne Scaffold wurden analog behandelt.

2.5.4 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde auf der Grundlage des NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Zunächst wurden die Suspensionen (Abschnitt 2.5.3) zur Reduzierung der Viskosität filtriert. Dazu wurden die Suspensionen in die violette Filtereinheit aus dem Kit übertragen und diese 1 min bei 11.000 U/min zentrifugiert. Das Filtrat wurde dabei in neuen Sammelgefäßen aufgefangen und die Filtereinheit nach der Zentrifugierung verworfen. Im nächsten Schritt wurde 70%-iges Ethanol im Verhältnis 1:1 (d.h. 350 bzw. 700 μl) in die Sammelgefäße gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt, um die RNA-Bindung vorzubereiten. Dann wurde der Inhalt der Sammelgefäße auf die hellblaue Säule aus dem Kit übertragen, ein neues Sammelgefäß untergestellt, die Einheit 30 s bei 8.000 U/min zentrifugiert und das Lysat verworfen. Die Säule fasste maximal 750 μl , sodass der Schritt für das restliche Volumen wiederholt werden musste. Dadurch wurde die in den

Proben enthaltene RNA jeweils an einer Säule gebunden. Nun wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß platziert und 350 µl MDB (Membrane Desalting Buffer) auf die Säule gegeben. Die Einheit wurde 1 min lang bei 11.000 U/min zentrifugiert, um die Membran zu entsalzen und damit bessere Bedingungen für den DNase Verdau zu schaffen.

Im folgenden Schritt wurde ein Ansatz zum DNase Verdau hergestellt. Hierzu wurden pro Probe 10 µl rekonstituierte DNase I und 90 µl DNase-Reaktionspuffer in einem Eppendorf-Gefäß vorgelegt und durch Schnipsen gemischt. 95 µl dieser Reaktionsmischung wurde jeweils mittig auf die Säule pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Silica-Membran drei Mal gewaschen und dadurch getrocknet. Zunächst wurde 200 µl RA2 Puffer auf die Säule gegeben und diese dann 30 s bei 8.000 U/min zentrifugiert. Dadurch wurde die DNase inaktiviert. Dann wurde ein neues Sammelgefäß untergestellt, 600 µl RA3 Puffer auf die Säule pipettiert, die Einheit analog zum letzten Schritt zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der dritte Waschvorgang erfolgte mit 250 µl RA3 Puffer und Zentrifugation bei 11.000 U/min für 2 min. Dann wurde die Säule in ein im Kit enthaltenes 1,5 ml nukleasefreies Eppendorf-Gefäß platziert. Im letzten Schritt wurde die RNA aus der Säule gelöst. Hierzu wurden 40 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und die Einheit 1 min bei 11.000 U/min zentrifugiert. Die in Wasser gelöste RNA befand sich nun in den Eppendorf-Gefäßen. Die Proben wurden wenige Tage bei -20°C gelagert.

2.5.5 Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Proben (Abschnitt 2.5.4) auf Eis aufgetaut. In einem Eppendorf-Gefäß wurden 1 µl Probe und 49 µl 10mM Tris-Base (Trishydroxymethyl-aminomethan, AppliChem, Darmstadt und Aqua dest., pH = 7,2 – 7,5) vereinigt. Als Referenzflüssigkeit wurden 50 µl derselben Tris-Base verwendet. Zur Messung wurden jeweils 50 µl der Testflüssigkeit in eine spezielle Küvette (Uvette, Eppendorf, Hamburg) überführt. Die RNA Konzentration wurde dann im Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) bestimmt.

2.5.6 cDNA-Synthese

Aus der in den Proben (Abschnitt 2.5.4) gelösten RNA wurde im nächsten Schritt copy DNA (cDNA) hergestellt. Hierzu wurde 1 µg RNA verwendet. Das korrespondierende Flüssigkeitsvolumen wurde unter Zuhilfenahme der gemessenen RNA-Konzentration (Abschnitt 2.5.5) berechnet. Die RNA wurde mit Filterspitzen in 0,2 ml PCR-Röhrchen (PCR-Tubes, Hartenstein, Würzburg) pipettiert und mit HPLC-Wasser bis zu einem Endvolumen von 16 µl verdünnt. Betrug das errechnete Flüssigkeitsvolumen über 16 µl, wurde der RNA-Probe unter Vakuum (Bio Chem-Vacuum Center, BCV 21, Vacuumbrand, Wertheim) Flüssigkeit entzogen und diese damit höher konzentriert. Dann wurden 2 µl einer Lösung aus 1 µl DNA-Primer (Oligo(dT)Primer, 50 pMol, PeQLab, Erlangen) und 1 µl HPLC-Wassers dazugegeben, die PCR-Röhrchen 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend direkt auf Eis abgekühlt und danach kurz abzentrifugiert.

Im nächsten Schritt wurde 7 µl eines Ansatzes aus 5 µl Reaktionspuffer (M-MLV RT 10x Reaction Buffer, Ambion, Austin, USA), 0,625 µl Nukleotiden (dNTP-Set, 20mM, PeQLab, Erlangen), 1 µl RNA-abhängige DNA-Polymerase (M-MLV Reverse Transkriptase, Ambion, Austin, USA) und 0,375 µl HPLC-Wasser hinzugefügt. Das Endvolumen betrug also 25 µl. Zur cDNA Synthese wurden die PCR-Röhrchen 60 min bei 42°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der reversen Transkriptase für 10 min bei 95°C. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte, die durch Primer definiert werden. Dadurch kann ein bekannter DNA-Abschnitt in einer Probe nachgewiesen werden. In diesem Fall wurde die cDNA (Abschnitt 2.5.6) als DNA-Probe verwendet. Als Primer wurden Anfangs- und Endsequenzen des Housekeeping-Gens EF1 α zum Nachweis einer ausreichenden cDNA Bildung und Sequenzen verschiedener osteogener Markergene hinzugefügt. Diese sind in Tab. 1 aufgeführt.

Zunächst wurden die cDNA-Proben auf Eis aufgetaut und nach Erreichen des flüssigen Zustandes kurz abzentrifugiert. Dann wurde für jeden der verwendeten DNA-Primer ein Ansatz aus 1 µl Vorwärts-Primer (25 pmol/µl), 1 µl Rückwärts-Primer (25 pmol/µl), 5 µl 10x Puffer (10x Reaktionspuffer, PeQLab, Erlangen), 1 µl Desoxyribonukleotide (dNTP, 20mM) und 40,75 µl HPLC-Wasser in einem Eppendorf-Gefäß hergestellt. Das Eppendorf-Gefäß wurde auf Eis gelagert. Wie aus Tab. 1 zu entnehmen, wurde für den Ansatz beim Osteocalcin-Primer 1 µl Magnesiumchlorid (MgCl₂ 50mM) benötigt. In diesem Fall wurden nur 39,75 µl HPLC-Wasser verwendet. Als Letztes wurde 0,25 µl hitzestabile DNA-Polymerase (Taq DNA Polymerase, 5 U/µl, PeQLab, Erlangen) zum Ansatz hinzugefügt. Diese wurde erst kurz zuvor aufgetaut. Zum Mischen wurden die Eppendorf-Gefäße im Minishaker (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) gevortext.

Im nächsten Schritt wurde 1 µl cDNA in PCR-Röhrchen vorgelegt und 49 µl des oben beschriebenen Ansatzes hinzupipettiert. Dabei eventuell entstandene Luftblasen wurden durch Schnipsen beseitigt. Danach wurden die PCR-Röhrchen kurz abzentrifugiert. Zum Pipettieren wurden durchgängig Filterspitzen verwendet.

Nun wurden die geschlossenen PCR-Röhrchen zur Amplifikation der DNA in den Thermozykler (PCR Cyclyer Primus 25 advanced und PeQSTAR 96 Universal, PeQLab, Erlangen) überführt. Der Deckel des Gerätes wurde auf 110°C vorgeheizt. Dann wurden die Röhrchen in 5 min auf 94°C erwärmt. Die folgenden Schritte wurden je nach Zyklenzahl der jeweiligen Primer (Tab. 1) bis zu 38 Mal wiederholt: Zunächst erfolgte die Denaturierung der DNA für 30 s bei 94°C. Dann folgte die Anlagerung der Primer (Annealing) für 30 s bei der jeweiligen Annealing Temperatur (Tab. 1). Daraufhin wurden die neuen DNA-Stränge mit Hilfe der Taq-Polymerase 45 s lang bei 72°C synthetisiert. Nachdem die eingestellte Zyklenzahl erreicht war, wurden die PCR-Röhrchen 7 min bei 72°C belassen und danach auf 12°C bis zum Herausnehmen der Röhrchen abgekühlt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

Tab. 1: Liste der verwendeten Primer.

Gen	Primer Sequenz (5'→3')	Produkt Größe (bp)	Zyklen Zahl	Annealing Temp. (°C)	MgCl ₂ (µl)
EF1 α	Fw: AGGTGATTATCCTGAACCATC C Rv: AAAGGTGGATAGTCTGAGAAG C	234	35	54	
ALP	Fw: TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA Rv: ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC	453	37	51	
BSP	Fw: AATGAAAACGAAGAAAGCGAA Rv: ATCATAGCCATCGTAGCCTTGT	450	35	54	
OP	Fw: ACGCCGACCAAGGAAAACCTC Rv: GTCCATAAACCACTATCACCTCG	483	37	58	
ON	Fw: GATCTTCTTTCTCCTTTGCCTGG Rv: TGTTTGCAGTGGTGGTTCTGGCA	224	35	57	
OC	Fw: ATGAGAGCCCTCACACTCCTC Rv: GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	297	36	60	1
COL I A2	Fw: GGACACAATGGATTGCAAGG Rv: TAACCACTGCTCCACTCTGG	461	20	51	
Cbfa-1	Fw: ACAGATGATGACACTGCCACC Rv: CATAGTAGAGATATGGAGTGCTGC	240	38	60	

Anmerkung: Aufgelistet sind die Abkürzungen der verwendeten Primer (EF1 α = Elongationsfaktor 1 α , ALP = Alkalische Leukozytenphosphatase, BSP = Bone Sialo Protein, OP = Osteopontin, ON = Osteonektin, OC = Osteokalzin, COL I A2 = Kollagen I A2, Cbfa-1= Core binding factor alpha-1) und deren jeweilige Produktgröße in Basenpaaren (bp). Fw = Vorwärts-Primer Sequenz, Rv = Rückwärts-Primer Sequenz. Zyklenzahl, Annealing Temperatur und der Bedarf an MgCl₂ (Magnesiumchlorid) bei der Herstellung des Ansatzes beziehen sich auf die PCR.

2.5.8 Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung und Darstellung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde zunächst ein Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 1,5 g Agarose (PeQLab, Erlangen) mittels Waage (Scout, OHAus, Parsippany, USA) bestimmt und mit 100 ml 0,5-fachen TBE Puffer (TBE 10x: 108 g Trishydroxymethylaminomethan, + 55 g Borsäure + 40 ml EDTA, 0,5 M, jeweils von AppliChem, Darmstadt in 1 l Aqua dest., pH = 8,3) in einem Erlenmeyerkolben (Schott, Mainz) bei 400 W in der Mikrowelle (Sharp, Hamburg) unter Umrühren bis zum Kochen erhitzt. Dann wurde die Lösung auf 50°C abgekühlt und unter Schwenken mit 20 µl Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt. Im nächsten Schritt wurde die Lösung langsam und unter Vermeidung von Blasenbildung in den Kunststoffschlitten (Gel-Elektrophoresekammer MIDI, PeQLab, Erlangen) mit eingehängten Kämmen

gegossen. Die Lösung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur zum Gel ausgehärtet. Danach wurden die Kämmen entfernt und der Schlitten mit 0,5%igem TBE Puffer angefüllt.

Die Proben wurden auf Parafilm vorbereitet. Dazu wurden 10 µl der amplifizierten DNA (Abschnitt 2.5.7) mit 2 µl Ladepuffer in je einem Tropfen auf dem Parafilm vereinigt. Davon wurden jeweils 10 µl in die Kammern pipettiert. Zur späteren Referenz bezüglich der Fragmentlänge wurde eine Kammer mit 9 µl einer 100 bp DNA-Leiter (DNA-Leiter Plus 100 bp, PeQLab, Erlangen) angefüllt. Zur Auftrennung der Fragmente wurde ein elektrisches Feld mit 120 V über eine Stunde angelegt. Die Banden gleichlanger DNA-Fragmente konnten mithilfe des vorher zugefügten Ethidiumbromids, welches sich in DNA eingelagert hatte, unter UV-Licht im UV-Densitometer dargestellt und abfotografiert werden.

3. Ergebnisse

3.1 Morphologie der zellbesiedelten Konstrukte

Sowohl in der Gruppe mit den VSOP-markierten MSZ als auch in der Kontrollgruppe ließen sich Zellen über einen Zeitraum von 28 Tagen lichtmikroskopisch in den Scaffolds nachweisen. Makroskopische Ansichten der Konstrukte sind in Abb. 6 dargestellt. Die histologischen Schnitte sind in Abb. 7 bis 9 dargestellt. Abbildung 7 zeigt mikroskopische Vergrößerungen der Konstrukte nach histologischer Aufarbeitung in der H/E- bzw. der Berliner Blau Färbung zu wahrlos gewählten Zeitpunkten. Hier wurde der Schwerpunkt auf die Darstellung, nicht den Vergleich, der Morphologie gesetzt. In Abb. 8 und 9 sind die Konstrukte der beiden Gruppen von Tag 7 bis Tag 28 in den beiden Färbungen gegenübergestellt. Das Verteilungsmuster der Zellen in den Scaffolds war in beiden Gruppen ähnlich homogen. Das Scaffold selbst stellte sich in der H/E-Färbung als Gerüst aus basophilen Fasern dar (Abb. 7A).

Mit Hilfe der Berliner Blau Färbung gelang in der VSOP-Gruppe über den gesamten Zeitverlauf von 28 Tagen ein Eisen-III Nachweis. Die Eisenpartikel befanden sich lichtmikroskopisch betrachtet innerhalb und außerhalb der Zellen. In der Kontrollgruppe fiel der Eisennachweis negativ aus. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die VSOP-Markierung als unterscheidendes Merkmal zwischen den beiden Gruppen gelungen ist.

