

Technische Universität München

**Fakultät für Medizin**

**Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. P. Biberthaler)**

**Alginatekontrollierte Differenzierung von  
mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten**

Francesca Maria von Matthey

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. M. van Griensven
2. Univ.-Prof. Dr. P. Biberthaler

Die Dissertation wurde am 09.03.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.07.2015 angenommen.

Für Skippi

Ohne Worte, denn diesen sind Grenzen gesetzt

# INHALT

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
2.1	<b>Knochendefektdeckung und Knochenersatzmaterialien .....</b>	<b>4</b>
2.2	<b>Übersicht über bisherige Knochenersatzmaterialien .....</b>	<b>5</b>
2.3	<b>Anforderungen an Knochenersatzmaterial.....</b>	<b>6</b>
2.4	<b>Tissue Engineering .....</b>	<b>7</b>
2.4.1	Das trianguläre Prinzip des Tissue Engineering .....	7
2.4.2	Die Suche nach der Lösung .....	12
2.4.2.1	Alginate als Matrix- eine Alternative? .....	12
2.4.2.2	SCP-Zellen, immortalisierte Zellen als eine mögliche Lösung für die limitierte Verfügbarkeit von Osteoblasten und Knochenmarkstammzellen.....	13
2.4.2.3	Hydroxyapatit als Stimulus für die Zelldifferenzierung .....	15
<b>3</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
4.1	<b>Übersicht Zeitplan .....</b>	<b>17</b>
4.2	<b>Isolierung primärer humaner Osteoblasten aus intraoperativ entfernten Femurköpfen .....</b>	<b>19</b>
4.2.1	Benötigte Materialien .....	19
4.2.2	Vorgehensweise: .....	20
4.2.3	Vorbereitung des Arbeitsplatzes:.....	20
4.2.4	Herauslösen von Spongiosa aus dem Hüftkopf: .....	20
4.2.5	Waschen der Spongiosa: .....	20
4.2.6	Enzymatische Lösung der Osteoblastenverbände mit Hilfe von Kollagenase: .....	21
4.2.7	Durch Zentrifugierung isolierte Osteoblasten (OSÜ) und aus Spongiosastückchen isolierte Osteoblasten (OSS) .....	21
<b>4.3</b>	<b>Osteoblastenkulturmedium .....</b>	<b>23</b>
4.3.1	Benötigte Materialien für das Zellkulturmedium: .....	23
4.3.2	Herstellung von Osteoblastenkulturmedium:.....	24
<b>4.4</b>	<b>Osteoblastendifferenzierungsmedium .....</b>	<b>25</b>
4.4.1	Benötigte Materialien .....	25
4.4.2	Durchführung – Herstellung des Osteoblastendifferenzierungsmedium:.....	26
<b>4.5</b>	<b>Kultivierung primärer humaner Osteoblasten .....</b>	<b>26</b>
4.5.1	Benötigte Materialien .....	26
4.5.2	Mediumwechsel .....	26
4.5.3	Passagierung.....	27
<b>4.6</b>	<b>Isolierung von Stammzellen des Knochenmarks (Bone-marrow-stem-cells B-MSC) .....</b>	<b>28</b>
4.6.1	Benötigte Materialien: .....	28

4.6.2	Durchführung: .....	28
<b>4.7</b>	<b>Stammzellkulturmedium: .....</b>	<b>30</b>
4.7.1	Benötigte Materialien: .....	30
4.7.2	Herstellung von 500mL Stammzellkulturmedium: .....	30
<b>4.8</b>	<b>Stammzellendifferenzierungsmedium:.....</b>	<b>30</b>
4.8.1	Benötigte Materialien: .....	30
4.8.2	Durchführung: .....	31
<b>4.9</b>	<b>Kultivierung mesenchymaler Stammzellen .....</b>	<b>32</b>
4.9.1	Benötigte Materialien .....	32
4.9.2	Durchführung .....	32
4.9.3	Mediumwechsel und Passagierung.....	32
<b>4.10</b>	<b>SCP-Zellen und ihre Kultivierung .....</b>	<b>33</b>
<b>4.11</b>	<b>Herstellung von Alginatbeads und Einkapselung von Zellen.....</b>	<b>34</b>
4.11.1	Benötigte Materialien zur Herstellung von Beads: .....	34
4.11.1.1	Technische Geräte: .....	34
4.11.1.2	Zubehör: .....	36
4.11.1.3	Lösungen: .....	36
4.11.1.4	Benötigte Materialien zur Vorbereitung der einzukapselnden Zellen: .....	36
4.11.2	Durchführung .....	37
4.11.3	Anmerkung: .....	37
4.11.4	Herstellung der benötigten Lösungen: .....	37
4.11.4.1	1 Liter 0,9%ige NaCl-Lösung:.....	37
4.11.4.2	1 Liter CaCl <sub>2</sub> -Lösung:.....	38
4.11.4.3	50mL Alginatlösung: .....	38
4.11.5	Vorbereitung der Zellen: .....	38
4.11.6	Zellzählen .....	39
4.11.7	Herstellung von Alginatbeads mit eingekapselten Zellen.....	39
4.11.8	Herstellung von Alginatbeads ohne Zellen .....	41
<b>4.12</b>	<b>Übersicht Methodik .....</b>	<b>42</b>
<b>4.13</b>	<b>Hellfeldlichtmikroskopie .....</b>	<b>43</b>
4.13.1	Benötigte Materialien .....	43
4.13.2	Durchführung .....	43
<b>4.14</b>	<b>Live-Dead-Staining .....</b>	<b>44</b>
4.14.1	Benötigte Materialien .....	44
4.14.2	Durchführung .....	44
<b>4.15</b>	<b>Viabilitätsmessung mittels Alamar-Blau-Assay:.....</b>	<b>45</b>
4.15.1	Benötigte Materialien: .....	45
4.15.2	Durchführung: .....	45
4.15.3	Photometrische Messung .....	46

<b>4.16</b>	<b>Messung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität als Marker der Zelldifferenzierung:</b>	<b>46</b>
4.16.1	Benötigte Materialien:	46
4.16.2	Durchführung:	48
4.16.3	Photometrische Messung	48
4.16.4	Standardkurve	49
4.16.4.1	Pipettierschema Standardkurve AP	49
4.16.4.2	Durchführung: Pipettieren der Standardkurve:	50
<b>4.17</b>	<b>Quantifizierung der hellfeldlichtmikroskopischen Bilder mittels Graustufenanalyse</b>	<b>50</b>
<b>4.18</b>	<b>Alizarin-Rot-Färbung</b>	<b>52</b>
4.18.1	Benötigte Materialien:	52
4.18.2	Durchführung:	53
4.18.3	Photometrische Messung	53
4.18.4	Alizarin Rot-Standardkurve	54
4.18.4.1	Pipettierschema für die Alizarin Rot-Standardkurve:	54
4.18.4.2	Durchführung Pipettieren der Standardkurve:	55
<b>4.19</b>	<b>Isolation von Ribonukleinsäure aus in Alginatebeads eingekapselten Zellen in zwei Schritten:</b>	<b>56</b>
4.19.1	Schritt 1: Herauslösen der Zellen aus den Alginatebeads	56
4.19.1.1	Benötigte Materialien:	56
4.19.1.2	Durchführung: Herstellung der Citratlösung:	57
4.19.1.3	Berechnung der benötigten Menge an Beads	57
4.19.1.4	Isolierung der Zellen aus den Alginatebeads:	58
4.19.2	Schritt 2: Isolierung der RNA	58
4.19.2.1	Benötigte Materialien:	58
4.19.2.2	Durchführung der RNA-Isolierung	59
4.19.3	Bestimmung der RNA Menge und Reinheit	59
4.19.4	Test der RNA auf Integrität:	60
4.19.4.1	Benötigte Materialien:	60
4.19.4.2	Durchführung: Integritäts-Testung	60
4.19.5	Überprüfung der Intaktheit der RNA:	60
<b>4.20</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>61</b>
4.20.1	statistische Testverfahren	61
4.20.2	Spenderzahlen	63
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>64</b>
<b>5.1</b>	<b>Beurteilung der Alginatebeads mittels Hellfeldlichtmikroskopie</b>	<b>64</b>
<b>5.1</b>	<b>Darstellung der Viabilität der eingekapselten Zellen mittels Live-Dead- Färbung</b>	<b>68</b>
<b>5.2</b>	<b>Beurteilung Viabilität mittels Alamar-Blau-Assay</b>	<b>75</b>
5.2.1	Messung des Resazurinumsatzes innerhalb der einzelnen Zelllinien:	75
5.2.1.1	Stammzellen des Knochenmarks (B-MSC):	75

5.2.1.2	immortalisierte Stammzellen des Knochenmarks (SCP): .....	75
5.2.1.3	humane Osteoblasten (OSÜ): .....	75
5.2.2	Vergleich des Resazurinumsatzes zwischen den verschiedenen Zelllinien: .....	76
<b>5.3</b>	<b>Messung der Aktivität der spezifische alkalische Phosphatase .....</b>	<b>77</b>
5.3.1	Messung der AP-Aktivität innerhalb der einzelnen Zelllinien im Verlauf von 21 Tagen.....	78
5.3.1.1	Spezifische AP-Aktivität von B-MSK .....	78
5.3.1.2	Spezifische AP-Aktivität von SCP .....	78
5.3.1.3	Spezifische AP-Aktivität von OSÜ .....	78
5.3.2	Vergleich der Aktivität der alkalischen Phosphatase der verschiedenen Zelllinien an Tag 21 und Tag 1 .....	78
<b>5.4</b>	<b>Darstellung der Zellmineralisierung mittels Hellfeldlichtmikroskopie .....</b>	<b>80</b>
<b>5.5</b>	<b>Quantifizierung der Zellmineralisierung mittels Graustufenanalyse .....</b>	<b>80</b>
<b>5.6</b>	<b>Beurteilung der Zellmineralisierung in Alginatebeads mittels Alizarin-Rot-Färbung ..</b>	<b>81</b>
5.6.1	Messung der Zellmineralisierung innerhalb der einzelnen Zelllinien.....	81
5.6.1.1	Mineralisierung der B-MSK .....	81
5.6.1.2	Mineralisierung der SCP .....	82
5.6.1.3	Mineralisierung der OSÜ .....	82
5.6.1.4	Mineralisierung leerer Alginatebeads .....	82
5.6.2	Vergleich der Mineralisierung .....	82
<b>5.7</b>	<b>RNA-Isolierung .....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>85</b>
6.1	Studiendesign .....	85
6.2	Alginate.....	86
6.3	Zellen .....	87
6.4	Überleben in den Alginatebeads - Alamar-blau-Assay und Live-Dead-Staining .....	88
6.5	Differenzierungspotential der Zellen in den Alginatebeads, AP-Aktivität .....	89
6.6	Mineralisierung der Alginatebeads - Alizarin-Rot-Färbung und Graustufenanalyse ...	91
6.7	RNA-Isolation aus den Alginatebeads und PCR .....	93
6.8	Vergleich der unterschiedlichen Zelllinien im Kontext des Tissue Engineerings mit Alginatebeads .....	93
6.9	Ausblick.....	94
6.10	Einschränkungen: Kritische Betrachtung des Studiendesigns und Methodik.....	95
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>100</b>
<b>9</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>102</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>103</b>
<b>11.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>111</b>

# 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	Alamar Blau
AP	Alkalische Phosphatase
ARS	<i>Alizarin-Red-Staining</i>
AU	<i>Arbitrary unit</i>
avSEM	<i>Average standard error of the mean</i>
BF-Mikroskopie	<i>Bright-field-Mikroskopie (Hellfeldlichtmikroskopie)</i>
BMP2	<i>Bone-morphogenetic-protein-2</i>
B-MSC	Bone-marrow-Stem-Cells
bzw.	Beziehungsweise
C	<i>Concentration</i>
CoCrMo,	Kobalt-Chrom-Molybdän
CoNiCrMo	Kobalt-Nickel-Chrom-Molybdän
CrNiMo,	Chrom-Nickel-Molybdän
CoCrWNi	Kobalt-Chrom-Wolfram- Nickel
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DANN	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECM	<i>Extra-Cellular-Matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ext.	Extinktion
Em.	Emission
FCS	<i>Fetal- Calf- Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
HA	Hydroxyapatit
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hTERT	Humane Telomerase reverse Transkriptase
H <sub>2</sub> O	Wasser
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MEM	Modified Eagle's Medium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i>

N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NADPH+H <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaCl	Natriumchlorid
NTNU	<i>Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet</i>
Ω	Omega
OD	Optical Density
OSÜ	Durch Zentrifugierung isolierte Osteoblasten
OSS	Aus Spongiosastückchen isolierte Osteoblasten
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
RNA	Ribonucleic acid
SCP-Zellen	Single-Cell-Picked-Clones
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
TGF-β	Transformierende Wachstumsfaktor-β
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
WHO	<i>World Health Organization</i>
z.B	Zum Beispiel



## 2 EINLEITUNG

Die Zahl der Knochen- und Gelenkerkrankungen steigt weltweit. Nicht umsonst rief die WHO für die Jahre 2000-2010 die so genannte "Bone and Joint Decade" aus und verlängerte diese mittlerweile bis 2020.

