

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und
Rehabilitation

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

**Humane ASCs auf biphasischen Kalziumphosphat-Scaffolds als
potentielles Knochenersatzmaterial**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Theresa Luise Wiedenmann

aus Heidelberg

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter E. Müller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans-Joachim Andreß
Prof. Dr. Matthias Schieker

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. Maryna Bondarava

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2018

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINFÜHRUNG	8
1.1	Knochengewebe	8
1.1.1	Funktion, Entwicklung und Aufbau	8
1.1.2	Knochenzellen	9
1.1.3	Knochenmatrix	9
1.1.4	Knochenumbau und Frakturheilung	10
1.1.5	Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien	11
1.2	Tissue Engineering und Regenerative Medizin von Knochen	12
1.3	Mesenchymale Stroma-/Stammzellen (MSCs)	13
1.4	Fettgewebe als Stroma-/Stammzellreservoir (ASCs)	14
1.5	Scaffolds (Gerüstsubstanzen)	15
1.5.1	Biokeramik-Scaffolds auf Kalziumphosphatbasis	15
1.5.2	Rapid Prototyping Technik	16
1.6	Faktoren für eine osteogene Differenzierung von MSCs	16
1.6.1	Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)	17
1.6.2	Klinische Anwendung von BMPs	17
1.7	Klinischer Einsatz von tissue engineered Knochenersatzmaterial	18
1.8	Fragestellung	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Material	20
2.1.1	Verbrauchsgegenstände	20
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien, Lösungen	21
2.1.3	Laborgeräte	23
2.1.4	Primer	24
2.1.5	Antikörper	24
2.1.6	Software	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Arbeiten mit Zellkulturen	26
2.2.1.1	Allgemeine Arbeitsbedingungen und Zellkultivierung	26
2.2.1.2	Herstellung von Kulturmedien	26
2.2.1.3	Isolierung mesenchymaler Stroma-/Stammzellen aus Fettgewebe	28

2.2.1.4	Kultivierung in Kulturflaschen	29
2.2.1.5	Zellpassagierung	29
2.2.1.6	Zellzählung	30
2.2.1.7	Kryokonservierung	30
2.2.1.8	Auftauen von Zellen	31
2.2.2	ASC-Monolayerkulturen zur Immunfluoreszenzfärbung	31
2.2.2.1	Anlage von ASC-Monolayerkulturen zur Immunfluoreszenzfärbung	31
2.2.2.2	Zellfixierung von ASC-Monolayerkulturen	31
2.2.2.2.1	Herstellung von 4 % Paraformaldehyd (PFA)	31
2.2.2.3	Immunfluoreszenzfärbung von ASC-Monolayerkulturen	32
2.2.3	ASC-Kulturen auf Scaffolds	33
2.2.3.1	Beschreibung der Scaffolds	33
2.2.3.2	Versuchsansatz der Scaffoldkulturen	34
2.2.3.2.1	Vorbereitung der Scaffolds zur Besiedelung mit ASCs	35
2.2.3.2.2	Scaffoldbesiedelung mit ASCs	36
2.2.3.2.3	Scaffoldtransferierung	36
2.2.3.2.4	Mediumwechsel	36
2.2.3.3	Zellvitalitäts- und Proliferationstests	36
2.2.3.3.1	WST-1 Test	36
2.2.3.3.2	PicoGreen Assay	37
2.2.3.4	mRNA-Expressionsanalyse	38
2.2.3.4.1	RNA-Gewinnung	38
2.2.3.4.1.1	Probenasservation für die spätere RNA-Gewinnung	40
2.2.3.4.1.2	RNA-Gewinnung aus Zellen in Zellkulturflaschen	40
2.2.3.4.2	cDNA-Synthese	40
2.2.3.4.3	quantitative real time PCR (qRT-PCR)	41
2.2.3.5	Histologische Untersuchung der ASC-Scaffoldkulturen	43
2.2.3.5.1	Herstellung von Gefrierschnittpräparaten	43
2.2.3.5.1.1	Fixierung in PFA	43
2.2.3.5.1.2	Scaffoldeinbettung in Agarose	43
2.2.3.5.1.3	Entkalkung der Scaffolds	43
2.2.3.5.1.4	Einfrieren der entkalkten Proben	44
2.2.3.5.1.5	Herstellung der Gefrierschnitte	44
2.2.3.5.2	Histologische Färbungen	45
2.2.3.5.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	45
2.2.3.5.2.2	Picosirius-Red-Färbung	45
2.2.3.5.2.3	Immunfluoreszenzfärbung von Scaffoldkulturen	46
2.2.4	Auswertung	47
2.2.4.1	WST-1 Test und PicoGreen Assay	47
2.2.4.2	qRT-PCR	47
2.2.4.3	Statistische Auswertung	48

3	ERGEBNISSE	49
3.1	ASC-Monolayerkulturen	49
3.2	Immunologische Charakterisierung von ASC-Monolayerkulturen	49
3.3	Beschreibung der Scaffolds	51
3.4	Zellproliferation und –vitalität in Scaffoldkulturen	52
3.4.1	Scaffoldbesiedelung	52
3.4.2	WST-1 Test	52
3.4.3	PicoGreen Assay	53
3.5	Expression von Osteoblastenmarkern in Scaffoldkulturen (mRNA-Analysen)	55
3.5.1	Alkalische Phosphatase	55
3.5.2	Osteokalzin	56
3.5.3	Collagen 1	57
3.6	Histologie der Scaffoldkulturen	59
3.6.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	59
3.6.2	Picosirius-Red-Färbung	61
3.6.3	Immunfluoreszenzfärbungen von Scaffoldkulturen	62
3.6.3.1	Osteokalzin	62
3.6.3.2	Osteopontin	63
3.6.3.3	DMP-1	64
3.6.3.4	Sclerostin	65
3.6.3.5	CD 73, CD 90, CD 105	66
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	68
4	DISKUSSION	69
4.1	ASC-Monolayerkulturen	69
4.2	Scaffoldkulturen	72
4.2.1	Kulturbedingungen	72
4.2.2	Vitalität und Proliferation	73
4.2.3	Osteogene Differenzierung	74
4.2.3.1	mRNA-Expressionsmuster osteogener Markerproteine	74
4.2.3.2	Immunfluoreszenzfärbungen osteogener Markerproteine	77
4.2.3.3	Immunfluoreszenzfärbungen von ASC-Markern	78
4.2.4	Einfluss von rhBMP-2	79
4.2.5	Einsatz als Knochenersatzmaterial	80

5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	85
7	LITERATURVERZEICHNIS	88
8	DANKSAGUNG	96
9	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	97

1 EINFÜHRUNG

1.1 KNOCHENGEWEBE

1.1.1 FUNKTION, ENTWICKLUNG UND AUFBAU

Das Knochengewebe, ein besonders hartes Bindegewebe, gehört zusammen mit dem Knorpelgewebe zum Stützgewebe des menschlichen Körpers [1, 2]. Die Knochen erfüllen neben ihrer Stütz-, Schutz- und Skelettfunktion weitere wichtige Aufgaben als Teile des passiven Bewegungsapparates, metabolische Funktionen v.a. als Kalziumreservoir und enthalten das blutbildende Knochenmark [1, 2].

Die verschiedenen Bindegewebsarten, wie beispielsweise Fett- und Knorpelgewebe ebenso wie das Knochengewebe sind mesenchymalen Ursprungs, unterscheiden sich jedoch grundsätzlich durch die jeweiligen gewebstypisch differenzierten Bindegewebszellen und den Aufbau ihrer extrazellulären Matrix (EZM) [2]. Das Knochengewebe kennzeichnende ortsständige Bindegewebszellen sind die Osteoblasten und Osteozyten, die extrazelluläre Matrix ist als besonderes Kennzeichen des Knochengewebes verkalkt [2].

Vordere kraniofaziale Anteile des Schädelknochens und Dentin entstehen aus Neuralleistenzellen, hintere Anteile des Schädelknochens aus prächordalem Mesoderm, das Axenskelett geht aus dem paraxialen Mesoderm und das Extremitätenskelett aus dem Seitenplattenmesoderm hervor [3]. Während der Embryonalentwicklung kommt es an den Orten der späteren Knochenlokalisationen zu einer Mesenchymverdichtung in der sich osteochondrale Progenitorzellen entweder beim Vorgang der sogenannten desmalen Ossifikation zu Knochenmatrix synthetisierenden Osteoblasten differenzieren oder im Rahmen der endochondralen Ossifikation zu Chondrozyten, die ein Knorpelgerüst bilden, welches anschließend durch Knochen ersetzt wird [4].

Der während der Knochenentwicklung primär gebildete Knochen weist eine ungeordnete Organisation der Collagenfibrillen seiner Knochenmatrix auf und wird als Geflechtknochen bezeichnet, daraus entstehender Knochen mit einer lamellär strukturierten Anordnung der Collagenfibrillen wird Lamellenknochen genannt [5]. Der Hauptteil des Knochengewebes beim Erwachsenen ist in Form von Lamellenknochen angeordnet, der wiederum in einer spongiösen oder kompakten Form vorliegen kann [1]. In der Kompakta befinden sich Osteone die aus Speziallamellen, einen zentral gelegen Haverskanal konzentrisch umgebende Lamellen, bestehen, außerdem die zwischen den Osteonen gelegenen Schaltlamellen, die Überreste abgebauter Osteone darstellen und Generallamellen als innere und äußere Begrenzung der Kompakta [2]. Kompakter Knochen findet sich z.B. in den Diaphysen langer Röhrenknochen, außerdem umrahmt er den spongiösen Knochen von außen [1]. Die Spongiosa, auch trabekulärer Knochen genannt, mit unregelmäßig, jedoch etwa oberflächenparallel verlaufenden Knochenlamellen, ist beispielsweise Bestandteil der Wirbelkörper oder der Epiphysen der Röhrenknochen [2]. Das Periost ummantelt die äußere Knochenoberfläche, die Haverskanäle und die Markhöhle im Inneren werden von Endost ausgekleidet [1, 2].

1.1.2 KNOCHENZELLEN

In Knochengewebe finden sich mit Osteoblasten, Osteozyten, Saumzellen und Osteoklasten vier Arten spezifischer Knochenzellen [6].

Osteoblasten, die nur 4-6 % der ortsständigen Knochenzellen ausmachen, sind an der Knochenoberfläche gelegene kubische Zellen mit reichlich Zellorganellen die für die Proteinsynthese benötigt werden, wie raues Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und sekretorische Vesikel [6]. Sie synthetisieren und sekretieren EZM-Proteine, Bestandteile der unmineralisierten Matrix, dem Osteoid, zu dessen Verkalkung sie anschließend durch Matrixvesikel beitragen die aus ihrer Membranoberfläche entstehen und Ionen enthalten die Mineralkristalle bilden und freisetzen können [6, 7]. Ihre Funktion ist jedoch nicht auf die Bildung der Knochenmatrix begrenzt, werden ihnen doch auch endokrine Funktionen sowie eine Rolle in der Osteoklastenentwicklung und der Regulation hämatopoetischer Stammzellen zugeschrieben [7]. Osteoblasten können sich zu Osteozyten oder Saumzellen weiterentwickeln oder in Apoptose gehen [6, 7].

Werden Osteoblasten zunehmend von Osteoid umgeben, können sie sich zu Osteozyten differenzieren, wobei die Osteozyten mit einem Anteil von 90-95 % die weitaus am häufigsten vorkommenden Knochenzellen darstellen [7]. Reife Osteozyten sind vollständig von mineralisierter Matrix umgeben, jedoch über zahlreiche Zellfortsätze in Kanalikuli zur Zell-Zell-Kommunikation befähigt [7]. Sie sind in der Lage mechanische Reize zu verarbeiten, haben Einfluss auf die Regulation von Osteoblasten und Osteoklasten, spielen eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase und haben endokrine Funktionen [7].

Die Saumzellen, an der Knochenoberfläche gelegen, können den Kontakt zwischen Osteoklasten und Knochenmatrix und damit die Knochenresorption verhindern, aber auch Einfluss auf den Knochenumbau und die Osteoklastenentwicklung nehmen [6].

Im Unterschied zu den anderen Knochenzellen, die mesenchymalen Ursprungs sind [6], entwickeln sich die Osteoklasten aus granulocyte-macrophage colony forming units (CFU-GM) die wiederum von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen abstammt [8]. Ihre Hauptaufgabe ist der Abbau anorganischer wie auch organischer Knochenmatrix [9].

1.1.3 KNOCHENMATRIX

Die Knochenmatrix setzt sich zum einen aus organischen Komponenten, bedeutsam u.a. für die Biegsamkeit des Knochens und zum anderen aus anorganischen Bestandteilen, die zur Mineralisation und damit zur charakteristischen Härte des Knochens beitragen, zusammen und beeinflusst entscheidend die mechanischen Eigenschaften der Knochen [10].

Organische Bestandteile der Knochenmatrix setzen sich aus Collagenproteinen, die mit rund 90 % den größten Anteil darstellen und die im Knochen v.a. als Typ I Collagen vorliegen, und weiteren, über hundert verschiedenen nicht-collagenen EZM-Proteinen zusammen [6, 10]. Zu diesen nicht-collagenen EZM-Proteinen gehören matrizelluläre Proteine, small integrin-binding ligand-linked glycoproteins (SIBLINGs) zu denen u.a. DMP-1 und Osteopontin

gerechnet werden, carboxylierte Proteine wie Osteokalzin, small leucine rich proteoglycans (SLRPs) und Matrix Metalloproteinasen (MMPs) [10]. Die Mineralphase der Knochenmatrix wird durch Apatitkristalle gebildet, wobei Kalzium- und Phosphationen den größten Teil der anorganischen Komponenten darstellen [6, 11].

Hydroxyapatit mit der chemischen Formel $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ ist das Kalziumphosphatmaterial, das dem Knochenapatit kristallographisch betrachtet am meisten ähnelt [12]. Dennoch ist das Knochenmineral kein reines Hydroxyapatit, da beispielsweise auch andere Elemente Bestandteile der Apatitkristalle sein können, sodass das biologische Apatit, das das Mineral des Knochens bildet, als Karbonathydroxyapatit und näherungsweise mit der Formel $[(\text{Ca}, \text{Na}, \text{Mg})_{10}(\text{PO}_4, \text{HPO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH}, \text{Cl}, \text{F})_2]$ beschrieben werden sollte [11].

Nach erfolgter Kristallisationskernbildung als erster Schritt des Mineralisierungsprozesses wachsen Apatitkristalle durch Anlagerung weiterer Ionen innerhalb und zwischen den Collagenmolekülen bis schließlich eine vollständige Verkalkung der Knochenmatrix erreicht ist [13]. Nicht-collagene Proteine der EZM haben Funktionen als Regulatoren des Verkalkungsprozesses, auf den sie initiierend aber auch inhibierend wirken können [14].

1.1.4 KNOCHENUMBAU UND FRAKTURHEILUNG

Knochengewebe ist ein sehr dynamisches Gewebe in dem ständig Umbauvorgänge aus Knochenresorption und -neubildung stattfinden [15, 16], sodass im Erwachsenenalter innerhalb von ca. zehn Jahren das Skelett vollständig erneuert wird [16]. Diese Umbauprozesse erlauben eine Anpassung des Knochens an veränderte mechanische Bedingungen und den Ersatz geschädigten Knochens [15]. Knochen ist außerdem in der Lage einen Defekt ohne Bildung von Narbengewebe zu regenerieren [17].

Während des Knochenumbaus (bone remodeling) wird Knochen resorbiert und durch neu gebildeten Knochen ersetzt, sodass er seine Form und Größe beibehält [18]. Angestoßen wird der Umbauprozess durch apoptotische Osteozyten, wie sie beispielsweise aufgrund von Mikrorissen entstehen, die den Saumzellen Ort und Ausmaß des Defektes signalisieren [18]. Es bildet sich daraufhin ein bone remodeling compartment (BRC) mit Osteoblasten- und Osteoklasten-Vorläuferzellen [18]. Differenzierte und aktivierte Osteoklasten resorbieren dann den zu ersetzenden Knochen, der anschließend von den Osteoblasten neu synthetisiert wird [18].

Die Regeneration eines frakturierten Knochens kann durch verschiedenen Mechanismen erfolgen, die den Vorgängen während der Embryonalentwicklung nachempfunden sind und in einen endochondralen, einen primären und einen direkten Reparaturmechanismus oder die Distraktionsosteogenese unterteilt werden können, wobei die Art des Reparaturmechanismus vor allem von der Position der Frakturrenden zueinander abhängt und somit durch die Behandlungsstrategie beeinflusst werden kann [5]. Primäre Reparatur bei operativ stabilisierten Frakturen mit adaptierten Knochenfragmenten ohne Frakturspalt erfolgt durch die sofortige Bildung von Lamellenknochen in longitudinaler Orientierung [5]. Davon unterschieden wurde die direkte Reparatur, die ebenfalls einer stabilen operativen Fixierung

der Fraktur bedarf, aber einen Frakturspalt größer 0,1 mm aufweist, sodass der initiale Knochen rechtwinklig zu Knochenachse gebildet und in einem weiteren Schritt zum endgültigen Lamellenknochen umgewandelt werden muss [5]. Bei der Distraktionsosteogenese entsteht ebenfalls kein Knorpel im Distraktionsspalt, sondern erst Geflecht- und dann Lamellenknochen [5]. Sind die Frakturrenden nicht rigid fixiert sondern beweglich, wie es auch bei der Behandlung im Gipsverband auftritt, findet endochondrale Reparatur statt, in deren Rahmen sich knorpeliges Kallusgewebe bildet das anschließend durch Knochen ersetzt wird [5].

1.1.5 KNOCHENTRANSPLANTATE UND KNOCHENERSATZMATERIALIEN

Zur Behandlung von schlecht, verspätet oder nicht heilenden Knochentraumata, tumorassozierten Knochendefekten oder periprothetischen Osteolysen können Knochentransplantate eingesetzt werden um die Knochenheilung zu verbessern [16], ein, mit weltweit über 2 Millionen Knochentransplantationen im Jahr, häufig durchgeführter Eingriff [19].

Wichtige Eigenschaften, die zur Charakterisierung von Knochentransplantaten und -ersatzmaterialien verwendet werden, sind erstens die Osteokonduktion, eine Gerüstfunktion, die das Ansiedeln benötigter Zellen ermöglicht, zweitens die Osteoinduktion, die bewirkt, dass mesenchymale Stammzellen rekrutiert werden, wachsen und sich zu Chondroblasten und Osteoblasten differenzieren können, drittens die osteogenen Eigenschaften mit dem Vorhandensein von mesenchymalen Stammzellen und Knochenzellen innerhalb des Ersatzmaterials sowie viertens die Bereitstellung von struktureller Unterstützung [16].

Autologe Knochentransplantate gelten als Standardmaterial für Knochentransplantate, da sie sowohl osteokonduktive, osteoinduktive als auch osteogene Eigenschaften in sich vereinen, abhängig vom entnommenen Material teilweise auch strukturelle Unterstützung bieten und aufgrund ihrer Herkunft aus demselben Organismus sowohl die Übertragung von Infektionskrankheiten, als auch eine Abstoßungsreaktion durch das Immunsystem vermeiden können [16, 19, 20]. Autologes Knochenmaterial kann grundsätzlich an diversen Stellen entnommen werden [20, 21]. Der Beckenkamm hat sich hierbei als gut geeignete Entnahmestelle etabliert, die Gewinnung von autologem Material aus Femur und Tibia mittels eines neuen Systems, dem Reamer-Irrigator-Aspirator (RIA), könnte jedoch zukünftig neue Standards setzen [20, 21]. Trotzdem sind autologe Transplantate nicht nachteilsfrei, gehen sie doch mit einer höheren Patientenmorbidity aufgrund des generierten Defektes an der Entnahmestelle einher und sind nur begrenzt verfügbar [16, 19, 20].

Diese Nachteile werden umgangen, wenn die Gewebespende nicht durch den Empfänger selbst erfolgt, wobei im Falle einer Herkunft des Gewebes aus derselben Spezies von allogenen Transplantaten gesprochen wird [16, 19, 20]. Diese haben jedoch aufgrund des notwendigen Verarbeitungsprozesses keine osteogenen und verminderte osteoinduktive Eigenschaften, sie bergen das Risiko einer Krankheitsübertragung und abstoßender Immunreaktionen und sind bzgl. ihrer Effektivität den autologen Transplantaten unterlegen [16, 19, 20].

Xenografts, Transplantate aus tierischem Gewebe, als weitere Alternative zu autologen Knochentransplantaten sind im klinischen Einsatz nicht verbreitet [19].

Neben den zuvor beschriebenen Transplantaten stehen weitere Knochenersatzmaterialien zur Verfügung. Knochenersatzmaterialien sind synthetische, anorganische oder biologisch organische Verbindungen, auch Biomaterialien genannt, die anstelle von autologem oder allogenen Knochen zur Behandlung eines Knochendefektes eingesetzt werden können und in Gruppen eingeteilt wurden [22]. Eine Untergliederung erfolgte hierbei in erstens biologische, organische Substanzen, z.B. Bone morphogenetic proteins (BMPs), zweitens synthetische, anorganische Materialien wie Keramiken, drittens synthetische, organische Stoffe, z.B. Polymere und viertens in Verbundwerkstoffe wie Materialkombinationen der ersten drei Gruppen [22].

Auch diese Biomaterialien sind jedoch den autologen Transplantaten, die insbesondere hohe osteogene Eigenschaften aufweisen, unterlegen [22].

Tissue Engineering Ansätze eröffnen die Möglichkeit zur Herstellung eines optimierten Knochenersatzmaterials, das osteokonduktive, -induktive und -gene Eigenschaften in sich vereint [20].

1.2 TISSUE ENGINEERING UND REGENERATIVE MEDIZIN VON KNOCHEN

Das fächerübergreifende Fachgebiet des Tissue Engineerings (TE) erhielt seinen Namen im Jahr 1987 [23]. Tissue Engineering wurde als interdisziplinäres Fach beschrieben, das die Entwicklung biologischer Ersatzmaterialien zur Wiederherstellung, Erhaltung oder Verbesserung der Gewebefunktion zum Ziel hat und dafür Prinzipien der Ingenieur- und Biowissenschaften anwendet [24]. Während der Entwicklung in diesem Bereich über die nächsten Jahre wurde der Begriff der Regenerativen Medizin (RM) geprägt der besonders die aufkommende Anwendung von Erkenntnissen der Stammzellforschung einbezog [25]. Einen Versuch diesen kurz zu definieren unternahm Mason et al., indem sie postulierten „Regenerative Medizin ersetzt oder regeneriert menschliche Zellen, Gewebe oder Organe, um die normale Funktion wiederherzustellen oder aufzubauen“ [26]. Der synonymen Verwendung der Begriffe [27] steht die Beschreibung des Tissue Engineerings als Teilgebiet der Regenerativen Medizin gegenüber [28]. Besonders aufgrund annähernd gleicher Prinzipien wurden beide Forschungsfelder auch bereits unter einem Begriff als TERM zusammengefasst [29]. TE und RM stellen attraktive Optionen zur Behandlung defekten Gewebes in Aussicht, sowohl unter dem Aspekt einer möglichen Herstellung von Gewebe *ex vivo* zur nachfolgenden Implantation, als auch aufgrund weiterentwickelter Methoden die Geweberegeneration *in vivo* anstreben [30]. Für dementsprechend viele unterschiedliche Gewebe werden Tissue Engineering Techniken untersucht, so beispielsweise zur Herstellung von Ersatzmaterial für Haut, Blutgefäße, Leber, Rückenmark oder Knochen [31].

Drei gemeinsame Grundkomponenten bilden die Basis von Tissue Engineering und Regenerativer Medizin: Zellen, Gerüstsubstanzen (Scaffolds) und Signale, wobei dem Begriff

der Signale unter anderem Wachstums- und chemotaktische Faktoren zugeordnet werden [32].

Tissue Engineering Ansätze für Knochen basieren meist auf den drei Säulen mesenchymale Stammzellen, Scaffolds und Wachstumsfaktoren [33]. Das sogenannte Diamant-Konzept der Knochenfrakturheilung benennt zusätzlich die mechanischen Rahmenbedingungen als eigenständige vierte notwendige Komponenten der Knochenregeneration [33].

1.3 MESENCHYMALE STROMA-/STAMMZELLEN (MSCs)

In den Schritten bis zur Entdeckung mesenchymaler Stammzellen spielt das Knochenmark eine zentrale Rolle, da es schon in der zweiten Hälfte des 19. Jhd. die Hypothese gab Zellen aus dem Knochenmark seien an der Geweberegeneration beteiligt und im Zuge nachfolgender Experimente vorrangig an Knochenmarkzellen schließlich die Entdeckung nicht-hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark gelang [34]. So zeigten Untersuchungen von Knochenmarkzellen deren Fähigkeit zur Bildung von Knochengewebe [35]. In weiteren Experimenten mit Knochenmarkzellen wurden Fibroblastenkolonien beschrieben deren Zellen innerhalb einer einzelnen Kolonie Klone darstellten [36]. Klonale Zellen der fibroblast colony-forming cells (FCFCs) waren in der Lage sich in osteogener und chondrogener Linie zu differenzieren [37]. Einigen FCFCs wurde Multipotenz und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung zugeschrieben und es resultierte die Beschreibung eines Vorhandenseins von Stammzellen innerhalb der FCFC-Population [38], die schließlich mesenchymale Stammzellen genannt wurden [39].

Mesenchymale Stammzellen wurden als multipotente, nicht-hämatopoetische Stammzellen beschrieben, die in der Lage sind sich in verschiedene Gewebe mesenchymalen Ursprungs wie Knochen-, Knorpel- oder Fettgewebe zu differenzieren, sich bei der Isolation und *in vitro* Kultivierung in der adhären Zelfraktion befinden und eine fibroblastartige Morphologie aufweisen [40]. Sie können über viele Passagen *in vitro* kultiviert werden ohne ihre Multipotenz zu verlieren und weisen beispielsweise mit ihrer ebenfalls vorhandenen Expression neuraler Marker auf ein Differenzierungspotential hin, das nicht auf die mesenchymale Linie beschränkt zu sein scheint [41].

Im Jahr 2005 wurde zur Beschreibung fibroblastartiger, plastikadhärenter Zellen die Bezeichnung multipotente mesenchymale stromale Zellen (multipotent mesenchymal stromal cells, MSCs) vorgeschlagen, wobei die Abkürzung MSC weiterhin auch für die mesenchymale Stammzelle mit spezifischen Stammzeleigenschaften, der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und dem multilinealen Differenzierungspotential *in vivo*, verwendet werden könne [42].

Mit den zu erfüllenden Merkmalen Plastikadhärenz, Expression von CD 73, CD 90 und CD 105, nicht vorhandener Expression von CD 45, CD 34, CD 14 oder CD 11b, CD 79 α oder CD 19 und HLA-DR Oberflächenmolekülen sowie der Fähigkeit zur osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung *in vitro*, wurden im darauffolgenden Jahr Mindestkriterien zur Charakterisierung einer Zelle als multipotente mesenchymale stromale Zelle (MSC) festgelegt

[43]. Kriterien, die jedoch mit zunehmender wissenschaftlicher Erkenntnis weiterentwickelt werden sollten u.a. im Hinblick auf Unterschiede zwischen MSCs aus verschiedenen Geweben [44].

MSCs konnten nämlich neben dem Knochenmark aus vielen weiteren Geweben isoliert werden und wurden als Bestandteil nahezu aller Gewebe beschrieben [45]. Untersuchungen zu ihrer Lokalisation *in vivo* zeigten einen perivaskulären Ursprung [46], wobei Perizyten, dem Endothel von Mikrogefäßen extraluminal anliegende Zellen mit wichtigen Funktionen in der Regulation von Gefäßstruktur und -funktion, und MSCs wohl nicht identisch sind, sondern Perizyten eine Subpopulation der MSCs darstellen können [47].

MSCs scheinen neben ihrem Potenzial zur Geweberegeneration auch immunmodulatorische, antiapoptotische, antifibrotische, chemotaktische und angiogenetische Eigenschaften zu haben [48].

1.4 FETTGEWEBE ALS STROMA-/STAMMZELLRESERVOIR (ASCs)

Wie das Knochenmark gehört Fett zu den Geweben mesenchymalen Ursprungs [49]. Aus Lipoaspirat gelang die Isolation einer Zellpopulation, den sogenannten processed lipoaspirate (PLA) cells, die in adipogener, osteogener, chondrogener und myogener Richtung differenziert werden konnten [50]. Das Vorhandensein von Stammzellen in Fettgewebe war mit dem Nachweis von in PLA-Zellkulturen vorhandenen klonalen Zellen mit trilinealem Differenzierungspotential, die adipose-derived stem cells (ADSCs) genannt wurden, anzunehmen [49]. PLA-Zellen wurden durch ihre Eigenschaft zur Plastikadhärenz aus der Stromal Vascular Fraction (SVF) des Lipoaspirates isoliert, wobei die SVF zuvor mittels Collagenaseverdau und Zentrifugation gewonnen wurde [50]. Um in dem sich schnell entwickelnden Feld Begrifflichkeiten zu klären, gaben die International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) und die International Society for Cellular Therapy (ISCT) im Jahr 2013 eine gemeinsame Erklärung ab in der sie adhärente Zellen der SVF als adipose tissue-derived stromal cells (ASCs) bezeichneten, da diese eine noch heterogene Zellpopulation darstellen, in der aber Zellen mit multilinealem Differenzierungspotential enthalten sind [51]. Weiterhin wurden, neben einer Zellviabilität > 90 %, folgende immunphänotypische, Proliferationsfrequenz- und Differenzierungsmerkmale zur Charakterisierung der ASCs benannt: die primär stabilen positiven Marker CD 13, CD 29, CD 44, CD 73, CD 90 und CD 105 werden von > 80 % der Zellen, der primär instabile positive Marker CD 34 variabel und die primär negativen Marker CD 31, CD 45 und CD 235a von < 2 % der Zellen exprimiert [51]. Sekundäre andere positive Marker sind CD 10, CD 26, CD 36, CD 49d und CD 49e, während CD 3, CD 11b, CD 49f, CD 106 und PODXL sekundäre andere niedrige oder negative Marker darstellen [51]. ASCs zeigen außerdem eine zunehmende Frequenz von > 5 % im CFU-F Assay sowie ein Differenzierungspotential enthaltener Zellen in osteogener, adipogener und chondrogener Linie das histologisch und mit Hilfe von Biomarkern nachgewiesen werden kann [51].

Neben der Differenzierung in mesodermaler Linie wiesen Forschungsergebnisse mit der Differenzierung in u.a. neuronale [52] und hepatische [53] Richtung auf eine mögliche Differenzierung in ekto- und endodermaler Linie mit Pluripotenz der ASCs hin [54].

Die gute Verfügbarkeit, die durch Fettabsaugung oder operative Gewebeentnahme vergleichsweise einfache Gewinnung und die höhere Ausbeute an MSCs im Vergleich zu Knochenmark macht das Fettgewebe zu einer attraktiven Ressource von mesenchymalen Stroma-/Stammzellen [55].

1.5 SCAFFOLDS (GERÜSTSUBSTANZEN)

Für die Entwicklung von Gewebe in Tissue Engineering Verfahren finden Scaffolds als Gerüstsubstanzen, die auch biologische Substanzen aufnehmen und mit Zellen besiedelt werden können, Verwendung [12]. Die Eigenschaften, die ein Scaffold für den Einsatz in der Knochenregeneration aufweisen sollte, sind nach Wagoner et al. die drei Hauptmerkmale Biokompatibilität, Osteokonduktivität und die interkonnektierende Porosität sowie als weitere, oftmals in Zusammenhang stehende Eigenschaften Biodegradierbarkeit, Bioaktivität, Osteoinduktivität, Permeabilität, Herstellbarkeit, mechanische Integrität und die Porenstruktur [56]. Materialien für den potentiellen Einsatz als Scaffolds in der Knochenregeneration können eingeteilt werden in die natürlichen Polymere wie Collagen, die synthetischen Polymere, zu denen Polyester gehört, die Keramiken aus beispielsweise Bioglas oder Kalziumphosphat, Scaffolds aus Metall und schließlich Verbundmaterialien wie Polymer/Keramik-, Metall/Keramik- oder Metall/Polymer-Kombinationen [57].

Verschiedene Scaffoldmaterialien mit positiven Merkmalen in einer Kategorie gehen oftmals mit negativen Charakteristika bezüglich einer anderen einher, wie beispielsweise eine gute Biokompatibilität und -degradierbarkeit bei defizitären mechanischen Eigenschaften des Collagens oder hoher mechanischer Stabilität aber geringer Stimulation neuen Knochenwachstums bei Metallen [57]. Wichtige Faktoren zur Berücksichtigung in der Planung der Scaffoldstruktur sind die interkonnektierende Porosität und die Porenstruktur, die ein Einwachsen von Zellen und deren Nährstoffversorgung fördern, die jedoch auch die gewünschte mechanische Stabilität des Scaffolds ermöglichen sollen [58]. Sog. solid free-form fabrication (SFF)-Herstellungsmethoden ermöglichen eine verbesserte, individuelle Umsetzung von Scaffolddesigns [58].

Bemühungen zielen weiterhin darauf ab für die entsprechende anatomische Lokalisation und die individuellen Patientenfaktoren das Scaffold mit optimalen Eigenschaften generieren zu können [56, 59].

1.5.1 BOKERAMIK-SCAFFOLDS AUF KALZIUMPHOSPHATBASIS

In Form von Kalzium-defizientem Apatit, Hydroxyapatit (HA), beta-Tricalciumphosphat (β -TCP) oder biphasischem Kalziumphosphat, einer Mischung aus HA und β -TCP, sind

Kalziumphosphatkeramiken als Biomaterial kommerziell erhältlich [11]. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Knochenmineral bzgl. der chemischen Zusammensetzung, der Osteokonduktivität, der Bioaktivität und der Biodegradierbarkeit eignen sich Kalziumphosphatkeramiken gut als Scaffolds für Knochenregeneration [11, 56]. Hierbei beschreibt Bioaktivität die Fähigkeit eine chemische Verbindung zum umgebenden und sich neu bildenden Knochen einzugehen und Biodegradierbarkeit, dass das Scaffold nach einer gewissen, u.a. materialabhängigen Zeit *in vivo* abgebaut ist, sodass körpereigenes Gewebe die Gerüstfunktion des Scaffolds übernehmen kann [11, 56]. Kalziumphosphatkeramiken sind außerdem biokompatibel, wodurch unerwünschte Reaktionen, beispielsweise die Entzündungsantwort betreffend, nach der Implantation im Empfänger ausbleiben [56]. Sie können Proteine binden und sind als Trägersubstanzen für Wachstumsfaktoren und Zellen geeignet [56].

Hinsichtlich der Biodegradierbarkeit und der mechanischen Eigenschaften zeichnet sich Hydroxyapatit durch Härte und schlechte Löslichkeit aus, Tricalciumphosphat, die nicht kristalline Form von HA ist hingegen gut löslich bei schlechter mechanischer Stabilität [19]. Bei biphasischem Kalziumphosphat kann über eine Änderung des HA/ β -TCP-Verhältnisses die Abbaubarkeit angepasst werden [11].