Hinsichtlich der Zellmorphologie gab es nur geringe Unterschiede. In beiden Gruppen hatten die Zellen die für MSZ typische Morphologie mit spindelförmigen, teils ovalen Zellkernen, prominenten Nukleoli und langen Zellfortsätzen (Abb. 7A bzw. B). Die Größe der Zellkerne war in beiden Gruppen ähnlich. Die Eisenpartikel zeigten sich am deutlichsten in der Berliner Blau Färbung als blaue Partikel, waren jedoch auch in der H/E-Färbung als goldene Punkte sichtbar. Sie hatten ein zentral betontes Verteilungsmuster mit erahnbarer punktförmiger Anreicherung in intrazytoplasmatischen Vesikeln (Abb. 7F und H). In der VSOP Gruppe befanden sich Zell-Gewebkonglomerate insbesondere an den Randbereichen der Scaffolds (z.B. Abb. 9F).

Makroskopisch wurde ab dem Tag 21 eine Kontraktion der Scaffolds sichtbar. Diese Beobachtung korrelierte mit einer Verdichtung der EZM in beiden Gruppen in den histologischen Schnitten, die am Tag 14 begann und über den Zeitverlauf zunahm. Am Tag 21 wirkte die Durchbauung der Scaffolds mit Zellen und EZM deutlich organisierter als zu Beginn (Abb. 8E und F, Abb. 9E und F).

Die Zellzahl pro Flächeneinheit unterschied sich grob geschätzt nicht in den beiden Gruppen. Es fiel jedoch auf, dass die Randbereiche der Scaffolds in beiden Gruppen ab Tag 14 im Sinne einer Zell/Gewebeverdichtung betont waren (Abb. 8C-H, Abb. 9C-H). Die Dichte der Scaffoldbesiedelung im Inneren war in beiden Gruppen mäßig ausgeprägt.

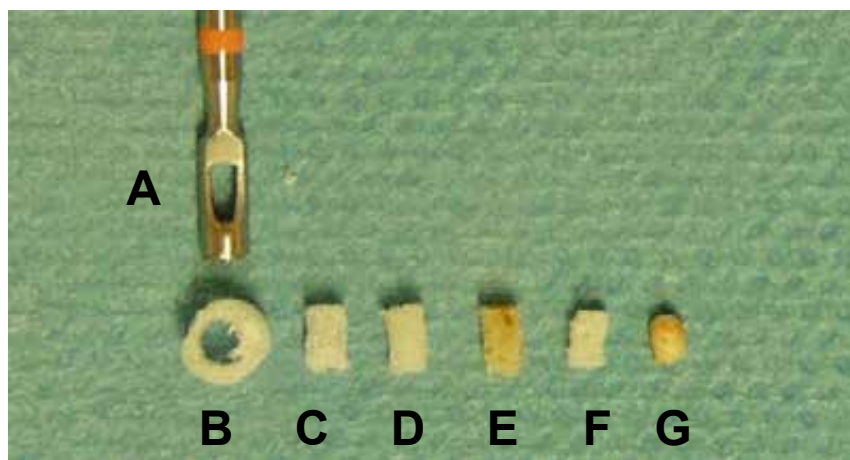


Abb. 6 (A-G): Stanzbohraufsatz (A) mit einem Innendurchmesser von 2 mm und ausgestanzte OPLA-Scaffolds, die mit Zellen besiedelt wurden. Aufgereiht sind PFA fixierte Scaffolds zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Besiedlung. Von links nach rechts: nach Stanzung verworfener Scaffold Rest (B), ausgestanztes Scaffold unbesiedelt (C), ausgestanztes Scaffold mit nicht-markierten MSZ nach 3 Tagen (D), ausgestanztes Scaffold mit VSOP-markierten MSZ nach 3 (E), 14 (F) und 28 (G) Tagen. Am Tag 28 nach Besiedlung war makroskopisch eine Kontraktion der Scaffolds deutlich sichtbar (G).

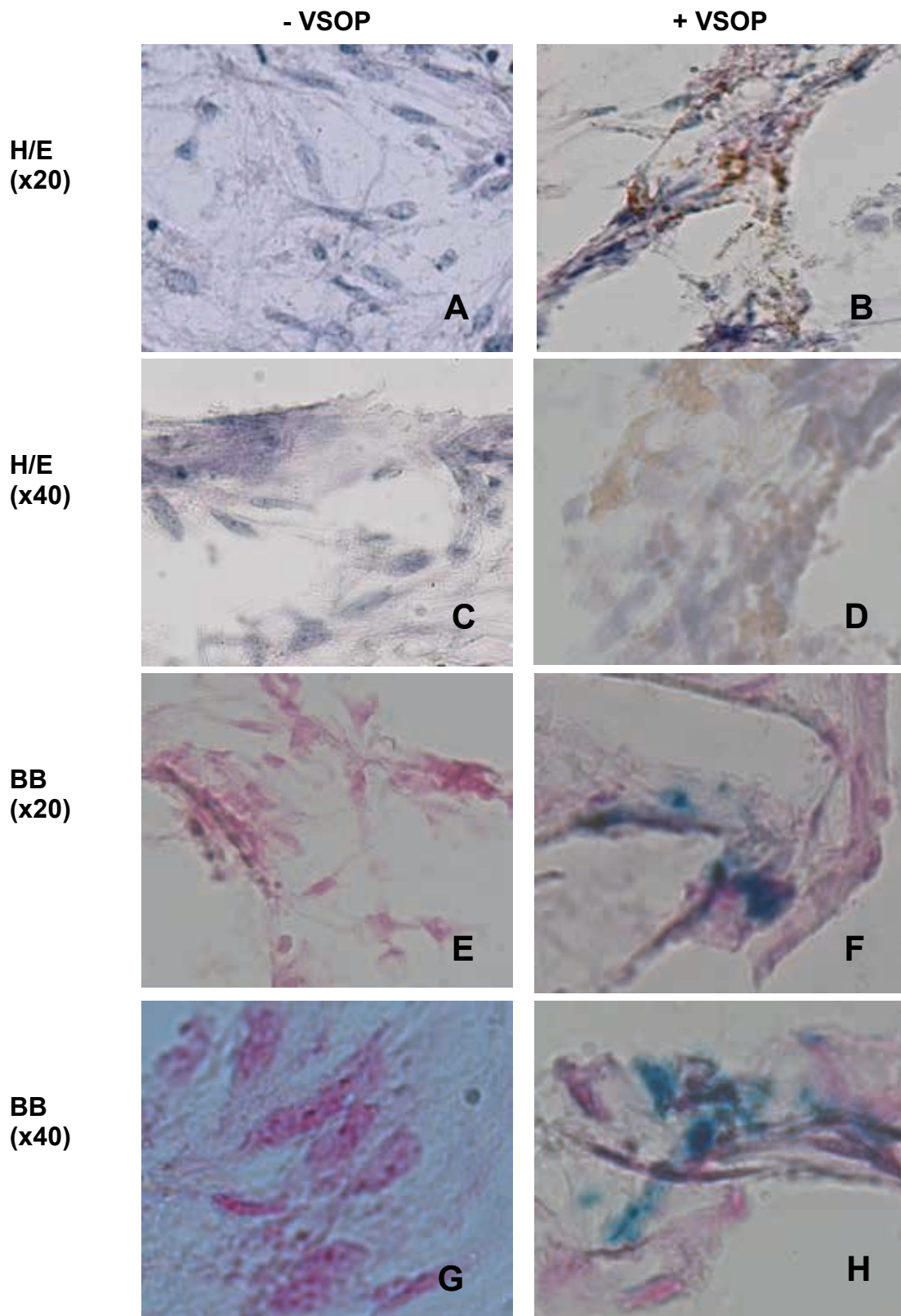


Abb. 7 (A-H): Lichtmikroskopische Darstellung der Morphologie MSZ-besiedelter OPLA-Scaffolds zu unterschiedlichen Zeitpunkten (A = 14, B = 28, C = 21, D = 7, E = 21, F = 28, G = 14, H = 28 Tage) in H/E- und Berliner Blau (BB) gefärbten kryokonservierten Schnitten. Vergrößerung 20- und 40-fach. Schichtdicke 5 - 20 µm.

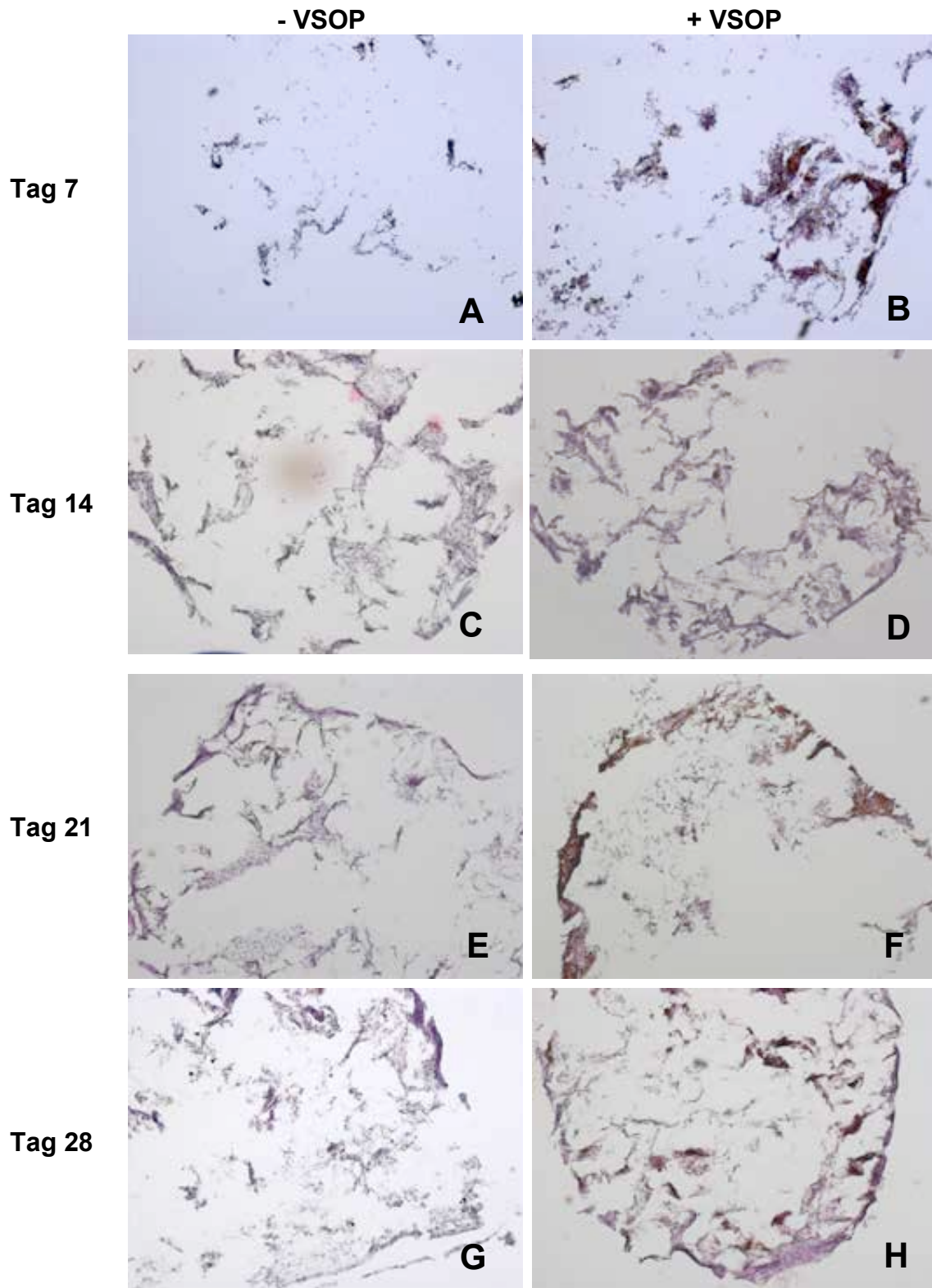


Abb. 8 (A-H): H/E-Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ-besiedelten OPLA-Scaffolds. Gegenübergestellt sind kryokonservierte, H/E-gefärbte Schnitte von Konstrukten mit VSOP-markierten MSZ (B, D, F und H) im Vergleich zu nativen MSZ (A, C, E und G) zu definierten Zeitpunkten (7, 14, 21, und 28 Tage) bei anfänglich gleicher Zelldichte (5×10^5 MSZ/Scaffod). Vergrößerung 5x. Schichtdicke 5 - 20 μm .