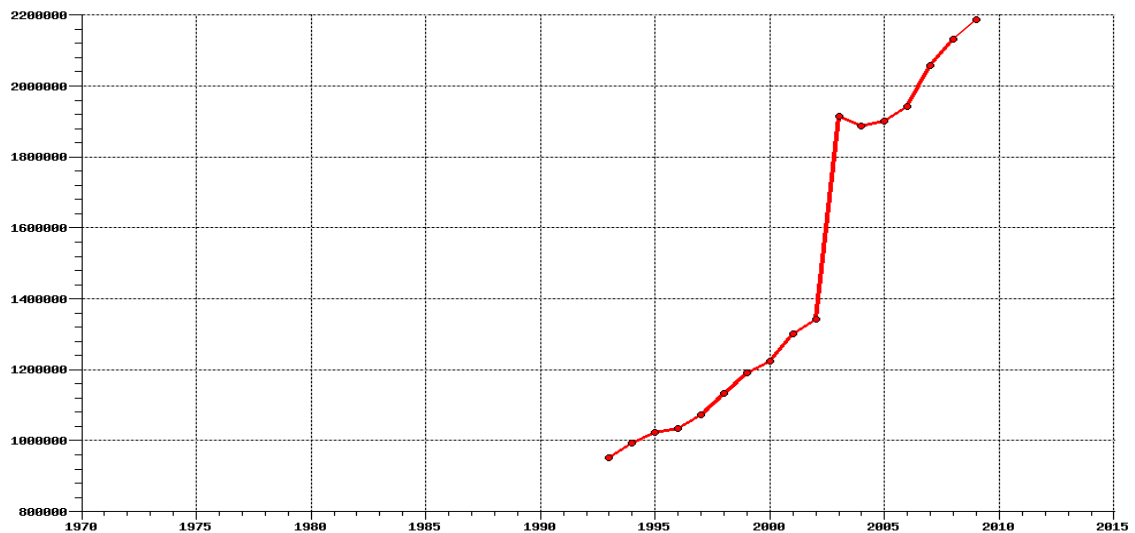


Abbildung 1: Muskuloskeletale Erkrankungen 1993-2009 [WHO, 2012a]

Wie Abbildung 1 zeigt, stiegen die Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems alleine auf Deutschland bezogen, immens an. Lag die Erkrankungszahl im Jahr 1993 noch unter einer Million, waren es 2009 schon ca. 2.200 000 Erkrankungen [WHO, 2012b].

Aber nicht nur in Deutschland kann man von einer Zunahme der Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems sprechen. In den USA beispielsweise stieg die Zahl der Knieendoprothesen und Revisionen von 700 000 im Jahr 1998 auf über 1,1 Millionen bis 2005 [Porter et al., 2009].

## 2.1 Knochendefektdeckung und Knochenersatzmaterialien

Im Rahmen der demographischen Entwicklung und damit der weiteren Zunahme der Knochenerkrankungen, wie zum Beispiel Osteoporose, und damit verbunden der steigenden Frakturzahlen vor allem im Alter, wird die Frage der Heilung größerer Knochendefekte und damit auch deren Defektdeckung immer relevanter. Auch Defektdeckung nach Traumata oder Tumorentfernung sind von erheblicher Relevanz [Porter et al., 2009]. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität müssen die Knochendefekte aufgefüllt und entsprechend überbrückt werden. Standard ist die Verwendung von autologem Knochen, der meist aus dem Beckenkamm entnommen wird [Finkemeier, 2002]. Autolog bedeutet, dass Spender und Empfänger dieselbe Person sind. Die Transplantation von autologem Knochen ist ein gängiges Verfahren, weltweit werden jährlich 2,2 Millionen durchgeführt [Calori et al., 2011]. Von Vorteil ist bei diesem Verfahren das größere Regenerationspotential von vitalem Knochenersatz durch die Anwesenheit von mesenchymalen Stammzellen und Wachstumsfaktoren [Heinemann et al., 2011]. Die Verwendung von autologem Spendermaterial ist allerdings mit nicht unerheblichen Risiken wie der nur limitierten Zahl von Transplantaten, der Spendermorbidity oder auch des Operationsrisikos verbunden [Calori et al., 2011, Porter et al., 2009].

Daher wurde versucht, Alternativen zu suchen. Hierzu zählt zum Beispiel allogenes Material, bei dem die Transplantate von unterschiedlichen Personen der gleichen Spezies stammen [Heinemann et al., 2011]. Aber auch hier sind die Risiken erheblich. Alleine das Infektionsrisiko bei einer allogenen Knochentransplantation beträgt um die 13% und auch die Immunreaktionen sind nicht zu unterschätzen [Porter et al., 2009]. Zur Reduktion der genannten Risiken wurde versucht, den allogenen Knochen zu devitalisieren. Dabei wurden alle (Stamm)Zellen eliminiert, sodass dieses Material nur noch eine tote Struktur darstellt, welche entsprechend keinen Anschluss an das umgebende Knochengewebe finden konnte. Noch stärker ausgeprägt findet man diese Problematiken bei dem Versuch der xenogenen Knochentransplantation, bei der Spender und Empfänger verschiedenen Spezies angehören [Heinemann et al., 2011, Porter et al., 2009].

Alloplastische Knochenersatzmaterialien, synthetische oder halbsynthetische Materialien wie Calciumphosphat-Keramik oder bioaktives Glas, sind nunmehr seit über 30 Jahren in der klinischen Anwendung [El-Ghannam, 2005]. Jedoch sind auch die bisherigen alloplastischen Transplantate nicht problemlos einzusetzen, zumal sie den Ansprüchen, die an Knochenersatzmaterialien gestellt werden, nur bedingt genügen.

## 2.2 Übersicht über bisherige Knochenersatzmaterialien

Tabelle 1 zeigt die gängigsten Knochenersatzmaterialien und erklärt die Transplantationsmöglichkeiten. In Abbildung 2 und 3 sind beispielhaft Knochenersatzstoffe dargestellt.

**Tabelle 1: Übersicht über die häufigsten Knochenersatzmaterialien und Transplantate**

	<b>Definition</b>
<b>Autolog</b>	Bei Transplantatspender und Empfänger handelt es sich um dieselbe Person.
<b>Allogen</b>	Transplantatspender und Empfänger gehören derselben Spezies an.
<b>Xenogen</b>	Transplantatspender und Empfänger gehören verschiedenen Spezies an.
<b>Alloplastisch</b>	Synthetische oder halbsynthetische Transplantate
Beispiele	
<b>Massivimplantate: Metalle und Legierungen</b>	CrNiMo, CoCrMo, CoCrWNI-, CoNiCrMo- Legierungen
<b>synthetische und halbsynthetische Polymere</b>	Polyethylen und modifiziertes Polyethylen, Silikon, Polypropylen, Polymethylmetacrylat
<b>Biopolymere und modifizierte Biopolymere</b>	Polysaccharide, Proteine
<b>Kalziumphosphat und Kalziumphosphat-basierte Ersatzmaterialien</b>	Kalziumphosphatbiokeramiken: Hydroxyapatit, Trikalziumphosphat Kalziumphosphatzemente Kalziumsulfate

<b>Silikat-basierte Ersatzmaterialien</b>	Biogläser auf Basis saurer Oxide Sol-Gel-Gläser
<b>Kompositmaterialien aus organischer und anorganischer Komponente</b>	Organische Komposite: z.B. Kollagen, Fibroin, Gelatine, Zellulose Anorganische Komposite: z.B. Si-substituiertes Hydroxyapatit oder $\alpha$ -Tricalciumphosphat



Abbildung 2: komplett synthetisches Spongiosa-Knochenersatzmaterial, das aus reinem  $\beta$ -Trikalziumphosphat besteht [synthes, 2012a]



Abbildung 3: resorbierbares Knochenersatzmaterial aus Trikalziumphosphat und Hyaluronat [synthes, 2012b]

## 2.3 Anforderungen an Knochenersatzmaterial

Der Anspruch an ein optimales Knochenersatzmaterial wäre in letzter Konsequenz die folgenlose Ausheilung eines Knochendefektes.

Es gibt verschiedene Kriterien, die es für Knochenersatzmaterialien zu erfüllen gilt, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen beziehungsweise diese in vivo einzusetzen.

Neben einer hohen Bioverfügbarkeit des Ersatzmaterials, welche ein zentrales Problem darstellt, zählen dazu sowohl Osteogenität sowie Osteoinduktion und Osteokonduktion des Materials (Tabelle 2) [Giannoudis et al., 2005, Theler, 2011].

**Tabelle 2: Begriffsklärung**

Osteogenität	Osteogenität bezeichnet die Fähigkeit des Transplantates selbst, neuen Knochen zu bilden.
Osteoinduktion	Osteoinduktion bezeichnet die Induktion der Knochenneubildung durch Stimulation von Knochenzellen.
Osteokonduktion	Osteokonduktion bezeichnet die Fähigkeit des Knochenersatzmaterials die autogene Knochenneubildung zu fördern, da es als Leitschiene fungiert.

Des Weiteren sollten die, auch bei den bisher verwendeten Transplantaten, vorhandenen Risiken und Probleme wie Infektionen, Immun- und Abstoßungsreaktionen minimiert werden beziehungsweise ausbleiben.

## **2.4 Tissue Engineering**

In den letzten Jahren erzielte die Forschung auf dem Gebiet der Entwicklung von Knochenersatzmaterialien große Fortschritte, dabei besonders auf dem Gebiet des Tissue Engineering.

Tissue Engineering bezeichnet die Entwicklung eines dreidimensionalen Gewebeersatzes, welcher nicht nur der Defektdeckung dient, sondern vielmehr durch die oben genannten Eigenschaften wie Osteogenität, Osteoinduktion und Osteokonduktion selbst zur Gewebe- beziehungsweise Knochenneubildung beiträgt. Dies würde bei optimalen Verhältnissen die folgenlose Defektheilung bedeuten und wäre somit die Antwort auf die Frage nach Knochenersatzstoffen.

### **2.4.1 Das trianguläre Prinzip des Tissue Engineering**

Ziel des Tissue Engineerings ist es funktionales Knochengewebe aus lebenden Zellen zu generieren um somit Knochendefekte zu überbrücken [Unger et al., 2009].

Das Prinzip des Bone Engineering baut auf drei Säulen, aus denen das in vitro hergestellte Gewebe aufgebaut sein sollte, auf (Abbildung 4, Abbildung 5). Dazu zählen erstens die sogenannte Matrix oder Scaffold, ein dreidimensionales Grundgerüst, welches einerseits als Grundlage für die

Zelldifferenzierung, die Ernährung und als Speicher für Wasser, Zytokine und Wachstumsfaktoren dient, andererseits aber auch das Einwandern von Zellen sowohl in den Knochendefekt als auch in die Matrix selbst, fördern sollte. Zweitens, Zellen, sowie drittens, Wachstumsfaktoren beziehungsweise Wachstumsstimulantien. An jedes dieser drei Elemente werden für einen erfolgreichen Gewebeersatz verschiedene Anforderungen gestellt.