1.5.2 RAPID PROTOTYPING TECHNIK

Die Herstellung von dreidimensionalen, porösen Scaffolds kann konventionell beispielsweise durch Gussverfahren, Gefriertrocknen oder Verschäumen erfolgen oder mittels neuerer Rapid Prototyping Verfahren, auch SFF genannt [60]. Rapid Prototyping ist der Oberbegriff einer Reihe von Verfahren, die computergenerierte Daten, z.B. basierend auf CT- oder MRT-Bilddaten, in die Herstellung eines Scaffolds umsetzen [60]. Somit kann das Scaffold individuellen Gegebenheiten angepasst und ein im Vergleich zu konventionellen Methoden verbessertes Scaffolddesign erzielt werden [60]. Zu den häufigsten Rapid Prototyping Verfahren gehören: Stereolithographie (SLA), selective laser sintering (SLS), fused deposition modeling (FDM) und der 3D-Druck [60]. Die Scaffolds werden dabei Schicht für Schicht, mit genau definierter Architektur und reproduzierbar generiert [60]. Jedes Verfahren hat im Vergleich zu den anderen Vor- und Nachteilen, wobei sich der 3D-Druck u.a. durch Gleichmäßigkeit und Schnelligkeit in der Produktion sowie den Verzicht auf hohe Temperaturen oder aggressive Chemikalien auszeichnet, jedoch u.a. geringe mechanische Stabilität und Probleme beim Entfernen von Puderrückständen mit sich bringt [60].

1.6 FAKTOREN FÜR EINE OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG VON MSCs

Eine Vielzahl von Signalmolekülen, wie Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren oder miRNA, mit komplexen Interaktionsmustern, beeinflussen die osteogene Differenzierung von MSCs [61]. Stimulierend wirkenden Wachstumsfaktoren stammen insbesondere aus der Wnt-

und der BMP-Familie, stimulierende Transkriptionsfaktoren schließen β -catenin, Runx2, TAZ, SATB2, Osterix, Smads, C/EBP β , activator protein 1 und ATF4 mit ein [61]. Hemmend auf die osteogene Differenzierung wirken die Transkriptionsfaktoren PPAR γ und Twist1 [61]. Aus der Gruppe der miRNAs gibt es sowohl stimulierende als auch inhibitorische Faktoren [61]. MSCs lassen sich *in vitro* durch Medienzusätzen in verschiedene mesenchymale Linien differenzieren, wobei Vitamin D, Dexamethason, Ascorbat und β -Glycerophosphat die osteogene Entwicklung fördern [40, 49]. Weitere Reize die auf MSCs einwirken unterstützen ebenfalls deren Entwicklung in osteogener Linie, so z.B. elektromagnetische Felder [62], Scherbeanspruchung [63] oder der richtige Härtegrad der Matrix [64].

1.6.1 BONE MORPHOGENETIC PROTEINS (BMPs)

In demineralisierter Knochenmatrix war nach ektopter *in vivo* Implantation die Bildung von Knochengewebe zu beobachten [65] und führte zur Beschreibung der innenwohnenden osteoinduktiven Komponenten als Bone morphogenetic proteins (BMPs) [66], die mit der darauffolgenden Isolierung und Charakterisierung einzelner BMPs nun eine Proteinfamilie mit rund 20 Mitgliedern umfassen [67]. Die BMPs gehören, mit Ausnahme von BMP-1, zur TGF- β Superfamilie [67, 68]. BMPs haben Einfluss auf die Entwicklung und Differenzierung vieler Gewebe zu denen auch ihre wichtige Funktion in der Osteogenese gehört [67, 68]. Jedoch fördern nur ein Teil der BMPs, z.B. BMP-2, -4, -6, -7 und -9 Knochenbildung, während andere Proteine der BMP-Familie keine Funktion in der Osteogenese haben oder diese, wie BMP-3, inhibieren können [68]. Im Knochen werden die BMPs in Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Chondrozyten, Thrombozyten und Endothelzellen synthetisiert, bilden Homo- oder Heterodimere, werden sekretiert, können in der EZM zwischengespeichert werden und bewirken nach auto- oder parakriner Rezeptorbindung eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege, wie beispielsweise der Smad-Signalweg, über die eine Regulation der Transkription von Zielgenen, z.B. Runx2, und die Stimulation einer osteogenen Differenzierung erfolgen kann [67, 69]. BMPs fördern außerdem die Rekrutierung von Stammzellen, die zur Heilung von Knochendefekten benötigt werden [70].

1.6.2 KLINISCHE ANWENDUNG VON BMPs

Die Entdeckung und das zunehmende Verständnis der Wirkungsweise der BMPs legte ihren klinischen Einsatz als Wachstumsfaktoren in der Knochenregeneration nahe und in der Tat werden BMPs hierfür zur Behandlung von Patienten eingesetzt [67]. Mit der genauen Kenntnis der DNA-Sequenzen die BMPs kodieren ist es möglich die Proteine rekombinant herzustellen [71], als zuverlässige und produktionseffizientere Alternative zu einer Isolation aus Spenderknochen [69], auch wenn rekombinantes humanes BMP-2 (rhBMP-2) zu quantitativ weniger Knochenbildung führte als die aus humaner Knochenmatrix gewonnenen BMP-Proteine [72]. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit (HWZ) von applizierten BMPs *in vivo*,

wurden sie in Kombination mit zahlreichen Trägersubstanzen untersucht, um eine kontrollierte Abgabe und ausreichend hohe lokale Konzentrationen *in vivo* zu erreichen [68]. Zur Behandlung bestimmter Wirbelkörperversteifungen anstelle von Autotransplantaten, offenen Tibiafrakturen mit Marknagelfixation und für den Nebenhöhlen- und lokalen Alveolarkammaufbau bei mit Extraktionsalveolen assoziierten Defekten anstelle von Autotransplantaten erhielt rhBMP-2 in Kombination mit einem resorbierbaren Collagenschwamm von der Food and Drug Administration (FDA) die klinische Zulassung [73]. Auch rhBMP-7 als Bestandteil eines auf Collagen basierenden Produktes wurde für die Behandlung von Frakturen der langen Röhrenknochen und für posterolaterale lumbale Spondylodesen anstatt Autotransplantaten von der FDA klinisch zugelassen [74]. Außerdem werden ein Großteil der Behandlungen mit BMPs off-label durchgeführt [75].

Zu beachten sind potentielle Nebenwirkungen von applizierten BMPs, beispielsweise die Ausbildung von heterotopem Knochengewebe [76], Hämatomen oder Ödemen [77]. rhBMP-2 führte zu verbesserten Fusionsraten in Wirbelkörperversteifungsoperationen [77]. Der Einsatz von BMPs sollte jedoch weiter geprüft werden, da er mit erhöhten Komplikationsraten bei anterioren zervikalen Wirbelkörperversteifungen einherging und insgesamt auch erhöhte Krankenhauskosten anfielen [78].

Die Untersuchung einer Vielzahl von Studien über den klinischen Einsatz von BMPs, insbesondere BMP-2 und BMP-7, in der Behandlung von offenen und nicht-heilenden Knochenfrakturen erbrachte das Fazit, dass BMPs die Heilung schwerer offener Frakturen beschleunigen und Komplikationen reduzieren können und bei nicht-verheilten Frakturen ähnlichen Ergebnisse wie die Therapie mit Autotransplantaten bewirken [79, 80].

1.7 KLINISCHER EINSATZ VON TISSUE ENGINEERED KNOCHENERSATZMATERIAL

Die große Anzahl an Publikationen, die Herstellung von Knochenersatzmaterial mittels Tissue Engineering betreffend, zeigt die intensiv betriebene Forschung auf diesem Gebiet, ihre Anwendung in der Klinik und die Herstellung medizinischer Produkte blieb jedoch bis dato hinter den Erwartungen zurück [81]. Es gilt neben grundsätzlichen Aufgaben, wie der Wahl geeigneter Zellen, Scaffolds und Reizen und der Art ihrer Kombination, dem Erreichen von Vaskularisation und Integration in Empfängergewebe, Wissenslücken z.B. hinsichtlich Nebenwirkungen oder geeigneter Tiermodelle zu schließen sowie Herausforderungen zum einen in der Erfolgsbeurteilung des regenerierten Knochengewebes zu meistern und zum anderen für einen klinischen Einsatz wichtige Faktoren wie niedrige Kosten und Erhalt einer klinischen Zulassung zu erreichen [82].

Dennoch gibt es Berichte von der erfolgreichen Behandlung von Patienten mit Knochenersatzmaterial basierend auf Tissue Engineering. Mesimäki et al. berichteten von der Bildung vaskularisierten Knochengewebes in einem Titaniumgerüst das mit, mit rhBMP-2 behandelten und mit autologen ASCs besiedelten, β -TCP Granula gefüllt und in einer Muskeltasche des Patienten platziert war und der anschließenden erfolgreichen Implantation

des Knochengewebes zur Therapie eines Maxilladefektes [83]. Weitere Patienten wurden ebenfalls mit einer direkten Implantation von resorbierbaren Biokeramik-Scaffolds in Kombinationen mit autologen ASCs und teilweise zusätzlich rhBMP-2 in kraniofaziale Knochendefekte erfolgreich behandelt [84].

Demzufolge ist der Forschungsbedarf im Bereich des TE und der RM von Knochen hoch, um dieses grundsätzlich vielversprechende Konzept weiter zu entwickeln, insbesondere in Richtung eines Einsatzes in der Patientenversorgung.

1.8 FRAGESTELLUNG

In der nachfolgend beschriebenen Arbeit wurden adipose tissue-derived stromal cells (ASCs) aus humanem subkutanem Fettgewebe isoliert und in Monolayer kultiviert. Zunächst wurden die Zellen hinsichtlich der Expression von MSC-typischen sowie osteogenen Proteinmarkern charakterisiert, mit der Fragestellung:

1. Entspricht das Markerexpressionsmuster der isolierten Zellen den in der Literatur beschriebenen Phänotypen von ASCs?
2. Sind die osteogenen Markerproteine in den isolierten ASCs endogen exprimiert?
3. Eignen sich die aus subkutanem Fettgewebe isolierten humanen ASCs für das Tissue Engineering Verfahren in dieser Studie?

Anschließend wurden ASCs auf biphasischen Kalziumphosphat-Scaffolds angesiedelt und in drei verschiedenen Kulturmedien, einem normalen (MN), einem osteogenen (MO) und einem osteogenen Wachstumsmedium mit rhBMP-2 Zusatz (MO + BMP-2) bis zu 29 Tage statisch kultiviert. Folgende Analysen mittels Vitalitäts- und Proliferationstests, histologischen Untersuchungen, qRT-PCR und Immunfluoreszenzfärbungen dienten der Beantwortung der Fragen:

4. Wie verhalten sich ASCs, die auf biphasischen Kalziumphosphat-Scaffolds angesiedelt wurden, hinsichtlich Vitalität und Proliferation?
5. Welchen Einfluss haben verschiedene Kulturbedingungen wie MN, MO und MO + BMP-2 auf Vitalität und Proliferation von ASCs in Scaffoldkulturen?
6. Welche Einflüsse haben unterschiedliche Zellkulturbedingungen auf die Expression von osteogenen und MSC-typischen Proteinmarkern?
7. Ist der Zusatz von rhBMP-2 für eine effektive Osteoinduktion in 3D-ASC-Kulturen sinnvoll?
8. Ist der Ansatz für die Entwicklung von Knochenersatzmaterial geeignet?

2 MATERIAL UND METHODEN

Die Durchführung der experimentellen Arbeiten erfolgte im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München.

2.1 MATERIAL

2.1.1 VERBRAUCHSGEGENSTÄNDE

ALU-Laborfolie, weich, glatt, 0,015 x 300 mm	Universal, D
Becherglas, 1000 ml	Duran Group, D
Becherglas, 50 ml	Kimble, USA
Biokeramik-Scaffolds	Friedrich-Baur BioMed Center, D
Cryobox	neoLab, D
Cryogenic vial	Thermo Fisher Scientific, D
Cryo-Gloves®	Tempshield, USA
Deckgläser, rechteckig, 24 x 50 mm	Menzel, D
Deckgläser, rund, 13 mm	Thermo Fisher Scientific, D
Dermatril® P Handschuhe	KCL, D
Dismembratorkugeln	Sartorius, D
Disposable Vinyl Specimen Molds (Biopsy; Intermediate)	Sakura Finetek, D
Einmalpinzette, steril 12,5 cm, anatomische Form	Heinz Herenz Medizinalbedarf, D
Faltenfilter	Roth, D
Färbekammer Stain Tray™	Roth, D
Färbeküvette	Wagner & Munz, D
Federstahlpinzette	Ehlert & Partner, D
Gewindeflasche	Duran, Schott, D
Glaspipette	Schuett-biotec, D
Konisches Röhrchen, Polypropylen, 50ml	Corning, USA
Küchentuch	Wepa, D
Kulturflaschen (T75; T175)	Nunc, DK
Langpinzette	Roth, D
LightCycler® 480 Sealing Foil	Roche, D
LightCycler® Multiwellplatte 96	Roche, D
Magnetstäbchen	Brand, D
Messbecher	Brand, D
Messzylinder Duran	Brand, D
Microlance 3, 0,9 x 40 mm	Becton Dickinson, USA
Microtome blade A35	Feather Savety Razor, Japan
Mikroreaktionsgefäß, 1,5 ml	Eppendorf, D
Münchner Mappe	Wagner & Munz, D
Nunc™ MicroWell™ 96F	Thermo Fisher Scientific, D

Nunc™ Multidish 48	Thermo Fisher Scientific, D
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel, D
Parafilm M® Laboratory Film	Bemis, USA
PCR-clean Quali-Maximum Recovery tips (0,1-10 µl; 0,5-20 µl; 1-100 µl; 1-200 µl; 100-1000 µl)	Kisker Biotech, D
PCR-clean Safe-Lock Tube, 1,5 ml	Eppendorf, D
PCR-Rack	neoLab, D
PCR-Tube-Streifen	Kisker Biotech, D
Petrischalen, Nunc™ Dish	Thermo Fisher Scientific, D
Pinsel	Leonhardy, D
Pipettenspitzen Diamond® Tippiack (DL10ST; D200ST; D1000ST)	Gilson, USA
Präparatekasten	neoLab, D
Präparatemappe	Wagner & Munz, D
Rotilabo®-Einmal-Wägeschale	Roth, D
Rotilabo®-Glastrichter	Roth, D
Rotilabo®-Magnetstab-Entferner	Roth, D
Schutzbrille	Uvex, D
Serologische Pipetten Costar® Stripette® (5 ml; 10 ml; 25 ml)	Corning, USA
Sicherheitsskalpell	B. Braun Melsungen, D
Spritzenfilter, 0,22 µm	Techno Plastic Products, Schweiz
Surgical Face Mask	Medeco, NL
Vasco® Basic Handschuhe	B. Braun Melsungen, D
Wischtücher Wypall® X80	Kimberly-Clark, USA
Zellsieb, 100 µm	Corning, USA
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Techno Plastic Products, Schweiz

2.1.2 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN, LÖSUNGEN

20 % EDTA-4Na	Apotheke Innenstadt Universität München, D
Aceton	AppliChem, D
Agarose UltraPure™	Invitrogen, D
Amphotericin B solution, 250 µg/ml	Biochrom, D
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen, D
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma-Aldrich, D
Bovine Serum Albumine	Sigma-Aldrich, D
Brij® L23 solution	Sigma-Aldrich, D
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche, D
Chloroform	Sigma-Aldrich, D
Collagenase A (I)	Sigma-Aldrich, D
Dexamethason	Sigma-Aldrich, D
Dimethylsulfoxide	Merck, D
Direct Red 80	Sigma-Aldrich, D

Distilled water DNase/RNase free	Gibco by life technologies, USA
DMEM high glucose	Gibco by life technologies, USA
DMEM/Ham`s F12	Biochrom, D
Eosin Y solution	Sigma-Aldrich, D
Essigsäure (Eisessig) 100 %	Merck, D
Ethanol 70 % bzw. 96 % vollständig vergällt mit Methylenketon	Apotheke Innenstadt Universität München, D
Ethanol 80 % vollständig vergällt mit MEK/BITREX	CLN, D
Ethanol 99 % vergällt mit 1 % Petrolether	SAV Liquid Production, D
Ethanol absolut Emplura®	Merck, D
Eukitt®	O. Kindler, D
FastStart Essential DNA Green Master	Roche, D
Fetal Calf Serum	Sigma-Aldrich, D
Fluoromount W for microscopy	Serva Electrophoresis, D
Flüssiger Stickstoff	Linde, D
Gigasept® AF forte	Schülke, D
Hämatoxylin sauer nach Mayer	Roth, D
Hämatoxylinlösung A und B nach Weigert	Roth, D
HCl	Merck, D
Hoechst 33342	Life technologies, USA
Isopropyl alcohol	Sigma-Aldrich, D
Mucocit® T	Merz Hygiene, D
Na3Citrat	Sigma-Aldrich, D
NaCl	AppliChem, D
NaOH-Plätzchen	Merck, D
Natriumdodecylsulfat	AppliChem, D
Paraformaldehyd	Merck, D
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺ , low endotoxin	Biochrom, D
PBS Puffer pH 7,4 (10-fach konzentriert)	Apotheke Innenstadt Universität München, D
Penicillin, 10.000 IU/ml Streptomycin, 10.000 µg/ml	Merck-Gruppe, D
Picosäure	Sigma-Aldrich, D
Pufferlösungen (pH 10; 7; 4 (± 0,02))	Roth, D
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, D
Quant-iT™PicoGreen®dsDNA Assay-Kit	Invitrogen, D
QULazol® Lysis Reagent	Qiagen, D
Reinigungsspray: RNase Zap®	Ambion, D
rhBMP-2	Biomol, D
RNAlater®-Lösung	Ambion, D
Rotihistol	Roth, D
Sucrose	Sigma-Aldrich, D
Tissue-Tek® O.C.T.™Compound	Sakura Finetek, D
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, D

Trypanblau	Biochrom Seromed Merck-Gruppe, D
Trypsin/EDTA, 0,5 %/0,2 % (10-fach konzentriert)	Merck-Gruppe, D
Wasserbad-Schutzmittel „Aqua-stabil“	Julabo, D
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, D

2.1.3 LABORGERÄTE

Axioskop 40	Zeiss, D
Axiovert 40CFL	Zeiss, D
Centrifuge 5417R (PCR-Arbeitsplatz)	Eppendorf, D
Dewar-Eisbehälter	KGW-Isotherm, D
Digitales Auflichtmikroskop „Smartzoom 5“	Zeiss, D
Eismaschine	Ziegra, D
Eisschrank -80 °C: HERAfreeze®	Heraeus, D
Electronicrührer Variomag	H+P, D
Gefriermikrotom Leica CM 3050	Leica, D
Gefrierschrank -20 °C	Bosch, D
Gefrierschrank -20 °C	Siemens, D
Gefrierschrank -20 °C (Histologie)	Liebherr, D
Grant-bio PV-1 Vortex Mixer	Grant Instruments, England
Inkubator	Binder, D
Kamera des Samsung GT-I9100	Samsung, Südkorea
Kamerasystem AxioCam ERc 5s	Zeiss, D
Kamerasystem AxioCam MRc 5	Zeiss, D
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, D
Kühlschrank 8 °C	Liebherr, D
Laborschüttler Certomat® MO II	Sartorius, D
Lifebook E Series	Fujitsu, Japan
LightCycler® 96	Roche, D
Megafuge2.0 (für LightCycler® Multiwellplatten)	Heraeus, D
Microplate reader	Bio Tek, D
Mikro-Dismembrator S	Sartorius, D
Mikroliterpipetten Pipetman® neo (0,2-2 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl) (PCR-Arbeitsplatz)	Gilson, USA
Mikroliterpipetten Transferpette® S typ variable	Brand, D
Mikrowelle	Siemens, D
Mini Cooler	Kisker Biotech, D
Mixer Uzusio VTX 3000L (PCR-Arbeitsplatz)	LMS, Japan
Multifuge 1L-R (Zellkultur)	Heraeus, D
NanoDrop™ Lite	Thermo Fisher Scientific, D
Neubauerkammer improved	Glaswarenfabrik Karl Hecht, D
pH/mVmeter HI 122	Hanna instruments, D

Pipettierhilfe, elektrisch accu-jet® pro	Brand, D
Precipoint M8 Digital Microscope & Scanner	PreciPoint, D
Sicherheitswerkbank	BDK Luft-&Reinraumtechnik, D
Spectrafuge™ mini (Histologie)	Labnet, USA
Stickstofftank	Cryotherm, D
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, D
Tischabzug	Köttermann, D
Trockenschrank	Binder, D
Vakuum Pumpe EcoVac	Schuett-biotec, D
Vortex V-1 plus (Histologie)	bioSan, Lettland
Waage	Sartorius, D
Wasserbad TW20	Julabo, D
Wasserdestillierapparat	ZEFA, D
Zentrifuge & Vortex Sky Line (PCR-Arbeitsplatz)	ELMI, Lettland

2.1.4 PRIMER

			Literatur
<i>ALP</i>	forward	TCAAGGGTCAGCTCCACCACA	[85]
<i>ALP</i>	reverse	ATTGGCCTTCACCCCACACA	
<i>Collagen 1 (COL1A1)</i>	forward	GCTTCCCTGGTCTTCCTG	[86]
<i>Collagen 1 (COL1A1)</i>	reverse	TCTCACCACGGTCACCCT	
<i>GAPDH</i>	forward	TGCACCACCAACTGCTTAGC	[87]
<i>GAPDH</i>	reverse	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	
<i>Osteokalzin</i>	forward	CCCAGGCGCTACCTGTATCAA	[88]
<i>Osteokalzin</i>	reverse	CTGGAGAGGAGCAGAACTGG	

2.1.5 ANTIKÖRPER

				Konzentration
1. AK	CD 34	Mouse-anti human, monoclonal	R&D Systems, D	10 µg/ml
	CD 39	Mouse-anti human, monoclonal	R&D Systems, D	10 µg/ml
	CD 44	Mouse-anti human, monoclonal	R&D Systems, D	10 µg/ml
	CD 45	Mouse-anti human, monoclonal	R&D Systems, D	10 µg/ml
	CD 166	Mouse-anti human, monoclonal	R&D Systems, D	10 µg/ml
	CD 73	Mouse-anti human, monoclonal	BD Pharmingen, USA	2,5 µg/ml

	CD 90	Mouse-anti human, monoclonal	BD Pharmingen, USA	6,25 µg/ml
	CD 105	Mouse-anti human, monoclonal	BD Pharmingen, USA	2,5 µg/ml
	DMP-1	Mouse-anti human, monoclonal	R&D Systems, D	25 µg/ml
	Osteokalzin	Mouse-anti human, monoclonal	R&D Systems, D	25 µg/ml
	Osteopontin	Mouse-anti human, monoclonal	R&D Systems, D	25 µg/ml
	Sclerostin	Mouse-anti human, monoclonal	R&D Systems, D	10 µg/ml
2. AK		Goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor® 488	Molecular Probes, D	5 µg/ml

2.1.6 SOFTWARE

Adobe Photoshop
AxioVision Rel. 4.9
Gen5 2.03
GraphPad Prism5 Version 5.02
LightCycler® 96 Software 1.1
Microsoft Office
TouchMicroscope
Windows 8.1 Fotos-App

2.2 METHODEN

2.2.1 ARBEITEN MIT ZELLKULTUREN

2.2.1.1 ALLGEMEINE ARBEITSBEDINGUNGEN UND ZELLKULTIVIERUNG

Die Arbeiten mit Zellkulturen fanden in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 unter sterilen Bedingungen an Sicherheitswerkbänken statt. Arbeitsflächen, Einweg-Arbeitshandschuhe und unsterile Gebrauchsgegenstände ohne direkten Kontakt zu Zellkulturen wurden vor Verwendung unter der Sicherheitswerkbank mit 80 % Ethanol desinfiziert. Sicherheitswerkbänke wurden außerdem in vierwöchigem Abstand mit verdünntem Mucocit® T gereinigt. Unsterile Gebrauchsgegenstände mit direktem Kontakt zu den Zellkulturen, wie Glaspipetten und Deckgläser für ASC-Monolayerkulturen, wurden vor Verwendung sterilisiert, Federstahlpinzetten zur Scaffoldentnahme wurden in Ethanol absolut Emplura® desinfiziert. Unsterile Lösungen wurden vor ihrer Verwendung in Zellkulturen steril filtriert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter standardisierten Bedingungen in Inkubatoren bei 37 °C und 5 % CO₂. Frisch isolierte Zellen wurden gesondert in einem Brutschrank für Primärkulturen kultiviert, bis eine Kontamination ausgeschlossen worden war. Flüssigkeiten wurden, so nicht anders angegeben, vor Verwendung an Zellkulturen im Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt. Dem Wasserbad war das Schutzmittel Aqua-stabil beigelegt.

2.2.1.2 HERSTELLUNG VON KULTURMEDIEN

Für die Zellkultivierung verwendete Kulturmedien setzten sich aus einem Basismedium und Medienzusätzen zusammen. Als Basismedium diente Dulbeccos` Modified Eagle Medium (DMEM) oder DMEM/Ham`s F12. Nach dem erstmaligen Öffnen einer versiegelten Flasche Basismedium wurde dieser einmalig eine Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) -Lösung zugegeben. Außerdem war fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS), je nach Verwendungszweck in unterschiedlicher Konzentration, Bestandteil jedes Kulturmediums. Die Lagerung der Kulturmedien erfolgt bei 4 °C.

In nachfolgenden Tabellen 1-5 sind die Zusammensetzungen der verwendeten Kulturmedien aufgelistet:

1. Kulturmedien für ASC-Monolayerkulturen (Tab. 1, 2)

<i>Basismedium:</i>	
DMEM high glucose	
<i>Mediumzusätze:</i>	
FCS	Anteil der Mediumzusätze: 15 % im Kulturmedium
Penicillin	60 IU/ml Basismedium
Streptomycin	60 µg/ml Basismedium

Tab. 1 Standardmedium

<i>Basismedium:</i>	
DMEM high glucose	
<i>Mediumzusätze:</i>	
FCS	Anteil der Mediumzusätze: 15 % im Kulturmedium
Penicillin	60 IU/ml Basismedium
Streptomycin	60 µg/ml Basismedium
Amphotericin	0,25 µg/ml Kulturmedium

Tab. 2 Kulturmedium mit Amphotericinzusatz

2. Kulturmedien für Scaffoldkulturen (Tab. 3, 4, 5)

<i>Basismedium:</i>	
DMEM high glucose	
<i>Mediumzusätze:</i>	
FCS	Anteil der Mediumzusätze: 10 % im Kulturmedium
Penicillin	60 IU/ml Basismedium
Streptomycin	60 µg/ml Basismedium

Tab. 3 Normales Wachstumsmedium (MN)

Für die Herstellung des osteogenen Wachstumsmediums wurde einer frischen Flasche Basismedium DMEM/Ham`s F12 neben der Pen/Strep-Lösung auch einmalig die weiteren Medienzusätze L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, β -Glycerophosphat (β -GP) und Dexamethason nach vorheriger steriler Filtration hinzugefügt.

<i>Basismedium:</i>	
DMEM/Ham`s F12	
<i>Mediumzusätze:</i>	
FCS	Anteil der Mediumzusätze: 10 % im Kulturmedium
Penicillin	60 IU/ml Basismedium
Streptomycin	60 µg /ml Basismedium
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	50 µmol/l Kulturmedium
β -GP	10 mmol/l Kulturmedium
Dexamethason	10 nmol/l Kulturmedium

Tab. 4 Osteogenes Wachstumsmedium (MO)

Der Wachstumsfaktor BMP-2 wurde zu osteogenem Wachstumsmedium in der Konzentration 100 ng/ml hinzugefügt. Bei -80 °C in PCR-Reaktionsgefäßen gelagerte rhBMP-2-Aliquots wurden bei Raumtemperatur aufgetaut.

<i>Basismedium:</i>	
DMEM/Ham`s F12	
<i>Mediumzusätze:</i>	<i>Anteil der Mediumzusätze:</i>
FCS	10 % im Kulturmedium
Penicillin	60 IU/ml Basismedium
Streptomycin	60 µg/ml Basismedium
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	50 µmol/l Kulturmedium
β-GP	10 mmol/l Kulturmedium
Dexamethason	10 nmol/l Kulturmedium
rhBMP-2	100 ng/ml Kulturmedium

Tab. 5 Osteogenes Wachstumsmedium mit rhBMP-2 Zusatz (MO + BMP-2)

2.2.1.3 ISOLIERUNG MESENCHYMALER STROMA-/STAMMZELLEN AUS FETTGEWEBE

Gewebeproben wurden von der Gewebebank der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern (München, Deutschland) innerhalb des Rahmenwerks der gemeinnützigen, öffentlichen Stiftung des bürgerlichen Rechts Human Tissue and Cell Research (HTCR) nach schriftlicher Zustimmung der aufgeklärten Patienten bezogen und verwendet [89].

Subkutanes humanes Fettgewebe wurde von Patienten unterschiedlichen Alters (31-80 Jahre), BMIs (29-52) und Geschlechts bezogen.

Tabelle 6 zeigt die in folgendem Protokoll speziell für die Zellisolation benötigten Lösungen:

Transport-PBS	PBS (Dulbecco) mit Pen/Strep (180 IU/ml / 180 µg/ml Pen/Strep) und Amphotericin (0,75 µg/ml)
Collagenase-Lösung	0,2 % Collagenase A (I) in DMEM

Tab. 6 Lösungen für die Isolierung mesenchymaler Stroma-/Stammzellen aus Fettgewebe

Frisch gewonnenes Fettgewebe wurde in eiskaltem Transport-PBS und auf Eis gelagert transportiert. Nach zweimaligem Waschen des Gewebes mit Transport-PBS wurde dieses in eine Petrischale mit Collagenase-Lösung gegeben. Mit einem Skalpell wurde das Gewebe in kleinstmögliche Stücke geschnitten. Dazu wurde ein Ende des Gewebestücks mit einer Pinzette fixiert und das Gewebe vom Rand her mit dem Skalpell ausgefranst. Die Menge der Collagenase-Lösung richtete sich nach der Größe des Gewebestücks und betrug so viel, dass das zerkleinerte Gewebe vollständig von Collagenase bedeckt war. Die zugeklebte Petrischale wurde anschließend bei 37 °C für 40 bis 60 Minuten, je nach makroskopisch sichtbarem Fortschritt des Collagenverbaus, mit ca. 60 UpM auf dem Laborschüttler geschüttelt. Danach wurde der Collagenverbau durch Zugabe von Kulturmedium mit Amphotericinzusatz im

Verhältnis 1:1 (Collagenlösung : Kulturmedium) gestoppt. Die Lösung wurde resuspendiert und durch ein 100 µm Zellsieb in ein 50 ml fassendes konisches Röhrchen filtriert. Dieses wurde dann bei 400 g für 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wies der Inhalt des Röhrchens eine sichtbare Schichtung auf. Die oberste dünne weiße Schicht enthielt die Adipozyten, die mit einer 1000 µl Pipette abpipettiert und entsorgt wurden. Der nachfolgende Überstand wurde ebenfalls langsam abgesaugt und entsorgt. Die folgende rot gefärbte Schicht mit den Erythrozyten und die unterste weiße, die ASCs enthaltende Schicht bildeten ein Pellet. Dieses Pellet wurde nun in Kulturmedium mit Amphotericinzusatz resuspendiert (10 ml für T75 bzw. 20 ml für T175 Kulturflaschen), in Kulturflaschen gegeben und über Nacht kultiviert. Die Eigenschaft der ASCs an Plastikoberflächen zu adhären [51] ermöglichte die weitere Zellisolation. So wurden die Zellen am darauffolgenden Tag, nachdem sie ausreichend Zeit zur Adhäsion hatten, dreimal mit PBS (Dulbecco) gewaschen. Nicht adhären Erythrozyten und Zelltrümmer wurden so entfernt. Neues Kulturmedium wurde zugegeben. Nach einigen Tagen kontaminationsfreier Kultur wurde auf den Amphotericinzusatz im Kulturmedium verzichtet und die Kultivierung mit Standardmedium fortgesetzt. Nach diesem Protokoll isolierte Zellen wurden adipose tissue-derived stromal cells (ASCs) genannt.

2.2.1.4 KULTIVIERUNG IN KULTURFLASCHEN

Für die Zellkultivierung in Kulturflaschen wurden je nach Zellzahl Flaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² (T75) mit standardmäßig 20 ml Kulturmedium bzw. Flaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² (T175) mit 40 ml Kulturmedium verwendet. Ein Mediumwechsel erfolgte nach Zellisolation aus Gewebe und nach Auftauen von Zellen am darauffolgenden Tag, ansonsten alle 3 - 4 Tage. Zellwachstum und -morphologie wurden regelmäßig unter dem Lichtmikroskop evaluiert. Bei einer Konfluenz der Zellen am Flaschenboden von etwa 70 – 80 % erfolgte die Trypsinierung der Zellen mit anschließender Passagierung, Kryokonservierung oder Kultivierung in einem neuen Versuchsansatz.

2.2.1.5 ZELLPASSAGIERUNG

Um eine Passagierung der Zellen, d.h. die Ansiedelung in einem neuen Kulturgefäß, vorzunehmen, wurde zunächst das alte Kulturmedium entfernt und die Zellen dreimal mit je 10 ml PBS (Dulbecco) (T75) bzw. 20 ml (T175) pro Kulturflasche gewaschen. Zum Ablösen der adhären Zellen wurden 2,5 ml (T75) bzw. 5 ml (T175) Trypsin/EDTA (T/E) -Lösung zugegeben, die aus 10-fach konzentrierten T/E-Aliquots durch Verdünnung mit Aqua ad iniectabilia hergestellt wurde, sodass der Boden der Kulturflasche vollständig bedeckt war. Nach einer Inkubationszeit von ca. 5 min im Brutschrank wurde die Ablösung der Zellen mikroskopisch überprüft und gegebenenfalls mechanisch durch Beklopfen der Kulturflasche unterstützt. Sobald sich die Zellen rund und freischwimmend darstellten wurde die

Trypsinwirkung mit der Zugabe von Kulturmedium (2,5 ml je T75 bzw. 5 ml je T175) gestoppt. Die Zellsuspension wurde dann in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei Bedarf ein kleines Aliquot in ein Mikroreaktionsgefäß zur Zellzahlbestimmung abgefüllt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1500 UpM bildete sich am Boden ein Zellpellet. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet mit 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche mit der entsprechenden Kulturmediummenge gegeben. Nach dem Lösen der Zellen in Suspension (Trypsinierung) und Ansiedelung in einer neuen Kulturflasche befanden sich die Zellen nun in der nächsthöheren Passage.