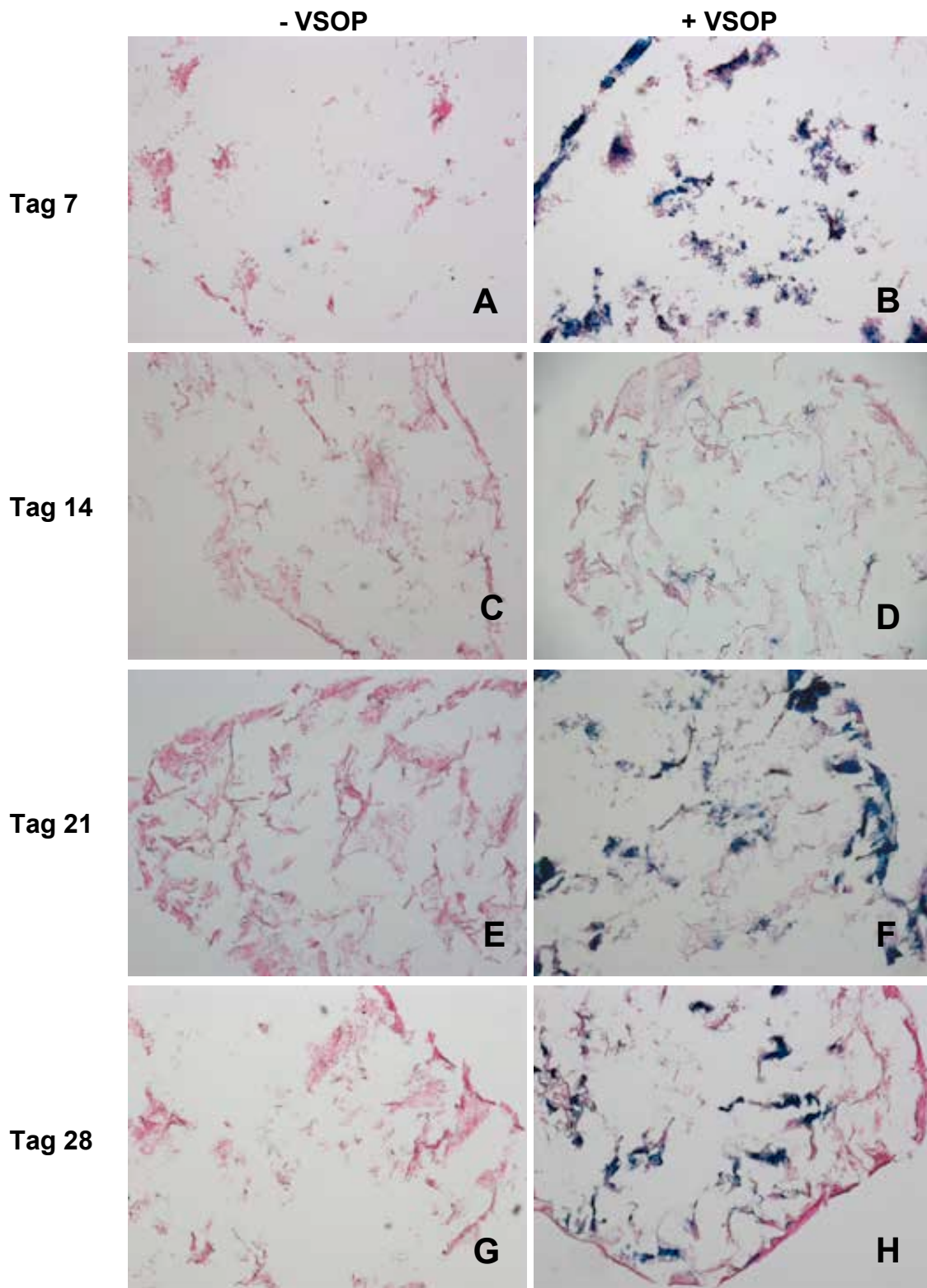


Abb. 9 (A-H): Berliner Blau (BB) Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ-besiedelten OPLA-Scaffolds. Gegenüberegestellt sind kryokonservierte Schnitte von Konstrukten mit VSOP-markierten MSZ (B, D, F und H) im Vergleich zu nativen MSZ (A, C, E und G) zu definierten Zeitpunkten (7, 14, 21, und 28 Tage) bei anfänglich gleicher Zelldichte (5×10^5 MSZ/Scaffod). Vergrößerung 5x. Schichtdicke 5 - 20 μm .

3.2 Vitalität der MSZ in den Konstrukten

Die photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung über 28 Tage erbrachte den Nachweis von DNA über den gesamten Versuchsverlauf in beiden Versuchsgruppen. Die Rohdaten sind in Tab. 2 dargestellt.

Zum statistischen Vergleich der beiden Gruppen hinsichtlich der Auswirkung von VSOP auf die DNA-Konzentration in den Scaffolds wurde die Effektstärke (SRM, Standard Response Mean) berechnet. Die geringsten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zeigten sich an den Tagen 3 und 21 (SRM = -0,22 und -0,25), wohingegen der größte Unterschied am Tag 7 (SRM = 1,49) bestand. Die Stichprobengröße war $n = 3$ an fast allen untersuchten Tagen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

In Abb. 10 ist die DNA-Konzentration in den Scaffolds beider Gruppen über die Zeit grafisch aufgetragen. Der Vergleich der beiden Gruppen hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der DNA-Konzentrationen zeigte ähnliche Ergebnisse. Am Tag 0 wurde der DNA-Gehalt in den Zellpellets mit Werten zwischen 2,5 und 4 $\mu\text{g/ml}$ gemessen. Am Tag 3 wurden DNA-Konzentrationen in den Scaffolds in beiden Gruppen zwischen 7,5 und 8,5 $\mu\text{g/ml}$ gemessen. Im weiteren Verlauf stellten sich die DNA-Konzentrationen in beiden Gruppen bei Werten zwischen 2,5 und 4 $\mu\text{g/ml}$ ein. Dabei sank die DNA-Konzentration in der Kontrollgruppe schon ab Tag 7 und die der VSOP-Gruppe erst ab Tag 14. Es kann also von einer DNA-Replikation in beiden Gruppen nach Scaffold Besiedelung (zwischen Tag 0 und Tag 3) ausgegangen werden. Somit wurden vitale MSZ auf die Scaffolds übertragen. Der Abfall der DNA-Konzentrationen in beiden Gruppen zum Versuchsende hin kann als eine VSOP unabhängige, für beide Versuchsgruppen gleichermaßen geltende, am ehesten durch äußerliche Faktoren bedingte Abnahme der Zellvitalität interpretiert werden.

Tab. 2: Auflistung der photometrisch bestimmten DNA-Konzentration in den Scaffolds beider Gruppen (Mittelwert, in Klammern Rohdaten) an jedem Versuchstag mit jeweiliger Standardabweichung (SD), Stichprobengröße (n) und Effektstärke (SRM).

Tag	Gruppe	DNA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	SD	n	SRM
0	- VSOP	2,51 (3,55; 1,98; 2,00)	0,90	3	0,81
	+VSOP	3,86 (5,47; 1,39; 4,72)	2,17	3	
3	- VSOP	8,35 (7,07; 13,70; 4,29)	4,83	3	-0,22
	+ VSOP	7,43 (3,65; 9,03; 9,62)	3,29	3	
7	- VSOP	3,39 (1,96; 5,87; 2,35)	2,15	3	1,49
	+ VSOP	7,23 (4,24; 10,1; 7,36)	2,93	3	
14	- VSOP	2,57 (2,48; 2,06; 3,18)	0,57	3	-1,28
	+ VSOP	1,89 (1,65; 2,45; 1,56)	0,49	3	
21	- VSOP	2,88 (3,09; 2,66)	0,30	2	-0,25
	+ VSOP	2,78 (3,10; 2,27; 2,97)	0,45	3	
28	- VSOP	3,00 (3,12; 2,87)	0,18	2	1,36
	+ VSOP	3,78 (3,34; 3,42; 4,58)	0,69	3	

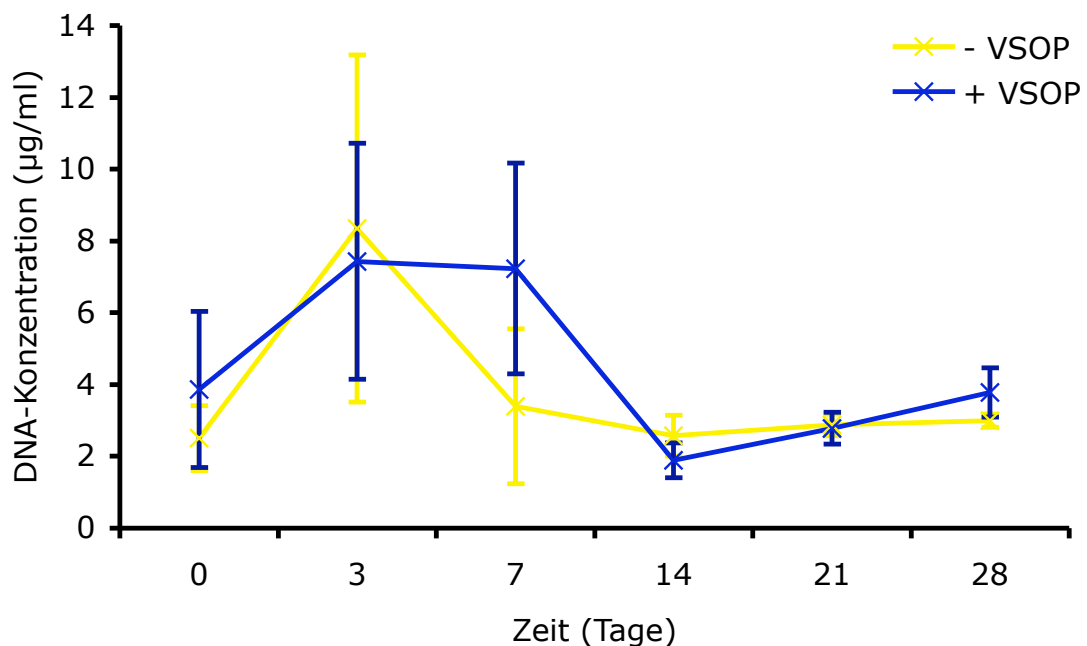


Abb. 10: Grafische Darstellung der DNA-Konzentrationen (Mittelwert \pm SD) in den Scaffolds bzw. Zellpellets beider Gruppen über die Zeit. Die DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt.

3.3 Osteogene Differenzierung der MSZ in den Konstrukten

Die osteogenen Markergene ALP, BSP, OP, ON, OC, COL I A2, Cbfa-1 und das Housekeeping-Gen EF1 α wurden in beiden Gruppen sowohl in den Zellpellets als auch in den Scaffolds über die Zeit von 28 Tagen exprimiert. Die abfotografierten Gelelektrophoresen nach RT-PCR Analyse sind in Tab. 3 im Überblick dargestellt.

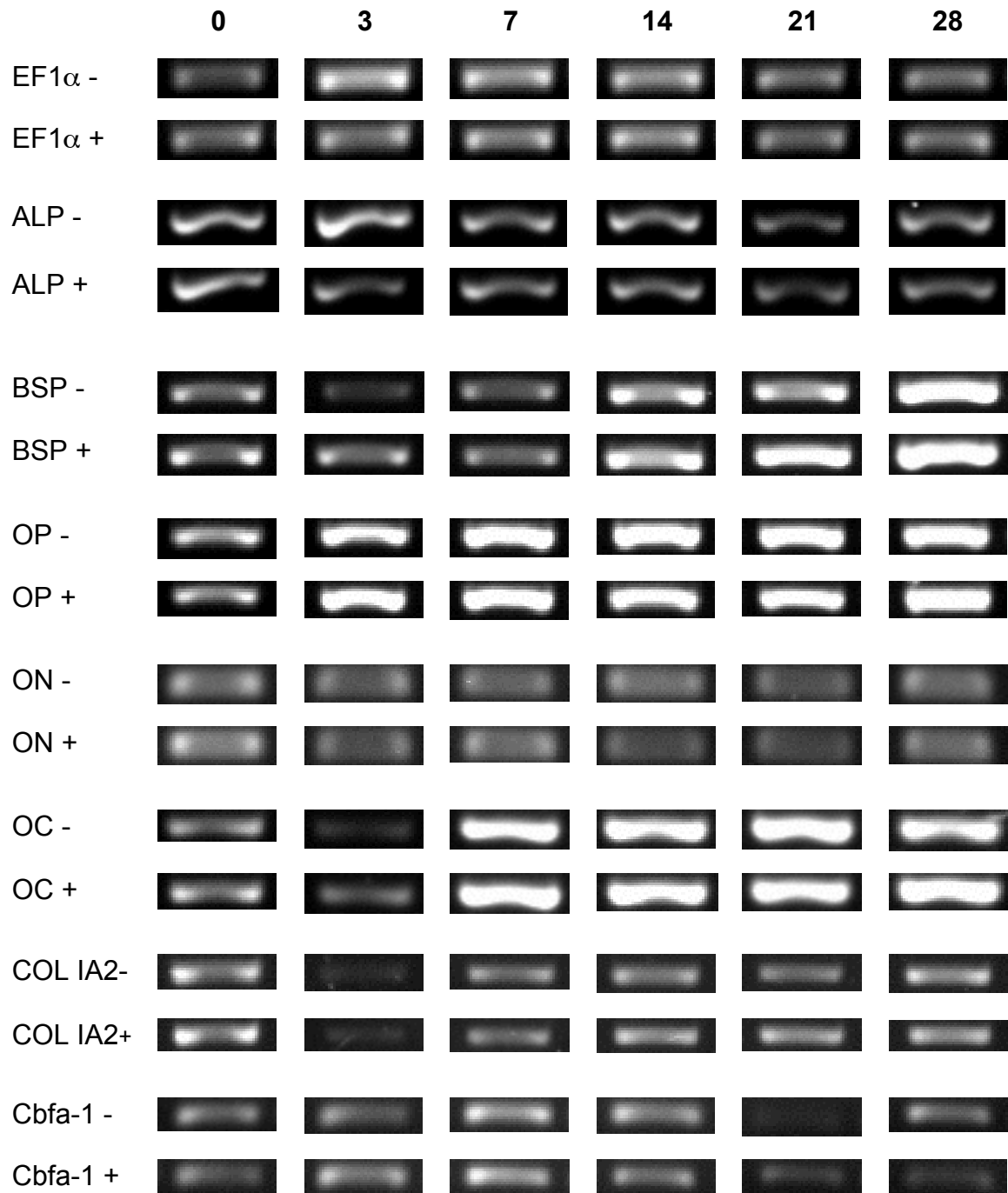
Die Expression von EF1 α war an den Tagen 3, 7 und 14 in beiden Gruppen ungefähr gleich stark. Bemerkenswert ist jedoch eine verminderte Expression an den Tagen 0, 21 und 28 in beiden Gruppen.

Das frühe osteogene Markerprotein ALP und der osteogene Transkriptionsfaktor Cbfa-1 waren in beiden Gruppen zu Versuchsbeginn stärker exprimiert als zu Versuchsende. Die ALP-Expression war in beiden Gruppen an den Tagen 0 und 3 am höchsten, wobei es Unterschiede zwischen den Gruppen im Sinne einer schwächer ausgeprägten ALP-Expression am Tag 3 in der VSOP-Gruppe gab. Zu Versuchsende nahm die ALP-Expression in beiden Gruppen gleichermaßen ab. Die höchste Expressionsintensität von Cbfa-1 war in beiden Gruppen am Tag 7 und 14. Danach fiel die Expression in beiden Gruppen deutlich ab.

Während OP und ON nach Scaffold Besiedelung (Tag 3) in beiden Gruppen in einer konstanten Intensität exprimiert wurden, nahm die Expression von COL I A2 und OC, des späten Markers der osteogenen Differenzierung, erst ab Tag 7 zu und erreichte dann in beiden Gruppen ähnliche Intensitäten.

Auffällig ist, dass die Expression des integrinbindenden Matrixproteins BSP in beiden Gruppen erst ab Tag 14 deutlich zunahm und die Expressionsintensität von BSP in der VSOP-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe insgesamt höher war.