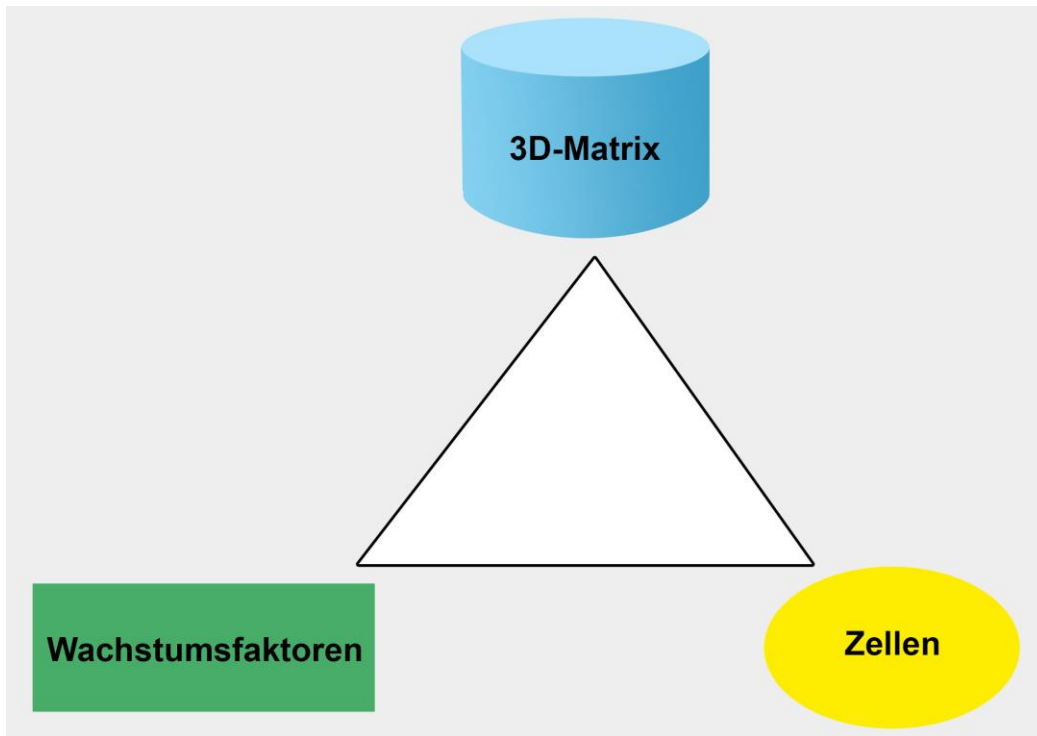
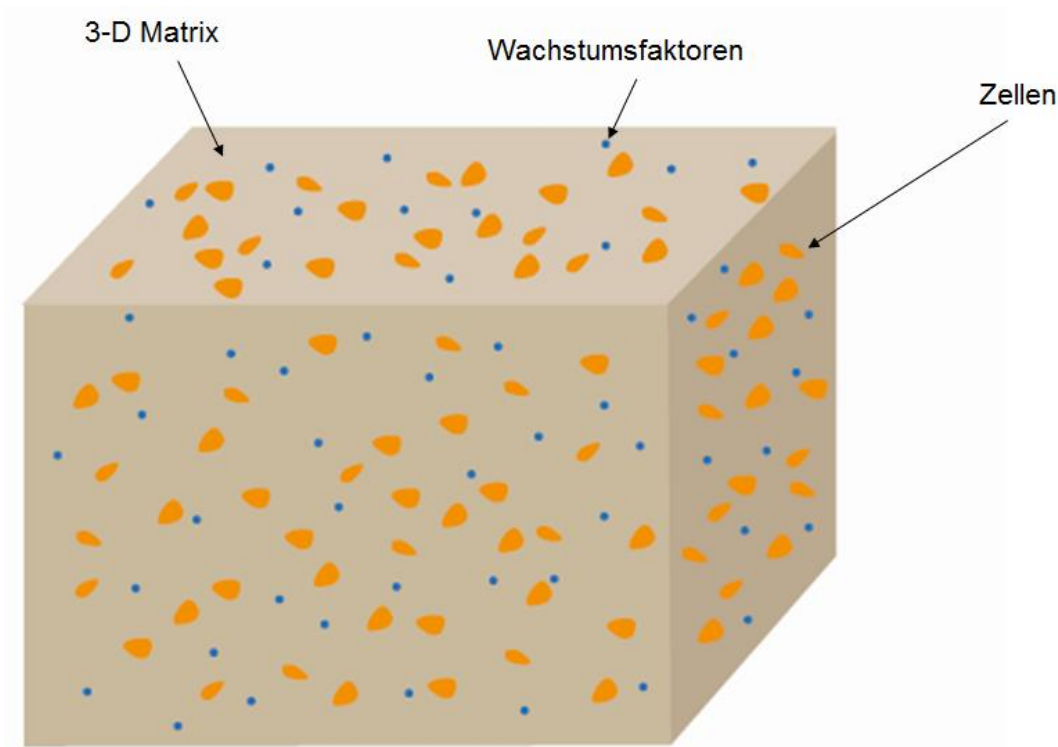


Abbildung 4: trianguläres Prinzip des Tissue Engineering



**Abbildung 5: trianguläre Prinzip des Tissue Engineering: beispielhafte Darstellung einer 3-D-Matrix mit Zellen und Wachstumsfaktoren.**

## 1. Matrix

Bezüglich des Einsatzes der Matrix existieren zwei Ansätze: Zum einen die Implantation einer in vitro mit Zellen besiedelten Matrix, welche in das defekte Knochengewebe integriert werden soll. Zum anderen die Implantation der Matrix ohne Zellen [Stevens et al., 2005]. In diesem Fall besteht der Anspruch an die Matrix, dass diese, sobald sie in das Knochengewebe eingesetzt worden ist, die Grundlage für das Einwandern körpereigener Zellen bietet [Rezwan et al., 2006]. Die heutzutage verwendeten Matrices sind synthetische oder natürliche Polymere, wie beispielsweise Hydrogele oder bioaktive Keramik [Haberstroh et al., 2010, Rezwan et al., 2006].

### Anforderungen an die Matrix

Die als 3D-Gerüst verwendete Matrix sollte verschiedene Eigenschaften aufweisen, hervorzuheben sind dabei erstens die Biokompatibilität [Morais et al., 2010] welche entscheidend für das Einwachsen des Transplantates in das Knochengewebe ist, sowie zweitens, die Abbaubarkeit. Bei der Abbaubarkeit beziehungsweise Bioresorbierbarkeit spielt eine entscheidende Rolle [Augst et

al., 2006], dass das Scaffold zu dem Zeitpunkt abgebaut ist, zu dem sich an dessen Stelle neuer Knochen gebildet hat [Bruder et al., 1994, Xie et al., 2010]. Des Weiteren sollte die Matrix über eine bestimmte Porengröße verfügen. Diese dient den in der Matrix befindlichen Zellen unter anderem als Grundlage für die Ernährung beispielsweise durch Diffusion [Schmidt-Rohlfing et al., 2009] oder ermöglicht auch das Einwandern neuer Zellen in die Matrix [Thomson et al., 1995, Whang et al., 1998]. Die Porengröße stellt eines der entscheidenden Probleme in der Frage der Stabilität der Matrix dar. Um ausreichende Stabilität, ähnlich der von Knochen, aufzuweisen, dürfen die Poren weder zu groß noch zu klein sein. Zu kleine Poren wiederum könnten eine Minderversorgung der in der Matrix enthaltenen Zellen bedeuten, wohingegen zu große Poren die Angiogenese ebenfalls behindern und eine geringere Stabilität der Matrix bedeuten. Die Angaben über die optimale Porengröße variieren je nach Literatur zwischen 200-400µm [Burg et al., 2000, Schaefer et al., 2000, Schmidt-Rohlfing et al., 2009].

Neben diesen Eigenschaften obliegt es auch der Matrix, die Differenzierung der Zellen in Osteoblasten zu beeinflussen und somit auf das Knochenremodeling beziehungsweise die Knochenneubildung hinzuwirken [Kolambkar et al., 2011].

## **2. Zellen**

Bislang wurden für den Einsatz des Bone Engineerings von Knochen im Wesentlichen mesenchymale Stammzellen, mesenchymale Stromazellen, periostale Zellen, sowie Osteoblasten verwendet [Schmidt-Rohlfing et al., 2009].

Obwohl alle diese Zelltypen sowohl den Anspruch der Osteogenität beziehungsweise der Differenzierungsfähigkeit in Osteoblasten erfüllen, sind sie als eine in vitro basierte Anwendung für das Bone Engineering nicht optimal, da denjenigen, die osteogenen Ursprungs sind, allen gemein ist, dass sie in nur begrenzten Mengen zur Verfügung stehen und auch die Wachstums- und Differenzierungszeit größtenteils nicht kurz genug ist um dieses Manko auszugleichen.



### **3. Wachstumsfaktoren**

Wachstumsfaktoren sind an der Zelldifferenzierung und Gewebeentwicklung von Knochen maßgeblich mitbeteiligt. Für Knochengewebe typisch sind beispielsweise der transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Bone-morphogenetic-protein-2 (BMP2) oder der Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) [Schmidt-Rohlfing et al., 2009].

Bei dem Remodeling von Knochengewebe spielt vor allem die Interaktion der Wachstumsfaktoren mit der Matrix und den Knochenzellen eine bedeutsame Rolle, da die Wachstumsfaktoren so in die Matrix integriert werden sollten, dass eine Proteinübermittlung an die Zellen ermöglicht wird und so deren Wirksamkeit entfaltet werden kann [Kolambkar et al., 2011].

## 2.4.2 Die Suche nach der Lösung

### 2.4.2.1 Alginat als Matrix- eine Alternative?

Im Rahmen der Forschung auf dem Gebiet des Bone Engineerings wurde in den vergangenen Jahren versucht sowohl optimale Materialien als auch Bedingungen für die Generierung von Knochenersatzstoffe, zu entwickeln. In diesem Zusammenhang wurde versucht Alginat als Matrix für das Bone Engineering zu verwenden.

Alginat, ein Biopolymer aus der Braunalge [Augst et al., 2006], ist ein Hydrogel welches als solches eine ähnliche Morphologie wie die extrazelluläre Matrix aufweist [Hunt et al., 2010]. Auf Grund seiner Bioresorbierbarkeit und den fehlenden Immunreaktionen [de Vos et al., 2006, Pawar et al., 2012, Shapiro et al., 1997] sowie des fehlenden Infektionsrisikos wurde seine Eignung als Matrix für das Knochen-Tissue-Engineering vielfach diskutiert.

Umstritten für den Einsatz im Bone-Engineering ist, dass Alginat als natürliches Polysaccharid die Konsistenz eines Gels hat [Xie et al., 2010], dessen Stabilität kaum der des Knochens gleicht. Das Polysaccharid besteht aus zueinander im Verhältnis stehenden Copolymeren aus 1-4,  $\beta$ -D-Mannuronsäure (M-Kette) und  $\alpha$ -L-Glucuronsäure (G-Kette). Das Verhältnis der G-Polymere zu den M- Polymeren ist für die strukturelle Festigkeit des Gels verantwortlich [Pawar et al., 2012, Xie et al., 2010]. Eine weitere Eigenschaft von Alginat ist seine Fähigkeit mit zweiwertigen Ionen Komplexe zu bilden, so genannte Cross-Links, welche ebenfalls die Alginatkonsistenz beeinflussen [Morch et al., 2006]. Das Problem der mangelnden Stabilität des Gels wurde unter anderem durch die Mineralisierung mit zweiwertigen Ionen wie beispielsweise Calcium, untersucht [de Vos et al., 2006, Morch et al., 2006, Xie et al., 2010].

Für die Mineralisierung von Alginat mit Calcium-Phosphat stellte sich heraus, dass dieses bei Raumtemperatur einen Einfluss auf Hydroxyapatit ausübt [Morch et al., 2006]. Hydroxyapatit ist Bestandteil des menschlichen Knochens und leistet einen entscheidenden Beitrag zu dessen Stabilität.

#### Mikrokapseln aus Alginat Beads

Die Idee des Einkapselns von Zellen geht auf die Immunisation von Zellen zu therapeutischen Zwecken zurück. Das Einbringen von Zellen in Kapseln ermöglicht diesen die Differenzierung innerhalb einer 3D Zellkultur, die im Falle von Hydrogelen

morphologisch der Extrazellulärmatrix ähnelt [Hunt et al., 2010]. Bereits 1980 wurde das Einkapseln von Pankreasinzellen in Mikrokapseln aus Alginat beschrieben [Lim et al., 1980].

Die Permeabilität der Kapseln ist durch eine bidirektionale Diffusion zwischen Kapsel und dem sie umgebenden Gewebe bedingt [Krishnamurthy et al., 2011].

In dieser Arbeit wurde Versucht, das Modell der Kapseln aus Alginat zu nutzen und als 3-D Matrix für das Bone Engineering zu verwenden.

#### **2.4.2.2 SCP-Zellen, immortalisierte Zellen als eine mögliche Lösung für die limitierte Verfügbarkeit von Osteoblasten und Knochenmarkstammzellen**

##### a) Osteoblasten und Knochenmarksstammzellen

Osteoblasten sind ausdifferenzierte Knochenzellen, die unter anderem für den Aufbau der Extrazellulärmatrix verantwortlich sind [Eriksen, 2010, Lian et al., 1995]. Damit wären sie theoretisch die erste Wahl für die Herstellung von Knochengewebe. Aufgrund allerdings der langen Kultivierungszeit und begrenzten Möglichkeiten, diese Zellen in ausreichender Zahl zu gewinnen [Ehnert S, 2011], um einen entsprechend großen Zellpool generieren zu können, mit dem auch größere Knochendefekte gedeckt werden könnten, suchte man nach Alternativen.

Einer dieser Lösungsansätze, ist der Einsatz von Knochenmarksstammzellen. Diese, so genannten Bone-marrow-Stem-Cells (B-MS), sind pluripotente Zellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in Zellen unterschiedlicher Gewebe wie Knochen-, Knorpel-, Sehnen- oder Muskelzellen auszudifferenzieren [Bruder et al., 1994, Xiao et al., 2010].