2.2.1.6 ZELLZÄHLUNG

Zur Ermittlung der Zellzahl in einer Zellsuspension kam die Zellzählung in der Neubauerkammer zur Anwendung. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl des Farbstoffes Trypanblau gemischt. Mit 10 µl dieser Mischung wurde die Zählkammer zwischen Deckgläschen und Objektträger befüllt. Unter dem Lichtmikroskop erfolgte die Darstellung der Zellen. Nur vitale Zellen, erkennbar an der fehlenden Aufnahme des Farbstoffes aufgrund ihrer intakten Zellmembran, gingen in die Zählung ein. Das Gittermuster der Zählkammer erlaubte die standardisierte Auszählung vorhandener Zellen. Ermittelt wurde die Anzahl an Zellen in jedem der vier Eckquadranten des Gitters. Diese vier Werte (n_1 , n_2 , n_3 , n_4) wurden anschließend in folgende Formel zur Berechnung der Zellzahl je ml der Suspension eingesetzt:

$$[(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) : 4] \times 10^4 \times 2 = \text{Zellzahl/ml}$$

Mit:

10⁴: Volumenfaktor:

1 mm² (Fläche eines Eckquadranten) x 0,1 mm (Höhe der Zählkammer) = 0,1 mm³
bzw. 10⁻⁴ ml (Volumen eines Eckquadranten)

2: Verdünnungsfaktor

(Zellsuspension zu Trypanblau im Verhältnis 1:1)

2.2.1.7 KRYOKONSERVIERUNG

Nach Trypsinierung von Zellen bestand die Möglichkeit diese für den späteren Gebrauch zu kryokonservieren. Nach Zentrifugation der Zellsuspension wurde das Zellpellet mit kaltem, vor Licht geschütztem Einfriermedium, bestehend aus FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) - Zusatz resuspendiert. Nach erfolgter Zellzählung wurde so viel Einfriermedium verwendet, dass die gewünschte Zellzahl pro ml erreicht wurde. Je 1 ml der Suspension wurde in ein Einfrierröhrchen (Cryogenic vial) gefüllt. Über Nacht wurden diese bei -80 °C gelagert, am nächsten Tag in den Stickstofftank überführt und dort in der Dampfphase des flüssigen Stickstoffs bei einer durchschnittlichen Temperatur von -150 °C bis -160 °C gelagert.

2.2.1.8 AUFTAUEN VON ZELLEN

Vor der Entnahme aufzutauender Zellen aus dem Stickstofftank wurde ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 9 ml Standardmedium vorbereitet. Anschließend wurde das gewünschte Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad erwärmt. Um die toxische Wirkung des Einfriermediums auf die Zellen zu minimieren wurden diese nur so lange erwärmt, dass noch ein kleiner Eiskern im Röhrchen zu sehen war. Die so aufgetauten Zellen wurden jetzt in das vorbereitete Medium pipettiert, anschließend 5 min mit 1500 UpM zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Zellpellet wurde mit 10 ml Standardmedium resuspendiert und die Suspension in eine neue T75 Kulturflasche gegeben. Der erste Mediumwechsel erfolgte dann am nächsten Tag.

2.2.2 ASC-MONOLAYERKULTUREN ZUR IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG

2.2.2.1 ANLAGE VON ASC-MONOLAYERKULTUREN ZUR IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG

Zur Durchführung von Immunfluoreszenzfärbungen von ASC-Monolayerkulturen war es notwendig, die Zellen auf einem planen Träger anzusiedeln der mobilisiert werden konnte und so eine Inkubation mit Antikörperlösung und eine Platzierung auf einem Objektträger zur Auswertung und Aufbewahrung ermöglichte. Als Träger wurden sterile runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 13 mm verwendet, die in die Wells einer 48-Well-Platte (Nunc™ Multidish 48) eingelegt wurden. In Kultur befindliche Zellen aus Kulturflaschen wurden durch Trypsinierung gelöst und in Suspension gebracht. In je ein Well mit Deckglas wurden 2×10^4 Zellen in 1 ml Standardmedium angesiedelt. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Zellfixierung.

2.2.2.2 ZELLFIXIERUNG VON ASC-MONOLAYERKULTUREN

Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen der ASC-Monolayerkulturen in den Wells zweimal mit 1 x PBS (10 % 10-fach konzentrierter PBS in Aqua dest.) gewaschen, anschließend zügig mit eiskaltem 4 % Paraformaldehyd (PFA, vgl. 2.2.2.2.1) mit ca. 0,5 ml/Well bedeckt und 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. 4 % PFA wurde abpipettiert und die Zellen kurz unter dem Abzug getrocknet. Fixierte Zellen wurden bis zu Weiterverarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt und bei längerer Lagerzeit mit 1 x PBS bedeckt.

2.2.2.2.1 HERSTELLUNG VON 4 % PARAFORMALDEHYD (PFA)

8 g Paraformaldehyd wurden in ein Becherglas abgewogen und in etwa 80 ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) aufgelöst. Die Lösung wurde unter ständigem Rühren mit einem Magnetstäbchen auf dem Electronicrührer bei ca. 50 °C mehrere Stunden erwärmt. Es wurden

dann NaOH-Plätzchen zugegeben bis die Flüssigkeit klar wurde. Unter dem Abzug wurde die Lösung durch einen Faltenfilter in ein neues Becherglas filtriert. Mit HCl wurde der pH-Wert auf 7 eingestellt und Aqua dest. zugegeben bis das Volumen der Lösung 100 ml betrug. Anschließend wurden noch 100 ml 2-fach konzentrierter PBS, der aus 20 ml 10-fach konzentriertem PBS mit 80 ml Aqua dest. hergestellt wurde, zugegeben. Aliquots wurden bei -20 °C eingefroren.

2.2.2.3 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON ASC-MONOLAYERKULTUREN

Mit den Immunfluoreszenzfärbungen war es möglich Zielstrukturen durch Antikörperbindung anzufärben. Zielstrukturen von menschlichen Zellen wurden durch Zugabe der jeweiligen spezifisch gegen sie gerichteten Antikörper gebunden. Diese wurden als erster Antikörper (1. AK) bezeichnet, stammten von der Maus und gehörten zur der Immunglobulinklasse G (IgG). Ein zugegebener zweiter, von Ziegen gewonnener Antikörper war gegen IgG der Maus gerichtet und konnte sich so mit einem ersten Antikörper verbinden. Diese zweiten Antikörper (2. AK) waren mit einem fluoreszierenden Farbstoff (Alexa 488) verbunden. Eine höhere Intensität des Fluoreszenzsignals konnte somit als erhöhtes Vorkommen von Zielstrukturen, die die Antikörperbindung ermöglichten, gewertet werden. Um Zellen unabhängig von dem Vorhandensein von Zielstrukturen des 1. Antikörpers darstellen zu können, wurden zusätzlich die Zellkerne mit dem blau fluoreszierenden Hoechst angefärbt.

Im Rahmen dieser Arbeit fanden für die Monolayerkultur-Färbungen ASCs bis in fünfter Passage Verwendung.

Folgende Lösungen aus Tabelle 7 wurden zur Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen benötigt:

1 x PBS	10 % 10-fach konzentrierter PBS in Aqua dest.
Waschpuffer	0,1 % Brij [®] L23 solution in 1 x PBS
BSA-Lösung	5 % BSA in 1 x PBS
1. Antikörperlösung	1. AK in BSA-Lösung (Konzentration siehe 2.1.5)
Triton-Lösung	0,1 % Triton [®] X-100 in 1 x PBS
2. Antikörperlösung	2. AK in 1 x PBS (Konzentration siehe 2.1.5)
Hoechst-Lösung	Hoechst 33342 in 1 x PBS (Verdünnung 1:1000)

Tab. 7 Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbungen

Fixierte Zellen wurden 3 x 5 min mit Waschpuffer (1 ml/Well) unter leichtem Schütteln (ca. 20 UpM) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit BSA-Lösung (0,5 ml/Well) zum Blockieren von unspezifischen Antikörperbindungen für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen mit dem entsprechenden 1. Antikörper wurden auf Parafilm M[®] getropft (60 µl/Glas), als negative Kontrolle wurde BSA-Lösung verwendet. Mit einer Federstahlpinzette wurden die Gläser aus den Wells entnommen, der Rand auf einem

Küchentuch abgetupft und anschließend mit der besiedelten Seite auf der Antikörperlösung platziert. Es wurde darauf geachtet Luftblasen zu vermeiden. Die Parafilmstreifen mit den Präparaten wurden in einer Färbekammer mit etwas Aqua dest., um Austrocknung zu vermeiden, über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Gläser mit der Pinzette in neue, Waschpuffer gefüllte Wells gegeben, die Zellen zeigten wieder nach oben, und insgesamt 3 x 5 min mit Waschpuffer (1 ml/Well) unter leichtem Schütteln gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation in Tritonlösung (1 ml/Well) für 15 min bei Raumtemperatur und wiederum 3 x 5 min Waschen mit Waschpuffer (1 ml/Well) unter leichtem Schütteln.

Nachfolgend wurden die Präparate für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit der 2. Antikörperlösung (200 µl/Well) inkubiert. Ab dem Zeitpunkt der Zugabe des fluoreszierenden 2. Antikörpers wurden die Proben vor Licht geschützt. Nach weiteren drei fünfminütigen Waschgängen mit Waschpuffer (1 ml/Well) unter leichtem Schütteln, wurde die ebenfalls fluoreszierende Hoechstlösung zur Kernfärbung zugegeben (200 µl/Well) und unter leichtem Schütteln 8 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden weitere 4 x 5 min mit Waschpuffer (1 ml/Well) unter leichtem Schütteln gewaschen. Zum Eindecken wurden die Gläser mit der Pinzette aus den Wells entnommen, der Rand auf einem Küchentuch getrocknet und mit der zellhaltigen Seite in einem Tropfen Fluoromount W (ca. 30 µl/Glas) auf einem Objektträger platziert. Die Präparate wurden in Dunkelheit bei 4 °C gelagert. Nach dem Trocknen erfolgte die Auswertung mit Fotodokumentation unter dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop 40 mit dazu passenden Filtersets, AxioCam MRc 5 und AxioVision Rel. 4.9 Software.

2.2.3 ASC-KULTUREN AUF SCAFFOLDS

2.2.3.1 BESCHREIBUNG DER SCAFFOLDS

Die verwendeten Scaffolds wurden am Friedrich-Baur BioMed Center (Bayreuth, Deutschland) entwickelt, produziert, sterilisiert und in versiegelten 48-Well-Platten geliefert. Nach Angaben des Herstellers bestanden die Scaffolds aus biphasischem Kalziumphosphat, das sich zu 60 % aus Hydroxyapatit und zu 40 % aus beta-Tricalciumphosphat zusammensetzte, und die Herstellung erfolgte mit Rapid Prototyping Technik im 3D-Druck-Verfahren (Abb. 1, 2). Die Scaffolds wurden mit dem digitalen Auflichtmikroskop „Smartzoom 5“ analysiert.

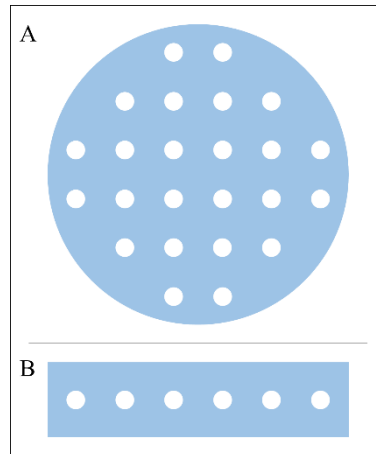


Abb. 1 Schemazeichnung der Scaffolds in der Draufsicht (A) und der seitlichen Ansicht (B)

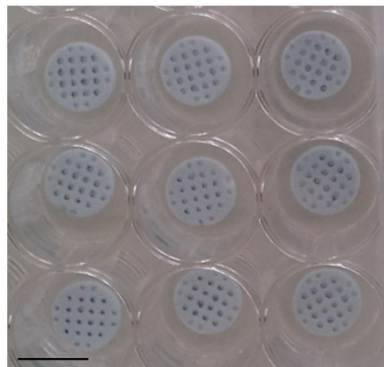


Abb. 2 Darstellung der biphasischen Kalziumphosphat-Scaffolds in den Wells einer 48-Well-Platte
Maßstab balken: ca. 8 mm

2.2.3.2 VERSUCHSANSATZ DER SCAFFOLDKULTUREN

In drei Versuchen (V1, V2, V3) wurden die Zellen von drei Patienten untersucht. Pro Versuch wurden Zellen auf 75 Scaffolds angesiedelt. Für eine Besiedelung der 75 Scaffolds war eine Anzahl von 2×10^6 Zellen notwendig. Die Zellen wurden kultiviert bis sie in ausreichender Zahl vorhanden waren und dann in Passage 2 oder 3 auf den Scaffolds angesiedelt. Die Kultivierung besiedelter Scaffolds fand in 48-Well-Platten mit je einem Scaffold pro Well statt. Die Besiedelung und Kultivierung erfolgte nach folgendem Schema (vgl. Abb. 3):

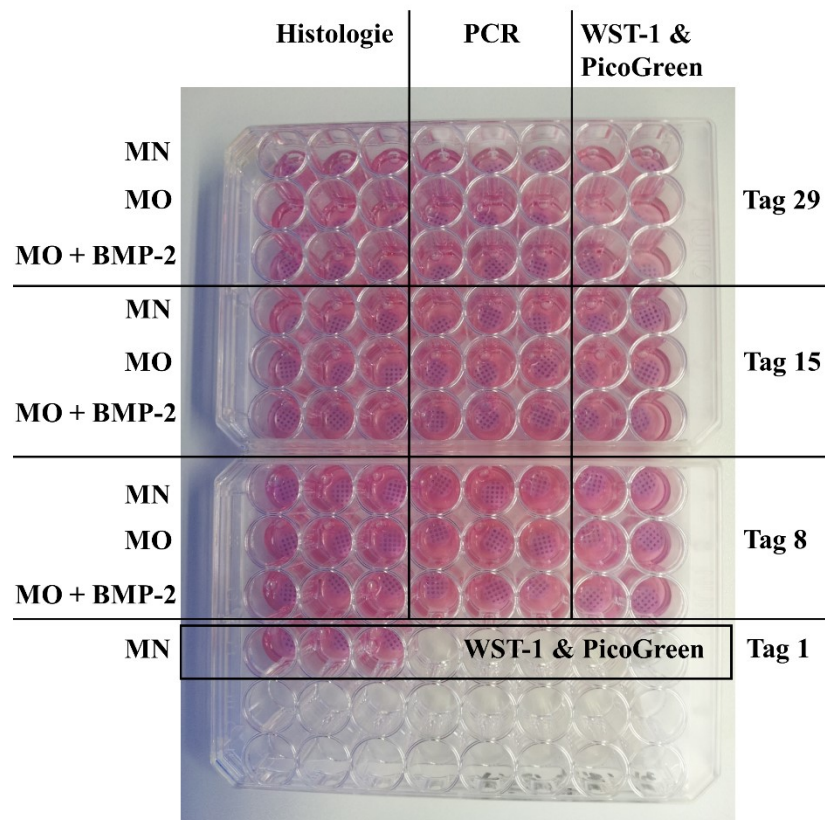


Abb. 3 Übersicht über den Versuchsaufbau der Scaffoldkulturen

Die Besiedelung der Scaffolds mit Verwendung von normalem Wachstumsmedium (MN) für alle 75 Scaffolds wurde als Tag 0 bezeichnet. An Tag 1 erfolgte die erste Probenentnahme zur Durchführung des WST-1 Tests und PicoGreen Assays mit drei Scaffolds sowie die Scaffoldtransferierung in neue Wellplatten. Für die weitere Kultivierung wurden die verbliebenen 72 Scaffolds ab Tag 1 in drei gleichgroße Versuchsgruppen eingeteilt, die sich bezüglich der Kulturmedien unterschieden. Es wurde normales Wachstumsmedium (MN), osteogenes Wachstumsmedium (MO) und osteogenes Wachstumsmedium mit rhBMP-2 Zusatz (MO + BMP-2) verwendet. Die nächsten Probenentnahmen erfolgten dann an Tag 8 und Tag 15 sowie abschließend an Tag 29. Zu diesen Zeitpunkten wurde mit jeweils zwei Scaffolds pro Versuchsgruppe der WST-1 Test und der PicoGreen Assay durchgeführt, aus jeweils drei Scaffolds pro Versuchsgruppe wurde die RNA zur Genexpressionsanalyse isoliert und weitere drei Scaffolds pro Versuchsgruppe wurden für histologische Untersuchungen entnommen (Abb. 3).

2.2.3.2.1 VORBEREITUNG DER SCAFFOLDS ZUR BESIEDELUNG MIT ASCs

Die steril gelieferten Scaffolds wurden entsprechend dem Versuchsansatz in die Wells von 48-Well-Platten übertragen. Vor einer Besiedelung mit Zellen wurden die Scaffolds für einen Zeitraum von 3 bis 24 Stunden in normalem Wachstumsmedium (500 µl/Well) im Brutschrank inkubiert (equilibriert).

2.2.3.2.2 SCAFFOLDBESIEDELUNG MIT ASCs

Die für den jeweiligen Versuch benötigten, in Kultur befindlichen Zellen wurden trypsinisiert und gezählt. Anschließend wurde eine Suspension mit 5×10^5 Zellen/ml hergestellt. Das zur Equilibrierung verwendete Medium wurde vollständig aus den Wells mit den Scaffolds entfernt. Jeweils 50 μ l der Zellsuspension wurden tropfenweise mittig auf die Scaffolds pipettiert, sodass jedes Scaffold mit ca. 25000 Zellen besiedelt wurde. Nach 1 Stunde Inkubation zur Adhäsion der Zellen am Scaffold wurden 300 μ l/Well normales Wachstumsmedium hinzugefügt und die Kultivierung begonnen.

2.2.3.2.3 SCAFFOLDTRANSFERIERUNG

An Tag 1 des Versuchsansatzes erfolgte eine Transferierung der Scaffolds in neue Wells. Dieser Schritt wurde unternommen, um im weiteren Verlauf nur die Zellen zu kultivieren, die am Scaffold und nicht am Plastik adhärirt hatten. Dazu wurden neue 48-Well-Platten entsprechend der Versuchsgruppen jetzt mit den drei unterschiedlichen Wachstumsmedien befüllt (300 μ l/Well) und die Scaffolds in entsprechende Wells steril übertragen.

2.2.3.2.4 MEDIUMWECHSEL

In Versuch 1 und 3 fiel Tag 1 des Versuches auf einen Dienstag, in Versuch 2 auf einen Mittwoch. Der erste Mediumwechsel erfolgte bei allen Versuchen am folgenden Freitag und anschließend immer montags, mittwochs und freitags.

2.2.3.3 ZELLVITALITÄTS- UND PROLIFERATIONSTESTS

2.2.3.3.1 WST-1 TEST

Water soluble tetrazolium-1 (WST-1) ist ein rötlich gefärbtes, wasserlösliches Tetrazoliumsalz das durch zelluläre Enzyme zu wasserlöslichem Formazan reduziert werden kann und dabei eine Farbveränderung der Lösung bewirkt, die spektrophotometrisch gemessen werden kann [90, 91]. Der Zusammenhang zwischen der Menge des produzierten Formazans und der Anzahl lebender Zellen in der Lösung ist dabei direkt proportional [91].

Zur Messung verwendete WST-1-Lösung wurde frisch vorbereitet und enthielt WST-1-Reagenz (Cell Proliferation Reagent WST-1) in normalem Wachstumsmedium im Verhältnis 1:10. Je 600 μ l/Well WST-1-Lösung wurden in eine neue 48-Well-Platte pipettiert. Mit einer Pinzette wurden die zu messenden Scaffolds entnommen und in jeweils ein Well mit WST-1-Lösung gelegt. Zur Messung des Blank-Wertes wurde ein Well mit WST-1-Lösung befüllt, aber kein Scaffold zugegeben. Die Proben wurden anschließend für exakt 2 Stunden im Inkubator aufbewahrt. Danach wurden jeweils 100 μ l/Well der WST-1-Lösung, nach auf- und

abpipettieren zum Durchmischen, in neue Wells einer 96-Well-Messplatte (Nunc™ MicroWell™ 96F) pipettiert. Entstandene Luftblasen wurden durch Anstechen mit Kanülen (Microlance 3, 0,9 x 40 mm) entfernt. Im Microplate reader wurde die Absorbance (Extinktion) mit einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

2.2.3.3.2 PICOGREEN ASSAY

Der PicoGreen Assay wurde zur Messung von DNA-Konzentrationen angewendet. Der Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen bindet doppelsträngige DNA (dsDNA), woraufhin das Fluoreszenzsignal stark ansteigt [92]. Durch Messung der Fluoreszenz von DNA-Standardkonzentrationen bei jeder Probenmessung, konnte das gemessene Probensignal in die darin enthaltene DNA-Menge umgerechnet werden.

Verwendet wurde das Kit Quant-iT™PicoGreen®dsDNA Assay-Kit. Darin enthalten waren Quant-iT™PicoGreen®dsDNA reagent (Farbstoff-Stock), 20x TE und Lambda DNA standard (DNA-Stock).

Zur Durchführung des Assays benötigte Lösungen sind in Tabelle 8 aufgeführt:

Lyse Puffer	17,53 g NaCl und 8,82 g Na ₃ Citrat in ca. 80 ml Aqua dest. lösen, den pH mit HCl auf 7,2 einstellen und mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen. Anschließend 1:20 mit Aqua dest. verdünnen. 0,2 g SDS pro 100 ml (0,2 %) zugeben.
TE-Puffer	20x TE-Puffer (Kit) in 1:20 Verdünnung mit Distilled water DNase/RNase free
Indikatorreagenz	für 100 µl: 5 µl Farbstoff-Stock (Kit) + 99,5 µl TE-Puffer

Tab. 8 Lösungen für den PicoGreen Assay

Aus 30 µl DNA-Stock (Kit) wurde mit 1,47 ml TE-Puffer ein Standard-DNA-Stock von 2 µg DNA/ml angelegt. Hieraus wurde die Verdünnungsreihe zur Herstellung der DNA-Standard-Lösungen, wie in Tabelle 9 abgebildet, angesetzt.

Standard-DNA-Stock [in µl]	TE-Puffer [in µl]	DNA-Konzentration [in µg/ml der DNA-Standard-Lösungen]
1000	0	2
500	500	1
100	900	0,2
10	990	0,02
0 (Blank)	1000	0

Tab. 9 Verdünnungsreihe zur Herstellung der DNA-Standard-Lösungen

Der PicoGreen Assay wurde an denselben Proben durchgeführt, die zuvor im WST-1 Test analysiert worden waren. Zusätzlich zu den Proben und dem Blank-Wert wurden auch bei jedem PicoGreen Assay fünf Standard-DNA-Konzentrationen gemessen.

Die noch vorhandene WST-1-Lösung wurde entfernt und 300 µl/Well angewärmter Lyse Puffer unter kräftigem Spülen des Scaffolds zugegeben und mindestens 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In eine 96-Well-Messplatte wurden 80 µl/Well TE-Puffer pipettiert, 20 µl/Well der Lyselösung der Proben oder des Blanks bzw. 20 µl/Well der DNA-Standard-Lösungen zugegeben sowie 100 µl/Well Indikatorreagenz zugefügt. Dabei wurde auf Lichtschutz geachtet und vorhandene Luftblasen durch Anstechen mit Kanülen entfernt. Am Microplate reader wurden die Proben mit einer Strahlenquelle von 480 nm erregt und die Intensität der Fluoreszenzemission bei 520 nm gemessen.

2.2.3.4 MRNA-EXPRESSIONSANALYSE

Allgemeine Arbeitsbedingungen

Die im Rahmen der RNA-Isolation durchzuführenden Arbeitsschritte Quiazol® Lysis Reagent- und Chloroform-Zugabe erfolgten unter dem Abzug. Die nachfolgenden Arbeitsschritte zur Isolation von RNA, die cDNA-Synthese und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) fanden an einem PCR-Arbeitsplatz statt. Dieser wies eine Glasüberdachung auf. Arbeitsoberfläche und Arbeitshandschuhe wurde vor Benutzung mit RNase Zap®-Spray gereinigt. Des Weiteren wurden hier sogenannte PCR-clean Verbrauchsgegenstände, die frei von DNasen und RNase waren, verwendet.

2.2.3.4.1 RNA-GEWINNUNG

Homogenisierung

Der erste Schritt der RNA-Gewinnung bestand in einer Homogenisierung der Proben im Dismembrator. Zuerst wurde das Kulturmedium entfernt und die Proben zweimal mit je 600 ml PBS (Dulbecco) gewaschen. Die Scaffolds wurden mit der Federstahlpinzette aus den Wells entnommen, auf einem Küchentuch getrocknet und je ein Scaffold in ein Einfrierröhrchen gegeben. Diese wurden dann in flüssigen Stickstoff geworfen. Dismembratorokugeln wurden nacheinander in Ethanol absolut Emplura®, 0,5 M NaOH und Distilled water DNase/RNase free gereinigt. Je eine gereinigte und anschließend auf einem Küchentuch getrocknete Kugel wurde zu einem Scaffold in ein Einfrierröhrchen in Stickstoff gegeben. Anschließend wurden die Proben aus dem Stickstoff entnommen, im Dismembrator eine Minute mit 3000 UpM zerkleinert und auf Eis gelagert.

RNA-Isolierung

Um die RNA aus den Proben zu isolieren wurde zu den aufgetauten Proben je 1 ml QUIazol® Lysis Reagent gegeben und gevortext. Durch Entlangfahren an der Außenseite der Röhrchen

mit einem Stabmagneten wurden die Dismembratorkugeln aus den Gefäßen entfernt. Für jede Probe wurde ein neues PCR-clean Safe-Lock Tube mit 200 µl Chloroform gefüllt und der Inhalt des Einfrierröhrchens vollständig zugegeben, 15 sec kräftig geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend 30 min bei 15000 rcf und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren trennte sich die Probe in eine untere, rote Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere farblose wässrige Phase, die die RNA enthielt. Nur die klare Phase mit der benötigten RNA wurde mit einer 200 µl Pipette in ein neues Gefäß überführt und weiterverarbeitet.

RNA-Fällung

Zur RNA-Fällung wurde 0,5 ml Isopropyl alcohol je Gefäß zugegeben, gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C mit der Maximalgeschwindigkeit der Zentrifuge von 20817 rcf über Nacht zentrifugiert. Die RNA sammelte sich dadurch als Pellet am Boden des Gefäßes.

Waschen der RNA

Im Anschluss wurde die RNA gewaschen. Alle Proben wurden während der folgenden Versuchsschritte auf Eis gelagert. Der nach der Zentrifugation entstandene Überstand wurde abgossen und verworfen. Zuerst wurde 1 ml/Gefäß 75 % Ethanol, der aus mit Aqua ad iniectabilia verdünntem Ethanol absolut Emplura® hergestellt worden war, zugegeben ohne das Pellet zu resuspendieren. Es folgte eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 4 °C und 20817 rcf. Nach Abgießen des Überstands wurde 0,5 ml/Gefäß 75 % Ethanol zugegeben und erneut 20 min bei 4 °C und 20817 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und ein Ethanolrest zuerst mit einer 200 µl, dann mit der 10 µl Pipette abgesaugt. Das Pellet wurde anschließend ca. 5 min bei geöffnetem Deckel getrocknet bis es eine glasige Farbe annahm.

Lösen der RNA

Die RNA wurde in 32 µl Distilled water DNase/RNase free pro Probe gelöst und 20 min auf dem Thermomixer bei 37 °C gewärmt, anschließen auf Eis gestellt, gevortext und herunterzentrifugiert.

Messung der RNA-Konzentration mit dem NanoDrop™

Mit dem NanoDrop™ wurde die Konzentration der isolierten, in Distilled water DNase/RNase free gelösten RNA spektrophotometrisch ($A_{260/280}$) gemessen. Pro Messung wurden 2 µl benötigt. Nach vorheriger Messung von DNase/RNase freiem Distilled water zur Ermittlung des Blank-Wertes, erfolgte die Messung der Proben.

Bei Bedarf wurde die isolierte RNA anschließend bei -80 °C eingefroren.

2.2.3.4.1.1 PROBENASSERVATION FÜR DIE SPÄTERE RNA-GEWINNUNG

War nach der Probenentnahme eine sich direkt anschließende Homogenisierung nicht möglich, wurden die Proben in RNAlater®-Lösung asserviert. Dazu wurden die Proben nach der Entnahme auf Küchentuch getrocknet und in je ein PCR-clean Safe-Lock Tube mit 1 ml RNAlater®-Lösung gegeben und bei 4 °C einen Tag, optional bis zu einem Monat, asserviert. Anschließend konnten die Proben entnommen, getrocknet und in Einfrierröhrchen gegeben werden und bei -80 °C weiter gelagert oder mit der RNA-Gewinnung fortgefahren werden. Sollten die Proben nach der Homogenisierung asserviert werden, wurde das Protokoll zur RNA-Gewinnung bis zur Zugabe des QIazol® Lysis Reagent und dem Entfernen der Dismembratorkugel durchgeführt und die Proben anschließend bei -80 °C gelagert, bis mit der RNA-Gewinnung fortgefahren wurde.

2.2.3.4.1.2 RNA-GEWINNUNG AUS ZELLEN IN ZELLKULTURFLASCHEN

Um die RNA aus Zellen aus Kulturflaschen zu isolieren, wurden die Zellen durch Trypsinierung gelöst, die Zellsuspension 5 min zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Zellpellet wurde mit 5 ml PBS (Dulbecco) resuspendiert und weitere 5 min zentrifugiert. Der PBS-Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellpellet in 1 ml QIazol® Lysis Reagent gelöst. Nach Überführung in ein PCR-clean Safe-Lock Tube konnte die RNA-Isolation fortgesetzt oder die Proben bei -80 °C zwischengelagert werden.

2.2.3.4.2 cDNA-SYNTHESE

Das Umschreiben der RNA in cDNA im Thermocycler erfolgte mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit. Darin enthalten waren 7x gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, 5x Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix und RNase-Free Water. Alle Reagenzien und Proben wurden auf Eis gelagert und nach dem Auftauen anzentrifugiert.

Für alle 29-tägig kultivierten Proben wurde jeweils 1 µg RNA ($x = 1$) umgeschrieben. Da die RNA-Ausbeute nach 8 und 15 Tagen Kultur niedriger ausgefallen war, wurden hier RNA-Mengen zwischen 0,1 und 1 µg umgeschrieben. Um die gewünschte RNA-Menge umzuschreiben, musste zuvor eine Konzentrationsangleichung erfolgen. Entsprechend den im NanoDrop™ gemessenen RNA-Konzentrationen y [in µg/µl] wurde die benötigte Menge der RNA-Probe in ein PCR-Tube gegeben und mit RNase-Free Water auf 12 µl aufgefüllt. Außerdem wurde 7x gDNA Wipeout Buffer hinzugefügt. In je ein PCR-Tube wurden die Proben somit nach dem Schema in Tabelle 10 pipettiert:

RNA-Probe [in μl], die die gewünschte RNA-Menge x [in μg] enthält; y [in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] entsprechend der im NanoDrop™ gemessenen RNA-Konzentration	$\frac{x}{y}$
RNase-Free Water [in μl]	$12 - \frac{x}{y}$
7x gDNA Wipeout Buffer [in μl]	2
Gesamtvolumen [in μl]	14

Tab. 10 Inhalt eines PCR-Tubes für das 1. Thermocyclerprogramm der cDNA-Synthese

Nach Vortexen und Zentrifugieren wurden die PCR-Tubes in den Thermocycler gestellt und das folgende, in Tabelle 11 dargestellte, 1. Thermocyclerprogramm gestartet:

Bei einer Deckeltemperatur von 105 °C	
42 °C	2 min
4 °C	∞

Tab. 11 1. Thermocyclerprogramm der cDNA-Synthese

Nach Erreichen des letzten Programmschrittes wurden je PCR-Tube 6 μl Mastermix zugefügt. Der Mastermix für eine Probe setzte sich, wie in Tabelle 12 gezeigt, zusammen:

Quantiscript Reverse Transcriptase	1 μl
5x Quantiscript RT Buffer	4 μl
RT Primer Mix	1 μl
Gesamtvolumen	6 μl

Tab. 12 Mastermix für die cDNA-Synthese (Menge für eine Probe)

Nach anschließendem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben erneut in den Thermocycler gestellt und das, in Tabelle 13 dargestellte, 2. Thermocyclerprogramm gestartet:

Bei einer Deckeltemperatur von 105 °C	
42 °C	15 min
95 °C	3 min
4 °C	∞

Tab. 13 2. Thermocyclerprogramm der cDNA-Synthese

Anschließend wurde jede Probe mit 20 μl RNase-Free Water verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.4.3 QUANTITATIVE REAL TIME PCR (QRT-PCR)

Die Genexpression von cDNA-Proben wurden mittels quantitativer real time Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) untersucht. Das im PCR-Mastermix enthaltene SYBR-Green bindet an doppelsträngige DNA und sendet dabei ein Fluoreszenzsignal aus, das mit der vorhandenen DNA-Menge korreliert und so eine

Quantifizierung ermöglicht [93]. Im LightCycler® wurde das Überschreiten eines bestimmten Fluoreszenz-Schwellenwertes als Ct (Cycle threshold) -Wert gemessen.

Vor jedem Experiment wurde ein Primer spezifisches LightCycler® Programm erstellt (siehe Tabelle 14). Der Preinkubationsphase schloss sich die Amplifikationsphase an, in der sich drei aufeinanderfolgende Reaktionsschritte in einer bestimmten Zyklenzahl wiederholten (3 Step Amplification). Als erster Schritt wurde bei 95 °C die DNA denaturiert, es folgt die Anlagerung der Primer (Annealing) und schließlich die Amplifikation der DNA bei 72 °C. Das Programm endete mit Melting und Cooling.

	<i>GAPDH</i>	<i>ALP</i>	<i>Osteokalzin</i>	<i>Collagen 1</i>
<i>Preinkubation:</i> (Ramp 4,4 °C/sec) 95 °C für 600 sec				
<i>3 Step Amplification:</i> (Ramp 4,4 °C/sec)				
1. Denaturierung bei 95 °C	10 sec	10 sec	30 sec	10 sec
2. Primerhybridisierung: Annealingtemperature	60 °C	60 °C	64 °C	65 °C
Annealingtime	10 sec	10 sec	30 sec	10 sec
3. Amplifikation bei 72 °C	15 sec	15 sec	30 sec	15 sec
Anzahl der Zyklen	45	45	45	40
<i>Melting:</i> (Ramp 4,4 °C/sec) 95 °C für 10 sec 65 °C für 60 sec 97 °C für 1 sec				
<i>Cooling:</i> (Ramp 2,2 °C/sec) 37 °C für 30 sec				

Tab. 14 LightCycler®-Programm für die qRT-PCR

cDNA-Proben, Primer sowie das im PCR-Kit enthaltene PCR Grade Water und der FastStart Essential DNA Green Master 2x konzentriert mit dem SYBR-Green, mit letzterem unter Lichtschutz, wurden auf Eis gelagert, nach dem Auftauen gevortext und zentrifugiert.

Der PCR-Mastermix wurde nach folgendem Schema, wie in Tabelle 15 abgebildet, vorbereitet:

Primer	0,3 µl
PCR Grade Water	2,2 µl
SYBR-Green	5,0 µl
Gesamtvolumen	7,5 µl

Tab. 15 PCR-Mastermix für eine Probe

In eine analog dem erstellten LightCycler® Programm beschriftete PCR-Platte wurden 2,5 µl cDNA/Well pipettiert. Als negative Kontrolle wurde PCR Grade Water anstelle der cDNA verwendet. Alle Proben wurden in Triplets gemessen. 7,5 µl Mastermix/Well wurden hinzugefügt. Die PCR-Platte wurde verschlossen und kurz zentrifugiert, dabei wurde auf Lichtschutz geachtet. Anschließend wurde die PCR-Platte im LightCycler® platziert und das

Programm gestartet. Am Ende der Messung wurde für jedes Well mit entsprechender Probe der Ct- und der Ct Error-Wert angezeigt, die für die Auswertung benötigt wurden.

2.2.3.5 HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER ASC-SCAFFOLDKULTUREN

2.2.3.5.1 HERSTELLUNG VON GEFRIERSCHNITTPRÄPARATEN

2.2.3.5.1.1 FIXIERUNG IN PFA

Die Scaffolds wurden mit der Federstahlpinzette aus den Wells entnommen und auf einem Küchentuch trocken getupft. Je drei Scaffolds einer Versuchsgruppe wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben, das mit ca. 10 ml eiskaltem 4 % PFA gefüllt war, und darin über Nacht bei 4 °C gelagert.

