

Aus der Klinik für Allgemeine, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Böcker

**OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG VON HUMANEN
MESENCHYMALEN STAMMZELLEN IN THERMORESPONSIVEN
PLURONIC® P123 – HYDROGELEN MIT OSTEOINDUKTION
DURCH DEN WACHSTUMSFAKTOR RHBMP-7**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Claudia Catrine Jedelhauser

aus Marktoberdorf

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Schieker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Susanne Mayer

PD Dr. Wenko Smolka

Mitbetreuung durch die

promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. biol. hum. Ines Westphal

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

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2018

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen in thermoresponsiven Pluronic® P123 – Hydrogelen mit Osteoinduktion durch den Wachstumsfaktor rhBMP-7“

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.

Meinen Eltern **GUNDI UND MANFRED**

In Liebe und Dankbarkeit

Zusammenfassung

Einleitung:

Die Entwicklung moderner Therapien zur Frakturversorgung, als Alternative zum Goldstandard der autologen Knochentransplantate, stellt ein zentrales Thema der Regenerativen Medizin dar. Vielversprechende Materialien sind thermoresponsive Hydrogele, z.B. Pluronic® P123, die mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) besiedelt werden. Zur Osteoinduktion können Wachstumsfaktoren, z.B. rhBMP-7, beitragen. Ziel der Dissertation war die osteogene Differenzierung von hMSC in mit Poly(etherurethan) kettenverlängertem Pluronic® P123 (HDI-, BDI-Hydrogel). Daneben wurde der Einfluss von Kollagen I auf das Zellüberleben sowie der Effekt von rhBMP-7 auf die Osteoinduktion der hMSC analysiert.

Material und Methoden:

Pluronic® P123 wurden auf Eis mit 20 % Kollagen I modifiziert und mit 5×10^5 hMSC besiedelt. Die Mizellenbildung erfolgte bei 37 °C. Zellüberleben und Morphologie im Hydrogel wurden durch WST-Assay und Lebend-Tot-Färbung untersucht. Die Quantifizierung der Osteogenese durch osteogenes Differenzierungsmedium und additiver Stimulation durch rhBMP-7 erfolgte, neben Alizarin-Rot-Assay und ALP-Assay, durch histologische Färbungen von Kryoschnitten sowie Genexpressionsprofilen.

Ergebnisse:

Das Zellüberleben nahm über 21 Tage ab, wobei die Viabilität durch 20 % Kollagen I signifikant höher war. Die hMSC zeigten im Hydrogel dreidimensionale Zellsphäroide. Das BDI-Hydrogel lieferte dabei im Vergleich bessere Resultate hinsichtlich Zellviabilität als das HDI-Hydrogel. Die im 80 % BDI-Hydrogel angesiedelten hMSC konnten nach 25 Tagen Stimulation erfolgreich osteogen differenziert werden. Durch rhBMP-7 (100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml) wurde die Osteogenese gesteigert.

Diskussion:

Die Besonderheit in der praktischen Arbeit mit Pluronic® P123 lag in seinem temperaturabhängigen Phasenzustand, sowie seiner Mizellenstruktur. Zur osteogenen Differenzierung wurden die Bedingungen im Hydrogel optimiert. Die Bereitstellung von Zelladhäsionssequenzen durch 20 % Kollagen I resultierte in einem signifikant höheren Zellüberleben. Alle Nachweismethoden zeigten eine erfolgreiche osteogene Differenzierung der hMSC im Vergleich zur Negativkontrolle. Durch rhBMP-7 konnte die Osteogenese signifikant gesteigert werden. Die Konzentration von 250 ng/ml rhBMP-7 war am effizientesten.

Schlussfolgerung und Ausblick:

Das thermoresponsive BDI-Hydrogel bietet nach Modifikation mit Kollagen I ein vielversprechendes Material für das *Tissue Engineering* von Knochengewebe. Durch die Stimulation mit rhBMP-7 kann der Effekt der osteogenen Differenzierung signifikant gesteigert werden. Weitere Meilensteine in der Entwicklung dieses Hydrogels könnte die Induktion der Angiogenese zur Vaskularisation des Gewebes sowie *in vivo* Versuche sein. Daneben könnte das Pluronic® P123 auch als reiner Pharmakonträger von z.B. rhBMP-7 eingesetzt werden.

Summary

Introduction:

A central issue of regenerative medicine is the development of modern therapies for fracture management as an alternative to autografts. Promising materials are thermoresponsive hydrogels, as pluronic® P123. These materials are seeded with human mesenchymal stem cells (hMSC). For osteoinduction of these cells growth factors, as rhBMP-7, are used. The aim of this dissertation was the osteogenic differentiation of hMSC seeded pluronic® P123, which is chain extended by poly(etherurethans) (HDI-, BDI-hydrogel). Additionally the influence of modification with collagen I on cell viability and the effect of rhBMP-7 on osteoinduction of hMSC was analyzed.

Materials and methods:

Pluronic® P123 was modified with 20 % collagen I on ice and seeded with 5×10^5 hMSC. At 37 °C the hydrogel organized to micelles. Cell viability and morphology in the hydrogel were analyzed by WST assay and live-dead assay. The osteogenic differentiation by osteogenic differentiation media and additive stimulation with rhBMP-7 was quantified by alizarin red assay, ALP assay and also staining of cryohistology and gene expression profiles.

Results:

Cell survival decreased over 21 days. Modification with 20 % collagen I resulted in a significant higher viability. The cells organized to three-dimensional spheroids in the hydrogel. In comparison to the HDI hydrogel, the BDI hydrogel showed a better cell viability. The hMSC, seeded at 80 % BDI hydrogel, resulted in an osteogenic differentiation after incubation with osteogenic differentiation media over 25 days. By additionally stimulation with rhBMP-7 (100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml) the osteogenesis was increased significantly.

Discussion:

Application of pluronic® P123 prepared some specificities because of its temperature-responsive phase and its micelles. For osteogenic differentiation the conditions in the hydrogel were improved. The cell viability was improved by providing cell adhesion domains by 20 % collagen I. Every method showed a successful osteogenic differentiation of hMSC in comparison to the negative control. Stimulation with rhBMP-7 increased the osteogenesis significantly. The concentration of 250 ng/ml rhBMP-7 was most efficient.

Conclusion and outlook:

The thermoresponsive BDI hydrogel with 20 % collagen I is a promising material of tissue engineering of bone. Stimulation with rhBMP-7 can increase the effect of osteogenic differentiation significantly. Further steps in the development of this hydrogel could be the induction of angiogenesis for vascularization of the tissue as well as in vivo experiments. Also pluronic® P123 could be used as carrier for drugs, as rhBMP-7.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ActR	Aktivin-Rezeptor
ADSC	adipose-derived stem cells
ALK	Aktivin-Rezeptor-like Kinase
ALP	Alkalische Phosphatase
Aqua_{dest.}	destilliertes Wasser
BDI	1,4-Butan-diisocyanat
BMP	bone morphogenetic protein
BMSC	bone marrow-derived stem cells
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CHO	Eizellen des chinesischen Hamsters
CFU	colony forming units
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLSM	Konfokales Laser-Rastermikroskop
DBM	demineralisierte Knochenmatrix

DGEA	Aspartat–Glycin–Glutamat–Alanin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
ESC	embryonale Stammzellen
FBS	fetales bovines Serum
FDA	Federal Drug Administration
FGF	fibroblastic growth factor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFOGER	Glycin-Phenylalanin-Hydroxyprolin-Glycin-Glutamat-Arginin
HDI	1,6-Hexamethylen-diisocyanat
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
HPMC	Hydroxypropyl-Methylcellulose
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase

IGF	insulin-like growth factor
I-Smad	inhibitorisches Smad
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
LCST	lower critical sensitive temperature
MAPK	mitogen aktivierter Proteinkinase
MEM α	minimal essential medium α
MSC	mesenchymale Stammzellen
OM	osteogenes Differenzierungsmedium
OP-1	osteogenic protein-1, BMP-7
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung
PD	Populationsverdoppelungen
PDGF	platelet-derived growth factor
PEG	Poly(ethylenglykol)
PEO	Poly(ethylenoxid)
Pluronic®	Poloxamer, Triblock-Copolymer aus PEO – PPO – PEO
PNiPAAM	Poly(N-isopropylacrylamid)
PPO	Poly(propylenoxid)

PVA	Poly(vinyl)alcohol
PSC	perivascular stem cells
RGD	Arginin – Glycin – Aspartat
rhBMP	rekombinantes humanes bone morphogenetic protein
rpm	Umdrehungen pro Minute
R-Smad	Rezeptor-reguliertes SMAD
RTQ-PCR	Real-Time-quantitative-PCR
Runx-2	CBFA-1
R-X-X-R	Arginin-x-x-Arginin, Schlüsselsequenz für BMP-Protein-Konvertase
SCP-1	single-cell picket one
TGF-β	transforming growth factor- β
Tsg	twisted gastrulation
UCST	upper critical sensitive temperature
VEGF	vascular endothelial growth factor
WST-1	water soluble tetrazolium 1
μCT	Mikro-Computertomographie
\emptyset OM	Standard-Nährmedium (Negativkontrolle)

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	10
1.1. VIELFÄLTIGE URSACHEN KOMPLIZIERTER FRAKTUREN	10
1.2. THERAPIESTRATEGIEN KOMPLIZIERTER FRAKTUREN	11
1.2.1. Autologe, allogene und xenogene Knochentransplantate	12
1.2.2. <i>Tissue Engineering</i> zur Entwicklung von Knochengewebe	12
1.3. STAND DER ENTWICKLUNG VON KNOCHENERSATZMATERIALIEN	14
1.3.1. Feststoffe als Knochenersatzmaterialien	14
1.3.2. Hydrogele als Knochenersatzmaterialien	15
1.3.2.1. <i>Biologische Hydrogele</i>	17
1.3.2.2. <i>Synthetische Hydrogele</i>	19
1.4. MESENCHYMALE STAMMZELLEN	22
1.5. WACHSTUMSFAKTOREN	24
1.6. ZENTRALE FRAGESTELLUNG	29
2. MATERIAL UND METHODEN.....	29
2.1 ZELLKULTUR	29
2.1.1 Humane mesenchymale Stammzellen.....	29
2.1.2 Methoden der Zellkultivierung.....	30
2.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen	31
2.2 THERMORESPONSIVES HYDROGEL	31
2.2.1 Herstellung des Hydrogels.....	31
2.2.2 Modifikation mit Kollagen I	32
2.2.3 Besiedlung der Hydrogele mit Zellen	32
2.3 OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG.....	33
2.3.1 Osteogenes Differenzierungsprotokoll	33
2.3.2 Stimulation durch rhBMP-7	34
2.4 ZELLÜBERLEBEN UND ZELLMORPHOLOGIE IM GEL	34
2.4.1 WST-1-Assay	34
2.4.2 Giemsa-Färbung	35

2.4.3	Live-Dead-Assay	36
2.4.4	Fluoreszenzmikroskopie	36
2.4.5	CLSM	36
2.5	NACHWEIS DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG	37
2.5.1	Direkter Nachweis osteogener Matrix und Enzyme.....	37
2.5.1.1	Alizarin-Rot-Assay	37
2.5.1.2	ALP-Aktivität-Assay	38
2.5.2	Histologischer Nachweis.....	39
2.5.2.1	Kryoeinbettung und Schneiden der Hydrogele.....	39
2.5.2.2	Von-Kossa-Färbung.....	39
2.5.2.3	Alizarin-Rot-Färbung.....	39
2.5.2.4	Mikroskopie und Quantifizierung der histologischen Färbung	39
2.5.3	Molekularbiologische Untersuchung der Osteogenese	40
2.5.3.1	RNA-Isolierung	40
2.5.3.2	cDNA-Synthese	40
2.5.3.3	Real-time quantitative Polymerase Kettenreaktion.....	41
2.6	STATISTIK	42
3.	ERGEBNISSE.....	43
3.1.	ZELLÜBERLEBEN UND MORPHOLOGIE IM HYDROGEL.....	43
3.1.1.	Zellüberlebensanalyse im HDI-Hydrogel und BDI-Hydrogel.....	43
3.1.2.	Morphologie der Zellen im Hydrogel	46
3.2.	OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG IN PLURONIC® P123	49
3.2.1.	Vergleich der Osteogenese im HDI-Hydrogel und BDI-Hydrogel	49
3.2.2.	Osteogene Differenzierung von primären MSC im BDI-Hydrogel.....	50
3.2.2.1.	Alizarin-Rot-Assay	50
3.2.2.2.	ALP-Aktivitäts-Assay	51
3.2.2.3.	Kryohistologische Untersuchung.....	51
3.2.2.4.	Genexpressionsanalyse nach Osteogenese.....	52
3.2.2.4.1.	Relative Genexpression von Osteopontin	53
3.2.2.4.2.	Relative Genexpression von ALP	54
3.2.2.4.3.	Relative Genexpression von Runx-2	55
3.2.3.	Osteoinduktion von hMSC im BDI-Hydrogel mittels rhBMP-7	56
3.2.3.1.	Alizarin-Rot-Assay	56
3.2.3.2.	ALP-Aktivität-Assay	57
3.2.3.3.	Kryohistologische Untersuchung.....	59
3.2.3.4.	Genexpressionsanalyse von Osteogenesemarkern.....	62

3.2.3.4.1.	<i>Relative Genexpression von Osteopontin</i>	62
3.2.3.4.2.	<i>Relative Genexpression von ALP</i>	63
3.2.3.4.3.	<i>Relative Genexpression von Runx-2</i>	64
3.3.	BESONDERHEITEN IN DER ANWENDUNG DES PLURONIC® P123	65
4.	DISKUSSION	67
4.1.	ANWENDUNGSFREUNDLICHKEIT DES PLURONIC® P123.....	67
4.1.1.	Thermoresponsive Hydrogele in der Praxis	67
4.1.2.	Einfluss der Mizellenstruktur auf Nachweismethoden	68
4.1.3.	Pluronic-Hydrogele in der histologischen Beurteilung	68
4.1.4.	Differenzierte Betrachtung der Genexpressionsanalyse	69
4.2.	BIOKOMPATIBILITÄT DER EINGESETZTEN HYDROGELE	71
4.2.1.	Reduziertes Zellüberleben in synthetischem Hydrogel	71
4.2.2.	Bereitstellung von Adhäsionsschlüsselsequenzen.....	72
4.2.3.	Bildung von Zellsphäroiden innerhalb des Hydrogels	72
4.2.4.	Vergleich von HDI-Hydrogel und BDI-Hydrogel	74
4.3.	OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG IM PLURONIC® P123.....	75
4.3.1.	Optimierung der Bedingungen zur osteogenen Differenzierung.....	75
4.3.2.	Erfolgreiche osteogene Differenzierung im BDI-Hydrogel.....	76
4.3.3.	Osteoinduktion im BDI-Hydrogel durch rhBMP-7	77
5.	SCHLUSSFOLGERUNG	82
6.	AUSBLICK	83
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	85
8.	LITERATURVERZEICHNIS	87

1. EINLEITUNG

„The bones are the hardest and driest parts of the living being, and, as one might say, the most earthy. They sustain and support the other elements of the body as a foundation, for everything is secured and attached to the bones.“ (1)

Schon der griechische Arzt und Anatom Galen von Pergamon (* um 129, † um 199 n. Chr) hat in seinen medizinischen Werken über die Osteologie das Knochenskelett des menschlichen Körpers als entscheidenden Träger des gesamten Körpers dargestellt. Aus dieser Aussage erschließt sich die Notwendigkeit eines stabilen und funktionsfähigen Knochengerüsts. Knöcherne Defekte bedeuten enorme Einbußen in dieser Stabilität. Aus diesem Grund ist das Ausheilen bestehender Frakturen ein bedeutsamer Vorgang für die Wahrung der Mobilität eines Menschen.

1.1. VIELFÄLTIGE URSACHEN KOMPLIZIERTER FRAKTUREN

Die Ursachen kompliziert verlaufender Frakturen und knöcherner Instabilitäten sind vielfältig. Neben traumatischen Knochenbrüchen treten Frakturen aufgrund von Stoffwechselerkrankungen, wie Osteomalazie und Osteoporose, aufgrund angeborener Defekte, wie Osteogenesis imperfecta, und als tumorassoziierte pathologische Frakturen auf.

Die steigende Inzidenz an osteoporotischen Frakturen im Zuge des demografischen Wandels stellt ein ernst zu nehmendes Problem dar. Osteoporose ist nicht nur Risikofaktor für die Entstehung von Frakturen, sondern gleichzeitig auch Risikofaktor für eine ausbleibende Knochenheilung. Als eine Erkrankung des höheren Alters steigt deren Prävalenz insbesondere ab dem 50. Lebensjahr zunehmend an (2). Die Alterspyramide (Abb. 1) zeigt die Altersverteilung der deutschen Bevölkerung in den Jahren 2015 und 2050 (3). Aufgrund des demografischen Wandels steigt die Altersgruppe „über 50 Jahre“ zunehmend an, von einem prozentualen Anteil der Über-50-Jährigen von 39 % im Jahre 2009 auf mehr als 50 % im Jahre 2050 (4).

Parallel dazu wird auch die Prävalenz altersbezogener Krankheiten, wie Osteoporose ansteigen (4). Ausgehend von einer Prävalenz von über 27,5 Millionen diagnostizierter Osteoporosefälle im Jahre 2010, wird eine Zunahme der Inzidenz um 23 % auf 33,9 Millionen Fälle im Jahre 2025 erwartet (2). Da durchschnittlich mehr als 50 % der Erkrankten in den ersten vier Jahren ab Diagnosestellung mindestens eine Fraktur erleiden (5), werden ebenfalls die Osteoporose-bedingten Frakturen von einer Inzidenz von über 3,5 Millionen im Jahre 2010 über 28 % auf ca. 4,5 Millionen im Jahre 2025 ansteigen (2). Damit verbunden sind nicht zuletzt auch, aufgrund der oftmals

mangelhaften Frakturkonsolidation, Kostensteigerungen für das Gesundheitssystem von 98 Billionen € im Jahre 2010 auf 121 Billionen € im Jahre 2025 (2).

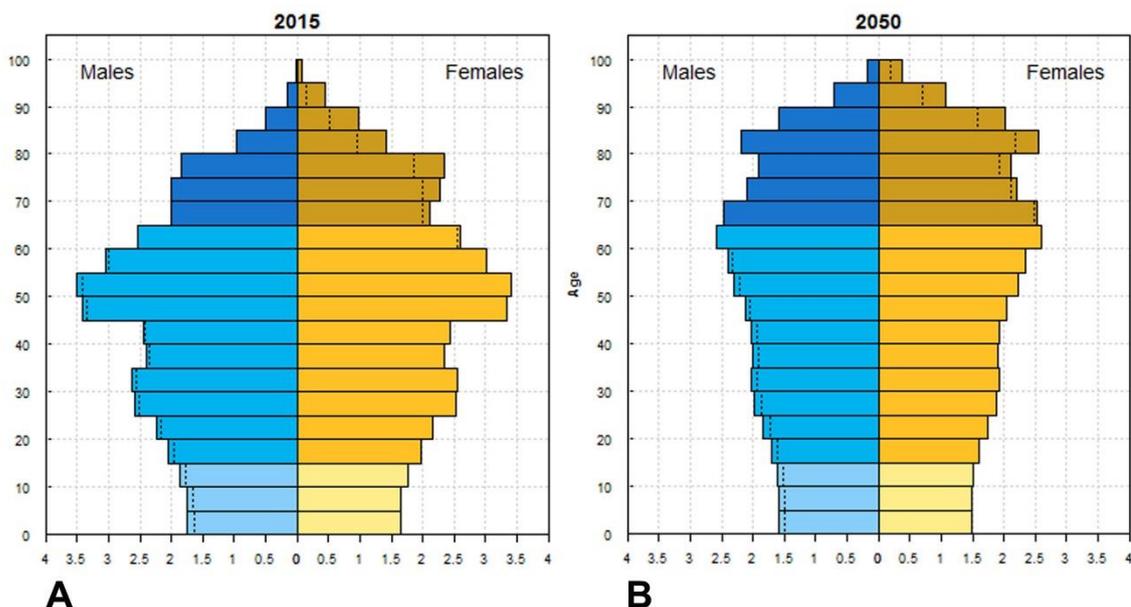


Abbildung 1: **Geschlechterspezifische Altersverteilung in Deutschland**

Altersverteilung in Deutschland im Jahre 2015 (A) und erwartete Altersstruktur im Jahre 2050 (B). Anzahl der Männer (males, blau) und Frauen (females, gelb) in Millionen (x-Achse) pro Altersgruppen (je 5 Jahre, y-Achse) dargestellt. (3)

Der Großteil aller Frakturen heilt innerhalb von neun Monaten vollständig aus. Allerdings bleibt diese vollständige Konsolidation bei etwa 10 % der diaphysären Frakturen aus (6). Laut der *US Federal Drug Administration (FDA)* wird das Ausbleiben einer vollständigen Konsolidation ab einem Zeitraum von neun Monaten seit dem Frakturereignis als Pseudarthrose definiert (7-9). Dabei wird die Form der hypertrophen Pseudarthrose, aufgrund unzureichender Stabilität der Fraktur, von der atrophischen Pseudarthrose, aufgrund mangelhafter Versorgung durch Blutgefäße, abgegrenzt (7, 9).

1.2. THERAPIESTRATEGIEN KOMPLIZIERTER FRAKTUREN

Komplizierte Frakturen, großflächige Knochendefekte sowie Pseudarthrosen bedürfen besonderer chirurgischer Maßnahmen, um eine vollständige Heilung zu ermöglichen (10). Jede Art der hierfür therapeutisch eingesetzten Knochentransplantate und der Knochenersatzmaterialien ist anhand der folgenden sechs Kriterien beurteilbar (11, 12):

- Biologische Leistungsfähigkeit:

- Osteogenes Potential ist definiert als Fähigkeit, dass sich die im Knochenersatzgewebe vorhandenen Stammzellen zu Osteoblasten differenzieren können.
 - Osteoinduktive Materialien enthalten Wachstumsfaktoren, wie *bone morphogenetic proteins (BMPs)*, die die osteogene Differenzierung der Stammzellen stimulieren.
 - Osteokonduktion wird als die Eigenschaft eines Materials beschrieben, als Trägergerüst für das Einsprossen von Knochenzellen zu dienen.
- Frühe mechanische Beanspruchbarkeit
 - Verfügbarkeit
 - Technischer Aufwand
 - Langzeitstabilität
 - Morbidität

1.2.1. Autologe, allogene und xenogene Knochentransplantate

Bei der autogenen Knochentransplantation wird Knochen innerhalb eines Individuums von einer gesunden Entnahmestelle, z.B. Beckenkamm, zur Überbrückung in den bestehenden Knochendefekt transplantiert. Diese Methode stellt den Goldstandard zur Versorgung komplizierter Frakturen und Pseudarthrosen dar. Der große Vorteil dieser Therapiestrategie ist die hohe biologische Leistungsfähigkeit, mit der Erfüllung der drei Kriterien Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion. Des Weiteren besteht direkt postoperativ mechanische Stabilität. Die Nachteile stellen neben einer begrenzten Verfügbarkeit jedoch Komplikationen, wie Infektionen, Dysästhesien bis hin zu ernsthaften Gefäßverletzungen, dar (10-15).

Durch die Gewinnung von Knochenmaterial aus einem weiteren Individuum erhält man ein allogenes Knochentransplantat. Diese sind besser verfügbar als autologe Knochentransplantate. Problematisch sind aber die potentielle Übertragung von Bakterien, Viren und Prionen, sowie mögliche immunologische Reaktionen gegen das Fremdmaterial. Mittels thermischer Desinfektion wird das Risiko für derartige Komplikationen reduziert. Jedoch geht dabei auch die zelluläre Komponente und somit das osteogene Potential verloren (10-12, 14, 15).

Die xenogene Knochentransplantation erfolgt aus der Entnahme von Knochen einer fremden Spezies. Diese bietet eine hohe Verfügbarkeit von Knochenmaterial. Allerdings besteht die Gefahr der Übertragung von Krankheitserregern und Unverträglichkeitsreaktionen (12).

1.2.2. *Tissue Engineering* zur Entwicklung von Knochengewebe

Aufgrund der bestehenden Risiken und Nachteile der vorgestellten Knochentransplantate, wird in der Regenerativen Medizin intensiv an alternativen Ersatzgeweben geforscht. Durch das *Tissue Engineering* von Knochengewebe haben sich dabei neue Möglichkeiten entwickelt. *Tissue Engineering* ist definiert als “an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and the life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function.” (16)

Die drei Kernbestandteile des *Tissue Engineering* sind Trägerkonstrukte, Zellen und Wachstumsfaktoren (12). Osteokonduktive Trägermaterialien dienen als Baugerüste für Knochenzellen. Der Einsatz von Zellen bewirkt durch osteogene Differenzierung der Zellen die gewünschte Osteogenese. Durch Wachstumsfaktoren wird mittels Osteoinduktion die Knochenbildung induziert (10, 12). Jede dieser drei Kernbestandteile erfüllt prinzipiell jeweils nur ein Merkmal der biologischen Leistungsfähigkeit (Osteogenese, Osteoinduktion, Osteokonduktion). Erst die Kombination dieser drei Bestandteile erfüllt, wie sonst nur die autologe Knochentransplantation, alle drei Kriterien biologischer Leistungsfähigkeit (15, 17). Dazu wird beim *Tissue Engineering* (Abb. 2) von Knochengewebe ein geeignetes Trägermaterial mit Stammzellen besiedelt. Deren osteogene Differenzierung wird durch Wachstumsfaktoren stimuliert. Das so in der Zellkultur gezüchtete Knochenersatzgewebe kann im Rahmen einer Operation in den Knochendefekt eingesetzt werden. Angestrebtes Ziel ist, dass, nach Abschluss des natürlichen Prozesses des *Remodelling*, der Knochendefekt vollständig verheilt ist (18).

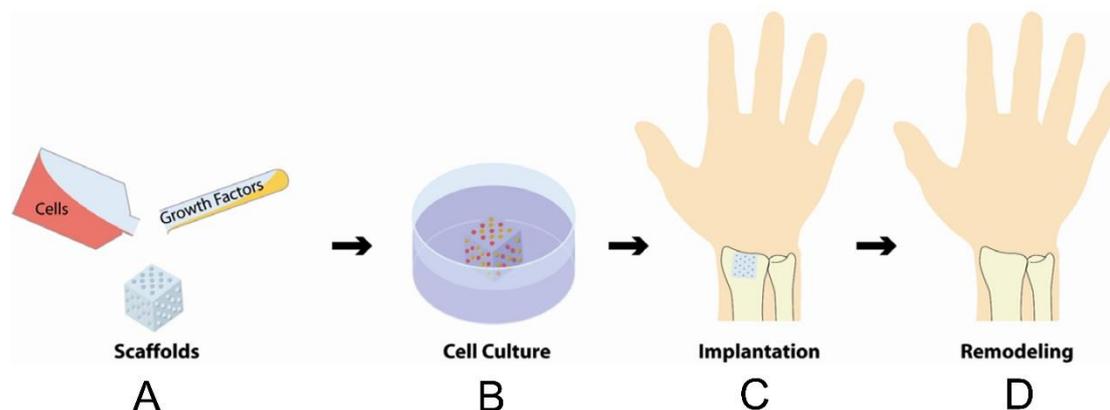


Abbildung 2: ***Tissue Engineering* von Knochengewebe**

Beim *Tissue Engineering* werden (A) drei-dimensionale Konstrukte (*scaffolds*) mit metabolisch aktiven Zellen (*cells*) besiedelt, deren Differenzierung durch osteoinduktive Wachstumsfaktoren (*growth factors*) stimuliert wird. Nach (B) einer *in vitro* Kultivierung (*cell culture*), wird (C) das damit geschaffene Knochenersatzgewebe in den entsprechenden Knochendefekt implantiert (*implantation*). Im Zuge des *Remodelling* (D) heilt der Knochendefekt aus. (18)

1.3. STAND DER ENTWICKLUNG VON KNOCHENERSATZMATERIALIEN

Knochenersatzmaterialien stellen dreidimensionale Trägerkonstrukte mit osteokonduktiver Funktion dar (19). Diese Baugerüste begünstigen die Ansiedelung, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen (18). Aufgrund des steigenden Interesses an alternativen Therapiemöglichkeiten von Frakturen wurde mittlerweile eine Vielzahl verschiedener Materialien entwickelt. Die Entscheidung für das jeweilige Knochenersatzmaterial erfolgt dabei nach den folgenden Kriterien (10, 12, 15, 18):

- Biologische Leistungsfähigkeit (osteogen, osteoinduktiv, osteokonduktiv)
- Biokompatibilität, Bioresorption
- Porengröße, Oberflächencharakter
- Mechanische Stabilität
- Verfügbarkeit
- Handhabung
- Kosten, Preis-Leistungsverhältnis
- Toxizität, Kanzerogenität, Inflammation, Unverträglichkeitsreaktionen
- Ethische Fragestellungen

Prinzipiell können Knochenersatzmaterialien in Feststoffe und Hydrogele, sowie in biologische und synthetische Materialien untergliedert werden.

1.3.1. Feststoffe als Knochenersatzmaterialien

Biologische Feststoffe bieten, neben biologischer Leistungsfähigkeit, die Vorteile einer hohen Biokompatibilität und guter biologischer Abbaubarkeit (12). Allerdings besteht das Risiko potentieller Immunogenität mit möglichen Abwehrreaktionen gegen das körperfremde Material (10, 12). Das am weitesten verbreitete biologische solide Knochenträgergerüst stellt demineralisierte Knochenmatrix (DBM) dar. Diese wird aus allogenen Knochengewebe gewonnen und mittels Säurebehandlung dekalzifiziert (15, 20). Übrig bleibt ein Trabekelgerüst aus Kollagen I und Nicht-Kollagen-Proteinen, an denen Zellen adhäreren können (19). DBMs stellen somit Knochenersatzmaterialien mit osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften dar (21, 22), bieten jedoch nur geringe mechanische Stabilität (22).

Synthetische Feststoffe sind, im Gegensatz zu biologischem Knochenersatz, nahezu uneingeschränkt verfügbar und haben ein geringeres Risiko für allergische Reaktionen (10, 12). Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung sind Keramikstoffe, die z.B. aus β -Tricalciumphosphat, Hydroxylapatit oder Calciumsulfat bestehen. Diese Materialien

bieten gute osteokonduktive Eigenschaften, Biokompatibilität und Bioaktivität (14, 20, 23). Allerdings besitzen diese Keramikstoffe nur geringe mechanische Resistenz und Flexibilität (12). Neben Keramikhaltigem Knochenersatz besteht eine Option in der Applikation von Bioaktivem Glas. Dieses Bioglas besteht neben 45 % Silica, aus 24,5 % Calciumoxid, 24,5 % Disodiumoxid und 6 % Pyrophosphat. Die poröse Matrix des Bioglasses ermöglicht, aufgrund guter Osteokonduktion, die Infiltration und das Adhären von osteogener Zellen, bei jedoch nur geringer mechanischen Stabilität (23).

Insgesamt betrachtet, bestehen die Nachteile dieser Feststoffe, selbst bei grobporigem Material, in einer inhomogenen Zellverteilung innerhalb des Trägermaterials (24, 25). Zudem erfordert die Implantation dieser soliden Knochenersatzmaterialien immer ein offen-chirurgisches Vorgehen (25).

1.3.2. Hydrogele als Knochenersatzmaterialien

Hydrogele stellen vielversprechende Alternativen für die Therapie von Knochendefekten dar und sind aus diesem Grund ein wichtiges Forschungsfeld der Regenerativen Medizin. Das angestrebte Einsatzgebiet liegt, neben dem Transport von Medikamenten, in der Reparatur von Geweben.

Diese Knochenersatzstoffe bestehen aus 1 – 20 % Trockenmasse und damit aus einem wässrigen Anteil von bis zu 99 % (24). Die prinzipiellen Vorteile dieser Hydrogele sind, neben ihrer minimal-invasiven Applikation (25-27), eine homogene Verteilung applizierter Zellen oder Wachstumsfaktoren innerhalb des Konstruktes (25, 28). Dabei werden in die Hydrogele im flüssigen Zustand Zellen oder Wachstumsfaktoren inkorporiert, gut verteilt und diese im Anschluss als flüssiges Konstrukt in den Gewebedefekt injiziert. Durch die Applikation des flüssigen Produkts *in situ*, füllt das Hydrogel den Gewebedefekt aus und adaptiert sich dabei besser an die geometrische Form des Defekts als vorgeformte solide Materialien (25). Durch Querverbindungen zwischen den Hydrogelmolekülen entsteht ein dreidimensionales Netzwerk, in dem Zellen adhären und proliferieren können (24). Hydrogele ersetzen somit das Osteoid, die extrazelluläre und noch nicht mineralisierte Knochenmatrix. Ziel ist, dass die Hydrogele die Funktionen des Osteoids übernehmen, wie zum Beispiel Zellen dreidimensional als Leitschiene zu organisieren und die Diffusion von Wachstumsfaktoren und Metaboliten zu steuern (26, 29).

Die Transition vom flüssigen in den festen Zustand erfolgt durch diverse chemische wie physikalische Bindungen zwischen den Molekülen (Abb. 3). Physikalische Hydrogele beruhen auf physikalischen Anziehungskräften zwischen den Polymerketten, bedingt durch Veränderungen von Temperatur, pH-Wert oder Ionen (24, 30). Dagegen gehen chemische Hydrogele kovalente Bindungen zwischen den Polymerketten ein, z.B. durch Photopolymerisation. Mittels eines Photoinitiators erfolgt die Interaktion mit Licht unter der Bildung freier Radikale, die die chemische Polymerisation initiieren (24). Die größte

Gruppe der Hydrogele bilden die thermoresponsiven Hydrogele. Dabei werden durch Temperaturveränderungen Veränderungen in Struktur und Löslichkeit des Hydrogels erzielt. Denn das Eingehen von temperaturabhängigen Bindungen ist durch ein Gleichgewicht zwischen hydrophilen und hydrophoben Polymerketten gesteuert (25). Bei Überschreiten von Temperaturgrenzen werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Polymer und umgebendem Wasser instabil. Aus diesem Grund ordnen sich amphiphile Polymerketten in hydrophiler Umgebung mizellenartig an (25, 31).