Im Rahmen der physiologischen Frakturheilung sind es unter Anderem diese Zellen, welche in das Gebiet des Frakturspaltes einwandern und sich dort entweder zu Osteoblasten oder zu Osteoklasten weiter ausdifferenzieren [Fayaz et al., 2011]. Richtungsbestimmend für die Differenzierung der Knochenmarksstammzellen sind dabei verschiedenste Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, wie beispielsweise BMP-2, welches unter anderem von den B-MS exprimiert wird [Wulsten et al., 2011]. Die Fähigkeit dieser Zellen, sich in knochenbildende Zellen weiterzuentwickeln [Xiao et al., 2010], identifiziert sie für das Tissue Engineering als potentiell Target, da sie relativ einfach aus dem Markraum entnommen werden können [Finkemeier, 2002].

Allerdings ist ihre Häufigkeit im Knochenmark begrenzt. Nur 0,001-0,01% der kernhaltigen Zellen sind mesenchymale Stammzellen, so dass sie in vitro vermehrt werden müssen, bevor sie in ausreichender Menge eingesetzt werden können [Boker et al., 2008]. Ein weiteres Problem, welches die B-MSC betrifft ist, dass bei einer längeren in-vitro Kultivierung ihre Proliferations- und Differenzierungskapazität abnimmt [Abdallah et al., 2005, Baxter et al., 2004].

Um im Rahmen des Tissue Engineering, beziehungsweise der Besiedelung eines Scaffolds mit Zellen, eine Immunreaktion zu verhindern oder eine höhere Gewebeverträglichkeit zu erzielen, wäre der Einsatz von autologen Zellen von Vorteil.

Da sich wie oben beschrieben, sowohl der Einsatz von Osteoblasten als auch der von B-MSC auf Grund ihrer nur limitierten Verfügbarkeit schwierig gestaltet, wurde versucht, Zellen mit Hilfe reverser Transkriptase genetisch so zu modifizieren, dass diese nicht nur über eine schnellere Differenzierungsfähigkeit, sondern auch über eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit verfügten.

#### b) SCP-Zellen - der Hintergrund

Telomere, am Chromosomenende eukaryonter Zellen, sind mitverantwortlich für den Alterungsprozess beziehungsweise die nur begrenzte Teilungshäufigkeit der Zellen [Abdallah et al., 2005, Baxter et al., 2004]. Die Telomere, welche bei der Zellteilung verkürzt werden, werden wiederum durch das Enzym humane Telomerase reverse Transkriptase (hTERT) verlängert [Abdallah et al., 2005, Bodnar et al., 1998]. Dies erklärt die Verantwortlichkeit des Enzyms für die Zellerterung. Obwohl es gelang, die hTERT mittels Gentransfektion in humane mesenchymale Stammzellen zu integrieren und diese somit sowohl unbegrenzt teilungsfähig zu machen als auch ihre Funktionsfähigkeit zu erhalten [Abdallah et al., 2005], war dies nur ein begrenzter Erfolg, da diese Zellen nachweislich eine erhöhte Mutagenität aufwiesen [Boker et al., 2008].

In der Literatur wurde allerdings auch beschrieben, dass normale eukaryonte Zellen mittels Transfektion mit hTERT immortalisiert wurden, ohne dabei onkogenes Potential aufzuweisen [Harley, 2002]. Daher wurde ein Zusammenhang mit dem zur Transfektion eingesetzten, viralen Vektor vermutet [Harley, 2002]. Bei dem für die mutagen entarteten humanen mesenchymalen Stammzellen verwendeten Vektor handelte es sich immer um gamma-retrovirale-Vektoren [Boker et al., 2008]. Aus

dieser Erfahrung heraus wurde der Versuch unternommen, humane mesenchymale Stammzellen nicht mehr mit Vektoren von Gammaretroviren sondern mittels Vektoren von Lentiviren zu transfizieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei dieser Transfektionsmethode keine maligne Entartung der Zellen entstand. Aus diesem Versuch heraus entstanden die so genannten Single-Cell-Picked-Clones (SCP-Zellen), bei denen es sich um einzelne Zellen der fünften Zellpassage der mittels Lentiviren transfizierten und damit immortalisierten, mesenchymalen Stammzellen handelt [Boker et al., 2008].

#### **2.4.2.3 Hydroxyapatit als Stimulus für die Zelldifferenzierung**

Wie bereits beschrieben, gibt es ein Zusammenspiel zwischen mit Calciumphosphat mineralisiertem Alginat und Hydroxyapatit (HA). Studien *des Nanoinstitutes der NTNU Trondheim* konnten zeigen, dass es durch die Interaktion von mit Calciumphosphat versetztem Alginat mit einer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zur Bildung von Hydroxyapatit kommt und dieses zu einer primären Mineralisierung von Alginatbeads führt [Xie et al., 2010].

Der Anteil des Hydroxyapatit in der erwähnten Studie ähnelte dem im menschlichen Knochen [Xie et al., 2010]. Auch ist bekannt, dass HA des Weiteren osteokonduktive Eigenschaften aufweist [Moreau et al., 2009] und Scaffolds aus Nanofaser-Hydroxyapatit die osteoblastenspezifische Differenzierung stimulieren [Liu et al., 2009].

### 3 ZIELSETZUNG

Verletzungen mit langstreckigen Knochendefekten stellen ein großes klinisches Problem dar. Die bisherigen Behandlungsmethoden reichten vom Einsatz autologer Knochentransplantation bis hin zum Einsatz von synthetischen oder halbsynthetischen Materialien. Keine dieser bisherigen Methoden löste jedoch das Problem der Knochendefektdeckung zufriedenstellend, da sie entweder bezüglich der Menge des verfügbaren Materials oder aber hinsichtlich ihres Einwachsverhaltens in den Empfängerknochen, Mängel aufzeigten. In diesem Kontext ist die Forschung auf dem Gebiet des Tissue Engineerings verstärkt in den Blickpunkt gerückt, bei dem seit Jahren versucht wird, eine optimale Lösung für das Problem der Knochendefektdeckung zu finden. Dabei ist nicht nur die Überbrückung des Defektes, sondern auch die Generierung von neuem Knochenmaterial das Ziel. Das Prinzip des Tissue Engineerings baut auf drei Säulen auf, welche die Grundlage für die Entstehung von neuem Gewebe zur Defektdeckung darstellen. Die Idee dahinter ist, eine Matrix, ähnlich einer 3-D-Zellkultur zu schaffen, welche in den Defekt eingesetzt werden kann. Die Matrix stellt das Gerüst für die Zellen und Wachstumsfaktoren da, welche neues Gewebe bilden sollen. Zu ihren Eigenschaften zählt entsprechend, die die Proliferation und Differenzierung der Zellen zu fördern. Ziel ist, durch so neu entstandenes Gewebe, einen Knochendefekt zu schließen.

Ziel dieser Arbeit war es daher:

- a) herauszufinden, ob sich Osteoblasten, mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (B-MSK) und immortalisierte Stammzellen (SCP) in Alginatebeads, einkapseln lassen und diesen Vorgang überleben.
- b) zu überprüfen, wie lange eine Überleben der Zelllinien in den Alginatebeads möglich ist
- c) in einem weiteren Schritt, zu untersuchen, ob sich die Zellen in den Alginatebeads differenzieren
- d) ob es zu einer Mineralisierung der Alginatebeads im Verlauf der Kultivierungszeit kommt.
- e) Schließlich, die verschiedenen Zelltypen gegeneinander zu vergleichen, um somit, den hinsichtlich Überleben und Differenzierungsverhalten potentesten Zelltyp herauszufinden

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Übersicht Zeitplan

In Zusammenarbeit mit dem *Nanoinstitut der NTNU Trondheim* wurden die verschiedenen Zelllinien mittels eines so genannten Bead-Generators in mit Calciumphosphat mineralisiertes Alginat eingekapselt. Um das Zellüberleben, die Differenzierung und die Mineralisierung beurteilen zu können, wurden diese jeweils an Tag 1,6,11,16 und 21 diesbezüglich untersucht.

An den Tagen 0,5,10 und 21 sowie 1, 10 und 20 wurde die Zellentwicklung fotodokumentiert.

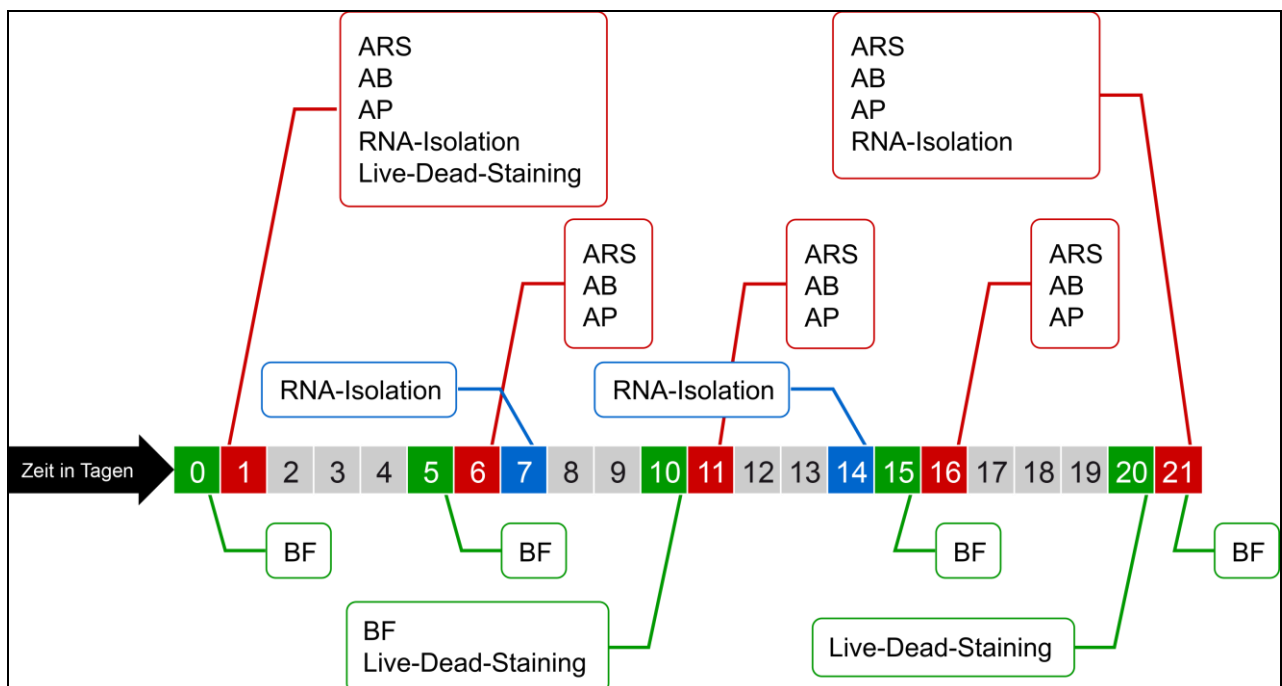


Abbildung 6: Schematische Darstellung der 21 Tage Kultivierungszeit

Abbildung 10 zeigt die 21 Tage Kultivierungszeit im Überblick und die Versuche, die an den entsprechenden Tagen durchgeführt wurden.

Tag 0 entspricht dem Tag, an dem die Zellen in die Alginatbeads eingekapselt wurden, an diesem Tag wurden auch die ersten lichtmikroskopischen Bilder der Beads angefertigt. Weitere Bilder erfolgten an Tag 5, 10, 15 und 21.

Jeweils an Tag 1, 6, 16 und 21 erfolgten die Untersuchungen der Beads (beziehungsweise der eingekapselten Zellen) mittels Alizarin-Rot-Färbung, Alamar-Blau-Färbung, sowie die Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität. Die Lebend-Tot-Färbung wurde an den Tagen 1, 10 und 20 durchgeführt. An den Tagen 1, 7, 14 und 21 erfolgte die RNA-Isolation aus den Zellen.



## 4.2 Isolierung primärer humaner Osteoblasten aus intraoperativ entfernten Femurköpfen

### 4.2.1 Benötigte Materialien

Tabelle 3 zeigt die zur Isolierung primärer humaner Osteoblasten benötigten Materialien und die von uns verwendeten Mengen.

**Tabelle 3: Materialien für die Isolierung humaner Osteoblasten**

Menge	Material	Zusätzliche Information
1	Lüer Zange	Steril
	Handschuhe	Steril
	Sterilfilter für Flüssigkeiten	Millex® GP Filter Unit 0,22µm
	50mL Reaktionsgefäße (Falcon-Tubes)	
4	Zellkulturflaschen	175cm <sup>2</sup> PAA, Pasching, Österreich
500mL	Dulbecco's PBS	PAA, Pasching, Österreich
1mL	Kollagenase-Lösung	Herstellung: - 0,7mg Kollagenase Typ II, Biochrome, Berlin, Deutschland  Lagerung: -20 °C  - 1,0mL PBS, PAA, Pasching, Österreich  Zur Herstellung der Kollagenaselösung wird die Kollagenase in PBS gelöst.
	Osteoblastenkulturmedium	

#### **4.2.2 Vorgehensweise:**

Als Basis für die Isolierung primärer Osteoblasten dienten Hüftköpfe, die im Rahmen eines prothetischen Gelenkersatzes entfernt wurden.