2.2.3.5.1.2 SCAFFOLDEINBETTUNG IN AGAROSE

Nach der Fixierung der Zellen in den Scaffolds in 4 % PFA über Nacht erfolgte eine Einbettung in Agarose. In einer Gewindeflasche wurde 1 % Agarose in 1 x PBS hergestellt, kurz in der Mikrowelle bis zum Siedepunkt erhitzt und auf der Wärmeplatte warmgehalten. Bei der Verwendung betrug die Temperatur der Agarose 55 – 60 °C. Das einzubettende Scaffold wurde aus der 4 % PFA-Lösung in eine Petrischale gegeben und mit der Pinzette sanft in der Petrischale abgeklopft, um Wassertropfen zu entfernen. In eine Einbettungsschale (Disposable Vinyl Specimen Mold) der Größe Biopsy wurde ein kleiner ca. 1 mm³ großer Agarosequader platziert und das Scaffold schräg darauf gelagert, um die Auflagefläche auf dem Plastik zu minimieren. Die flüssige Agarose wurde jetzt, um Luftblasenbildung zu vermeiden, tropfenweise auf das Scaffold pipettiert bis die Einbettungsschale gefüllt war. Nach dem Auskühlen wurde das eingebettete Scaffold in die Entkalkerlösung gegeben.

2.2.3.5.1.3 ENTKALKUNG DER SCAFFOLDS

Für die Entkalkung wurde eine Lösung aus 15 % EDTA in PBS mit pH 7,1 und 10 % Sucrose-Zusatz hergestellt. Die Apotheke lieferte 20 % EDTA-4Na mit pH 7,1. 750 ml dieser Lösung ergab gemischt mit 250 ml vierfach konzentriertem PBS, hergestellt aus 100 ml 10-fach konzentriertem PBS mit 150 ml Aqua dest., die gewünschte Konzentration. Die neu eingebetteten Scaffolds einer Versuchsgruppe wurden zusammen in ein konisches Röhrchen mit ca. 35 ml Entkalkerlösung gegeben. Die Proben wurden unter leichtem Schütteln und wöchentlichem Wechsel der Lösung entkalkt bis die Scaffoldstruktur nur noch schemenhaft erkennbar war.

An Tag 8 entnommene Scaffolds wurden zwischen 41 und 48 Tage entkalkt.

An Tag 15 entnommene Scaffolds wurden in der MN-Gruppe 42 bis 48, in der MO-Gruppe 48 bis 64 und in der MO + BMP-2-Gruppe 42 bis 50 Tage entkalkt.

Die zuletzt an Tag 29 entnommenen Scaffolds wurden in der MN-Gruppe 50 bis 54, in der MO-Gruppe 92 bis 109 und in der MO + BMP-2-Gruppe 49 bis 50 Tage entkalkt.

2.2.3.5.1.4 EINFRIEREN DER ENTKALKTEN PROBEN

Die fertig entkalkten Proben wurden aus der Entkalkerlösung entnommen und in Zentrifugenröhrchen mit einer Lösung aus 1 x PBS mit 30 % Sucrose-Anteil gegeben, in denen sie bei 4 °C über Nacht gelagert wurden. Am folgenden Tag wurden die Proben einzeln in Einbettungsschalen der Größe Intermediate platziert, restliche Flüssigkeit mit Küchentuch abgesaugt und vollständig, möglichst luftblasenfrei in Tissue-Tek® eingebettet. Der Boden der Einbettungsschale wurde dann mit einer Langpinzette in flüssigen Stickstoff gehalten. Der Einfrierungsprozess von außen nach innen wurde beobachtet und sobald nur noch ein kleiner Teil der Probe in der Mitte nicht gefroren war, wurde die Einbettungsschale vollständig in Stickstoff eingetaucht. Die komplett gefrorene Probe wurde sofort in ALU-Laborfolie gewickelt und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.5.1.5 HERSTELLUNG DER GEFRIERSCHNITTE

Zur Herstellung der Schnittpräparate wurde ein Gefriermikrotom verwendet. Die Kammertemperatur betrug ca. -29 °C, die Objektträgertemperatur ca. -31 °C. Eingefrorene Proben wurden im Gefriermikrotom aus ihrer Einbettungsschale gedrückt und mittels Tissue-Tek® auf dem Probenhalter fixiert. Der Messerblock wurde bei Bedarf mit Aceton gereinigt. Es wurden 14 µm dünne Schnitte angefertigt und auf Objektträger (SuperFrost® Plus) aufgezogen. Die Objektträger wurden über Nacht luftgetrocknet und anschließend bis zur Weiterverarbeitung in ALU-Laborfolie gewickelt bei -20 °C gelagert.

2.2.3.5.2 HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN

2.2.3.5.2.1 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG

Die Hämatoxylin-Eosin (H.E.) -Färbung, als typische Routinefärbung zur besseren Differenzierbarkeit unterschiedlicher Zell- und Gewebeelemente, färbt Zellkerne blauviolett und das Zytoplasma rot an [94].

Die Durchführung der H.E.-Färbung unter dem Tischabzug ist in nachfolgendem Färbeprotokoll (Tab. 16) dargestellt:

	Objektträger aus -20 °C Lagerung entnehmen
3 min	Fixieren mit Aceton
2 min	wässern in Aqua dest.
6 min	färben mit Hämatoxylin sauer nach Mayer
5 min	spülen unter fließendem Leitungswasser
6 min	färben mit Eosin 1 %ig, wässrig
5 min	spülen mit Leitungswasser
5 sec intensiv schwenkend	entwässern in Ethanol 70 %
5 sec intensiv schwenkend	entwässern in Ethanol 96 %
5 sec intensiv schwenkend	entwässern in Ethanol 99 %
5 sec intensiv schwenkend	entwässern in Rotihistol
5 min	entwässern in Rotihistol
	Eindecken mit Eukitt
10 min	bei 35 °C im Trockenschrank trocknen

Tab. 16 Färbeprotokoll der H.E.-Färbung

Die Auswertung und Fotodokumentation erfolgte unter dem Precipoint M8 Digital Microscope & Scanner mit der Software TouchMicroscope.

2.2.3.5.2.2 PICROSIRIUS-RED-FÄRBUNG

Die Picosirius-Red-Färbung ermöglicht das Anfärben von Collagen und führt zu einer Verstärkung seiner Doppelbrechung, die unter dem Polarisationsmikroskop farblich sichtbar wird [95].

Die für die Picosirius-Red-Färbung vorzubereitenden Lösungen zeigt Tabelle 17:

Weigert`s Hämatoxylin	Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1 mischen und durch einen Faltenfilter filtrieren
Picosirius-Red	2 g Direct Red 80 auf 200 ml Picosäure
Essigsäures Aqua dest.	400 ml Aqua dest. + 2 ml Eisessig

Tab. 17 Lösungen für die Picosirius-Red-Färbung

Das Färbeprotokoll der unter dem Tischabzug durchgeführten Picrosirius-Red-Färbung ist in Tabelle 18 dargestellt:

	Objektträger aus -20 °C Lagerung entnehmen
15 min	fixieren mit eiskaltem 4 % PFA je 1 ml/OT bei 4 °C
5 min	wässern in Aqua dest.
15 min	färben in Weigert`s Hämatoxylin
15 min	spülen unter fließendem Leitungswasser
1 Stunde	färben in Picrosirius-Red
5 sec	spülen in essigsaurem Aqua dest.
5 sec	spülen in essigsaurem Aqua dest.
5 sec	spülen in Aqua dest.
5 min	entwässern in Ethanol 96 %
5 min	entwässern in Ethanol 96 %
5 min	entwässern in Ethanol 99 %
10 min	entwässern in Rotihistol
10 min	entwässern in Rotihistol
	Eindecken mit Eukitt
10 min	bei 35 °C im Trockenschrank trocknen

Tab. 18 Färbeprotokoll der Picrosirius-Red-Färbung

Die Auswertung und Fotodokumentation erfolgte unter dem Lichtmikroskop Zeiss Axioskop 40 mit entsprechendem Polarisationsfilter unter Verwendung von AxioCam MRc 5 und AxioVision Rel. 4.9 Software.

2.2.3.5.2.3 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON SCAFFOLDKULTUREN

Analog zu dem Prinzip der Immunfluoreszenzfärbungen der ASC-Monolayerkulturen (siehe 2.2.2.3) wurden auch die Scaffoldkulturen angefärbt. Der Waschpuffer, die BSA-, 1. Antikörper-, Triton-, 2. Antikörper- und Hoechst-Lösung wurden wie in Tabelle 7 aufgelistet vorbereitet.

Die zu färbenden Objektträger mit Gefrierschnitten der Scaffoldkulturen wurden aus der -20 °C-Lagerung entnommen, in eine Färbekammer gelegt und 15 min bei 4 °C mit eiskaltem 4 % PFA (1 ml/OT) fixiert. Anschließend wurden die Präparate 3 x 5 min in der Färbeküvette in Waschpuffer gewaschen. Dann mit 5 % BSA-Lösung (1 ml/OT) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurde die 1. Antikörperlösung (150 µl/OT) bzw. als negative Kontrolle 5 % BSA (150 µl/OT) zugegeben und jeder Objektträger unter Vermeidung von Luftblasen mit einem Parafilm M®-Streifen in der Größe eines Deckglases versiegelt. So wurden die Präparate in einer mit etwas Aqua dest. gefüllten Färbekammer über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Präparate zunächst 3 x 5 min in Waschpuffer gewaschen, im Folgenden für 15 min in Tritonlösung bei Raumtemperatur inkubiert und weitere 2 x 5 min in Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die 2. Antikörperlösung (150 µl/OT) zugegeben und

wiederum jeder Objektträger mit Parafilm M® versiegelt. Nach Zugabe des 2. Antikörpers wurden die Präparate vor Licht geschützt. Die Inkubation mit dem 2. Antikörper erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Nach 3 x fünfminütigen Waschgängen in Waschpuffer wurde die Hoechstlösung (500 µl/OT) zugegeben und für 8 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde noch 4 x 5 min in Waschpuffer gewaschen, dann erfolgte das Eindecken der Objektträger. Dazu wurden ca. 6 Tropfen Fluoromount W auf den Objektträger gegeben und anschließend möglichst luftblasenfrei ein Deckglas darauf platziert. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4 °C in Dunkelheit. Die Auswertung und Fotodokumentation erfolgte nach dem Trocknen unter dem Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop 40 mit entsprechenden Filterset, unter Verwendung von AxioCam MRc 5 und AxioVision Rel. 4.9 Software.

Die grünen Fluoreszenzsignale wurden innerhalb jeder Markerfärbung einheitlich belichtet mit folgenden Belichtungszeiten:

233,5 msec: Osteokalzin, Osteopontin, DMP-1

766,5 msec: Sclerostin, CD 73, CD 90

867,5 msec: CD 105

2.2.4 AUSWERTUNG

2.2.4.1 WST-1 TEST UND PICOGREEN ASSAY

Von den gemessenen Probenwerten des WST-1 Tests wurde zuerst der Blank-Wert subtrahiert.

Die im PicoGreen Assay gemessenen Fluoreszenzwerte der Proben wurden anhand des Blank-Wertes und der ermittelten DNA-Standardkurve von der Software Gen5 2.03 in DNA-Konzentrationen umgerechnet.

Für jeweils beide Tests wurden anschließend aus allen Werten der Versuche 1 bis 3 der gleichen Versuchsgruppe zum gleichen Versuchszeitpunkt der Mittelwert und der Standardfehler berechnet und graphisch dargestellt.

2.2.4.2 qRT-PCR

Die Auswertung der LightCycler® Ergebnisse der qRT-PCR erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode, die eine relative Quantifizierung der Genexpression ermöglicht [96]. Für jeden Versuch wurden Kalibratorzellen, in Monolayer kultivierte Zellen die im jeweiligen Versuch zur Besiedelung verwendet wurden, benötigt. Als Referenzgen wurde *GAPDH* eingesetzt. Für *GAPDH* wurde der Ct-Mittelwert jedes Triplets bestimmt, der nachfolgend als Referenzwert für die entsprechende Probe diente. *GAPDH*-Werte mit einem Ct Error > 1 gingen nicht in die Mittelwertberechnung ein. Für die analysierten Zielgene *ALP*, *Osteokalzin* und *Collagen 1* wurde für jeden Ct-Wert der Triplets durch Subtraktion des *GAPDH*-Referenzwertes ein ΔCt -Wert bestimmt. Der ΔCt -Wert der Kalibratorzellen stellte den Kalibratorwert für den entsprechenden Versuch dar, der zur Ermittlung des $\Delta\Delta Ct$ -Wertes von allen ΔCt -Werten

abgezogen wurde. Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte wurden nun noch in die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt, deren Ergebnis die Expressionsunterschiede der Proben im Vergleich zu den Kalibratorzellen als „fold change“ anzeigte. Proben mit nicht messbaren Ct-Werten der Zielgene gingen als Wert Null in die Statistik ein.

2.2.4.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism5 Version 5.02 verwendet. Vergleiche zwischen Versuchsgruppen und –zeitpunkten wurden mit dem two-tailed Paired t-Test mit 95 % Konfidenzintervall durchgeführt. Signifikanzniveaus wurden anhand des p-Wertes ermittelt, wobei hochsignifikant (p-Wert < 0,001; ***), sehr signifikant (p-Wert 0,001 - 0,01; **), signifikant (p-Wert 0,01 - 0,05; *) und nicht signifikant (p-Wert > 0,05; n.s.) unterschieden wurden.

3 ERGEBNISSE

3.1 ASC-MONOLAYERKULTUREN

Aus humanem subkutanem Fettgewebe isolierte ASCs zeigten in Monolayerkulturen ein gutes Proliferationsverhalten unabhängig von Alter, Gewicht und Geschlecht des Gewebespenders sowie eine spindelförmige, fibroblastartige Morphologie (Abb. 4).

Kryokonservierte Zellen waren nach dem Auftauen in ihrer Vitalität und Proliferation nicht supprimiert.

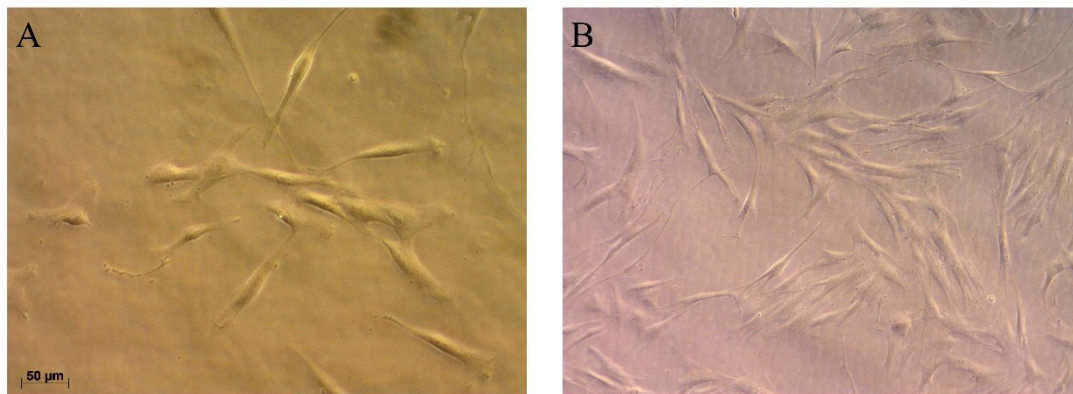


Abb. 4 Lichtmikroskopische Aufnahmen von ASC-Monolayerkulturen in Passage 0 (A) sowie Passage 1 (B)

3.2 IMMUNOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON ASC-MONOLAYERKULTUREN

Zur näheren Charakterisierung isolierter ASCs wurden diese in Monolayerkulturen mittels Immunfluoreszenzfärbungen hinsichtlich der endogenen Expression unterschiedlicher Proteinmarker untersucht. Hierbei zeigten die Zellen stark positive Fluoreszenzsignale für CD 44, CD 105 und CD 166 (Abb. 5 C, G, H), wiesen im Vergleich dazu geringer positive Fluoreszenzsignale für CD 73 und CD 90 (Abb. 5 E, F) auf, waren schwach positiv für CD 39 (Abb. 5 B) und erschienen negativ für CD 34 und CD 45 (Abb. 5 A, D).

Des Weiteren wiesen ASCs in Monolayerkulturen intrazelluläre Expression von Osteokalzin (OC), Osteopontin (OPN) und Dentin matrix protein-1 (DMP-1) auf (Abb. 5 J, K, L). Im Gegensatz dazu wurde in ASC-Monolayerkulturen keine Expression von Sclerostin (Abb. 5 M) nachgewiesen.

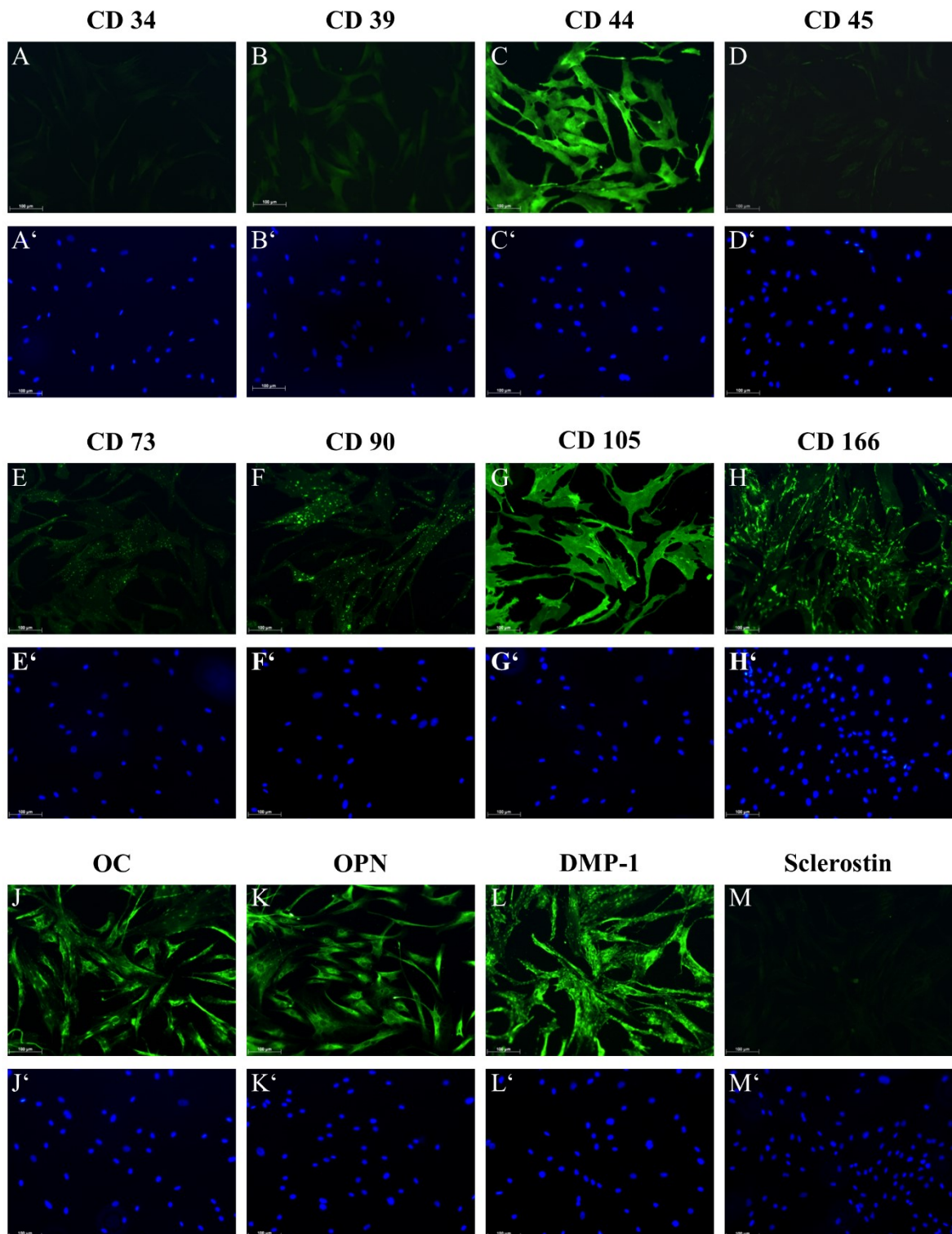


Abb. 5 Immunfluoreszenzfärbungen von ASC-Monolayerkulturen
 Immunfluoreszenz für CD 34 (A), CD 39 (B), CD 44 (C), CD 45 (D), CD 73 (E), CD 90 (F), CD 105 (G), CD 166 (H), Osteokalzin (J), Osteopontin (K), DMP-1 (L) und Sclerostin (M) ist in grün dargestellt. Entsprechende Zellkernfärbungen (*) sind in blau abgebildet.
 Maßstabbalken: 100 μm

3.3 BESCHREIBUNG DER SCAFFOLDS

Die zylinderförmigen, porösen Biokeramik-Scaffolds wurden mit einem Durchmesser von 8 mm, einer Höhe von 2 mm und einem Makroporendurchmesser von ca. 0,5 mm designt (Abb. 6).

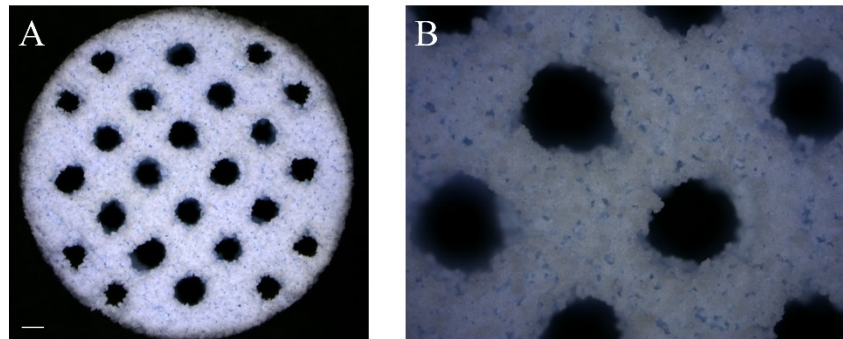


Abb. 6 Biphasische Kalziumphosphat-Scaffolds unter dem Mikroskop bei geringer (A, Maßstabballen: ca. 0,5 mm) und zunehmender Vergrößerung (B)

Die biphasischen Kalziumphosphatpartikel, aus denen die Scaffolds mittels Rapid Prototyping Technik im 3D-Druck-Verfahren in der gewünschten Form hergestellt wurden, ließen sich mikroskopisch darstellen (Abb. 7). Innerhalb des gedruckten Gefüges, dieses HA/ β -TCP-Partikel-Konglomerates, waren sie als kugelförmige Strukturen unterschiedlicher Größe mit Durchmessern im Bereich von ca. 20-75 μm sichtbar.

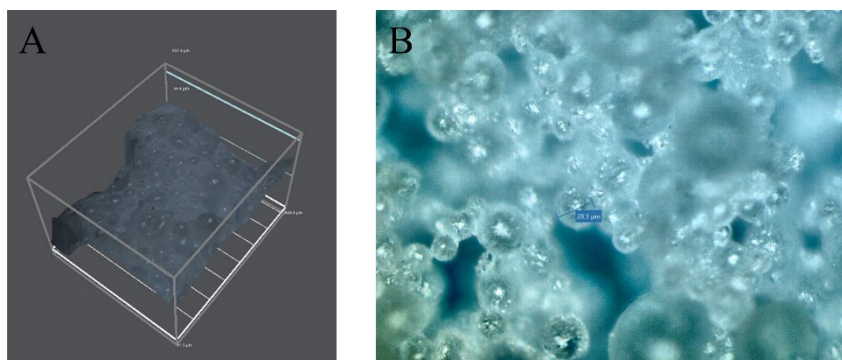


Abb. 7 Innenstruktur der biphasischen Kalziumphosphat-Scaffolds
Darstellung eines Fragmentes in einem dreidimensionalen Koordinatensystem (A) sowie der kugelförmigen Kalziumphosphatpartikel aus denen sich das Scaffold zusammensetzt (B, Maßstabballen: 28,3 μm).

3.4 ZELLPROLIFERATION UND –VITALITÄT IN SCAFFOLDKULTUREN

3.4.1 SCAFFOLDBESIEDELUNG

Die Scaffolds wurden erfolgreich mit hASCs besiedelt und in allen getesteten Wachstumsmedien über einen Zeitraum von bis zu 29 Tagen statisch kultiviert. Nach der Ansiedelung von Zellen auf Scaffolds und dem Scaffoldtransfer an Tag 1 erwies sich die Auswanderung von Zellen auf die Plastikoberfläche der Wellplatten als unerheblich.

3.4.2 WST-1 TEST

Im WST-1 Test gemessene Mittelwerte und ihre Standardfehler für die Extinktion (Absorbance) ergaben an Tag 1 $0,07 \pm 0,01$, an Tag 8 in MN $0,22 \pm 0,04$, in MO $0,47 \pm 0,10$ und in MO + BMP-2 $0,20 \pm 0,03$ (Abb. 8). An Tag 15 ermittelte Werte waren in MN $0,67 \pm 0,13$, in MO $1,79 \pm 0,13$ und in MO + BMP-2 $0,74 \pm 0,09$ sowie an Tag 29 in MN $1,77 \pm 0,33$, in MO $2,54 \pm 0,19$ und in MO + BMP-2 $1,12 \pm 0,05$. Somit zeigte sich eine Zunahme der Extinktion in allen drei Versuchsgruppen über 29 Tage. Nach acht Tagen Scaffoldkultur hatte die Extinktion in der MO- und der MO + BMP-2-Gruppe im Vergleich zu Tag 1 signifikant ($p < 0,05$) und in der MN-Gruppe sehr signifikant ($p < 0,001$) zugenommen. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen an Tag 8 waren nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Zunahme an Tag 15 im Vergleich zu Tag 8 war in der MO-Gruppe hochsignifikant ($p < 0,001$), in den anderen beiden Gruppen sehr signifikant ($p < 0,001$ - $0,01$). Die Extinktion zwischen der MN- und der MO + BMP-2-Gruppe unterschied sich an Tag 15 nicht signifikant ($p > 0,05$), jedoch wiesen beide eine hochsignifikant ($p < 0,001$) niedrigere Extinktion als die MO-Gruppe auf. Auch nach 29 Tagen Kultur stieg die Extinktion im Vergleich zu Tag 15 in der MN- und MO + BMP-2-Gruppe signifikant ($p < 0,05$), in der MO-Gruppe sehr signifikant ($p < 0,001$ - $0,01$) an. Auch an Tag 29 war der Unterschied zwischen der MN- und MO + BMP-2-Gruppe nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Extinktion der MO-Versuchsgruppe an Tag 29 war aber signifikant ($p < 0,05$) höher als die der MN-Gruppe und sehr signifikant ($p < 0,001$ - $0,01$) höher als die der MO + BMP-2-Gruppe (Abb. 8).

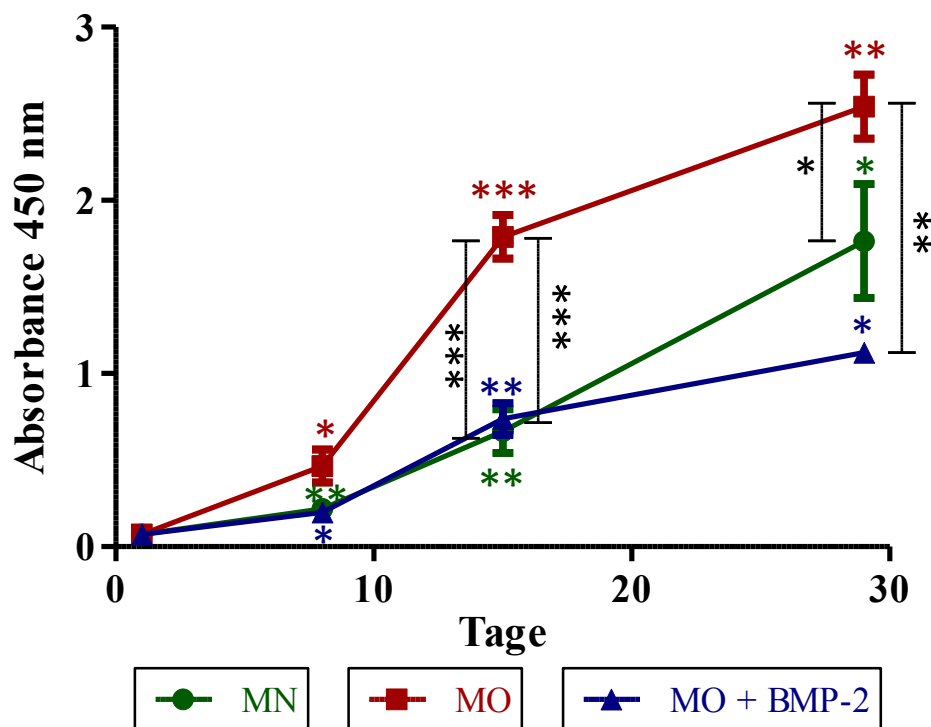


Abb. 8 WST-1 Test der ASC-Scaffoldkulturen in verschiedenen Kulturmedien: MN (grün), MO (rot) und MO + BMP-2 (blau). Die Messwerte geben Mittelwerte \pm Standardfehler an; $n = 6$.

3.4.3 PICOGREEN ASSAY

Im PicoGreen Assay festgestellte Mittelwerte und ihre Standardfehler für den dsDNA-Gehalt in $\mu\text{g/ml}$ waren an Tag 1 $0,33 \pm 0,01$, an Tag 8 in der MN-Gruppe $0,47 \pm 0,03$, in der MO-Gruppe $0,98 \pm 0,09$ und in der MO + BMP-2-Gruppe $0,65 \pm 0,05$ (Abb. 9). An Tag 15 berechnete Werte ergaben in MN $0,85 \pm 0,09$, in MO $1,66 \pm 0,09$ und in MO + BMP-2 $1,25 \pm 0,03$ sowie an Tag 29 in MN $1,31 \pm 0,12$, in MO $1,71 \pm 0,08$ und in MO + BMP-2 $1,59 \pm 0,13$. Es wurde dadurch festgestellt, dass es zu einer Zunahme der dsDNA in allen Versuchsgruppen an Tag 8 der Kultur im Vergleich zu Tag 1 und an Tag 15 im Vergleich zu Tag 8 gekommen war. Die Zunahme an Tag 29 gegenüber Tag 15 war in keiner Versuchsgruppe signifikant ($p > 0,05$). An Tag 8 hatte der dsDNA-Gehalt im Vergleich zu Tag 1 in der MO- und der MO + BMP-2-Gruppe sehr signifikant ($p 0,001 - 0,01$) und in der MN-Gruppe signifikant ($p 0,01 - 0,05$) zugenommen. Die an Tag 8 gemessene dsDNA-Konzentration in der MO-Gruppe war sehr signifikant ($p 0,001 - 0,01$) höher als in der MN-Gruppe und signifikant ($p 0,01 - 0,05$) höher als in der MO + BMP-2-Gruppe, wobei letztere auch signifikant ($p 0,01 - 0,05$) höhere dsDNA-Konzentrationen aufwies als die MN-Gruppe. An Tag 15 ließ sich ebenfalls eine sehr signifikante ($p 0,001 - 0,01$) Zunahme der dsDNA-Konzentration gegenüber Tag 8 in der MO- und MN-Gruppe und eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Zunahme in der MO + BMP-2-Gruppe feststellen. An Tag 15 war wiederum die größte Menge dsDNA in der MO- und die niedrigste in der MN-Gruppe

festgestellt worden. Konzentrationsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren an Tag 15 zwischen der MO- und der MO + BMP-2-Gruppe signifikant (p 0,01 – 0,05), zwischen der MO- und der MN-Gruppe hochsignifikant ($p < 0,001$) und zwischen der MO + BMP-2- und der MN-Gruppe sehr signifikant (p 0,001 – 0,01). Die Konzentration an dsDNA stieg an Tag 29 in keiner der Versuchsgruppen im Vergleich zu Tag 15 signifikant an ($p > 0,05$). Ein signifikanter (p 0,01 – 0,05) Unterschied zeigte sich an Tag 29 lediglich zwischen der MO- und der MN-Gruppe. Unterschiede zwischen der MO- und der MO + BMP-2-Gruppe sowie der MO + BMP-2- und der MN-Gruppe waren an Tag 29 nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abb. 9).

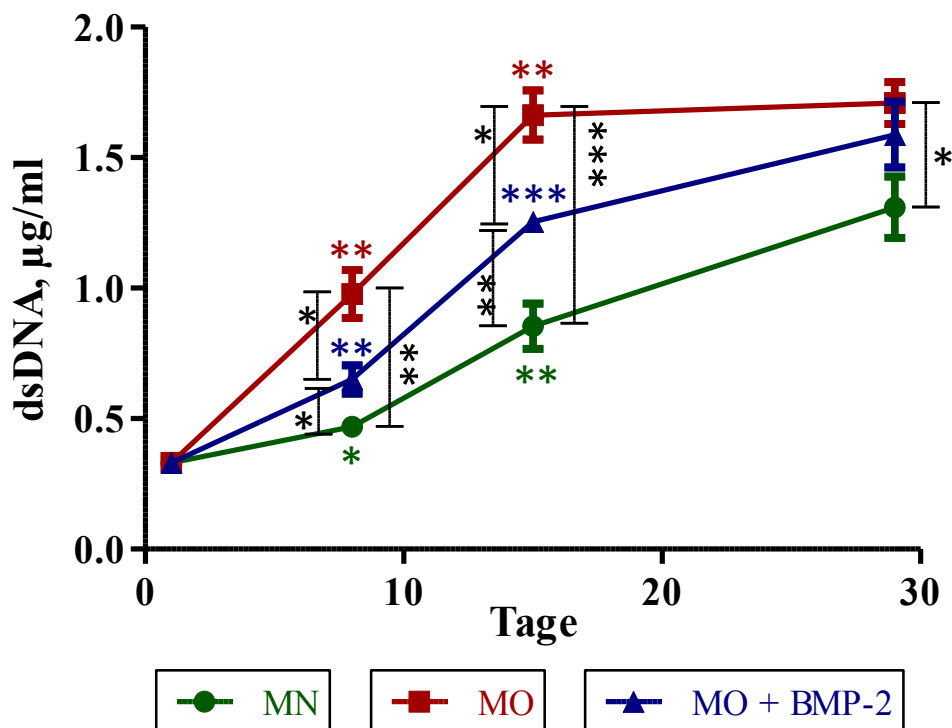


Abb. 9 PicoGreen Assay der ASC-Scaffoldkulturen in verschiedenen Kulturmedien: MN (grün), MO (rot) und MO + BMP-2 (blau). Die Messwerte geben Mittelwerte \pm Standardfehler an; $n = 6$.

3.5 EXPRESSION VON OSTEOLASTENMARKERN IN SCAFFOLDKULTUREN (MRNA-ANALYSEN)

Die mRNA-Expression der Osteoblastenmarkerproteine Alkalische Phosphatase, Osteokalzin und Collagen 1 in Scaffoldkulturen hat sich im Laufe der Kultivierung über 29 Tage unterschiedlich verändert.