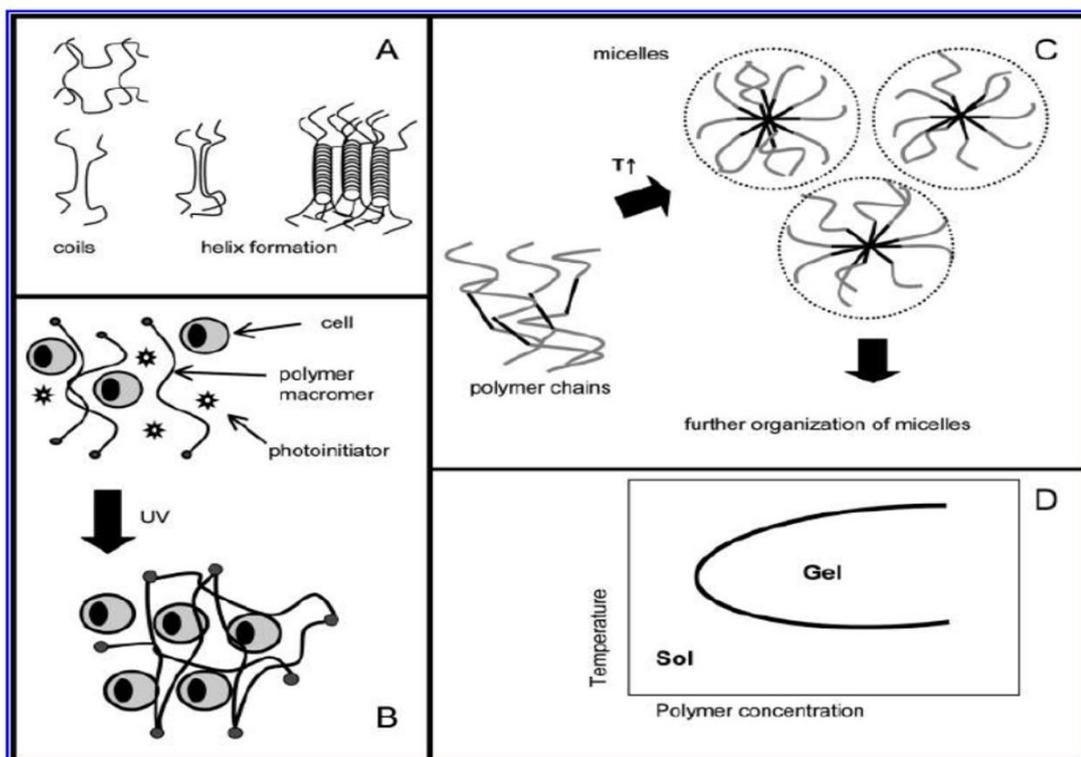


Abbildung 3: **Mechanismen der Gelbildung eines Hydrogels**

Gelbildung durch physikalische Bindungen (A). Photopolymerisation (B) durch kovalente Bindungen unter UV-Licht. Pluronic® (C) geliert temperaturabhängig durch Mizellenbildung, entsprechend des Phasendiagramms (D) eines thermoresponsiven Polymers. (24)

Je nach dem Verhalten auf eine entsprechende Temperaturveränderung werden positiv-sensitive thermoresponsive Hydrogele mit einer *upper critical sensitive temperature (UCST)* von negativ-sensitiven thermoresponsiven Hydrogelen mit einer *lower critical sensitive temperature (LCST)* unterschieden. Die Temperaturpunkte *UCST* bzw. *LCST* stehen für eine obere bzw. untere kritische Lösungstemperatur, die den Temperaturbereich, in dem das Polymer vollständig mischbar und flüssig ist, beschreibt

(32, 33). Das bedeutet, bei Überschreitung der *UCST* bzw. bei Unterschreitung der *LCST* sind die Bestandteile des Hydrogels flüssig und vollständig mischbar. Das Prinzip der positiv-sensitiven Hydrogele beruht auf einer Polymerisation bei Abkühlung des Materials unter die *UCST* und einer reversible Verflüssigung bei Erwärmung über die *UCST* (32, 33). Im Gegenteil dazu wurden auch negativ-sensitive thermoresponsive Hydrogele entwickelt. Diese Gruppe der Hydrogele verfestigt seine Konsistenz bei Erwärmung über die *LCST*. Bei Abkühlen unter die Grenze der *LCST* erfolgt eine reversible Transition in einen flüssigen Zustand (32, 33). Aus diesem Grund werden die negativ-sensitiven Hydrogele auch als inverse thermoresponsive Hydrogele bezeichnet (24, 33).

Ziel der thermoresponsiven Hydrogele im *Tissue Engineering* von Knochen ist es, aus dem menschlichen Organismus entnommene Zellen, *ex vivo* in dem flüssigen, gut mischbaren Hydrogel anzusiedeln und dieses zellbeladene Hydrogel in die entsprechende Defektzone zu injizieren. Bei Körpertemperatur erfolgt die Polymerisation, wodurch die Zellen in dem Defekt gehalten werden (34).

1.3.2.1. *Biologische Hydrogele*

Wie die biologischen Feststoffe bieten auch die biologischen Hydrogele ein hohes Maß an Biokompatibilität, Bioaktivität und biologischer Abbaubarkeit. Aufgrund ihres natürlichen Ursprungs bedingen sie allerdings eine potentielle Immunogenität sowie einen raschen Abbau durch körpereigene Enzyme (28).

Kollagen I ist ein physiologisches Protein des Organismus und stellt die Hauptkomponente der extrazellulären Knochenmatrix dar (12). Kollagen I verfügt beispielsweise über Bindungsdomänen der Aminosäuren Arginin – Glycin – Aspartat (RGD), Aspartat – Glycin – Glutamat – Alanin (DGEA) oder Glycin – Phenylalanin – Hydroxyprolin – Glycin – Glutamat – Arginin (GFOGER) (35). Integrine, wie $\alpha1\beta1$ oder $\alpha2\beta1$, bewirken als Rezeptor die Zelladhäsion über die Bindungsdomänen (35). Kollagen I bietet günstige Umweltbedingungen für die osteogene Differenzierung von Zellen zur Knochenregeneration (12, 19). Die Vorteile von Kollagen I als thermoresponsives Knochenersatzmaterial sind seine hohe Biokompatibilität, Bioresorbierbarkeit und gute biologische Abbaubarkeit (12, 28). Aufgrund der geringen mechanischen Stabilität erfolgt der Einsatz von Kollagen I hauptsächlich in den zwei folgenden Applikationen: Zum einen fungiert Kollagen I als Träger für Wachstumsfaktoren, Zellen oder Medikamente (19). Zum anderen wird die Biokompatibilität synthetischer Materialien durch die Modifikation der Oberflächen mit Kollagen I gesteigert (12, 19).

Weitere thermoresponsive, biologische Hydrogele sind Gelatine, die durch Hydrolyse als Derivat von Kollagen I gewonnen wird (28) und das Polysaccharid Chitosan (Abb. 4 A), das eine Ähnlichkeit zu physiologischem Glykosaminoglykan aufweist (30).

Hyaluronsäure (Abb. 4 C) ist ein nicht-sulfatiertes Glykosaminoglykan der extrazellulären Matrix (28), das im Rahmen von Photopolymerisation zu einem dreidimensionalen Netzwerk polymerisiert (24). Alginate (Abb. 4 B) sind hydrophile, lineare Polysaccharide aus den Zellwänden von Braunalgen und Bakterien, deren Gelierung durch ionische Bindungen erfolgt (30). Agarose ist ein Polysaccharid mariner Algen, das temperaturabhängig zu Doppelhelixes aggregiert (26).

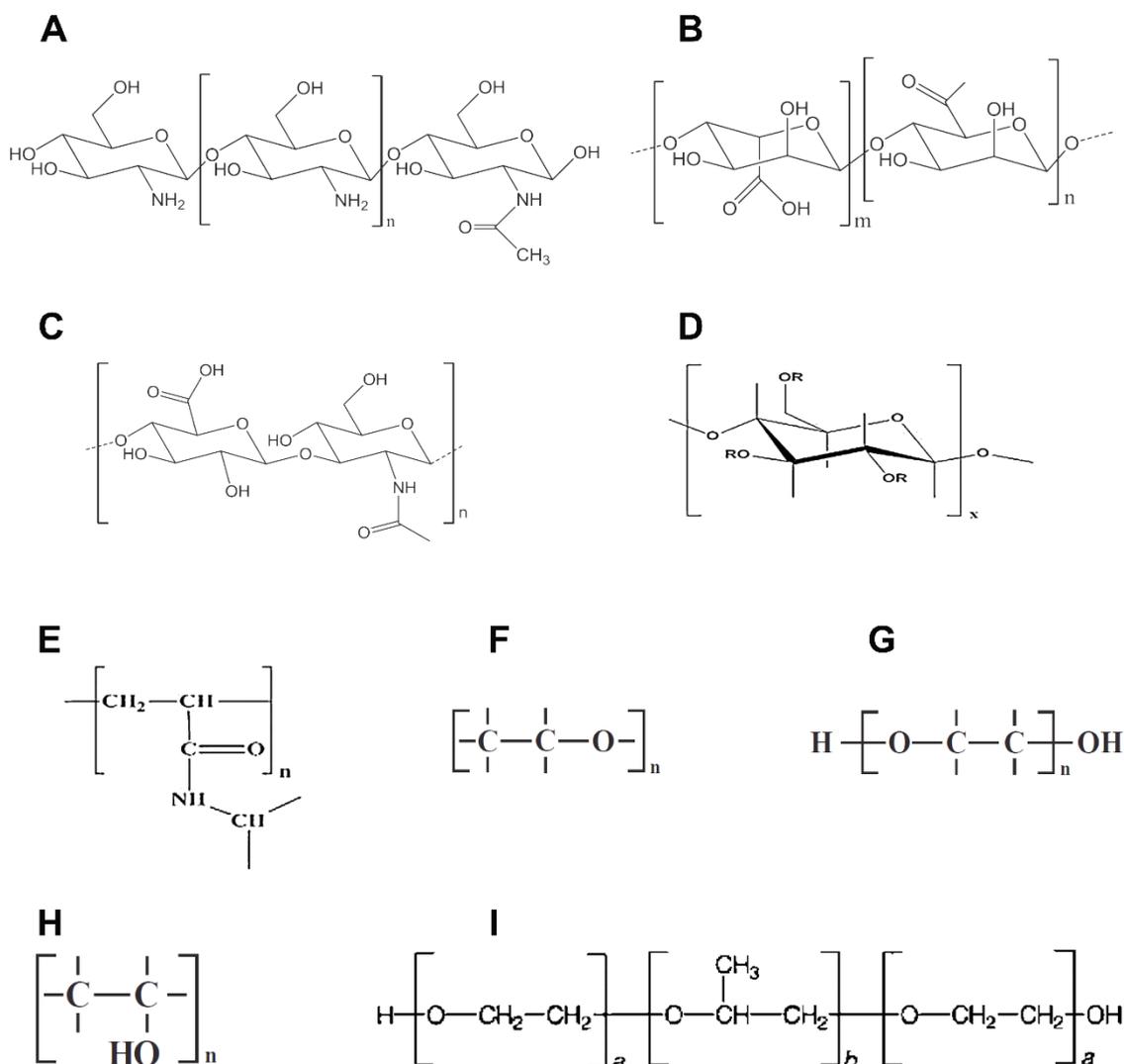


Abbildung 4: **Strukturformel biologischer und synthetischer Hydrogele**

Biologische Hydrogele: (A) Chitosan (30), (B) Alginate (30), (C) Hyaluronsäure (30)
 Synthetische Hydrogele: (D) Hydroxypropyl-Methylcellulose (HPMC) (36), (E) Poly(N-

isopropylacrylamid) (PNiPAAM) (36), (F) Poly(ethylenoxid) (PEO) (27), (G) Poly(ethylenglykol) (PEG) (27), (H) Poly(vinyl)alkohol (PVA) (27), (I) Pluronic® (PEO – PPO – PEO) (37)

1.3.2.2. Synthetische Hydrogele

Die Verfügbarkeit synthetischer Ersatzstoffe ist sehr gut. Im Gegensatz zu natürlichen Hydrogelen besteht ein geringeres Risiko für immunogene Unverträglichkeitsreaktionen. Ein weiterer Vorteil der synthetischen Polymere ist, dass deren Eigenschaften durch chemische Modifikationen auf die gewünschten Konditionen angepasst werden können. Dies bedeutet eine gute Steuerbarkeit aber auch Reproduzierbarkeit der Eigenschaften (28). Gleichzeitig bieten synthetische Polymere jedoch eine geringere Biokompatibilität sowie eine geringere biologische Abbaubarkeit (28). Außerdem besitzen diese keine zell-spezifischen Schlüsselsequenzen, die für die Migration, Adhäsion und Proliferation von Zellen von Bedeutung sind. Durch Addition von z.B. Kollagen I kann das Hydrogel mit entsprechenden Bindungsdomänen (RGD, DGEA, GFOGER) ausgestattet werden und somit die Konditionen für die Zelladhäsion verbessert werden (24, 29, 35, 38).

Durch den steigenden Bedarf an alternativen Knochenersatzmaterialien wurde eine Vielzahl verschiedener synthetischer Polymere entwickelt und erforscht, von denen einige auch bereits für medizinische Anwendungen zugelassen sind.

Hydroxypropyl-Methylcellulose (HPMC) (Abb. 4 D) ist ein silyliertes langkettiges Polysaccharid-Polymer aus Zellulose, das pH-abhängig geliert (24, 39). Poly(vinyl)alkohol (PVA) (Abb. 4 H) ist ein hydrophiles Polymer, dessen Gelbildung auf chemischen oder physikalischen Prozesse beruht (27, 28). Die Polymere, Poly(ethylenglykol) (PEG) (Abb. 4 G) und Poly(ethylenoxid) (PEO) (Abb. 4 F), wurden aus Ethylenoxid entwickelt und unterscheiden sich nur in Kettenlänge und Endgruppen. Deren Gelbildung erfolgt entweder temperaturabhängig oder durch Photopolymerisation. (24, 27, 28) Das thermoresponsive Polymer, Poly(N-isopropylacrylamid) (PNiPAAM) (Abb. 4 E), geliert oberhalb der *LCST* bei 32 °C (24). Die *LCST* kann durch Copolymerisation mit hydrophilen Monomeren erhöht werden und z.B. mit Acrylsäure als PNiPAAM-co-AAc auf 37 °C modifiziert werden (24).

Eine der vielversprechendsten Entwicklung in der Erforschung thermoresponsiver Hydrogele in der Regenerativen Medizin stellen Triblock-Copolymere aus den nicht-ionischen Tensiden Poly(ethylenoxid) – Poly(propylenoxid) – Poly(ethylenoxid) (PEO – PPO – PEO) (Abb. 4 I) dar (33). Diese wurden von BASF in den 1950er Jahren entwickelt und werden unter den Namen Poloxamer oder Pluronic® vermarktet (33). Je nach Molekulargewicht und PPO-PEO-Ratio wurden verschiedene Polymere entwickelt, die in einem Pluronic®-Gitter (Abb. 5) angeordnet werden können (40, 41). Entlang einer horizontalen Linie sind Poloxamere mit gleichem Molekulargewicht des PPO-Blocks

gruppiert. Entlang einer vertikalen Linie finden sich Poloxamere mit gleicher PPO-PEO-Ratio. Die Bezeichnung der Poloxamere erfolgt nach dem folgenden Prinzip (40):

- 1.) Anfangsbuchstabe: L („*liquid*“), P („*paste*“) – F („*flakes*“)
- 2.) Zahl 1-2: Molekulargewicht des PPO-Blocks
- 3.) Zahl 3: PPO-PEO-Ratio

Pluronic® P123 stellt demnach eine Paste dar, während Pluronic® F127 flockenartig konfiguriert ist. Beide Poloxamere haben das gleiche Molekulargewicht, aber eine unterschiedliche PPO-PEO-Ratio. Der Anteil an PEO beträgt im Pluronic® P123 30 % und im Pluronic® F127 70 %.

Poloxamere zeigen ein negativ-sensitives, thermoresponsives Verhalten in wässrigen Lösungen. Das heißt, sie zeigen unterhalb der *LCST* eine niedrige Viskosität und werden bei Überschreiten der *LCST* zu einem halbfesten Gel (33). Das amphiphile Polymer besteht aus zwei hydrophilen randständigen PEO und einem zentralen hydrophoben PPO. Unterhalb der *LCST* befinden sich sowohl PEO als auch PPO in einem hydrierten Zustand, sind somit löslich in Wasser und zeigen eine geringe Viskosität (31). Oberhalb der *LCST* wird das zentrale PPO dehydriert und somit unlöslich (31). Die hydrophoben PPO bilden einen zentralen hydrophoben Kern mit einer Korona aus den hydrophilen randständigen PEO aus. Dieses Phänomen wird als Mizellenbildung bezeichnet (31).

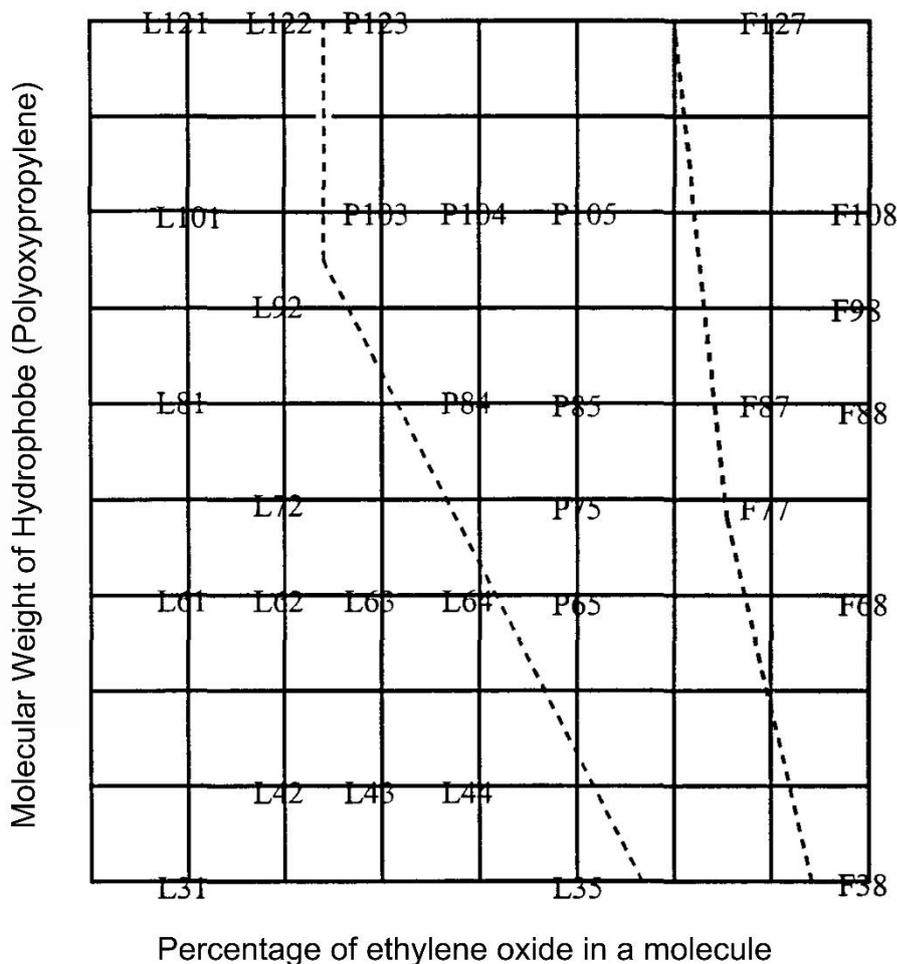


Abbildung 5: **Pluronic®-Gitter**

Entlang der horizontalen Linie sind Poloxamere mit gleichem Molekulargewicht des PPO-Blocks gruppiert. Entlang der vertikalen Linie finden sich Poloxamere mit gleicher PPO-PEO-Ratio. (41)

Schwierigkeiten in der Anwendung bereiten die geringe mechanische Stabilität und der rasche, unkontrollierbare Abbau der Mizellenstruktur durch nicht-biologische Mechanismen (25). Durch Modifikation des Molekulargewichts und der Polymerkonzentration kann die *LCST* modifiziert und auf die gewünschten Bedürfnisse angepasst werden (31, 40). Höhere Polymerkonzentrationen verbessern die mechanische Stabilität und ermöglichen eine Gelierung bei einer *LCST*, die in etwa der Körperkerntemperatur entspricht (33, 42). Eine hohe Dosis des im Allgemeinen als nicht-toxisch angesehenen Poloxamers verursachte allerdings teilweise fragliche Hypercholesterinämien und Hyperlipidämien in Mäusen, Ratten und Kaninchen (43-45). Aus diesem Grund sollte die Polymerkonzentration zugunsten einer höheren Biokompatibilität möglichst niedrig gewählt werden. Durch die Polymerisation der Poloxamere zu Poly(etherurethanen) mit Hilfe von Kettenverlängerern kann die Konzentration des Polymers gesenkt werden (32, 33, 37). Durch höhere Viskosität bei 37 °C wird dennoch eine Transition des flüssigen Materials in ein halbfestes Gel bei Körperkerntemperatur erzielt (32, 33, 37).

Ein gut erforschtes Poloxamer ist das Poloxamer 407, auch bekannt als Pluronic® F127. Pluronic® F127 besitzt ein breites Anwendungsspektrum von Kosmetik bis Medizin und Pharmazie (25, 31). Seit vielen Jahren wird dessen Einsatz zur Behandlung von Brandwunden und als synthetischer Hautersatz erprobt (46, 47). Darüber hinaus wird seine Funktion als Transportträger für Medikamente (48) und Zellen erforscht (49-51).

Ein weiteres Poloxamer ist das Pluronic® P123. Pluronic® P123 wird im *Tissue Engineering* von Hautersatzgewebe zur kutanen Wundheilung erforscht. Dabei unterstützt dieses Poloxamer den Transport von Stammzellen in die Defektzone und fördert die Differenzierung in epitheliale Strukturen (52). Daneben besteht ein weiteres Anwendungsgebiet in dem Transport von Pharmaka, z.B. als freisetzender Träger von Nevirapin zur anti-retroviralen Therapie (53) oder als effektives Verteilungssystem von Chemotherapeutika wie Docetaxel (54). Durch Inhibition des p-Glykoproteins ermöglicht P123 eine gute Passage der Blut-Hirn-Schranke. Dieser Effekt kann zum Transport des Antiepileptikums Lamotrigin genutzt werden (55). Außerdem wird dieses Poloxamer zum Gentransfer eingesetzt, da es, alternativ zu viralen Vektoren, die zelluläre Aufnahme und den Transport von Plasmid-DNA in den Nukleus verbessern kann (56).

Zur Besserung der mechanischen Stabilität, trotz geringer Polymerkonzentration, wurde Pluronic® P123 durch 1,6-Hexamethylen-diisocyanat (HDI), 1,4-Butan-diisocyanat (BDI) zu Poly(etherurethanen) polymerisiert (32, 37). Die *LCST* des Poloxamers liegt für den Kettenverlängerer HDI bei 27,6 °C und für BDI bei 26,2 °C (32). Bei der Zieltemperatur von 37 °C zeigt sich für HDI und BDI eine ausgeprägte mechanische Stabilität bei gleichzeitig guter Elastizität des Pluronic® P123 (32). Beide Kettenverlängerer weisen eine hohe Biokompatibilität auf (32). Das adipogene und osteogene Differenzierungspotenzial von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) im Pluronic® P123 wurde durch HDI und BDI nicht negativ beeinflusst (32).

1.4. MESENCHYMALE STAMMZELLEN

Neben den Trägerkonstrukten ist ein weiterer wichtiger Baustein des Tissue Engineering der Einsatz von Zellen. Metabolisch aktive Zellen tragen durch osteogenetische und osteoinduktive Eigenschaften zur Heilung eines Knochendefektes bei (18). Deshalb stellen multipotente Zellen, wie mesenchymale Stammzellen (MSC), vielversprechende Strategien zell-basierter Regenerativer Medizin dar (57).

Zum ersten Mal wurden MSC im Jahre 1966 von Friedenstein beschrieben und aus einer Ko-Kultur mit hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark isoliert (58). Diese wurden zunächst aufgrund ihres Fibroblasten-ähnlichen Charakters als *colony forming units fibroblasts* (CFU-Fibroblasten) bezeichnet (58) und stellen den Beginn der stammzell-basierten Regenerativen Medizin dar. Neben einer ektopen Knochenbildung konnte auch eine Bildung von Knorpel- und Fettgewebe erzielt werden (59). Aufgrund der Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene mesenchymale Gewebe (Abb. 6), wie

Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe, postulierte Caplan im Jahre 1991 den Begriff der mesenchymalen Stammzellen (60, 61). MSC bestehen aus einer heterogenen Zellpopulation, die sich sowohl im Phänotyp, also auch im Proliferations- und Differenzierungspotenzial unterscheiden können (10, 62). Diese multipotenten Stammzellen sind durch keine für ihre Klasse spezifischen Oberflächenantigene charakterisiert (10). Aus diesem Grund wurden 2006 vom *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* eine Klassifikation der MSC durch folgende Kriterien vorgenommen (62):

- 1.) In Standard-Kulturbedingungen zeigen die isolierten MSC ein Plastik-adhärentes Verhalten.
- 2.) MSC sind *in vitro* fähig zur osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung.
- 3.) ≥ 95 % der MSC exprimieren die Oberflächenantigene CD 73, CD 90, CD 105 und ≤ 2 % der MSC exprimieren die Oberflächenmarker CD 11b, CD 14, CD 19, CD 34, CD 45, CD 79a, HLA Klasse II.

Ein limitierender Faktor für den Einsatz von MSC im Tissue Engineering ist deren begrenzte Proliferations- und Diffusionskapazität. Aufgrund von Alterungsprozessen, sogenannter replikativer Seneszenz (63), ist, je nach Alter des Donors, das Proliferationsvermögen von MSC auf 25 – 40 Populationsverdoppelungen (PD) *in vitro* limitiert (64). Ursache hierfür ist eine progressive Verkürzung der Telomere mit jeder Zellteilung (64). Verhindert wird diese Telomerverkürzung durch das Enzym humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT), das jedoch in MSC *in vitro* inaktiv ist (65). Ziel vieler Forschungsgruppen war deshalb die genetische Programmierung von hTERT-immortalisierten MSC (66). Das Enzym Telomerase stellt eine Reverse Transkriptase dar, die typischerweise in Tumorzellen überexprimiert ist und durch das Verhindern der Telomerverkürzung eine unbegrenzte Zellproliferation ermöglicht (65). Durch lentiviralen Gentransfer von hTERT wurden MSC als *single-cell picket one* (SCP-1) Zelllinie immortalisiert (67). Genaue Untersuchungen zeigten für die SCP-1 im Verlauf weder genetische Veränderungen des Karyotyps, noch Anzeichen für maligne Transformation (67).

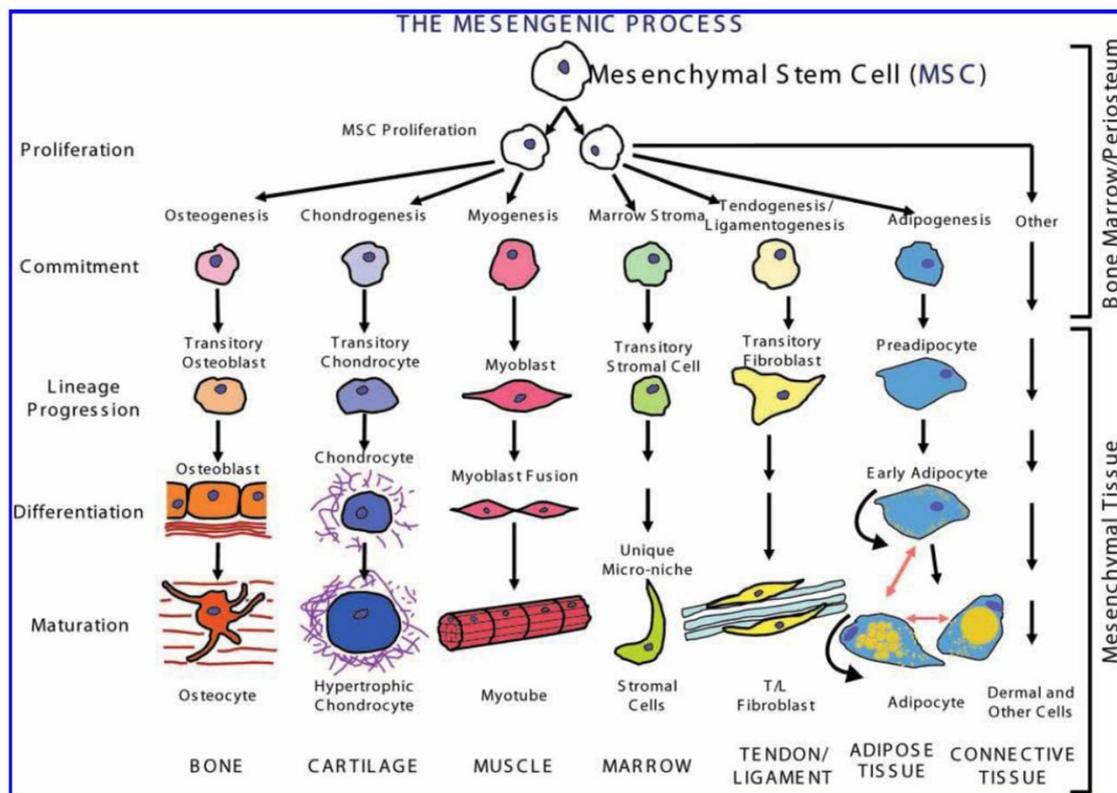


Abbildung 6: **Der Entwicklungsprozess der mesenchymalen Stammzellen**

Pluripotente MSC können zur Differenzierung in verschiedene mesenchymale Zelllinien induziert werden. Je nach eingeschlagener Zelllinie differenzieren die Stammzellen über verschiedene Vorläuferzellen und bilden das jeweilige mesenchymale Gewebe. Mögliche mesenchymale Gewebe sind z.B. Knochengewebe, Knorpelgewebe, Fettgewebe und Muskelgewebe. (61)

1.5. WACHSTUMSFAKTOREN

Der dritte Baustein des Tissue Engineering besteht in dem Einsatz von Wachstumsfaktoren. Diese Faktoren kommen physiologisch im Körper vor und steuern dabei z.B. Osteogenese oder Angiogenese. Die Anwendung in der chirurgischen Versorgung von Knochendefekten zielt auf eine Osteoinduktion im Bereich des Knochendefektes ab. Mögliche Signalmoleküle mit osteoinduktiven Eigenschaften sind *insulin-like growth factor (IGF)*, *platelet-derived growth factor (PDGF)*, *fibroblastic growth factor (FGF)*, *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, *transforming growth factor- β (TGF- β)* und *bone morphogenetic proteins (BMP)* (10, 68).

Eine der für das Tissue Engineering von Knochengewebe vielversprechendsten und deshalb auch am meist erforschten Wachstumsfaktoren stellen die BMPs dar. Nachdem Urist 1965 die Existenz osteoinduktiver Faktoren in der Knochenmatrix postulierte (69, 70), führte er 1971 den Begriff *bone morphogenetic proteins (BMP)* ein (71). Im Jahre

1984 gelang es Urist, ein reines Isolat von bovinem BMP zu gewinnen (72). Mittlerweile konnten mehr als 20 unterschiedliche Mitglieder der BMPs identifiziert werden (73).

Aufgrund der ähnlichen Struktur ihrer Aminosäure-Sequenzen, werden die BMPs zu der TGF- β -Superfamilie (Abb. 7) gerechnet. Die Proteine dieser Superfamilie sind Polypeptide, die zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose steuern (74, 75).

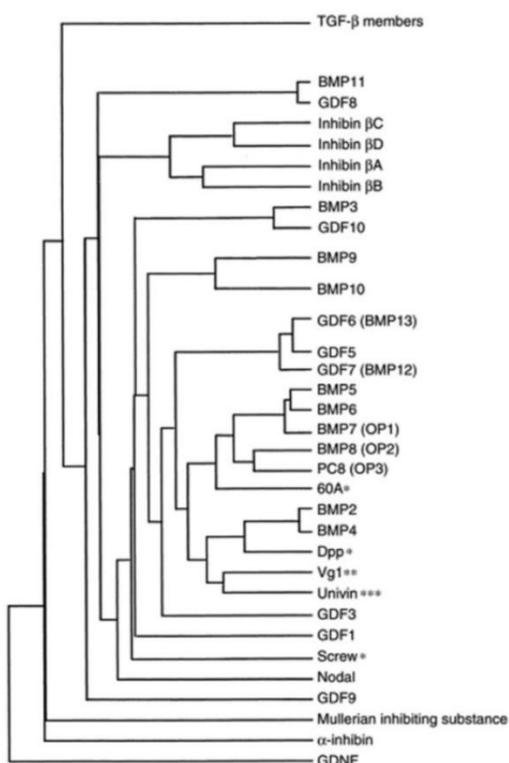


Abbildung 7: **Übersicht über die TGF- β -Superfamilie**

Bone morphogenic proteins (BMPs) werden zu der TGF- β -Superfamilie gerechnet (76).

BMPs liegen im Knochen in geringen Konzentrationen vor, die außerdem abhängig von Körpergewicht und Alter des Individuums sind (77). Mit zunehmendem Lebensalter nimmt die BMP-Konzentration und somit auch die Kapazität zur Osteogenese ab (77). Aufgrund dieser geringen Konzentration sind für die direkte Isolation große Mengen an Knochen nötig. Laut *Wozney* werden 40 kg Knochen für die Gewinnung von 40 μ g BMP benötigt (78), *Cook* beschreibt ein Verhältnis von 1000 kg Knochen für 1 mg BMP-7

(79). Mittlerweile ist durch gentechnologische Verfahren eine rekombinante Herstellung von BMPs möglich. Aus den Eizellen des chinesischen Hamsters (*CHO cells*) können große Mengen verschiedener BMP-Typen gewonnen werden. Mittlerweile ist z.B. rekombinantes BMP der Typen rhBMP-2, rhBMP-3, rhBMP-4, rhBMP-7 und rhBMP-8 erhältlich (78, 80).

Die gewonnenen BMPs liegen als Homodimere, deren Monomere durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, vor (76). Zunächst liegen die BMPs als inaktive Vorläuferproteine vor. Durch Proprotein-Konvertasen werden die Vorläuferproteine an der Schlüsselsequenz R-X-X-R (Arginin-X-X-Arginin) proteolytisch gespalten, wodurch das Carboxy-terminale Protein-Homodimer aktiviert wird (74). Alle Proteine der TGF- β -Superfamilie besitzen eine Carboxy-terminale, konservierte Domäne aus 7 Cystein-Resten. Diese Domäne wird als TGF- β -Domäne bezeichnet und ist für die Bildung der intermolekularen Disulfidbrücken verantwortlich (76).

Das aktive BMP bindet zur Initiation der Signalkaskade (Abb. 8) an eine Kombination von Serin-/Threonin-Kinase-Rezeptoren der Typen I und II (75, 81). Sobald ein BMP-Molekül an seinen entsprechenden Rezeptor bindet, wird der Typ I-Rezeptor durch den Typ II-Rezeptor phosphoryliert. Dies initiiert eine Signalkaskade durch die Phosphorylierung der BMP-spezifischen, intrazellulären Rezeptor-regulierten Smads (R-Smads). Im nächsten Schritt bilden die R-Smads einen Komplex mit Smad 4. Dieser Komplex transloziert in den Zellkern und reguliert dort die Transkription bestimmter Zielgene (82). Alternativ erfolgt die BMP-gesteuerte Regulation der Genexpression über die Smad-unabhängige Signalkaskade mittels mitogen aktivierter Proteinkinasen (MAPK) (81). Inhibiert wird die biologische Aktivität von BMP zum einen durch extrazelluläre Antagonisten, z.B. Nogin, Chordin, Follistatin, *twisted gastrulation* (Tsg) und Gremlin. Zum anderen durch die intrazellulären Antagonisten, auch als inhibitorische Smads (I-Smads) bezeichnet, sowie Smurf 1, Smurf 2 (76, 83). Daneben erfolgt eine Inhibition der BMP-Aktivität durch andere Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aufgrund eines konkurrierenden Wettbewerbs um die Interaktion der entsprechenden R-Smads mit Smad 4 (74).

BMP sind aufgrund ihrer osteoinduktiven Eigenschaften (71) von besonderem Interesse in der Regenerativen Medizin. Neben der reinen Induktion ektoper Knochenbildung, die in Tiermodellen (79, 84, 85) sowie in klinischen Versuchen (86) gezeigt wurde, spielen BMP in der Embryonalentwicklung von Skelett, Nervensystem, Auge, Niere und Herz eine entscheidende Rolle (87-89). Seit einigen Jahren sind rhBMP-2 und rhBMP-7 von der *European Medicines Agency* (EMA) für spezielle Indikationen von Tibiafrakturen und Spondylodesen zugelassen (81, 90). Darüber hinaus werden beide in vielen Fällen *off-label* bei verschiedenen Arten von Knochendefekten eingesetzt.