Für die zu Forschungszwecken verwendeten Femurköpfe lag sowohl eine Einverständniserklärung der Patienten als auch eine Genehmigung durch die Ethikkommission der Technischen Universität München vor. (AZ 2033/08)

#### **4.2.3 Vorbereitung des Arbeitsplatzes:**

Die Isolierung der Zellen erfolgte unter einer sterilen Laborreinbank, die vor Benutzung erst ausgiebig mit 70%igem Alkohol desinfiziert und gereinigt wurde.

Auf die gesäuberte Arbeitsfläche wurden eine sterile Luer-Zange, mehrere Reaktionsgefäße (Falcon), steriles PBS sowie sterile Handschuhe vorbereitet.

#### **4.2.4 Herauslösen von Spongiosa aus dem Hüftkopf:**

Zum Lösen der Spongiosa aus dem Hüftkopf wurden zwei 50mL Reaktionsgefäße, mit je 20mL sterilem PBS gefüllt, vorbereitet.

Anschließend wurden aus dem Hüftkopf mit Hilfe der Luer-Zange möglichst kleine (im Millimeterbereich) Spongiosastückchen herausgebrochen und bis zur 10mL Markierung in die mit PBS gefüllten Reaktionsgefäße aufgeteilt.

#### **4.2.5 Waschen der Spongiosa:**

Für den Waschvorgang wurden die Reaktionsgefäße mit PBS und Spongiosastückchen bis zur 50mL Markierung mit PBS aufgefüllt, verschlossen und geschwenkt. Der Schwenkvorgang diente dem Waschen der Spongiosa. Anschließend wurde das PBS abgesaugt [Robey et al., 1985] [El-Amin et al., 2006]. Um eine ausreichende Säuberung des Knochens zu garantieren, wurde dieser Vorgang fünfmal wiederholt.

#### **4.2.6 Enzymatische Lösung der Osteoblastenverbände mit Hilfe von Kollagenase:**

Um die erwünschte Kollagenase-Lösung zu erhalten, wurden in der benötigten Menge 0,7mg Kollagenase Typ II in einem mL PBS gelöst und die so entstandene Enzymlösung steril gefiltert. Nun wurden die Spongiosafragmente mit der Enzymlösung versetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass alle Knochenstückchen gut mit Lösung bedeckt waren. Die so in Kollagenase eingelegten Knochenteile wurden eine Stunde bei 37 °C inkubiert [Robey et al., 1985],[El-Amin et al., 2006]. Die Reaktionsgefäße wurden gelegentlich geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Kollagenase zu gewährleisten.

#### **4.2.7 Durch Zentrifugierung isolierte Osteoblasten (OSÜ) und aus Spongiosastückchen isolierte Osteoblasten (OSS)**

Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde der noch übrige Kollagenase-Überstand abgenommen und in ein 50mL Falcon pipettiert. Die Spongiosafragmente im Reaktionsgefäß wurden nun zwei Mal mit sterilem PBS gewaschen, der PBS-Überstand jedoch nicht verworfen, sondern ebenfalls in 50mL Reaktionsgefäße gefüllt. Die in Falcons gefüllten Überstände wurden für zehn Minuten bei 600g zentrifugiert, um die darin enthaltenen Zellen zu sichern. Nach der Zentrifugierung wurden die entstandenen Zellpellets vom Flüssigüberstand befreit und 6mL Osteoblastenkulturmedium zugegeben [Robey et al., 1985];[El-Amin et al., 2006]. Die nun in Osteoblastenkulturmedium gelösten Zellen wurden auf zwei Zellkulturflaschen verteilt und je weitere 19mL Kulturmedium zugegeben. Die auf diese Weise isolierten Osteoblasten wurden als OSÜ bezeichnet.

Auch die gewaschenen Spongiosastückchen wurden auf zwei Zellkulturflaschen verteilt und je 25mL Osteoblastenkulturmedium zugegeben. Die auf diese Weise isolierten Osteoblasten bekamen die Bezeichnung OSS (Abbildung 5).

Nach der Isolierung wurden sowohl OSÜ als auch OSS bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der erste Wechsel des Mediums erfolgte am Tag nach der Isolierung der Zellen. Für die weitere Kultivierung war ein Wechsel des Mediums alle drei bis fünf Tage notwendig.



**Abbildung 7: Osteoblasten in Zellkulturflasche - deutlich zu erkennen sind hier die Spongiosastückchen, aus denen die Osteoblasten isoliert wurden**

## 4.3 Osteoblastenkulturmedium

### 4.3.1 Benötigte Materialien für das Zellkulturmedium:

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die für die Herstellung von Osteoblastenkulturmedium benötigten Materialien

**Tabelle 4: Materialien für das Osteoblastenkulturmedium**

Menge	Material	Zusätzliche Information
500mL	MEM With Earle's Salts With L-Glutamine (Lagerung: 2 °C – 8 °C)	Sigma-Alderich, München, Deutschland
500mL	Ham's F-12 With L-Glutamine (Lagerung: 2 °C – 8 °C)	Sigma-Alderich, München, Deutschland
1mL	$\beta$ -Glycerolphosphat- Stocklösung	Herstellung:  - 108mg $\beta$ -Glycerolphosphat, AppliChem, Darmstadt, Deutschland - PBS, PAA, Pasching, Österreich  Das $\beta$ -Glycerolphosphat wurde in 10mL PB  S gelöst und anschließend steril gefiltriert.  Von der Stocklösung wurden 20 Aliquots, je 0,5mL hergestellt.  (Lagerung: -20 °C)
1mL	L-Ascorbat-2-Phosphat-	Herstellung:

	Stocklösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 128mg L-Ascorbat-2-Phosphat, Sigma-Alderich, München, Deutschland</li> <li>- Lösung in 10mL PBS, PAA, Pasching, Österreich</li> <li>- sterile Filterung</li> <li>- Herstellung von 20 Aliquots, je 0,5mL</li> <li>- Lagerung bei -20 °C</li> </ul>
10mL	Penicillin/Streptomycin Penicillin:10000 Einheiten/mL Streptomycin: 10mg/mL	2x5mL Penicillin/Streptomycin PAA, Pasching, Österreich
100mL	FCS (Fetal- Calf- Serum) Hitzeinaktivierung für 30 Minuten bei 56 °C	2x50mL PAA, Pasching, Österreich
20mL	Dulbecco's PBS	PAA, Pasching, Österreich

#### 4.3.2 Herstellung von Osteoblastenkulturmedium:

Zur Herstellung von einem Liter Osteoblastenkulturmedium wurden 500mL MEM with Earle's Salt mit 500mL HAM's F-12 in ein äquivalentes Verhältnis gebracht, so dass sich in jeder Flasche 250mL MEM with Earle's Salt und 250mL HAM's F-12 befanden, was die Basis des Kulturmediums darstellte.

Den 10mL benötigter Penicillin und Streptomycin- Antibiotikalösung wurden je 1mL  $\beta$ -Glycerolphosphat-Stocklösung und 1mL L-Ascorbat-2-Phosphat-Stocklösung zugegeben. Von der entstandenen Mischung wurden anschließend je 6mL in 500mL des Mediums gefiltert.

Pro Flasche wurden schließlich 50mL FCS zugegeben. Durch kurzes Schwenken der Flasche sollte der Inhalt gemischt werden [Ehnert S, 2011].

## 4.4 Osteoblastendifferenzierungsmedium

### 4.4.1 Benötigte Materialien

Eine Auflistung der benötigten Materialien zur Herstellung von Osteoblastendifferenzierungsmedium zeigt Tabelle 5.

**Tabelle 5: Materialien für das Osteoblastendifferenzierungsmedium**

Menge	Material	Zusätzliche Information
500mL	MEM With Earle's Salts With L-Glutamine (Lagerung: 2 °C – 8 °C)	Sigma-Alderich, München, Deutschland
500mL	Ham's F-12 With L-Glutamine (Lagerung: 2 °C – 8 °C)	Sigma-Alderich, München, Deutschland
10mM Entspricht 1,08 g/500mL	β -Glycerol phosphat-disodium	Sigma-Alderich, München, Deutschland
200µM Entspricht 29,0 mg/500mL	L-Ascorbat-2-Phosphat	Sigma-Alderich, München, Deutschland
12,5mM Entspricht 1,49 g/500mL	HEPES	PAA, Pasching, Österreich
1,5mM Entspricht 0,11 g/500mL	Calcium-Chloride-Dihydrate	Sigma-Alderich, München, Deutschland
2 x 5mL ; 1% entspricht 5mL/500mL	FCS (Fetal- Calf- Serum) Hitzeinaktivierung für 30 Minuten bei 56 °C	PAA, Pasching, Österreich
2x5mL (10mL); entspricht 5mL/500 mL	Penicillin/Streptomycin Penicillin:10000 Einheiten/mL Streptomycin: 10 mg/mL	PAA, Pasching, Österreich
10nM, entspricht 5 µl/500mL	Dexamethasone-Stocklösung	Dexamethasone- Stocklösung: 7,84mg Dexamethasone, Sigma-Alderich, München, Deutschland, werden in 20mL Dimethylsulfoxid gelöst.

#### 4.4.2 Durchführung – Herstellung des Osteoblastendifferenzierungsmedium:

Als Grundlage des Osteoblastendifferenzierungsmediums dienten 500mL MEM with Earle's Salts sowie 500mL Ham's F-12, die je Flasche in ein 1:1 Verhältnis gebracht wurden. Anschließend wurden pro 500mL Flasche 1,08mg  $\beta$ -Glycerol phosphate disodium sowie 29,0mg L-Ascorbat-2-Phosphat zugegeben. Des Weiteren wurden pro Mediumsflasche 1,49g HEPES, 0,11g Calciumchloride sowie 5mL FCS und 5mL Antibiotikallösung beigemischt. Zu guter Letzt wurde die Lösung durch Schwenken vermischt [Robey et al., 1985], [El-Amin et al., 2006]

### 4.5 Kultivierung primärer humaner Osteoblasten

#### 4.5.1 Benötigte Materialien

Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die zur Kultivierung primärer humaner Osteoblasten benötigten Materialien.

Tabelle 6: Materialien für die Kultivierung humaner Osteoblasten

Menge	Material	Zusätzliche Information
	Ethanol 70%	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
	Dulbecco's PBS ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$	PAA, Pasching, Österreich
2,5 mg/mL	Trypsin EDTA	PAA, Pasching, Österreich
	Falcon 50mL	
	Zellkulturflaschen 175cm <sup>2</sup>	PAA, Pasching, Österreich
	Osteoblastenkulturmedium	

#### 4.5.2 Mediumwechsel

Um optimale Bedingungen für das Zellüberleben und –Wachstum zu schaffen, wurden die Osteoblastenkulturen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3-5 Tage, um die Zellen mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen. Unter sterilen Bedingungen wurde das verbrauchte Medium aus den



Zellkulturflaschen abgesaugt und erneut 25mL Osteoblastenkulturmedium nachgefüllt. Vor und nach dem Mediumwechsel wurde die sterile Arbeitsfläche ausreichend mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

### **4.5.3 Passagierung**

Die Zellkulturen wurden regelmäßig unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Ab einem Zellgehalt von ungefähr 80% einer Zellkulturflasche wurden die Zellen passagiert. Das bedeutete, die Zellen einer 175cm<sup>2</sup> Flasche wurden auf 2 bis 3 Flaschen aufgeteilt.

Dabei war der erste Schritt, die vorhandenen 25mL Kulturmedium abzusaugen. War dies erfolgt, wurden die Zellen gewaschen um sie von etwaigen Resten des Mediums zu befreien. Das Waschen der Zellen erfolgte durch Zugabe von 25mL sterilem PBS. Nach kurzer Einwirkzeit wurde das PBS abgesaugt, um anschließend pro zu passgierender Flasche 2mL EDTA-Trypsin zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Kulturflasche gut zu verteilen. Hiernach wurden die Zellen für 3-6 Minuten bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Trypsin bewirkt eine Ablösung der am Boden der Kulturflasche adhärenen Zellen. Durch vorsichtiges Klopfen der Kulturflasche und lichtmikroskopische Begutachtung wurde kontrolliert, ob sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden gelöst hatten. War dies der Fall, wurde die Wirkung des Trypsin durch Zugabe von 8mL Zellkulturmedium aufgehoben. Mit Hilfe einer Pipette wurden die sich nun in inaktiviertem Trypsin befindlichen Zellen in ein 50mL Falcon transferiert und bei 650g für 10 Minuten zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand von dem so entstandenen Zellpellet abgesaugt. Durch Zugabe der entsprechenden Menge Medium wurde das Pellet gelöst und die Zellen konnten auf 2 bis 3 Kulturflaschen verteilt werden. Zu guter Letzt wurden die Kulturflaschen bis auf ein Volumen von 25mL mit Medium aufgefüllt. Anschließend konnten die Zellen in gewohnter Weise inkubiert werden [El-Amin et al., 2006],[Robey et al., 1985]. Die Passagierung der Zellen erfolgte bis zu einem Mindestzellbestand von 4-6 Millionen Zellen und bis maximal Passage 5.