3.5.1 ALKALISCHE PHOSPHATASE

Der fold change der ermittelten mRNA-Expression von *Alkalischer Phosphatase (ALP)* in den Scaffoldkulturen gegenüber den Kalibratorzellen war in MN an Tag 8 $0,20 \pm 0,06$, an Tag 15 $0,61 \pm 0,12$ und an Tag 29 $2,45 \pm 0,48$ (Abb. 10). In der MO-Gruppe zeigte sich an Tag 8 ein fold change von $1,01 \pm 0,13$, an Tag 15 von $4,19 \pm 0,36$ und an Tag 29 von $7,23 \pm 0,64$ sowie in der MO + BMP-2-Gruppe an Tag 8 von $0,70 \pm 0,15$, an Tag 15 von $3,11 \pm 0,56$ und an Tag 29 von $4,86 \pm 0,52$.

Die Ergebnisse an Tag 8 für MN und MO + BMP-2 und an Tag 15 für MN zeigten Werte < 1 und somit eine geringere ALP-Expression im Vergleich zu den Kalibratorzellen. In den anderen Versuchsgruppen mit Werten > 1 war die ALP-Expression gegenüber den Kalibratorzellen erhöht (Abb. 10).

Die Expression der mRNA von ALP war in den beiden Versuchsgruppen MN und MO über den gesamten Versuchszeitraum signifikant angestiegen mit einem signifikanten Anstieg ($p < 0,01 - 0,05$) an Tag 15 gegenüber Tag 8 und einem sehr signifikanten Anstieg ($p < 0,001 - 0,01$) an Tag 29 im Vergleich zu Tag 15 in der MN-Gruppe und jeweils hochsignifikanten ($p < 0,001$) Anstiegen zwischen Tag 8 und 15 sowie Tag 15 und 29 in der MO-Gruppe. In der MO + BMP-2-Gruppe stieg die Expression bis Tag 15 sehr signifikant ($p < 0,001 - 0,01$) an, der Anstieg an Tag 29 gegenüber Tag 15 war hingegen nicht signifikant ($p > 0,05$). An allen Messtagen war die Expression in MO hochsignifikant ($p < 0,001$) höher als in MN, auch in der MO + BMP-2-Gruppe war die Expression gegenüber MN an Tag 8 signifikant ($p < 0,01 - 0,05$) und an Tag 15 und 29 hochsignifikant ($p < 0,001$) erhöht. An Tag 8 und 15 war kein signifikanter ($p > 0,05$) Unterschied zwischen MO und MO + BMP-2 feststellbar, wohingegen an Tag 29 die ALP-Expression in der MO-Gruppe hochsignifikant ($p < 0,001$) höher war als in der MO + BMP-2-Gruppe (Abb. 10).

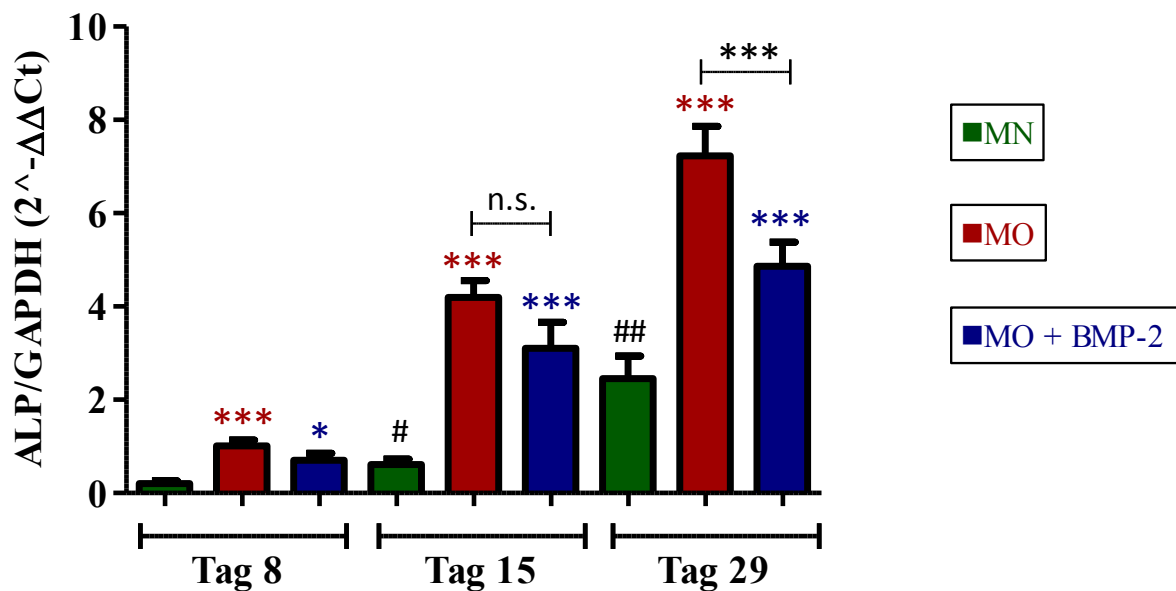


Abb. 10 Quantitative RT-PCR-Analyse von *ALP*-mRNA in ASC-Scaffoldkulturen in verschiedenen Kulturmedien: MN (grün), MO (rot), MO + BMP-2 (blau). Expression der mRNA von *ALP* nach Normalisierung gegenüber dem mRNA-Niveau von *GAPDH*. Die Messwerte geben Mittelwerte \pm Standardfehler an; $n = 9$. Sternchen (*) über den Säulen geben das Signifikanzniveau im Vergleich zu der MN-Gruppe des gleichen Versuchszeitpunktes an. Doppelkreuze (#) über den Säulen der MN-Gruppe zeigen den Signifikanzunterschied zu der MN-Gruppe des vorhergehenden Versuchszeitpunktes.

3.5.2 OSTEOKALZIN

Die mRNA-Expression von *Osteokalzin* war in allen Versuchsgruppen über den gesamten Versuchszeitraum höher als in den Kalibratorzellen, da alle berechneten Mittelwerte > 1 sind (Abb. 11). Der an Tag 8 ermittelte fold change-Mittelwert mit seinem Standardfehler war $2,07 \pm 0,49$ in MN, $3,11 \pm 0,45$ in MO und $5,29 \pm 1,36$ in MO + BMP-2. An Tag 15 ergaben die Werte in MN $2,24 \pm 0,21$, in MO $2,49 \pm 0,23$ und in MO + BMP-2 $3,72 \pm 0,30$, an Tag 29 wiederum in MN $2,78 \pm 0,36$, in MO $3,27 \pm 0,37$ und in MO + BMP-2 $6,07 \pm 0,44$.

Die mRNA-Expression von *Osteokalzin* änderte sich sowohl innerhalb der MN- als auch der MO-Gruppe zu allen Messzeitpunkten nicht signifikant ($p > 0,05$). Lediglich an Tag 8 war die Expression in MO im Vergleich zu MN signifikant ($p 0,01 - 0,05$) höher, an Tag 15 und 29 war der Unterschied zwischen MN und MO nicht signifikant ($p > 0,05$). Die höchsten Expressionswerte für *Osteokalzin* zeigten sich zu allen Zeitpunkten in der MO + BMP-2-Gruppe. Diese waren an Tag 8 sehr signifikant ($p 0,001 - 0,01$) höher als in MN, jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$) höher als in MO. An Tag 15 war dieser Unterschied gegenüber MN hochsignifikant ($p < 0,001$), gegenüber MO signifikant ($p 0,01 - 0,05$) und an Tag 29 sowohl im Vergleich zu MN als auch zu MO hochsignifikant ($p < 0,001$). Der Expressionsrückgang in der MO + BMP-2-Gruppe an Tag 15 im Vergleich zu Tag 8 war nicht signifikant ($p > 0,05$), der

Anstieg an Tag 29 aber wiederum gegenüber Tag 15 hochsignifikant ($p < 0,001$). mRNA-Expression von *Osteokalzin* in der MO + BMP-2-Gruppe unterschied sich an Tag 8 und Tag 29 nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abb. 11).

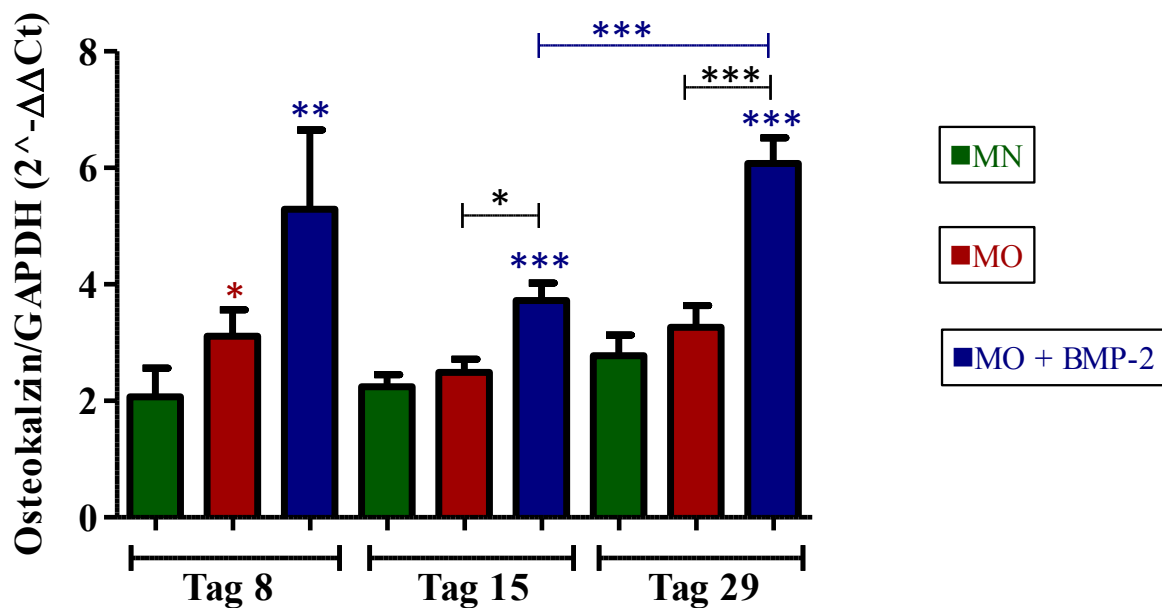


Abb. 11 Quantitative RT-PCR-Analyse von *Osteokalzin*-mRNA in ASC-Scaffoldkulturen in verschiedenen Kulturmedien: MN (grün), MO (rot), MO + BMP-2 (blau). Expression der mRNA von *Osteokalzin* nach Normalisierung gegenüber dem mRNA-Niveau von *GAPDH*. Die Messwerte geben Mittelwerte \pm Standardfehler an; $n = 9$. Sternchen (*) über den Säulen geben das Signifikanzniveau im Vergleich zu der MN-Gruppe des gleichen Versuchszeitpunktes an.

3.5.3 COLLAGEN 1

In der Auswertung der mRNA-Expression von *Collagen 1* zeigte sich, dass diese in allen Versuchsgruppen geringer war als in den Kalibratorzellen (Abb. 12). Mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ermittelte Werte waren < 1 . Mittelwerte und ihre Standardfehler waren an Tag 8 in MN $0,05 \pm 0,02$, in MO $0,12 \pm 0,03$ und in MO + BMP-2 $0,08 \pm 0,02$, an Tag 15 in MN $0,10 \pm 0,03$, in MO $0,17 \pm 0,04$ und in MO + BMP-2 $0,06 \pm 0,01$ sowie an Tag 29 in MN $0,29 \pm 0,06$, in MO $0,10 \pm 0,03$ und in MO + BMP-2 $0,04 \pm 0,01$.

Es zeigte sich, dass die Zunahme der mRNA-Expression von *Collagen 1* in der MN-Gruppe an Tag 15 gegenüber Tag 8 noch nicht signifikant ($p > 0,05$), an Tag 29 gegenüber Tag 15 jedoch hochsignifikant ($p < 0,001$) war und die Expression in MN an Tag 29 im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen hochsignifikant ($p < 0,001$) am höchsten war. An Tag 8 und 15 waren jedoch in der MO-Gruppe die höchsten Expressionswerte nachweisbar. So unterschieden sie sich von MN und MO + BMP-2 signifikant ($p 0,01 - 0,05$) an Tag 8 und sehr signifikant ($p 0,001 - 0,01$) an Tag 15. Über den Versuchszeitraum betrachtet zeigte sich eine sehr signifikante ($p 0,001 - 0,01$) Zunahme in der MO-Gruppe an Tag 15 gegenüber Tag 8 und

eine sehr signifikante (p 0,001 – 0,01) Abnahme an Tag 29 im Vergleich zu Tag 15. Innerhalb der MO + BMP-2-Gruppe war die Abnahme von Tag 8 zu Tag 15 nicht signifikant ($p > 0,05$), an Tag 29 gegenüber Tag 15 jedoch sehr signifikant (p 0,001 – 0,01), wobei in der MO + BMP-2-Gruppe an Tag 29 auch der niedrigste Expressionswert aller Versuchsgruppen gemessen wurden, der außerdem signifikant (p 0,01 – 0,05) niedriger war als der nach 29 Tagen in der MO-Gruppe gemessene Wert (Abb. 12).

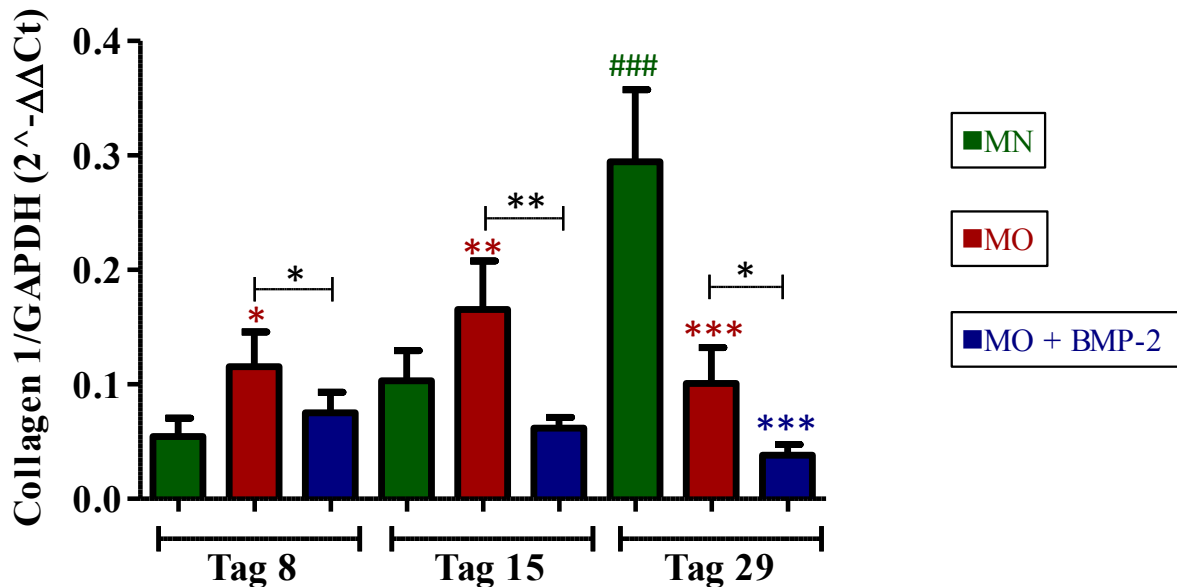


Abb. 12 Quantitative RT-PCR-Analyse von *Collagen 1*-mRNA in ASC-Scaffoldkulturen in verschiedenen Kulturmedien: MN (grün), MO (rot), MO + BMP-2 (blau).

Expression der mRNA von *Collagen 1* nach Normalisierung gegenüber dem mRNA-Niveau von *GAPDH*. Die Messwerte geben Mittelwerte \pm Standardfehler an; $n = 9$.

Sternchen (*) über den Säulen geben das Signifikanzniveau im Vergleich zu der MN-Gruppe des gleichen Versuchszeitpunktes an. Doppelkreuze (#) über den Säulen der MN-Gruppe zeigen den Signifikanzunterschied zu der MN-Gruppe des vorhergehenden Versuchszeitpunktes an.

3.6 HISTOLOGIE DER SCAFFOLDKULTUREN

3.6.1 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG

Über den Versuchszeitraum zeigte sich in allen Versuchsgruppen bei zunehmender Anfärbbarkeit mit Hämatoxylin-Eosin eine Zunahme des Zellgehaltes innerhalb der zellbesiedelten Scaffolds (Abb. 13).

Bei verhältnismäßig ähnlichen Färbeergebnissen in MN und MO + BMP-2 wurde tendenziell eine vermehrte Färbung in MO beobachtet, sodass auch am Versuchsende an Tag 29 die stärkste Färbung und der höchste Zellgehalt in der Versuchsgruppe mit osteogenem Medium sichtbar war (Abb. 13 H). Weiterhin zeigten die gefärbten Zellen in der MN- und der MO-Gruppe im Vergleich zur MO + BMP-2-Gruppe eine bessere Durchwanderung der Scaffolds (Abb. 13 G'', H'', J'').

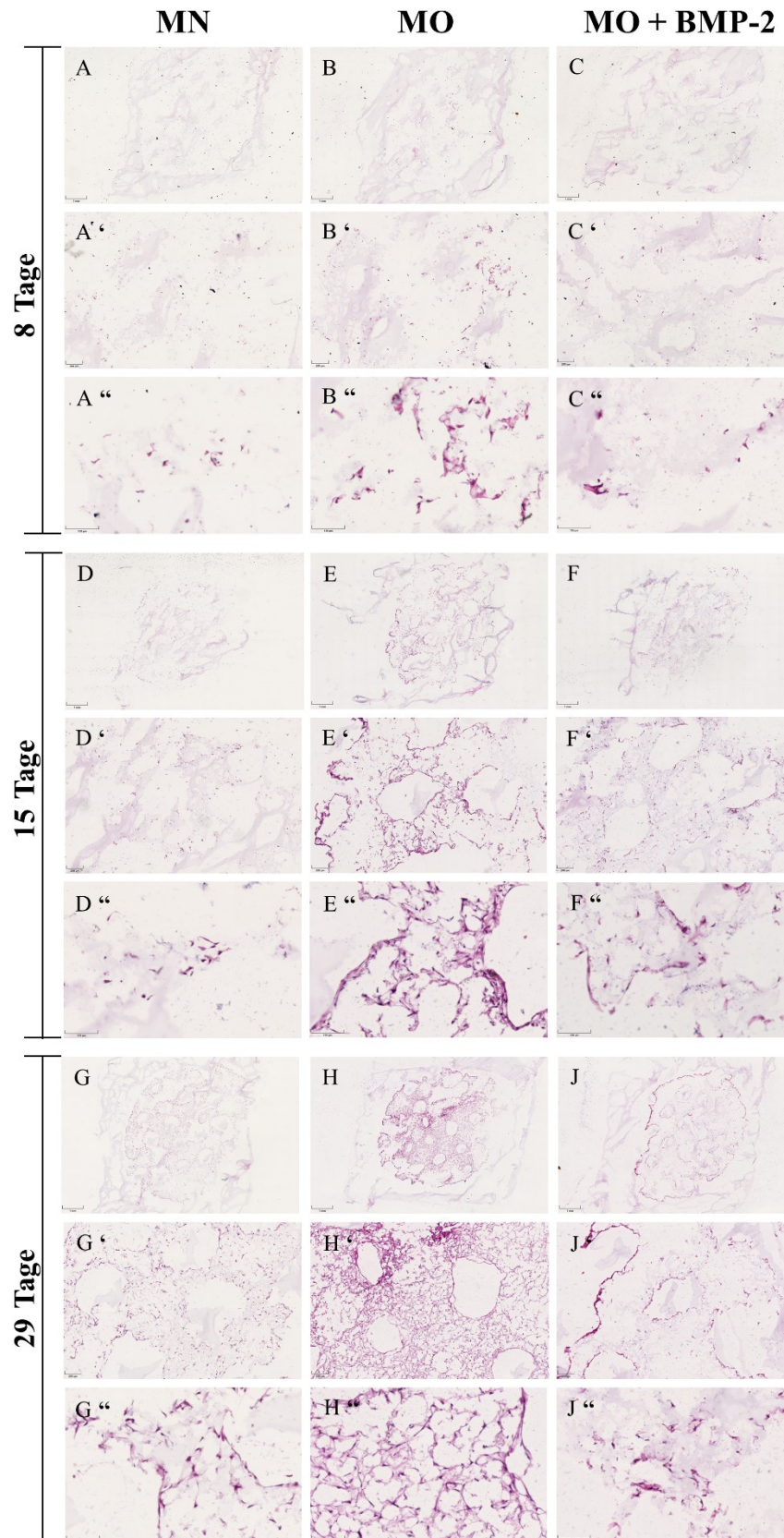


Abb. 13 H.E.-Färbung von ASC-Scaffoldkulturen in verschiedenen Kulturmedien, nach 8 Tagen: MN (A), MO (B), MO + BMP-2 (C), 15 Tagen: MN (D), MO (E), MO + BMP-2 (F) und 29 Tagen Kultur: MN (G), MO (H), MO + BMP-2 (J) in verschiedene Vergrößerungen, wobei die jeweils abgebildeten Maßstabballen 1mm (), 200 μ m (') und 100 μ m (') entsprechen.

3.6.2 PICROSIRIUS-RED-FÄRBUNG

Die Betrachtung der Picosirius-Red-Färbung von ASC-Scaffoldkulturen im polarisierten Licht ergab bei 15-tägig kultivierten Proben in allen Versuchsgruppen ein kaum bis gar nicht sichtbares rotes Signal (Abb. 14 A, B, C). An Tag 29 war eine leichte Zunahme dieses Rot-Signals im Vergleich zu Tag 15 in allen Versuchsgruppen erkennbar (Abb. 14 D, E, F). Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren aufgrund des schwachen Signals nicht nachweisbar. In der Darstellung entsprechender Bildausschnitte unter dem Lichtmikroskop ohne Polarisationsfilter waren in allen Proben mit Weigert's Hämatoxylin angefärbte Zellen sichtbar (Abb. 14 A' - F').

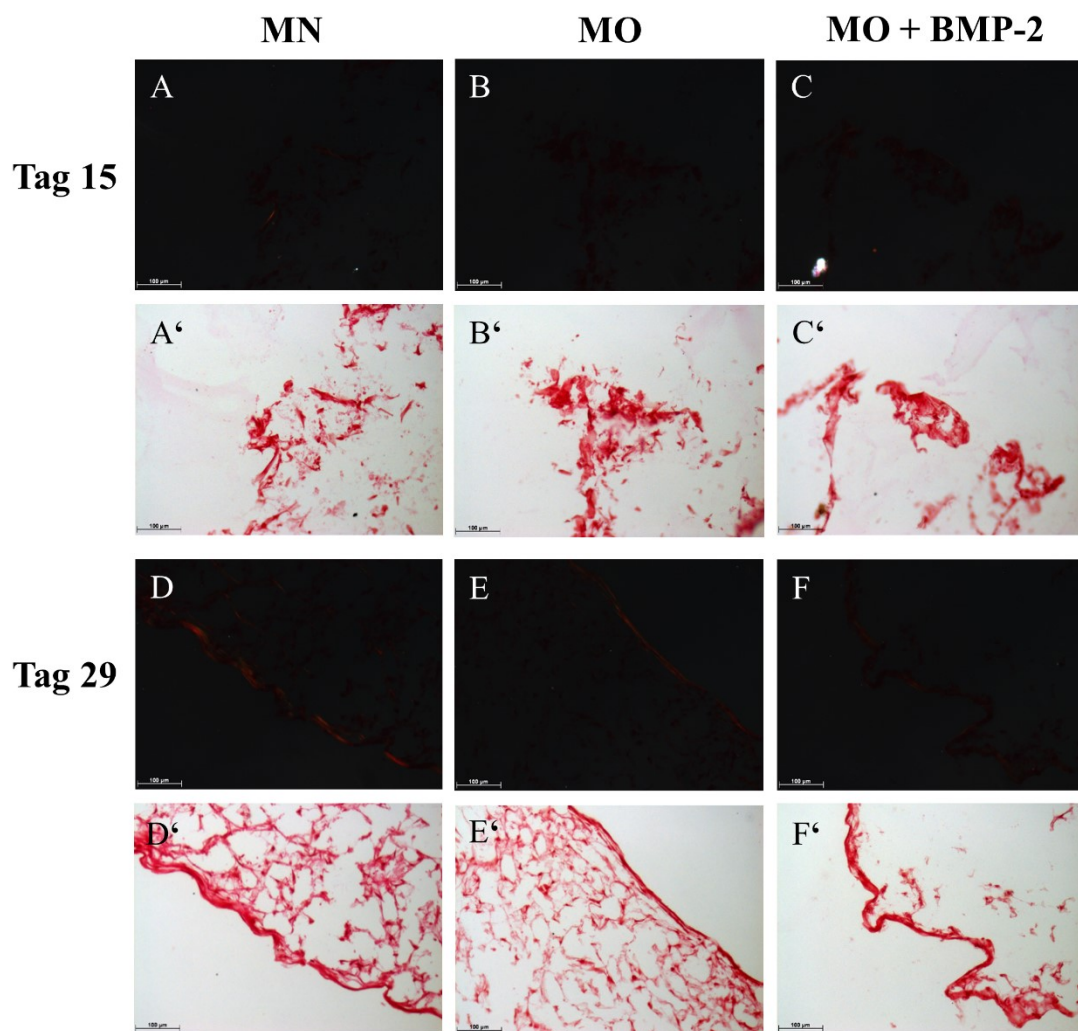


Abb. 14 Picosirius-Red-Färbung von ASC- Scaffoldkulturen in verschiedenen Kulturmedien
Aufnahmen im polarisierten Licht nach 15 Tagen: MN (A), MO (B), MO + BMP-2 (C) und 29
Tagen Kultur: MN (D), MO (E), MO + BMP-2 (F) sowie entsprechende Aufnahmen ohne
Polarisationsfilter mit Darstellung der Färbungen mit Weigert's Hämatoxylin (').
Maßstabballen: 100 µm

3.6.3 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN VON SCAFFOLDKULTUREN

3.6.3.1 OSTEOKALZIN

An Tag 8 war das Fluoreszenzsignal von Osteokalzin in der MO + BMP-2-Gruppe gegenüber den anderen beiden Gruppen vergleichsweise erhöht (Abb. 15 A, B, C). Die an Tag 15 gleiche Fluoreszenzintensität in der MN- und in der MO + BMP-2-Gruppe war jedoch stärker ausgeprägt als in der MO-Gruppe (Abb. 15 D, E, F). An Tag 29 war das stärkste Signal in der MO + BMP-2-Gruppe nachweisbar (Abb. 15 G, H, I).

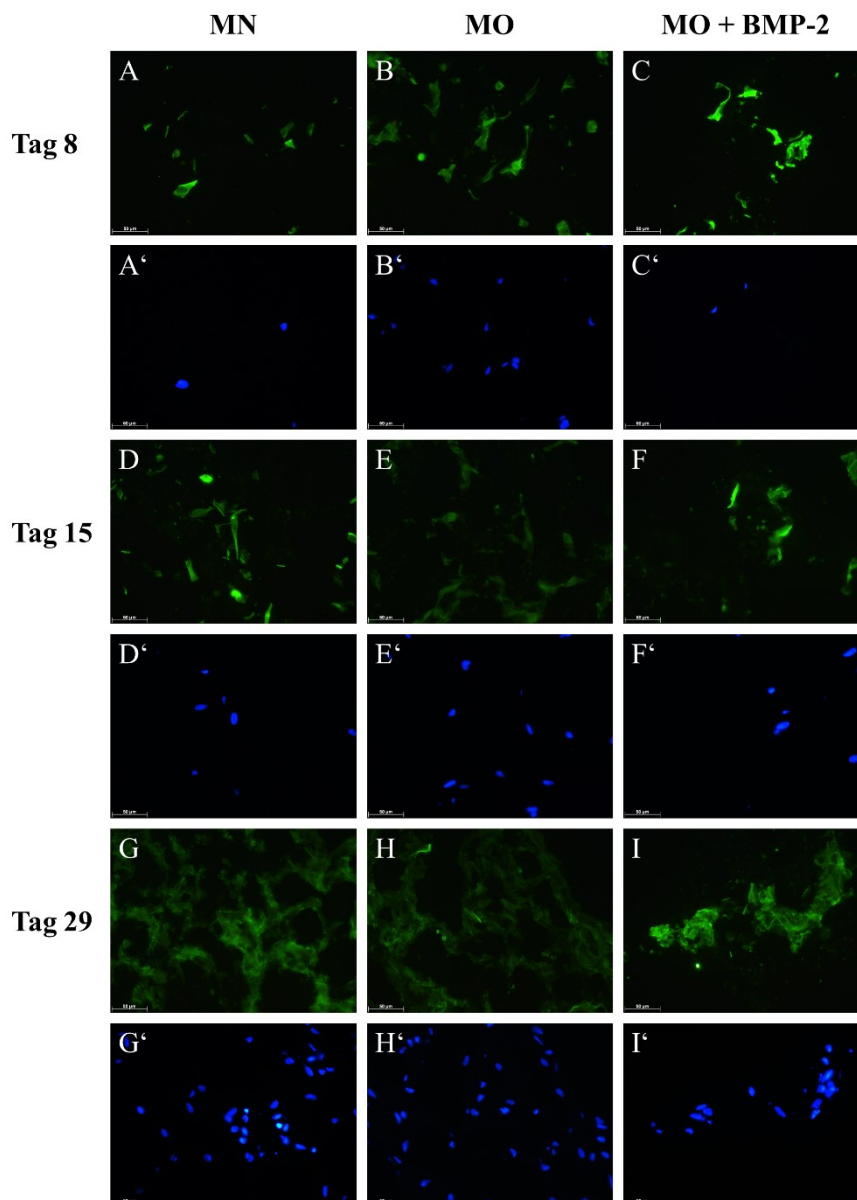


Abb. 15 Osteokalzin-Immunfluoreszenzfärbung von ASC-Scaffoldkulturen

Osteokalzin (grün) ist in verschiedenen Kulturmedien nach 8 Tagen: MN (A), MO (B) und MO + BMP-2 (C), nach 15 Tagen: MN (D), MO (E), MO + BMP-2 (F) und nach 29 Tagen Kultur: MN (G), MO (H), MO + BMP-2 (I) dargestellt. Entsprechende Zellkernfärbungen (') sind in blau abgebildet. Maßstabbalken: 50 µm

3.6.3.2 OSTEOPONTIN

Die Intensität des Fluoreszenzsignals zum Nachweis von Osteopontin war an Tag 8 und Tag 15 in allen Versuchsgruppen gleich (Abb. 16 A – F). An Tag 29 zeigte sich das Signal in der MO + BMP-2-Gruppe tendenziell leicht erhöht (Abb. 16 G, H, I). Die Intensität des Signals war im gesamten Versuchsverlauf stark ausgeprägt.

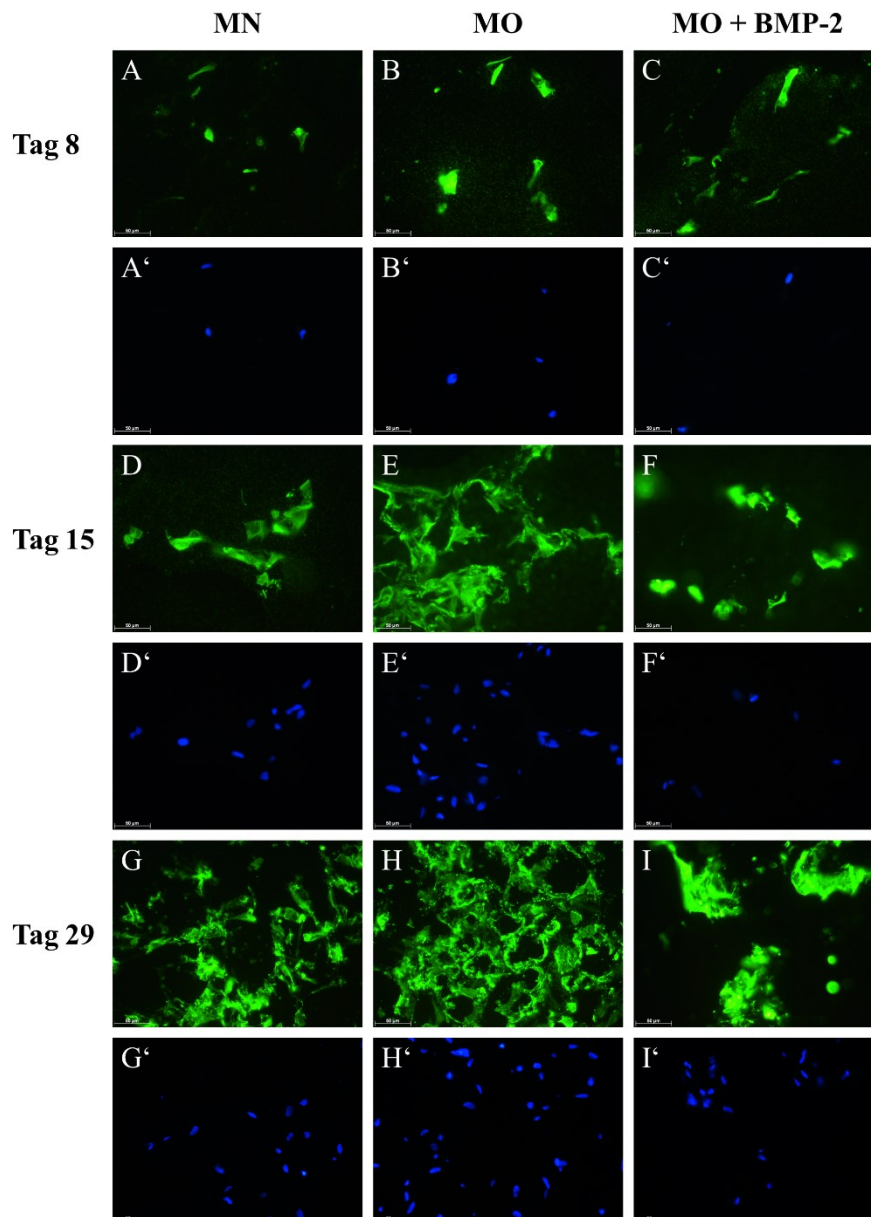


Abb. 16 Osteopontin-Immunfluoreszenzfärbung von ASC-Scaffoldkulturen

Osteopontin (grün) ist in verschiedenen Kulturmedien nach 8 Tagen: MN (A), MO (B) und MO + BMP-2 (C), nach 15 Tagen: MN (D), MO (E), MO + BMP-2 (F) und nach 29 Tagen Kultur: MN (G), MO (H), MO + BMP-2 (I) dargestellt. Entsprechende Zellkernfärbungen (') sind in blau abgebildet. Maßstab Balken: 50 µm

3.6.3.3 DMP-1

Das Immunfluoreszenzsignal von DMP-1 war in allen Versuchsgruppen an Tag 8 am intensivsten und nahm über den Versuchszeitraum hinweg ab, sodass sich an Tag 29 ein niedrigeres Signal als zu Versuchsbeginn zeigte (Abb. 17). Die Intensität des Signals unterschied sich zwischen den Versuchsgruppen an Tag 8 nicht (Abb. 17 A, B, C), an Tag 15 zeigte die MN-Gruppe ein tendenziell intensiveres Signal als die MO- und die MO + BMP-2-Gruppe (Abb. 17 D, E, F), an Tag 29 war wiederum kein Unterschied in der insgesamt schwachen Signalintensität zwischen den Versuchsgruppen erkennbar (Abb. 17 G, H, I).