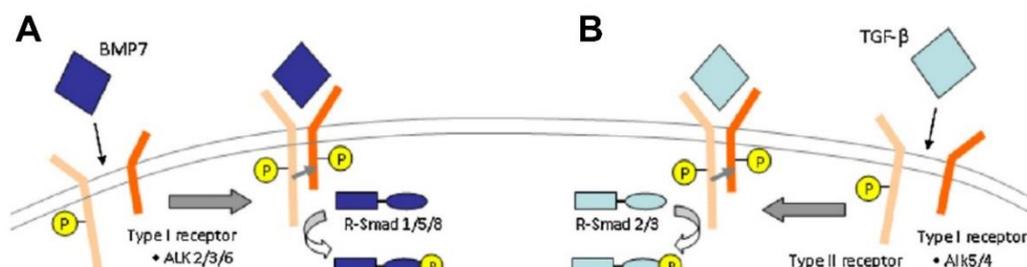


Abbildung 8: **Signaltransduktionsweges in der TGF- β -Superfamilie**

Signaltransduktion für BMP-7 (A) und TGF- β (B). Die Bindung an den Typ I und Typ II Rezeptor induziert die Phosphorylierung des Typ I Rezeptors durch den Typ II Rezeptor. Dies löst eine Signalkaskade aus, mit der nachfolgenden Phosphorylierung der intrazellulären R-Smads. Die so aktivierten R-Smads bilden einen Komplex mit Smad 4, der anschließend in den Nukleus transloziert und die Genexpression reguliert. Da BMP-7 und TGF- β unterschiedliche R-Smads aktiviert, konkurrieren diese um die Bindung an Smad 4 und inhibieren sich gegenseitig. (73)

Nach anfänglicher Euphorie über die vielversprechenden BMPs im *Tissue Engineering* von Knochengewebe, wurden auch negative Ergebnisse publiziert. Diese zeigen das Gefahrenpotenzial der BMPs, die sich beim klinischen Einsatz dieser Wachstumsfaktoren ergaben. Im Rahmen von BMP-unterstützten Spondylodesen zeigten sich neben ektooper Knochenbildung auch BMP-assoziierte Radikulitiden sowie neurologische Komplikationen (91-93). Daneben besteht zum einen ein Risiko für immunogene Reaktionen gegen rekombinante BMPs oder deren Trägermaterialien wie Kollagen (94). Zum anderen gilt der Verdacht der Induktion maligner Entartungen mittels BMPs (95). Insgesamt betrachtet ist das Risiko für diese Komplikationen bei einer supraphysiologischen Dosis erhöht. Aus der Applikation einer niedrigeren und somit physiologischeren Dosis resultierte ein besseres Ergebnis bei geringerem Risikoprofil (94). Der Einsatz von BMPs ist mit hohen Kosten verbunden (73), die jedoch Studien zufolge vernachlässigbar sind, im Vergleich zu den Kosten, die mit der Entwicklung und Therapie einer Pseudarthrose assoziiert sind (96).

BMP-7, das auch als *osteogenic protein-1 (OP-1)* bezeichnet wird, (Abb. 9) besteht parallel zu dem oben beschriebenen Grundaufbau der BMPs aus einem Vorläuferprotein aus 431 Aminosäuren. Durch die proteolytische Aktivierung entsteht ein Homodimer mit 32 – 36 kDa Molekulargewicht, das aus zwei Monomeren mit jeweils 148 Aminosäuren besteht (73).

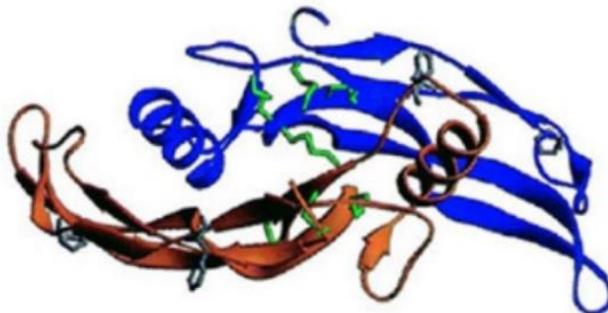


Abbildung 9: **Struktureller Aufbau von BMP-7**

Zwei Monomeren (blau und orange) bilden, durch Disulfidbrücken zwischen ihren Cysteinresten (grün) verbunden, ein Homodimer (76).

BMP-7 bewirkt neben einer Osteoinduktion (79, 84-86) auch die Induktion der Chondrogenese. Nach anfänglicher chondrogener Differenzierung erfolgt daraus die enchondrale Ossifikation (73, 79, 97). *In vivo* resultiert der Einsatz von BMP-7 in einer effizienteren Bildung von Knochengewebe als durch autologe Knochentransplantate. Bei Versagen dieser autologer Knochentransplantate konnte bei Affen durch BMP-7 dennoch eine Heilung von Knochendefekten erzielt werden (73, 98). Eine Anwendung von BMP-7 am Menschen zeigte allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen autologen Knochentransplantaten und BMP-7 (86). Daneben wird der Effekt von BMP-7 auch auf braunes Fettgewebe, Tumorzellen und die Niere untersucht. Aufgrund der Induktion der Bildung von braunem Fettgewebe könnte BMP-7 künftig ein vielversprechendes Pharmakon in der Therapie von Adipositas darstellen (73). In der Therapie von Knochenmetastasen von Mamma- und Prostatakarzinomen stellt BMP-7 ebenfalls ein attraktives Target dar, da es die Invasion der Tumorzellen durch Inhibition der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) verhindert (99). In Bezug auf die Nieren spielt BMP-7 eine wichtige Rolle. Neben der Bedeutung für eine korrekte embryonale Nierenentwicklung (100), scheint BMP-7 die Niere durch anti-fibrotische und anti-inflammatorische Effekte vor der Entwicklung einer Nierenfibrose zu schützen (101, 102).

1.6. ZENTRALE FRAGESTELLUNG

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Entwicklung eines thermoresponsiven Hydrogels, in dem unter den Aspekten des *Tissue Engineering*, angesiedelte humane mesenchymale Stammzellen durch die Stimulation mit Wachstumsfaktoren osteogen differenziert werden können. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- 1.) Umgang mit dem thermoresponsiven Pluronic® P123 in der *in vitro* Zellkultur. Welche Besonderheiten ergeben sich in der Anwendung eines thermoresponsiven Hydrogels in Bezug auf die tägliche Arbeit in der Zellkultur und anschließende Versuche?
- 2.) Aufgrund des synthetischen Charakters von Pluronic® P123 mit fehlenden Schlüsselsequenzen für die Zelladhäsion besitzt dieses Hydrogel eine geringe Biokompatibilität. Welchen Einfluss hat eine Modifikation mit Kollagen I durch Bereitstellung entsprechender Zelladhäsionssequenzen auf die Zellmorphologie und die Überlebensraten von Zellen im Hydrogel?
- 3.) Das thermoresponsive Pluronic® P123 wurde mit Hilfe der Kettenverlängerer HDI und BDI modifiziert. Das Zellüberleben, die Zellmorphologie und die Effektivität der osteogenen Differenzierung der hMSC im, mit HDI oder BDI modifizierten, Hydrogel wurde untersucht und miteinander verglichen. Welcher Kettenverlängerer führt am effektivsten zu den gewünschten Eigenschaften des Hydrogels und sollte weiter verfolgt werden?
- 4.) Osteogene Differenzierung von hMSC im, mit BDI kettenverlängerten, Pluronic® P123 *in vitro* nach einem etablierten Protokoll mit entsprechendem osteogenen Differenzierungsmedium. Ist ein Nachweis erfolgreicher Osteogenese auf den Ebenen des direkten Nachweises von Calcium oder Alkalischer Phosphatase, der histologischen Untersuchung und der Quantifizierung von Osteogenese-typischen Genen möglich?
- 5.) Zusätzliche Stimulation der Osteogenese durch den osteoinduktiven Wachstumsfaktor rhBMP-7. Kann die Effektivität der Osteogenese *in vitro* durch den Einsatz von rhBMP-7 gesteigert werden? Welche Konzentration von rhBMP-7 ist erfolgsversprechend?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 ZELLKULTUR

2.1.1 Humane mesenchymale Stammzellen

Single-cell-picked-1 (SCP-1) stellt eine Zelllinie von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) dar (67). Dieser Zellklon stammt von einer Knochenmarksstammzelllinie ab, die durch lentiviralen Gentransfer von einer humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) immortalisiert wurde. Die primären hMSC unterliegen einer Seneszenz und sind in ihrer Proliferationskapazität eingeschränkt. Die hTERT-immortalisierten SCP-1 exprimieren das Enzym Telomerase, die eine Verkürzung der Telomere verhindert und somit unbegrenzte Zellproliferation ermöglicht.

Da diese hMSC-Zelllinie, die weiterhin als Stammzelle osteogen, adipogen und chondrogen differenziert werden kann, über eine hohe und unbegrenzte Proliferationskapazität verfügt (67), wurde sie in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung von Zellmorphologie und Zellüberleben im Hydrogel eingesetzt. Die SCP-1 befanden sich in den Passagen p 75 bis p 85.

Neben den immortalisierten Stammzellklonen wurde auch mit primären hMSC (Cambrex-Lonza GmbH, Germany) gearbeitet. Die hMSC Zelllinie (Donor XV, 34-jährige Frau) befand sich bei der Anwendung in den Passagen p 5 bis p 8. Das osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierungspotenzial wurde in vorangegangenen Studien nachgewiesen (103).

2.1.2 Methoden der Zellkultivierung

Die Zellexpansion erfolgte in sterilen Zellkulturflaschen, die Kultivierung der zellbesiedelten Hydrogele in 24-Wellplatten (1,9 cm²) (Nunc-Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland). Geeignete Umweltkonditionen mit 95 % Luft, 5 % CO₂ und 37 °C wurden durch den Einsatz eines Inkubator (Jouan, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) sichergestellt. Als Nährmedium wurde *minimal essential medium* α (MEM α) (Gibco - Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) mit 10 % fetalem bovines Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 40 IU/ml Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) für die SCP-1 und mit 15 % FBS und 40 IU/ml Penicillin/Streptomycin für die primären hMSC eingesetzt. Zweimal wöchentlich wurde ein Mediumwechsel durch Absaugen des verbrauchten Mediums und Versorgung mit frischem Medium durchgeführt.

Die Zellpassage erfolgte vor Erreichen von Zellkonfluenz. Nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Waschen mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland), wurden die SCP-1 in PBS verdünntem 1 x Trypsin/EDTA (Gibco - Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) und die primären hMSC in 5 x Trypsin/EDTA für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsstop von Trypsin/EDTA erfolgte mittels Zugabe der doppelten Menge an Medium.

Die genaue Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10 μ l Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und deren vier Großquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Multiplikation der mittleren Zellzahl pro Großquadrat mit 1×10^4 ergab die Zellzahl pro ml. Es folgte eine weitere Zellexpansion durch Aufsplitten der Zellzahl in neue Zellkulturflaschen oder das Einfrieren von Zellen.

2.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Das Einfrieremedium bestand aus 70 % des jeweiligen Nährmediums, 20 % FBS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Deutschland). Zellsuspensionen mit je 1×10^6 Zellen wurden bei $500 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert und das überstehende Medium abgesaugt. Nach Resuspension in 1,5 ml Einfrieremedium, erfolgte der zügige Transfer in sterile Kryoröhrchen mit Lagerung auf Trockeneis und anschließender Aufbewahrung in einem Stickstofftank.

Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen in ein Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ getaucht. Sobald die Zellsuspension aufgetaut war, wurde diese rasch in eine Zellkulturflasche mit warmem Nährmedium transferiert. Nach 6-8 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel mit Entfernen des zellschädlichen DMSO.

2.2 THERMORESPONSIVES HYDROGEL

2.2.1 Herstellung des Hydrogels

In der vorliegenden Dissertation wurde mit Pluronic® P123 (Abb. 10) gearbeitet. Für höhere Stabilität und verbesserter thermoresponsiver Eigenschaften wurde das P123 mit den Kettenverlängerern Hexamethylen-diisocyanat (HDI) oder Butan-diisocyanat (BDI) von dem kooperierenden Unternehmen (Polymaterials AG, Kaufbeuren, Deutschland) modifiziert. Im Folgenden werden diese als HDI-Hydrogel und BDI-Hydrogel bezeichnet.

Zur Herstellung des Hydrogels wurde je 1 g des Polymers autoklaviert. Für ein 11 %-iges Hydrogel wurde nach dem Autoklavieren 8 ml Nährmedium (MEM α oder *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), je nach Versuch) zu 1 g P123-Polymer zugegeben und vorsichtig vermengt (Abb. 11 A). Das Medium wurde angereichert mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Das Polymer löste sich über einen Zeitraum von 3 Tagen. Für diesen Vorgang wurde das Gel bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und jeden Tag mit einer Pipettenspitze gemischt. Nach spätestens drei Tagen war die entstandene Hydrogellösung homogen und einsatzbereit (Abb. 11 B). Das gelöste Polymer war bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ flüssig und

verfestigte sich, unter Ausbildung von Mizellen, ab der LCST von 27,6 °C für das HDI-Hydrogel und 26,2 °C für das BDI-Hydrogel (Abb. 11 C).



Abbildung 10: **BDI-verlängertes Pluronic® P123 im Rohzustand**

2.2.2 Modifikation mit Kollagen I

Zur Verbesserung der Zelladhäsion wurden Schlüsselsequenzen im Hydrogel geschaffen. Dazu wurde eiskaltes, gelöstes Kollagen I (3,3 mg/ml, Millipore – Merck, Schwalbach, Deutschland) in einer Konzentration von 20 % in das eisgekühlte Poloxamer-Hydrogel pipettiert und homogen gemischt. Zu 200 µl Poloxamer-Hydrogel wurde dementsprechend jeweils 50 µl Kollagen I pipettiert (Gesamtvolumen 250 µl).

2.2.3 Besiedlung der Hydrogele mit Zellen

Zur Besiedlung der Hydrogele, wurden die Zellen zunächst mit 1 x Trypsin/EDTA für die SCP-1 und mit 5 x Trypsin/EDTA für die primären hMSC abgelöst und unter der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Pro Gelpellet wurden 5×10^5 Zellen benötigt. Die entsprechende Zellzahl wurde bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in MEM α -Medium (1/10 des Gesamtvolumens des Hydrogels) resuspendiert. Die folgenden Arbeitsschritte fanden im eisgekühlten Hydrogel statt, um ein vorzeitiges Polymerisieren zu verhindern.

In eine sterile 24-Wellplatte wurde jeweils 250 µl Hydrogel pro Well transferiert. Dazu wurden jeweils 5×10^5 Zellen in 25 µl Nährmedium pipettiert und vorsichtig homogen gemischt. Nach dem Gelieren (15 Minuten, 37 °C) wurde jeweils 1 ml warmes Medium (37 °C) auf das Gelpellet zugegeben (Abb. 11 D). Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf vorgewärmten Gelkompressen, um die Temperatur oberhalb der LCST zu halten.

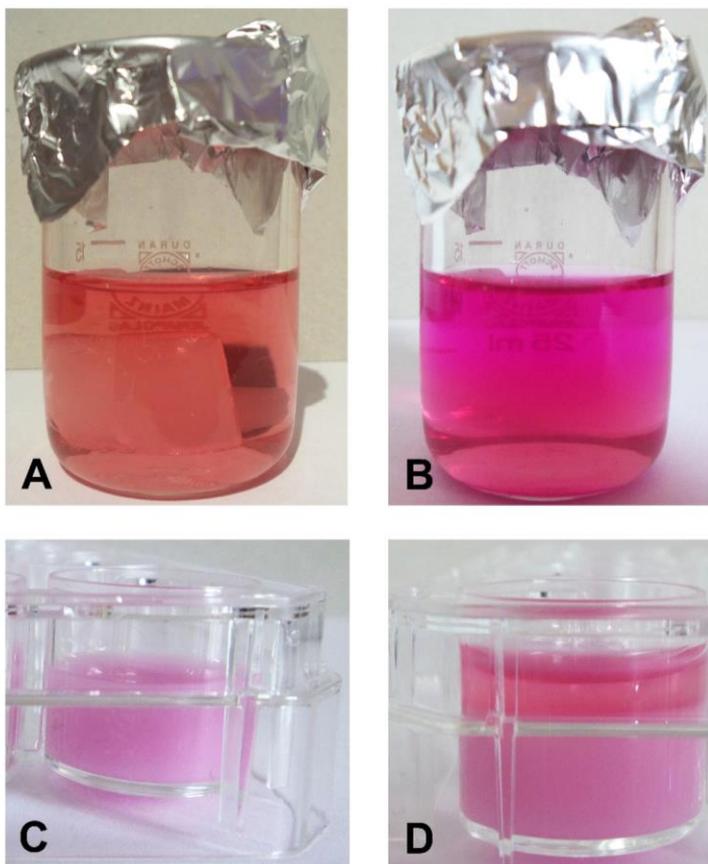


Abbildung 11: **BDI-verlängertes Pluronic® P123 nach Zugabe von Medium**

Direkt nach Zugabe von 8 ml Nährmedium zu je 1 g Polymer (A). Nach 3 Tagen (4 °C) homogene und einsatzbereite Hydrogellösung (B). Oberhalb der LCST (37 °C) gelierte das Poloxamer durch Mizellenbildung (C). Auf das zellbesiedelte Polymergel wurde je 1 ml Medium gegeben (D).

2.3 OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG

2.3.1 Osteogenes Differenzierungsprotokoll

Die osteogene Differenzierung erfolgte mittels eines etablierten Differenzierungsmediums. Dieses bestand aus *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco - Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) mit 40 IU/ml Penicillin/Streptomycin und 10 % FBS, und den Zusätzen 100 nM Dexamethason, 10 mM β -Glycerophosphat und 50 μ M L-Ascorbinsäure (32).

48 Stunden nach der Besiedelung der Hydrogele wurde, nach Entfernen des verbrauchten Mediums, die osteogene Differenzierung durch die Zugabe von 1 ml Differenzierungsmedium pro 24-Well gestartet. Zweimal pro Woche wurde ein

Mediumwechsel durchgeführt. Die Dauer der Differenzierung wurde auf 25 Tage für die primären hMSC und auf 35 Tage für die SCP-1 festgelegt. Von Tag 25 – 35 wurde im Differenzierungsmedium für die SCP-1 die Konzentration von Dexamethason auf 200 nM und L-Ascorbinsäure auf 100 µM verdoppelt.

Eine Negativkontrolle in MEM α wurde bei jedem Versuch mitgeführt.

2.3.2 Stimulation durch rhBMP-7

Als osteoinduktiver Wachstumsfaktor wurde rekombinantes humanes BMP-7 (rhBMP-7) (R&D systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) eingesetzt. Das als Pulver vorliegende rhBMP-7 wurde in einer steril filtrierten Lösung aus Aqua_{dest.} (Millipore – Merck, Schwalbach, Deutschland) mit bovinem Serumalbumin (BSA) und 4 M HCL resuspendiert und in einer Konzentration von 10 µg/100 µl verdünnt. Es folgte eine Aliquotierung zu je 10 µl und die Aufbewahrung bei -20 °C bis zum Einsatz.

Ab Tag 6 wurde die osteogene Differenzierung zusätzlich durch rhBMP-7 stimuliert. Bei jedem Mediumwechsel wurde, neben 1 ml osteogenem Differenzierungsmedium, fortan rhBMP-7 in den Konzentrationen 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml zu den jeweiligen Pellets hinzugegeben.

2.4 ZELLÜBERLEBEN UND ZELLMORPHOLOGIE IM GEL

2.4.1 WST-1-Assay

Mittels des Zellproliferationsreagenz *water soluble tetrazolium 1* (WST-1) (Roche, Mannheim, Deutschland) wurden die Zytotoxizität des Hydrogels und die Zellproliferation im Hydrogel untersucht. Nur stoffwechselaktive Zellen mit intakter Atmungskette sind fähig, das hellrote Tetrazoliumsalz WST-1 in das dunkelrote Formazan enzymatisch umsetzen (Abb. 12). Das Ausmaß dieses Farbumschlags korreliert direkt mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen.

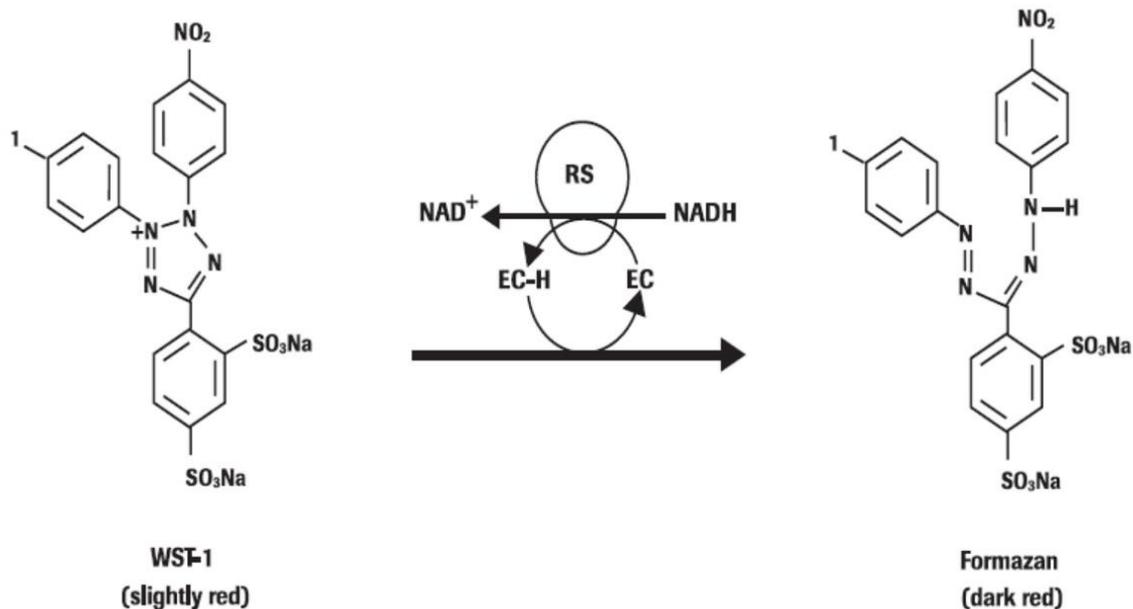


Abbildung 12: **WST-1-Assay**

Enzymatische Umsetzung des hellroten Tetrazoliums Salzes WST-1 zu dunkelrotem Formazan (EC = mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System) (104)

In der vorliegenden Dissertation wurden HDI- und BDI-Hydrogel, jeweils mit und ohne 20 % Kollagen I, mit 5×10^5 SCP-1 besiedelt und in MEM α kultiviert. Nach einem Zeitraum von 2, 7, 14 und 21 Tagen wurde der WST-1-Assay durchgeführt. Dazu wurde WST-1-Reagenz (1/10 des Gesamtvolumens von Gelpellet und Medium) zur Probe pipettiert. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37 °C, wurde kurz auf einem Shaker gemischt und 50 μ l des Mediums in eine 96-Wellplatte transferiert. Die Absorption des Farbumschlags wurde kolorimetrisch bei 450 nm und 620 nm Wellenlänge in dem *Multiskan FC Microplate* Photometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) gemessen.

2.4.2 Giemsa-Färbung

In der Giemsa-Färbung (Azur-Eosin-Methylenblaulösung) werden, durch Komplexbildung mit Nukleinsäuren, Zellkerne purpurrot und Zytoplasma blau gefärbt. Die Giemsa-Stocklösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde in dem Verhältnis 1:20 in Aqua_{dest.} verdünnt. Nach Entfernung des Mediums und zweimaligem Waschen mit warmen Aqua_{dest.}, wurden die Gelpellets mit der verdünnten, warmen Giemsa-Färbelösung bedeckt und inkubiert (15 Minuten, 37 °C). Nach Abpipettieren der

Färbelösung und zweimaligem Waschen mit Aqua_{dest.} erfolgte die Beurteilung der Färbung unter dem Lichtmikroskop Axiovert S100 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) mit der Farbkamera AxioCam ICc3 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) bei 20 x Vergrößerung.

2.4.3 Live-Dead-Assay

Das Zellüberleben und deren Morphologie im Hydrogel wurden mit Hilfe einer Lebend-Tot-Färbung untersucht. Der *Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit* (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) besteht aus 2 Fluoreszenzfarbstoffen: Calcein AM markiert lebende Zellen durch grüne Fluoreszenz. Ehtidiumbromid-III passiert beschädigte Zellmembranen und emittiert eine rote Fluoreszenz.

Die Färbung der osteogen differenzierten Gelpellets erfolgte durch die Färbelösung aus PBS mit 2 mM Ethidiumbromid-III und 4 mM Calcein AM. Durch warme Gelkompressen wurde eine Verflüssigung des Gels verhindert. Nach zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Pellets mit je 1 ml der Färbelösung benetzt und unter Lichtschutz inkubiert (30 Minuten, 37 °C). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Pellets mikroskopiert.

2.4.4 Fluoreszenzmikroskopie

Als Fluoreszenzmikroskop wurde das Axio Observer Z1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) mit der Kamera AxioCam MRm (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) eingesetzt. Es wurden Mikroskopaufnahmen mit den Zeiss Filter-Sets # 10 und # 15 mit einer 5 x und 20 x Vergrößerung durchgeführt und mit der Software AxioVision (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) bearbeitet.

2.4.5 CLSM

Das Konfokale Laser-Rastermikroskop (CLSM) (Abb. 13) ermöglicht hoch auflösende, kontrastreiche Mikroskopaufnahmen. Als Lichtquelle fungiert ein Argonlaser, der durch einen Kollimator gebündelt wird und über ein Spiegelsystem Zeile für Zeile die Probe scannt (105). Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird vom Detektor aufgenommen (105)

In der vorliegenden Dissertation wurde das Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) mit einem Argonlaser von 488 nm (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland), den Filtern LP 420 und 505 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) und dem Objektiv Plan-Apochromat 63 x / 1.4 Öl DIC (Carl Zeiss

Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) eingesetzt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software LSM Image Browser (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland).

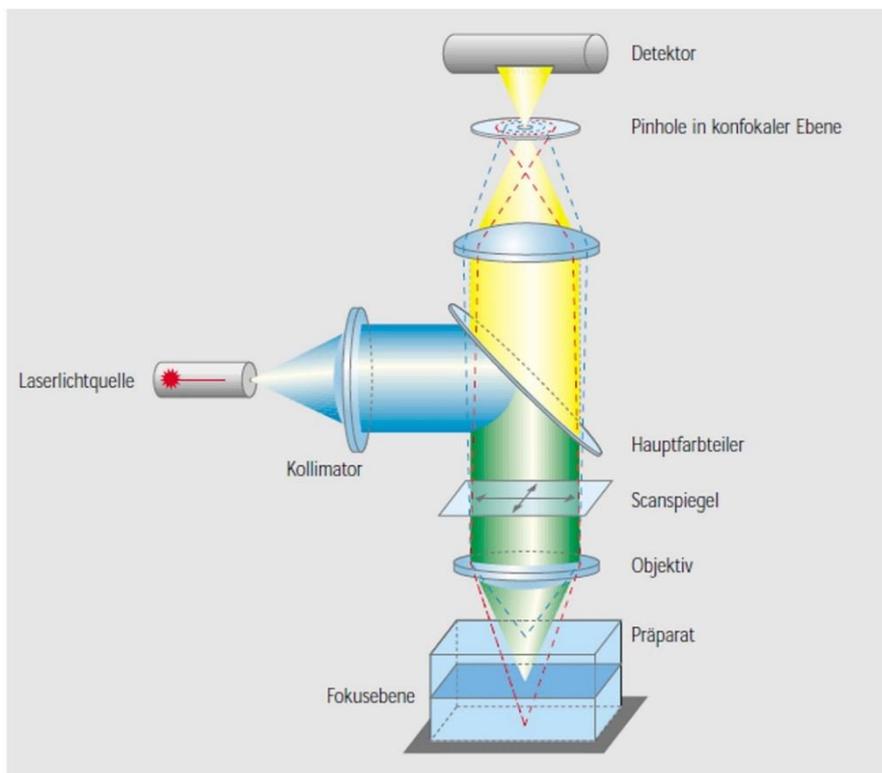


Abbildung 13: **Konfokales Laser-Rastermikroskop**

Strahlengang im Konfokalen Laser-Rastermikroskop (CLSM) (105)

2.5 NACHWEIS DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG

2.5.1 Direkter Nachweis osteogener Matrix und Enzyme

2.5.1.1 Alizarin-Rot-Assay

Zur Alizarin-Rot-Färbung wurde der *Osteogenesis Assay Kit* (Millipore – Merck, Schwalbach, Deutschland) eingesetzt. Das Anthrachinon-Derivat Alizarin-Rot-S ermöglicht den visuellen Nachweis erfolgreicher osteogener Differenzierung. Durch Chelatbildung mit Calcium-Ionen entstehen rötliche Alizarin-Rot-S-Calcium-Komplexe. Die Quantifizierung der Osteogenese erfolgte durch Extraktion des in das Gewebe aufgenommenen Farbstoffs.

Die praktische Durchführung der Färbung erfolgte zur Stabilisierung der Mizellen zunächst bei 37 °C. Nach Entfernung des Mediums, zweimaligem Waschen mit PBS und Waschen mit Aqua_{dest.}, wurden die Pellets in Eppendorf-Gefäße transferiert. Zur Verflüssigung des Polymers folgte die Lagerung bei 4 °C für 30 Minuten. Nach einer Zentrifugation (5 Minuten, 12.000 rpm) wurde der Überstand entfernt und mit Aqua_{dest.} gewaschen. Diese Schritte wurden dreimal wiederholt. Das Pellet wurde mit 250 µl Alizarin-Rot resuspendiert und inkubiert (30 Minuten). Es folgte eine dreimalige Zentrifugation (5 Minuten, 12.000 rpm) und das Waschen mit Aqua_{dest.}. Zur Extraktion des aufgenommenen Farbstoffs wurden 400 µl Zellyse-Puffer auf die Alizarin-Rot-S-Calcium-Komplexe pipettiert und für 30 Minuten auf einem Shaker gelagert. Die Lyse erfolgt durch Erhitzen (10 Minuten, 85 °C) und anschließender Lagerung auf Eis (5 Minuten). Nach erneuter Zentrifugation (20 Minuten, 13.000 rpm), wurden 108 µl des Überstands in ein 96-Well transferiert und der pH durch 40,5 µl Ammoniumhydroxid neutralisiert. Die Absorption wurde bei 405 nm im *Multiskan FC Microplate* Photometer gemessen. Die Kalkulation der Alizarin-Rot-Konzentration in µM erfolgte anhand einer Standardkurve aus der OD_{405nm}.

2.5.1.2 ALP-Aktivität-Assay

Das Enzym Alkalische Phosphatase (ALP) ist unter anderem am Knochenstoffwechsel beteiligt und ein früher Marker der Osteogenese. Die Aktivität der ALP im zellbeladenen Hydrogel wurde mit Hilfe des *StemTAG™ Alkaline Phosphatase Activity Assay Kit* (Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA) quantifiziert.

Nach dem Transfer der Gelpellets in Eppendorf-Gefäße folgten Reinigungsschritte. Dazu wurde, nach der Auflösung der Mizellenstruktur bei 4 °C für 30 Minuten, zweimal zentrifugiert (5 Minuten, 500 x g), der Überstand entfernt und mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte durch Behandlung mit 200 µl Zellyse-Puffer (20 Minuten, 4 °C). Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten, 12000 x g) wurde der Überstand als Zellysat in neue Eppendorf-Gefäße transferiert. Die Reaktion der Alkalischen Phosphatase in je 50 µl Zellysat wurde durch 50 µl Activity Assay Substrat gestartet und nach 30 Minuten Inkubation (37 °C) durch 50 µl 1 x Stoplösung gestoppt. Das Ausmaß der ALP-Aktivität wurde anhand der Absorption im *Multiskan FC Microplate* Photometer bei 405 nm bestimmt. Anhand einer Standardkurve erfolgte die Kalkulation der p-Nitrophenol-Konzentration (nM) aus der OD_{405nm}.

2.5.2 Histologischer Nachweis

2.5.2.1 Kryoeinbettung und Schneiden der Hydrogele

Die Fixation der Gelpellets erfolgte in 4 % Paraformaldehyd (PFA) (30 Minuten, 37 °C). Nach zweimaligem Waschen mit Aqua_{dest.} (15 Minuten, 37 °C), wurden die Pellets direkt in das Kryo-Einbettmedium *Tissue-Tek® O.C.T™ Compound* (Sakura, Staufen, Deutschland) eingebettet. Die Kryopräparate wurden bei -20 °C gelagert.

Aus den Präparaten wurden an einem Kryotom (CryoStar, Thermo Scientific, Waltham, USA) bei -20 °C Gewebeschnitte von 30 µm gewonnen. Die fertigen Schnitte wurden auf einen Glasobjektträger aufgebracht und bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.2.2 Von-Kossa-Färbung

Das Silbernitrat der Von-Kossa-Färbung (Merck, Darmstadt, Deutschland) reagiert mit Calcium-Ionen und bewirkt durch Reduktion von Ag^+ zu Ag^0 eine Schwarzfärbung.

Nach zweimaligem Waschen der Kryoschnitte mit Aqua_{dest.} (3 Minuten), wurden die Schnitte mit 2,5 % Silbernitratlösung bedeckt und 15 Minuten unter einer 60 Watt Lampe inkubiert. Nach dem Färben wurden die Proben zweimal mit Aqua_{dest.} gewaschen (3 Minuten).

2.5.2.3 Alizarin-Rot-Färbung

Nach zweimaligem Waschen in Aqua_{dest.} (3 Minuten), wurden die Schnitte für 30 Sekunden mit der Alizarin-Rot-Färbelösung des *Osteogenesis Assay Kit* bedeckt. Die restliche Farbe wurde durch Kippen des Objektträgers entfernt.

2.5.2.4 Mikroskopie und Quantifizierung der histologischen Färbung

Zur Mikroskopie wurde das Lichtmikroskop Axiovert S100 mit der Farbkamera AxioCam ICc3 eingesetzt. Es wurden je 10 Bildausschnitte innerhalb der Pellets bei 10 x Vergrößerung aufgenommen.

Zur Quantifizierung der Von-Kossa-Färbung wurden die Aufnahmen in der Software *Image J* (Wayne Rasband - National Institutes of Health, Bethesda, USA) in eine binäre Darstellung (schwarz-weiß) konvertiert und die Anzahl der schwarzen Pixel pro Fläche der einzelnen Aufnahmen bestimmt. Aus diesen Werten wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung ermittelt.

2.5.3 Molekularbiologische Untersuchung der Osteogenese

2.5.3.1 RNA-Isolierung

Das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde zur RNA-Isolierung eingesetzt.

Zur Spaltung des zugefügten Kollagen I erfolgte eine initiale Behandlung mit Collagenase (0,3 mg Collagenase in 3 ml PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Nach zweimaligem Waschen der Gelpellets mit PBS (37 °C), wurden die Pellets in der Collagenase-Lösung (dem Volumen des Gelpellets entsprechend 275 µl), inkubiert (30 Minuten, 37 °C). Der Reaktionsstop erfolgte mit der doppelten Menge an Medium (550 µm). Durch zweimaliges Zentrifugieren (5 Minuten, 500 x g) und Waschen mit PBS wurde das gespaltene Kollagen I entfernt. Der nächste Schritt bestand in der Zugabe von 350 µl der RNA-Isolierungslösung aus QIAzol (Qiagen, Hilden, Deutschland) und Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) (Verhältnis 5:1). Nach 5 Minuten auf Eis und Durchmengen mit einer Pipettenspitze entstand eine homogene Masse. Nach einer Zentrifugation (15 Minuten, 4 °C, 12000 x g) wurde die oberste wässrige Phase in ein neues Sammelgefäß transferiert. Es folgten die Zugabe von 175 µl Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland), Zentrifugation (15 Minuten, 4 °C, 12000 x g) und das Entfernen des Überstands. Das RNA-Pellet wurde in 350 µl 70 % Ethanol aufgenommen und in die Mini-Beladungssäule transferiert. Es folgten Zentrifugations-Schritte (10000 rpm) mit Verwerfen des jeweiligen Filtrates. Zwischen jeder Zentrifugation wurde die RNA durch das Waschen mit RW1-Puffer bzw. RWE-Puffer weiter aufgereinigt. Zur Reduzierung von DNA-Kontamination erfolgte eine Behandlung mit DNase. Nach abschließend zweimaliger Zentrifugation (10000 rpm) in 100 µl RNase-freiem Wasser war die RNA aufgereinigt und isoliert.