## 4.6 Isolierung von Stammzellen des Knochenmarks (Bone-marrow-stem-cells B-MSK)

### 4.6.1 Benötigte Materialien:

Tabelle 7 gibt einen Überblick über die für die Isolierung von Stammzellen des Knochenmarks benötigten Materialien

**Tabelle 7: Materialien für die Isolierung von B-MSK**

Menge	Material	Zusätzliche Information
500mL	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
50mL	FCS (Fetal- Calf- Serum) Hitzeinaktivierung 30 Minuten bei 56 °C	PAA, Pasching, Österreich
5mL	Penicillin/Streptomycin  Penicillin:10000 Einheiten/mL Streptomycin: 10mg/mL	5mL Penicillin/Streptomycin  PAA, Pasching, Österreich
	Dulbecco's PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAA, Pasching, Österreich
	Histopaque-1077	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
	15mL Falcon Tube	
	75cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche	

### 4.6.2 Durchführung:

Die zu isolierenden mesenchymalen Stammzellen (MSCs) wurden intraoperativ während der Implantation von Hüftprothesen aus dem Femurschaft entnommen. Die aus dem proximalen Femur-Markraum entnommene Probe war bei 4°C aufzubewahren und innerhalb von vier Stunden weiterzuverarbeiten.

Für die Entnahme der Patientenprobe lag eine Genehmigung durch die Ethikkommission der Technischen Universität München vor. (AZ 2033/08)

Isolierung der Stammzellen:

Je nach Dickflüssigkeit der Patientenprobe wurde diese mittels PBS verdünnt, bis sie pipettierbar war. Je nach Menge des Knochenmarks wurden entsprechend viele 15mL Falcon-Tubes vorbereitet, wobei ein Tube in der Regel 8mL Knochenmark-PBS-Suspension enthielt.

In jedes Tube wurden 5mL Histopaque-1077 vorgelegt. Auf das schräg gehaltene Tube wurden nun vorsichtig, schichtweise 8mL der Patientenprobe pipettiert. Dabei war darauf zu achten, dass sich die beiden Phasen nicht vermischten. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation für 20 Minuten bei 350g.

Nach der Zentrifugation hatten sich in der Patientenprobe entsprechend ihres Dichtgradienten verschiedene Phasen gebildet (Abbildung 6). Zur Isolierung der Stammzellen wurde die oberste Phase, die Fettschicht, mit einer Serumpipette durchstoßen. Das Interphasenzellgemisch, welches die Stammzellen enthielt, wurde so in eine 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche übertragen.

Die Zellkulturflasche wurde nun auf ein Volumen von 15mL mit dem vorbereiteten Stammzellkulturmedium aufgefüllt. Die so isolierten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 48 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel, wobei gleichzeitig die nicht adhärennten Zellen aus der Kulturflasche mit abgesaugt wurden [El-Amin et al., 2006, Robey et al., 1985].

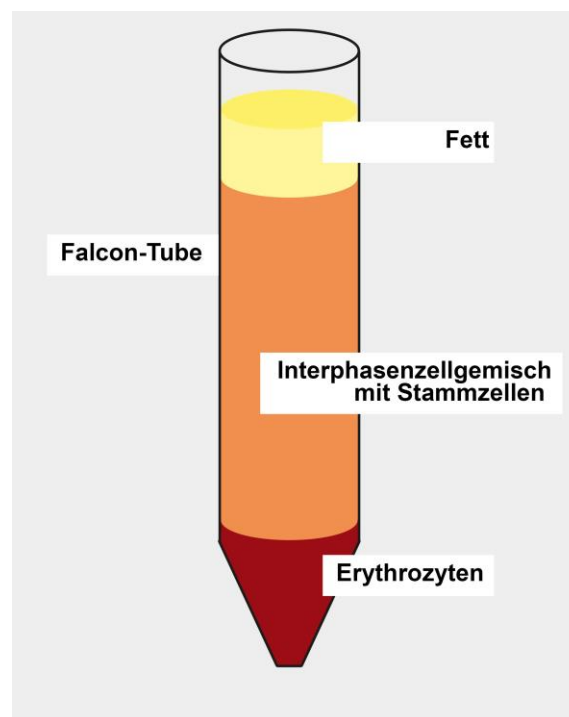


Abbildung 8: Falcon Tube mit Interphasenzellgemisch nach Zentrifugation

## 4.7 Stammzellkulturmedium:

### 4.7.1 Benötigte Materialien:

Die zur Herstellung von Stammzellkulturmedium benötigten Materialien zeigt Tabelle 8.

**Tabelle 8: Materialien zur Herstellung von Stammzellkulturmedium**

Menge	Material	Zusätzliche Information
500mL	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Storage: 2 °C – 8 °C)	PAA, Pasching, Österreich
5mL (2 x 5mL)	Penicillin/Streptomycin Penicillin: 10000 Einheiten/mL Streptomycin: 10mg/mL	PAA, Pasching, Österreich
50mL (2x50mL)	FCS (Fetal- Calf- Serum) Hitzeinaktivierung für 30 Minuten bei 56°C	PAA, Pasching, Österreich

### 4.7.2 Herstellung von 500mL Stammzellkulturmedium:

Unter sterilen Bedingungen wurden in 500mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium 5mL Penicilin/Streptomycin-Mischung - Antibiotikamischung zugegeben. Weiter wurde das Nährmedium mit 50mL FCS ergänzt. War auch dieses zugesetzt, wurde das Kulturmedium durch kurzes Schwenken der Flasche vermischt [El-Amin et al., 2006, Robey et al., 1985].

Zur Verwendung wurde das Kulturmedium im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

## 4.8 Stammzellendifferenzierungsmedium:

### 4.8.1 Benötigte Materialien:

Die benötigten Materialien für die Herstellung von Stammzellkulturmedium finden sich in Tabelle 9.

**Tabelle 9: Materialien zur Herstellung von Stammzellendifferenzierungsmedium**

Menge	Material	Zusätzliche Information
500mL	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Storage: 2 °C – 8 °C)	Sigma-Alderich, München, Deutschland
10mM Entspricht 1,08 g/500mL	β-Glycerol phosphat-disodium	Sigma-Alderich, München, Deutschland
200μM Entspricht 29,0mg/500mL	L-Ascorbat-2-Phosphat	Sigma-Alderich, München, Deutschland
12,5mM Entspricht 1,49g/ 500mL	HEPES	PAA, Pasching, Österreich
1,5mM Entspricht 0,11g/500mL	Calcium-Chloride-Dihydrate	Sigma-Alderich, München, Deutschland
5mL, 1% entspricht 5mL/500mL	FCS (Fetal- Calf- Serum) Hitzeinaktivierung 30 Minuten bei 56°C	PAA, Pasching, Österreich
5mL, entspricht 5mL/500mL	Penicillin/Streptomycin Penicillin:10.000 Einheiten/mL Streptomycin: 10mg/mL	PAA, Pasching, Österreich
5μM, entspricht 50μl/ 500mL	Cholecalciferol	Fluka - Sigma-Alderich, München, Deutschland  Cholecalciferol-Stocklösung: 19mg Cholecalciferol werden in 1mL Dimethylsulfoxid gelöst.

#### 4.8.2 Durchführung:

Herstellung von 500mL Stammzellendifferenzierungsmedium:

Auch als Ausgangsmaterial für das Stammzellendifferenzierungsmedium dienten 500mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium. Diesem wurden pro 500mL 1,08mg β-Glycerol phosphat disodium, 29mg L-Ascorbat-2-Phosphat, 1,49g HEPES sowie 0,11g CaCl<sub>2</sub> zugegeben. Zusätzlich wurde das Medium mit 5mL Penicillin/Streptomycin Mischung und 5mL FCS ergänzt. Zuletzt wurden noch 50μl

Cholecalciferol-Stocklösung hinzugefügt und das Medium durch Schwenken der Flasche vermischt [El-Amin et al., 2006, Robey et al., 1985].

## 4.9 Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

### 4.9.1 Benötigte Materialien

Tabelle 10 zeigt die zur Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen verwendeten Materialien.

**Tabelle 10: Materialien zur Kultivierung von MSC**

Menge	Material	Zusätzliche Information
	Ethanol 70%	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
	Dulbecco's PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAA, Pasching, Österreich
2,5mg/mL	Trypsin EDTA	PAA, Pasching, Österreich
	Falcon 50mL	
	Zellkulturflaschen 175cm <sup>2</sup>	PAA, Pasching, Österreich
	Stammzellkulturmedium	

### 4.9.2 Durchführung

Die Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen entsprach der von Osteoblasten.

Anstelle des Osteoblastenkulturmediums wurde jedoch spezifisches Stammzellkulturmedium verwendet.

### 4.9.3 Mediumwechsel und Passagierung

Ebenso wie bei Osteoblasten erfolgte der Mediumwechsel alle 3-5 Tage. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Passagierung der Osteoblasten. Die mesenchymalen Zellkulturen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (Abbildung 7).

## 4.10 SCP-Zellen und ihre Kultivierung

Bei der dritten kultivierten Zelllinie handelte es sich um so genannte SCP-Zellen, die uns freundlicherweise von Herrn Professor Schieker der experimentellen Unfallchirurgie der LMU München, zu Verfügung gestellt wurden [Bocker et al., 2008].

SCP-Zellen sind modifizierte Stammzellen des Knochenmarks welche mittels retroviraler Vektoren durch das telomerase reverse Transkriptasegen erweitert wurden und somit immortalisiert wurden. Unter Immortalisierung ist eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit der Zellen zu verstehen [Boker et al., 2008].

Die Kultivierung und Passagierung der SCP-Zellen erfolgte analog der Vorgehensweise bei humanen Knochenmarksstammzellen (B-MSK). Auch das verwendete Nährmedium entsprach dem der B-MSK.

## 4.11 Herstellung von Alginatbeads und Einkapselung von Zellen

Tabelle 11-17 geben eine Übersicht über die zur Herstellung, von in Alginatbeads eingekapselten Zellen, benötigten Geräte, Materialien und Lösungen.

### 4.11.1 Benötigte Materialien zur Herstellung von Beads:

#### 4.11.1.1 Technische Geräte:

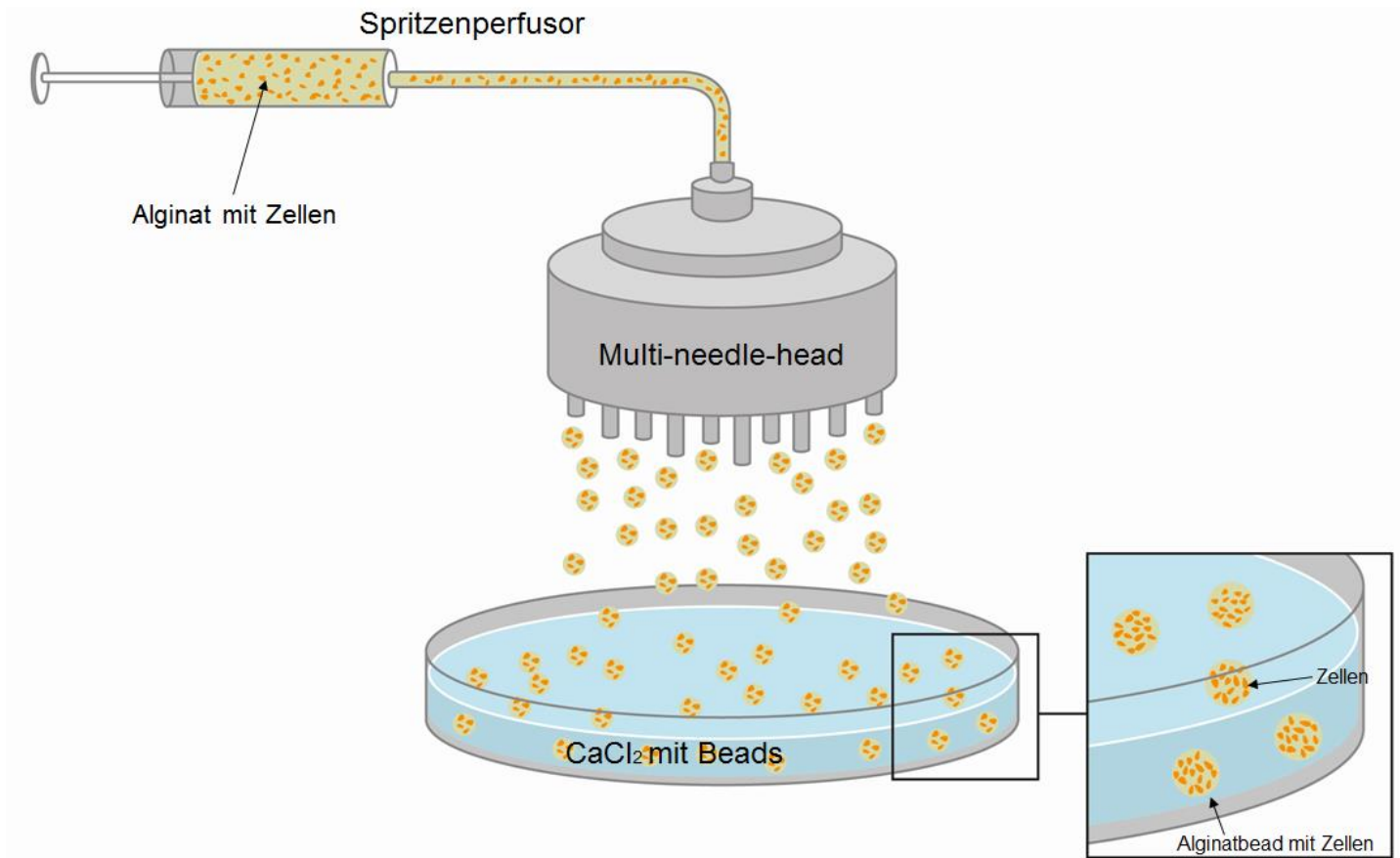
Tabelle 11: Materialien zur Herstellung von Alginatbeads

Bead-Generator
Spritzen Perfusor
Magnetrührer



Abbildung 9: Zeigt den Bead-Generator unter der Reinbank: links im Bild der Spritzenperfusor mit Spritze, die über einen Schlauch mit dem Generator verbunden ist. Rechts der Generator mit Multi-Needle-Head von welchem aus die Beads durch die Needles in die unterhalb stehende Glasschale gepresst werden.