Tab. 3: RT-PCR. Dargestellt sind Ausschnitte aus Gelelektrophoresen zum Vergleich der Expression unterschiedlicher osteogener Markergene VSOP-markierter (+) und nicht-markierter (-) MSZ zu den Zeitpunkten 0, 3, 7, 14, 21, 28 Tagen. Die m-RNA wurde aus Zellpellets (Tag 0) bzw. MSZ-besiedelten OPLA-Scaffolds gewonnen.



4. Diskussion

4.1 Methodische Überlegungen und Diskussion

4.1.1 Zellen und Kulturbedingungen

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel ein Tissue Engineering Konstrukt für den Knochenersatz *in vitro*, mit potentiell klinischem Einsatz *in vivo*, zu entwickeln. Nach dem Tissue Engineering Paradigma von Langer und Vacanti (1993) bestehen entsprechende Konstrukte für den Organersatz aus Zellen, Matrix und Biomolekülen. Auf den Knochenersatz angewendet stehen also als Zellquelle Osteoblasten/Osteozyten oder native bzw. differenzierte Stammzellen zur Verfügung. Die am häufigsten für die Erforschung der Knochenregeneration verwendeten Zellen sind Osteoblasten, Periostzellen und MSZ (Kneser et al., 2006).

MSZ sind eine heterogene Zellpopulation, die multipotente Stammzellen enthalten, für die eine osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierungsfähigkeit *in vitro* durch Pittenger et al. (1999) nachgewiesen wurde. MSZ haben ein großes proliferatives Potential und können ohne größeren Aufwand aus dem Knochenmark isoliert werden (Haynesworth et al., 1992; Nöth et al., 2002b; Keating, 2006; Wagner und Ho, 2007). Dadurch ist eine kleine initiale Zellanzahl ausreichend, die *in vitro* expandiert und retransplantiert werden kann. Da MSZ nicht nur aus fetalen Geweben, sondern vor allem auch aus dem adulten Knochenmark isoliert und *in vitro* expandiert werden können, eignen sie sich als Zellquelle für die autologe Zelltransplantation (Mauney et al., 2005; Raimondo et al., 2006). Autologe Zelltransplantationen haben den Vorteil, dass sie ethisch besser zu vertreten sind als allogene Transplantationen (Tuan et al., 2003; Raimondo et al., 2006) und die Probleme der lebenslang notwendigen Immunsuppression sowie möglicher Transplantatabstoßung umgehen. Nicht nur die Differenzierbarkeit von MSZ zu Knochenzellen, sondern auch die parakrinen Effekte der Zellen auf geschädigtes Gewebe im menschlichen Körper mit regenerativen Effekten

sprechen für den Einsatz von MSZ bei der Herstellung von Tissue Engineering Konstrukten. In lebendigen Organismen werden MSZ bei Gewebsschädigung (z.B. Ischämie oder Knochenfrakturen) aus dem Blut an die entsprechenden Stellen gelockt und unterstützen die Regeneration (Caplan, 1989; Mödder und Khosla, 2008). MSZ können selbst zu Knochenzellen werden, wie ursprünglich durch Caplan (1989) angenommen, oder durch Signalstoffe gewebsspezifische Zellen zur Regeneration anleiten. Als parakrine Effekte von MSZ sind anti-apoptotische, immunregulatorische, migrationsstimulierende und neo-angiogenetische Signale (Jones und Yang, 2011) bekannt. Tuan et al. (2003) benutzen in diesem Zusammenhang den Begriff „director cells“. Es ist noch nicht abschließend geklärt, welche MSZ-Eigenschaft für den pro-regeneratorischen Effekt bei der Knochenregeneration hauptsächlich verantwortlich ist.

Viele Autoren benutzen MSZ zur Herstellung von Tissue Engineering Konstrukten für die Knochenregeneration (Jäger et al., 2005; Reichert et al., 2009; Heymer et al., 2009). Da die osteogene Differenzierungsfähigkeit von MSZ bei Spendern mit osteoporotischem Knochen oder Diabetes herabgesetzt ist (Jones und Yang, 2011), wurden zur PLA-Scaffold Besiedelung von anderen Autoren Osteoblasten bevorzugt, die wie MSZ histologisch Knochengewebe in vitro erzeugen (Montjovent et al., 2005; Rath et al., 2012). Ge et al. (2009) untersuchten die mechanischen und molekularen Eigenschaften von Osteoblasten auf PGLA-Scaffolds in vitro. Alexander et al. (2008) benutzten Kieferperiostzellen für die Besiedelung von OPLA-Scaffolds. Hee et al. (2006) stellten entsprechende Konstrukte mit dermalen Fibroblasten her.

Eine alternative Isolierungsmethode von MSZ aus dem trabekulären Knochen wurde durch Nöth et al. (2002a) mit Hilfe von Kollagenase beschrieben. Sie haben dasselbe Differenzierungsspektrum von MSZ aus dem spongiösen Knochenmark und eignen sich für die Rekonstruktion von Knorpel-Knochendefekten (Tuli et al., 2003; Tuli et al., 2004; Berner et al., 2010). MSZ können auch aus dem Perichondrium bzw. Periost isoliert werden (Chu et al., 1995; Lohberger et al., 2012).

Mehrere Autoren unserer Arbeitsgruppe untersuchten die notwendigen Zellkonzentrationen, um unterschiedliche Trägermaterialien ausreichend zu besiedeln. Reichert et al. (2009) besiedelten Kollagen-I-Hydrogele mit einer MSZ-Konzentration von $7,5 \times 10^5$ MSZ pro ml und konnten histologisch nach 3-tägiger Kultur in SZM eine homogene Verteilung der Zellen im Gel nachweisen. Heymer et al. (2008) konnten VSOP-markierte MSZ bis zu einer Mindestzellzahl von $0,5 \times 10^5$ MSZ pro ml Gel in Kollagen-I-Hydrogelen nach 5 Tagen Kultur im MRT als Hypointensitäten wahrnehmen. Stüber (2007) besiedelte im Rahmen seiner Dissertation OPLA-Scaffolds, wobei er die MSZ zuerst in Kollagen-I-Hydrogele einbrachte und die OPLA-Scaffolds dann mit den flüssigen Gelen besiedelte. Er konnte histologisch die beste Zell-Durchbauung des Scaffolds bei $1,7 \times 10^7$ Zellen pro Scaffold nachweisen. Er benutzte jedoch OPLA-Scaffolds in der Originalgröße mit Hydratationskapazität von 30 μ l. Die hier verwendeten verkleinerten Scaffolds hatten eine Hydratationskapazität von 15 μ l. Damit wäre nach Stüber eine Zellzahl von 850×10^5 MSZ pro Scaffold notwendig. Da in der vorliegenden Arbeit kein Hydrogel als Zwischenträger benutzt wurde, welches die Poren des Scaffolds ausfüllt und Raum für eine höhere Zelldichte bietet, und das Scaffold-Volumen rechnerisch um das 5,5-fache verkleinert wurde, wurde hier eine MSZ-Konzentration von 5×10^5 Zellen pro Scaffold (bei einer Zelldichte von $3,3 \times 10^7$ Zellen pro ml SZM unter Verwendung von 15 μ l SZM für die Besiedlung) gewählt.

Als Zellquelle für die hier diskutierten Versuche wurden adulte humane MSZ aus der Hüftkopf-Spongiosa von Patienten isoliert, welchen eine Hüftendoprothese implantiert wurde. Einwilligungen der Patienten und der Ethikkommission wurden vorher eingeholt. Für den klinischen Einsatz könnten MSZ auch per Beckenkammbiopsie gewonnen werden. Die Zellen wurden in SZM kultiviert. Osteogenes Induktionsmedium wurde nicht verwendet, weil lediglich der Effekt von Eisenoxid-Partikeln auf native MSZ in dreidimensionaler Kultur untersucht werden sollte.

4.1.2 Trägermaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden dreidimensionale, biologisch resorbierbare Trägermaterialien aus Polylaktid benutzt (OPLA-Scaffolds). Diese haben gegenüber zweidimensionalen Kultursystemen den Vorteil, dass sie die in vivo Struktur von spongiösem Knochen eher nachempfinden und dadurch den natürlichen Verhältnissen besser angepasste Kulturbedingungen und eine bessere Möglichkeit für die osteogene Differenzierung der Stammzellen und den Knochenersatz bieten (Brekke und Toth, 1998, Alexander et al., 2008; Berner et al., 2010).

Das Trägermaterial ist porös gebaut und erfüllt damit eine grundlegende Bedingung für die Eignung als Biomaterial für den Knochenersatz (Hutmacher, 2000). OPLA-Scaffolds wurden bereits erfolgreich als Zell-besiedeltes und unbesiedeltes Trägermaterial angewendet. Brekke und Toth (1998) und Vögelin et al. (2005) benutzen unbesiedelte OPLA-Scaffolds mit Hyaluron und BMP-2 im Tiermodell für die Rekonstruktion von Knochendefekten und für Wirbelkörperfusionen. Alexander et al. (2008) besiedelten OPLA-Scaffolds der Firma BD Biosciences direkt mit Kieferperiostzellen über 15 Tage in vitro und konnten elektronenmikroskopisch eine dichte Besiedlung und osteogene Differenzierung nach osteogener Stimulation nachweisen. Hee et al. (2006) benutzten OPLA-Scaffolds der Firma Kensey Nash (Drilac) für die erfolgreiche Kultur von dermalen Fibroblasten. Berner et al. (2010) implantierten trabekuläre humane MSZ auf OPLA-Scaffolds in einen Bohrlochdefekt im Kniegelenk von Nacktratten. Es zeigte sich histologisch neu gebildeter Knochen im Polymer mit guter Osseointegration. PLA-Scaffolds wurden mit MSZ (Jäger et al., 2005; Heymer et al., 2009) und adulten und fetalen Osteoblasten besiedelt (Montjovent et al., 2005).

Die Zell-Besiedelung von PLA-Scaffolds kann direkt mittels Pipettierung oder indirekt über Verwendung von Zwischenträgern (z.B. Kollagen-Hydrogelen) erfolgen. Montjovent et al. (2005) isolierten adulte und fetale humane Osteoblasten. Nach Kultivierung in SZM und direkter Aussaat der Zellen auf PLA-Scaffolds mit und ohne HA- und β -TCP-Zusätzen wurden die Konstrukte über eine Stunde ohne Medium inkubiert und dann in osteogenem

Differenzierungsmedium in 24-Well Platten über einen Zeitraum von 28 Tagen kultiviert. Es wurde eine gute Zell-Haftung und EZM-Produktion für alle Konstrukte nachgewiesen. Die untersuchten Osteoblasten behielten ihre Fähigkeit zur Differenzierung bei.

Die Arbeitsgruppe Lohberger et al. (2012) isolierte humane MSZ aus der Maxilla bei Weisheitszahn-Extraktionen und besiedelte 1 x 1 mm messende β -TCP-Scaffolds (Vitoss) und avitalisierte Rinderknochen (Bio-Oss) mit diesen Zellen nach zweiwöchiger Kultur in SZM. Die Konstrukte wurden in osteogenem Differenzierungsmedium für weitere zwei Wochen kultiviert. Es zeigten sich gute Kulturbedingungen für MSZ auf diesen Scaffolds.

Reichert et al. (2009) untersuchten die mikroskopische Struktur von MSZ-besiedelten PCL-Kollagen-I-Hydrogel-Konstrukten histologisch in vitro. Die Zellen wurden zunächst in ein Kollagen-I-Hydrogel eingebracht und im zweiten Schritt wurde damit ein PCL-Scaffold besiedelt. Nach 42-tägiger Kultur in SZM wurde eine homogene Durchbauung des Scaffolds mit fibroblastären Zellen nachgewiesen. Durch das Gel wurden die Poren im Scaffold ausgefüllt und dadurch vermutlich eine höhere Zelldichte erreicht.

Stüber (2007) verwendete OPLA-Scaffolds zur Herstellung von Knorpelgewebe ebenfalls mit einem Zwischenträger. OPLA-Kollagen-I-Hydrogel-Konstrukte wurden mit MSZ besiedelt. Eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung der MSZ mit entsprechender Matrixbildung konnte gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die OPLA-Scaffolds ohne Kollagen-Hydrogel als Zwischenträger mit MSZ besiedelt. Die Scaffolds wurden zur Vorbereitung auf evtl. aufbauende Kleintiermodelle mit einer Kronenfräse verkleinert. Die histologische Aufarbeitung zeigte eine gelungene Zellbesiedelung aller Scaffoldbereiche mit Betonung der Scaffoldränder.

Um für den Knochenersatz in vivo geeignet zu sein, sollen Scaffolds entsprechende mechanische Eigenschaften besitzen. Diese ergeben sich zum einen durch die Materialeigenschaften und zum anderen durch die Produktionsweise. Die hier verwendeten Scaffolds werden von der Firma Kensey Nash produziert und über BD vertrieben. Die genaue Herstellungsweise wird nicht bekanntgegeben. In Tab. 4 sind aus der Literatur entnommene

mechanische und strukturelle Eigenschaften von verschiedenen PLA- und eines Komposit-Scaffolds exemplarisch aufgelistet. Abhängig von der Produktionstechnik variieren die mechanischen Eigenschaften.

Zur Knochenrekonstruktion eines segmentalen Defekts sollten Scaffolds einen Elastizitätsmodul (elastic modulus) von 300-500 MPa, eine Zugfestigkeit (strength) von 5-10 MPa besitzen und die Porosität sollte größer als 75% sein bei einer Porengröße zwischen 200 und 400 μm , um ausreichende Nährstoffdiffusion aus dem Medium zu den Zellen zu gewährleisten (Mathieu et al., 2006; Brekke und Toth, 1998). Diese mechanischen Anforderungen erfüllt das hier verwendete OPLA-Scaffold nicht. Zur Rekonstruktion eines segmentalen Knochendefekts müsste also eine von außen stützende Platte oder ein mechanisch stabileres Scaffold benutzt werden. Ein Bohrlochdefekt im Tibiakopf von Mäusen oder Ratten mit ausreichender Stabilität des umliegenden Knochengewebes wäre sicherlich problemlos mit dem verwendeten Konstrukt rekonstruierbar, wie z.B. durch Berner et al. (2010) gezeigt wurde. Die Zugfestigkeit kann aus dem Quotienten aus maximaler Belastung (Abschnitt 2.2.1) und Fläche errechnet werden und beträgt 1 MPa. Der Elastizitätsmodul liegt laut Herstellerangaben bei 0,92 MPa. Mathieu et al. (2006) haben die mechanischen Eigenschaften von PLA-Scaffolds im Rahmen der Gas-Aufschäumung durch Zumischung der anorganischen Verbindungen (Keramiken) Trikalziumphosphat (β -TCP) und Hydroxylapatit (HA) verbessern können. Der Elastizitätsmodul eines Komposit-Scaffolds mit 10%-igem β -TCP betrug 170 MPa. Betrachtet man die durch die Salz-Extrusion-Technik gewonnenen Scaffolds, so liegen Elastizitätsmodul und Zugfestigkeit unter den erforderlichen Eigenschaften für die Knochenrekonstruktion eines segmentalen Defektes.