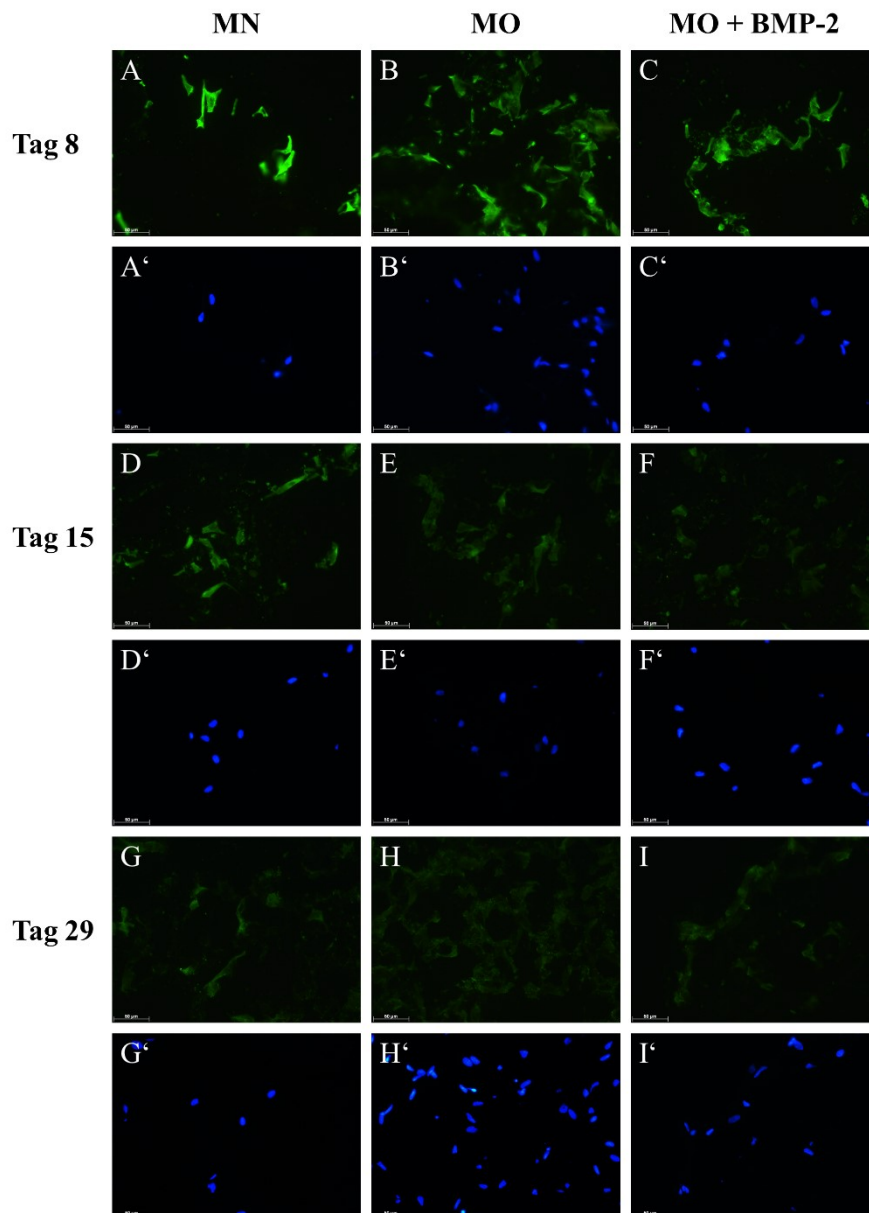


Abb. 17 DMP-1-Immunfluoreszenzfärbung von ASC-Scaffoldkulturen

DMP-1 (grün) ist in verschiedenen Kulturmedien nach 8 Tagen: MN (A), MO (B) und MO + BMP-2 (C), nach 15 Tagen: MN (D), MO (E), MO + BMP-2 (F) und nach 29 Tagen Kultur: MN (G), MO (H), MO + BMP-2 (I) dargestellt. Entsprechende Zellkernfärbungen (*) sind in blau abgebildet. Maßstab: 50 µm

3.6.3.4 SCLEROSTIN

Das Immunfluoreszenzsignal von Sclerostin war an Tag 8, Tag 15 und Tag 29 in allen Versuchsgruppen nachweisbar, wenn auch in schwacher Intensität (Abb. 18).

Unterschiede in dieser insgesamt niedrigen Intensität des Fluoreszenzsignals von Sclerostin waren zwischen den Versuchsgruppen sowohl an Tag 8, als auch an Tag 15 und 29 nicht nachweisbar (Abb. 18).

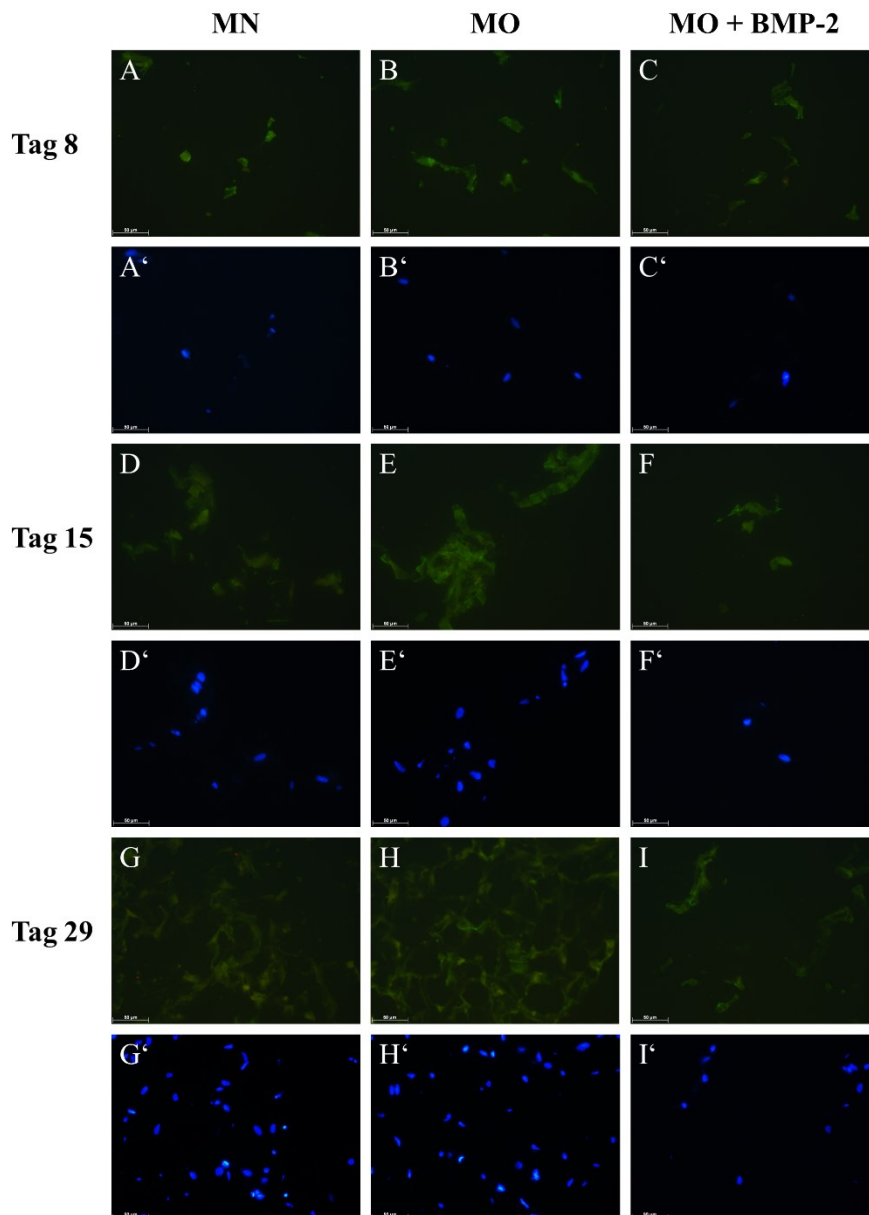


Abb. 18 Sclerostin-Immunfluoreszenzfärbung von ASC-Scaffoldkulturen

Sclerostin (grün) ist in verschiedenen Kulturmedien nach 8 Tagen: MN (A), MO (B) und MO + BMP-2 (C), nach 15 Tagen: MN (D), MO (E), MO + BMP-2 (F) und nach 29 Tagen Kultur: MN (G), MO (H), MO + BMP-2 (I) dargestellt. Entsprechende Zellkernfärbungen (*) sind in blau abgebildet. Maßstab Balken: 50 µm

3.6.3.5 CD 73, CD 90, CD 105

Auf Scaffolds angesiedelte ASCs wurden nach 29 Tagen Kulturdauer mittels Immunfluoreszenzfärbungen hinsichtlich der Expression von CD 73, CD 90 und CD 105 untersucht (Abb. 19).

Eine Expression von CD 73 war dabei in keiner der Versuchsgruppen nachweisbar (Abb. 19 A, B, C).

Demgegenüber war Expression von CD 90 nach 29 Tagen Scaffoldkultur in der MN-Gruppe vorhanden (Abb. 19 D), während in der MO- und der MO + BMP-2-Gruppe nur ein sehr schwaches CD 90-Signal in lediglich einzelnen Zellen nachweisbar war (Abb. 19 E, F).

Immunfluoreszenzsignale von CD 105 waren in allen Versuchsgruppen vorhanden (Abb. 19 G, H, I). Die Signalintensität in der MN- und MO-Gruppe war geringer ausgeprägt als in Monolayerkulturen der ASCs (Abb. 5 G). Im Gegensatz dazu fiel eine hohe Signalintensität in der MO + BMP-2-Gruppe auf.

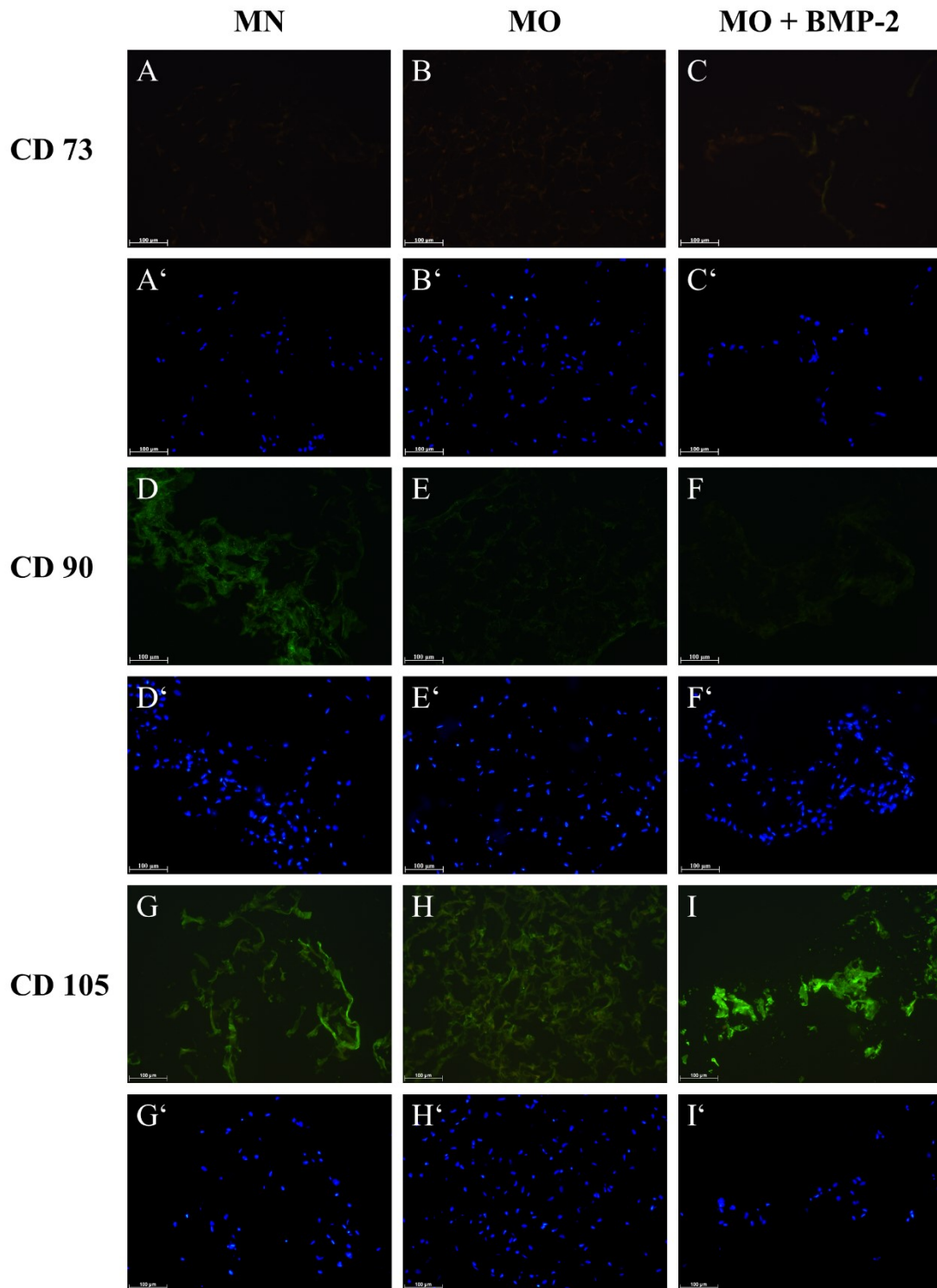


Abb. 19 Immunfluoreszenzfärbungen von Scaffoldkulturen nach 29 Tagen Kulturdauer. Immunfluoreszenzsignale für CD 73 in MN (A), MO (B) und MO + BMP-2 (C), für CD 90 in MN (D), MO (E) und MO + BMP-2 (F) und für CD 105 in MN (G), MO (H) und MO + BMP-2 (I) sind in grün dargestellt. Entsprechenden Zellkernfärbungen (*) sind in blau abgebildet. Maßstabbalken: 100 μ m

3.7 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

- Gutes Proliferationsverhalten und spindelförmige Morphologie der hASCs in Monolayerkulturen
- In Monolayer kultivierte ASCs in Immunfluoreszenzfärbungen für CD 44, CD 105 und CD 166 mit stark positiven, für CD 73 und CD 90 mit vergleichsweise dazu geringer positiven und für CD 39 mit schwach positiven Fluoreszenzsignalen sowie für CD 34 und CD 45 negativ erscheinend
- ASC-Monolayerkulturen mit intrazellulärer Expression von OC, OPN und DMP-1 sowie nicht nachgewiesener Expression von Sclerostin in Immunfluoreszenzfärbungen
- Erfolgreiche Besiedelung der biphasischen Kalziumphosphat-Scaffolds mit hASCs sowie Kultivierung in drei verschiedenen Wachstumsmedien, MN, MO oder MO + BMP-2, über einen Versuchszeitraum von bis zu 29 Tagen
- Im WST-1 Test Zunahme der Extinktion in allen Versuchsgruppen mit höchsten Werten in MO
- Im PicoGreen Assay Zunahme des dsDNA-Gehaltes in allen Versuchsgruppen mit höchsten Werten in MO
- Zunahme der ALP-mRNA-Expression in allen Versuchsgruppen mit höchsten Werten in MO
- Höchste *Osteokalzin*-mRNA-Expression in MO + BMP-2
- *Collagen 1*-mRNA-Expression in allen Versuchsgruppen geringer als in Kalibratorzellen
- In H.E.-Färbungen Zunahme des Zellgehaltes innerhalb der Scaffolds aller Versuchsgruppen mit vergleichsweise vermehrter Färbung in MO
- Im polarisierten Licht Rot-Signal in Picosirius-Red-Färbungen der ASC-Scaffoldkulturen an Tag 15 kaum bis gar nicht sichtbar, an Tag 29 mit leichter Zunahme
- ASC-Scaffoldkulturen an Tag 29 in Immunfluoreszenzfärbungen mit höchstem Fluoreszenzsignal von OC in MO + BMP-2 sowie tendenziell höchstem Fluoreszenzsignal von OPN ebenfalls in MO + BMP-2
- In Immunfluoreszenzfärbungen der ASC-Scaffoldkulturen Abnahme des Fluoreszenzsignals von DMP-1 in allen Versuchsgruppen über den Versuchszeitraum sowie insgesamt schwache Intensität des Fluoreszenzsignals von Sclerostin
- In Immunfluoreszenzfärbungen der ASC-Scaffoldkulturen nach 29 Tagen Kulturdauer in keiner Versuchsgruppe Nachweis von CD 73, Fluoreszenzsignal von CD 90 in MN vorhanden, in MO und MO + BMP-2 in lediglich einzelnen Zellen sehr schwach nachweisbar sowie Nachweis von Immunfluoreszenzsignalen von CD 105 in allen Versuchsgruppen mit im Vergleich zu MN und MO höherer Signalintensität in MO + BMP-2

4 DISKUSSION

4.1 ASC-MONOLAYERKULTUREN

Fettgewebe enthält eine Zellpopulation, die aus seiner SVF aufgrund der Plastikadhärenz isoliert werden kann und als adipose tissue-derived stromal cells (ASCs) bezeichnet wurde [51]. Auch in dieser Arbeit wurden ASCs aus der SVF humaner Fettgewebstücke durch die verbreitete Isolationsmethode der Plastikadhärenz isoliert. Ihr gutes Proliferationsverhalten und die spindelförmige, fibroblastartige Zellmorphologie in Monolayerkultur (Abb. 4) entsprachen beschriebenen Eigenschaften von kultivierten ASCs [50, 55].

Eine Vielzahl von Oberflächenmarkern sind für die nähere Charakterisierung von ASCs untersucht worden, jedoch gibt es keinen einzelnen Marker der alleine eine Zelle als ASC identifizieren kann, sodass Markerkombinationen bemüht werden müssen [97]. Weiterhin differiert die Markerexpression zum einen innerhalb einer ASC-Population, aufgrund ihrer, auch allgemein in MSC-Populationen vorhandenen, Heterogenität sowie im Kulturverlauf und zum anderen interindividuell abhängig von Eigenschaften des Gewebespenders [97, 98].

In Passage 3 und 4 wurden die ASCs dennoch als recht einheitlich beschrieben, mit hoher Expression von CD 13, CD 29, CD 44, CD 73, CD 90, CD 105 und CD 166, Marker die in der SVF noch niedriger exprimiert waren sowie einer im Vergleich zur SVF reduzierten Expression von CD 34 und dem Verlust hämatopoetischer Marker wie CD 45 [99].

Auch in einem gemeinsamen Leitfaden der International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) und der International Society for Cellular Therapy (ISCT) wurden zur phänotypischen Identifikation von ASCs CD 13, CD 29, CD 44, CD 73, CD 90 und CD 105 als primär stabile positive Marker (> 80 %), CD 34 mit variabler Expression als primär instabiler positiver Marker, CD 31, CD 45 und CD 235a als primär negative Marker (< 2 %) sowie weitere sekundäre Marker definiert [51].

CD 34, ursprünglich als negativer Marker für MSCs charakterisiert [43], stellte sich positiv in ASC-Subpopulationen dar, seine Expression nimmt jedoch mit der Kulturdauer ab [99, 100]. CD 34, wie auch CD 36, gehört außerdem zu einer Reihe von Oberflächenantigenen die interindividuell variieren [97].

Im Rahmen dieser Arbeit isolierte Zellen wiesen in der Immunfluoreszenzfärbung die in den Kriterien für MSCs und ASCs geforderte positive Expression von CD 105 auf, sowie eine Positivität für das ebenfalls in MSCs und ASCs als charakteristisch positiv gewertete CD 73 und CD 90 (Abb. 5) [43, 51].

Die hier beobachteten positiven Signale für CD 44, CD 166 und schwach positiven für CD 39 sowie das negativ erscheinende CD 34 in seiner Eigenschaft als primär instabiler positiver Marker mit variabler Expression [51] entsprechen beschriebenen Immunphänotypen von ASCs (Abb. 5) [97]. Auch das für ASCs geforderte Kriterium der Negativität für CD 45 [51] wurde bei den hier isolierten Zellen, die negativ für CD 45 erschienen, als erfüllt gewertet (Abb. 5).

Hinsichtlich der Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen ist die erfolgte visuelle Beurteilung der Fluoreszenzsignale unter dem Mikroskop zu beachten. Eine prozentuale Quantifizierung positiver Zellen, wie in der Durchflusszytometrie, wurde hierbei nicht angegeben, sodass keine absoluten Werte für das Maß an Positivität oder Negativität der Zellen für ein bestimmtes Markerprotein gewonnen wurden. Andererseits ergaben durchflusszytometrische Untersuchungen von Yu et al. an hASCs aus Lipoaspirat einheitliche Expressionsmuster mit CD 29, CD34, CD 73, CD 90 und CD 105 (alle > 80 %) positiven Zellen und CD 44 ($15,5 \pm 8,5$ %) und CD 45 ($12,0 \pm 6,0$ %) niedrig positiven Zellen (Hintergrundfluoreszenz: $6,1 \pm 3,2$ % bzw. $4,8 \pm 3,3$ %), sodass hier keine vollständige Negativität für CD 45 zu beobachten war, die Zellen aber ebenfalls als MSC-typisch beschrieben wurden und zusätzlich eine niedrige Expression von CD 44 von beschriebenen ASC-Phänotypen abwich und damit ihre Heterogenität unterstreicht [101].

Außerdem erlaubte die hier eingesetzte Methodik der Immunfluoreszenzfärbung keine gleichzeitige Anwendung mehrere verschiedener monoklonaler Antikörper an den gleichen Zellproben. Eine Bestimmung von eventuell enthaltenen Zellsubpopulationen anhand exprimierter Markerkombinationen war somit nicht möglich. Dennoch gab das Färbeverhalten in den Immunfluoreszenzfärbungen wertvolle Hinweise auf das Oberflächenantigenexpressionsmuster der Zellen.

Auch in Anbetracht der bekannten Heterogenität und vorhandener Variabilität bzgl. des Expressionsmusters von Oberflächenantigenen in ASCs sowie der hier verwendeten Methodik der Immunfluoreszenzfärbung wurden die hier analysierten Zellen als übereinstimmend mit beschriebenen Phänotypen von hASCs gewertet und als ASCs betitelt.

Das multilineale Differenzierungspotential als weiteres wichtiges Kriterium zur Charakterisierung von hASCs [51] wurde an Zellen die mittels der oben beschriebenen Methode der Isolierung mesenchymaler Stroma-/Stammzellen aus Fettgewebe gewonnen wurden, bereits laborintern durch ihre Differenzierung entlang adipogener und osteogener Linie nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Weitere Immunfluoreszenzfärbungen von osteogenen Markern Osteokalzin, Osteopontin, DMP-1 und Sclerostin [61] zeigten auffällige Ergebnisse, indem sich die Zellen positiv für Osteokalzin, Osteopontin und DMP-1 und negativ für Sclerostin anfärbten (Abb. 5).

Somit exprimierten die Zellen in Monolayerkultur sowohl diejenigen Marker die sie als ASCs charakterisieren, als auch Marker die für eine osteogene Differenzierung der Zellen sprechen. Durch diese, bereits in nicht induzierten ASCs vorhandene endogene Expression können Osteokalzin, Osteopontin und DMP-1 hier folglich nicht als spezifische osteogene Markerproteine interpretiert werden. Osteokalzin wurde in unterschiedlichen Zellarten, darunter beispielsweise in Megakaryozyten oder glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen, wird jedoch hauptsächlich in Osteoblasten exprimiert [102]. Auch Osteopontinexpression wurde, neben ihrem Vorkommen in Knochen, in anderen Zellen, wie Makrophagen und glatten Muskelzellen, gefunden [103]. Während DMP-1 ebenfalls in zahlreichen nicht-mineralisierten Geweben, dort jedoch in weitaus geringerer Menge als in Geweben die

mineralisiert werden, exprimiert wird [104], wurde endogenes DMP-1 auch in Zellen einer embryonalen Mauszelllinie, den C3H10T1/2 [105] mesenchymalen Zellen, pluripotenten Stammzellen mit multilinealem, darunter osteo-, chondro- und adipogenem Differenzierungspotential, exprimiert [106]. Dies stellt eine mögliche Erklärung der hier beobachteten Expression dar. Im Rahmen einer anderen Studie eingesetzte Kontrollgruppen nicht induzierter hMSCs aus Knochenmark erschienen allerdings in Immunfluoreszenzfärbungen kaum positiv bis negativ für Osteokalzin und Osteopontin, in Western Blot Analysen war OC- und OPN-Expression in den Kontrollgruppen jedoch ebenfalls vorhanden [107].

Die positive Expression osteogener Markerproteine, insbesondere diejenige von Osteokalzin und Osteopontin und in Zusammenhang mit der geringeren Positivität von CD 73 im Vergleich zu CD 105 betrachtet, könnte so auch eine, bereits in Monolayerkultur in Standardmedium vorhandene, intrinsische Tendenz der Zellen zur osteogenen Differenzierung vermuten lassen. In hMSC-Kulturen wurde ebenfalls nach Immunfluoreszenzfärbungen von CD 90, CD 105 und CD 73 insbesondere für CD 73 eine Heterogenität in der Markerexpression festgestellt, wobei insbesondere in einer morphologisch abgegrenzten Subpopulation von abgeflachten Zellen eine verminderte Expression von CD 73 auffällig war und die Herabregulation von CD 73 mit einer beginnenden Zelldifferenzierung in Verbindung gebracht wurde [108].

Die Negativität von Sclerostin ist hierbei nicht überraschend, ist es doch ein später Marker der osteogenen Differenzierung, der erst von in mineralisierter EZM eingebetteten Osteozyten exprimiert wird [109].

Jedoch zeichnen sich ASCs generell aber als weiteres wichtiges Charakteristikum durch ihr Potential aus, sich *in vitro* in osteogener, adipogener und chondrogener Linie differenzieren zu lassen [51], sodass davon auszugehen ist, dass sich die Zellen trotz dieses osteogen imponierenden Phänotyps durch entsprechende Medienzusätze entlang anderer mesenchymaler Linien differenzieren ließen. Insbesondere auch aufgrund der beschriebenen Transdifferenzierungskapazität hMSCs, die eine Entwicklung einer bereits differenzierten Zelle nach entsprechender Induktion entlang einer anderen mesenchymalen Linie zulässt [110].

Interessanterweise scheint es eine Hierarchie in der Reihenfolge der Differenzierung von MSCs zu geben, die z.B. von Muraglia et al. [111] und Sarugaser et al. [112] auf der Basis von Experimenten beschrieben wurde in denen Zellen durch Medienzusätze in die verschiedenen mesenchymalen Linien differenziert wurden. Während Muraglia et al. die Meinung vertraten die Standardentwicklung sei die osteogene Differenzierung von MSCs [111], kamen Sarugaser et al. in einem erweiterten Modell zu dem Schluss, dass das Differenzierungspotential der Zellen ebenfalls schrittweise eingebüßt werde, wobei das chondrogene und osteogene Potenzial am längsten erhalten bliebe, die Zellen sich jedoch standardmäßig in Fibroblasten differenzierten [112].

Eine spontane Differenzierung von ASCs wurde von mehreren Forschungsgruppen jedoch als nicht vorhanden beschrieben. Walmsley et al. begründeten dies mit negativen Alizarin red S- und Oil red O-Färbungen bei in normalem Kulturmedium für 21 Tage kultivierten hASCs [113]. In der Arbeit von Ogawa et al. war in Versuchen mit Maus-ASCs ebenfalls eine negative ALP-

und überwiegend negative von Kossa-Färbung mit lediglich einzelnen punktförmigen Schwarzfärbungen in der nicht induzierten Kontrollgruppe zu sehen, in PCR-Analysen war *Osteopontin* und *ALP* geringer positiv als in osteogen induzierten Zellen an Tag 28, *Osteokalzin* wurde jedoch in keiner Versuchsgruppe nachgewiesen [114]. De Girolamo et al. beobachteten auch kaum positive Immunfluoreszenzfärbungen für Osteopontin und Alizarin red S-Färbungen in uninduzierten hASCs [115].

Dudakovic et al. fanden Unterschiede in Phänotypen von proliferierenden und nicht-proliferierenden hASCs, wobei letztere mehr EZM-Proteine exprimierten und phänotypische Charakteristika weiter differenzierter Zellen, jedoch ohne Festlegung auf eine spezielle mesenchymale Linie, aufwiesen [116].

Immunfluoreszenzfärbungen weiterer Marker, die eine Differenzierung entlang anderer mesenchymaler, z.B. chondrogener oder adipogener Linien anzeigen würden, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Diese Färbungen könnten weiter Aufschluss über den Phänotyp von hASCs in Standardmedium ohne Differenzierungsinduktion geben.

Im Rahmen dieser Arbeit war insbesondere das veränderte Verhalten der Zellen in Scaffoldkultur und ihre Differenzierungspotential in osteogener Linie von Interesse.

Mit den beschriebenen phänotypischen Charakteristika von ASCs sowie der Expression osteogener Proteine eignen sich die isolierten ASCs, um als Bestandteil eines Tissue Engineering Ansatzes für Knochenregeneration eingesetzt zu werden.

4.2 SCAFFOLDKULTUREN

4.2.1 KULTURBEDINGUNGEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zuvor in Monolayer kultivierte ASCs auf dreidimensionalen, porösen Biokeramik-Scaffolds angesiedelt und statisch in drei unterschiedlichen Wachstumsmedien *in vitro* kultiviert. Alle drei Grundkomponenten des Tissue Engineerings und der Regenerativen Medizin, Zellen, Scaffolds und Signale [32] wurden somit verwendet, um die Eignung der hier untersuchten Kombinationen für den potentiellen Einsatz als Knochenersatzmaterial zu analysieren.

Kalziumphosphat-Scaffolds sind biokompatibel, bioaktiv und osteokonduktiv, können Zellen und Proteine binden, weisen jedoch auch Defizite in mechanischen Eigenschaften, v.a. durch ihre spröde Beschaffenheit auf [56]. Durch die Variation des Anteils der Einzelkomponenten lassen sich ihre Eigenschaften beeinflussen, so kann beispielsweise durch die Kombination des schlecht löslichen HA mit dem vergleichsweise gut löslichen β -TCP eine optimierte Resorbierbarkeit *in vivo* erreicht werden [117, 118]. Des Weiteren geht mit zunehmendem Anteil von β -TCP in biphasischen Kalziumphosphat-Scaffolds eine Abnahme der Festigkeit einher [56]. In Bezug auf die günstigsten Verhältnisse von HA/ β -TCP bestehen jedoch widersprüchliche Ergebnisse [117]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Scaffolds mit einem Verhältnis von 60 % HA zu 40 % β -TCP verwendet.

Die Anwendung eines 3D-Druck-Verfahrens war zur Herstellung der Scaffolds geeignet. So konnten die Scaffolds, abgesehen von kleineren Unregelmäßigkeiten die auch auf die Brüchigkeit des Materials zurückgeführt werden können, uniform entsprechend den vorgegebenen Maßzahlen (Durchmesser: 8 mm, Höhe: 2 mm) produziert werden (Abb. 6). Sie wiesen eine interkonnektierende Porosität auf, eine wichtige Eigenschaft um Zellwachstum und Nährstoffversorgung innerhalb der Scaffolds zu gewährleisten [58]. Eine allgemeine Empfehlung lautete eine Porengröße von 100 μm nicht zu unterschreiten, da größere Poren eine bessere Osteogenese aufwiesen, jedoch mit einem Verlust der mechanischen Stabilität einhergingen, sodass die maximale Porosität v.a. durch die entstehende Instabilität begrenzt wird [119]. Hier wurde ein Makroporendurchmesser von ca. 0,5 mm gewählt.

Die mikroskopisch sichtbare Scaffoldstruktur aus kugelförmigen Kalziumphosphatpartikeln (Abb. 7) bot den Zellen eine geeignete Oberfläche zur Adhäsion, Proliferation und Durchwanderung der Scaffolds wie sie in der H.E.-Färbung (Abb. 13) zu sehen war.

Es ist bekannt, dass sich ASCs *in vitro* durch entsprechende Medienzusätze in unterschiedliche mesenchymale Linien differenzieren lassen, wobei Dexamethason, Ascorbinsäure und β -GP gängige Komponenten osteogener Wachstumsmedien darstellen [50, 120].

Neben dem normalen Wachstumsmedium ohne osteogene Zusätze und dem osteogenen Wachstumsmedium wurde noch ein drittes Kulturmedium eingesetzt, das zusätzlich zu den drei osteogenen Komponenten rhBMP-2 enthielt.

4.2.2 VITALITÄT UND PROLIFERATION

Zunächst sollte untersucht werden, wie sich eine Zellkultivierung auf bzw. in den Scaffolds unter statischen Bedingungen über einen Zeitraum von 29 Tagen auf die Vitalität und das Proliferationsverhalten der ASCs auswirkt. Hierzu wurden WST-1 Test, PicoGreen Assay und H.E.-Färbungen durchgeführt.

Während der PicoGreen Assay die dsDNA quantifiziert [92] und somit auf die Zellzahl und die Proliferation rückgeschlossen wurde, liegt dem WST-1 Test die enzymatische Umwandlung von WST-1 in wasserlösliches Formazan mit anschließender Extinktionsmessung zugrunde [91], wobei der Test, basierend auf dieser metabolischen Reaktion, neben der Zellproliferation als Indikator für Zellvitalität angesehen wurde.

Sowohl in Scaffoldkultur mit normalem, als auch mit osteogenem und osteogenem Wachstumsmedium mit rhBMP-2 Zusatz wurde eine Zunahme der Zellproliferation und der Zellvitalität beobachtet.

Dies zeigte sich durch eine mit fortschreitender Kulturdauer zunehmende Extinktion im WST-1-Test (Abb. 8), eine im PicoGreen Assay gemessene Zunahme des dsDNA-Gehaltes (Abb. 9) und wurde in H.E.-Färbungen durch eine zunehmende Zahl anfärbbarer Zellen in Scaffolds (Abb. 13) bestätigt.

Demnach waren die Kulturbedingungen geeignet, Proliferation und Vitalität der Zellen innerhalb der Scaffolds zu fördern, wobei sich bezüglich des Ausmaßes Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zeigten.

Die Gegenüberstellung unterschiedlicher Kulturmedien ergab höhere Vitalität- und Proliferationsraten in osteogenem Wachstumsmedium im Vergleich zu beiden anderen Kulturmedien. MN und MO + BMP-2 unterschieden sich überwiegend nicht signifikant voneinander. Die H.E.-Färbung stimmte mit den Vitalitäts- und Proliferationstestungen in der Hinsicht überein, dass neben der insgesamt zunehmenden Anfärbbarkeit jeweils ähnliche Zellzahlen in MN wie in MO + BMP-2 beobachtet wurden und im Vergleich dazu insbesondere an Tag 29 ein erhöhter Zellgehalt in MO sichtbar war.

Die Mediumzusätze in MO alleine förderten somit die Zellproliferation und Zellvitalität stärker als MO mit zusätzlicher Zugabe des Wachstumsfaktors BMP-2. Da die Kulturbedingungen in der MO + BMP-2-Gruppe bis auf das Vorhandensein von rhBMP-2 denen in MO entsprachen, scheint rhBMP-2 ursächlich hierfür zu sein.

Eine Abnahme der Proliferation bei hASC-Kultur mit BMP-2 wurde auch von anderen Autoren beschrieben [121].