**Abbildung 10: Schematische Darstellung des Multi-needle-head bei der Herstellung von Alginatbeads. Modifiziert nach [Xie et al., 2010]**

Abbildung 10 zeigt (von links nach rechts) die Spritze (Spritzenperfusor), mit dem darin enthaltenen Alginat und Zellen. Die Alginat-Zellen-Mischung wird durch den Multi-needle-head des Bead-Generators gedrückt, wodurch Alginatbeads mit darin eingekapselten Zellen entstehen.

#### 4.11.1.2 Zubehör:

Tabelle 12: Materialien zur Herstellung von Alginatbeads

1	10mL Spritze steril
1	Glasschale steril
	Zellkulturflaschen

#### 4.11.1.3 Lösungen:

Tabelle 13: Lösungen zur Herstellung von Alginatbeads

0,9 %ige NaCl-Lösung
CaCl <sub>2</sub> -Lösung
Alginat-Lösung
Zelldifferenzierungsmedium

#### 4.11.1.4 Benötigte Materialien zur Vorbereitung der einzukapselnden Zellen:

Tabelle 14 zeigt die für das Einkapseln der Zellen benötigten Materialien

Tabelle 14: Materialien für die Zellvorbereitung vor dem Einkapseln in Alginatbeads

Menge	Material	Zusätzliche Information
	Ethanol 70%	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
	Dulbecco's PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAA, Pasching, Österreich
2,5mg/mL	Trypsin EDTA	PAA, Pasching, Österreich
	Falcon 50mL	
	Zellkulturmedium	

#### 4.11.2 Durchführung

Die Herstellung der Alginatbeads und das Einkapseln der Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit der *Norwegian University of Science and Technology in Trondheim* in Anlehnung an die von Bruder et al. [Xie et al., 2010] beschriebene Methodik.

#### 4.11.3 Anmerkung:

Das Einkapseln der Zellen und die notwendigen Hilfsmittel sowie Lösungen mussten steril sein bzw. unter sterilen Bedingungen verarbeitet werden. Der ganze Vorgang des Einkapselns erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer sterilen Werkbank. Zusätzlich wurden die Arbeitsmaterialien mit 70%igem Ethanol gereinigt.

#### 4.11.4 Herstellung der benötigten Lösungen:

##### 4.11.4.1 1 Liter 0,9%ige NaCl-Lösung:

##### Benötigte Materialien:

Tabelle 15: Materialien zur Herstellung der NaCl - Lösung

9g/l	NaCl
	H <sub>2</sub> O

Zur Herstellung der 0,9%igen NaCl-Lösung wurden 9g Natriumchlorid abgewogen und in einem Liter Wasser gelöst (Tabelle 15).

#### 4.11.4.2 1 Liter CaCl<sub>2</sub>-Lösung:

##### Benötigte Materialien:

Tabelle 16: Materialien zur Herstellung der CaCl<sub>2</sub> - Lösung

44,1g/L	CaCl <sub>2</sub>
6,06g/L	TRIS
1 Liter	H <sub>2</sub> O

Tabelle 16 zeigt die zur Herstellung der CaCl<sub>2</sub>-benötigten Materialien.

Die CaCl<sub>2</sub> - Lösung wurde ebenfalls in einem Volumenumfang von einem Liter hergestellt. Dazu wurden 44,1g/L CaCl<sub>2</sub> in einem Liter Wasser gelöst. Hinzugefügt wurden außerdem 6,06g TRIS-Puffer. Die CaCl<sub>2</sub> - Lösung wurde mittels pH-Meter auf einen pH-Wert zwischen 7,2-7,4 kalibriert.

#### 4.11.4.3 50mL Alginatlösung:

Tabelle 17 zeigt die zur Herstellung der Alginatlösung benötigten Materialien.

Tabelle 17: Materialien zur Herstellung der Alginatlösung

Menge	Material	pH
	C <sub>final</sub> : 2%iges Alginat	
100mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
		pH: 7,2-7,4

#### 4.11.5 Vorbereitung der Zellen:

Da ungefähr 2-3 Millionen pro 1mL Alginat ( $5,1 \times 10^6$  pro 2,55mL Alginat) Zellen je Einkapseln verwendet wurden, musste die Zellzahl schon zu Beginn der Zellvorbereitung entsprechend kalkuliert werden. Zum Einkapseln wurde die Zellzahl entsprechend einer Alginatmenge von ungefähr 2mL verwendet.

Je nachdem wie viele Zellen sich in einer 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche befanden, wurden entsprechend viele Flaschen eines Spenders bereitgestellt. Aus diesen wurde

zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um sie vollständig von Medium-Überresten zu befreien.

Abhängig davon, um welche Zellart es sich handelte, wurden diese ein- oder zweimal gewaschen. (SCP-Zellen einmal, Osteoblasten und BMSC zweimal) Bei dem Waschvorgang war darauf zu achten, das PBS möglichst nicht direkt auf die Zellfläche zu pipettieren, um den Zellen nicht zu schaden. Nach einer fünfminütigen Einwirkzeit wurde das PBS abgesaugt.

Im Anschluss an den Waschvorgang wurden, ähnlich der Passagierung von Zellen, 2mL Trypsin in die Kulturflasche gefüllt, um ein Ablösen der adhären Zellen zu bewirken. Das Trypsin wurde für 3-6 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Ob sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde nach vorherigem Klopfen der Flaschen unter dem Lichtmikroskop überprüft. War dies der Fall, wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe von 8mL Zellkulturmedium pro Flasche gestoppt. Nun wurden die Zellen in 50mL Falcon-Tubes gefüllt und bei 650g für 10 Minuten zentrifugiert. Von dem so sichtbar gewordenen Zellpellet wurde der aus Trypsin und Medium bestehende Flüssigüberstand abgesaugt und durch 5 bis 15mL PBS ersetzt.

#### **4.11.6 Zellzählen**

Um sicher zu gehen, dass die richtige Anzahl an Zellen verwendet wurde, wurden diese nun mit Hilfe eines Hämozytometers gezählt. Hierfür wurden je 20µl der Zell-PBS-Lösung gemeinsam mit 20µl Trypanblau gemischt und 10µl auf beide Seiten des Hämozytometers pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen gezählt und der Durchschnitt berechnet. Waren genügend Zellen vorhanden, konnte mit der Vorbereitung für die Einkapselung fortgefahren werden: Die in PBS befindlichen Zellen wurden abermals zentrifugiert und der PBS-Überstand vom Zellpellet abgesaugt. Als letzten Schritt wurden die Zellen in 400µl PBS resuspendiert.

#### **4.11.7 Herstellung von Alginatebeads mit eingekapselten Zellen**

Vorbereitung des Bead-Generators und Bereitstellen der Instrumente:

Bevor mit der Einkapselung von Zellen bzw. der Alginatebeads begonnen werden konnte, sollte alles vorbereitet werden, um die Durchführung zu erleichtern. Zu aller erst wurde die sterile Werkbank mit 70%igem Ethanol gereinigt, um die

Wahrscheinlichkeit einer Kontamination zu limitieren. Ebenso wurde mit dem Bead-Generator, dem Spritzenperfusor und dem Magnetrührer verfahren, welche dann unter der sterilen Werkbank platziert wurden.

Nun wurde der Bead-Generator um seinen sterilen „Kopf“ (single-needle-head: 1 Nadel oder multi-needle-head: 6 Nadeln) ergänzt. In den sogenannten Kopf wurden vorsichtig die Nadeln eingebracht, um ihn dann mittels eines dünnen Plastikschauches mit der 10mL Spritze zu verbinden. (Abbildung 8 und 9)

Anschließend wurde der Magnetrührer in das bereitgestellte Glasgefäß gegeben, dieses mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gefüllt und unter dem „Head“ positioniert. Zu guter Letzt wurde der „needle-head“ auf die korrekte Höhe eingestellt.

War dies erfolgt, wurden 3600 $\mu\text{l}$  Alginate und anschließend die in 400 $\mu\text{l}$  PBS gelösten Zellen in die Spitze pipettiert und gut vermischt. Beim Pipettiervorgang entstehende Blasen waren möglichst zu vermeiden. Die Spritze konnte nun in den Spritzenperfusor eingespannt werden.

Zum Einkapseln wurde der Bead-Generator mit 700V betrieben, die Spritzenpumpe lief mit einer Geschwindigkeit von 5mL/h/Nadel, was 30mL/h bei 6 Nadeln entspricht. Sobald der Strom angeschlossen und die Geräte eingeschaltet waren, wurde die Alginate-Zell-Mischung mittels der Spritzenpumpe durch die Nadeln gepresst, wobei sich 500 $\mu\text{m}$  große Beads formten, die dann in die mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gefüllte Glasschale tropften.

War keine Alginate-Zell-Mischung mehr in der Spritze vorhanden, wurden die Geräte ausgeschaltet. Die Glasschale, in der sich nun die in Alginatebeads eingekapselten Zellen befanden, wurde allerdings noch für 20-30 Minuten auf dem Magnetrührgerät belassen, um die Beads noch weiter in Bewegung zu halten. Nach Abschalten des Magnetrührgerätes sollte die Glasschale noch 1-2 Minuten stehen, um ein Absinken der Beads an den Boden zu ermöglichen, was das nun folgende Waschen der Beads erheblich erleichterte.

Um eine Reaktion zwischen Medium und  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zu vermeiden, wurde die Lösung abgesaugt und die Beads mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Dabei wurden nach dem Absaugen der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung 100mL NaCl in das Glasgefäß gefüllt und eine Minute gewartet. Jetzt wurden 50mL NaCl abgesaugt und die in der übriggebliebenen NaCl-Lösung befindlichen Beads in ein 50mL Falcon-Tube transferiert.

Wieder wurde gewartet bis die Beads sicher an den Boden – nun des Tubes - abgesunken waren, bis dann die NaCl- Lösung abgesaugt und erneut 25mL NaCl- Lösung zugegeben wurden. Nach Abschluss des Waschvorganges wurde das NaCl ein letztes Mal abgesaugt und nun durch 25mL Zellkulturmedium ersetzt.

Als letzten Schritt wurden die sich nun in Kulturmedium befindlichen Beads in eine 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gefüllt und 250µl Gentamicin, zur Prävention einer eventuellen Kontamination, hinzugefügt. Die Beads wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Tag nach der Einkapselung erfolgte der erste Mediumwechsel, wobei von diesem Zeitpunkt an anstelle von Kulturmedium Zelldifferenzierungsmedium verwendet wurde.

#### **4.11.8 Herstellung von Alginatebeads ohne Zellen**

Die Herstellung von leeren Alginatebeads erfolgte genau wie in 4.11.6 beschrieben, nur ohne die Zellen. Die so hergestellten Beads wurden ebenfalls über einen Zeitraum von 20 Tagen in Zelldifferenzierungsmedium kultiviert und dienten als Kontrollen für die Mineralisierung der Alginatebeads.