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde im Spectrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen. Die Probe mit der geringsten RNA-Menge (2,4 ng/µl in 50 µl, entsprechend 120 ng RNA) war maßgebend für die eingesetzte RNA-Menge für die cDNA-Synthese aller Proben.

2.5.3.2 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das *cDNA Synthesis Kit* (Roche, Mannheim, Deutschland) genutzt. Das jeweilige Volumen mit der, für alle Proben gleich definierten RNA-Menge, wurde in einer Vakuumpumpe (RC 10.10, Jouan GmbH, Unterhaching, Deutschland) auf ein Volumen ≤ 11 µl konzentriert. Der Primer-Mix (je 13 µl) wurde aus 2 µl Primer, dem RNA-Volumen ≤ 11 µl und Aqua_{dest.} hergestellt. Der Master-Mix besteht aus 4 µl Puffer, 0,5 µl RNase, 2 µl dNTPs und 0,5 µl Reverse Transkriptase. Nach der initialen Denaturierung (10 Minuten, 65 °C) wurden zu 13 µl Primer-Mix je 7 µl Master-Mix

hinzugegeben. Die cDNA-Amplifikation erfolgte im *peqSTAR 2X Thermocycler* (Peqlab, Erlangen, Deutschland) nach den folgenden Schritten:

- 1.) Erhitzen auf 110 °C
- 2.) 25 °C für 10 Minuten
- 3.) 50 °C für 60 Minuten
- 4.) 85 °C für 5 Minuten
- 5.) Reaktionsstop und Kühlen auf 8 °C

Nach Durchführung der cDNA-Synthese wurde die cDNA in -20 °C aufbewahrt.

2.5.3.3 Real-time quantitative Polymerase Kettenreaktion

Die cDNA wurde durch eine *Real-Time-quantitative-PCR* (RTQ-PCR) polymerisiert. So erfolgte die direkte Quantifizierung der Expression eines jeweiligen Gens. Es werden die Gene Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (*housekeeping gene*), *runt-related transcription factor 2* (Runx-2 = CBFA-1), alkalische Phosphatase (= ALP) und Osteopontin (= OPN = ETA-1) (alle als LightCycler - Primer Set, Search-LC GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingesetzt (Abb. 14). Zur Erstellung einer Standardkurve lief neben den eigentlichen Proben immer der zum jeweiligen Primer gehörende Standard in verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000) mit.

Marker genes	Sense primer (5'-3')	Anti-sense primer(3'-5')
OP	GCAACCGAAGTTTTCACTCC	GCTCTCATCATTGGCTTTCC
Runx2	TGTCATGGCGGGTAACGAT	AAGACGGTTATGGTCAAGGTGAA
ALP	ACGTGGCTAAGAATGTCATC	CTGGTAGGCGATGTCCTTA
GAPDH	ATTTGGTCGTATTGGGCG	TGGAAGATGGTGATGGGATT

Abbildung 14: Primer der RTQ-PCR zur Beurteilung der Osteogenese

OP: Osteopontin, Runx2: *runt-related transcription factor 2*, ALP: Alkalische Phosphatase, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (106)

Zur Durchführung der sensitiven RTQ-PCR wurde die cDNA ein einem Verhältnis von 1:10 mit Aqua_{dest} verdünnt. Der PCR-Mix wurde unter Lichtschutz aus 2 µl Primer, 2 µl Master-Mix (Light Cycler Fast Start DNA – SYBR Green, Roche, Mannheim, Deutschland) und 6 µl Aqua_{dest}. hergestellt. In einer vorgekühlten Zentrifugenplatte

wurden die Glaskapillare mit je 10 µl PCR-Mix befüllt. Auf die 10 µl PCR-Mix wurden 10 µl Aquadest. als Negativkontrolle, 10 µl Standard oder 10 µl cDNA pipettiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 660 rpm), wurden die Kapillaren in den *Light Cycler 1.5* (Roche, Mannheim, Deutschland) transferiert und das PCR-Programm mit den folgenden Schritten gestartet:

1.) Denaturierung:		95 °C, 10 Minuten
2.) Amplifikation (pro cycle):	I	95 °C, 15 Sekunden
	II	68 °C, 10 Sekunden
	III	72 °C, 16 Sekunden
3.) Schmelzkurve	I	95 °C, 0 Sekunden
	II	58 °C, 10 Sekunden
	III	95 °C, 0 Sekunden
4.) Abkühlen		40 °C, 30 Sekunden

Die Auswertung der Genexpression erfolgte als relative Quantifizierung. Dabei wurde das jeweilige Zielgen, ALP, OPN oder Runx-2, auf das *housekeeping gene* GAPDH normalisiert.

2.6 STATISTIK

Alle Versuche wurden mindestens in zwei unabhängigen Durchläufen bei gleichen Konditionen durchgeführt. Pro Durchlauf und Testgruppe wurden je drei Proben eingeschlossen. Aus den Ergebnissen der Triplets und der verschiedenen Durchläufe wurde der Mittelwert mit Standardabweichung kalkuliert. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden durch den *Student's* t-Test berechnet. Als Signifikanzlevel wurde dabei ein $p < 0,05$ definiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. ZELLÜBERLEBEN UND MORPHOLOGIE IM HYDROGEL

3.1.1. Zellüberlebensanalyse im HDI-Hydrogel und BDI-Hydrogel

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Überleben und Proliferation der angesiedelten Zellen im mit BDI oder HDI kettenverlängerten Pluronic® P123 (BDI- und HDI-Hydrogel). Dies wurde durch den WST-Assay, dessen Absorptionswerte direkt mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen korrelieren, bestimmt. Neben dem Vergleich von HDI-Hydrogel und BDI-Hydrogel, wurde auch der Effekt von 20 % Kollagen I auf das Zellüberleben im Vergleich von 100 % Hydrogel und 80 % Hydrogel (mit 20 % Kollagen I) analysiert. Der Zeitraum der Überlebenskurve begann 2 Tage nach Besiedelung bei Zelladhärenz.

Die im 100 % HDI-Hydrogel (Abb. 15) angesiedelten SCP-1 führten 2 Tage nach Besiedlung zu einer Absorption von 0,141 (\pm ST 0,039). Im Zeitverlauf nahm die metabolische Aktivität ab mit einer Extinktion von 0,022 (\pm ST 0,001) nach 7 Tagen und 0,016 (\pm ST 0,011) nach 14 Tagen. Nach 21 Tagen wurde photometrisch eine Absorption von 0,011 (\pm ST 0,006) gemessen.

Im Vergleich dazu startete die Überlebenskurve der SCP-1 im 80 % HDI-Hydrogel (Abb. 15) 2 Tage nach Besiedlung mit einer Absorption von 0,242 (\pm ST 0,051). Auch in dieser Gruppe nahm die Extinktion und damit korrelierend die Zahl metabolisch aktiver Zellen im Hydrogel ab. Nach 7 Tagen wurde im Photometer eine Absorption von 0,109 (\pm ST 0,016) gemessen, nach 14 Tagen 0,107 (\pm ST 0,019). Nach 21 Tagen ergab sich eine Extinktion von 0,078 (\pm ST 0,008).

Die statistische Auswertung mittels *Student's t-Test* ergab statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Absorptionsniveaus und somit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen in 100 % HDI-Hydrogel im Vergleich zu dem 80 % HDI-Hydrogel. Bei $p < 0,05$ waren die Werte im mit Kollagen modifizierten HDI-Hydrogel zu jedem der Messpunkte (2, 7, 14 und 21 Tage) signifikant höher. Nach 14 Tagen und 21 Tagen war der Unterschied signifikant bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$.

Die Anzahl metabolisch aktiver SCP-1 im 100 % BDI-Hydrogel (Abb. 16) startete zum Zeitpunkt Tag 2 mit einer Absorption von 0,130 (\pm ST 0,002). Nach 7 Tagen befand sie sich bei 0,140 (\pm ST 0,017). Die Messungen im Verlauf zeigten eine Abnahme der Extinktion und dementsprechend des Zellmetabolismus von 0,063 (\pm ST 0,004) nach 14 Tagen und 0,048 (\pm ST 0,008) nach 21 Tagen.

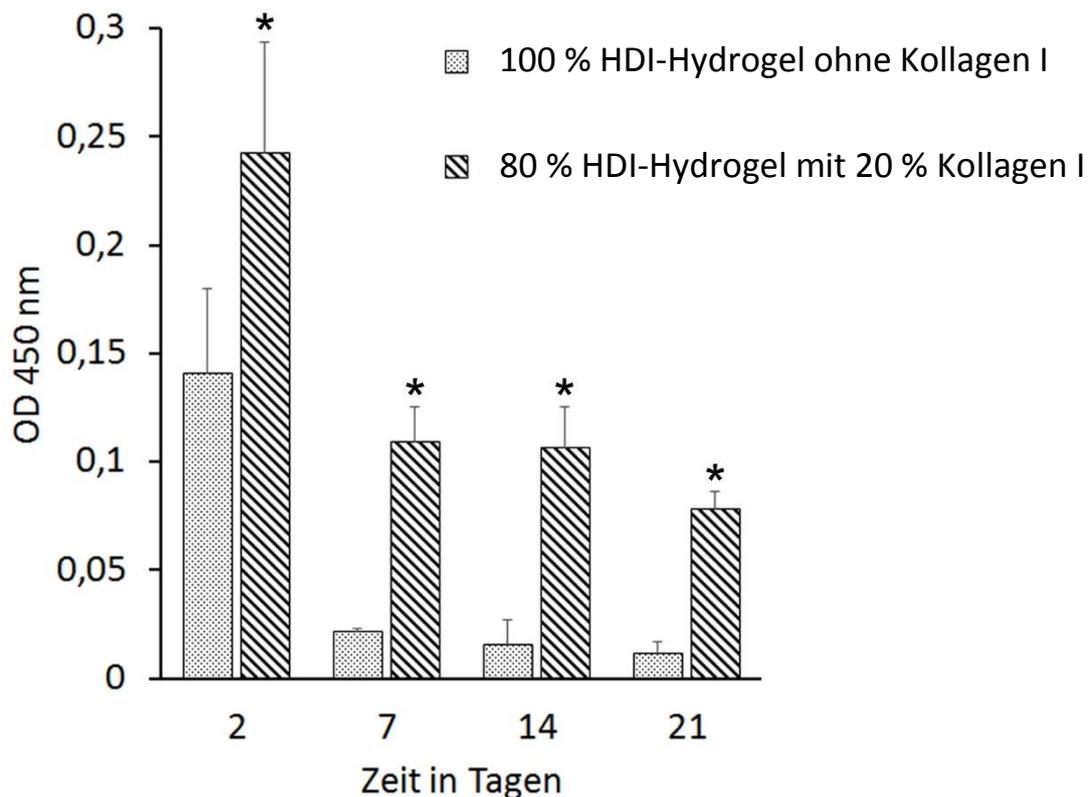


Abbildung 15: Zellüberleben im HDI-Hydrogel

Absorptionswerte (OD 450 nm) im WST-Assay korrelieren mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen. Verglichen werden die Gruppen 100 % HDI-Hydrogel mit 80% HDI-Hydrogel zu den Zeitpunkten 2, 7, 14 und 21 Tage. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen 80 % und 100 % Hydrogel besteht bei einer Markierung mit *.

Der Zellmetabolismus war im 80 % BDI-Hydrogel (Abb. 16) von Tag 2 bis 21 höher als im 100 % BDI-Hydrogel. Zu Beginn nach 2 Tagen lieferten die stoffwechselaktiven SCP- 1 einen enzymatischen Farbumschlag mit einer Extinktion von 0,232 (\pm ST 0,001). Im Verlauf nahm diese ab, mit 0,179 (\pm ST 0,025) nach 7 Tagen und 0,095 (\pm ST 0,008) nach 14 Tagen. Nach 21 Tagen erzeugten die Zellen eine Absorption von 0,086 (\pm ST 0,007).

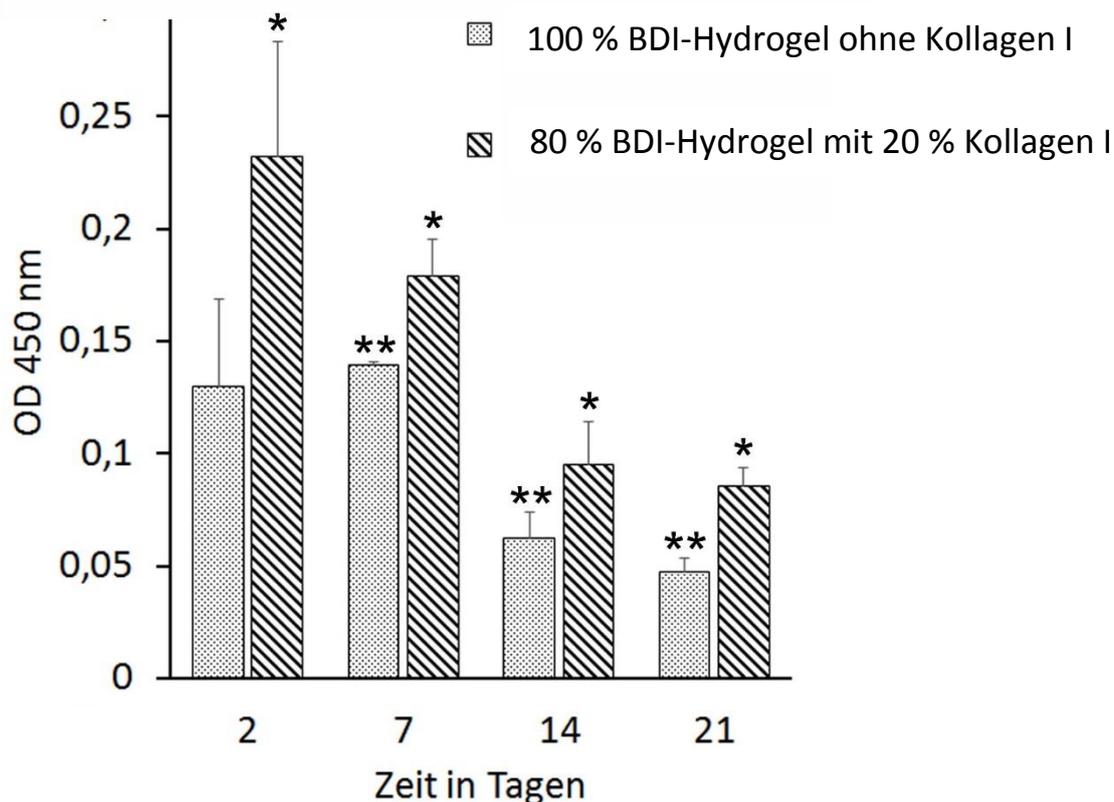


Abbildung 16: **Zellüberleben im BDI-Hydrogel**

Absorptionswerte (OD 450 nm) im WST-Assay korrelieren mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen. Verglichen werden die Gruppen 100 % BDI-Hydrogel mit 80 % BDI-Hydrogel zu den Zeitpunkten 2, 7, 14 und 21 Tage. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen 80 % und 100 % Hydrogel besteht bei einer Markierung mit *. Bei einer Markierung mit ** besteht statistische Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen BDI-Hydrogel und entsprechendem HDI-Hydrogel.

Die statistische Auswertung ergab über die gesamte Messperiode für die mit Kollagen modifizierten BDI-Hydrogele signifikant höhere Werte. Nach 2 Tagen war der Unterschied statistisch signifikant bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$. Nach 7, 14 und 21 Tagen war der Unterschied signifikant bei $p < 0,05$.

In einem Vergleich des Zellmetabolismus von 100 % HDI-Hydrogel und 100 % BDI-Hydrogel zeigte sich für die Ausgangswerte der jeweiligen Messungen nach 2 Tagen kein statistisch signifikanter Unterschied. Erst im Verlauf, zu den Zeitpunkten 7, 14 und 21 Tagen, lag die Absorptionsrate im 100 % BDI-Hydrogel signifikant höher ($p < 0,05$) als im 100 % HDI-Hydrogel. In der statistischen Auswertung mittels t-Test resultierte kein

signifikanter Unterschied im gesamten Zeitraum der Beobachtung zwischen dem mit 20 % Kollagen I modifiziertem 80 % HDI-Hydrogel und 80 % BDI-Hydrogel.

3.1.2. Morphologie der Zellen im Hydrogel

Die Analyse der Zellmorphologie im HDI-Hydrogel und BDI-Hydrogel, sowie der Effekte der Modifikation mit Kollagen I erfolgte durch Giemsa-Färbungen und Lebend-Tot-Färbungen nach 31 Tagen Zellkultur.

Exemplarisch wurde das mit SCP-1 besiedelte, 80 % HDI-Hydrogel-Pellet nach 31 Tagen Inkubation mit Giemsa gefärbt (Abb. 17). Es zeigte sich eine kugelförmige Anordnung der Zellen. Die blau gefärbten Zellen mit dunkler erscheinenden Kernen ordneten sich in einer Sphäroid-Form im Hydrogel an. Außerhalb dieser Sphäroide waren einzelne Zellen im Hydrogel erkennbar.

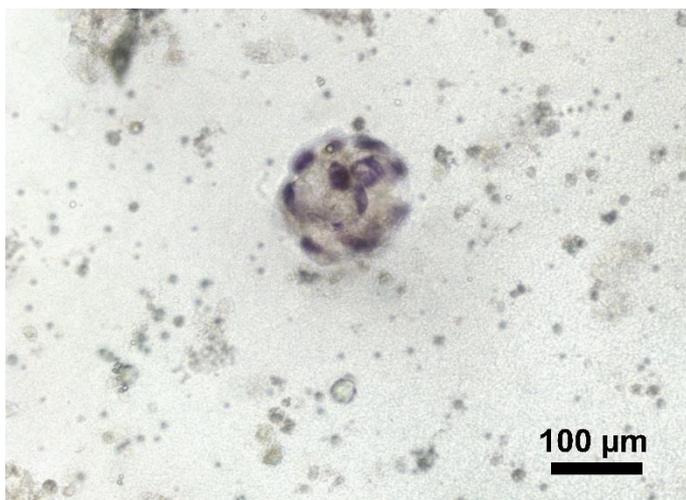


Abbildung 17: Zellmorphologie im Pluronic® P123 in der Giemsa-Färbung

Blau gefärbte Zellen mit dunklen Zellkernen ordneten sich nach 31 Tagen Zellkultur kugelförmig zu Zellsphäroiden an. Maßstab 100 µm pro Balken.

Detaillierter untersucht wurde diese interessante Morphologie durch Lebend-Tot-Färbungen an hMSC-besiedeltem 80 % HDI-Hydrogel und BDI-Hydrogel nach 31 Tagen Zellkultur. In der Fluoreszenzmikroskopie (10 x Vergrößerung) sowie unter dem CLSM (20 x und 63 x Vergrößerung) wurde das Verhältnis lebendiger zu abgestorbenen Zellen analysiert und auf die Zellmorphologie und Anordnung in der extrazellulären Matrix geachtet.

In der 10 x Vergrößerung (Abb. 18 A) zeigten die hMSC im kollagenhaltigen HDI-Hydrogel die oben beschriebenen Zellsphäroide. Die Grünfluoreszenz lebendiger Zellen überwog gegenüber der roten Fluoreszenz apoptotischer Zellen. Vereinzelt waren grün fluoreszierende Brücken zwischen einzelnen Sphäroiden zu erkennen. In der 20 x Vergrößerung (Abb. 18 B) zeigte sich ebenfalls die sphäroidartige Anordnung der Zellen. Bei dieser Vergrößerung konnten einzelne abgestorbene Zellkerne durch die Rotfluoreszenz des aufgenommenen Ethidiumbromid-III detektiert werden. In der hoch auflösenden 63 x Vergrößerung (Abb. 18 C) wurde ein Sphäroid detailliert aufgenommen. Hier zeigte sich der Aufbau eines Sphäroid: Einzelne, lebendige Zellen (Grünfluoreszenz) bildeten ein mosaikartiges Netzwerk zu kugelförmigen Zellnestern. Daneben waren wenige Kerne abgestorbener Zellen rot gefärbt. Außerhalb dieses Zellsphäroids fanden sich an Tag 31 einzelne Zellen.

Im hMSC-besiedelten 80 % BDI-Hydrogel zeigte sich in der 10 x Vergrößerung (Abb. 18 D) ein ähnliches Bild wie im HDI-Hydrogel. Die Zellen waren sphäroidartig angeordnet und bildeten nach 31 Tagen Inkubation zum Teil Verbundstrukturen mehrerer Sphäroide. Der Anteil lebendiger Zellen (Grünfluoreszenz) überwog gegenüber den abgestorbenen Zellen (Rotfluoreszenz). Das BDI-Hydrogel zeigte ein gering verstärktes Zell- und Sphäroidaufkommen als das HDI-Hydrogel. Bei der 20 x Vergrößerung (Abb. 18 E) zeigten sich, analog zum HDI-Hydrogel, die typischen Zellaggregate. Die Sphäroide waren einander angenähert und durch Gewebebrücken miteinander verbunden. In der hoch auflösenden 63 x Vergrößerung (Abb. 18 F) wurde ein Ausschnitt einer Gewebebrücke aufgenommen. Es zeigten sich im Zytoplasma grün-fluoreszierende hMSC mit teilweise elongierter Zellmembran. Daneben waren abgestorbene Zellen (rote Kernfluoreszenz) zu beobachten.

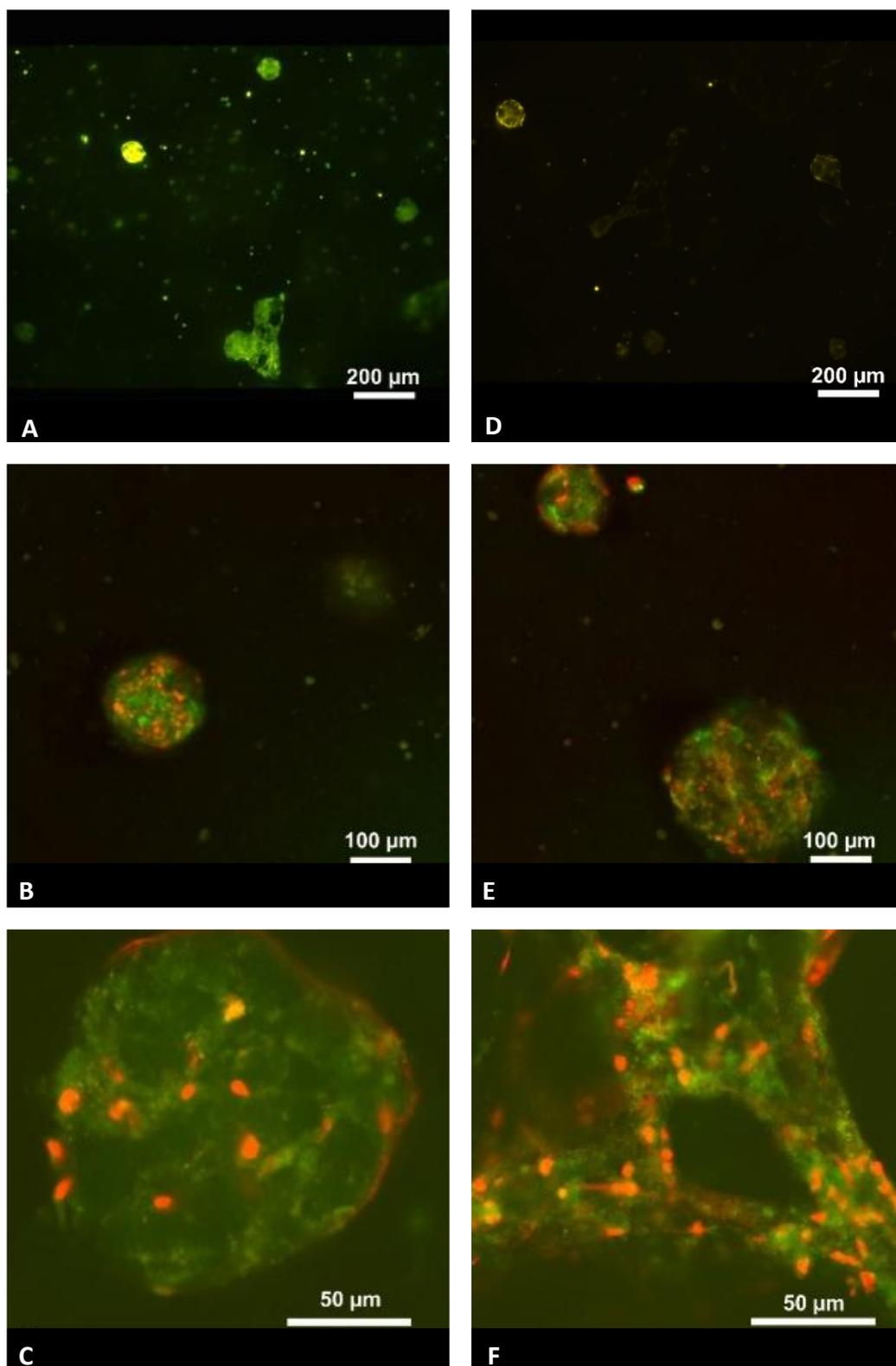


Abbildung 18: Zellmorphologie im HDI- und BDI-Hydrogel

31 Tage Zellkultur, Lebend-Tot-Färbung.

HDI-Hydrogel mit Vergrößerungen 10 x (A) mit 200 µm pro Balken, 20 x (B) mit 100 µm pro Balken und 63 x (C) mit 50 µm pro Balken.

BDI-Hydrogel mit Vergrößerungen 10 x (D) mit 200 µm pro Balken, 20 x (E) mit 100 µm pro Balken und 63 x (F) mit 50 µm pro Balken.

3.2. OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG IN PLURONIC® P123

3.2.1. Vergleich der Osteogenese im HDI-Hydrogel und BDI-Hydrogel

SCP-1 besiedeltes 80 % HDI-Hydrogel und BDI-Hydrogel wurden über einen Zeitraum von 25 Tagen mittels osteogenem Differenzierungsmedium (OM) stimuliert. Nach Ablauf der 25 Tage wurde die Osteogenese hinsichtlich der Calcium-Exkretion quantifiziert (Abb. 19).

Die Negativkontrolle, \emptyset osteogenes Differenzierungsmedium (\emptyset OM), wurden mit dem Standard-Nährmedium, MEM α , kultiviert. Im, mit SCP-1 besiedelten, HDI-Hydrogel wurde eine Alizarin-Rot-Konzentration von 1,055 mM (\pm ST 0,199) gemessen. Die SCP-1 im BDI-Hydrogel führten zu einer Alizarin-Rot-Konzentration von 1,24 mM (\pm ST 0,524).

Im osteogen differenzierten HDI-Hydrogel führte die Calciumproduktion zu einer Bindung von 3,724 mM (\pm ST 0,954) Alizarin Rot. Im osteogen differenzierten BDI-Hydrogel wurde eine Alizarin-Rot-Konzentration von 4,47 mM (\pm ST 1,721) gemessen.

In der statistischen Auswertung ergaben sich sowohl im HDI-Hydrogel als auch im BDI-Hydrogel signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Alizarin-Rot-Konzentration bezüglich der Gruppen OM und \emptyset OM. Im Vergleich von HDI- und BDI-Hydrogel zeigte sich kein signifikanter Unterschied, weder für die Gruppen \emptyset OM, noch für die Gruppen OM.

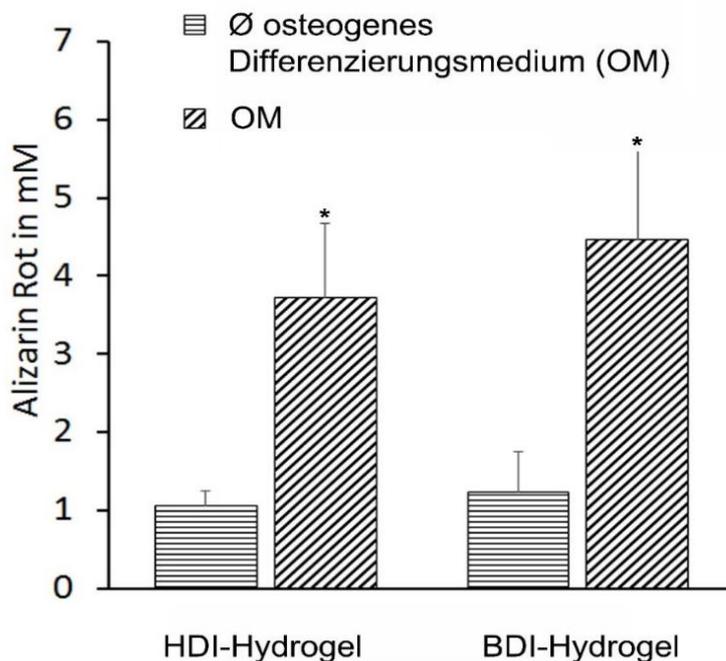


Abbildung 19: Osteogenese in HDI- und BDI-Hydrogel im Alizarin-Rot-Assay

Die Konzentration von Alizarin Rot wurde in den Gruppen HDI-Hydrogel und BDI-Hydrogel, sowie mit OM und \emptyset OM, nach 25 Tagen verglichen. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen OM und \emptyset OM besteht bei einer Markierung mit *.

3.2.2. Osteogene Differenzierung von primären MSC im BDI-Hydrogel

In den weiterführenden Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung von primären hMSC steht ausschließlich das BDI-kettenverlängerte Pluronic 123 im Fokus der Betrachtung.

3.2.2.1. Alizarin-Rot-Assay

Nach 25 Tagen Stimulation mit osteogenem Differenzierungsmedium wurde die Osteogenese durch den Alizarin Rot Assay quantifiziert (Abb. 20).

In der Negativkontrolle \emptyset OM zeigte sich eine Alizarin-Rot-Konzentration von 0,499 mM (\pm ST 0,006). Die, von den hMSC der Gruppe OM, sezernierten Calcium-Ionen bildeten Komplexe mit Alizarin-Rot in einer Konzentration von 2,612 mM (\pm ST 0,475).

Die gesteigerte Alizarin-Rot-Konzentration der Gruppe OM ist gegenüber der Negativkontrolle \emptyset OM statistisch signifikant ($p < 0,05$).

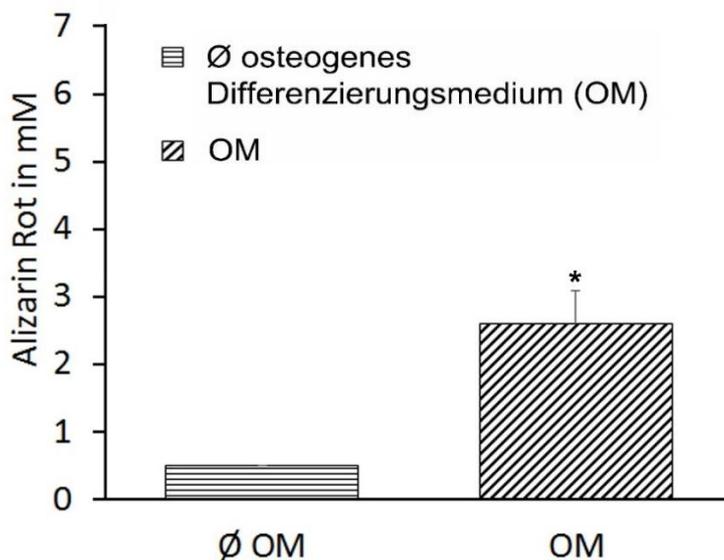


Abbildung 20: **Alizarin-Rot-Assay nach Osteogenese im BDI-Hydrogel**

Die Konzentration von Alizarin Rot wurde nach 25 Tagen im 80 % BDI-Hydrogel in den Gruppen, mit und ohne osteogenes Differenzierungsmedium, verglichen. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen OM und \emptyset OM besteht bei einer Markierung mit *.

3.2.2.2. ALP-Aktivitäts-Assay

Der frühe Osteogenesemarker ALP wurde nach 16 Tagen osteogener Differenzierung durch den ALP-Aktivitäts-Assay bestimmt (Abb. 21).

In der Negativkontrolle \emptyset OM ergab der ALP-Aktivitäts-Assay eine Konzentration des p-Nitrophenol von $100,43 \mu\text{M}$ (\pm ST 18,85). In der Gruppe OM wurde eine p-Nitrophenol-Konzentration von $206,47 \mu\text{M}$ (\pm ST 41,85) im Mittelwert gemessen.

Im *Student's t-Test* ergab sich in der Gruppe OM eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber der Negativkontrolle \emptyset OM.

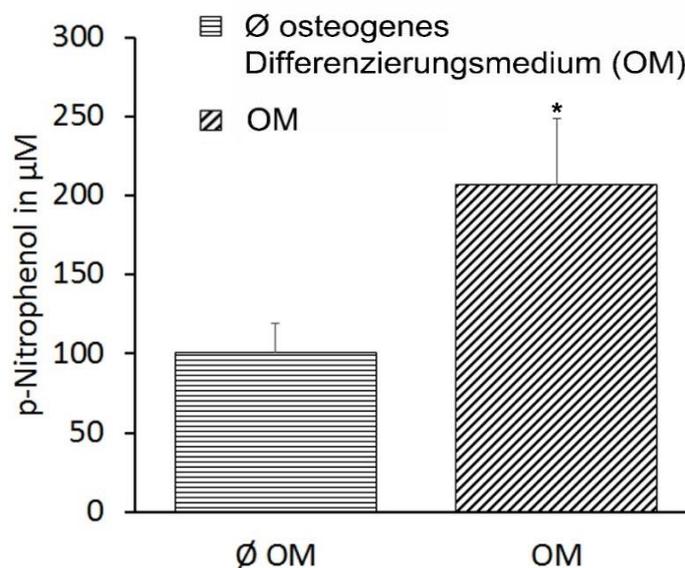


Abbildung 21: **ALP-Aktivitäts-Assay im BDI-Hydrogel**

Im 80 % BDI-Hydrogel wurde die p-Nitrophenol-Konzentration nach 16 Tagen in den Gruppen OM und \emptyset OM verglichen. Zwischen den Gruppen OM und \emptyset OM besteht bei einer Markierung mit * statistische Signifikanz ($p < 0,05$).

3.2.2.3. Kryohistologische Untersuchung

Die Analyse der Kryoschnitte der differenzierten Zell-Gel-Pellets erfolgte mittels Von-Kossa- und Alizarin-Rot-Färbungen nach 25 Tagen osteogener Stimulation.

In der Von-Kossa-Färbung zeigte sich die Negativkontrolle \emptyset OM (Abb. 22 A) in der 10 x Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop nahezu ungefärbt. Nur vereinzelt waren kleine Ansammlungen von schwarz gefärbtem Ag^0 zu erkennen. Das Hydrogel-

Schnittbild der Gruppe OM (Abb. 22 B) wurde deutlich schwarz gefärbt. Es zeigten sich Aggregate, die durch das Silbernitrat mit Ca^{2+} der osteogenen extrazellulären Matrix reagierten und tief schwarz erschienen.

In der Alizarin-Rot-Färbung war die Negativkontrolle (Abb. 22 C) weitgehend ungefärbt und ohne rötliche Farbkomplexe. Die osteogen differenzierten BDI-Hydrogelproben (Abb. 22 D) waren in den Lichtmikroskopaufnahmen bei 10 x Vergrößerung deutlich rot gefärbt.