Neuere Scaffold-Produktionsverfahren sind das Electrospinning und die SFF (Solid Freeform Fabrication). Schumann et al. (2007) beschreiben die beiden Techniken genauer. Durch Electrospinning werden zufällig angeordnete, netzartige Strukturen aus 50 nm dicken Kollagen- und PCL-Filamenten geschaffen, die sich insbesondere zur Anzüchtung von Knorpelgewebe eignen. Beim FDM (Fused Deposition Modelling), das eine SFF-Methode ist, wird

verflüssigtes PCL mit oder ohne Keramiken über Rollen geleitet, welche fadenförmige Filamente über eine Düse ausschleusen. Die Düse bewegt sich computergesteuert und kann auf der Grundlage von CT-Bildern die Filamente Schicht-für-Schicht übereinander reihen, sodass letztendlich ein Scaffold mit definierten Eigenschaften entsteht. Es kann beispielsweise eingebaute Kanäle zur Verbesserung der Vaskularisierung besitzen. Durch Variation der Anordnung der Filamente können gewünschte mechanische Eigenschaften des Scaffolds erzielt werden. Durch die Definition der Porengrößen entstehen geeignete Kulturbedingungen für bestimmte Zellen. So eignen sich die durch FDM hergestellten Scaffolds besonders zur Rekonstruktion von segmentalen Knochendefekten in vivo.

Komposit-Scaffolds haben für den Knochenersatz vorteilhaftere mechanische Eigenschaften (Gardin et al. 2012). Neben der Verbesserung der mechanischen Eigenschaften durch die Verwendung von Keramiken wird die Oberflächenstruktur der Scaffolds verändert. Hee et al. (2006) haben eine bessere osteogene Differenzierungsfähigkeit von dermalen Fibroblasten auf β -TCP-Scaffolds (Vitoss) im Vergleich zu OPLA-Scaffolds (Drilac, Kensey Nash) nachgewiesen.

Tab. 4: Übersicht über die Eigenschaften von Polylaktid-Scaffolds abhängig von Produktionstechnik und Beimischung von anorganischen Materialien.

Material	Produktions- Technik	Porosität (%)	Poren- größe (μm)	Elastizitäts- modul/module (MPa)	Zugfestigkeit /strength (MPa)	Ref.
Knochen	-	52-96	200-400	100-500	5-10	1,2,3
PLA	gas-foaming	70-90	100-200	20-180	2-3,5	2,3
PLLA	Extrusion	83,5	12-300	0,6-1,4/50-80	46,6-116,8/1	4,5
OPLA			100-200	0,92	1 (ber.)	6
PLA-TCP	gas-foaming	75-90	100-200	30-200	2-6	1, 3

Referenzen: 1 = Mathieu et al., 2006; 2 = Williams und Lewis, 1982 ; 3 = Montjovent, 2005; 4= Evans et al., 1999; 5 = Widmer et al., 1998; 6 = Technisches Datenblatt BD Bioscience, ber. = berechnet.

Die biomechanischen Eigenschaften und die unregelmäßig-poröse Struktur der hier verwendeten OPLA-Scaffolds lassen vermuten, dass sie am ehesten durch die Gas-Aufschäumungsmethode hergestellt wurden.

Das in den vorliegenden Versuchen verwendete OPLA-Scaffold ist bioresorbierbar und laut Herstellerangaben in vivo nach 12 Monaten vollständig abgebaut. PLA-Scaffolds zersetzen sich durch Hydrolyse in wässrigen Medien selbst (Anderson und Shive, 1997; Brekke und Toth, 1998; Nöth et al., 2002b; Berner et al., 2010). Hee et al. (2006) zeigten einen Gewichtsverlust des OPLA-Scaffolds in SZM ohne Zellen von 14% in zwei Tagen. Dabei kam es zur Einschwämmung von sauren Substraten ins Medium, die den pH erniedrigten. Potentiell kann das saure Milieu das Zellwachstum beeinflussen. Montjovent et al. (2005) haben jedoch keine Scaffold-Degeneration von mit fetalen Osteoblasten besiedelten PLA-Scaffolds nach acht Wochen Kultur feststellen können. Die anfallenden Teilmoleküle können verstoffwechselt werden, sodass das Fremdmaterial komplett abgebaut wird (Anderson und Shive, 1997; Brekke und Toth, 1998). Damit ist das Material biokompatibel und bioresorbierbar. Durch Beimischung von Keramiken kann der Scaffoldabbau besser gesteuert werden. Das saure Milieu durch die Scaffold-Hydrolyse wird durch HA- und β -TCP-Moleküle in Komposit-Scaffolds gepuffert (Hutmacher, 2000).

4.1.3 Eisenoxid-Markierung

Ziel der Versuche war es, eine möglichst wenig Zell-beeinflussende Markierungsmethode für MSZ auf PLA-Scaffolds in vitro zu untersuchen, die bei Einsatz in vivo eine nicht-invasive, wiederholbare und klinisch durchführbare bildgebende Möglichkeit der Zellverfolgung nach Implantation dieses Konstrukts ermöglicht. Zu diesem Zweck ist also eine duale Markierungsmethode, wie die Eisenoxid-Markierung, sinnvoll.

In der Literatur existieren zahlreiche Veröffentlichungen zur Eisenoxidmarkierung von MSZ und ihren Auswirkungen auf Morphologie, Proliferation und Differenzierung der Zellen in Zellkultur und im Zell-Scaffold-Konstrukt. Grundlegende Ergebnisse unterschiedlicher Autoren werden im folgenden Abschnitt dargestellt. Nach ausgiebiger Literaturrecherche lässt sich

feststellen, dass zum derzeitigen Stand keine Veröffentlichung existiert, die die Kombination aus VSOP-markierten MSZ auf OPLA-Scaffolds untersucht.

Eisenoxidpartikel (SPIO, USPIO, VSOP) können in vitro durch die Berliner Blau Färbung, durch Elektronenmikroskopie und in vivo im Sinne der molekularen Bildgebung durch das MRT dargestellt werden. Das MRT bietet, im Gegensatz zur nuklearmedizinischen Bildgebung, eine höhere Auflösung bei jedoch geringerer Sensitivität (Bengel et al., 2005). Ein weiterer Vorteil des MRT ist die gute Darstellbarkeit des Nachbargewebes. Damit können Rückschlüsse über Ödembildung und folglich die Entzündungsaktivität sowie das Läsionsausmaß gewonnen werden (Syková et al., 2009).

Die Eisenoxid-Markierung hat den Vorteil, dass zur Bildgebung keine radioaktive Strahlung mit potentiell mutagenem Effekt auf DNA involviert ist. Bei Verwendung von Nukleotiden zur Zell-Markierung werden, um die Zytotoxizität gering zu halten, zum direkten Labeling Nukleotide mit geringer Halbwertszeit und möglichst geringer Radioaktivität benutzt, wodurch die Zellverfolgung nur zeitlich limitiert möglich ist. Indium-111 hat beispielsweise eine Halbwertszeit von nur 2,8 Tagen (Gildehaus et al., 2011) und kann damit nur für eine entsprechend kurze Zeit als Zell-Marker dienen. Farrell et al. (2008) dagegen implantierten SPIO-markierte humane MSZ auf Kollagen-Glykosaminoglykan-Scaffolds in das Subkutangewebe von Nacktmäusen und konnten die Scaffolds 7 Wochen nach Labeling im MRT nachweisen. In der Aufarbeitung der histologischen Schnitte wurde 7 Wochen nach Implantation eine osteochondrale Differenzierung des implantierten Gewebes nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Eisenmarkierung von MSZ eine Erfolg versprechende Möglichkeit ist, MSZ über längeren Zeitraum nicht-invasiv in vivo nachzuweisen.

Der Einsatz von Transfektionagentien zur effektiveren Einschleusung von Nanopartikeln hat potentiell negative Effekte auf die Zellen. So wurde durch Strand et al. (2001) ein proinflammatorischer, nekrotisierender Effekt von Poly-L-Lysin (PLL) nachgewiesen. Schäfer et al. (2009) zeigten einen negativen Einfluss von SPIO auf die Migrationsfähigkeit von MSZ insbesondere unter

Verwendung eines kationischen Transfektionsagenten (Pulsin). Arbab et al. (2003) konnten zeigen, dass SPIO keine toxische Wirkung auf MSZ haben.

Die intrazelluläre Aufnahme von Eisenoxidpartikeln aus dem Medium wurde durch viele Arbeitsgruppen bereits gezeigt. Wahrscheinlich liegen Mechanismen der Endozytose (Phagozytose, Pinozytose) und Wechselwirkungen mit kationischen Abschnitten der Zellmembran zugrunde. Durch elektrostatische Wechselwirkungen werden bevorzugt negativ geladene Nanopartikel mit hoher Effizienz über die Zellmembran transportiert (Wilhelm et al., 2003). Das zeigen auch die Untersuchungen von Tautzenberger et al. (2010), die humane MSZ mit an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Polystyrol-Nanopartikel mit Vinyl-Phosphonsäure (VPA) als Copolymer markierten. Die 210 nm großen, durch die Phosphonate negativ geladenen Partikel, wurden in Endosomen der Zellen nachgewiesen. VSOP, deren Citrathülle negativ geladen ist, haben insofern einen Vorteil gegenüber Dextran-beschichteten, positiv geladenen SPIO. Fleige et al. (2002) zeigten eine Überlegenheit von VSOP gegenüber USPIO hinsichtlich der Markierungseffizienz von Makrophagen. Die Aufnahme von VSOP in die Zelle geschieht vor allem via Phagozytose. Farrell et al. (2008) benutzten SPIO mit einem Durchmesser über 100 nm (Endorem), die den Einsatz von Lipofectamin als Transfektionsagenz erforderten.

VSOP wurden bereits klinisch am Menschen erfolgreich als MR-Kontrastmittel zur Beurteilung der Koronararterien eingesetzt (Taupitz et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden VSOP C200 mit einem Durchmesser von 12 nm und Citrat-Hülle benutzt. VSOP gelangen ohne Transfektionsagentien ins Zytoplasma. Heymer et al. (2008) haben ein Markierungsprotokoll für MSZ mit diesen Partikeln etabliert und die intrazelluläre Aufnahme der VSOP histologisch sowohl in der Zellkultur, als auch im Kollagen-I-Hydrogel nachweisen können. Massenspektroskopisch ergab sich ein Eisengehalt von $4,59 \pm 2,01$ pg pro Zelle im Vergleich zum Eisengehalt von $0,22 \pm 0,15$ pg in nicht-markierten MSZ. Syková et al. (2009) bestimmten einen Eisengehalt von 17 pg pro Zelle nach dreitägiger Markierung von Ratten-MSZ mit dextranbeschichteten SPIO (Endorem). Bei einem im klinischen Alltag verwendeten MRT mit einer Feldstärke von 1,5 T können einzelne Zellen in vivo

ab einer Konzentration von 1,4 – 3 pg Eisen pro Zelle sichtbar gemacht werden (Bulte und Kraitchman, 2004). Die erfolgreiche VSOP-Aufnahme und Darstellbarkeit von VSOP-markierten MSZ wurde somit bereits nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde dasselbe Protokoll verwendet und deshalb auf die quantitative Eisenbestimmung und histologische Sicherung der Eisenoxid-Aufnahme in der Zellkultur verzichtet.

Eisenoxidpartikel sind zwar biokompatibel (Syková et al., 2009), jedoch resultiert ein Anstieg der freien intrazellulären Eisenkonzentration in oxidativem Stress, was zur Zellschädigung und zum Zelltod führen kann. Intrazelluläres chelatgebundenes Eisen kann in gewissen Konzentrationen zur Apoptose und DNA-Fragmentierung führen (Sun et al., 2005). Deshalb muss vor der klinischen Einführung der Zell-Markierung mit Eisenoxidpartikeln der noch nicht ausreichend geklärte Einfluss auf die Morphologie, Vitalität und Differenzierung von MSZ untersucht werden.

4.1.4 Histologische Methoden und Morphologie der Konstrukte

Die Morphologie der hier untersuchten MSZ in dreidimensionaler Kultur auf OPLA-Trägern wurde mittels kryofixierten Schnitten in der H/E- und Berliner Blau Färbung untersucht. Histologisch zeigten sich die Zellen in beiden Gruppen spindelförmig und fortsatzreich, wie für undifferenzierte MSZ typisch (Raimondo et al., 2006; Wagner und Ho, 2007). Der faserartige Aufbau des Scaffolds kam ebenfalls zur Darstellung. Histologisch auffällig waren die mäßige Besiedelung der zentralen Bereiche des Scaffolds und eine Betonung der Randbereiche. Diese Beobachtung wird im folgenden Abschnitt näher analysiert.

Spezielfärbungen, wie z.B. die van Kossa oder Alizarin Rot Färbung, werden zum histologischen Nachweis einer mineralisierten EZM durchgeführt. Da bei der Planung der vorliegenden Versuche nicht von einer osteogenen Differenzierung der MSZ ausgegangen wurde, weil kein osteogenes Induktionsmedium benutzt wurde, wurde auf diese Färbungen verzichtet. Wie sich allerdings in den Genexpressionsanalysen zeigte, wurden osteogene Markergene in den Konstrukten exprimiert. In nachfolgenden Versuchen

könnten die erwähnten Spezialfärbungen nachgeholt werden, um zu überprüfen, ob sich die Genexpression tatsächlich auch in der Bildung einer mineralisierten Matrix widerspiegelt. Dies würde eine osteogene Differenzierung der MSZ allein durch die besonderen dreidimensionalen Kulturbedingungen im OPLA-Scaffold belegen.