Außerdem wurde mit der Kultivierung in MO + BMP-2 keine verbesserte Vitalität und am Ende des Versuchszeitraumes keine signifikant erhöhte Proliferation im Vergleich zu normalem Wachstumsmedium erreicht.

Zellproliferation erscheint nun bekanntermaßen umgekehrt proportional zur Zelldifferenzierung [122]. Eine Stagnation der Proliferation kann somit mit einer voranschreitenden Differenzierung, mit einer Größenzunahme der einzelnen Zellen, wie sie nach induzierter Proliferationsinhibierung auftrat [123] sowie mit der Hochregulation gewebetypischer Gene, wie sie auch nach einer Blockade der DNA-Synthese festgestellt wurde [124], korreliert werden. In der H.E.-Färbung zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Anfärbbarkeit, wobei sich eine Größenzunahme der einzelnen Zellen mikroskopisch nicht eindeutig darstellte und somit von einer Zunahme der Zellzahl ausgegangen wurde.

Demnach war Zellproliferation über die gesamte Versuchszeit, wenn auch im Vergleich der Versuchsgruppen in unterschiedlichem Ausmaß, vorhanden, ebenso wie eine im Kulturverlauf ansteigenden Zellvitalität.

4.2.3 OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG

Als weiterer wichtiger Bestandteil dieser Arbeit sollte eine potentielle osteogene Differenzierung der Zellen in Scaffoldkultur überprüft werden. Dabei sollten Vergleiche bezüglich der Kultivierung in normalem (MN), in osteogenem (MO) und in osteogenem Wachstumsmedium mit rhBMP-2 Zusatz (MO + BMP-2) eventuell vorhandene Unterschiede zwischen diesen Versuchsgruppen aufzeigen.

4.2.3.1 mRNA-EXPRESSIONSMUSTER OSTEOGENER MARKERPROTEINE

Zur Beurteilung einer osteogenen Zelldifferenzierung können mRNA-Expressionsmuster verwendet werden. Die mRNA-Expression von *ALP*, *Osteokalzin* und *Collagen 1* wird hierfür

routinemäßig herangezogen, wobei erhöhte Expression für die vorhandene osteogene Differenzierung der Zellen spricht [125, 126].

Die beobachtete Zunahme der *ALP*- (Abb. 10) sowie die im Vergleich zu den Kalibratorzellen erhöhte *Osteokalzin*-Expression (Abb. 11) über den Kultivierungszeitraum von 29 Tagen in allen drei Versuchsgruppen wies somit auf eine osteogene Differenzierung der Zellen hin.

Hierbei wiesen die erhöhten Werte für *ALP* und *OC* im Vergleich zu Monolayer in der MN-Gruppe nach 29 Tagen Scaffoldkultur darauf hin, dass die Scaffolds alleine bereits die osteogene Differenzierung der Zellen förderten, also osteoinduktiv wirkten.

Untersuchungen zur Osteoinduktivität von Kalziumphosphat-Scaffolds *in vitro* wurden bereits von einigen Forschungsgruppen durchgeführt, deren Ergebnisse von Samavedi et al. zusammengefasst derart interpretiert wurden, dass die Osteoinduktivität auch ohne osteogene Medienzusätze vorhanden ist und von Eigenschaften der Scaffolds, wie z.B. der Löslichkeit oder dem Verhältnis von Kalzium zu Phosphat beeinflusst wird, wobei die höchste Osteoinduktivität biphasischen Kalziumphosphat-Materialien zugeschrieben werden könne [127]. Lobo et al. berichteten u.a. ebenfalls von einer Hochregulation osteogener Marker (*OPN*; *BSP*) in mesenchymalen Stammzellen die auf biphasischen Kalziumphosphat-Scaffolds in normalem Kulturmedium angesiedelt waren und vermuteten, dass die Mikroporosität und die Nanostruktur der Scaffolds zu den osteoinduktiven Eigenschaften beitragen [128].

Engler et al. konnten zeigen, dass sich mesenchymale Stammzellen auf einer eher weichen Grundlage in neurogener Linie und auf einer dagegen starren in osteogene Richtung entwickeln, die Differenzierung also durch die Elastizität der Matrice beeinflusst wird [64].

Die Beschaffenheit der hier getesteten Scaffolds bewirkte ihr osteoinduktives Potential im Einklang mit in der Literatur gemachten Beobachtungen.

Weiterhin fiel auf, dass die *ALP*-Expression in der MO- und im Unterschied dazu die *OC*-Expression in der MO + BMP-2-Gruppe am höchsten war. Eine Zelle, die sich in osteogener Linie differenziert, exprimiert in Abhängigkeit ihres gegenwärtigen Entwicklungsstadiums verschiedene Proteine sowie RNA-Moleküle [129, 130].

ALP, ein Membranprotein das als Phosphatase an der Mineralisierung beteiligt ist [130, 131] wird v.a. in Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten synthetisiert [129]. *Osteokalzin*, ein extrazelluläres Matrixprotein das Einfluss auf die Knochenmineralisation und Osteoblasten- sowie Osteoklastenaktivität zu haben scheint [102], wird hingegen in Osteoblasten und v.a. in Osteozyten exprimiert [129]. Davon ausgehend, dass *ALP* ein früher Marker und *OC* ein später Marker der osteogenen Differenzierung ist [129, 132, 133] lassen die hier gewonnen Ergebnisse vermuten, dass die Zellen in Kombination mit rhBMP-2 Zusatz bereits weiter differenziert waren und aus diesem Grund zum einen mehr *Osteokalzin*-mRNA exprimierten, als die Zellen in den anderen Versuchsgruppen und zum anderen am Versuchsende weniger mRNA des frühen Osteogenesemarkers *ALP* als Zellen in MO exprimierten. rhBMP-2 schien hier also insbesondere die Differenzierung der Zellen zu fördern und wirkte sich dabei inhibitorisch auf die Proliferation aus, wie beispielsweise die H.E.-Färbung an Tag 29 (Abb. 13) gezeigt hat. Somit scheint sich hier die Annahme einer umgekehrten Proportionalität von

Zelldifferenzierung zu Proliferation [122, 134] zu bestätigen. Legt man der osteogenen Differenzierung die zeitlich überlappend aufeinanderfolgenden Stadien Proliferation, Matrix Bildung und Mineralisation zugrunde, lässt sich die MO + BMP-2-Gruppe ebenfalls in eine weiter fortgeschrittenes Entwicklungsstadium einteilen [135].

Der Hochregulation von *ALP* und *Osteokalzin* und der damit implizierten osteogenen Differenzierung der Zellen, steht die reduzierte Expression der mRNA von *Collagen 1* (Abb. 12) im Vergleich zu Monolayerkultur in allen Versuchsgruppen zu allen Messzeitpunkten gegenüber.

In der Picosirius-Red-Färbung war Collagen im polarisierten Licht ebenfalls kaum nachweisbar (Abb. 14). Der Beobachtung und Annahme, dass mit der Polarisationsmikroskopie erhaltene Signale je nach Farbe unterschiedlichen Collagenarten zugeordnet werden können [95] wobei ein rotes oder gelbes Signal Collagen 1 und ein grünes Signal Collagen 3 darstellen sollte [136], wurde widersprochen, sodass mittels Picosirius-Red-Färbung somit keine Unterscheidung der Collagenarten möglich ist [137]. Auch wenn ein rotes Signal demnach nicht als spezifisch für Collagen 1 angesehen werden kann, waren diese roten Signale hier dennoch so gering ausgeprägt, dass Collagen im Allgemeinen und dazu gehörend Collagen 1 im Besonderen in nur sehr geringem Ausmaß vorhanden war und sich so mit den Ergebnissen der qRT-PCR konform zeigte.

Collagen 1 alpha1 gilt, wie ALP, als frühes Markerprotein für osteogene Differenzierung [133]. Beobachtungen von Liu et al. beschrieben eine hohe Collagen 1 Expression in allen Stadien der Osteoblastenreifung [125]. Als Osteoblastenmarkerprotein wird die Expression von Collagen 1 in Zellen mit osteogenem Phänotyp als gesteigert angenommen [126].

Somit scheinen sich die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse zu widersprechen, da im Falle einer osteogenen Differenzierung, wie durch die erhöhte *ALP*- und *OC*-Expression vermutet, die zu erwarten gewesene gesteigerte Expression von *Collagen 1* nicht beobachtet wurde. Diese vermeintliche Unstimmigkeit basiert auf der Annahme, die typischen Osteoblastenmarker *ALP*, *OC* und Collagen 1 [126] wären generell in sich osteogen differenzierenden Zellen hochreguliert. Jedoch gibt es auch Forschungsergebnisse, die eine Herabregulation initial gesteigerter mRNA-Expression von *Collagen 1* zeigten, beispielsweise die Herabregulation während der *in vitro* Kultivierung von Osteoblasten aus Kükenembryonen [138] oder fetalen Ratten-Osteoblasten [139]. Außerdem beobachteten Egusa et al. in einer Analyse von BMSCs und ASCs nach Kultivierung in osteogenem Medium eine reduzierte Expression vieler extrazellulärer Matrixproteine, u.a. auch von Collagen 1A1 in ASCs, und assoziierten deshalb die osteogene Differenzierung von BMSCs und ASCs mit einer Herabregulation einer Vielzahl extrazellulärer Matrixproteine [140].

4.2.3.2 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN OSTEOGENER MARKERPROTEINE

Wie schon mit ASC-Monolayerkulturen, wurden auch mit Scaffoldkulturen nach 29 Tagen Immunfluoreszenzfärbungen von OC (Abb. 15), OPN (Abb. 16), DMP-1 (Abb. 17) und Sclerostin (Abb. 18) angefertigt.

Osteopontin, ebenfalls ein osteogenes Markerprotein, wurde hinsichtlich seiner Expression in verschiedenen osteogenen Entwicklungsstadien beschrieben, wobei Beschreibungen als früher, potentieller Preosteoblasten-Marker [141] Berichte einer zeitlicher später als ALP und früher als OC beginnenden Expression gegenüberstehen [129] und Berichte, die es verglichen mit ALP als späteres Osteoblastenmarkerprotein [132] bzw. OPN, wie auch OC, als Marker einer späten Entwicklungsstufe der osteogenen Differenzierung beschreiben [130]. Diese Feststellungen stehen im Einklang zu der als zweigipflig, in der Proliferationsphase und in späteren Differenzierungsstadien beschriebenen Expression des OPN-Proteins [129, 133]. Osteogen induzierte ASCs scheinen jedenfalls eine verstärkte Expression von OPN aufzuweisen [115].

Immunfluoreszenzfärbungen der Scaffoldkulturen zeigten nach 29 Tagen tendenziell höhere Signale für OC und OPN in MO + BMP-2 (Abb. 15 I und Abb. 16 I) und unterstützen damit die Annahme einer weiter fortgeschrittenen osteogenen Differenzierung in dieser Versuchsgruppe.

Allerdings zeigte sich auch eine Abnahme des DMP-1-Signals in allen Versuchsgruppen (Abb. 17). DMP-1-Expression wurde auch in C3H10T1/2 mesenchymalen Stammzellen und MC3T3-E1 Preosteoblasten gezeigt [106]. Dennoch wird DMP-1 häufig als später Marker der osteogenen Differenzierung genannt [6, 61]. Es gab Untersuchungen, die hohe Expression v.a. in Osteozyten, nicht in Osteoblasten sahen [142], wohingegen andere ebenfalls hohe Expression in Osteozyten, aber auch eine Expression in Osteoblasten berichteten [143, 144]. Das DMP-1-Protein kann in Fragmente prozessiert werden, ein Vorgang der für seine Funktion *in vivo* essentiell ist [104]. Eine mögliche Erklärung für eine Abnahme des DMP-1-Immunfluoreszenzsignals, außer der Annahme, dass eine Herabregulation der DMP-1-Proteinsynthese bzw. ein Abbau des Proteins stattgefunden hat, ist die Hypothese einer Veränderung oder Prozessierung der DMP-1 Struktur, die eine Bindung des hier verwendeten Antikörpers verhindert hat, wie sie auch von Gluhak-Heinrich et al. aufgestellt wurde [145].

Das Osteozytenmarkerprotein Sclerostin, das von reifen Osteozyten synthetisiert wird, die bereits in mineralisierter Matrix eingebettet sind [109], wurde ebenfalls in Immunfluoreszenzfärbungen angefärbt und zeigte ein generell schwaches Fluoreszenzsignal (Abb. 18).

Hinsichtlich der Methodik der Immunfluoreszenzfärbung von Scaffoldkulturen war eine vorangehende Entkalkung der Proben notwendig, ein Prozess mit möglichen Auswirkungen auf die Nachweisbarkeit der Proteinexpressionsmuster. So konnte eine Degradation extrazellulärer Proteine während des Entkalkungsvorganges nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere bei bereits in Monolayer nachgewiesener Expression und eines potentiell vorhandenen Einflusses der Probenbehandlung gestaltete sich die quantitative Auswertung

schwierig, insbesondere auch bei unterschiedlich langen Entkalkungszeiten, wie beispielsweise bei 29 Tagen kultivierten MO-Proben, die aufgrund des makroskopisch beurteilten Entkalkungsfortschrittes über einen erheblich längeren Zeitraum entkalkt wurden. Trotz der Einschränkungen aufgrund der Probenverarbeitung ist die Immunfluoreszenzfärbung dennoch als aussagekräftige Methode anzusehen.

4.2.3.3 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN VON ASC-MARKERN

Zellen wurden nach 29 Tagen Scaffoldkultur erneut auf ihre Expression der ASC-Marker CD 73, CD 90 und CD 105 untersucht um Veränderungen gegenüber Monolayerkulturen zu detektieren (Abb. 19). So stellte sich CD 73 in allen Versuchsgruppen nach 29 Tagen Scaffoldkultur negativ dar. Somit zeigt sich ein vollständiger Verlust des CD 73 Oberflächenantigens, als Entwicklung aus einer bereits in Monolayer gegenüber CD 105 schwächeren Expression. CD 90 präsentierte sich in MN positiv, in MO und in MO + BMP-2 negativ, außer in einzelnen Zellen sehr schwach positiv.

Den Verlust typischer ASC-Marker wie CD 73 oder CD 90 mit einer Differenzierung der Zelle in Verbindung zu bringen liegt nahe. In Bezug auf CD 90 sprächen diese Ergebnisse für eine Beibehaltung des Stammzellcharakters in MN, der in MO und MO + BMP-2 in unterschiedlichem Ausmaß verloren ging und so im Falle eines Expressionsrückganges für eine Differenzierung dieser Zellen spräche. Delorme et al. hatten ebenfalls eine Herabregulation von CD 73 bei in osteogenem Medium kultivierten humanen BM MSCs festgestellt, allerdings hatten sie keine Expressionsänderung von CD 90 beobachtet, dafür aber einen Expressionsrückgang von u.a. CD 105 [146].

Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Färbungen von CD 105 waren zwar in allen Versuchsgruppen positiv (Abb. 19 G, H, I), in der MN- und der MO-Gruppe war CD 105 jedoch im Vergleich zu Monolayerkulturen (Abb. 5 G) deutlich herabreguliert. Eine Herabregulation von CD 105 bei osteogener Differenzierung hASCs wurde auch von Walmsley et al. beschrieben [113]. Ein schwächeres Signal in MO und MO + BMP-2 verglichen mit MN als Hinweis auf eine osteogene Differenzierung konnte nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise stellten sich Zellen in MO + BMP-2 verglichen mit den anderen beiden Versuchsgruppen mit der höchsten Expression von CD 105 dar (Abb. 19 I). CD 105 (Endoglin) spielt eine Rolle im TGF- β Signalweg und kann beispielsweise als akzessorisches Protein mit BMP-Typ 1-Rezeptoren ALK3 und ALK6, die BMP-2 gebunden haben, in Wechselwirkung treten [147, 148]. Es kann gemutmaßt werden, dass dieser Zusammenhang eine erhöhte Expression von CD 105 in den mit rhBMP-2 behandelten Zellen bedingt haben könnte.

Hinsichtlich einer osteogenen Differenzierung konnte festgestellt werden, dass die Scaffolds alleine bereits osteoinduktiv wirkten und, dass eine osteogene Differenzierung der Zellen in Scaffoldkultur stattfand, die insbesondere in der MO + BMP-2-Gruppe weiter fortgeschritten war.

4.2.4 EINFLUSS VON rhBMP-2

BMP-2 kann Knochenbildung induzieren und wird als Wachstumsfaktor zur Behandlung von Knochendefekten in der Klinik und als Bestandteil von Tissue Engineering Konzepten verwendet [67].

Alam et al. konnten z.B. in einem Rattenmodell, in dem allerdings keine Zellen auf den verwendeten Scaffolds angesiedelt waren, einen positiven Einfluss von rhBMP-2 auf die Knochenneubildung nachweisen, indem sie zeigten, dass der alleinige Einsatz von biphasischen Kalziumphosphatkeramik-Scaffolds unter das Perikranium von Ratten zur Bildung von fibrösem Bindegewebe führte, mit rhBMP-2 imprägnierte Scaffolds jedoch die Bildung neuen Knochens induzierten [149].

Über den Einfluss von BMP-2 auf die osteogene Differenzierung von ASCs wird jedoch gegensätzlich berichtet. Während der Zusatz von rhBMP-2 zu osteogenem Medium von *in vitro* kultivierte ASCs bei Dragoo et al. (MO enthielt Dexamethason, Ascorbinsäure-2-Phosphat und β -GP) und bei Panetta et al. (MO enthielt Ascorbinsäure und β -GP) zu einer verbesserten osteogenen Differenzierung der Zellen führte [150, 151], stellten Cruz et al. (MO enthielt Ascorbat und β -GP) keine Verbesserung fest [152].

Resultate der Gruppe um Chou und Zuk zeigten, dass die Behandlung von Femurdefekten von Ratten zum einen mit Scaffolds aus PLDLA und eingearbeitetem rhBMP-2, zum anderen aus einer zusätzlichen Besiedelung mit hASCs keine Unterschiede in der vorhandenen Knochenneubildung erbrachten, sodass die Knochenneubildung alleine auf das Vorhandensein von rhBMP-2 zurückgeführt werden könne und zusätzliche hASCs keinen Vorteil zu haben schienen [153]. In weiteren Versuchen derselben Gruppe bezüglich des Einflusses von rhBMP-2 auf hASC *in vitro* schienen ebenfalls keine Effekte auf die osteogene Differenzierung vorhanden zu sein [154].

Vanhatupa et al. erklärten schließlich, gegensätzliche Ergebnisse früherer Studien bzgl. des BMP-2-Effektes auf ASCs seien u.a. darauf zurückzuführen, dass osteogene und adipogene Differenzierung, abhängig vom Gewebespende, induziert werde sowie unterschiedliche Herstellungsverfahren des rhBMP-2 und die Kulturbedingungen Einfluss nähmen [121].

Tirkkonen et al. führten Experimente durch, die sie schlussfolgern ließen, dass osteogenes Medium alleine eine bessere osteogene Differenzierung von hASCs in 3D-Biokeramik-Kulturen bewirkt als das Erhaltungsmedium + rhBMP-2 und, dass die Kombination von osteogenem Medium + rhBMP-2 weder die ALP-Aktivität noch die Collagen-Produktion im Vergleich zu osteogenem Medium verbesserte [155].

In dieser Arbeit scheint der rhBMP-2-Zusatz in MO die Zelldifferenzierung in osteogener Linie zu verstärken, da Zellen in MO + BMP-2 die höchste mRNA-Expression von *Osteokalzin*, tendenziell erhöhte Immunfluoreszenzsignale für OC und OPN mit herabreguliertem CD 73 und CD 90 sowie eine im Vergleich zu MO niedrigerer Proliferation aufwiesen.

4.2.5 EINSATZ ALS KNOCHENERSATZMATERIAL

Scaffolds, Zellen und die Zelldifferenzierung fördernde Signale können bei ihrer Kombination die wünschenswerten Eigenschaften eines Knochenersatzmaterials, Osteokonduktion, Osteoinduktion und Osteogenese in sich vereinen und stellen attraktive Komponenten zur Entwicklung einer Alternative zu autologen Knochentransplantaten dar [16].

Der Einsatz speziell dieser Scaffolds, Zellen und osteogenen Reize in dieser Arbeit bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Materialien. Trotzdem bestehen in mancher Hinsicht nachteilige Eigenschaften, die insbesondere bei einem klinischen Einsatz zu beachten sind bzw. verbessert werden könnten. Das im Rahmen dieser Arbeit getestete Tissue Engineering Konstrukt stellt gleichwohl einen aussichtsreichen Ansatz zur Weiterentwicklung klinisch einsetzbarer Knochenersatzmaterialien dar.

ASCs eignen sich gut als zelluläre Bestandteile dieses Tissue Engineering Ansatzes, aufgrund der guten Erreichbarkeit, Entnahmemöglichkeit und Verfügbarkeit des Fettgewebes aus dem sie leicht isoliert werden können sowie wegen ihres osteogenen Differenzierungspotentials [55]. Nachteile bestehen in der Notwendigkeit der *in vitro* Kultivierung der Zellen, einerseits zur Isolation der plastikadhärenten ASCs, andererseits zur Zellvermehrung, um eine ausreichend hohe Zahl an Zellen für eine Scaffoldbesiedelung zu Verfügung zu haben. Die Kultivierung geht ebenfalls mit Problemen einher. Zum einen benötigt sie Zeit, die bei der Verwendung von autologen Zellen ein zweizeitiges Vorgehen notwendig macht, bei dem in einem ersten Schritt die Gewebeentnahme erfolgt und nach der *in vitro* Kultivierung die Reimplantation des Knochenersatzmaterials. Zum anderen weichen die Gegebenheiten *in vitro* von *in vivo* Bedingungen ab, z.B. was die Nährstoffkomponenten und -versorgung der Zellen betrifft.

Verschiedene Konzepte versuchen das Arbeiten mit ASCs zu optimieren. Ein Beispiel ist der Einsatz automatisierter Isolationssysteme mit dem Potential autologe Zellen der SVF zeitnah ohne den Zwischenschritt der *in vitro* Kultivierung zur Reimplantation bereitzustellen [156], wobei sowohl enzymatische, als auch nicht-enzymatische Isolationmethoden zur Verfügung stehen [157]. Weitere Beispiele beinhalten eine Änderung der *in vitro* Kulturbedingungen, z.B. durch den Einsatz von Kulturmedien ohne tierische Zusätze, die sich ebenfalls als effektiv erwiesen haben [83, 158] oder der Einsatz von Bioreaktoren, die ein dynamisches Kultursystem mit Kultivierung der Zellen in zirkulierendem Medium bereitstellen können und damit ebenfalls eine Annäherung an *in vivo* vorhandene Bedingungen wie die Gewebepfusion darstellen [159].

Hinsichtlich des Einsatzes des Wachstumsfaktors BMP-2 stehen mit rekombinant hergestellten humanen Proteinen klinisch zugelassene Substanzen zur Verfügung [69]. Bei ihrer Verwendung *in vivo* hat sich die Aufrechterhaltung einer ausreichend hohen lokalen Konzentration als problematisch erwiesen [68]. Außerdem ist die richtige Dosierung von

rhBMP-2 noch Gegenstand von Diskussionen, auch unter dem Aspekt, dass Nebenwirkungen abhängig von der eingesetzten Konzentration des Wachstumsfaktors zu sein scheinen [160]. Neben der Kombination mit Trägersubstanzen, ist eine weitere Möglichkeit zur Aufrechterhaltung hoher *in vivo* Wachstumsfaktorkonzentrationen die genetische Veränderung von Zellen z.B. durch Transduktion, sodass BMP-2 konstant exprimieren werden kann [68, 150, 161-163]. Allerdings wurde auch bereits eine kurze, sechstägige Expression von BMP-2 für eine Festlegung von MSCs zur osteogenen Differenzierung als ausreichend beschrieben [164]. Sogar eine nur 15-minütige Inkubation von hASCs mit BMP-2 vor der Ansiedelung auf Kalziumphosphat-Scaffolds hatte deren osteogene Differenzierung gefördert, sodass bei einem einzeitigen Vorgehen entnommenen Zellen von einer kurzen Behandlung mit BMP-2 vor ihrer Reimplantation während derselben Operation profitieren könnten [165].

Wichtige Voraussetzung für einen klinischen Einsatz als Knochenersatzmaterial sind die Eigenschaften des Scaffolds auf dem die Zellen angesiedelt werden. Biphasische Kalziumphosphate sind kommerziell in verschiedenen Ausführungen erhältlich [117]. Herausforderungen stellen die Brüchigkeit von Kalziumphosphat-Scaffolds dar, die ihren Einsatz besonders in Knochen die großen Gewichtbelastungen ausgesetzt sind erschwert sowie die Abwägung des Ausmaßes u.a. der Stabilität, Porosität und Abbaubarkeit [56]. Wünschenswert ist eine exakte Passform des Scaffolds für entsprechende Knochendefekte. Bildgebende Verfahren, wie CT oder MRT, liefern die Daten zur genauen dreidimensionalen Darstellung des Defektes, wodurch die Konstruktion eines passgenauen Scaffolds ermöglicht wird das mittels Rapid Prototyping Technik angefertigt werden kann, sodass ein Produkt entsteht, das auf die individuellen Bedürfnisse des Patienten abgestimmt ist [60, 166].

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Scaffolds wurden ebenfalls mit Rapid Prototyping Technik im 3D-Druck-Verfahren hergestellt, für diese konzeptuelle Testung allerdings uniform zylinderförmig. Für den individuellen Defektersatz sind komplexere, größere geometrische Formen zu erwarten.

Hieraus ergibt sich eine weitere Herausforderung in der Übertragung von Tissue Engineering Produkten in die Klinik: die notwendige Vaskularisation von Gewebe mit einer Ausdehnung über 400 μm , um die Vitalität der Zellen aufrechtzuerhalten [167]. *In vitro* erfolgt die Nährstoffversorgung von Zellen üblicherweise durch Nährmedien und deren regelmäßige Wechsel und kann z.B. in Bioreaktoren physiologischen Bedingungen angenähert werden [159].

In vivo werden dennoch Blut- bzw. Lymphgefäße für den Transport von Nährstoffen und Sauerstoff zum Gewebe und den Abtransport von Abfallprodukten bzw. Lymphflüssigkeit benötigt werden [167]. Lösungsansätze für die Problematik der Vaskularisation umfassen Konzepte die zum einen die Konstruktion von Gefäßstrukturen im Gewebe vor der Transplantation, zum anderen die Beschleunigung der *in vivo* Vaskularisation als Grundlage haben [167].

Fortschritte auf diesem Gebiet und zukünftige erweiterte und neue Erkenntnisse bezüglich ASCs und Mechanismen der osteogenen Differenzierung, Biokeramik-Scaffolds und BMPs und

ihrer Kombinationen können zu einer Verbesserung und Weiterentwicklung dieses Tissue Engineering Ansatzes beitragen und seinen Einsatz in der Klinik ermöglichen. Auch wenn der klinische Einsatz von Tissue Engineering Produkten für die Knochenregeneration hinter den anfänglich hohen Erwartungen zurückblieb [81], bietet dieses Forschungsgebiet Perspektiven für eine verbesserte Patientenversorgung. Auf dem Gebiet der Behandlung von Knochenerkrankungen und -defekten mit steigenden Zahlen von Therapien mit Knochenersatzmaterial [19] ist eine Alternative zum autologen Knochenersatz, der nach wie vor das Standardverfahren darstellt [19], wünschenswert. Weitergehende Forschungsarbeit auf dem Gebiet des Tissue Engineerings von Knochenersatzmaterialien kann die Basis für die Entwicklung neuer Knochenersatzmaterialien und ihren Einsatz in der Klinik für eine bessere Patientenversorgung bilden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Behandlung von Knochendefekten kann in bestimmten Fällen, beispielsweise bei nicht heilenden Knochentraumata oder tumorassoziierten Knochendefekten, den Einsatz von Knochenersatzmaterialien erforderlich machen. Als Standardmethode gelten hierfür autologe Knochentransplantate, die trotz ihrer guten Eignung dennoch nicht nebenwirkungsfrei sind. Aus diesem Grund ist die Entwicklung alternativer, verbesserter Knochenersatzmaterialien erstrebenswert. Das Forschungsgebiet des Tissue Engineerings hat zum Ziel biologische Ersatzmaterialien zu entwickeln. Die Grundkomponenten hierfür stellen Zellen, Scaffolds und Signale, z.B. Wachstumsfaktoren, dar.

Im Rahmen dieser Arbeit auf dem Gebiet des Tissue Engineerings von Knochenersatzmaterial wurde die Kombination aus mesenchymalen Stroma-/Stammzellen aus Fettgewebe mit biphasischen Kalziumphosphat-Scaffolds sowie zusätzlichen osteogenen Stimuli *in vitro* untersucht. Es erfolgte eine Charakterisierung isolierter Zellen in Monolayerkultur hinsichtlich ihres Phänotyps und die Untersuchung des Zellkulturverhaltens in Scaffoldkultur mit einer Analyse der osteogenen Differenzierung der Zellen, insbesondere auch unter Einfluss des Wachstumsfaktors BMP-2.

Mesenchymale Stroma-/Stammzellen wurden aus humanem subkutanem Fettgewebe isoliert. In Monolayerkultur wiesen sie mit spindelförmiger Morphologie und mit in Immunfluoreszenzfärbungen starker Positivität für CD 44, CD 105 und CD 166, im Vergleich dazu geringere Positivität für CD 73 und CD 90, schwacher Positivität für CD 39 sowie Negativität für CD 34 und CD 45, beschriebene phänotypische Eigenschaften von adipose tissue-derived stromal cells (ASCs) auf. Bereits in Monolayer war ebenfalls in Immunfluoreszenzfärbungen eine positive Anfärbbarkeit der osteogenen Marker Osteokalzin, Osteopontin und DMP-1 bei Negativität für Sclerostin vorhanden.

ASCs wurden auf biphasischen Kalziumphosphat-Scaffolds (60% HA/ 40% β -TCP), die mit Rapid Prototyping Technik im 3D-Druck-Verfahren hergestellt wurden, angesiedelt und bis zu 29 Tage statisch kultiviert. Die Kultivierung erfolgte hierbei in drei unterschiedlichen Kulturmedien, einem normalen Wachstumsmedium (MN), einem osteogenen Wachstumsmedium (MO) und einem osteogenen Wachstumsmedium mit Zusatz von rhBMP-2 (MO + BMP-2). Es zeigte sich im PicoGreen Assay, im WST-1 Test und in H.E.-Färbungen eine über den Versuchszeitraum zunehmende zelluläre Proliferation, Vitalität und Durchwanderung der Scaffolds in allen Versuchsgruppen, die in der MO-Gruppe gegenüber den anderen beiden Versuchsgruppen erhöht waren.

In der qRT-PCR von Scaffoldkulturen zeigte sich eine erniedrigte *Collagen 1*-Expression, die sich durch eine geringe Anfärbbarkeit in der Picosirius-Red-Färbung bestätigte. Die mRNA-Expression von *ALP*, ein früher osteogener Marker, stieg über den Versuchszeitraum an, mit höchster *ALP*-Expression in MO. Die mRNA-Expression von *Osteokalzin*, ein später osteogener Marker, war in MO + BMP-2 am stärksten. In Immunfluoreszenzfärbungen zeigte sich, bei einem Rückgang der DMP-1-Expression über den Versuchszeitraum und einer insgesamt

schwachen Sclerostin-Expression, eine ebenfalls tendenziell höhere Expression von Osteokalzin und Osteopontin in der MO + BMP-2-Gruppe. Immunfluoreszenzfärbungen von ASC-Markern an Tag 29 der Scaffoldkultur ergaben keinen Expressionsnachweis von CD 73, positive (MN) und überwiegend negative (MO und MO + BMP-2) Fluoreszenzsignale für CD 90 sowie geringer als in ASC-Monolayerkultur vorhandene Expression von CD 105 in MN und MO, während die Immunfluoreszenzintensität von CD 105 in MO + BMP-2 stark ausgeprägt war.

Die aus Fettgewebe isolierten ASCs mit bereits in Monolayer vorhandener Expression osteogener Marker wiesen in Scaffoldkultur steigende Proliferation und Vitalität auf und eigneten sich als zelluläre Bestandteile dieses Tissue Engineering Ansatzes. Biphasische Kalziumphosphat-Scaffolds alleine waren in der Lage die osteogene Differenzierung der Zellen zu fördern, da bereits in MN ein mRNA-Expressionsanstieg osteogener Markerproteine beobachtet wurde. Osteogenes Medium führte zu höchstem Zellwachstum, der Zusatz von rhBMP-2 zu einer im Vergleich zu MO geringeren Proliferation aber einer weiter fortgeschrittenen osteogenen Differenzierung mit erhöhter mRNA- und Proteinexpression von *Osteokalzin*.