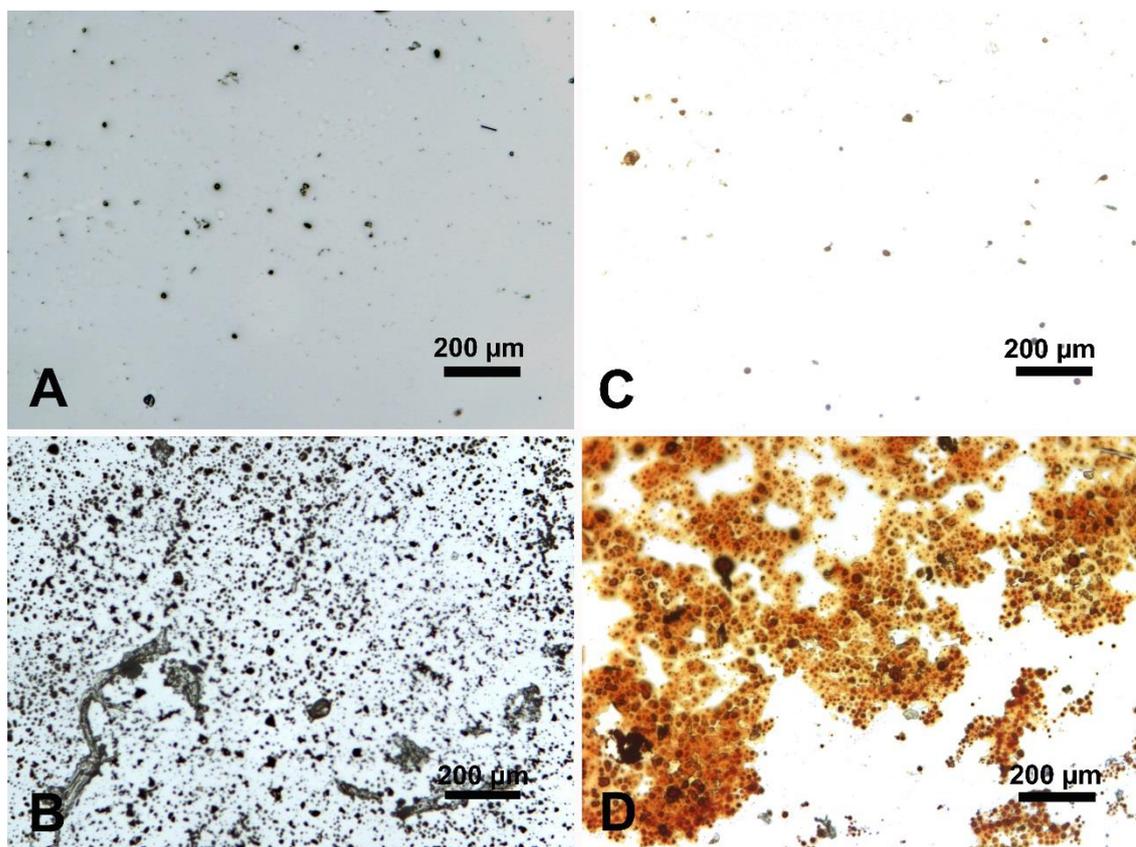


Abbildung 22: Von-Kossa- und Alizarin-Rot-Färbung im BDI-Hydrogel

Von-Kossa-Färbung der Gruppe Ø OM (A) und OM (B). Alizarin-Rot-Färbung der Gruppe Ø OM (C) und OM (D). Der Maßstab beträgt 200 µm pro Balken.

3.2.2.4. Genexpressionsanalyse nach Osteogenese

Die Hochregulation von Osteogenese-Genen wurde durch relative Quantifizierung von Osteopontin, ALP und Runx-2 analysiert. Nach Zeiträumen von 7, 14 und 21 Tagen osteogener Differenzierung erfolgte die RTQ-PCR mit Normalisierung auf das *house-keeping* gene GAPDH. Zugunsten einer besseren Darstellung wurde die relative Genexpression in % dargestellt, wobei 100 % jeweils der Genexpression der 21 Tage osteogen stimulierten Gruppe entsprechen.

3.2.2.4.1. Relative Genexpression von Osteopontin

In der relativen Quantifizierung (Abb. 23) stieg die Expression von Osteopontin in der Negativkontrolle Ø OM über den Zeitraum der 21 Tage gering an. Nach 7 Tagen ergab die RTQ-PCR eine Osteopontin-Expression von 33,45 % ($\pm 4,96$ ST). Diese stieg nach 14 Tagen auf 38,47 % ($\pm 12,00$ ST) an auf bis zu 42,75 % ($\pm 2,04$ ST) nach 21 Tagen.

In der Gruppe OM war die Expression von Osteopontin zu allen drei Messpunkten (7, 14 und 21 Tage) deutlich höher als in der Negativkontrollgruppe. Nach 7 Tagen ergab sich eine Genexpression von 77,13 % ($\pm 7,27$ ST). Nach einer Expression von 62,05 % ($\pm 14,36$ ST) am Tag 14, stieg diese am Tag 21 auf 100 % ($\pm 5,85$ ST) an.

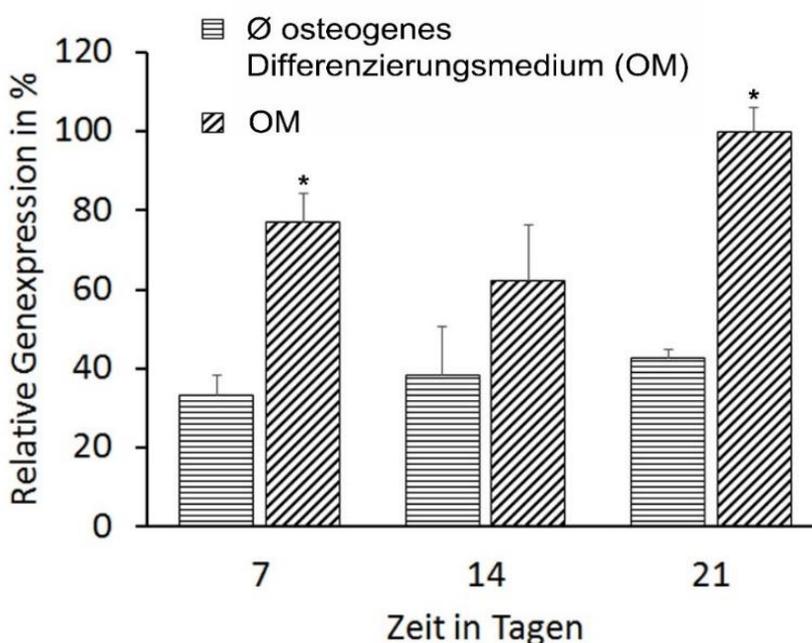


Abbildung 23: **Expression von Osteopontin im BDI-Hydrogel**

Im 80 % BDI-Hydrogel wurde die relative Genexpression von Osteopontin in den Gruppen OM und Ø OM zu den Zeitpunkten 7, 14 und 21 Tagen in % dargestellt. 100 % entsprechen der Genexpression der 21 Tage osteogen stimulierten Gruppe. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen OM und Ø OM wurde durch * markiert.

Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) bestand zwischen OM gegenüber Ø OM nach 7 Tagen und 21 Tagen. Dabei zeigten die hMSC, die im BDI-Hydrogel mit osteogenem Differenzierungsmedium stimuliert wurden, nach 7 Tagen und nach 21 Tagen eine signifikant höhere Osteopontin-Expression als die hMSC der Negativkontrollgruppe. Nach 14 Tagen zeigte sich zwischen diesen zwei Gruppen kein signifikanter Unterschied.

Ebenfalls besteht keine Signifikanz innerhalb der Gruppe \emptyset OM bzw. innerhalb der Gruppe OM zu den verschiedenen Zeitpunkten.

3.2.2.4.2. Relative Genexpression von ALP

Die ALP-Expression (Abb. 24) in der Gruppe OM betrug nach 7 Tagen 3,75 % ($\pm 3,52$ ST). Nach 14-tägiger Stimulation mit Differenzierungsmedium wurde eine Expression von 38,81 % ($\pm 7,39$ ST) gemessen. Mit 100 % ($\pm 3,58$ ST) war das ALP-Gen nach 21 Tagen am stärksten exprimiert.

In der Negativkontrolle \emptyset OM war die ALP-Expression nach 7 und 21 Tagen gering, mit 1,12 % ($\pm 0,83$ ST) nach 7 Tagen und 6,07 % ($\pm 1,94$ ST) nach 21 Tagen. Nach 14 Tagen Kultivierung mit Standardnährmedium zeigte sich in der Genquantifizierung eine Expression von 21,64 % ($\pm 6,04$ ST).

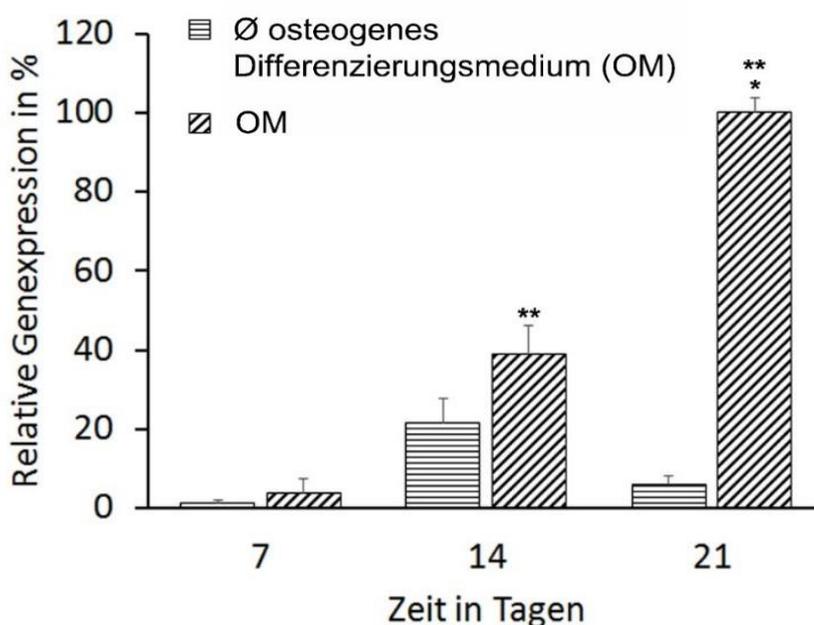


Abbildung 24: **Expression von Alkalischer Phosphatase im BDI-Hydrogel**

Die relative Genexpression der Alkalischen Phosphatase wurde in den Gruppen OM und \emptyset OM zu den Zeitpunkten 7, 14 und 21 Tagen in % dargestellt. 100 % entsprechen der Genexpression der 21 Tage osteogen stimulierten Gruppe. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen OM und \emptyset OM besteht bei der Markierung durch *. Mit ** wurde eine Signifikanz zwischen den Zeitpunkten 7,14 und 21 Tagen innerhalb einer Gruppe markiert.

Hinsichtlich der Negativkontrolle ergab sich in der Gruppe OM nach 21 Tage osteogener Differenzierung ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Der Vergleich innerhalb der Gruppe OM lieferte bei jedem Vergleich zwischen den drei verschiedenen Zeitintervallen ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$). Die ALP-Expression ist nach 14 Tagen signifikant höher als nach 7 Tagen. Nach einer Stimulation über 21 Tage ist die Genexpression von ALP signifikant höher als über 7 Tage und 14 Tage.

3.2.2.4.3. Relative Genexpression von Runx-2

Die Quantifizierung des Runx-2-Gens (Abb. 25) in der Gruppe OM ergab die höchste Genexpression nach 21 Tagen mit 100 % ($\pm 2,08$ ST). Diese stieg schrittweise im Zeitverlauf an und verdoppelte sich prozentual dabei nach jeder weiteren Woche Inkubation. Von einer Expression von 17,85 % ($\pm 17,79$ ST) nach 7 Tagen Differenzierung, stieg sie über 47,62 % ($\pm 20,29$ ST) nach 14 Tagen, auf 100 % ($\pm 2,08$ ST) nach 21 Tagen.

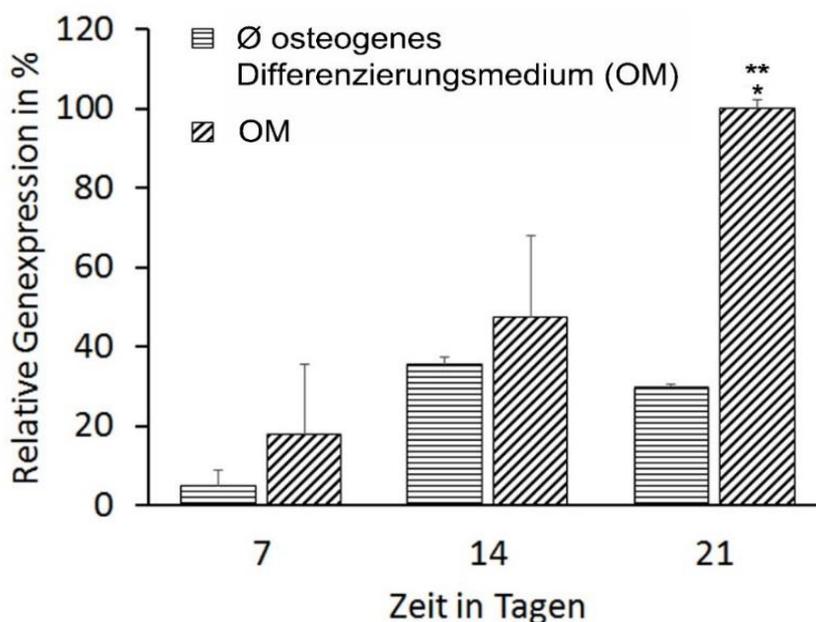


Abbildung 25: **Expression von Runx-2 im BDI-Hydrogel**

Die relative Genexpression von Runx-2 wurde in den Gruppen, OM und Ø OM, zu den Zeitpunkten 7, 14 und 21 Tagen in % dargestellt. 100 % entsprechen der Genexpression der 21 Tage osteogen stimulierten Gruppe. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) zwischen OM und Ø OM besteht bei der Markierung durch *. Mit ** wurde eine Signifikanz zwischen den Zeitpunkten 7,14 und 21 Tagen innerhalb einer Gruppe markiert.

Nach einem Wert von 5,05 % ($\pm 3,88$ ST) nach 7 Tagen, ist die Genexpression auch in der Negativkontrolle angestiegen. Dabei wurden bei einer Kultivierung über 14 Tage eine Expression von 35,55 % ($\pm 1,81$ ST) gemessen, sowie über 21 Tage von 29,84 % ($\pm 0,59$ ST).

Die Runx-2-Expression in der osteogen differenzierten Gruppe war nach 21 Tagen signifikant höher als in der Negativkontrolle. Nach 7 Tagen und 14 Tagen bestand kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Ebenfalls signifikant höher war die Genexpression in der 21 Tage lang osteogen differenzierten Gruppe im Vergleich zur 7 Tage lang osteogen differenzierten Gruppe. Keine Signifikanz bestand beim Vergleich der osteogenen Stimulationsperioden von 7 und 14 Tagen sowie von 14 und 21 Tagen.

3.2.3. Osteoinduktion von hMSC im BDI-Hydrogel mittels rhBMP-7

Neben der Gruppe OM, wurde in weiteren Gruppen neben dem Differenzierungsmedium ab Tag 6 zusätzlich mit rhBMP-7 stimuliert. Um die optimale Konzentration für die Osteogenese zu finden, wurde rhBMP-7 in drei Konzentrationen (100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml) eingesetzt. Zusätzlich gab es eine Negativkontrolle.

3.2.3.1. Alizarin-Rot-Assay

Im Alizarin-Rot-Assay wurde nach 25 Tagen Stimulation die Osteogenese der Gruppe \emptyset OM, OM, OM + 100 ng/ml rhBMP-7 und OM + 250 ng/ml rhBMP-7 miteinander verglichen (Abb. 26).

In der Negativkontrolle wurden 0,499 mM (\pm ST 0,006) Alizarin-Rot im BDI-Hydrogel gebunden. In der Gruppe OM wurde eine Alizarin-Rot-Konzentration von 2,612 mM (\pm ST 0,475) im Photometer gemessen. Der Einsatz von 100 ng/ml rhBMP-7 führte zu einer annähernden Verdoppelung der Alizarin-Rot-S-Calcium-Komplexe auf 4,748 mM (\pm ST 0,271). Bei der zusätzlichen Stimulation durch 250 ng/ml BMP-7 führte die Calciumexkretion mit 6,663 mM (\pm ST 1,146) Alizarin-Rot zu einer etwa dreifachen Alizarin-Rot-Konzentration als in der Gruppe OM.

Die Stimulation der Osteogenese mit rhBMP-7 führte in beiden Konzentrationen zu signifikant höheren Alizarin-Rot-Konzentrationen als das alleinige osteogene Differenzierungsmedium. Im Vergleich zur Gruppe OM war die Alizarin-Rot-Konzentration im *Student's t-Test* signifikant höher ($p < 0,05$) in den Gruppen, OM + 100 ng/ml rhBMP-7 und OM + 250 ng/ml rhBMP-7. Ein Vergleich der Effektivität der beiden rhBMP-7-Konzentrationen zeigte, dass die höhere Konzentration

von 250 ng/ml rhBMP-7 zu einer signifikant höheren Alizarin-Rot-Konzentration führte als die geringere Konzentration von 100 ng/ml rhBMP-7.

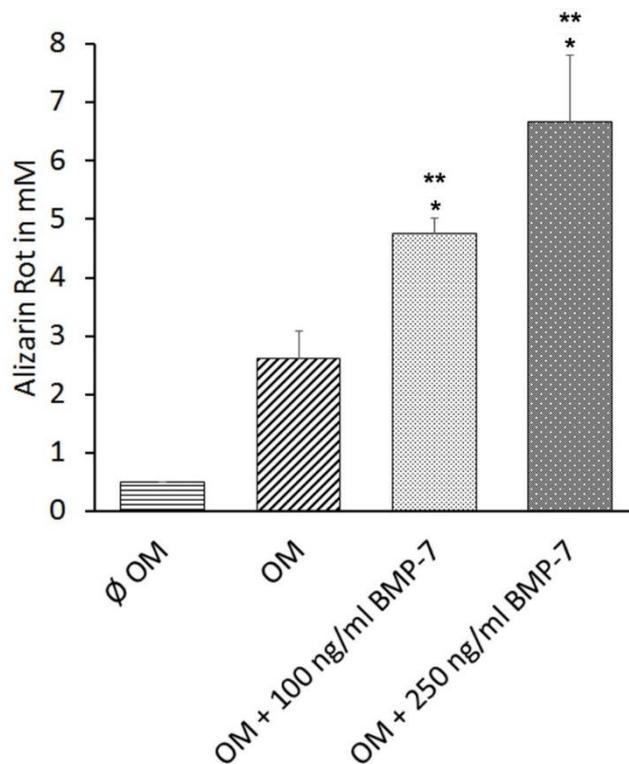


Abbildung 26: **Alizarin-Rot-Assay nach rhBMP-7-Stimulation im BDI-Hydrogel**

Die Alizarin-Rot-Konzentration wurde nach 25 Tagen in den Gruppen, Ø OM, OM, OM + 100 ng/ml rhBMP-7 und OM + 250 ng/ml rhBMP-7 miteinander verglichen. Eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mit * zwischen den mit rhBMP-7 stimulierten Gruppen und der Gruppe OM markiert. Die Markierung ** bedeutet einen signifikanten Unterschied zwischen Stimulation mit 100 ng/ml und 250 ng/ml rhBMP-7.

3.2.3.2. ALP-Aktivität-Assay

Neben der Gruppe OM und der Negativkontrolle wurden die drei Gruppen mit zusätzlicher Stimulation durch 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml rhBMP-7 durch den ALP-Aktivitäts-Assay nach 16 Tagen untersucht (Abb. 27).

Die Negativkontrolle erbrachte eine p-Nitrophenol-Konzentration von $100,43 \mu\text{M} (\pm 18,85 \text{ ST})$. In der Gruppe OM bewirkte die ALP-Aktivität eine Konzentration von $206,47 \mu\text{M} (\pm 41,85 \text{ ST})$ p-Nitrophenol. Die zusätzliche Stimulation durch rhBMP-7 führte in jeder Konzentration zu einer deutlichen Steigerung der

p- Nitrophenol-Konzentration. Durch die Zugabe von 100 ng/ml rhBMP-7 wurde so viel ALP gebildet, dass die Konzentration von p-Nitrophenol sich mit 878,72 μM ($\pm 113,25$ ST) im Vergleich zur Gruppe OM vervierfacht hat. Die mittlere Konzentration von 250 ng/ml rhBMP-7 konnte die p-Nitrophenol-Konzentration auf 1109,67 μM ($\pm 159,96$ ST) um den Faktor 5 im Vergleich zur Gruppe OM erhöhen. Die höchste Aktivität der ALP zeigte sich mit einer p-Nitrophenol-Konzentration von 1289,25 μM ($\pm 4,67$ ST) durch eine Stimulation mit 500 ng/ml rhBMP-7.

In der statistischen Auswertung steigerte jede der drei rhBMP-7-Konzentrationen das Ergebnis statistisch signifikant gegenüber der Gruppe OM. Der Vergleich der drei Konzentrationen untereinander zeigte eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Konzentration an p-Nitrophenol in der Gruppe, OM mit 500 ng/ml rhBMP-7, verglichen zur Gruppe, OM mit 100 ng/ml rhBMP-7. Zwischen den Gruppen, 100 ng/ml und 250 ng/ml rhBMP-7, sowie zwischen 250 ng/ml und 500 ng/ml rhBMP-7 zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

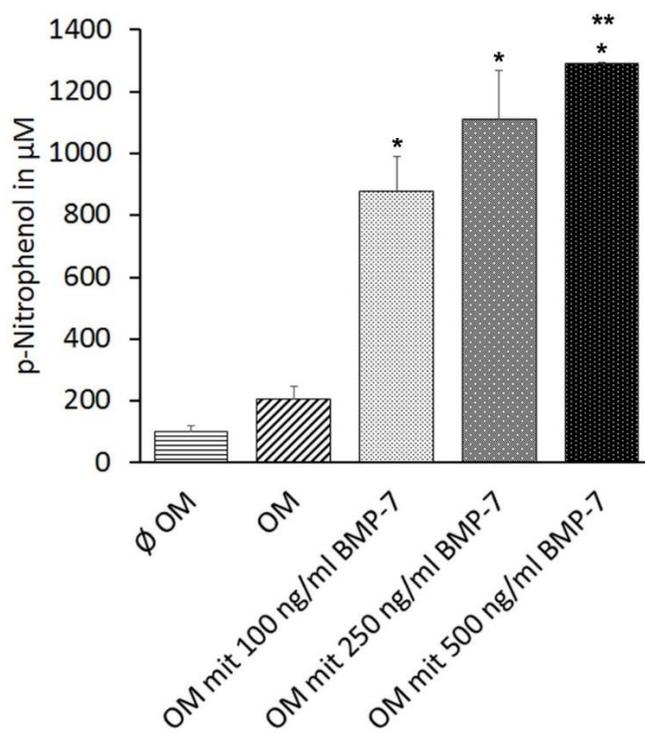


Abbildung 27: **ALP-Aktivität nach rhBMP-7-Stimulation im BDI-Hydrogel**

Die p-Nitrophenol-Konzentration wurde nach 16 Tagen in den Gruppen, Ø OM, OM, OM + 100 ng/ml rhBMP-7, OM + 250 ng/ml rhBMP-7 und OM + 500 ng/ml rhBMP-7 miteinander verglichen. Mit * wurde eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) der Gruppen mit BMP-7 gegenüber der Gruppe OM markiert. Die statistisch signifikant höhere p-Nitrophenol-Konzentration durch 500 ng/ml rhBMP-7 gegenüber 100 ng/ml rhBMP-7 wurde mit ** markiert.

3.2.3.3. Kryohistologische Untersuchung

Die Stimulation der Osteogenese durch rhBMP-7 wurde in den 2 Gruppen, OM mit 100 ng/ml und 250 ng/ml rhBMP-7, mit der Negativkontrolle und der Gruppe OM verglichen. Nach 25 Tagen Stimulation erfolgte der histologische Calciumnachweis in den Kryopräparaten durch Von-Kossa- und Alizarin-Rot-Färbungen.

Die Negativkontrolle blieb in der Von-Kossa-Färbung (Abb. 28 A) weitgehend ungefärbt. In der Gruppe OM (Abb. 28 B) waren deutliche schwarz gefärbte Silbernitratkristalle unter dem Mikroskop zu erkennen. Bei 10 x Vergrößerung im Lichtmikroskop zeigte sich in der Gruppe OM mit 100 ng/ml rhBMP-7 (Abb. 28 C) ein ähnlicher Anteil an schwarz gefärbtem Silbernitrat wie in der Gruppe OM. In der Gruppe OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 (Abb. 28 D) war die Schwarzfärbung durch Reaktion der calciumhaltigen Matrix mit Silber-Ionen wesentlich ausgeprägter. Dieser Unterschied zeigte sich zum einen gegenüber der Gruppe OM, zum anderen auch gegenüber OM mit 100 ng/ml rhBMP-7. In der Mikroskopie der Gruppen OM, OM mit 100 ng/ml rhBMP-7 und OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 ließ sich eine geometrische Anordnung der schwarz gefärbten Strukturen erkennen.

Durch Analyse in der Software *Image J* (Wayne Rasband - National Institutes of Health, Bethesda, USA) wurde die Von-Kossa-Färbung der verschiedenen Gruppen quantifiziert. Durch die Konversion in eine binäre Darstellung wurde für jeweils $n = 10$ pro jeder der vier untersuchten Gruppen die mittlere Anzahl der schwarzen Pixel pro Fläche bestimmt. Für eine gute Vergleichbarkeit und einfache Darstellung wurden diese Pixelwerte in Prozentpunkte umgerechnet ($100\% = \text{Anzahl der schwarzen Pixel pro Fläche der Gruppe OM}$). Der prozentuale Pixelwert als Mittelwert mit Standardabweichung wurde für jede Gruppe in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 29). In der Negativkontrolle betrug das Ausmaß der positiven Silbernitratfärbung $7,08\% (\pm 6,08 \text{ ST})$. Die Gruppe OM ergab einen prozentualen Wert von $100\% (\pm 13,48 \text{ ST})$. Die Gruppe OM mit 100 ng/ml rhBMP-7 führte zu einer Silbernitratfärbung von $107,30\% (\pm 6,80 \text{ ST})$. Durch die weitere Stimulation mit 250 ng/ml rhBMP-7 konnte ein deutlich positives Von-Kossa-Signal mit einem Wert von $215,54\% (\pm 11,66 \text{ ST})$ erreicht werden.

In der statischen Evaluation mittels *Student's t*-Test erwies sich der Unterschied zwischen den Gruppen OM und OM mit 100 ng/ml rhBMP-7 als statistisch nicht signifikant ($p < 0,05$). Alle weiteren statistischen Untersuchungen mittels *t*-Test lieferten signifikante Ergebnisse. Gegenüber der Negativkontrolle erreichten alle drei osteogen differenzierten Gruppen, OM, OM mit 100 ng/ml rhBMP-7 und OM mit 250 ng/ml rhBMP-7, signifikant höhere prozentuale Werte in der Quantifizierung der Von-Kossa-Färbung. In der Gruppe OM mit 100 ng/ml rhBMP-7 bestand keine Signifikanz gegenüber der Gruppe OM. Eine signifikante Steigerung der Schwarzfärbung gegenüber der Gruppe OM erfolgte durch den Einsatz von 250 ng/ml rhBMP-7. Der Vergleich der Gruppen OM mit 100 ng/ml rhBMP-7 und OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 lieferte ein signifikant höheres Ausmaß der Von-Kossa-Färbung für die höhere Konzentration von rhBMP-7 (250 ng/ml).

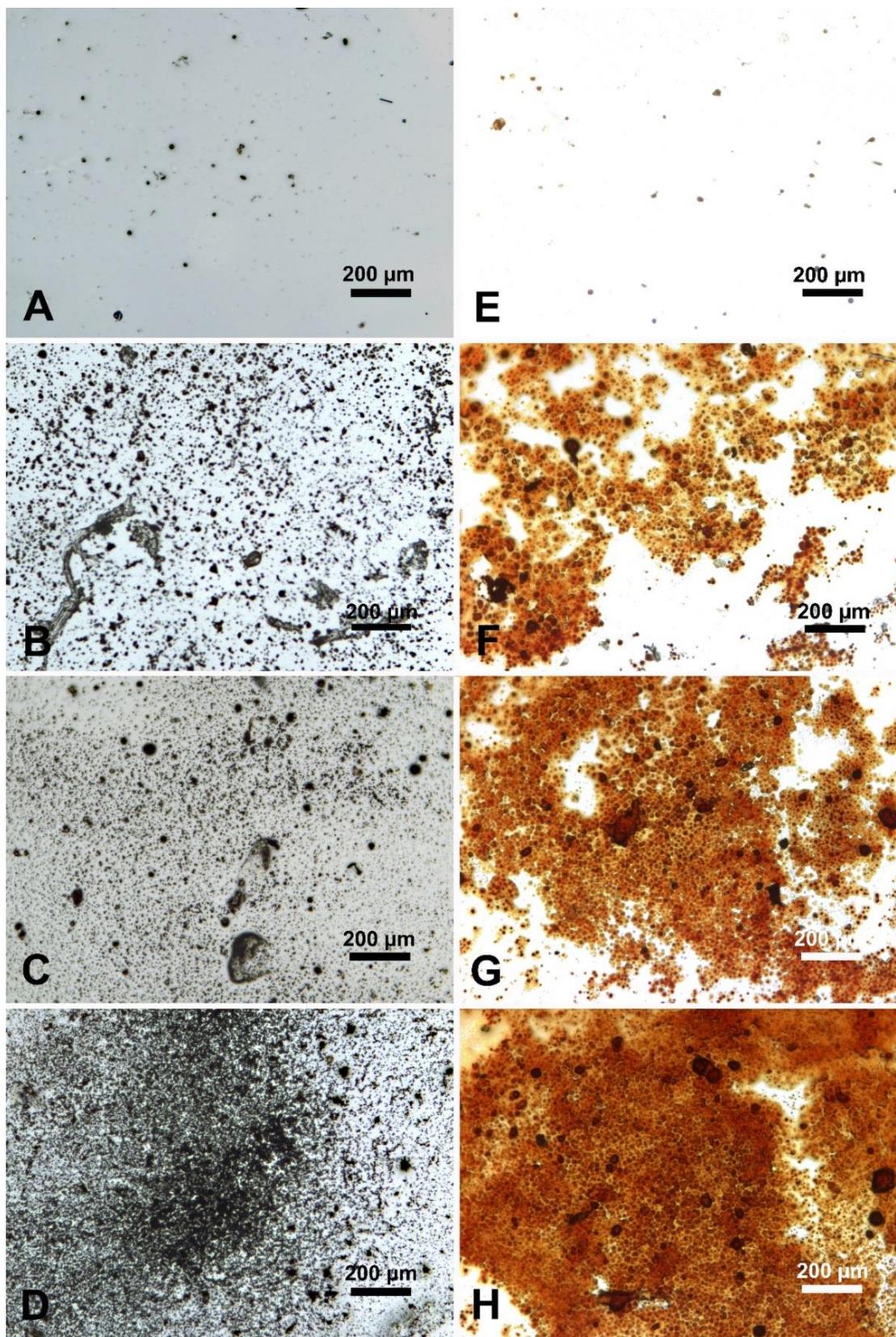


Abbildung 28: Von-Kossa- und Alizarin-Rot-Färbungen im BDI-Hydrogel

Osteogene Stimulation für 25 Tage. Von-Kossa-Färbung von Ø OM (A), OM (B), OM mit 100 ng/ml rhBMP-7 (C), OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 (D). Alizarin-Rot-Färbung von Ø OM (E), OM (F), OM mit 100 ng/ml rhBMP-7 (G), OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 (H). Maßstab 200 µm pro Balken.

Neben der direkten Quantifizierung im Alizarin-Rot-Assay erfolgte die Färbung der Kryoschnitte mit Alizarin-Rot. Unter dem Lichtmikroskop konnte dabei neben der Ausprägung der rot gefärbten Alizarin-Rot-S-Calcium-Komplexe auch deren morphologische Anordnung analysiert werden.

In der Negativkontrolle (Abb. 28 E) waren nahezu keine Alizarin-Rot-S-Calcium-Komplexe zu sehen. In der Gruppe OM (Abb. 28 F) zeigten sich eine deutliche Rotfärbung und die konzentrische Anordnung der einzelnen Alizarin-Rot-S-Calcium-Komplexe entsprechend der Zellsphäroide im BDI-Hydrogel. Durch die zusätzliche Stimulation mit 100 ng/ml rhBMP-7 (Abb. 28 G) war die Rotfärbung ausgeprägter. Im Vergleich zur Gruppe OM waren in der Gruppe OM mit 100 ng/ml rhBMP-7 deutlich mehr Farbkomplexe, ebenfalls entlang der Zellsphäroide angeordnet, zu erkennen. Die einzelnen konzentrischen Farbgruppierungen schienen einander angenähert und gingen zum Teil ineinander über. Die Alizarin-Rot-Färbung der Gruppe OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 (Abb. 28 H) führte makroskopisch wie mikroskopisch zu einer ausgeprägten Rotfärbung. Unter dem Lichtmikroskop zeigte sich eine große Menge an Farbkomplexen, die das Kryopräparat nahezu vollständig bedecken. Statt der in den Gruppen, OM und OM mit 100 ng/ml rhBMP-7, zu erkennenden konzentrischen Anordnung der Farbkomplexe, konfluieren die sphäroidartigen Gruppierungen deutlich.

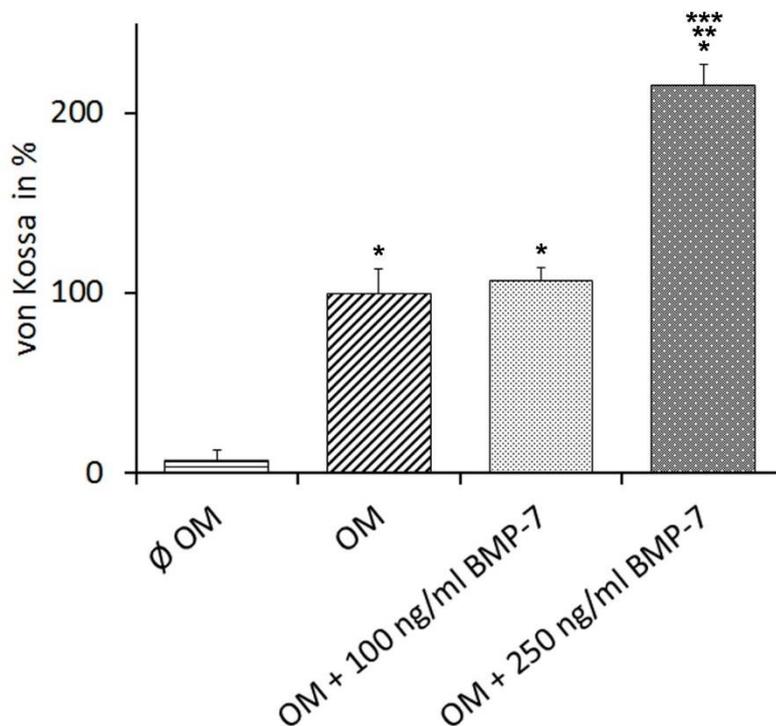


Abbildung 29: **Quantifizierung der Von-Kossa-Färbung im BDI-Hydrogel**

Die Quantifizierung der Von-Kossa-Färbung in % wurde in den Gruppen Ø OM, OM, OM mit 100 ng/ml rhBMP-7 und OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 verglichen. Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber der Negativkontrolle wurde mit * markiert. Mit ** wurde die statistische Signifikanz von 250 ng/ml rhBMP-7 gegenüber OM markiert und mit *** gegenüber 100 ng/ml rhBMP-7.