Die VSOP-Partikel kamen in der Berliner Blau Färbung intrazellulär zur Darstellung. SPIO- und USPIO-Partikel wurden elektronenmikroskopisch in Lysosomen, Endosomen und glatten Vesikeln von MSZ oder Zellen mesenchymaler Herkunft nachgewiesen (Arbab et al., 2003; Schäfer et al., 2009; Sun et al. 2005). In unserer Arbeitsgruppe wurden VSOP-markierte MSZ in Kollagen-I-Hydrogelen histologisch untersucht. In der H/E-Färbung wurde eine perinukleäre zytoplasmatische Anreicherung beschrieben (Heymer et al., 2008). Die histologischen Schnitte der vorliegenden Arbeit zeigen ebenfalls eine punktförmige zytoplasmatische Anreicherung der VSOP. Die Lokalisation in membranumschlossenen Vesikeln kann vermutet werden. Die Ergebnisse zeigen in Analogie zu Heymer et al. (2008), dass eine VSOP-Markierung von MSZ auch möglich ist, wenn die Zellen auf OPLA-Scaffolds kultiviert werden.

Es existieren verschiedene andere Methoden der Präparation von stammzellbesiedelten Konstrukten für die histologische Diagnostik. Die klassische Paraffin-Einbettung hat den Nachteil, dass sich die Laktat-basierten Scaffolds während der vorher nötigen Entwässerung in Alkohol auflösen. Somit kann die Scaffold-Architektur nicht dargestellt werden, was auch zu Darstellungsartefakten der Zell-Morphologie führt. Technovit 8100 ist ein kaltpolymerisierender Kunststoff (Methacrylat), der die Scaffold-Struktur erhält (Reichert et al., 2009). Das Einbetten in Technovit ist zeitaufwendig, jedoch können sehr feine Schnitte auch von mineralisiertem Gewebe hergestellt werden. Die Darstellung der Morphologie ist sehr fein möglich. Die hier verwendete Kryokonservierung ist eine kosten- und zeiteffizientere Methode und erhält ebenfalls die Scaffold-Struktur. Das Material muss nicht entkalkt werden. Der Nachteil liegt in der etwas ungenaueren Darstellung im Vergleich zur Kunststoff-Einbettung.

4.1.5 DNA-Quantifizierung und Vitalität der MSZ in den Konstrukten

Es existieren unterschiedliche Möglichkeiten die Vitalität von MSZ zu untersuchen. In Monolayer-Kulturen kann die Anzahl von Colony Forming Units (CFU) oder einzelnen Zellen nach Labeling gezählt werden und diese mit nicht-markierten verglichen werden. In dreidimensionaler Kultur bieten sich photometrische Bestimmungen von Stoffwechselendprodukten oder DNA an. Darüber können indirekt Aussagen über Proliferation oder Zellzahlentwicklung getroffen werden. Der Alamar Blue Test ist ein Redox-Indikator, der seine Farbe je nach Vorhandensein eines reduzierten Produkts im Medium ändert. Damit zeigt er die metabolische Aktivität der Zellen an, und es ergibt sich eine Proportionalität zum Zellwachstum. Da PLA-Scaffolds den pH-Wert des Mediums verändern können, sind Verfälschungen bei dieser Methode denkbar. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt, der eine indirekte Beurteilung der Zellvitalität erlaubt.

Die grafische Gegenüberstellung des DNA-Gehalts über die Zeit in den beiden Gruppen suggeriert eine anfängliche Zellproliferation in beiden Gruppen. Ab Tag 7 (bzw. Tag 14 in der VSOP-Gruppe) sank der DNA-Gehalt in den Scaffolds in beiden Gruppen. Diese Ergebnisse korrelierten mit den histologischen Beobachtungen der mäßig dichten Besiedelung und Betonung der Randbereiche. Die Kulturbedingungen im Scaffold schienen also unabhängig von der VSOP-Markierung in beiden Gruppen nicht optimal zu sein. Dies ist am ehesten durch eine unzureichende Versorgung der Zellen mit Nährmedium zu erklären. Die makroskopisch beobachtete Kontraktion der Scaffolds könnte die Versorgung der Zellen mit Nährmedium zusätzlich einschränken. Cancedda et al. (2003) beschrieben das Knochenwachstum nach Implantation von MSZ-besiedelten Hydroxylapatit-Scaffolds für die Therapie von segmentalen Knochendefekten in vivo bei Schafen und beobachteten ein besseres Knocheneinwachsen an den Scaffoldrändern im Vergleich zu den Zentren. Durch konventionelle Techniken hergestellte Scaffolds bieten, verglichen mit natürlichem Knochengewebe, in vitro keine optimalen Wachstumsbedingungen, vorrangig bedingt durch den Mangel an Wachstumsfaktoren, mechanischer Stimulation, wechselnder Matrix und Blutgefäßversorgung (Sachlos und

Czernuszka, 2003; Ge et al., 2009). Rath et al. (2012) zeigten eine Überlegenheit von dynamischen Kulturbedingungen (Perfusionskammer) im Hinblick auf Zelldichte und metabolische Aktivität von Osteoblasten und MSZ auf mittels 3DP hergestellten Komposit-Scaffolds. In den dynamisch kultivierten Scaffolds war die Zelldichte im Zentrum der Scaffolds höher. Heutzutage werden insbesondere für in vivo Versuche diejenigen Scaffolds bevorzugt, die mittels moderner Techniken, wie z.B. der SFF, hergestellt werden, weil die Geometrie des Scaffolds optimal an die Anforderungen angepasst werden kann (Hutmacher und Cool, 2007, Reichert et al., 2011).

Ein VSOP-induzierter Unterschied der Proliferationsfähigkeit der MSZ in den Konstrukten ist nicht zu vermuten, da der DNA-Gehalt trotz großer Abweichungen am Tag 7 nach 21 Tagen sehr ähnliche Werte in beiden Gruppen annahm, wie die Bestimmung des SRM zeigte. Um eine signifikante Aussage über die Entwicklung des DNA-Gehaltes der beiden Gruppen im zeitlichen Verlauf treffen zu können, müsste die Stichprobenzahl pro Gruppe allerdings auf mindestens $n = 64$ pro Tag erhöht werden. Erst ab dieser Stichprobengröße würden statistische Verfahren (wie z.B. der T-Test) sinnvoll anwendbar sein.

4.1.6 RT-PCR und Differenzierung der MSZ in den Konstrukten

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von VSOP auf die Expression von osteogenen Markergenen durch MSZ in dreidimensionaler Kultur ohne osteogenes Differenzierungsmedium untersucht.

Hinweise auf osteogene Differenzierung von Stammzellen können durch histologische Färbungen oder Gewinnung und Vervielfältigung von osteogenen Markergenen im Sinne einer PCR gewonnen werden. Das Ausmaß der Matrix-Mineralisierung werden beispielsweise in der Alizarin Rot Färbung als violett-rote und in der von Kossa Färbung als braun-schwarze Strukturen deutlich.

Osteogene Marker werden von reifen Osteoblasten im Laufe ihrer Differenzierung exprimiert und variieren typischerweise im zeitlichen Verlauf. ALP und COL I gelten als frühe Marker der osteoblastären Differenzierung, wohingegen BSP und OC später exprimiert werden (Marie und Fromigué, 2006;

Reichert et al., 2009; Montjovent et al, 2005). ALP zeigt die Matrixbildung an und ist damit ein wichtiger Marker für die Osteoblastenfunktion (Ge et al., 2009). Die Expression des OC-Gens kennzeichnet den Beginn der Knochenmineralisierung (Marie und Fromigué, 2006). ON ist für die Kalzifizierung von Kollagen I verantwortlich (Rath et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit waren alle untersuchten osteogenen Markergene nachweisbar. ALP wurde in der Anfangsphase vermehrt exprimiert.

Die Expressionsbestimmung des Housekeeping-Gens EF1 α als Kontrolle ist ein Qualitätsmerkmal der durchgeführten PCR. EF1 α wird in jeder Zelle unabhängig von der Intervention (hier also die VSOP-Markierung) gleich stark exprimiert. Wird das Housekeeping-Gen schwächer exprimiert, wie im vorliegenden Fall an den Tagen 0, 21 und 28 in beiden Gruppen, so ist von einem Stichprobenfehler (sample-to-sample variation) auszugehen. Die RNA-Expression der genannten Tage ist also nicht mit derjenigen der Tage 3, 7 und 14 vergleichbar. Gründe für die verminderte EF1 α -Expression können Variationen im isolierten RNA-Gehalt, der Intaktheit der gewonnenen RNA oder Pipettierungsfehler sein.

Obwohl kein osteogenes Differenzierungsmedium benutzt wurde, ließen sich osteogene Markergene in beiden Gruppen nachweisen. Für diese Ergebnisse sind zwei Deutungen denkbar. Entweder existiert eine VSOP-unabhängige Baseline-Expression von osteogenen Markergenen durch nicht-osteogen stimulierte MSZ, die durch das VSOP-Labeling nicht beeinflusst wird, oder die dreidimensionale Kultur im OPLA-Scaffold induziert eine osteogene Differenzierung der MSZ. Zur Überprüfung letztgenannter These könnte die Expression der entsprechenden Gene in Monolayer Kulturen mit der Genexpression im Scaffold verglichen werden. Mit Hilfe einer Spezialfärbung zum Nachweis von mineralisierter Knochenmatrix oder ALP könnte die tatsächliche osteogene Differenzierung der MSZ gezeigt werden und damit die Theorie der osteogenen Induktion durch den Träger bewiesen werden. Dies war jedoch nicht Ziel der vorliegenden Arbeit. Das Vorhandensein einer Baseline-Expression von osteogenen Markern durch MSZ könnte wie eine vermehrte

Neigung von nativen MSZ zur osteogenen Differenzierung im Vergleich zur chondrogenen und adipogenen Differenzierung verstanden werden.

Für MSZ-besiedelte Kollagen-I-Hydrogelkonstrukte mit nativen MSZ zeigten Reichert et al. (2009) einen osteoinduktiven Effekt allein durch Kultur der Konstrukte in SZM. Nach Zusatz von Dexamethason, Ascorbat-2-Phosphat und β -Glycerophosphat zum SZM konnte dieser Effekt verstärkt werden. Die Gele waren makroskopisch vermehrt kontrahiert. In der von Kossa und Alizarin Färbung zeigte sich eine Zunahme der mineralisierten Matrix. Die Zellen waren von spindelförmiger Morphologie und die RT-PCR zeigte eine Zunahme der osteogenen Marker OC, ALP, COL I und Cbfa-1.

Heymer et al. (2008) markierten humane MSZ ebenfalls mit VSOP. Die Auswirkungen auf die Differenzierung der Zellen wurden in Monolayer-Zellkultur und in Kollagen-I-Hydrogelen untersucht. Es wurde kein Einfluss der VSOP-Markierung auf die adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung festgestellt.

Der Einfluss von SPIO auf die Differenzierung von MSZ in Monolayer-Kultur wurde bereits durch unterschiedliche Arbeitsgruppen untersucht. Gemäß der MSZ-Definition von Pittenger et al. (1999) wurde eine SPIO-unabhängige osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierungsfähigkeit von SPIO-markierten MSZ nachgewiesen (Schäfer et al., 2009; Heymer et al., 2008). Kostura et al. (2004) beschrieben dagegen Einschränkungen der chondrogenen Differenzierungsfähigkeit von SPIO-markierten MSZ. Farrell et al. (2008) zeigten, dass die adipogene und chondrogene Differenzierung von MSZ mit entsprechender Genexpression trotz SPIO-Labeling normal möglich ist. Bei der osteogenen Differenzierung zeigten sich 13 Tage nach SPIO-Labeling in der Zellkultur Veränderungen der EZM mit fraglicher Externalisierung der Eisenpartikel und eine verminderte Expression von Cbfa-1. Eine verminderte Expression von Cbfa-1 wurde in den vorliegenden Versuchen ab Tag 21 in beiden Gruppen nachgewiesen, wobei kein osteogenes Differenzierungsmedium benutzt wurde und der Effekt der Eisenpartikel auf die Genexpression nicht in der Zellkultur, sondern auf OPLA-Scaffolds untersucht wurde. Eine Externalisierung der VSOP-Partikel nach 4-wöchiger Kultur war in

den vorliegenden Versuchen nicht festzustellen. In den vorliegenden Versuchen zeigte sich allerdings eine vermehrte Expressionaktivität von BSP in der VSOP-Gruppe.

4.2 Zukunftsperspektiven

Nach Hutmacher und Cool (2007) unterliegt die Heilung und Rekonstruktion von Knochendefekten einem Paradigmenwechsel von der Autotransplantation und Prothesenversorgung zur Applikation von Tissue Engineering Konstrukten. Zurzeit ist der Goldstandard allerdings weiterhin die Autotransplantation (Kneser et al., 2006). Vor der klinischen Einführung von Tissue Engineering Konstrukten müssen noch viele Fragen beantwortet werden. Ein Kernproblem scheint die Vaskularisierung von größeren Konstrukten zu sein (Kneser et al., 2006; Khademhosseini et al., 2009; Reichert et al., 2011). Bei unzureichender Durchbauung der Konstrukte mit Blutgefäßen sterben die transplantierten Zellen im Konstrukt vor dem natürlichen Einsprossen der Kapillaren des Empfängergewebes ab. Die Diffusionsstrecke von Sauerstoff und Nährstoffen im menschlichen Gewebe ohne Blutgefäße beträgt 100-200 µm (Griffith et al., 1997; Hutmacher und Cool, 2007). Die SFF-Techniken der Scaffold-Produktion eröffnen neue Möglichkeiten diesem Problem durch die Integration von blutgefäßähnlichen Strukturen in den Scaffold (Griffith et al., 1997) zu begegnen. Die axiale Vaskularisierung von Konstrukten durch AV-Loops wurde bereits im Tiermodell erprobt (Kneser et al., 2006). Die in vitro Kulturbedingungen für Konstrukte können durch Bioreaktoren und Verwendung von Perfusionskammern, die einen Nährmediumsfluss ermöglichen, verbessert werden (Rath et al., 2012). Der Einsatz von Wachstumsfaktoren und anderen Biomolekülen in Konstrukten ist ebenfalls ein Thema, welches intensiv beforscht wird. Für die Knochenregeneration spielen BMP, FGF, TGF-β (Transforming Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor) und HS (Heparin-Sulfat) eine Rolle (Hutmacher und Cool, 2007; Hutmacher et al., 2012). Des Weiteren ist der in vivo Nachweis der transplantierten Zellen im Konstrukt interessant. Die hier beschriebene Markierungsmethode von MSZ im Tissue Engineering Konstrukt hat das

Potential, Erkenntnisse über die Migration der eingebrachten Zellen in vivo zu liefern. Der intrazelluläre Nachweis von VSOP in MSZ in vivo ist mittels MRT bereits erfolgt. Heymer et al. (2008) verwendeten ein MRT mit einer Feldstärke von 11,7 T zur erfolgreichen Visualisierung von Zellen in Kollagen-Hydrogelen in vitro, wohingegen Wang et al. (2009) den Nachweis im MRT mit klinisch verwendbaren Feldstärken von 1,5 - 3 T im Tiermodell erbracht haben. Die Zellmarkierung in diesem Kontext kann auch hilfreich sein bei der Determination, welche Rolle die eingebrachten MSZ bei der Knochenregeneration hauptsächlich übernehmen; Differenzierung oder Signalübermittlung. Letztendlich wird die Einführung von Tissue Engineering Konstrukten für den Knochenersatz im Menschen mit in vitro expandierten und kultivierten Zellen nur möglich sein, wenn Tiermodelle eine echte Überlegenheit der Konstrukte im Vergleich zur Autotransplantation zeigen und die Zellen in chemisch definierten Stammzellmedien ohne Verwendung von tierischen Proteinen (wie z.B. FCS) kultivierbar sind (Tonti und Mannello, 2008).