Die Kombination von ASCs mit biphasischen Kalziumphosphat-Scaffolds führte zu einer osteogenen Differenzierung der Zellen, die durch die Zugabe von rhBMP-2 beschleunigt wurde und stellt somit einen Ansatz für ein potentiell klinisch nutzbares Knochenersatzmaterial dar.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ADSC	adipose-derived stem cell
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASC	adipose tissue-derived stromal cell
ATF 4	Activating transcription factor 4
BM MSC	bone marrow mesenchymal stem cell
BMI	Body Mass Index
BMP	Bone morphogenetic protein
BMSC	bone marrow-derived stromal cell
BRC	bone remodeling compartment
BSA	bovine serum albumin
BSP	Bone sialoprotein
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding proteins
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CFU-F	fibroblastoid colony-forming unit
CFU-GM	granulocyte-macrophage colony forming unit
CT	Computertomographie
Ct	Cycle threshold
D	Deutschland
d.h.	das heißt
DK	Dänemark
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMP-1	Dentin matrix protein-1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuclease
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
EZM	extrazelluläre Matrix
FCFC	fibroblast colony-forming cell
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
FDM	fused deposition modeling
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomic DNA
h	human
H.E.	Hämatoxylin-Eosin

HA	Hydroxyapatit
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen-antigen D Related
HTCR	Human Tissue and Cell Research
HWZ	Halbwertszeit
IFATS	International Federation for Adipose Therapeutics and Science
Ig	Immunglobulin
ISCT	International Society for Cellular Therapy
IU	International Unit
Jhd.	Jahrhundert
MEK	Methylethylketon
min	Minuten
miRNA	microRNA
MMPs	Matrix Metalloproteinasen
MN	normales Wachstumsmedium
MO	osteogenes Wachstumsmedium
MO + BMP-2	osteogenes Wachstumsmedium mit rhBMP-2 Zusatz
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	multipotent mesenchymal stromal cell; mesenchymal stem cell
NL	Niederlande
OC	Osteokalzin
OPN	Osteopontin
OT	Objekträger
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PLA	processed lipoaspirate
PLDLA	poly(L-lactide-co-DL-lactide)
PODXL	Podocalyxin like protein
PPAR γ	Peroxisome proliferator activated receptor γ
qRT-PCR	quantitative real time PCR
r	rekombinant
rcf	relative centrifugal force
RIA	Reamer-Irrigator-Aspirator
RM	Regenerative Medizin
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transcription
Runx2	Runt-related 2
SATB2	Special AT-rich sequence binding protein 2
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	Sekunde
SFF	solid free-form fabrication
SIBLINGs	small integrin-binding ligand-linked glycoproteins
SLA	Stereolithographie
SLRPs	small leucine rich proteoglycans
SLS	selective laser sintering

sog.	sogenannt
Strep	Streptomycin
SVF	Stromal Vascular Fraction
T/E	Trypsin/EDTA
Tab.	Tabelle
TAZ	Transcription coactivator with binding capacity to PDZ motifs
TE	Tissue Engineering
TERM	Tissue Engineering, Regenerative Medizin
TGF- β	Transforming Growth Factor β
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
WST-1	water soluble tetrazolium-1
z.B.	zum Beispiel
β -GP	β -Glycerophosphat
β -TCP	beta-Tricalciumphosphat

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Drenckhahn, D. and P. Kugler, *Knochengewebe*, in *Anatomie*, D. Drenckhahn, Editor. 2008, Elsevier, Urban & Fischer München Jena. p. 133-149.
2. Welsch, U., *Bindegewebe*, in *Lehrbuch Histologie*, U. Welsch and W. Kummer, Editors. 2014, Elsevier, Urban & Fischer: München. p. 102-140.
3. Berendsen, A.D. and B.R. Olsen, *Bone development*. *Bone*, 2015. **80**: p. 14-8.
4. Yang, Y., *Skeletal morphogenesis during embryonic development*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2009. **19**(3): p. 197-218.
5. Shapiro, F., *Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts*. *Eur Cell Mater*, 2008. **15**: p. 53-76.
6. Florencio-Silva, R., G.R. Sasso, E. Sasso-Cerri, M.J. Simoes, and P.S. Cerri, *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 421746.
7. Capulli, M., R. Paone, and N. Rucci, *Osteoblast and osteocyte: games without frontiers*. *Arch Biochem Biophys*, 2014. **561**: p. 3-12.
8. Yavropoulou, M.P. and J.G. Yovos, *Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives*. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2008. **8**(3): p. 204-16.
9. Väänänen, H.K. and T. Laitala-Leinonen, *Osteoclast lineage and function*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008. **473**(2): p. 132-138.
10. Alford, A.I., K.M. Kozloff, and K.D. Hankenson, *Extracellular matrix networks in bone remodeling*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015. **65**: p. 20-31.
11. LeGeros, R.Z., *Calcium phosphate-based osteoinductive materials*. *Chem Rev*, 2008. **108**(11): p. 4742-53.
12. Baino, F., G. Novajra, and C. Vitale-Brovarone, *Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2015. **3**: p. 202.
13. Landis, W.J. and R. Jacquet, *Association of calcium and phosphate ions with collagen in the mineralization of vertebrate tissues*. *Calcif Tissue Int*, 2013. **93**(4): p. 329-37.
14. Gorski, J.P., *Biom mineralization of bone: a fresh view of the roles of non-collagenous proteins*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011. **16**: p. 2598-621.
15. Datta, H.K., W.F. Ng, J.A. Walker, S.P. Tuck, and S.S. Varanasi, *The cell biology of bone metabolism*. *J Clin Pathol*, 2008. **61**(5): p. 577-87.
16. Fillingham, Y. and J. Jacobs, *Bone grafts and their substitutes*. *Bone Joint J*, 2016. **98-b**(1 Suppl A): p. 6-9.
17. Einhorn, T.A., *The cell and molecular biology of fracture healing*. *Clin Orthop Relat Res*, 1998(355 Suppl): p. S7-21.
18. Seeman, E., *Bone modeling and remodeling*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2009. **19**(3): p. 219-33.
19. Campana, V., G. Milano, E. Pagano, M. Barba, C. Cicione, G. Salonna, W. Lattanzi, and G. Logroscino, *Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice*. *J Mater Sci Mater Med*, 2014. **25**(10): p. 2445-61.
20. Dimitriou, R., E. Jones, D. McGonagle, and P.V. Giannoudis, *Bone regeneration: current concepts and future directions*. *BMC Med*, 2011. **9**: p. 66.
21. Egol, K.A., A. Nauth, M. Lee, H.C. Pape, J.T. Watson, and J. Borrelli, Jr., *Bone Grafting: Sourcing, Timing, Strategies, and Alternatives*. *J Orthop Trauma*, 2015. **29 Suppl 12**: p. S10-4.
22. Schlickewei, W. and C. Schlickewei, *The Use of Bone Substitutes in the Treatment of Bone Defects – the Clinical View and History*. *Macromolecular Symposia*, 2007. **253**(1): p. 10-23.
23. Nerem, R.M., *Cellular engineering*. *Ann Biomed Eng*, 1991. **19**(5): p. 529-45.
24. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. *Science*, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
25. Mironov, V., R.P. Visconti, and R.R. Markwald, *What is regenerative medicine? Emergence of applied stem cell and developmental biology*. *Expert Opin Biol Ther*, 2004. **4**(6): p. 773-81.
26. Mason, C. and P. Dunnill, *A brief definition of regenerative medicine*. *Regen Med*, 2008. **3**(1): p. 1-5.
27. Nerem, R.M., *Tissue engineering: the hope, the hype, and the future*. *Tissue Eng*, 2006. **12**(5): p. 1143-50.
28. Daar, A.S. and H.L. Greenwood, *A proposed definition of regenerative medicine*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007. **1**(3): p. 179-84.
29. Kaul, H. and Y. Ventikos, *On the genealogy of tissue engineering and regenerative medicine*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2015. **21**(2): p. 203-17.

30. Badylak, S.F. and R.M. Nerem, *Progress in tissue engineering and regenerative medicine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(8): p. 3285-6.
31. Langer, R. and J. Vacanti, *Advances in tissue engineering*. Journal of Pediatric Surgery, 2016. **51**(1): p. 8-12.
32. Nerem, R.M. and S.C. Schutte, *Chapter 2 - The Challenge of Imitating Nature*, in *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*. 2014, Academic Press: Boston. p. 9-24.
33. Giannoudis, P.V., T.A. Einhorn, and D. Marsh, *Fracture healing: the diamond concept*. Injury, 2007. **38 Suppl 4**: p. S3-6.
34. Hernigou, P., *Bone transplantation and tissue engineering, part IV. Mesenchymal stem cells: history in orthopedic surgery from Cohnheim and Goujon to the Nobel Prize of Yamanaka*. Int Orthop, 2015. **39**(4): p. 807-17.
35. Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, II, and K.V. Petrakova, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. J Embryol Exp Morphol, 1966. **16**(3): p. 381-90.
36. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet, 1970. **3**(4): p. 393-403.
37. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhyan, and U.V. Gerasimov, *Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers*. Cell Tissue Kinet, 1987. **20**(3): p. 263-72.
38. Owen, M., *Marrow stromal stem cells*. J Cell Sci Suppl, 1988. **10**: p. 63-76.
39. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
40. Pittenger, M.F., A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, and D.R. Marshak, *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
41. Okolicsanyi, R.K., E.T. Camilleri, L.E. Oikari, C. Yu, S.M. Cool, A.J. van Wijnen, L.R. Griffiths, and L.M. Haupt, *Human Mesenchymal Stem Cells Retain Multilineage Differentiation Capacity Including Neural Marker Expression after Extended In Vitro Expansion*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0137255.
42. Horwitz, E.M., K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C. Marini, R.J. Deans, D.S. Krause, and A. Keating, *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2005. **7**(5): p. 393-5.
43. Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz, *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
44. Keating, A., *Mesenchymal stromal cells: new directions*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(6): p. 709-16.
45. da Silva Meirelles, L., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi, *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 11): p. 2204-13.
46. Crisan, M., S. Yap, L. Casteilla, C.W. Chen, M. Corselli, T.S. Park, G. Andriolo, B. Sun, B. Zheng, L. Zhang, C. Norotte, P.N. Teng, J. Traas, R. Schugar, B.M. Deasy, S. Badylak, H.J. Buhring, J.P. Giacobino, L. Lazzari, J. Huard, and B. Peault, *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 301-13.
47. Blocki, A., Y. Wang, M. Koch, P. Peh, S. Beyer, P. Law, J. Hui, and M. Raghunath, *Not all MSCs can act as pericytes: functional in vitro assays to distinguish pericytes from other mesenchymal stem cells in angiogenesis*. Stem Cells Dev, 2013. **22**(17): p. 2347-55.
48. Singer, N.G. and A.I. Caplan, *Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 457-78.
49. Zuk, P.A., M. Zhu, P. Ashjian, D.A. De Ugarte, J.I. Huang, H. Mizuno, Z.C. Alfonso, J.K. Fraser, P. Benhaim, and M.H. Hedrick, *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
50. Zuk, P.A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J.W. Futrell, A.J. Katz, P. Benhaim, H.P. Lorenz, and M.H. Hedrick, *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-28.
51. Bourin, P., B.A. Bunnell, L. Casteilla, M. Dominici, A.J. Katz, K.L. March, H. Redl, J.P. Rubin, K. Yoshimura, and J.M. Gimble, *Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)*. Cytotherapy, 2013. **15**(6): p. 641-8.

52. Safford, K.M., K.C. Hicok, S.D. Safford, Y.D. Halvorsen, W.O. Wilkison, J.M. Gimble, and H.E. Rice, *Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(2): p. 371-9.
53. Seo, M.J., S.Y. Suh, Y.C. Bae, and J.S. Jung, *Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(1): p. 258-64.
54. Zuk, P.A., *The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(11): p. 1783-7.
55. Barba, M., C. Cicione, C. Bernardini, F. Michetti, and W. Lattanzi, *Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: state of the art*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 416391.
56. Wagoner Johnson, A.J. and B.A. Herschler, *A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair*. Acta Biomater, 2011. **7**(1): p. 16-30.
57. Polo-Corrales, L., M. Latorre-Esteves, and J.E. Ramirez-Vick, *Scaffold design for bone regeneration*. J Nanosci Nanotechnol, 2014. **14**(1): p. 15-56.
58. Hollister, S.J., *Porous scaffold design for tissue engineering*. Nat Mater, 2005. **4**(7): p. 518-24.
59. Velasco, M.A., C.A. Narvaez-Tovar, and D.A. Garzon-Alvarado, *Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 729076.
60. Thavornnyutikarn, B., N. Chantarapanich, K. Sitthiseripratip, G.A. Thouas, and Q. Chen, *Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques*. Prog Biomater, 2014. **3**: p. 61-102.
61. Fakhry, M., E. Hamade, B. Badran, R. Buchet, and D. Magne, *Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts*. World J Stem Cells, 2013. **5**(4): p. 136-48.
62. Ross, C.L., M. Siriwardane, G. Almeida-Porada, C.D. Porada, P. Brink, G.J. Christ, and B.S. Harrison, *The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation*. Stem Cell Res, 2015. **15**(1): p. 96-108.
63. Yourek, G., S.M. McCormick, J.J. Mao, and G.C. Reilly, *Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Regen Med, 2010. **5**(5): p. 713-24.
64. Engler, A.J., S. Sen, H.L. Sweeney, and D.E. Discher, *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*. Cell, 2006. **126**(4): p. 677-89.
65. Urist, M.R., *Bone: formation by autoinduction*. Science, 1965. **150**(3698): p. 893-9.
66. Urist, M.R. and B.S. Strates, *Bone morphogenetic protein*. J Dent Res, 1971. **50**(6): p. 1392-406.
67. Carreira, A.C., G.G. Alves, W.F. Zambuzzi, M.C. Sogayar, and J.M. Granjeiro, *Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications*. Arch Biochem Biophys, 2014. **561**: p. 64-73.
68. Oryan, A., S. Alidadi, A. Moshiri, and A. Bigham-Sadegh, *Bone morphogenetic proteins: a powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations*. Biofactors, 2014. **40**(5): p. 459-81.
69. Carreira, A.C., F.H. Lojudice, E. Halcsik, R.D. Navarro, M.C. Sogayar, and J.M. Granjeiro, *Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives*. J Dent Res, 2014. **93**(4): p. 335-45.
70. Zhang, W., C. Zhu, Y. Wu, D. Ye, S. Wang, D. Zou, X. Zhang, D.L. Kaplan, and X. Jiang, *VEGF and BMP-2 promote bone regeneration by facilitating bone marrow stem cell homing and differentiation*. Eur Cell Mater, 2014. **27**: p. 1-11; discussion 11-2.
71. Wozney, J.M., V. Rosen, A.J. Celeste, L.M. Mitsock, M.J. Whitters, R.W. Kriz, R.M. Hewick, and E.A. Wang, *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. Science, 1988. **242**(4885): p. 1528-34.
72. Bessho, K., K. Kusumoto, K. Fujimura, Y. Konishi, Y. Ogawa, Y. Tani, and T. Iizuka, *Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein*. Br J Oral Maxillofac Surg, 1999. **37**(1): p. 2-5.
73. McKay, W.F., S.M. Peckham, and J.M. Badura, *A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft)*. Int Orthop, 2007. **31**(6): p. 729-34.
74. Bessa, P.C., M. Casal, and R.L. Reis, *Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery)*. J Tissue Eng Regen Med, 2008. **2**(2-3): p. 81-96.
75. Ong, K.L., M.L. Villarraga, E. Lau, L.Y. Carreon, S.M. Kurtz, and S.D. Glassman, *Off-label use of bone morphogenetic proteins in the United States using administrative data*. Spine (Phila Pa 1976), 2010. **35**(19): p. 1794-800.
76. Boraiah, S., O. Paul, D. Hawkes, M. Wickham, and D.G. Lorch, *Complications of recombinant human BMP-2 for treating complex tibial plateau fractures: a preliminary report*. Clin Orthop Relat Res, 2009. **467**(12): p. 3257-62.

77. Shields, L.B., G.H. Raque, S.D. Glassman, M. Campbell, T. Vitaz, J. Harpring, and C.B. Shields, *Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion*. Spine (Phila Pa 1976), 2006. **31**(5): p. 542-7.
78. Cahill, K.S., J.H. Chi, A. Day, and E.B. Claus, *Prevalence, complications, and hospital charges associated with use of bone-morphogenetic proteins in spinal fusion procedures*. Jama, 2009. **302**(1): p. 58-66.
79. Ronga, M., A. Fagetti, G. Canton, E. Paiusco, M.F. Surace, and P. Cherubino, *Clinical applications of growth factors in bone injuries: experience with BMPs*. Injury, 2013. **44 Suppl 1**: p. S34-9.
80. Dai, J., L. Li, C. Jiang, C. Wang, H. Chen, and Y. Chai, *Bone Morphogenetic Protein for the Healing of Tibial Fracture: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0141670.
81. Hollister, S.J. and W.L. Murphy, *Scaffold translation: barriers between concept and clinic*. Tissue Eng Part B Rev, 2011. **17**(6): p. 459-74.
82. Amini, A.R., C.T. Laurencin, and S.P. Nukavarapu, *Bone tissue engineering: recent advances and challenges*. Crit Rev Biomed Eng, 2012. **40**(5): p. 363-408.
83. Mesimaki, K., B. Lindroos, J. Tornwall, J. Mauno, C. Lindqvist, R. Kontio, S. Miettinen, and R. Suuronen, *Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2009. **38**(3): p. 201-9.
84. Sandor, G.K., J. Numminen, J. Wolff, T. Thesleff, A. Miettinen, V.J. Tuovinen, B. Mannerstrom, M. Patrikoski, R. Seppanen, S. Miettinen, M. Rautiainen, and J. Ohman, *Adipose stem cells used to reconstruct 13 cases with cranio-maxillofacial hard-tissue defects*. Stem Cells Transl Med, 2014. **3**(4): p. 530-40.
85. Cordonnier, T., P. Layrolle, J. Gaillard, A. Langonne, L. Sensebe, P. Rosset, and J. Sohier, *3D environment on human mesenchymal stem cells differentiation for bone tissue engineering*. J Mater Sci Mater Med, 2010. **21**(3): p. 981-7.
86. Varas, L., L.B. Ohlsson, G. Honeth, A. Olsson, T. Bengtsson, C. Wiberg, R. Bockermann, S. Jarnum, J. Richter, D. Pennington, B. Johnstone, E. Lundgren-Akerlund, and C. Kjellman, *Alpha10 integrin expression is up-regulated on fibroblast growth factor-2-treated mesenchymal stem cells with improved chondrogenic differentiation potential*. Stem Cells Dev, 2007. **16**(6): p. 965-78.
87. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman, *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. Research0034.
88. Pauly, S., F. Klatte, C. Strobel, G. Schmidmaier, S. Greiner, M. Scheibel, and B. Wildemann, *Characterization of tendon cell cultures of the human rotator cuff*. Eur Cell Mater, 2010. **20**: p. 84-97.
89. Thasler, W.E., T.S. Weiß, K. Schillhorn, B. Irrgang, and K.W. Jauch, *Die Verwendung menschlichen Gewebes in der Forschung*. Dtsch med Wochenschr, 2002. **127**(25/26): p. 1397-1400.
90. Ishiyama, M., M. Shiga, K. Sasamoto, M. Mizoguchi, and P.-g. He, *A New Sulfonated Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye*. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 1993. **41**(6): p. 1118-1122.
91. Ishiyama M., T.H., Shiga M., Sasamoto K., Ohkura Y., Ueno K., Watanabe M., *Novel Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Using a Tetrazolium Salt That Produces a Water-Soluble Formazan Dye*. In Vitro Toxicology, 1995. **8**(2): p. 187-190.
92. Dragan, A.I., J.R. Casas-Finet, E.S. Bishop, R.J. Strouse, M.A. Schenerman, and C.D. Geddes, *Characterization of PicoGreen interaction with dsDNA and the origin of its fluorescence enhancement upon binding*. Biophys J, 2010. **99**(9): p. 3010-9.
93. Arya, M., I.S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, and H.R. Patel, *Basic principles of real-time quantitative PCR*. Expert Rev Mol Diagn, 2005. **5**(2): p. 209-19.
94. Welsch, U., *Begriffe und Methodik*, in *Lehrbuch Histologie*, U. Welsch and W. Kummer, Editors. 2014, Elsevier, Urban & Fischer: München. p. 1-11.
95. Junqueira, L.C., G. Bignolas, and R.R. Brentani, *Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections*. Histochem J, 1979. **11**(4): p. 447-55.
96. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method*. Nat. Protocols, 2008. **3**(6): p. 1101-1108.
97. Baer, P.C., S. Kuci, M. Krause, Z. Kuci, S. Zielen, H. Geiger, P. Bader, and R. Schubert, *Comprehensive phenotypic characterization of human adipose-derived stromal/stem cells and their subsets by a high throughput technology*. Stem Cells Dev, 2013. **22**(2): p. 330-9.
98. Baer, P.C. and H. Geiger, *Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity*. Stem Cells Int, 2012. **2012**: p. 812693.

99. Mitchell, J.B., K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett, Z.E. Floyd, A. Kloster, Y. Di Halvorsen, R.W. Storms, B. Goh, G. Kilroy, X. Wu, and J.M. Gimble, *Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers*. *Stem Cells*, 2006. **24**(2): p. 376-85.
100. Baer, P.C., *Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro*. *World J Stem Cells*, 2014. **6**(3): p. 256-65.
101. Yu, G., X. Wu, M.A. Dietrich, P. Polk, L.K. Scott, A.A. Ptitsyn, and J.M. Gimble, *Yield and characterization of subcutaneous human adipose-derived stem cells by flow cytometric and adipogenic mRNA analyzes*. *Cytotherapy*, 2010. **12**(4): p. 538-46.
102. Neve, A., A. Corrado, and F.P. Cantatore, *Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects*. *J Cell Physiol*, 2013. **228**(6): p. 1149-53.
103. Li, T., L. Ni, X. Liu, Z. Wang, and C. Liu, *High glucose induces the expression of osteopontin in blood vessels in vitro and in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. **480**(2): p. 201-207.
104. Ravindran, S. and A. George, *Dentin Matrix Proteins in Bone Tissue Engineering*. *Adv Exp Med Biol*, 2015. **881**: p. 129-42.
105. Reznikoff, C.A., D.W. Brankow, and C. Heidelberger, *Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division*. *Cancer Res*, 1973. **33**(12): p. 3231-8.
106. Siyam, A., S. Wang, C. Qin, G. Mues, R. Stevens, R.N. D'Souza, and Y. Lu, *Nuclear localization of DMP1 proteins suggests a role in intracellular signaling*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **424**(3): p. 641-6.
107. Tao, K., D. Xiao, J. Weng, A. Xiong, B. Kang, and H. Zeng, *Berberine promotes bone marrow-derived mesenchymal stem cells osteogenic differentiation via canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway*. *Toxicol Lett*, 2016. **240**(1): p. 68-80.
108. Haasters, F., W.C. Prall, D. Anz, C. Bourquin, C. Pautke, S. Endres, W. Mutschler, D. Docheva, and M. Schieker, *Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing*. *J Anat*, 2009. **214**(5): p. 759-67.
109. Poole, K.E., R.L. van Bezooijen, N. Loveridge, H. Hamersma, S.E. Papapoulos, C.W. Lowik, and J. Reeve, *Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation*. *Faseb j*, 2005. **19**(13): p. 1842-4.
110. Song, L. and R.S. Tuan, *Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow*. *Faseb j*, 2004. **18**(9): p. 980-2.
111. Muraglia, A., R. Cancedda, and R. Quarto, *Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model*. *J Cell Sci*, 2000. **113** (Pt 7): p. 1161-6.
112. Sarugaser, R., L. Hanoun, A. Keating, W.L. Stanford, and J.E. Davies, *Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy*. *PLoS One*, 2009. **4**(8): p. e6498.
113. Walmsley, G.G., D.A. Atashroo, Z.N. Maan, M.S. Hu, E.R. Zielins, J.M. Tsai, D. Duscher, K. Paik, R. Tevlin, O. Marecic, D.C. Wan, G.C. Gurtner, and M.T. Longaker, *High-Throughput Screening of Surface Marker Expression on Undifferentiated and Differentiated Human Adipose-Derived Stromal Cells*. *Tissue Eng Part A*, 2015. **21**(15-16): p. 2281-91.
114. Ogawa, R., H. Mizuno, A. Watanabe, M. Migita, T. Shimada, and H. Hyakusoku, *Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **313**(4): p. 871-7.
115. de Girolamo, L., M.F. Sartori, W. Albisetti, and A.T. Brini, *Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007. **1**(2): p. 154-7.
116. Dudakovic, A., E. Camilleri, S.M. Riester, E.A. Lewallen, S. Kvasha, X. Chen, D.J. Radel, J.M. Anderson, A.A. Nair, J.M. Evans, A.J. Krych, J. Smith, D.R. Deyle, J.L. Stein, G.S. Stein, H.J. Im, S.M. Cool, J.J. Westendorf, S. Kakar, A.B. Dietz, and A.J. van Wijnen, *High-resolution molecular validation of self-renewal and spontaneous differentiation in clinical-grade adipose-tissue derived human mesenchymal stem cells*. *J Cell Biochem*, 2014. **115**(10): p. 1816-28.
117. Dorozhkin, S.V., *Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates*. *Acta Biomaterialia*, 2012. **8**(3): p. 963-977.
118. Livingston, T.L., S. Gordon, M. Archambault, S. Kadiyala, K. McIntosh, A. Smith, and S.J. Peter, *Mesenchymal stem cells combined with biphasic calcium phosphate ceramics promote bone regeneration*. *J Mater Sci Mater Med*, 2003. **14**(3): p. 211-8.

119. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. *Biomaterials*, 2005. **26**(27): p. 5474-91.
120. Langenbach, F. and J. Handschel, *Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro*. *Stem Cell Res Ther*, 2013. **4**(5): p. 117.
121. Vanhatupa, S., M. Ojansivu, R. Autio, M. Juntunen, and S. Miettinen, *Bone Morphogenetic Protein-2 Induces Donor-Dependent Osteogenic and Adipogenic Differentiation in Human Adipose Stem Cells*. *Stem Cells Transl Med*, 2015. **4**(12): p. 1391-402.
122. Ruijtenberg, S. and S. van den Heuvel, *Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression*. *Cell Cycle*, 2016. **15**(2): p. 196-212.
123. Agathocleous, M. and W.A. Harris, *Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation*. *Trends Cell Biol*, 2013. **23**(10): p. 484-92.
124. Kockx, M., L. McCabe, J.L. Stein, J.B. Lian, and G.S. Stein, *Influence of DNA replication inhibition on expression of cell growth and tissue-specific genes in osteoblasts and osteosarcoma cells*. *J Cell Biochem*, 1994. **54**(1): p. 47-55.
125. Liu, F., L. Malaval, A.K. Gupta, and J.E. Aubin, *Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level*. *Dev Biol*, 1994. **166**(1): p. 220-34.
126. Pavlin, D., R. Zadro, and J. Gluhak-Heinrich, *Temporal Pattern of Stimulation of Osteoblast-Associated Genes During Mechanically-Induced Osteogenesis In Vivo: Early Responses of Osteocalcin and Type I Collagen*. *Connective Tissue Research*, 2001. **42**(2): p. 135-148.
127. Samavedi, S., A.R. Whittington, and A.S. Goldstein, *Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior*. *Acta Biomaterialia*, 2013. **9**(9): p. 8037-8045.
128. Lobo, S.E., R. Glickman, W.N. da Silva, T.L. Arinze, and I. Kerkis, *Response of stem cells from different origins to biphasic calcium phosphate bioceramics*. *Cell Tissue Res*, 2015. **361**(2): p. 477-95.
129. Aubin, J.E., F. Liu, L. Malaval, and A.K. Gupta, *Osteoblast and chondroblast differentiation*. *Bone*, 1995. **17**(2 Suppl): p. 77s-83s.
130. Rodan, G.A. and M. Noda, *Gene expression in osteoblastic cells*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 1991. **1**(2): p. 85-98.
131. Millan, J.L., *The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization*. *Calcif Tissue Int*, 2013. **93**(4): p. 299-306.
132. Weinreb, M., D. Shinar, and G.A. Rodan, *Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization*. *J Bone Miner Res*, 1990. **5**(8): p. 831-42.
133. Soltanoff, C.S., S. Yang, W. Chen, and Y.P. Li, *Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2009. **19**(1): p. 1-46.
134. Zhu, L. and A.I. Skoultchi, *Coordinating cell proliferation and differentiation*. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. **11**(1): p. 91-7.
135. Stein, G.S., J.B. Lian, L.G. Gerstenfeld, V. Shalhoub, M. Aronow, T. Owen, and E. Markose, *The onset and progression of osteoblast differentiation is functionally related to cellular proliferation*. *Connect Tissue Res*, 1989. **20**(1-4): p. 3-13.
136. Montes, G.S. and L.C. Junqueira, *The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1991. **86 Suppl 3**: p. 1-11.
137. Lattouf, R., R. Younes, D. Lutomski, N. Naaman, G. Godeau, K. Senni, and S. Changotade, *Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues*. *J Histochem Cytochem*, 2014. **62**(10): p. 751-8.
138. Gerstenfeld, L.C., S.D. Chipman, C.M. Kelly, K.J. Hodgens, D.D. Lee, and W.J. Landis, *Collagen expression, ultrastructural assembly, and mineralization in cultures of chicken embryo osteoblasts*. *J Cell Biol*, 1988. **106**(3): p. 979-89.
139. Owen, T.A., M. Aronow, V. Shalhoub, L.M. Barone, L. Wilming, M.S. Tassinari, M.B. Kennedy, S. Pockwinse, J.B. Lian, and G.S. Stein, *Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix*. *J Cell Physiol*, 1990. **143**(3): p. 420-30.
140. Egusa, H., K. Iida, M. Kobayashi, T.Y. Lin, M. Zhu, P.A. Zuk, C.J. Wang, D.K. Thakor, M.H. Hedrick, and I. Nishimura, *Downregulation of extracellular matrix-related gene clusters during osteogenic differentiation of human bone marrow- and adipose tissue-derived stromal cells*. *Tissue Eng*, 2007. **13**(10): p. 2589-600.

141. Aubin, J.E. and K. Turksen, *Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblast lineage*. *Microsc Res Tech*, 1996. **33**(2): p. 128-40.
142. Toyosawa, S., S. Shintani, T. Fujiwara, T. Ooshima, A. Sato, N. Ijuhin, and T. Komori, *Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts*. *J Bone Miner Res*, 2001. **16**(11): p. 2017-26.
143. Feng, J.Q., J. Zhang, S.L. Dallas, Y. Lu, S. Chen, X. Tan, M. Owen, S.E. Harris, and M. Macdougall, *Dentin Matrix Protein 1, a Target Molecule for Cbfa1 in Bone, Is a Unique Bone Marker Gene*. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002. **17**(10): p. 1822-1831.
144. Feng, J.Q., H. Huang, Y. Lu, L. Ye, Y. Xie, T.W. Tsutsui, T. Kunieda, T. Castranio, G. Scott, L.B. Bonewald, and Y. Mishina, *The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development*. *J Dent Res*, 2003. **82**(10): p. 776-80.
145. Gluhak-Heinrich, J., L. Ye, L.F. Bonewald, J.Q. Feng, M. MacDougall, S.E. Harris, and D. Pavlin, *Mechanical loading stimulates dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in osteocytes in vivo*. *J Bone Miner Res*, 2003. **18**(5): p. 807-17.
146. Delorme, B., J. Ringe, N. Gallay, Y. Le Vern, D. Kerboeuf, C. Jorgensen, P. Rosset, L. Sensebe, P. Layrolle, T. Haupl, and P. Charbord, *Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells*. *Blood*, 2008. **111**(5): p. 2631-5.
147. Barbara, N.P., J.L. Wrana, and M. Letarte, *Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(2): p. 584-94.
148. Guerrero-Esteo, M., T. Sanchez-Elsner, A. Letamendia, and C. Bernabeu, *Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(32): p. 29197-209.
149. Alam, I., I. Asahina, K. Ohmamiuda, and S. Enomoto, *Comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics impregnated with rhBMP-2 as bone substitutes*. *J Biomed Mater Res*, 2001. **54**(1): p. 129-38.
150. Dragoo, J.L., J.Y. Choi, J.R. Lieberman, J. Huang, P.A. Zuk, J. Zhang, M.H. Hedrick, and P. Benhaim, *Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat*. *J Orthop Res*, 2003. **21**(4): p. 622-9.
151. Panetta, N.J., D.M. Gupta, J.K. Lee, D.C. Wan, G.W. Commons, and M.T. Longaker, *Human adipose-derived stromal cells respond to and elaborate bone morphogenetic protein-2 during in vitro osteogenic differentiation*. *Plast Reconstr Surg*, 2010. **125**(2): p. 483-93.
152. Cruz, A.C., M.L. Silva, T. Caon, and C.M. Simoes, *Addition of bone morphogenetic protein type 2 to ascorbate and beta-glycerophosphate supplementation did not enhance osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells*. *J Appl Oral Sci*, 2012. **20**(6): p. 628-35.
153. Chou, Y.F., P.A. Zuk, T.L. Chang, P. Benhaim, and B.M. Wu, *Adipose-derived stem cells and BMP2: part 1. BMP2-treated adipose-derived stem cells do not improve repair of segmental femoral defects*. *Connect Tissue Res*, 2011. **52**(2): p. 109-18.
154. Zuk, P., Y.F. Chou, F. Mussano, P. Benhaim, and B.M. Wu, *Adipose-derived stem cells and BMP2: part 2. BMP2 may not influence the osteogenic fate of human adipose-derived stem cells*. *Connect Tissue Res*, 2011. **52**(2): p. 119-32.
155. Tirkkonen, L., S. Haimi, S. Huttunen, J. Wolff, E. Pirhonen, G.K. Sandor, and S. Miettinen, *Osteogenic medium is superior to growth factors in differentiation of human adipose stem cells towards bone-forming cells in 3D culture*. *Eur Cell Mater*, 2013. **25**: p. 144-58.
156. Riis, S., V. Zachar, S. Boucher, M.C. Vemuri, C.P. Pennisi, and T. Fink, *Critical steps in the isolation and expansion of adipose-derived stem cells for translational therapy*. *Expert Rev Mol Med*, 2015. **17**: p. e11.
157. Oberbauer, E., C. Steffenhagen, C. Wurzer, C. Gabriel, H. Redl, and S. Wolbank, *Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art*. *Cell Regen (Lond)*, 2015. **4**: p. 7.
158. Patrikoski, M., M. Juntunen, S. Boucher, A. Campbell, M.C. Vemuri, B. Mannerstrom, and S. Miettinen, *Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells*. *Stem Cell Res Ther*, 2013. **4**(2): p. 27.
159. Rauh, J., F. Milan, K.P. Gunther, and M. Stiehler, *Bioreactor systems for bone tissue engineering*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2011. **17**(4): p. 263-80.
160. Schmidt-Bleek, K., B.M. Willie, P. Schwabe, P. Seemann, and G.N. Duda, *BMPs in bone regeneration: Less is more effective, a paradigm-shift*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015.
161. Lieberman, J.R., A. Daluiski, S. Stevenson, L. Wu, P. McAllister, Y.P. Lee, J.M. Kabo, G.A. Finerman, A.J. Berk, and O.N. Witte, *The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing*

- bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats.* J Bone Joint Surg Am, 1999. **81**(7): p. 905-17.
162. Zhu, C., Q. Chang, D. Zou, W. Zhang, S. Wang, J. Zhao, W. Yu, X. Zhang, Z. Zhang, and X. Jiang, *LvBMP-2 gene-modified BMSCs combined with calcium phosphate cement scaffolds for the repair of calvarial defects in rats.* J Mater Sci Mater Med, 2011. **22**(8): p. 1965-73.
163. Peterson, B., J. Zhang, R. Iglesias, M. Kabo, M. Hedrick, P. Benhaim, and J.R. Lieberman, *Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue.* Tissue Eng, 2005. **11**(1-2): p. 120-9.
164. Noël, D., D. Gazit, C. Bouquet, F. Apparailly, C. Bony, P. Ponce, V. Millet, G. Turgeman, M. Perricaudet, J. Sany, and C. Jorgensen, *Short-Term BMP-2 Expression Is Sufficient for In Vivo Osteochondral Differentiation of Mesenchymal Stem Cells.* STEM CELLS, 2004. **22**(1): p. 74-85.
165. Overman, J.R., E. Farre-Guasch, M.N. Helder, C.M. ten Bruggenkate, E.A. Schulten, and J. Klein-Nulend, *Short (15 minutes) bone morphogenetic protein-2 treatment stimulates osteogenic differentiation of human adipose stem cells seeded on calcium phosphate scaffolds in vitro.* Tissue Eng Part A, 2013. **19**(3-4): p. 571-81.
166. Peltola, S.M., F.P. Melchels, D.W. Grijpma, and M. Kellomaki, *A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes.* Ann Med, 2008. **40**(4): p. 268-80.
167. Auger, F.A., L. Gibot, and D. Lacroix, *The pivotal role of vascularization in tissue engineering.* Annu Rev Biomed Eng, 2013. **15**: p. 177-200.

8 DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gebührt Herrn Prof. Müller für die Ermöglichung der Dissertation über dieses spannende Thema und die Begutachtung meiner Arbeit.

Für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit sowie die Hilfestellung bei allen Fragen bedanke ich mich vielmals bei Frau Dr. Maryna Bondarava. Es war mir eine große Freude!

Mein besonderer Dank gilt auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für Biomechanik und experimentelle Orthopädie für die Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und eine schöne Zeit im Labor.

Für die Bereitstellung der Scaffolds danke ich Herrn Seitz und dem Team des Friedrich-Baur BioMed Centers.

Mein Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Gewebebank für die Bereitstellung der Gewebeproben.

Ich danke der Friedrich-Baur-Stiftung für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Dem Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Betreuung und finanzielle Unterstützung.

9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Eidesstattliche Versicherung

Wiedenmann Theresa Luise

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Humane ASCs auf biphasischen Kalziumphosphat-Scaffolds als potentielles Knochenersatzmaterial

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, 05.08.2017

Theresa Luise Wiedenmann