3.2.3.4. Genexpressionsanalyse von Osteogenesemarkern

Um die Auswirkung von 250 ng/ml rhBMP-7 auf die Osteogenese zu untersuchen, wurde die Expression der Gene Osteopontin, ALP und Runx-2 am Tag 7, 14 und 21 der osteogenen Differenzierung quantifiziert. Die Ergebnisse wurden auf GAPDH normalisiert und zur besseren Darstellung in prozentualen Werte (100 % = Genexpression der Gruppe OM nach 21 Tagen) dargestellt.

3.2.3.4.1. Relative Genexpression von Osteopontin

In der Negativkontrolle wurde nach 7 Tagen eine prozentuale Osteopontin-Expression von 33,45 % ($\pm 4,96$ ST), nach 14 Tagen 38,47 % ($\pm 12,00$ ST) und nach 21 Tagen 42,75 % ($\pm 2,04$ ST) gemessen (Abb. 30). In der Gruppe OM ergab sich eine Genexpression von 77,13 % ($\pm 7,27$ ST) nach 7 Tagen. Nach 62,05 % ($\pm 14,36$ ST) am Tag 14 stieg diese am Tag 21 auf 100 % ($\pm 5,85$ ST) an. Die zusätzliche Stimulation durch 250 ng/ml rhBMP-7 führte nach 7 Tagen zu 33,79 % ($\pm 6,17$ ST). Nach 14 Tagen stieg die Genexpression in dieser Gruppe auf 106,62 % ($\pm 15,75$ ST) an und erreichte am Tag 21 der Differenzierung 341,81 % ($\pm 18,81$ ST).

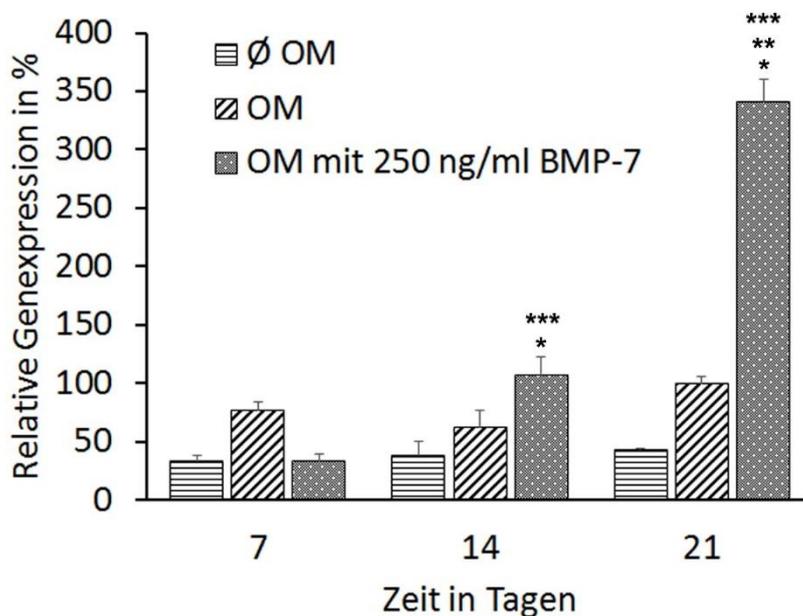


Abbildung 30: **Expression von Osteopontin nach Stimulation mit rhBMP-7**

Relative Genexpression von Osteopontin zwischen den Gruppen Ø OM, OM und OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 zu den Zeitpunkten 7, 14 und 21 Tagen in %. 100 % entsprechen der Genexpression der 21 Tage osteogen stimulierten Gruppe. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber Ø OM wurde durch * markiert, gegenüber der Gruppe OM durch **. Innerhalb der Gruppe OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 wurden signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den drei Zeitpunkten durch *** dargestellt.

In der statistischen Evaluation mittels *Student's t-Test* ergaben sich folgende Signifikanzen ($p < 0,05$) hinsichtlich dem Effekt durch rhBMP-7: Die Expression von Osteopontin war in der Gruppe OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 im Vergleich zur Negativkontrolle nach 14 und 21 Tagen statistisch signifikant höher. Nach 21 Tagen zeigte die zusätzliche Stimulation mit 250 ng/ml rhBMP-7 eine Steigerung der Genexpression von statistischer Signifikanz gegenüber der Gruppe OM. In der Gruppe OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 bestand untereinander zwischen jedem der Zeiträume (7, 14 und 21 Tage) ein signifikanter Unterschied. Nach 14 Tagen wurde eine signifikant höhere Genexpression gemessen als nach 7 Tagen. Auch nach 21 Tagen stieg, im Vergleich zu Tag 7, die quantifizierte Genkonzentration signifikant an. Der Vergleich nach 14 und 21 Tagen osteogener Differenzierung lieferte einen signifikanten Zuwachs an Osteopontin nach 21 Tagen gegenüber 14 Tagen.

3.2.3.4.2. *Relative Genexpression von ALP*

Die Genexpression von ALP in der Negativkontrolle betrug an Tag 7 der Differenzierung 1,12 % ($\pm 0,83$ ST) (Abb. 31). Nach einem Anstieg auf 21,64 % ($\pm 6,04$ ST) nach 14 Tagen, wurde an Tag 21 eine Expression von 6,07 % ($\pm 1,94$ ST) gemessen. In der Quantifizierung des ALP-Gens der Gruppe OM stieg die Konzentration kontinuierlich an, von 3,75 % ($\pm 3,52$ ST) an Tag 7, über 38,81 % ($\pm 7,39$ ST) an Tag 14, auf 100 % ($\pm 3,58$ ST) an Tag 21. Durch die zusätzliche Stimulation der hMSC-besiedelten BDI-Hydrogele mit 250 ng/ml rhBMP-7 wurden zu jedem der drei Messzeitpunkte höhere Werte als ohne rhBMP-7 gemessen. Nach 7 Tagen osteogener Differenzierung der Gruppe OM mit 250 ng/ml rhBMP-7, betrug die ALP-Expression 4,82 % ($\pm 2,46$ ST). Diese wuchs nach 14 Tagen Stimulation bereits auf 134,87 % ($\pm 10,10$ ST) an. Nach 21 Tagen wurden sogar 532,53 % ($\pm 303,90$ ST) des Gens Alkalische Phosphatase exprimiert.

Mittels *Student's t-Test* ($p < 0,05$) wurden die Ergebnisse der relativen Quantifizierung des ALP-Gens statistisch beurteilt. Die Stimulation durch 250 ng/ml rhBMP-7 bewirkte am Tag 14 der osteogenen Differenzierung eine signifikante Steigerung der ALP-Expression gegenüber den Gruppen \emptyset OM und OM. Zu den Zeitpunkten 7 und 21 Tage war der Effekt durch rhBMP-7 im Vergleich zur Negativkontrolle und der Gruppe OM statistisch nicht signifikant. Der Effekt von rhBMP-7 zu den drei Zeitpunkten (7, 14 und 21 Tage) wurde ebenfalls statistisch untersucht. Es wurde ein signifikanter Zuwachs der Genexpression zwischen den Zeitpunkten 7 Tage und 14 Tage ermittelt. Die Zunahme der quantifizierten ALP-Konzentration am Tag 21 war in Bezug auf Tag 7 und Tag 14 statistisch nicht signifikant.

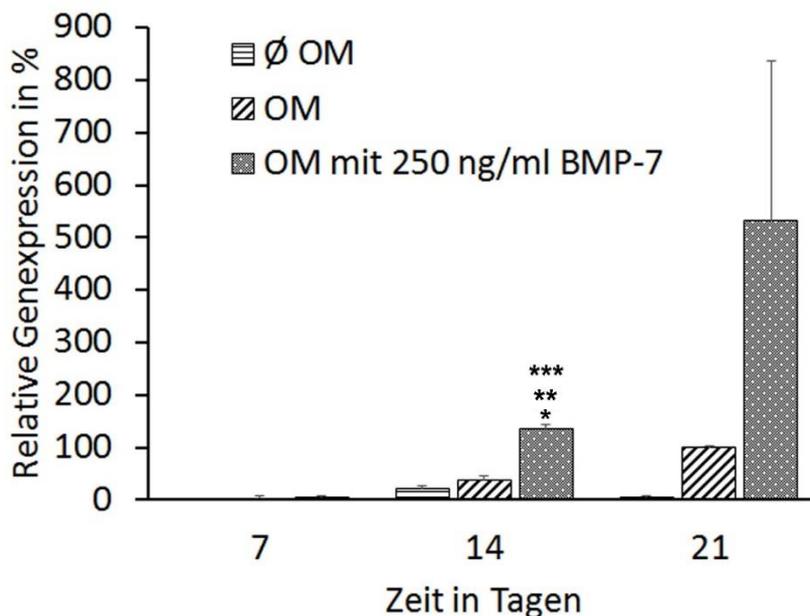


Abbildung 31: ALP-Expression im BDI-Hydrogel nach rhBMP-7-Stimulation

Die relative Genexpression von ALP wurde in den Gruppen Ø OM, OM und OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 und zu den Zeitpunkten 7, 14 und 21 Tagen in % dargestellt. 100 % entsprechen der Genexpression der 21 Tage osteogen stimulierten Gruppe. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber Ø OM wurde durch * markiert, gegenüber OM durch **. Innerhalb der Gruppe OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 wurden signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den drei Zeitpunkten durch *** dargestellt.

3.2.3.4.3. Relative Genexpression von Runx-2

In der Negativkontrolle ergab sich nach 7 Tagen eine Runx-2-Expression von 5,05 % ($\pm 3,88$ ST) (Abb. 32). Diese erreichte 35,55 % ($\pm 1,81$ ST) nach 14 Tagen und 29,84 % ($\pm 0,59$ ST) nach 21 Tagen. Die hMSC der Gruppe OM exprimierten nach 7 Tagen Inkubation 17,85 % ($\pm 17,79$ ST) Runx-2. Diese Genexpression stieg über 47,62 % ($\pm 20,29$ ST) an Tag 14 auf 100 % ($\pm 2,08$ ST) nach 21 Tagen an. In der Gruppe OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 wurde zu jedem der drei Zeitpunkte (7, 14, 21 Tage) jeweils die höchste Genexpression der drei Gruppen, Ø OM, OM und OM mit 250 ng/ml rhBMP-7, gemessen. Die relative Genquantifizierung von Runx-2 zeigte stetig ansteigende Werte von 27,32 % ($\pm 16,49$ ST) nach 7 Tagen, über 101,30 % ($\pm 0,46$ ST) nach 14 Tagen, bis hin zu 167,50 % ($\pm 68,77$ ST) nach 21 Tagen Stimulation.

Die statistische Auswertung erfolgt mittels *Student's t-Test* ($p < 0,05$). Durch die Stimulation mit 250 ng/ml rhBMP-7 zeigte sich nach 14 Tagen Inkubation gegenüber der

Negativkontrolle ein statistisch signifikanter Anstieg der Expression. An den Tagen 7 und 21 war dieser Effekt in Bezug auf die Negativkontrollgruppe statistisch nicht signifikant. Im Vergleich zur Gruppe OM bestand zu keinem der drei Zeitpunkte Signifikanz. Die statistische Analyse innerhalb der Gruppe OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 zwischen den drei Zeitpunkten ergab einen signifikanten Anstieg der Runx-2-Expression von 7 Tagen auf 14 Tage. Zwischen 7 bzw. 14 Tagen und 21 Tagen bewirkte die Stimulation durch rhBMP-7 keinen signifikanten Unterschied.

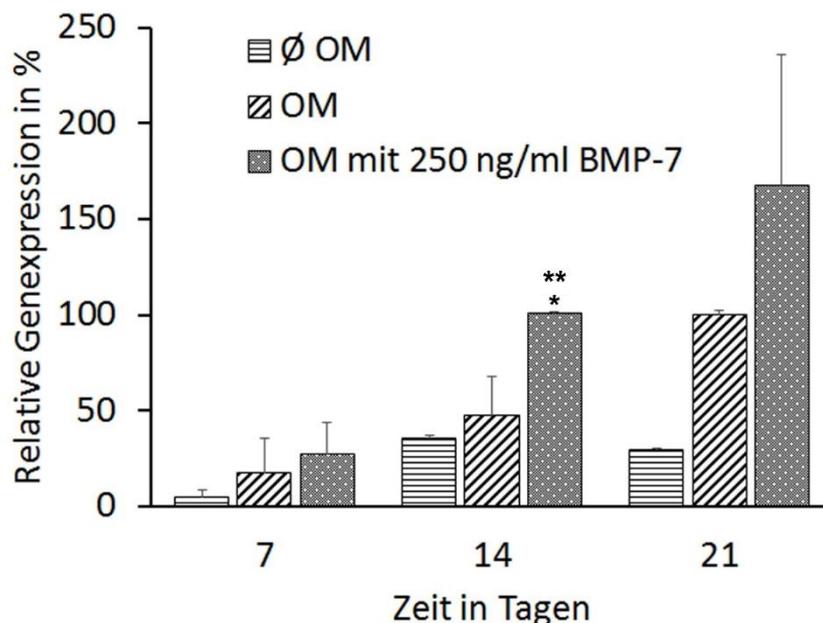


Abbildung 32: **Expression von Runx-2 nach Stimulation mit rhBMP-7**

Relative Genexpression von Runx-2 in % zwischen den Gruppen Ø OM, OM und OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 sowie zu den Zeitpunkten 7, 14 und 21 Tagen. 100 % entsprechen der Genexpression der 21 Tage osteogen stimulierten Gruppe. Statistische Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber Ø OM wurde durch * markiert. Innerhalb der Gruppe OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 wurden signifikante Unterschiede in der Genexpression zwischen den drei Zeitpunkten durch ** dargestellt.

3.3. BESONDERHEITEN IN DER ANWENDUNG DES PLURONIC® P123

Als thermoresponsives Hydrogel ist die Temperatur ein vorherrschender Faktor für den Phasenzustand des Pluronic® P123. Für eine flüssige Phase des Poloxamers war eine Temperatur unterhalb der LCST nötig. Die Aufbewahrung des Hydrogels bis zum Einsatz erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C. Die Modifikation mit Kollagen I sowie die Zellbesiedelung wurden auf Eis durchgeführt. Zur Entfernung des P123 aus den Zell-Gel-

Pellets für bestimmte Nachweismethoden (Alizarin-Rot-Assay, ALP-Assay) wurde das Hydrogel zur Aufhebung der Mizellenstruktur für 30 Minuten bei 4 °C gelagert. Nach Aufhebung der Mizellenstruktur unterhalb der LCST erfolgte ein Zentrifugationsschritt zur Entfernung des Hydrogels. Nach der Zellbesiedelung erfolgte die Mizellenbildung bei Temperaturen oberhalb der LCST (27,6 °C für HDI-Hydrogel, 26,2 °C für BDI-Hydrogel). Der gelartige Zustand des Poloxamers wurde durch eine konstante Temperatur von 37 °C im Inkubator aufrechterhalten und stabilisiert. Außerhalb des Inkubators wurde das Hydrogel auf erwärmten Gelkompressen gelagert und das Medium und andere Zusätze auf 37 °C erwärmt.

Der Alizarin-Rot-Assay erfolgte anfangs durch direkte Färbung im Gelpellet. Die Alizarin-Rot-Partikel blieben allerdings in der Mizellenstruktur zurück, wodurch die Beurteilung der Ergebnisse durch Mikroskopie und Quantifizierung schwierig und ungenau war. Aus diesem Grund wurde die Methode auf die Anwendung im Pluronic® P123 angepasst. Nach Aufhebung der Mizellenstruktur (30 Minuten, 4 °C) wurde das Poloxamer durch Zentrifugation und Waschen entfernt. Der Alizarin-Rot-Assay erfolgte im Zell-Matrix-Pellet. Der ALP-Assay wurde ebenfalls, durch Aufhebung der Mizellenstruktur und anschließender Zentrifugation, im Poloxamer-freien Zell-Matrix-Pellet durchgeführt.

Das Standardprotokoll zur Kryoeinbettung wurde ebenfalls für das Hydrogel modifiziert. Statt zweimaliger Fixierung in 4 % PFA (30 Minuten, Raumtemperatur) wurde das P123 nur einmal für 30 Minuten bei 37 °C in 4 % PFA fixiert. Eine Dekalzifizierung der Probe wurde nicht durchgeführt. Auf die Kryoprotektion der Probe durch aufsteigende Konzentrationen an Saccharose-Lösung musste gänzlich verzichtet werden, da sich das Hydrogel hierdurch zunehmend auflöste.

Das Standardverfahren der RNA-Isolierung aus den hMSC musste aufgrund von Pluronic® P123, Kollagen I und der calciumhaltigen extrazellulären Matrix im osteogen differenzierten Kollagen-Poloxamer-Hydrogel besonders angepasst werden. Vor der eigentlichen RNA-Isolierung wurden diese drei Bestandteile, die die Durchlässigkeit der Membran der Beladungssäulen behindern, entfernt. Dazu wurde das Kollagen I zunächst mit Collagenase gespalten und durch Zentrifugation entfernt. Als weiteren Schritt erfolgte eine Aufreinigung mit Chloroform, QIAzol und Isopropanol. Nach Zentrifugation wurde die eigentliche RNA-Isolierung nach dem Standardverfahren im Pellet durchgeführt.

4. DISKUSSION

4.1. ANWENDUNGSFREUNDLICHKEIT DES PLURONIC® P123

Thermoresponsive Hydrogele wie das kettenverlängerte Pluronic® P123 der vorliegenden Dissertation stellen vielversprechende Materialien für die Regenerative Medizin dar. Um die Vorteile dieser innovativen Materialien jedoch vollends einsetzen zu können, müssen im Umgang mit dem Hydrogel einige Fakten beachtet werden. Unter anderem sind im Umgang mit den Gelen spezifische Modifikationen für eine gezielte Anpassung an die jeweiligen Methoden notwendig.

4.1.1. Thermoresponsive Hydrogele in der Praxis

Aufgrund der negativ-sensitiven Thermoresponsivität des Pluronic® P123 ist die Temperatur der entscheidende Faktor für den Phasenzustand und die mechanischen Stabilität des Hydrogels. Für ein flüssiges Poloxamer muss die Temperatur unterhalb einer LCST von 27,6 °C für das HDI-Hydrogel bzw. 26,2 °C für das BDI-Hydrogel liegen (33).

Aus diesem Grund wurden, neben der Aufbewahrung des Hydrogels bei 4 °C, auch die Modifikation des Hydrogels mit Kollagen I und die Zellbesiedelung auf Eis durchgeführt. Da das Temperaturoptimum für die Kultur von hMSC bei 37 °C liegt, sollten die Arbeitsschritte möglichst rasch durchgeführt werden, um negative Effekte auf die Zellproliferation zu vermeiden. Um das Hydrogel für den Alizarin-Rot-Assay und den ALP-Assay zu entfernen, erfolgte zunächst eine Lagerung bei 4 °C für 30 Minuten mit anschließender Zentrifugation. Auch der Einsatz anderer negativ-thermoresponsiver Hydrogele wie z.B. Pluronic® F127 erfordert für die Zellbesiedelung Temperaturen unterhalb der jeweiligen LCST (107).

Sobald das zellbesiedelte Poloxamer durch Inkubation oberhalb der LCST eine Mizellenstruktur gebildet hat, sollte die Temperatur konstant oberhalb der LCST gehalten werden, um eine Destabilisierung der Mizellen zu verhindern. Dazu wurden die Medien auf 37 °C erwärmt und die Arbeitsschritte auf erwärmten Gelkompressen durchgeführt. Ohne diese Maßnahmen würde das Hydrogel seine Gelstruktur verlieren. Die gestörte Gelarchitektur hätte negative Folgen auf die angesiedelten Zellen. Diese würden ebenfalls ihre Ordnung in dem dreidimensionalen Mizellennetzwerk verlieren. Aus diesem Grund sollte penibel auf die Einhaltung des jeweilig nötigen Temperaturbereichs geachtet werden. Mit Hilfe der Lagerung auf Eis oder erwärmten Gelkompressen konnte dieser Anspruch jedoch ohne großen Mehraufwand eingehalten werden.

Das in der Dissertation eingesetzte Pluronic® P123 wurde hinsichtlich seiner mechanischen Stabilität durch die Polymerisation mit den Kettenverlängerern HDI und BDI bereits optimiert. Alternativ kann eine Erhöhung der Poloxamerskonzentration die

mechanischen Eigenschaften verbessern, allerdings zulasten der Biokompatibilität (33). Stattdessen werden zunehmend verschiedene Hydrogele miteinander kombiniert, z.B. Pluronic® F127 mit PLGA/PEG, um die Eigenschaften des Hydrogels zu modifizieren (108).

4.1.2. Einfluss der Mizellenstruktur auf Nachweismethoden

Zur Quantifizierung der Osteogenese mittels Alizarin-Rot-Assay zeigte sich, dass das Hydrogel im ersten Arbeitsschritt entfernt werden muss. Gleiches gilt auch für den ALP-Assay.

Das Standardvorgehen mit Direktfärbung im Hydrogel resultierte in Messfehlern und positiver Negativkontrolle. Eine klare Aussage über den Erfolg der osteogenen Differenzierung war hierbei schwierig zu treffen, da die zellbesiedelte nicht osteogen stimulierte Negativkontrolle und sogar eine zellfreie Negativkontrolle eine deutliche Rotfärbung durch Alizarin-Rot-Komplexe aufwies. Es war lediglich ein Unterschied in der Ausprägung der Rotfärbung auszumachen. Als wahrscheinliche Ursache der positiv gefärbten Negativkontrollen gilt die Mizellenstruktur des Poloxamers, in der die Alizarin-Rot-Farbpigmente hängen bleiben. Ein osteoinduktiver Effekt, der bereits vom reinen Hydrogel ausgeht, ist eher unwahrscheinlich, da die Alizarin-Rot-Färbung auch im zellfreien Hydrogel ein positives Ergebnis aufweist. Zur Lösung dieser Problematik wurde das Hydrogel vor Durchführung des Assays bei $\leq 4\text{ °C}$ verflüssigt und durch Zentrifugation entfernt. So wurde der Störeffekt durch die Mizellenstruktur aufgehoben.

Eine Entfernung des Hydrogels vor der weiteren Arbeit mit den Zellen findet sich auch in der Literatur. Zellbesiedeltes Pluronic® F 127 wurde nach erfolgter Zellkultur durch Inkubation bei 4 °C für 15 bzw. 30 Minuten verflüssigt und entfernt. Im Anschluss wurden die gewünschten Experimente, z.B. eine *Oil-Red*-Färbung durchgeführt (51, 107).

Auffällig war jedoch eine mitunter ausgeprägte Messungenauigkeit mit hoher Standardabweichung. Dies kann in den Aufreinigungsschritten zur Entfernung des Hydrogels begründet sein. Möglicherweise wurde in den verschiedenen Proben unterschiedlich viel Hydrogel entfernt und ebenfalls unbeabsichtigt calciumhaltige Matrix oder Zellen mitentfernt.

4.1.3. Pluronic-Hydrogele in der histologischen Beurteilung

Der histologische Nachweis der Osteogenese erfolgte anhand von Kryopräparaten. Die Kryohistologie bedarf einer weniger aufwändigen Methodik als die Paraffineinbettung, die dieser jedoch in der Qualität der Schnitte etwas nachsteht. Zusätzlich wurde das übliche Procedere modifiziert, indem für 30 Minuten in 4 % PFA bei 30 °C fixiert wurde. Auf die Kryoprotektion durch Sucrose wurde vollständig verzichtet. Dies hätte ansonsten

in Veränderung der Gelarchitektur mit Gerverlusten resultiert. Trotz Einbußen in der Qualität der histologischen Schnitte wurde, zugunsten der sensiblen Hydrogelstruktur, diese modifizierte Kryoeinbettung gewählt. Zudem erlaubte diese Technik nur eine Schnittdicke von 30 µm. Die Qualität dieser Schnitte war für den gewünschten, reinen Calciumnachweis jedoch völlig ausreichend.

Die histologische Analyse von Hydrogelen stellt besondere Anforderungen. Aus diesem Grund wird in vielen Studien vollständig auf diese Methode verzichtet und stattdessen auf Alternativen wie RTQ-PCR oder Assays ausgewichen (109, 110). Als Alternativverfahren wurde eine spezielle Gelatineeinbettung publiziert, die auch für thermoresponsive und sensible Hydrogele eine histologische Analyse ermöglichen soll (111). In der Publikation wurde das thermoresponsive PCL-polyPEGMA-EE246 erfolgreich durch aufsteigende Gelatinekonzentrationen bei 37 °C eingebettet, wobei die Gelarchitektur erhalten werden konnte. Im Anschluss konnten die in Gelatine-eingebetteten Proben in Kryomedium oder in Paraffin eingebettet werden und dünne Schnitte hergestellt werden. Als positiv thermoresponsive Substanz liegt Gelatine bei Überschreiten einer UCST als Lösung vor und geliert bei abnehmender Temperatur. In der Publikation funktioniert dieses Procedere einwandfrei. Die Anwendung dieser Methode auf das kettenverlängerte Pluronic® P123 in der vorliegenden Arbeit führte jedoch, trotz der eingehaltenen Temperatur von 37 °C, zu einem Verlust der Gelarchitektur. Daraus resultierte ein minderwertiger histologischer Schnitt mit kaum mehr vorhandenen Reststrukturen des zellbesiedelten Hydrogels. Vermutlich wurde der Großteil beim Entfernen der jeweiligen Gelatinelösung zum Austausch mit einer höher konzentrierten Gelatinelösung mitentfernt.

4.1.4. Differenzierte Betrachtung der Genexpressionsanalyse

Die molekularbiologische Untersuchung der osteogen differenzierten MSC im BDI-Hydrogel stellte besondere Herausforderungen. Die RNA-Isolierung wird sowohl durch das BDI-Hydrogel, als auch das Kollagen I und die calciumhaltige extrazelluläre Matrix stark beeinflusst, da diese Bestandteile die Membran der RNA-Isolationssäulen nicht passieren können und diese in ihrer Funktion beeinträchtigen.

Aus diesem Grund wurde, wie in anderen Studien über kollagenhaltige Hydrogele publiziert (112), das zugefügte Kollagen I durch eine Behandlung mit Collagenase gespalten. Durch den Einsatz von QIAzol und Chloroform wurde die Probe in verschiedene Phasen aufbereitet, wodurch eine Abtrennung des Hydrogels und der extrazellulären Matrix gelang. Diese Methode wurde bereits in ähnlichen Studien mit osteogen differenzierten Zellen in Hydrogelen erfolgreich eingesetzt (112, 113). Durch diese Adaptionen wurde zwar eine RNA-Isolierung ermöglicht, dennoch resultierten daraus eine sehr geringe RNA-Menge sowie eine minderwertige RNA-Qualität.

Die Besiedelung der Hydrogele erfolgte mit jeweils 5×10^5 hMSC pro Gelpellet. Über die exakte Zellzahl zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung nach 21 Tagen osteogener Differenzierung kann keine Aussage getroffen werden. Der Überlebenskurve des 80 % BDI-Hydrogels (Abb. 16) jedoch zufolge, müsste die Zellzahl deutlich, um mehr als 50 % abgenommen haben. Dies könnte die geringe Menge an RNA von 120 ng (2,4 ng/ μ l in 50 μ l) erklären. Laut dem Hersteller des *cDNA Synthesis Kit* können RNA-Mengen von 10 ng bis 5 μ g eingesetzt werden, empfohlen ist jedoch 1 μ g RNA. Eine zu geringe RNA-Menge resultiert in einer geringen Menge an cDNA und daneben auch in einer minderwertigen cDNA-Qualität (114). Um die Menge und Qualität der RNA innerhalb der verschiedenen Gruppen \emptyset OM, OM und OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 homogen zu gestalten, betrug die geringste einsetzbare RNA-Menge jeweils 120 ng.

Aus der RTQ-PCR resultierten Expressionslevel der Zielgene ALP, Runx-2 und OPN, die, übereinstimmend mit den übrigen Nachweismethoden, eine erfolgreiche osteogene Differenzierung der im BDI-Hydrogel differenzierten hMSC zeigten. Zur relativen Quantifizierung erfolgte die Normalisierung der Expressionslevel der Zielgene durch das *housekeeping gene* GAPDH. Die RTQ-PCR von GAPDH lieferte jedoch nicht, wie erwartet, konstante Expressionslevel, sondern schwankte innerhalb des Zeitraums von 7, 14 und 21 Tagen und zwischen den Gruppen \emptyset OM, OM und OM mit 250 ng/ml rhBMP-7. Insbesondere in den Gruppen \emptyset OM und OM nach 7 Tagen Inkubation zeigte das GAPDH wesentlich höhere Expressionslevel als in den anderen Messgruppen. Die Anwendung eines weiteren *housekeeping gene*, der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT), zeigte ähnliche Expressionsprofile mit Höchstwerten in den Gruppen \emptyset OM und OM nach 7 Tagen. Ursächlich hierfür könnten die diskutierte geringe Menge sowie die minderwertigen Qualität der Nukleinsäuren sein. Zu einem frühen Zeitpunkt des Versuchs ist die Zellzahl im Hydrogel höher als nach 14 oder 21 Tagen. Damit wird möglicherweise zu diesem Zeitpunkt auch die größte Menge an RNA aus dem Gelpellet isoliert. Zum Ausschluss dieser Fehlerquelle wurde jedoch zur cDNA-Synthese in allen Proben einheitlich die RNA-Menge von 120 ng eingesetzt. In den Gruppen \emptyset OM und OM nach 7 Tagen ist jedoch auch die Sekretion einer calciumhaltigen Matrix im Zuge der Osteogenese am geringsten ausgeprägt. Die RNA-Isolation war durch das teilweise sehr calciumhaltige Gewebe deutlich erschwert. Aus diesem Grund mussten additive Schritte zur Entfernung der calciumhaltigen Matrix eingesetzt werden. Hierdurch könnte die RNA-Qualität durch das aggressive Procedere beeinträchtigt sein. Ein weiterer Grund für die Variabilität der GAPDH-Expression könnte das GAPDH selbst sein, falls es, wider Erwarten, einer Regulation unterlegen ist. Um die Ergebnisse der RTQ-PCR zwischen den verschiedenen Gruppen zu vergleichen, sollte eine Normalisierung der RNA-Level der Zielgene durch ein oder sogar mehrere unregulierte *housekeeping genes* durchgeführt werden. Denn trotz der einheitlichen RNA-Menge sind Abweichungen zwischen den untersuchten Gruppen durch die Behandlung der Proben, die RNA-Qualität oder die Qualität der cDNA möglich (115). Zur Normalisierung der RNA-Level wird häufig das *housekeeping gene* Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) eingesetzt (115, 116). Im Gegensatz zu der bisher vertretenen Meinung, zeigte sich jedoch, dass *housekeeping genes*, wie insbesondere auch GAPDH, die Forderung nach

konstanten und unregulierten Expressionslevels nicht in allen Fällen erfüllen (115, 116). Eine Studie ergab, dass die Expression von GAPDH während einer osteogenen Differenzierung von MSC nicht konstant, sondern Variationen unterlegen ist (117). Besser geeignet zur Normalisierung der Expressionslevel der Zielgene ist möglicherweise EF1 α (117). In der Literatur wird außerdem auch der gleichzeitige Einsatz mehrerer *housekeeping genes* favorisiert (118-120). Deren Kombination erlaubt eine höhere Validität bei der Quantifizierung von Genexpressionen (118-120).

Trotz der Resultate der RTQ-PCR, die eine erfolgreiche Osteogenese widerspiegeln, sollten diese Ergebnisse in weiteren Versuchen mit anderen *housekeeping genes* verifiziert werden.

4.2. BIOKOMPATIBILITÄT DER EINGESETZTEN HYDROGELE

4.2.1. Reduziertes Zellüberleben in synthetischem Hydrogel

Die Biokompatibilität der eingesetzten BDI- und HDI-Hydrogele wurde anhand des WST-1-Assays untersucht. Das Absorptionsniveau im WST-1-Assay korrelierte direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Nach einem Zeitraum von 48 Stunden waren die Zellen adhärent, metabolisch aktiv und abgestorbene Zellen außerhalb der Gelpellets wurden durch einen Mediumwechsel entfernt. Ausgangspunkt der Proliferations- und Überlebenskurve war also der Zeitpunkt zwei Tage nach Besiedelung. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch die osteogene Differenzierung gestartet.

In allen vier untersuchten Gruppen, 100 % HDI-Hydrogel, 100 % BDI-Hydrogel, 80 % HDI-Hydrogel und 80 % BDI-Hydrogel zeigte sich über den Verlauf von 2, 7, 14 und 21 Tagen eine abnehmende Absorption (Abb. 15, 16). Daraus kann auf eine Abnahme der Zellviabilität geschlossen werden. Insbesondere in den 100 % Hydrogelen resultierte von dem Ausgangsniveau bei Tag 2 bis zum Tag 21 eine ausgeprägte Reduktion des WST-Absorptionslevels. Im 100 % HDI-Hydrogel sank das Ergebnis auf 8 % vom Ausgangswert, im 100 % BDI-Hydrogel ging die Zellviabilität auf 37 % zurück. Im Verlauf der 21 Tage nahm offensichtlich die metabolische Aktivität im Hydrogel-Scaffold und damit ein entscheidender Faktor für die Vitalität der Zellen ab. Mögliche Ursachen könnten ein Mangel an Schlüsselsequenzen für die Zelladhäsion, zu hohe Konzentrationen an abgestorbenen Zellen oder eine spät-zytotoxische Wirkung durch pH-Veränderungen innerhalb der zellulären Mikroumgebung sein.

Grundsätzlich werden Poloxamere als nicht-toxisch angesehen. Dosisabhängig wurden in der Anwendung hoher Polymerkonzentrationen jedoch negative Effekte auf die Zellen festgestellt (33). Durch den Einsatz von HDI und BDI als Kettenverlängerer konnte die Konzentration des Pluronic® P123 in der Dissertation, bei dennoch guter mechanischer

Stabilität, gering gehalten werden. Sowohl das HDI-Hydrogel, als auch das BDI-Hydrogel zeigten eine gute Biokompatibilität ohne zytotoxische Effekte (32).

4.2.2. Bereitstellung von Adhäsionsschlüsselsequenzen

Im Vergleich zu biologischen Hydrogelen bieten synthetische Polymere jedoch eine eingeschränkte Biokompatibilität. Dies bestätigte sich in den Ergebnissen dieser Arbeit. Ein Grund stellt die Natur der synthetischen Polymere dar, die den Zellen keine typischen Schlüsselsequenzen zur Zelladhäsion bieten (28).

Durch die Modifikation des synthetischen HDI-Hydrogels und BDI-Hydrogels mit 20 % Kollagen I verbesserte sich die Überlebens- und Proliferationskurve im WST-Assay (Abb. 15, 16). Sowohl für das HDI-Hydrogel, als auch für das BDI-Hydrogel lag das Ergebnis des WST-Assays zu jedem der Messpunkte, 2, 7, 14 und 21 Tage, im 80 % Hydrogel mit 20 % Kollagen I signifikant höher als im 100 % Hydrogel. Diese Ergebnisse zeigen einen direkten Einfluss von Kollagen I auf das Zellüberleben.