5. Zusammenfassung

Die direkte Markierung von Stammzellen ist ein etabliertes Verfahren, um Erkenntnisse über den Verbleib oder die Migration der Zellen nach Applikation in Form von Tissue Engineering Konstrukten zu gewinnen. Eisenoxidpartikel sind aufgrund der wiederholt möglichen, langen und nicht-invasiven Detektionsmöglichkeit in kernspintomographischen Untersuchungen im Sinne der molekularen Bildgebung in vivo und in vitro ohne den Einfluss von radioaktiver Strahlung eine sehr zukunftssträchtige Methode des direkten dualen Labellings von Stammzellen. VSOP sind besonders kleine Eisenpartikel, die durch ihre physikalischen Eigenschaften ohne die Verwendung von möglicherweise toxischen Hilfsmitteln per Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Die Auswirkungen des VSOP-Labellings von MSZ in Monolayer-Kulturen wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits untersucht. Da zum momentanen Zeitpunkt jedoch vergleichsweise wenige Erkenntnisse über die Auswirkungen der VSOP-Markierung von MSZ in dreidimensionaler Kultur auf Polylaktid-Trägern vorliegen, wurden OPLA-Scaffolds mit VSOP-markierten und nicht-markierten MSZ besiedelt, mit dem Ziel ein Tissue Engineering Konstrukt für die Rekonstruktion von Knochendefekten mit einer möglichen klinischen Anwendung zunächst in vitro zu untersuchen. Die klinische Anwendung von OPLA-Trägern ist aufgrund ihrer vollständigen Bioresorbierbarkeit und Biokompatibilität möglich. Die vorliegende Inaugural-Dissertation beschäftigt sich mit dem Einfluss der VSOP-Markierung von MSZ auf OPLA-Trägern im Hinblick auf Morphologie, Vitalität und Differenzierung über einen Zeitraum von 28 Tagen.

Histologisch war der intrazelluläre Eisen-III Nachweis mit Hilfe der Berliner Blau Färbung als Zeichen der gelungenen Eisenoxid-Markierung in der VSOP-Gruppe bis zum 28. Tag positiv. Morphologisch zeigten sich im Groben keine Unterschiede zwischen VSOP- und Kontrollgruppe bei ähnlicher Besiedelungsstruktur der Scaffolds mit Betonung der Randbereiche in beiden Gruppen.

Die morphologische Struktur stand in Korrelation mit den Ergebnissen der DNA-Konzentrationsbestimmung in den Konstrukten. Es zeigte sich in beiden Gruppen ein vergleichbarer DNA-Anstieg am Tag 3 nach Besiedelung und ein Abfall der DNA-Konzentration ab Tag 7 in der Kontrollgruppe, bzw. Tag 14 in der VSOP-Gruppe auf ein ähnliches Niveau in beiden Gruppen, welches ungefähr der DNA-Konzentration vor Besiedelung entsprach. Diese Beobachtungen zeigen am ehesten, dass die Vitalität der Zellen in den Konstrukten nicht VSOP-bedingt eingeschränkt ist, sondern von den äußeren Kulturbedingungen abhängig ist. Die Ergebnisse erreichten jedoch keine statistische Signifikanz aufgrund der zu geringen Stichprobengröße.

In der RT-PCR Analyse zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster fast aller untersuchter osteogener Marker in beiden Gruppen. Als VSOP-induzierten Effekt könnte lediglich die vermehrte Expression von BSP in der VSOP-Gruppe verstanden werden bei eingeschränkter Vergleichbarkeit der Proben aufgrund der inhomogenen Expression des Housekeeping-Gens. Erstaunlicherweise wurden alle osteogenen Marker in beiden Gruppen exprimiert, obwohl die Zellen nicht in osteogenem Induktionsmedium kultiviert wurden. Für diese Beobachtung gibt es zwei mögliche Erklärungen. Entweder haben MSZ in SZM in ihrem undifferenzierten Zustand eine Träger-unabhängige Tendenz zur osteogenen Differenzierung, was sich also in ihrer Baseline-Genexpression widerspiegelt, oder das OPLA-Scaffold induziert durch seine Struktur eine osteogene Differenzierung. Letztendlich bleibt der genaue Mechanismus in der vorliegenden Arbeit ungeklärt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die VSOP-Markierung von MSZ, wie bereits in anderen Studien gezeigt, auch in der dreidimensionalen Kultur auf OPLA-Scaffolds eine sichere und wenig zellbeeinflussende Methode ist, die damit zum Nachweis der Stammzellen nach Applikation in Form von Tissue Engineering Konstrukten dienen kann. Es ist die Aufgabe nachfolgender Studien, den Effekt von VSOP auf die BSP-Expression nochmals zu untersuchen. Die Anwendung des hier beschriebenen Tissue Engineering Konstrukts kann im Kleintiermodell zur Rekonstruktion von Bohrlochdefekten der Tibia angewendet werden. So können weitere Aufschlüsse zur MSZ-

Migration in vivo auch im Zusammenhang mit der Neoangiogenese bei der
Rekonstruktion von Knochendefekten gewonnen werden.

6. Literaturverzeichnis

Alexander D, Hoffmann J, Munz A, Friedrich B, Geis-Gerstorfer J, Reinert S. Analysis of OPLA scaffolds for bone engineering constructs using human jaw periosteal cells. *J Mater Sci Mater Med*. 19(3):965-74, 2008.

Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev*. 13;28(1):5-24, 1997.

Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H, Frank JA. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology*. 229(3):838-46, 2003.

BD Biosciences. BD™ Three Dimensional OPLA Scaffold – Guidelines for use, (http://www.bdbiosciences.com/external_files/dl/doc/manuals/live/web_enabled/354614_pug.pdf), Stand 22.05.2002.

Bengel FM, Schachinger V, Dimmeler S. Cell-based therapies and imaging in cardiology. Review. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 32(2):404-16, 2005.

Berner A, Siebenlist S, Reichert JC, Hendrich C, Nöth U. Reconstruction of osteochondral defects with a stem cell-based cartilage-polymer construct in a small animal model. German. *Z Orthop Unfall*. 148(1):31-8, 2010.

Bonnemain B. Nanoparticles: the industrial viewpoint. Applications in diagnostic imaging. Article in French. *Ann Pharm Fr*. 66(5-6):263-7, 2008.

Botta R, Migliaccio G. Cell-based treatments: advanced therapies and transplants. *Transplant Proc*. 43(1):338-40, 2011.

Brekke JH, Toth JM. Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis. *J Biomed Mater Res.* 43(4):380-98, 1998.

Bulte JW, Kraitchman DL. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. Review. *NMR Biomed.* 17(7):484-99, 2004.

Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G, Derubeis A, Muraglia A, Quarto R. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. Review. *Novartis Found Symp.* (249):133-43; discussion 143-7, 170-4, 239-41, 2003.

Caplan AI. Cell and molecular strategies for massive bone repair/regeneration. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* 63(5):692-9, 1989.

Chu CR, Monosov AZ, Amiel D. In situ assessment of cell viability within biodegradable polylactic acid polymer matrices. *Biomaterials.* 16(18):1381-4, 1995.

Evans GR, Brandt K, Widmer MS, Lu L, Meszlenyi RK, Gupta PK, Mikos AG, Hodges J, Williams J, Gürlek A, Nabawi A, Lohman R, Patrick CW Jr. In vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials.* 20(12):1109-15, 1999.

Farrell E, Wielopolski P, Pavljasevic P, van Tiel S, Jahr H, Verhaar J, Weinans H, Krestin G, O'Brien FJ, van Osch G, Bernsen M. Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 16;369(4):1076-81, 2008.

Fleige G, Seeberger F, Laux D, Kresse M, Taupitz M, Pilgrimm H, Zimmer C. In vitro characterization of two different ultras-small iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking. *Invest Radiol.* 37(9):482-8, 2002.

Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. Review. *Int Rev Cytol.* 47:327-59, 1976.

Gardin C, Ferroni L, Favero L, Stellini E, Stomaci D, Sivoletta S, Bressan E, Zavan B. Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction. *Int J Mol Sci.* 13(1):737-57, 2012.

Ge Z, Wang L, Heng BC, Tian XF, Lu K, Fan VTW, Yeo JF, Cao T, Tan E. Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts within 3D printed Poly-Lactic-co-Glycolic Acid Scaffolds. *J Biomater Appl.* (23):533, 2009.

Gildehaus FJ, Haasters F, Drosse I, Wagner E, Zach C, Mutschler W, Cumming P, Bartenstein P, Schieker M. Impact of indium-111 oxine labelling on viability of human mesenchymal stem cells in vitro, and 3D cell-tracking using SPECT/CT in vivo. *Mol Imaging Biol.* 13(6):1204-14, 2011.

Griffith LG, Wu B, Cima MJ, Powers MJ, Chaignaud B, Vacanti JP. In vitro organogenesis of liver tissue. Review. *Ann N Y Acad Sci.* 31(831):382-97, 1997.

Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone.* 13(1):81-8, 1992.

Hee CK, Jonikas MA, Nicoll SB. Influence of three-dimensional scaffold on the expression of osteogenic differentiation markers by human dermal fibroblasts. *Biomaterials.* 27(6):875-84, 2006.

Heymer A, Haddad D, Weber M, Gbureck U, Jakob PM, Eulert J, Nöth U. Iron oxide labelling of human mesenchymal stem cells in collagen hydrogels for articular cartilage repair. *Biomaterials.* 29(10):1473-83, 2008.

Heymer A, Bradica G, Eulert J, Nöth U. Multiphasic collagen fibre-PLA composites seeded with human mesenchymal stem cells for osteochondral defect repair: an in vitro study. *J Tissue Eng Regen Med.* 3(5):389-97, 2009.

Hutmacher DW, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 21:2529-2543, 2000.

Hutmacher DW, Cool S. Concepts of scaffold-based tissue engineering--the rationale to use solid free-form fabrication techniques. Review. *J Cell Mol Med.* 11(4):654-69, 2007.

Hutmacher DW, Woodruff MA, Shakesheff K, Guldberg RE. Direct fabrication as a patient-targeted therapeutic in a clinical environment. *Methods Mol Biol.* (868):327-40, 2012.

Jäger M, Feser T, Denck H, Krauspe R. Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured onto three different polymers in vitro. *Ann Biomed Eng.* 33(10):1319-32, 2005.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 64(2):295-312, 1997.

Jones AC, Arns CH, Sheppard AP, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Knackstedt MA. Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT. *Biomaterials.* 28(15):2491-504, 2007.

Jones E, Yang X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. Review. *Injury.* 42(6):562-8, 2011.

Keating A. Mesenchymal stromal cells. Review. *Curr Opin Hematol.* 13(6):419-25, 2006.

Khademhosseini A, Vacanti JP, Langer R. Progress in tissue engineering. *Sci Am.* 300(5):64-71, 2009.

Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. Review. *J Cell Mol Med.* 10(1):7-19, 2006.

Kostura L, Kraitchman DL, Mackay AM, Pittenger MF, Bulte JW. Feridex labeling of mesenchymal stem cells inhibits chondrogenesis but not adipogenesis or osteogenesis. *NMR Biomed.* 17(7):513-7, 2004.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Review. *Science.* 14;260(5110):920-6, 1993.

Lohberger B, Payer M, Rinner B, Bartmann C, Stadelmeyer E, Traunwieser E, Devaney T, Jakse N, Leithner A, Windhager R. Human Intraoral Harvested Mesenchymal Stem Cells. Characterization, Multilineage Differentiation Analysis, and 3-Dimensional Migration of Natural Bone Mineral and Tricalcium Phosphate Scaffolds. *J Oral Maxillofac Surg.* 70(10):2309-15, 2012.

Marie PJ, Fromigué O. Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. Review. *Regen Med.* 1(4):539-48, 2006.

Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med.* 3(1):1-5, 2008.

Mathieu LM, Mueller TL, Bourban PE, Pioletti DP, Müller R, Månson JA. Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 27(6):905-16, 2006.

Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. Review. *Tissue Eng.* 11(5-6):787-802, 2005.

Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 114:185-99, 2009.

Mödder UI, Khosla S. Skeletal stem/osteoprogenitor cells: current concepts, alternate hypotheses, and relationship to the bone remodeling compartment. Review. *J Cell Biochem.* 103(2):393-400, 2008.

Montjovent MO, Mathieu L, Hinz B, Applegate LL, Bourban PE, Zambelli PY, Månson JA, Pioletti DP. Biocompatibility of bioresorbable poly(L-lactic acid) composite scaffolds obtained by supercritical gas foaming with human fetal bone cells. *Tissue Eng.* 11(11-12):1640-9. 2005.

Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res.* 20(5):1060-9, 2002a.