Der Nutzen von Kollagen I auf die Zelladhäsion in synthetischen Zellträgern zeigte sich auch in anderen Studien (28, 38, 87). Im Gegensatz zu synthetischen Hydrogelen verfügen biologische Hydrogele aus z.B. Kollagen über eine Matrix, die den Zellen zellspezifische Schlüsselsequenzen bietet. Diese Bindungsdomänen, z.B. RGD, DGEA und GFOGER, stellen den Zellen Adhäsionsmöglichkeiten über die Bindung an Integrine zur Verfügung (24, 29, 35). Diese Sequenzen werden von Osteoprogenitorzellen nicht nur zur Adhäsion, sondern auch zur Migration, Proliferation und Differenzierung benötigt (24). Studien zeigten, dass Zellen in einem synthetischen Hydrogel ohne Adhäsionsdomänen zur Bildung von Zellclustern neigen (29). Auf der anderen Seite resultierte in einer anderen Publikation gerade die Modifikation von Pluronic® F127 mit Kollagen I in einer Bildung von Zellclustern, die weitere Versuche unmöglich machten (107). Dieser negative Effekt war dosisabhängig und in höheren Konzentrationen besonders stark ausgeprägt (107). In der Dosierung von 20 % Kollagen I konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden.

4.2.3. Bildung von Zellsphäroiden innerhalb des Hydrogels

Da die Modifikation mit Kollagen I zu besseren Zellüberlebensraten führte, wurde für die weiteren Versuche nur das 80 % Hydrogel mit 20 % Kollagen I eingesetzt.

Sowohl in der Voruntersuchung der Zellmorphologie durch eine einfache Giemsa-Kernfärbung (Abb. 17) als auch in einer genaueren Analyse durch Lebend-Tot-Färbung (Abb. 18, 19) zeigten sich sphäroidartige Zellaggregate.

Neben der traditionellen Standardkultur von MSC als zweidimensionalen *Monolayer*, wurde daneben auch eine alternative Methode zur MSC-Expansion in Form von dreidimensionalen Zellsphäroiden entwickelt (121). Diese kugelförmigen Zellaggregate bilden sich, wenn unter den vorherrschenden Kulturbedingungen eine Adhäsion an einer festen Oberfläche nicht möglich ist (121). In Hydrogelen, wie Chitosan oder Pluronic® F127, führte die Kultivierung von Zellen zur Bildung von Pseudopodien und durch Zell-Zell-Interaktionen zu multizellulären Sphäroiden (107, 122). Ebenso führte die Besiedelung der kollagenhaltigen Hydrogele in der vorliegenden Arbeit zu kugelförmigen Zellaggregaten. Im Gegensatz zu einer Publikation, in der die Modifikation von Pluronic® F127 mit Kollagen I zu einem einzelnen großen Zellcluster führte und weitere Untersuchungen unmöglich machte (107), zeigten sich im hier eingesetzten 80 % Hydrogel mehrere, homogen verteilte Zellaggregate.

Vorteile dieser 3D-Kulturen gegenüber dem Standard-*Monolayer* sind die Sphäroide, die den physiologischen, in-vivo Kulturbedingungen ähneln (121, 123). Diese Zellaggregate ermöglichen sowohl Zell-Zell-Kontakte, als auch Interaktionen zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix (123). Dadurch wird das Zellüberleben und auch das osteogene Differenzierungspotenzial möglicherweise gesteigert (121). Die gute Zellviabilität zeigte sich in der Lebend-Tot-Färbung (Abb. 18, 19). Die Sphäroide bestanden überwiegend aus grün fluoreszierenden, lebendigen Zellen und nur vereinzelt aus rot fluoreszierenden, apoptotischen Zellen.

Die Effektivität der Osteogenese wurde in der vorliegenden Dissertation untersucht und nachgewiesen. Auch in anderen Publikationen fand sich ein gesteigertes osteogenes Differenzierungspotenzial der Sphäroide anhand einer Hochregulation osteogenetischer Gene, wie Runx-2 und BMP-2, einer gesteigerten Freisetzung von Ca^{2+} und einer erfolgreichen Knochenregeneration in Ratten (121, 123).

Nachteil der Zellsphäroide ist eine eingeschränkte Diffusionsmöglichkeit von Nährstoffen, Sauerstoff und Abfallstoffen vom Zentrum des Zellaggregats nach außen (121, 124). Als limitierende Grenze für die Diffusion zeigte sich ein Radius von 200 μm (124). Die Größe der Sphäroide in den hier untersuchten Hydrogelen lag mit durchschnittlich 150 μm Durchmesser unter dieser Grenze. Somit sind negative Auswirkungen, wie hypoxischer Zelltod, durch eine eingeschränkte Diffusionskapazität eher nicht zu erwarten.

Die Organisation der MSC im 80 % HDI- und BDI-Hydrogel zu Zellsphäroiden ist somit als positiv zu bewerten. Gegenüber dem traditionellen *Monolayer* bieten sich möglicherweise Vorteile hinsichtlich der Zellviabilität und der osteogener Differenzierung.

4.2.4. Vergleich von HDI-Hydrogel und BDI-Hydrogel

Im Vergleich der beiden untersuchten Hydrogele zeigte das BDI-Hydrogel hinsichtlich des Zellüberlebes und auch der Zellmorphologie etwas bessere Resultate als das HDI-Hydrogel.

Im WST-1-Assay resultierte das 100 % BDI-Hydrogel (Abb. 16) zu den Messpunkten, Tag 7, 14 und 21, in einem statistisch signifikant höheren Zellüberleben als das 100 % HDI-Hydrogel (Abb. 15). Das 80 % BDI-Hydrogel (Abb. 16) lieferte keine statistisch signifikant höhere Zellviabilität als das 80 % HDI-Hydrogel (Abb. 15), dennoch zeigte es tendenziell bessere Ergebnisse. Auch in einer weiteren Studie wurde kein signifikanter Unterschied zwischen HDI-Hydrogel und BDI-Hydrogel publiziert (32). Das BDI-Hydrogel überzeugte aber auch in dieser Studie mit einem etwas höheren Zellüberleben (32).

Der Kettenverlängerer BDI (1,4-Butan-diisocyanat) setzt sich aus der chemischen Formel $OCN-(CH_2)_4-NCO$ zusammen. Dagegen besteht HDI (1,6-Hexamethylen-diisocyanat) aus der chemischen Formel $OCN-(CH_2)_6-NCO$. Dabei zeigt sich, dass sich diese zwei Stoffe um zwei CH_2 -Gruppen in ihrer Kettenlänge unterscheiden. Das bedeutet, dass das HDI im Vergleich zu BDI noch stärkere hydrophobe Eigenschaften besitzt. Damit erhöht sich zum einen die Stabilität im Hydrogel. Zum anderen hat es jedoch möglicherweise auch negative Auswirkung auf die Adhäsion von Zellen sowie die Versorgung mit Nährstoffen im Hydrogel durch die hydrophoben Eigenschaften.

Hinsichtlich der Zellmorphologie organisierten sich die angesiedelten Zellen in beiden Hydrogelen gleichermaßen zu sphäroidartigen Zellaggregaten (Abb. 17-18). In der mikroskopischen Untersuchung nach Lebend-Tot-Färbung konnte jedoch auf eine größere Anzahl an Sphäroiden bzw. auf eine zellreichere Matrix im BDI-Hydrogel geschlossen werden. Ursächlich ist möglich, dass der weniger starke hydrophobe Charakter des BDI im Vergleich zu HDI zu einer etwas besseren Zelladhäsion im jeweiligen Hydrogel führt. Dies bewirkt folglich ein höheres Zellaufkommen mit einer höheren Anzahl von Zellsphäroiden. Die Zellsphäroide im HDI-Hydrogel sind vereinzelt im Hydrogel verteilt. Im Gegensatz dazu erscheinen die kugelförmigen Zellaggregate im BDI-Hydrogel einander angenähert und bieten durch Matrixbrücken zwischen den Sphäroiden ein ausgeprägtes dreidimensionales Netzwerk. Die dreidimensionale MSC-Kultur bildet Sphäroide durch Zell-Zell-Kontakte und Interaktionen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix (123). In dem BDI-Hydrogel befinden sich tendenziell geringfügig mehr MSC als im HDI-Hydrogel. Diese MSC bilden Sphäroide, die bei größerer Anzahl durch Zell-Zell-Interaktionen wiederum in Kontakt treten können. Zudem wird durch das höhere Zellaufkommen im BDI-Hydrogel auch mehr extrazelluläre Matrix gebildet. Entlang der zellspezifischen Schlüsselsequenzen, die von der extrazellulären Matrix zur Verfügung gestellt werden (24, 29), adhären die MSC. Möglicherweise werden den Zellen also im BDI-Hydrogel mehr Adhäsionsmöglichkeiten durch ein größeres Maß an extrazellulärer Matrix angeboten. Dadurch werden größere und auch verzweigte Zellaggregate gebildet.

4.3. OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG IM PLURONIC® P123

4.3.1. Optimierung der Bedingungen zur osteogenen Differenzierung

Zur Durchführung der osteogenen Differenzierung von MSC im Hydrogel wurden, in Anbetracht der weiteren durchgeführten Versuche im Hydrogel, Modifikationen und Optimierungen durchgeführt.

Aufgrund der signifikant höheren Zellviabilität durch das Kollagen I im WST-Assay (Abb. 15, 16), wurden die Pluronic® P123 Hydrogele für die osteogene Differenzierung von vornherein alle mit 20 % Kollagen I modifiziert. Vor allem Osteoprogenitorzellen benötigen diese Adhäsionssequenzen für Migration, Proliferation und Differenzierung (24).

In einem Vorversuch wurden SCP-1 in 80 % Hydrogel mit etabliertem Differenzierungsmedium osteogen differenziert (Abb. 19). Die SCP-1 wurden eingesetzt, da sie keiner Seneszenz unterliegen und über eine hohe Proliferationskapazität verfügen (67). Obwohl eine osteogene Differenzierungsfähigkeit der SCP-1 eindeutig nachgewiesen wurde (67), besitzen diese Zellen in höheren Passagen ein eingeschränktes Differenzierungspotenzial. Dies zeigte sich darin, dass ein erfolgreicher, signifikanter Nachweis einer Osteogenese erst nach einer Stimulation über 35 Tage gelang. Zusätzlich wurden die Zusätze Dexamethason und L-Ascorbinsäure von Tag 25 bis Tag 35 in ihrer Konzentration verdoppelt. Die nativen hMSC des Donor XV dagegen zeigten ein hohes osteogenes Differenzierungspotenzial mit einer signifikanten Osteogenese bereits nach 25 Tagen. Außerdem wurden diese Zellen gentechnologisch nicht verändert (103). Aus diesen Gründen wurden für die in der Dissertation untersuchte osteogene Differenzierung hMSC eingesetzt.

In dem Vorversuch zur osteogenen Differenzierung wurde das Differenzierungspotenzial des 80 % HDI-Hydrogels mit dem des 80 % BDI-Hydrogel verglichen (Abb. 19). Die SCP-1 konnten in beiden Hydrogelen erfolgreich mit Differenzierungsmedium differenziert werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigte sich sowohl für das HDI-Hydrogel, als auch für das BDI-Hydrogel eine statistisch signifikant höhere Alizarin-Rot-Konzentration in den Gruppen OM. Zwischen den osteogen differenzierten Gruppen OM des HDI-Hydrogels und des BDI-Hydrogels war kein statistisch signifikantes Ergebnis festzustellen. Die Besiedelung der SCP-1 im BDI-Hydrogel resultierte jedoch, zwar ohne Signifikanz, in einer höheren Alizarin-Rot-Konzentration als im HDI-Hydrogel.

Zusammenfassend wurden zur Differenzierung von MSC im Pluronic® P123 folgende Optimierungen vorgenommen: Die Hydrogele wurden mit nativen hMSC besiedelt, die eine hohe Differenzierungsfähigkeit besitzen. Aufgrund der höheren Zellviabilität und des höheren osteogenen Differenzierungspotenzial wurde das Pluronic® P123, das mit BDI modifiziert wurde, als Zellträgermaterial gewählt.

4.3.2. Erfolgreiche osteogene Differenzierung im BDI-Hydrogel

Die osteogene Differenzierung der hMSC im 80 % BDI-Hydrogel wurde durch das osteogene Differenzierungsmedium durchgeführt, das sich in der Literatur als Standardmedium zur Osteogenese etabliert hat (32).

Die Effektivität der osteogenen Differenzierung wurde auf drei Ebenen analysiert. Neben dem direkten Nachweis einer Ca^{2+} -haltigen extrazellulären Matrix und einer Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase (ALP) durch photometrische Assays, wurde eine histologische Untersuchung der Gelpellets durchgeführt. An Kryogewebeschnitten wurde durch Von-Kossa und Alizarin-Rot die Ca^{2+} -haltige extrazelluläre Matrix angefärbt. Zusätzlich erfolgte eine molekulargenetische Untersuchung durch die RTQ-PCR der Gene Osteopontin, ALP und Runx-2.

Im Alizarin-Rot-Assay (Abb. 20) zeigte sich nach 25 Tagen Stimulation durch das osteogene Differenzierungsmedium eine statistisch signifikant höhere Alizarin-Rot-Konzentration der Gruppe OM gegenüber der Negativkontrolle. Der Alizarin-Rot-Assay wird in vielen Studien eingesetzt und gilt als valides und sensitives Verfahren zum Nachweis einer osteogenen Differenzierung (113). Die Ca^{2+} -Ionen, die bei der Knochenbildung in der extrazellulären Matrix vorhanden sind, werden durch die Komplexbildung mit Alizarin-Rot-S als Rotfärbung dargestellt.

Die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase ist in der Frühphase der Osteogenese erhöht (125). In anderen Studien wurde der ALP-Aktivitäts-Assay meist nach einem Zeitraum von 7 und 14 Tagen durchgeführt, wobei sich die höchste ALP-Aktivität nach 14 Tagen Stimulation zeigte (113, 126, 127). Aufgrund des, trotz Modifikation mit Kollagen I, reduzierten Zellüberlebens sowie der leicht verzögerten Differenzierung im Hydrogel, wurde der Zeitraum etwas verlängert. Dementsprechend wurde der ALP-Aktivitäts-Assay nach 16 Tagen osteogener Differenzierung durchgeführt. Wesentlich früher als durch die anderen Nachweismethoden zeigte sich so durch die hohe ALP-Aktivität ein signifikant erhöhtes osteogenetisches Potential in der Gruppe OM im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 21).

Die histologischen Färbungen (Abb. 22) zeigten eine ausgeprägte Schwarzfärbung (Von-Kossa) bzw. Rotfärbung (Alizarin-Rot) der osteogen differenzierten hMSC-besiedelten BDI-Hydrogele. Diese Farbkomplexe wiesen, wie auch in der Untersuchung der Zellmorphologie, eine zirkuläre Anordnung entsprechend den Zellsphäroiden auf. Detaillierte Zellstrukturen, wie in Studien mit *Monolayern* (126), konnten mittels dieser Färbungen nicht dargestellt werden. Als wahrscheinliche Ursache kommt die relativ dicke Schnittdicke der Kryopräparate von 30 μm in Frage, die für die Durchführung der Kryohistologie nötig war. Diese Dicke erschwert die Begutachtung detaillierter zellulärer Strukturen. Doch für die Beurteilung der osteogenen Differenzierung durch Calciumnachweis bereitet diese keine Probleme. Im Gegensatz zu der osteogen differenzierten Gruppe blieben die Negativkontrollen sowohl in der Von-Kossa-Färbung

als auch in der Alizarin-Rot-Färbung weitgehend blank und ungefärbt. Damit kann eine Mitreaktion des 80 % BDI-Hydrogels ausgeschlossen werden.

Zur molekularbiologischen Untersuchung wurde die Expression von Genen, die typischerweise während der Osteogenese hochreguliert werden, in einer RTQ-PCR quantifiziert. Zu diesen Osteogenese-Markern gehören die Gene ALP, OPN und Runx-2 (128). Insbesondere ALP und Runx-2 sind in der Frühphase der Osteogenese hochreguliert (128, 129). In einer Publikation zeigte sich für OPN und Runx-2 die höchste Genexpression an Tag 28 einer osteogenen Differenzierung, während in dieser Arbeit ALP an Tag 21 am stärksten exprimiert wurde (128). Eine weitere Studie veröffentlichte für ALP relativ konstant hohe Genexpressionen von Tag 3 bis Tag 20. Runx-2 zeigte eine gering ansteigende Genexpressionen von Tag 3 bis Tag 20. Die Expression von OPN dagegen stieg bis zum Tag 20 signifikant an (129).

In der vorliegenden Arbeit wurden die untersuchten Gene ALP, Runx-2 und OPN zu jedem der Zeitpunkte (7, 14 und 21 Tage) in der Gruppe OM stärker exprimiert als in der Negativkontrolle (Abb. 23-25). Dieser Unterschied in der Genexpression war für OPN an Tag 7 und Tag 21 statistisch signifikant, für ALP an Tag 21 und für Runx-2 an Tag 21. Alle drei Gene stiegen in der osteogen differenzierten Gruppe OM von Tag 7 bis Tag 21 zunehmend an und resultierten an Tag 21 mit der jeweils höchsten Expression.

Bisher wurden noch keine Studien über eine osteogene Differenzierung von MSC in Pluronic® P123 publiziert. Jedoch der Einsatz von Pluronic® F127 als Zellträger für das *Tissue Engineering* von Knochengewebe wurde bereits in mehreren Studien geprüft. Dabei zeigte sich Pluronic® F127 als erfolgreiches Gerüst für die osteogene Differenzierung von Zellen (51, 113).

Eine Steigerung der Effektivität der Osteogenese im Hydrogel kann durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren erreicht werden. Mehrfach gezeigt wurde, dass der Einsatz von BMP-2 in Hydrogel-Kulturen die osteogene Differenzierung von MSC steigert und somit als vielversprechende Methode zur Osteoinduktion zum Einsatz kommt (130).

4.3.3. Osteoinduktion im BDI-Hydrogel durch rhBMP-7

Im nächsten Schritt wurde eine potenzielle Optimierung der Osteogenese durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren analysiert. Mögliche Signalmoleküle mit osteoinduktiven Eigenschaften sind IGF, PDGF, VEGF, TGF- β und BMP (10, 68). Als vielversprechender osteoinduktiver Wachstumsfaktor gilt, neben BMP-2, insbesondere das BMP-7, deren positive Eigenschaften auf die Osteogenese in mehreren Studien publiziert wurde (79, 84-86). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Effektivität von rhBMP-7 als osteoinduktives Signalmolekül in den hMSC-besiedelten 80 % BDI-Hydrogelen untersucht.

In der Literatur wurden verschiedene Konzentrationen von rhBMP-7 beschrieben. Dabei zeigten *in vivo* Absolutmengen von 50 – 200 µg rhBMP-7 eine effektive Osteoinduktion im Einsatz von femoralen Knochendefekten der untersuchten Ratten (131-134). Auf das jeweils in diesen Studien eingesetzte Volumen umgerechnet ergaben sich Konzentrationen von 500 – 2000 µg/ml. *In vitro* erwies sich in einer Studie eine Konzentration von 400 ng pro 0,25 g des damit modifizierten Hydroxyapatits (1600 ng/g) als vielversprechende Methode zur Steigerung der Osteoinduktion (135). In weiteren *in vitro* Publikationen resultierten Konzentrationen von 160 – 200 ng/ml in der effektivsten osteogenen Differenzierung (97, 136). Für die *in vitro* Anwendung von rhBMP-7 in thermoresponsiven Hydrogelen wurde keine entsprechende Literatur gefunden. Der Wachstumsfaktor rhBMP-2 wurde dagegen als osteoinduktives Protein zur osteogenen Differenzierung von MSC in einem *Scaffold* aus poly(NiPAAm-co-AAc) und Hydroxyapatit eingesetzt. Die Konzentration von 100 ng/ml rhBMP-2 resultierte dabei in einer effektiven Osteogenese (130). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Dissertation drei Konzentrationen von rhBMP-7 gewählt, die sich an der rhBMP-2-Konzentration in der Literatur (135) orientieren. Diese drei Konzentrationen waren 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml rhBMP-7.

Im ALP-Aktivitäts-Assay wurden alle drei Konzentrationen hinsichtlich ihrer Effektivität untersucht und verglichen. Da der ALP-Aktivitäts-Assay mit dem Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase ein früher Osteogenese-Marker ist, wurde er an Tag 16 der osteogenen Differenzierung durchgeführt. Aufgrund der kürzeren Stimulationszeit ist der ALP-Aktivitäts-Assay, hinsichtlich des benötigten rhBMP-7, kostengünstiger als die anderen Methoden. Deshalb wurde nur der ALP-Aktivitäts-Assay zur Evaluation der drei Konzentrationen eingesetzt. Dem ALP-Assay zufolge (Abb. 27) scheint der Einsatz von 500 ng/ml rhBMP-7 nicht signifikant effektiver zu sein als 250 ng/ml rhBMP-7. Aber die doppelte Konzentration bedeutet gleichzeitig auch den doppelten Preis des kostenaufwendigen rhBMP-7. Um eine unökonomische Kostensteigerung zu vermeiden, wurden für den Alizarin-Rot-Assay sowie die histologischen Färbungen nach einer Stimulation über 25 Tage nur die beiden Konzentrationen 100 ng/ml rhBMP-7 und 250 ng/ml rhBMP-7 miteinander verglichen. Im Vergleich dieser zwei Konzentrationen zeigten sich folgende Ergebnisse (Abb. 26, 28 und 29): Im Vergleich zu 100 ng/ml rhBMP-7 resultierte die Stimulation durch 250 ng/ml rhBMP-7 in einer signifikant stärkeren Osteogenese. Deshalb wurde die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchung durch die RTQ-PCR mit der Konzentration von 250 ng/ml rhBMP-7 durchgeführt.

Mit Hilfe des ALP-Aktivitäts-Assays (Abb. 27) zeigte sich in der frühen Phase der Osteogenese für alle drei Konzentrationen von rhBMP-7, 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml, eine signifikant höhere Aktivität der alkalischen Phosphatase als in der Gruppe OM ohne Stimulation mit rhBMP-7. Der Einsatz von 100 ng/ml rhBMP-7 steigerte die ALP-Aktivität um den Faktor 4, ausgehend von der Gruppe OM. In den Gruppen OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 stieg die Enzymaktivität um den Faktor 5, während sie in der Gruppe OM mit 500 ng/ml rhBMP-7 sogar um den Faktor 6 zunahm.

Entsprechend des ALP-Assays resultierte auch der Alizarin-Rot-Assay (Abb. 26) in einer signifikanten Ergebnissteigerung durch rhBMP-7. Die zusätzliche Stimulation mit 100 ng/ml rhBMP-7 verdoppelte die Alizarin-Rot-Konzentration der Gruppe OM, die Induktion mit 250 ng/ml rhBMP-7 verdreifachte diese sogar.

Dagegen führte in der histologischen Untersuchung die Konzentration von 100 ng/ml rhBMP-7 zu einem nur unwesentlichen Unterschied in der Von-Kossa-Färbung (Abb. 28) und Alizarin-Rot-Färbung (Abb. 28). Dies wurde durch den nicht signifikant höheren Färbewert der Gruppe OM mit 100 ng/ml rhBMP-7 gegenüber der Gruppe OM in der Quantifizierung der Von-Kossa-Färbung objektiviert (Abb. 29). Durch die Stimulation mit 250 ng/ml rhBMP-7 resultierte in dieser Quantifizierung allerdings, entsprechend den anderen Ergebnissen zu 250 ng/ml rhBMP-7, ein signifikant höheres Ergebnis als in der Gruppe OM. Dies stellte sich in der visuellen Beurteilung der histologischen Färbungen dementsprechend dar: Sowohl in der Von-Kossa-Färbung als auch in der Alizarin-Rot-Färbung zeigte sich eine wesentlich stärker ausgeprägte Schwarzfärbung (Von-Kossa) bzw. Rotfärbung (Alizarin-Rot) als in den Gruppen OM und OM mit 100 ng/ml rhBMP-7. Aufgrund dessen kann geschlossen werden, dass insbesondere die Konzentration von 250 ng/ml rhBMP-7 eine effiziente Osteoinduktion mit erhöhter alkalischer Phosphatase und ausgeprägter calciumhaltiger extrazellulärer Matrix bewirkt.

Das Genexpressionslevel von Osteopontin stieg in der Gruppe OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 von jedem Messpunkt zum nächsten (7, 14 und 21 Tage) signifikant an (Abb. 30). Nach 21 Tagen Simulation zeigte Osteopontin seine höchste Expression, die statistisch signifikant höher lag als in der Gruppe OM nach 21 Tagen. Diese ansteigende Genexpression von OPN zeigt eine osteogene Differenzierung an, die durch die Stimulation mit rhBMP-7 signifikant gesteigert wurde. ALP stieg in der Gruppe OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 von Tag 7 auf Tag 14 signifikant an und war nach der Stimulation über 14 Tage in der signifikant höher exprimiert als in der Gruppe OM ohne rhBMP-7 (Abb. 31). Zu den Zeitpunkten 7 und 21 Tage lag die ALP-Expression durch Stimulation mit rhBMP-7 ebenfalls höher als ohne rhBMP-7, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Dies entspricht, als Marker der frühen Osteogenese, einer effizienten Osteoinduktion durch rhBMP-7. Die Expression von Runx-2 lag zum einen zu jedem der drei Messzeitpunkte in der Gruppe OM mit 250 ng/ml rhBMP-7 höher als in der Gruppe OM, doch dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant (Abb. 32). Zum anderen stieg die Runx-2-Expression von Tag 7, über Tag 14, auf Tag 21 an, jedoch auch dies nur von Tag 7 auf Tag 14 mit Signifikanz. Die Ergebnisse der RTQ-PCR weisen also auf die Effizienz der osteoinduktiven Eigenschaften von rhBMP-7 hin. Kritisch betrachtet werden muss die geringer ausgeprägte Signifikanz dieser Resultate, im Vergleich zu ALP-Aktivität-Assay oder Alizarin-Rot-Assay. Eine mögliche Ursache ist die Fallzahl von nur zwei Versuchsreihen. Pro Versuchsreihe und Gruppe wurde zwar in Triplets gearbeitet, die jedoch zur Gewinnung einer ausreichenden RNA-Menge zusammengefasst werden mussten. So wurde der Mittelwert der Genexpressionen jeweils aus nur zwei Werten ermittelt, wodurch eine größere Standardabweichung resultierte. Weiter muss, wie bereits diskutiert wurde, kritisch betrachtet werden, dass das *house-*

keeping gene GAPDH offensichtlich nicht wie erwartet vollkommen unreguliert ist und hierdurch eine Fehlerquelle möglich ist.

In Zusammenschau der Nachweismethoden zeigte sich, dass der Einsatz von rhBMP-7 eine vielversprechende Methode zur Osteoinduktion im BDI-Hydrogel ist.

Andere Studien zur Effektivität von rhBMP-7 in der Osteoinduktion zeigen teilweise sehr erfolgreiche und teilweise weniger überzeugende Ergebnisse. Im Vergleich mit BMP-2 schnitt dieses teilweise besser ab als BMP-7. *In vitro* zeigte BMP-2 eine höhere osteogene Aktivität in der Osteoinduktion von MSC als BMP-7 (137). Auch *in vivo* wurde in einer weiteren Publikation für den Einsatz von BMP-2 eine höhere Heilungsrate von Pseudarthrosen langer Röhrenknochen publiziert als von BMP-7 (96). Auf der anderen Seite wurde die osteogene Aktivität von BMP-2 und BMP-7 als gleichwertig eingestuft (138). Neben diesem ebenbürtigen osteogenen Potenzial, gemessen an der ALP-Aktivität nach Stimulation von MSC durch BMP-2 bzw. BMP-7, förderte der Einsatz von BMP-7 in dieser Studie zusätzlich auch die Proliferation der MSC (138). Diverse Publikationen belegen die Osteoinduktion von BMP-7 *in vitro* sowie auch *in vivo*. Der Einsatz von BMP-7 induzierte *in vitro* die osteogene Differenzierung von Präosteoblasten MC3T3-E1 zu reifen Osteoblasten (97). Im Vergleich zur osteogenen Differenzierung ohne BMP-7 und durch osteogenes Differenzierungsmedium allein, zeigte sich *in vitro* eine wesentlich schnellere Osteogenese durch Stimulation mit BMP-7 (136). Auch *in vivo* wurde der Effekt des BMP-7 zur Osteoinduktion in diversen Studien belegt. Der Einsatz von BMP-7 resultierte in einer effizienten Knochenheilung von knöchernen Defekten in Affen und Hunden (79, 84). Ein Allograft, das mit MSC besiedelt wurde, wurde durch die Stimulation mit BMP-7 besser in einen menschlichen Knochendefekt integriert als ohne BMP-7 (139).

Die Wachstumsfaktoren BMP-2 und BMP-7 sind die einzigen *bone morphogenetic proteins*, die von der FDA und EMA für spezielle Indikationen wie Tibiafrakturen und Spondylodesen zum Einsatz am menschlichen Patienten zugelassen sind. Der Einsatz dieser BMPs als Alternative zu autologen Knochentransplantaten wird allerdings immer noch kritisch begutachtet. In Publikationen wurden mögliche Komplikationen von rhBMP-7 in klinische Studien untersucht. Dazu gehören immunologische Reaktionen, wie Antikörperbildung gegen rhBMP-7, und heterotope Ossifikationen (140). Im direkten Vergleich zu autologen Knochentransplantaten wurde in dieser Publikation jedoch rhBMP-7 als sichere und effektive Alternative mit einer geringeren Rate an Komplikationen beurteilt (140). Als weitere negative Folge gelten postoperative Schwellungen, die zu neurologischen Komplikationen führen können (93). Dieser Effekt zeigte sich vor allem im Einsatz von rhBMP-2. Für rhBMP-7 konnte kein statistisch signifikanter Anstieg an postoperativen Schwellungen festgestellt werden (93). Eine der ungünstigsten Auswirkung eines Pharmakons ist eine potenziell kanzerogene Wirkung. Die Kanzerogenität von rhBMP-7 wurde in klinischen Studien nach erfolgter Spondylodese mit Hilfe von rhBMP-7 untersucht. Beim Einsatz von 7 mg rhBMP-7 pro Spondylodese zeigte sich ein Risiko von 12,5 % für eine Krebsentstehung gegenüber

8,3 % Risiko in der Kontrollgruppe (141, 142). In einer weiteren Arbeit wurde durch den Einsatz von 3,5 mg rhBMP-7 pro Spondylodese ein Risiko von 5,6 % gegenüber 0 % in der Kontrollgruppe, (142, 143) publiziert. Diese Ergebnisse basieren jedoch auf Studien mit sehr geringen Fallzahlen. Das Risiko für maligne Prozesse durch rhBMP-7 ist in diesen Publikationen statistisch nicht signifikant höher als in der jeweiligen Kontrollgruppe (141-143). Der Mangel an gut organisierten Studien mit hohen Fallzahlen erlaubt jedoch momentan keine evidenten Aussagen über die mögliche Einschränkungen in der Sicherheit, wie karzinogene Effekte, von rhBMP-7 (95). Der Wachstumsfaktor rhBMP-7 gilt prinzipiell als sicheres Pharmakon. Dennoch steht es im Verdacht, diese aufgeführten Komplikationen hervorrufen zu können. Doch auch der bisherige Goldstandard, autologe Knochentransplantate, hat negative Nebeneffekte, die in der Einleitung vorgestellt wurden. Die potentiellen Komplikationen von rhBMP-7 sind möglicherweise dosisabhängig. Somit könnte ein sinnvoller und vorsichtiger Einsatz von rhBMP-7 das Risiko für negative Effekte reduzieren. Außerdem sind, aufgrund der fehlenden Evidenz, gut strukturierte wissenschaftliche Arbeiten nötig, um potenzielle Sicherheitslücken von rhBMP-7 eindeutig aufzudecken bzw. um die Diskussion nach Komplikationen, bei Verneinung dieser, zu beenden.

Im Einklang mit der Literatur hat sich die Effektivität von rhBMP-7 zur Osteogenese bestätigt. Es scheint eine vielversprechende Alternative zu autologen Knochentransplantaten darzustellen.

5. SCHLUSSFOLGERUNG

Hydrogele sind aktuell Gegenstand vieler Forschungsgruppen. In der Regenerativen Medizin stellt die Entwicklung dieser besonderen Materialien eine vielversprechende Alternative für den autologen Knochenersatz dar. Die Attraktivität der Hydrogele besteht im Einsatz minimal-invasiver Therapiestrategien. Neben biologischen Hydrogelen liegt der Fokus der Forschung auf der Entwicklung synthetischer Hydrogele, die durch unbegrenzte Verfügbarkeit und individuelle Anpassbarkeit, bestehen. Die Adaptation auf die gewünschten, spezifischen Eigenschaften gelingt durch die gezielte Modifikation des Hydrogels.

Dementsprechend wurde das in dieser Arbeit untersuchte Pluronic® P123 mit den Polyurethanen, HDI (HDI-Hydrogel) und BDI (BDI-Hydrogel), zugunsten verbesserter physikalischer Eigenschaften und höherer mechanischen Stabilität, modifiziert. Besonders das BDI-Hydrogel stellte sich als vielversprechendes thermoresponsives Trägermaterial mit günstigen mechanischen Eigenschaften und guter Biokompatibilität heraus.

Der Nachteil dieser synthetischen Materialien besteht in den fehlenden Schlüsselsequenzen zur Zelladhäsion. Durch die Integration von Kollagen I in das Hydrogel konnten Forschungsgruppen spezifische Adhäsionssequenzen für die Interaktion von Zellen mit dem Hydrogel schaffen. Im BDI-Hydrogel bewirkte die Modifikation mit 20 % Kollagen I ein verbessertes Zellüberleben.

Analog zum Konzept des *Tissue Engineering* konnten die hMSC in den BDI-Hydrogelpellets erfolgreich osteogen differenziert werden. Die additive Stimulation mit rhBMP-7 resultiert in einer signifikanten Steigerung der Osteogenese von hMSC im BDI-Hydrogel. In Anbetracht von Kosten und Nutzen zeigt sich die Konzentration von 250 ng/ml rhBMP-7 als optimal zur Osteoinduktion von hMSC.

6. AUSBLICK

Ein limitierender Faktor von *Tissue Engineering* ist die mangelnde Diffusionskapazität größerer 3D-Konstrukte (144). Aus diesem Grund wäre eine weitere Optimierung, hinsichtlich eines Einsatzes *in vivo*, die Induktion der Angiogenese in der Zell-Gel-Matrix. Angiogenese ist ein wichtiger Bestandteil für eine effektive Regeneration von Knochengewebe, da das vaskularisierte Gewebe die Versorgung des dreidimensionalen Konstrukts mit Sauerstoff und Nährstoffen wesentlich verbessert (145). Somit wäre, neben dem Einsatz von rhBMP-7 als osteoinduktiver Wachstumsfaktor, auch der Einsatz von *Fibroblast growth factor-2* (FGF-2) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zur Angiogenese zu untersuchen (146).

Zur Sicherstellung der Validität der Genexpressionskurven der RTQ-PCR, sollte eine relative Quantifizierung auf ein sicher unreguliertes *housekeeping gene* oder sogar auf die Kombination mehrerer unregulierter *housekeeping genes* erfolgen (118-120).

Konsequenterweise sollte nach der erfolgreichen Osteogenese *in vitro* ein *in vivo* Versuch folgen. Möglich wäre die Implantation des, mit MSC besiedelten, Kollagen-BDI-Hydrogels in einen künstlich erzeugten Knochendefekt von Mäusen. Aufgrund des thermoresponsiven Charakters verändert sich das BDI-Hydrogel oberhalb der LCST von 26,2 °C von einem flüssigen in einen gelartigen Zustand. Das heißt, nach der Injektion des flüssigen Gelkonstrukts in den Knochendefekt geliert das Hydrogel bei Körpertemperatur aus und bildet ein Mizellennetzwerk, in dem die MSC entlang der Kollagenhelix organisiert sind. Interessant wäre, inwieweit das BDI-Hydrogel auch *in vivo* einsetzbar ist und ob die MSC im Hydrogel durch den Wachstumsfaktor rhBMP-7 zur Osteogenese induziert werden, sodass eine Regeneration des Knochendefekts stattfinden kann. Dies könnte anhand von μ CT-Schnittbildgebung oder histologischen Analysen untersucht werden.