Nöth U, Tuli R, Osyczka AM, Danielson KG, Tuan RS. In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 8(1):131-44, 2002b.

Nöth U, Rackwitz L, Heymer A, Weber M, Baumann B, Steinert A, Schütze N, Jakob F, Eulert J. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *J Biomed Mater Res A.* 1;83(3):626-35, 2007.

Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. Review. *Stem Cell Rev.* 1(2):169-78, 2005.

Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. Review. *Ciba Found Symp.* 136:42-60, 1988.

Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. Review. Eur Cell Mater. 2(13):1-10, 2007.

Petite H, Vandamme K, Monfoulet L, Logeart-Avramoglou D. Strategies for improving the efficacy of bioengineered bone constructs: a perspective. Review. Osteoporos Int. 22(6):2017-21, 2011.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 284(5411):143-7, 1999.

Raimondo S, Penna C, Pagliaro P, Geuna S. Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells. J Anat. 208(1):3-12, 2006.

Rath SN, Strobel LA, Arkudas A, Beier JP, Maier AK, Greil P, Horch RE, Kneser U. Osteoinduction and survival of osteoblasts and bone-marrow stromal cells in 3D biphasic calcium phosphate scaffolds under static and dynamic culture conditions. J Cell Mol Med. 16(10):2350-61, 2012.

Reichert JC, Heymer A, Berner A, Eulert J, Nöth U. Fabrication of polycaprolactone collagen hydrogel constructs seeded with mesenchymal stem cells for bone regeneration. Biomed Mater. 4(6):065001, 2009.

Reichert JC, Wullschleger ME, Cipitria A, Lienau J, Cheng TK, Schütz MA, Duda GN, Nöth U, Eulert J, Hutmacher DW. Custom-made composite scaffolds for segmental defect repair in long bones. Int Orthop. 35(8):1229-36, 2011.

Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of

tissue engineering scaffolds. Review. *Eur Cell Mater.* 30(5):29-39; discussion 39-40, 2003.

Saldanha KJ, Piper SL, Ainslie KM, Kim HT, Majumdar S. Magnetic resonance imaging of iron oxide labelled stem cells: applications to tissue engineering based regeneration of the intervertebral disc. *Eur Cell Mater.* 1(16):17-25, 2008.

Schäfer R, Kehlbach R, Müller M, Bantleon R, Kluba T, Ayturan M, Siegel G, Wolburg H, Northoff H, Dietz K, Claussen CD, Wiskirchen J. Labeling of human mesenchymal stromal cells with superparamagnetic iron oxide leads to a decrease in migration capacity and colony formation ability. *Cytherapy.* 11(1):68-78, 2009.

Schumann D, Ekaputra AK, Lam CX, Hutmacher DW. Biomaterials/scaffolds. Design of bioactive, multiphasic PCL/collagen type I and type II-PCL-TCP/collagen composite scaffolds for functional tissue engineering of osteochondral repair tissue by using electrospinning and FDM techniques. *Methods Mol Med.* (140):101-24, 2007.

Strand BL, Ryan TL, In't Veld P, Kulseng B, Rokstad AM, Skjak-Brek G, Espevik T. Poly-L-Lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines. *Cell Transplant.* 10(3):263-75, 2001.

Stüber JC. In vitro Untersuchungen zur Rekonstruktion von Meniskusdefekten mit mesenchymalen Stammzellen eingebettet in Polylaktid-Kollagen I-Hydrogelkonstrukten. Dissertation, 2007.

Sun R, Dittrich J, Le-Huu M, Mueller MM, Bedke J, Kartenbeck J, Lehmann WD, Krueger R, Bock M, Huss R, Seliger C, Gröne HJ, Misselwitz B, Semmler W, Kiessling F. Physical and biological characterization of superparamagnetic iron oxide- and ultrasmall superparamagnetic iron oxide-labeled cells: a comparison. *Invest Radiol.* 40(8):504-13, 2005.

Syková E, Jendelová P, Herynek V. MR tracking of stem cells in living recipients. *Methods Mol Biol.* 549:197-215, 2009.

Taupitz M, Wagner S, Schnorr J, Kravec I, Pilgrimm H, Bergmann-Fritsch H, Hamm B. Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrystalline very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol.* 39(7):394-405, 2004.

Tautzenberger A, Lorenz S, Kreja L, Zeller A, Musyanovych A, Schrezenmeier H, Landfester K, Mailänder V, Ignatius A. Effect of functionalised fluorescence-labelled nanoparticles on mesenchymal stem cell differentiation. *Biomaterials.* 31(8):2064-71, 2010.

Tonti GA, Mannello F. From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera?. Review. *Int J Dev Biol.* 52(8):1023-32, 2008.

Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Review. *Arthritis Res Ther.* 5(1):32-45, 2003.

Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells.* 21(6):681-93, 2003.

Tuli R, Nandi S, Li WJ, Tuli S, Huang X, Manner PA, Laquerriere P, Nöth U, Hall DJ, Tuan RS. Human mesenchymal progenitor cell-based tissue engineering of a single-unit osteochondral construct. *Tissue Eng.* 10(7-8):1169-79, 2004.

Vögelin E, Jones NF, Huang JI, Brekke JH, Lieberman JR. Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. *J Bone Joint Surg Am.* 87(6):1323-31, 2005.

Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations - comparing apples and oranges. Review. *Stem Cell Rev.* 3(4):239-48, 2007.

Wang HH, Wang YX, Leung KC, Au DW, Xuan S, Chak CP, Lee SK, Sheng H, Zhang G, Qin L, Griffith JF, Ahuja AT. Durable mesenchymal stem cell labelling by using polyhedral superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemistry.* 15(45):12417-25, 2009.

Weir C, Morel-Kopp MC, Gill A, Tinworth K, Ladd L, Hunyor SN, Ward C. Mesenchymal stem cells: isolation, characterisation and in vivo fluorescent dye tracking. *Heart Lung Circ.* 17(5):395-403, 2008.

Widmer MS, Gupta PK, Lu L, Meszlenyi RK, Evans GR, Brandt K, Savel T, Gurlek A, Patrick CW Jr, Mikos AG. Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials.* 19(21):1945-55, 1998.

Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri JC, Gazeau F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials.* 24(6):1001-11, 2003.

Williams JL, Lewis JL. Properties and an anisotropic model of cancellous bone from the proximal tibial epiphysis. *J Biomech Eng.* 104(1):50-6, 1982.

Zandstra PW, Nagy A. Stem cell bioengineering. Review. *Annu Rev Biomed Eng.* 3:275-305, 2001.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Humane MSZ aus dem Knochenmark in Monolayer-Kultur.....	8
Abb. 2 (A und B): SFF als neue Techniken der Scaffold-Produktion. (A) Schematische Darstellung des FDM (aus Sachlos und Czernuszka, 2003, mit freundlicher Genehmigung durch den Autor) (B) μ CT Darstellung eines mittels FDM hergestellten PDLLA-TCP-PCL-Scaffolds (aus Reichert JC, Wullschleger ME, Cipitria A, Lienau J, Cheng TK, Schütz MA, Duda GN, Nöth U, Eulert J, Hutmacher DW. Custom-made composite scaffolds for segmental defect repair in long bones. Int Orthop. 35(8):1229-36, 2011, Abb 1 a, S. 1231, mit freundlicher Genehmigung durch Springer Science+Business Media.).....	10
Abb. 3: Struktureller Vergleich von spongiösem Knochen (oben) und PLA-Scaffolds (unten) im μ CT (aus Mathieu LM, Mueller TL, Bourban PE, Pioletti DP, Müller R, Månson JA. Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials. 27(6):905-16, 2006, Abbildung 3, S. 910, mit freundlicher Genehmigung durch Elsevier.).....	11
Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.....	20
Abb. 5: Elektronenmikroskopische Struktur des OPLA-Scaffolds der Firma BD Biosciences (Quelle: http://www.bdbiosciences.ca/image_library/Faceted_OPLA3.jpg mit freundlicher Genehmigung durch BD Bioscience).	23
Abb. 6 (A-G): Stanzbohraufsatz und ausgestanzte OPLA-Scaffolds.	38
Abb. 7 (A-H): Lichtmikroskopische Darstellung der Morphologie MSZ-besiedelter OPLA-Scaffolds zu unterschiedlichen Zeitpunkten in H/E- und Berliner Blau (BB) gefärbten kryokonservierten Schnitten.	39
Abb. 8 (A-H): H/E Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ-besiedelten OPLA-Scaffolds.....	40
Abb. 9 (A-H): Berliner Blau (BB) Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ-besiedelten OPLA-Scaffolds.	41

Danksagungen

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Maximilian Rudert und Herrn Professor Dr. med. Jochen Eulert für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit in Ihrer Klinik zu forschen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Ulrich Nöth, dem Leiter der Abteilung für Tissue Engineering an der Orthopädischen Universitätsklinik König-Ludwig-Haus Würzburg und geschäftsführenden Oberarzt der Klinik, für die Anregung zur klinisch orientierten Stammzellforschung im Biochemiepraktikum des vierten Semesters, die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu forschen, die exzellente Betreuung und Geduld während der Arbeit und die Möglichkeit der Teilnahme und Postervorstellung auf dem WITE-Kongress (Würzburger Initiative Tissue Engineering), die zusätzlich für eine wissenschaftliche Basis gesorgt haben.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Osteologiezentrums und des wissenschaftlichen Labors am König-Ludwig-Haus bedanken für die Einführung in die Benutzung der Geräte und Hilfestellung beim Erlernen verschiedenster Arbeitstechniken. Hervorzuheben sind insbesondere Dr. Meike Haddad-Weber, die mich sehr intensiv und freundschaftlich betreut hat, sowie Martina Regensburger, Rolf Mickler-Strauch und Christa Amrem.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner lieben Ehefrau, meinen Eltern und Schwiegereltern, meiner Familie und Freunden – hier möchte ich vor allem Dr. Jürgen Plötz und Professor Dr. Stephan Huth namentlich erwähnen - für Ihre hilfreiche Beratung und Unterstützung, das Verständnis für die Zeit, in der ich nicht anderweitig zur Verfügung stand, sowie die zahlreichen Motivationsanstöße zur Fertigstellung der Arbeit.

Lebenslauf

Andreas Lutz Heinrich Gerken

Dienstanschrift:

Chirurgische Klinik
Universitätsmedizin Mannheim
Theodor-Kutzer-Ufer 1-3
68167 Mannheim
E-mail: andreas.gerken@umm.de

AUSBILDUNG

1991 - 1995	Martinusgrundschule Mainz
1995 - 1998	Theresianum Mainz, katholisches Ganztagesgymnasium
1998 - 2004	Goethegymnasium Essen
2001 - 2002	Ampleforth College, York / England, Internat (Auslandsjahr 11. Klasse)
2002	AS-Levels in England (Mathematik, Physik, Latein, Volkswirtschaft)
26.06.2004	Allgemeine Hochschulreife (Goethegymnasium Essen)
2004-2005	Grundwehrdienst als Sanitätssoldat: Hamm/Westf. und BwZK Koblenz

FREMDSPRACHEN

Englisch	fließend, TOEFL Test Score 257 (03/2004)
Französisch	gute Kenntnisse (9.-10. Klasse, Sprachkurse Uni, PJ franz. Schweiz)
Schwedisch	gute Kenntnisse (autodidaktischer Kurs, PJ in Schweden)
Italienisch	ausbaufähige Grundkenntnisse (Sprachkurse Universität)

INTERESSEN

Musik:	Ausbildung als Chorist bei den Mainzer, Essener und Würzburger Domsingknaben, Klavier
Sport:	Ski Übungsleiter (DSV-Instructor), Tennis, Fahrrad, Bergsteigen

10/2004 – 03/2005 **Krankenpflegedienst:**
BwZK Koblenz, Abt. Orthopädie/Unfallchirurgie

04/2005 **Studium Humanmedizin:**
Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg

04/2007 Ester Abschnitt der ärztlichen Prüfung ("Physikum"), Note gut

10/2007 Beginn Promotion: König-Ludwig Haus Würzburg, Tissue Engineering

07/2009 Grundkurs: Tierschutz und Versuchstierkunde (40 Std)

14.06.2011 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note gut

Famulaturen:

09 – 10/2007 BwZK Koblenz, Abt. Orthopädie/Unfallchirurgie

08 – 09/2008 UniversitätsSpital Zürich, Abt. Onkologie

03/2009 Universität Würzburg, Abt. Kinderchirurgie

03 – 04/2009 Praxis Dr. Odenhausen (Essen), Abt. Allgemeinmedizin

08 – 09/2009 Main Klinik Ochsenfurt, Abt. Anästhesie

OP-Assistenz:

10/2009 – 02/2010 Main Klinik Ochsenfurt (studentische Hilfskraft, ca. 8 Std/Wo)

Praktisches Jahr:

22.02. – 13.06.10 Universität Lausanne, Lehrkrankenhaus Sion / Schweiz, Innere Medizin

14.06. – 03.10.10 Universität Umeå / Schweden, Orthopädie (Wahlfach)

04.10. – 26.12.10 Universität Denver / USA, Allgemein- und Transplantationschirurgie

BERUFLICHER WERDEGANG

12.07.2011 **Approbation** als Arzt

seit 01.10.2011 **Assistenzarzt** in der Weiterbildung, Common Trunk, Chirurgische Klinik, Universitätsmedizin Mannheim, Medizinische Fakultät der Universität Heidelberg (Prof. Dr. med. Stefan Post)

Vorträge:

04.-06.10.2012 16. Chirurgische Forschungstage, Regensburg: Gerken A L H, Haddad-Weber M, Mickler-Strauch R, Nöth. Herstellung von Tissue Engineering Konstrukten für den Knochenersatz mit humenen mesenchymalen Stromazellen (MSZ): Vergleich von Eisenoxid-markierten und nicht-markierten MSZ auf Polylaktid-Trägern im zeitlichen Verlauf hinsichtlich Morphologie, Viabilität und Differenzierung.

Poster:

23.-25.05.2012 Würzburger Initiative Tissue Engineering (WITE) Kongress, Würzburg: Gerken A L H, Haddad-Weber M, Mickler-Strauch R, Nöth U. Assembly of tissue engineering constructs for the reconstruction of bone: Investigation of iron oxide labelled vs. non-labelled mesenchymal stem cells seeded on polylactic acid scaffolds with regard to morphology, viability and differentiation.

Mannheim, den 01.08.2014