Nach positiven *in vivo* Tierversuchen wäre das zukünftige Ziel der Einsatz am Menschen. Komplizierte Knochendefekte, beispielsweise aufgrund von Osteoporose oder Pseudarthrosen, könnten eine mögliche Indikation für das BDI-Hydrogel als Zellträger darstellen. Dabei würden in einem ersten Eingriff dem Patienten gezielt hMSC entnommen werden. Diese würden in Kollagen-BDI-Hydrogel angesiedelt werden. Die Osteogenese würde durch den Wachstumsfaktor rhBMP-7 induziert werden. Das Zell-Gel-Konstrukt würde in einer flüssigen Phase in einem zweiten chirurgischen Eingriff gezielt in den Knochendefekt injiziert werden und dort bei Körpertemperatur gelieren. Im Falle guter Biokompatibilität und fehlender immunogener Reaktionen, könnte dies eine erfolgsversprechende Methode in der Heilung von Knochendefekten darstellen. Der große Vorteil der thermoresponsiven Hydrogele ist die injizierbare Applikationsmethode. Es benötigt keinen offenen operativen Eingriff zur Gewinnung der MSC oder Injektion des Zell-Gel-Konstrukts, sondern kann durch einen wesentlich weniger traumatischen, minimal-invasiven Zugang erfolgen.

Außerdem wäre auch ein Einsatz von BDI-Hydrogel als reiner Pharmakonträger denkbar. Pluronic® P123 wurde bereits als Träger von Nevirapin, Docetaxel und Lamotrigin (53-55) erforscht. Dabei dient es als Transportmedium und effektives Verteilungssystem. Parallel dazu könnte das BDI-Hydrogel als Trägerkonstrukt von rhBMP-7 eingesetzt werden. Zunächst müsste das Freisetzungsverhalten des BDI-Hydrogels *in vitro* analysiert werden. Bei konstanter Freisetzung von rhBMP-7 in die Umgebung könnte ein *in vivo* Versuch folgen. Ziel dieser Anwendung wäre die minimal-invasive Applikation von BDI-Hydrogel, das mit rhBMP-7 angereichert ist, in einen Knochendefekt. Nach der Gelbildung bei Körpertemperatur folgt eine konstante Freisetzung von rhBMP-7, das auf die umliegenden Zellen des Knochendefekts einwirkt und eine Osteoinduktion und endgültige Knochenheilung erzielt. In diesem Fall müssten die Zellen nicht in einem vorherigen Eingriff gewonnen werden und in dem Hydrogel angesiedelt werden. Somit wäre sogar nur ein alleiniger minimal-invasiver Eingriff zur Injektion des BDI-Hydrogels in den Knochendefekt nötig. Dies würde eine besonders schonende Methode zur Erzielung einer Regeneration von Knochendefekten bedeuten.

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Geschlechterspezifische Altersverteilung in Deutschland	11
Abbildung 2: Tissue Engineering von Knochengewebe	13
Abbildung 3: Mechanismen der Gelbildung eines Hydrogels	16
Abbildung 4: Strukturformel biologischer und synthetischer Hydrogele	18
Abbildung 5: Pluronic®-Gitter	21
Abbildung 6: Der Entwicklungsprozess der mesenchymalen Stammzellen	24
Abbildung 7: Übersicht über die TGF-β-Superfamilie	25
Abbildung 8: Signaltransduktionsweges in der TGF-β-Superfamilie	27
Abbildung 9: Struktureller Aufbau von BMP-7	28
Abbildung 10: BDI-verlängertes Pluronic® P123 im Rohzustand	32
Abbildung 11: BDI-verlängertes Pluronic® P123 nach Zugabe von Medium	33
Abbildung 12: WST-1-Assay	35
Abbildung 13: Konfokales Laser-Rastermikroskop	37
Abbildung 14: Primer der RTQ-PCR zur Beurteilung der Osteogenese	41
Abbildung 15: Zellüberleben im HDI-Hydrogel	44
Abbildung 16: Zellüberleben im BDI-Hydrogel	45
Abbildung 17: Zellmorphologie im Pluronic® P123 in der Giemsa-Färbung	46
Abbildung 18: Zellmorphologie im HDI-und BDI-Hydrogel	48
Abbildung 19: Osteogenese in HDI-und BDI-Hydrogel im Alizarin-Rot-Assay	49
Abbildung 20: Alizarin-Rot-Assay nach Osteogenese im BDI-Hydrogel	50
Abbildung 21: ALP-Aktivitäts-Assay im BDI-Hydrogel	51
Abbildung 22: Von-Kossa-und Alizarin-Rot-Färbung im BDI-Hydrogel	52
Abbildung 23: Expression von Osteopontin im BDI-Hydrogel	53
Abbildung 24: Expression von Alkalischer Phosphatase im BDI-Hydrogel	54
Abbildung 25: Expression von Runx-2 im BDI-Hydrogel	55
Abbildung 26: Alizarin-Rot-Assay nach rhBMP-7-Stimulation im BDI-Hydrogel	57
Abbildung 27: ALP-Aktivität nach rhBMP-7-Stimulation im BDI-Hydrogel	58

Abbildung 28: Von-Kossa-und Alizarin-Rot-Färbungen im BDI-Hydrogel	60
Abbildung 29: Quantifizierung der Von-Kossa-Färbung im BDI-Hydrogel	61
Abbildung 30: Expression von Osteopontin nach Stimulation mit rhBMP-7	62
Abbildung 31: ALP-Expression im BDI-Hydrogel nach rhBMP-7-Stimulation	64
Abbildung 32: Expression von Runx-2 nach Stimulation mit rhBMP-7	65

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Goss, C.M., and Chodkowski, E.G. On Bones for Beginners by galen of pergamon: A translation with commentary. *American Journal of Anatomy* 169, 61, 1984.
2. Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergard, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., McCloskey, E.V., Jonsson, B., and Kanis, J.A. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Archives of osteoporosis* 8, 136, 2013.
3. United Nations Department of Economic and Social Affairs - Population Division. 2015. pp. *Population Prospects Germany*.
4. Bleibler, F., Konnopka, A., Benzinger, P., Rapp, K., and Konig, H.H. The health burden and costs of incident fractures attributable to osteoporosis from 2010 to 2050 in Germany-- a demographic simulation model. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 24, 835, 2013.
5. Hadji, P., Klein, S., Gothe, H., Haussler, B., Kless, T., Schmidt, T., Steinle, T., Verheyen, F., and Linder, R. The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Dtsch Arztebl Int* 110, 52, 2013.
6. Watson, L., Elliman, S.J., and Coleman, C.M. From isolation to implantation: a concise review of mesenchymal stem cell therapy in bone fracture repair. *Stem cell research & therapy* 5, 51, 2014.
7. Phieffer, L.S., and Goulet, J.A. Delayed unions of the tibia. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 88, 206, 2006.
8. Fayaz, H.C., Giannoudis, P.V., Vrahas, M.S., Smith, R.M., Moran, C., Pape, H.C., Krettek, C., and Jupiter, J.B. The role of stem cells in fracture healing and nonunion. *International orthopaedics* 35, 1587, 2011.
9. Miranda MA, M.M. Treatment strategy for nonunions and malunions. In: Stannard JP S.A., Kregor PJ, ed. *Surgical Treatment of Orthopaedic Trauma*. New York: Thieme; 2007. pp. 77.
10. Janicki, P., and Schmidmaier, G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury* 42 Suppl 2, S77, 2011.
11. Schieker, M., and Mutschler, W. Die Überbrückung von posttraumatischen Knochendefekten. *Unfallchirurg* 109, 715, 2006.
12. Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., and Maffulli, N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of orthopaedic surgery and research* 9, 18, 2014.
13. Calori, G.M., Colombo, M., Mazza, E.L., Mazzola, S., Malagoli, E., and Mineo, G.V. Incidence of donor site morbidity following harvesting from iliac crest or RIA graft. *Injury* 45, Supplement 6, S116, 2014.
14. Schieker, M., Seitz, H., Drosse, I., Seitz, S., and Mutschler, W. Biomaterials as Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Eur J Trauma* 32, 114, 2006.
15. Brydone, A.S., Meek, D., and Maclaine, S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H* 224, 1329, 2010.
16. Langer, R., and Vacanti, J.P. Tissue engineering. *Science (New York, NY)* 260, 920, 1993.
17. Giannoudis, P.V., Einhorn, T.A., and Marsh, D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 38 Suppl 4, S3, 2007.

18. Drosse, I., Volkmer, E., Capanna, R., De Biase, P., Mutschler, W., and Schieker, M. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury* 39 Suppl 2, S9, 2008.
19. Giannoudis, P.V., Dinopoulos, H., and Tsiridis, E. Bone substitutes: an update. *Injury* 36 Suppl 3, S20, 2005.
20. Sen, M.K., and Miclau, T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury* 38 Suppl 1, S75, 2007.
21. Khan, S.N., Cammisa, F.P., Jr., Sandhu, H.S., Diwan, A.D., Girardi, F.P., and Lane, J.M. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 13, 77, 2005.
22. Pietrzak, W.S., Perns, S.V., Keyes, J., Woodell-May, J., and McDonald, N.M. Demineralized bone matrix graft: a scientific and clinical case study assessment. *J Foot Ankle Surg* 44, 345, 2005.
23. Finkemeier, C.G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 84-a, 454, 2002.
24. Fedorovich, N.E., Alblas, J., de Wijn, J.R., Hennink, W.E., Verbout, A.J., and Dhert, W.J. Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing. *Tissue engineering* 13, 1905, 2007.
25. Ruel-Gariepy, E., and Leroux, J.C. In situ-forming hydrogels--review of temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm* 58, 409, 2004.
26. Lee, K.Y., and Mooney, D.J. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 101, 1869, 2001.
27. Drury, J.L., and Mooney, D.J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24, 4337, 2003.
28. Tan, H., and Marra, K.G. Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Materials* 3, 1746, 2010.
29. Vinatier, C., Guicheux, J., Daculsi, G., Layrolle, P., and Weiss, P. Cartilage and bone tissue engineering using hydrogels. *Biomed Mater Eng* 16, S107, 2006.
30. Alvarez-Lorenzo, C., Blanco-Fernandez, B., Puga, A.M., and Concheiro, A. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 1148, 2013.
31. Klouda, L., and Mikos, A.G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* 68, 34, 2008.
32. Volkmer, E., Leicht, U., Moritz, M., Schwarz, C., Wiese, H., Milz, S., Matthias, P., Schloegl, W., Friess, W., Goettlinger, M., Augat, P., and Schieker, M. Poloxamer-based hydrogels hardening at body core temperature as carriers for cell based therapies: in vitro and in vivo analysis. *Journal of materials science Materials in medicine* 24, 2223, 2013.
33. Cohn, D., Sosnik, A., and Levy, A. Improved reverse thermo-responsive polymeric systems. *Biomaterials* 24, 3707, 2003.
34. Nguyen, M.K., and Lee, D.S. Injectable biodegradable hydrogels. *Macromolecular bioscience* 10, 563, 2010.
35. Mineur, P., Guignandon, A., Lambert Ch, A., Amblard, M., Lapiere Ch, M., and Nusgens, B.V. RGDS and DGEA-induced $[Ca^{2+}]_i$ signalling in human dermal fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta* 1746, 28, 2005.
36. Matanovic, M.R., Kristl, J., and Grabnar, P.A. Thermoresponsive polymers: insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. *Int J Pharm* 472, 262, 2014.
37. Schieker, M., Wiese, H., and Moll, U. Chain-extending poloxamers, thermoreversible hydrogels formed by them which include biological materials, and medicinal applications of same. *Germany*2014.
38. Brodie, J.C., Goldie, E., Connel, G., Merry, J., and Grant, M.H. Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen. *Journal of biomedical materials research Part A* 73, 409, 2005.

39. Trojani, C., Weiss, P., Michiels, J.F., Vinatier, C., Guicheux, J., Daculsi, G., Gaudray, P., Carle, G.F., and Rochet, N. Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials* 26, 5509, 2005.
40. Alexandridis, P., and Alan Hatton, T. Poly(ethylene oxide) • poly(propylene oxide) • poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 96, 1, 1995.
41. Bahadur, P., and Riess, G. *Tenside. Surf Det* 281991.
42. Chiappetta, D.A., and Sosnik, A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 66, 303, 2007.
43. Palmer, W.K., Emeson, E.E., and Johnston, T.P. Poloxamer 407-induced atherogenesis in the C57BL/6 mouse. *Atherosclerosis* 136, 115, 1998.
44. Wout, Z.G., Pec, E.A., Maggiore, J.A., Williams, R.H., Palicharla, P., and Johnston, T.P. Poloxamer 407-mediated changes in plasma cholesterol and triglycerides following intraperitoneal injection to rats. *Journal of parenteral science and technology : a publication of the Parenteral Drug Association* 46, 192, 1992.
45. Blonder, J.M., Baird, L., Fulfs, J.C., and Rosenthal, G.J. Dose-dependent hyperlipidemia in rabbits following administration of poloxamer 407 gel. *Life sciences* 65, PI261, 1999.
46. Nalbandian, R.M., Henry, R.L., and Wilks, H.S. Artificial skin. II. Pluronic F-127 Silver nitrate or silver lactate gel in the treatment of thermal burns. *J Biomed Mater Res* 6, 583, 1972.
47. Schmolka, I.R. Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biomed Mater Res* 6, 571, 1972.
48. Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Melik-Nubarov, N.S., Fedoseev, N.A., Dorodnich, T.Y., Alakhov, V.Y., Chekhonin, V.P., Nazarova, I.R., and Kabanov, V.A. A new class of drug carriers: micelles of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain. *Journal of Controlled Release* 22, 141, 1992.
49. Lee, J.H., Kim, J.H., Oh, S.H., Kim, S.J., Hah, Y.S., Park, B.W., Kim, D.R., Rho, G.J., Maeng, G.H., Jeon, R.H., Lee, H.C., Kim, J.R., Kim, G.C., Kim, U.K., and Byun, J.H. Tissue-engineered bone formation using periosteal-derived cells and polydioxanone/pluronic F127 scaffold with pre-seeded adipose tissue-derived CD146 positive endothelial-like cells. *Biomaterials* 32, 5033, 2011.
50. Zhou, N., Huang, X., Jiang, X., Song, J., Li, H., and Xie, Q. [Experimental study on transplantation of bone morphogenetic protein-2 gene transfected bone mesenchymal stem cells compounded with Pluronic F-127 for promoting bone regeneration in rabbit mandibular distraction]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 31, 247, 2013.
51. Brunet-Maheu, J.M., Fernandes, J.C., de Lacerda, C.A., Shi, Q., Benderdour, M., and Lavigne, P. Pluronic F-127 as a cell carrier for bone tissue engineering. *J Biomater Appl* 24, 275, 2009.
52. Gu, J., Liu, N., Yang, X., Feng, Z., and Qi, F. Adipose-derived stem cells seeded on PLCL/P123 electrospun nanofibrous scaffold enhance wound healing. *Biomed Mater* 9, 035012, 2014.
53. Jindal, N., and Mehta, S.K. Nevirapine loaded Poloxamer 407/Pluronic P123 mixed micelles: Optimization of formulation and in vitro evaluation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 129, 100, 2015.
54. Liu, Z., Liu, D., Wang, L., Zhang, J., and Zhang, N. Docetaxel-loaded pluronic p123 polymeric micelles: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Mol Sci* 12, 1684, 2011.

55. Liu, J.S., Wang, J.H., Zhou, J., Tang, X.H., Xu, L., Shen, T., Wu, X.Y., and Hong, Z. Enhanced brain delivery of lamotrigine with Pluronic((R)) P123-based nanocarrier. *International journal of nanomedicine* 9, 3923, 2014.
56. Yang, Z., Sahay, G., Sriadibhatla, S., and Kabanov, A.V. Amphiphilic block copolymers enhance cellular uptake and nuclear entry of polyplex-delivered DNA. *Bioconjug Chem* 19, 1987, 2008.
57. Caplan, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213, 341, 2007.
58. Friedenstein, A.J., Piatetzky, S., II, and Petrakova, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16, 381, 1966.
59. Bianco, P., Robey, P.G., and Simmons, P.J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell* 2, 313, 2008.
60. Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641, 1991.
61. Caplan, A.I. What's in a name? *Tissue engineering Part A* 16, 2415, 2010.
62. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315, 2006.
63. Kassem, M., Ankersen, L., Eriksen, E.F., Clark, B.F., and Rattan, S.I. Demonstration of cellular aging and senescence in serially passaged long-term cultures of human trabecular osteoblasts. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 7, 514, 1997.
64. Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., and Kassem, M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33, 919, 2003.
65. Simonsen, J.L., Rosada, C., Serakinci, N., Justesen, J., Stenderup, K., Rattan, S.I., Jensen, T.G., and Kassem, M. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 20, 592, 2002.
66. Gronthos, S., Zannettino, A.C., Hay, S.J., Shi, S., Graves, S.E., Kortessidis, A., and Simmons, P.J. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116, 1827, 2003.
67. Bocker, W., Yin, Z., Drosse, I., Haasters, F., Rossmann, O., Wierer, M., Popov, C., Locher, M., Mutschler, W., Docheva, D., and Schieker, M. Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *Journal of cellular and molecular medicine* 12, 1347, 2008.
68. Southwood, L.L., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., and McIlwraith, C.W. Delivery of growth factors using gene therapy to enhance bone healing. *Vet Surg* 33, 565, 2004.
69. Urist, M.R., Silverman, B.F., Buring, K., Dubuc, F.L., and Rosenberg, J.M. The bone induction principle. *Clin Orthop Relat Res* 53, 243, 1967.
70. Urist, M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science (New York, NY)* 150, 893, 1965.
71. Urist, M.R., and Strates, B.S. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50, 1392, 1971.
72. Urist, M.R., Huo, Y.K., Brownell, A.G., Hohl, W.M., Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Hunkapiller, M., and DeLange, R.J. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 371, 1984.
73. Boon, M.R., van der Horst, G., van der Pluijm, G., Tamsma, J.T., Smit, J.W., and Rensen, P.C. Bone morphogenetic protein 7: a broad-spectrum growth factor with multiple target therapeutic potency. *Cytokine Growth Factor Rev* 22, 221, 2011.
74. Zilberberg, L., ten Dijke, P., Sakai, L.Y., and Rifkin, D.B. A rapid and sensitive bioassay to measure bone morphogenetic protein activity. *BMC cell biology* 8, 41, 2007.

75. Shi, Y., and Massague, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685, 2003.
76. Carreira, A.C., Lojudice, F.H., Halcsik, E., Navarro, R.D., Sogayar, M.C., and Granjeiro, J.M. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res* 93, 335, 2014.
77. Nishimoto, S.K., Chang, C.H., Gendler, E., Stryker, W.F., and Nimni, M.E. The effect of aging on bone formation in rats: biochemical and histological evidence for decreased bone formation capacity. *Calcif Tissue Int* 37, 617, 1985.
78. Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., and Wang, E.A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science (New York, NY)* 242, 1528, 1988.
79. Cook, S.D., Salkeld, S.L., Patron, L.P., Sargent, M.C., and Rueger, D.C. Healing course of primate ulna segmental defects treated with osteogenic protein-1. *J Invest Surg* 15, 69, 2002.
80. Ozkaynak, E., Rueger, D.C., Drier, E.A., Corbett, C., Ridge, R.J., Sampath, T.K., and Oppermann, H. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *EMBO J* 9, 2085, 1990.
81. Hausmann, M., Ehnert, S., Hofmann, V., Dobeles, S., Freude, T., Stockle, U., and Nussler, A. [Use of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) for the Treatment of Pseudarthroses - Efficiency and Therapy Failure]. *Z Orthop Unfall* 152, 144, 2014.
82. Chen, G., Deng, C., and Li, Y.P. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 8, 272, 2012.
83. Sapkota, G., Alarcon, C., Spagnoli, F.M., Brivanlou, A.H., and Massague, J. Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Molecular cell* 25, 441, 2007.
84. Cook, S.D., Baffes, G.C., Wolfe, M.W., Sampath, T.K., and Rueger, D.C. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop Relat Res*, 302, 1994.
85. Salkeld, S.L., Patron, L.P., Barrack, R.L., and Cook, S.D. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 83-A, 803, 2001.
86. Friedlaender, G.E., Perry, C.R., Cole, J.D., Cook, S.D., Cierny, G., Muschler, G.F., Zych, G.A., Calhoun, J.H., LaForte, A.J., and Yin, S. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 83-A Suppl 1, S151, 2001.
87. Vukicevic, S., Kopp, J.B., Luyten, F.P., and Sampath, T.K. Induction of nephrogenic mesenchyme by osteogenic protein 1 (bone morphogenetic protein 7). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 9021, 1996.
88. Simic, P., and Vukicevic, S. Bone morphogenetic proteins: from developmental signals to tissue regeneration. *Conference on bone morphogenetic proteins. EMBO reports* 8, 327, 2007.
89. Katagiri, T., Boorla, S., Frenzo, J.L., Hogan, B.L., and Karsenty, G. Skeletal abnormalities in doubly heterozygous *Bmp4* and *Bmp7* mice. *Developmental genetics* 22, 340, 1998.
90. Agency, E.M. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels Osigraft. *European Medicines Agency* 2015.
91. Blokhuis, T.J., Calori, G.M., and Schmidmaier, G. Autograft versus BMPs for the treatment of non-unions: what is the evidence? *Injury* 44 Suppl 1, S40, 2013.
92. Chrastil, J., and Patel, A.A. Complications associated with posterior and transforaminal lumbar interbody fusion. *J Am Acad Orthop Surg* 20, 283, 2012.
93. Leach, J., and Bittar, R.G. BMP-7 (OP-1) safety in anterior cervical fusion surgery. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 16, 1417, 2009.

94. Lissenberg-Thunnissen, S.N., de Gorter, D.J., Sier, C.F., and Schipper, I.B. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *International orthopaedics* 35, 1271, 2011.
95. Pountos, I., Panteli, M., Georgouli, T., and Giannoudis, P.V. Neoplasia following use of BMPs: is there an increased risk? *Expert opinion on drug safety* 13, 1525, 2014.
96. Conway, J.D., Shabtai, L., Bauernschub, A., and Specht, S.C. BMP-7 versus BMP-2 for the treatment of long bone nonunion. *Orthopedics* 37, e1049, 2014.
97. Asahina, I., Sampath, T.K., and Hauschka, P.V. Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res* 222, 38, 1996.
98. Cook, S.D., Wolfe, M.W., Salkeld, S.L., and Rueger, D.C. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 77, 734, 1995.
99. Tang, B., Vu, M., Booker, T., Santner, S.J., Miller, F.R., Anver, M.R., and Wakefield, L.M. TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *The Journal of clinical investigation* 112, 1116, 2003.
100. Dudley, A.T., Lyons, K.M., and Robertson, E.J. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes & development* 9, 2795, 1995.
101. Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., and Kalluri, R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nature medicine* 9, 964, 2003.
102. Patel, S.R., and Dressler, G.R. BMP7 signaling in renal development and disease. *Trends in molecular medicine* 11, 512, 2005.
103. Popov, T. Characterization of human mesenchymal stem cells by the appearance of integrins and functional analysis of collagen I-binding integrins *Experimental Surgery and Regenerative Medicine*, Department of Surgery, LMU Munich, Munich, 2011.
104. Roche, D. Manual - Cell Proliferation Reagent WST-1. 2012.
105. IMB-Jena. Laser Scanning Microscope. 2015.
106. Wang, R., A, N.M., Lee, M., Jr., Deutsch, D., Miadvedskaya, L., Braun, E., Pantano, P., Harper, S., and Draper, R. Toxicity assessment and bioaccumulation in zebrafish embryos exposed to carbon nanotubes suspended in Pluronic(R) F-108. *Nanotoxicology*, 1, 2015.
107. Vashi, A.V., Keramidaris, E., Abberton, K.M., Morrison, W.A., Wilson, J.L., O'Connor, A.J., Cooper-White, J.J., and Thompson, E.W. Adipose differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells using Pluronic F-127 hydrogel in vitro. *Biomaterials* 29, 573, 2008.
108. Rahman, C.V., Kuhn, G., White, L.J., Kirby, G.T., Varghese, O.P., McLaren, J.S., Cox, H.C., Rose, F.R., Muller, R., Hilborn, J., and Shakesheff, K.M. PLGA/PEG-hydrogel composite scaffolds with controllable mechanical properties. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 101, 648, 2013.
109. Choi, Y.S., Park, S.N., and Suh, H. Adipose tissue engineering using mesenchymal stem cells attached to injectable PLGA spheres. *Biomaterials* 26, 5855, 2005.
110. McCanless, J.D., Jennings, L.K., Cole, J.A., Bumgardner, J.D., and Haggard, W.O. In vitro differentiation and biocompatibility of mesenchymal stem cells on a novel platelet releasate-containing injectable composite. *Journal of biomedical materials research Part A* 100, 220, 2012.
111. Hruschka, V., Meinl, A., Saeed, A., Cheikh Al Ghanami, R., Redl, H., Shakesheff, K., and Wolbank, S. Gelatin embedding for the preparation of thermoreversible or delicate scaffolds for histological analysis. *Biomed Mater* 8, 041001, 2013.
112. Perez, R.A., Kim, M., Kim, T.H., Kim, J.H., Lee, J.H., Park, J.H., Knowles, J.C., and Kim, H.W. Utilizing core-shell fibrous collagen-alginate hydrogel cell delivery system for bone tissue engineering. *Tissue engineering Part A* 20, 103, 2014.

113. Huang, J.W., Chen, W.J., Liao, S.K., Yang, C.Y., Lin, S.S., and Wu, C.C. Osteoblastic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells loaded in A carrier system of Pluronic F127 and Interpore. *Chang Gung medical journal* 29, 363, 2006.
114. Williams, W.V., Rosenbaum, H., and Weiner, D.B. Effect of RNA concentration on cDNA synthesis for DNA amplification. *PCR methods and applications* 2, 86, 1992.
115. Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G., and Zumla, A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 37, 112, 2004.
116. Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., and Clark, B.J. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiological genomics* 21, 389, 2005.
117. Chen, X., Zhang, B., Zhao, Y., Liu, P., and Zhou, Y. EF1alpha is a suitable housekeeping gene for RT-qPCR analysis during osteogenic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Acta biochimica Polonica* 60, 381, 2013.
118. Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distante, V., Pazzagli, M., Bustin, S.A., and Orlando, C. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical biochemistry* 309, 293, 2002.
119. Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., and Heinen, E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of biotechnology* 75, 291, 1999.
120. Wiedemann, C., Schulz, H.L., and Weber, B.H.F. Quantitative Real-Time PCR – Eine Frage der Normalisierung. *Biospektrum* 01, 99, 2004.
121. Cesarz, Z., and Tamama, K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells international* 2016, 9176357, 2016.
122. Huang, G.S., Dai, L.G., Yen, B.L., and Hsu, S.H. Spheroid formation of mesenchymal stem cells on chitosan and chitosan-hyaluronan membranes. *Biomaterials* 32, 6929, 2011.
123. Yamaguchi, Y., Ohno, J., Sato, A., Kido, H., and Fukushima, T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. *BMC biotechnology* 14, 105, 2014.
124. Curcio, E., Salerno, S., Barbieri, G., De Bartolo, L., Drioli, E., and Bader, A. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials* 28, 5487, 2007.
125. Golub, E., and Boesze-Battaglia, K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics* 18, 444, 2007.
126. Fernandez-Moure, J.S., Corradetti, B., Chan, P., Van Eps, J.L., Janecek, T., Rameshwar, P., Weiner, B.K., and Tasciotti, E. Enhanced osteogenic potential of mesenchymal stem cells from cortical bone: a comparative analysis. *Stem cell research & therapy* 6, 203, 2015.
127. Lee, J.H., Baek, H.R., Lee, K.M., Lee, H.K., Im, S.B., Kim, Y.S., Lee, J.H., Chang, B.S., and Lee, C.K. The effect of poloxamer 407-based hydrogel on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *Clin Orthop Surg* 6, 455, 2014.
128. Wang, L., Li, Z.Y., Wang, Y.P., Wu, Z.H., and Yu, B. Dynamic Expression Profiles of Marker Genes in Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *Chinese medical sciences journal = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih / Chinese Academy of Medical Sciences* 30, 108, 2015.
129. Frank, O., Heim, M., Jakob, M., Barbero, A., Schafer, D., Bendik, I., Dick, W., Heberer, M., and Martin, I. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 85, 737, 2002.
130. Na, K., Kim, S.W., Sun, B.K., Woo, D.G., Yang, H.N., Chung, H.M., and Park, K.H. Osteogenic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells in thermo-reversible

- hydrogel constructs containing hydroxyapatite and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Biomaterials* 28, 2631, 2007.
131. Chen, D., Zhao, M., and Mundy, G.R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22, 233, 2004.
 132. Chen, X., Kidder, L.S., and Lew, W.D. Osteogenic protein-1 induced bone formation in an infected segmental defect in the rat femur. *J Orthop Res* 20, 142, 2002.
 133. Chen, X., Schmidt, A.H., Tsukayama, D.T., Bourgeault, C.A., and Lew, W.D. Recombinant human osteogenic protein-1 induces bone formation in a chronically infected, internally stabilized segmental defect in the rat femur. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 88, 1510, 2006.
 134. Hogel, F., Hoffmann, S., Hungerer, S., Fleischacker, E., Ullmann, T., Betz, O.B., and Augat, P. Bone healing of critical size defects of the rat femur after the application of bone marrow aspirate and two different rh-BMP7 concentrations. *Eur J Trauma Emerg Surg* 41, 557, 2015.
 135. Tsiroidis, E., Bhalla, A., Ali, Z., Gurav, N., Heliotis, M., Deb, S., and DiSilvio, L. Enhancing the osteoinductive properties of hydroxyapatite by the addition of human mesenchymal stem cells, and recombinant human osteogenic protein-1 (BMP-7) in vitro. *Injury* 37 Suppl 3, S25, 2006.
 136. Shen, B., Wei, A., Whittaker, S., Williams, L.A., Tao, H., Ma, D.D., and Diwan, A.D. The role of BMP-7 in chondrogenic and osteogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 109, 406, 2010.
 137. Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F.M., Haydon, R.C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H.H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., Szatkowski, J.P., Park, J.Y., and He, T.C. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *The Journal of bone and joint surgery American volume* 85-a, 1544, 2003.
 138. Pountos, I., Georgouli, T., Henshaw, K., Bird, H., Jones, E., and Giannoudis, P.V. The effect of bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-7, parathyroid hormone, and platelet-derived growth factor on the proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from osteoporotic bone. *J Orthop Trauma* 24, 552, 2010.
 139. Di Bella, C., Aldini, N.N., Lucarelli, E., Dozza, B., Frisoni, T., Martini, L., Fini, M., and Donati, D. Osteogenic protein-1 associated with mesenchymal stem cells promote bone allograft integration. *Tissue engineering Part A* 16, 2967, 2010.
 140. Calori, G.M., Colombo, M., Bucci, M., Mazza, E.L., Fadigati, P., and Mazzola, S. Clinical effectiveness of Osigraft in long-bones non-unions. *Injury* 46 Suppl 8, S55, 2015.
 141. Vaccaro, A.R., Patel, T., Fischgrund, J., Anderson, D.G., Truumees, E., Herkowitz, H.N., Phillips, F., Hilibrand, A., Albert, T.J., Wetzel, T., and McCulloch, J.A. A pilot study evaluating the safety and efficacy of OP-1 Putty (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis for degenerative spondylolisthesis. *Spine* 29, 1885, 2004.
 142. Devine, J.G., Dettori, J.R., France, J.C., Brodt, E., and McGuire, R.A. The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk? *Evidence-based spine-care journal* 3, 35, 2012.
 143. Delawi, D., Dhert, W.J., Rillardon, L., Gay, E., Prestamburgo, D., Garcia-Fernandez, C., Guerado, E., Specchia, N., Van Susante, J.L., Verschoor, N., van Ufford, H.M., and Oner, F.C. A prospective, randomized, controlled, multicenter study of osteogenic protein-1 in instrumented posterolateral fusions: report on safety and feasibility. *Spine* 35, 1185, 2010.
 144. Volkmer, E., Otto, S., Polzer, H., Saller, M., Trappendreher, D., Zagar, D., Hamisch, S., Ziegler, G., Wilhelmi, A., Mutschler, W., and Schieker, M. Overcoming hypoxia in 3D culture systems for tissue engineering of bone in vitro using an automated, oxygen-

- triggered feedback loop. *Journal of materials science Materials in medicine* 23, 2793, 2012.
145. Grigore, A., Sarker, B., Fabry, B., Boccaccini, A.R., and Detsch, R. Behavior of encapsulated MG-63 cells in RGD and gelatine-modified alginate hydrogels. *Tissue engineering Part A* 20, 2140, 2014.
 146. Mercado-Pagan, A.E., Stahl, A.M., Shanjani, Y., and Yang, Y. Vascularization in bone tissue engineering constructs. *Annals of biomedical engineering* 43, 718, 2015.

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank geht an:

- Prof. Dr. med. Matthias Schieker, meinen Doktorvater, für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas und die großzügige Förderung.
- Dr. rer. biol. hum. Ines Westphal, meiner Betreuerin, für die hervorragende und intensive Betreuung meiner Arbeit sowie für die freundschaftliche Unterstützung in allen wissenschaftlichen Angelegenheiten.
- PolyMaterials (Kaufbeuren, Deutschland), meinem kooperierenden Unternehmen, und Dr. Hinrich Wiese für die enge Zusammenarbeit und großartige Unterstützung.
- Dr. Uta Moll für die hervorragende initiale Einarbeitung in diese Thematik.
- PD Dr. Attila Aszodi, dem Leiter, und PD Dr. rer. nat. Denitsa Docheva, der Co-Leiterin des Forschungslabors für Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin.
- Herrn Dr. med. Michael Stengele, für seine stets verfügbare und hochqualifizierte Hilfe in allen EDV-Angelegenheiten.
- Meinen Kollegen Sarah Dex, Chi-Fen Hsieh, Dr. Paolo Alberton, Dr. Cvetan Popov, Feng-Koo Hsieh, Boris Schmalz, Daniel Leblanc, Susanne Dyckhoff, Lena Mittlmeier, Alexander Keppler, Martina Burggraf, Zsuzsanna Farkas, Heidrun Grondinger, PD Dr. Dorit Nägler und Dr. rer. nat. Veronika Schönitzer für ihre großartige Hilfe, weitreichende Unterstützung und ihren freundschaftlichen, stets aufmunternden Worten.
- Meinem Arbeitgeber in der St. Vinzenz Klinik Pfronten, der mir ermöglicht hat, neben meiner klinischen Weiterbildung auch meine wissenschaftliche Tätigkeit fortzuführen. Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Kai Scriba, der mich in meiner klinischen Laufbahn menschlich wie medizinisch prägte.
- Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken: Meinen Eltern Manfred Jedelhauser und Gundi Jedelhauser für Ihre sehr großzügige und tatkräftige Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung. Dies ermöglichte mir erst, meinen bisherigen Weg so zu absolvieren. Meiner Schwester Julia Jedelhauser und meinem Bruder Christian Jedelhauser für ihre geduldige Unterstützung. Und schließlich meinem damaligen Freund Holger Böck für sein großes Verständnis, seine Geduld und seine liebevolle mentale Unterstützung, durch die ich immer wieder Kraft tanken konnte.

CURRICULUM VITAE

Inhalt entfernt.