## 4.12 Übersicht Methodik

Tabelle 18 Übersicht über die angewendeten Methoden und deren Ziel

<b>METHODEN</b>	
<b>Hellfeldlichtmikroskopie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beurteilung von Form, Größe, Anzahl und Farbe der Alginatebeads.</li> <li>• Darstellung der in die Alginatebeads eingekapselten Zellen</li> <li>• Darstellung der Mineralisierung der Alginatebeads.</li> </ul>
<b>Live-Dead-Staining</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sichtung der Überlebenden Zellen und der toten Zellen innerhalb der Alginatebeads.</li> <li>• Beurteilung von Form, Größe und Anzahl der Alginatebeads</li> </ul>
<b>Alamar-Blau-Assay (Resazurin-Umsatz)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Messung des Überlebens, der in die Alginatebeads eingekapselten Zellen mittels Resazurin-Umsatz</li> </ul>
<b>Alkalische-Phosphatase-Aktivität</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Messung der Zelldifferenzierung, der in die Alginatebeads eingekapselten Zellen</li> </ul>
<b>Graustufenanalyse der hellfeldlichtmikroskopischen Bilder</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exemplarische Darstellung der Zellmineralisierung</li> </ul>
<b>Alizarin-Rot-Färbung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Messung der Mineralisierung der Alginatebeads</li> </ul>
<b>Isolation von Ribonukleinsäure aus Alginatebeads</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analyse der Zell-RNA (entfällt)</li> </ul>

Tabelle 18 gibt einen schematischen Überblick über die im Folgenden angewendeten Methoden und deren Zielsetzung.



## **4.13 Hellfeldlichtmikroskopie**

### **4.13.1 Benötigte Materialien**

Die Lichtmikroskopie diente der Beurteilung der Beads, die dazu keiner speziellen Vorbehandlung bedurften.

Während der Arbeit mit den Beads und den Zellkulturen wurde zur reinen Beobachtung und Beurteilung ohne Dokumentation ein inverses Mikroskop der Firma Zeiss (Axiovert 40CFL) mit einer 5-, 10- und 40fachen Vergrößerung verwendet.

Zur Beurteilung und Dokumentation der Beads an bestimmten Zeitpunkten wurde ein Nikon Eclipse (TE 2000S) Mikroskop mit integriertem Kamerasystem und Lichtquelle (Nikon-Intensilight C-HGF) verwendet.

Die Beurteilung der Beads erfolgte in 4- und 10fach Vergrößerung.

### **4.13.2 Durchführung**

Die Beads wurden von uns jeweils direkt nach dem Vorgang des Einkapselns sowie an den Tagen 5, 10, 15 und 21 lichtmikroskopisch untersucht und ihr Aussehen dokumentiert.

Bei der lichtmikroskopischen Beurteilung der Beads im Verlauf wurde vor allem die Gleichmäßigkeit der Form, die Größe, die Anzahl der Zellen in den Beads sowie die Farbe der Beads untersucht.

Bezüglich der Farbe wurde besonders auf die Gleichmäßigkeit der Färbung sowie die Varianz der Farbe innerhalb eines Beads, einer Zellsorte sowie der unterschiedlichen Zelllinien geachtet [Xie et al., 2010].

## 4.14 Live-Dead-Staining

### 4.14.1 Benötigte Materialien

Die Materialien, die für das Live-Dead-Staining benötigt wurden, sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 19: Materialien für die Live-Dead-Färbung

Menge	Material	Zusätzliche Information
	Mikroskop mit angeschlossener Kamera	
	24-Well-Platte	
400µl	Dulbecco's PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAA, Pasching, Österreich
0,5µl	Calcein (Ext. ~494nm; Em. ~517nm)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
1,5µl	Ethidiumbromid (Ext. ~495nm; Em. ~635nm)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
	Leitungswasser	

### 4.14.2 Durchführung

Das Live-Dead-Staining wurde von uns an den Tagen 1, 10 und 20 zur Kontrolle der Zellviabilität in den Beads durchgeführt [Xie et al., 2010]. Im Anschluss an die Färbung erfolgte die Darstellung im Fluoreszenzmikroskop sowie die Dokumentation mittels erwähnter, an das Mikroskop angeschlossener Kamera.

Zur Durchführung der Färbung wurde mittels einer Pipette eine geringe Menge an Beads aus der Kulturflasche in ihrem Nährmedium in ein 24-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde das Nährmedium abpipettiert und es erfolgte das einmalige Waschen der Beads mit Leitungswasser. In einem weiteren Well wurde dann eine Lösung aus 400µl PBS zusammen mit 0,5µl Calcein sowie 1,5µl Ethidiumbromid vorbereitet.

Nun wurde das Leitungswasser von den Beads abpipettiert und durch die vorbereitete Lösung ersetzt. Die sich nun in der Lösung befindlichen Beads wurden

jetzt für 20 Minuten im Dunklen inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte das zweimalige Waschen der Beads mit Leitungswasser, wobei bei diesem Zug darauf geachtet wurde, dass ein Rest des Wassers in dem Well verblieb, um den Beads ein freies Schwimmen zu ermöglichen. Nach dem beschriebenen Färbevorgang erfolgte nun die Beurteilung der Zellen innerhalb der Beads.

Auch bei der Fluoreszenzmikroskopie wurde sowohl auf Größe, Form und Beschaffenheit der Beads geachtet. Des Weiteren ermöglichte sie die Bestimmung der Anzahl an lebenden sowie an toten Zellen innerhalb der einzelnen Beads. Lebende Zellen erschienen in Folge des Färbevorgangs grün, tote Zellen rot.

## 4.15 Viabilitätsmessung mittels Alamar-Blau-Assay:

### 4.15.1 Benötigte Materialien:

Tabelle 19 zeigt die für die Viabilitätsmessung mittels Alamar-Blau-Assay benötigten Materialien.

**Tabelle 20: Materialien für den Alamar-Blau-Assay**

Menge	Material	Zusätzliche Information
18µl/well	Alamar-Blau-Reagenz	Biozol, Eching, Deutschland
	96-Well-Platte	

### 4.15.2 Durchführung:

Unter sterilen Bedingungen wurden aus einer 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit Beads je 180µl Bead-Suspension entnommen und in drei Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. In weitere drei Wells wurden als Negativkontrolle je 180µl Medium ohne Beads aus

der Zellkulturflasche pipettiert. Allen, insgesamt 6 Wells, wurden jetzt 18µl Alamar-Blau-Reagenz zugesetzt und die Well-Platte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 6 Stunden inkubiert. Alamar-Blau misst mittels Resazurin-Umsatz in einer Redox-Reaktion das Zellüberleben. Dabei erfolgt der Farbumschlag des Indikators je nach Zellmetabolismus.

#### **4.15.3 Photometrische Messung**

Nach 6 Stunden Inkubation wurde die Fluoreszenz der Alamar-Blau Kinetik bei einem Extinktionsfilter von 544nm und einer Emission von 590nm mittels eines Plate-Readers gemessen.

Der hierfür verwendete Plate-Reader war ein Gerät der Marke Fluostar Ω (Omega) der Firma BMG Labtech (BmG Labtech GmbH, 77656 Offenburg) mit den Softwareprogrammen (Version 3.0) Omega-Data-Analyses und MARS Data-Analyses ebenfalls der Firma Labtech (BmG Labtech Microplate Data Analyse Software).

Um die Umrechnung in Prozent zu ermöglichen, wurde jeweils die Zahl der Zellen nach dem Einkapseln in die Alginatebeads als 100% angenommen. Dies ermöglicht den Vergleich des Zellüberlebens der verschiedenen Spenderzelllinien im Verlauf von Tag 1-21.

### **4.16 Messung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität als Marker der Zelldifferenzierung:**

#### **4.16.1 Benötigte Materialien:**

Die zur Messung der alkalischen Phosphatase-Aktivität benötigten Materialien zeigt Tabelle 20.

**Tabelle 21: Materialien zur Messung der AP-Aktivität**

Menge	Material	Zusätzliche Information
MW: 75,07g/Mol	Glycine	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MW 121,12g/Mol	TRIZMA-base	
MW 203,3g/Mol	MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
2mg	4-Nitrophenol-phosphate-disodium 4-Nitrophenyl-phosphate disodium-salt-hexahydrate/mL AP-Activity-Assay-Buffer	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
	H <sub>2</sub> O	
400µl	AP-Substrat-Stocklösung	<p>Herstellung:</p> <p>AP-Activity-Assay-Buffer:</p> <p>Herstellung:</p> <p>5,75g Glycine MW 75,07g/Mol (C<sub>final</sub>: 50mM), 12,11g TRIZMA-base MW 121,12g/Mol (C<sub>final</sub>:0,1M), 103mg MgCl<sub>2</sub> MW 203,3g/Mol (C<sub>final</sub>:1mM) werden in 1 L H<sub>2</sub>O gemischt.</p> <p>Der pH- Wert wird auf 10,5 kalibriert.</p> <p>und die Lösung mit 2mg 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate/mL AP-Activity-Assay-Buffer ins Verhältnis gesetzt.</p>

#### **4.16.2 Durchführung:**

Ebenfalls aus einer Zellkulturflasche mit Beads wurden je zwischen 150 und 200µl Bead-Suspension in drei Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Das Medium wurde abpipettiert und die Beads einmal mit Wasser gewaschen. Nun wurden pro Well 100µl AP-Substrat zugegeben. Zusätzlich dienten 100µl AP-Substrat in ein Well ohne Beads als Kontrolle.

Die 96-Well-Platte wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für mindestens 30 Minuten inkubiert, bis ein Farbumschlag sichtbar wurde. Zum Zeitpunkt des Farbumschlages wurde die Substratlösung von den Beads abgenommen und in drei neue Wells pipettiert, wo dann der Substratumsatz bzw. die Absorption gemessen werden konnten [Robey et al., 1985, Skehan et al., 1990].

Die Messung wurde von uns jeweils an den Tagen 6, 11, 16 und 21 durchgeführt.

#### **4.16.3 Photometrische Messung**

Für die photometrische Messung wurde derselbe Plate-Reader und dasselbe Programm, wie auch bei dem Alamarblau-Assay verwendet.

Für die Messung der AP-Aktivität wurde jedoch nicht die Fluoreszenz sondern die photometrische Messung des Substratumsatzes mittels Absorption bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen. Die Messung erfolgte mindestens 70 Minuten nach Substratzugabe.

#### 4.16.4 Standardkurve

Abbildung 11 zeigt die AP-Standardkurve.

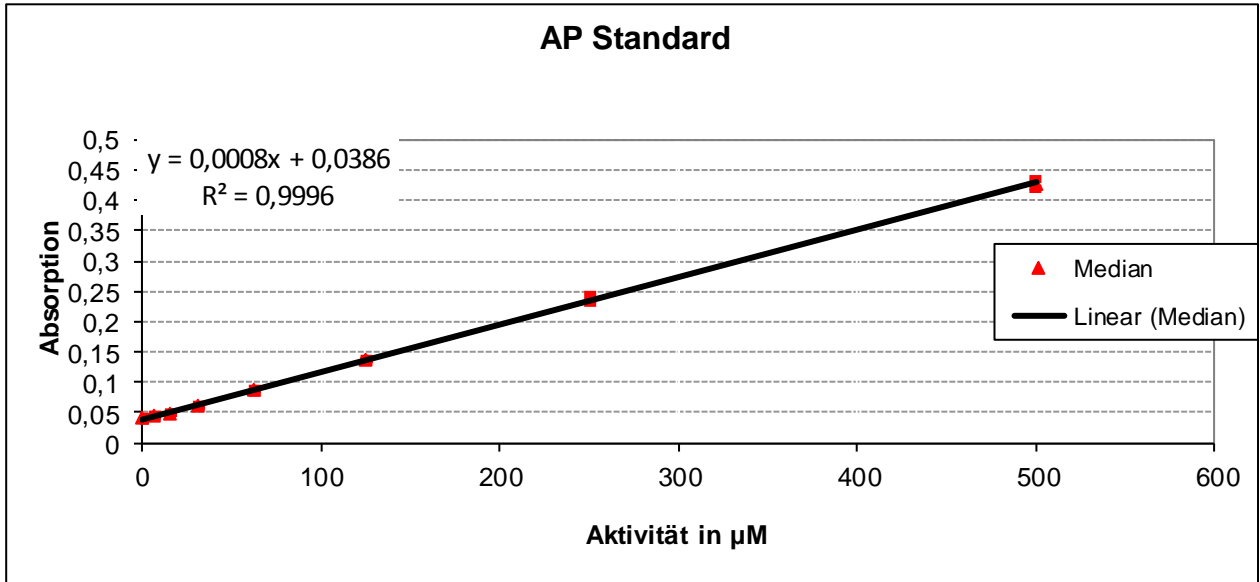


Abbildung 11: AP-Standardkurve,  $C(\text{oncentration}) = (\text{OD}-0,03497)/0,00126$  Extinktion zu Konzentration

##### 4.16.4.1 Pipettierschema Standardkurve AP

Abbildung 12 sowie Tabelle 21 zeigen das Pipettierschema der AP- Standardkurve.

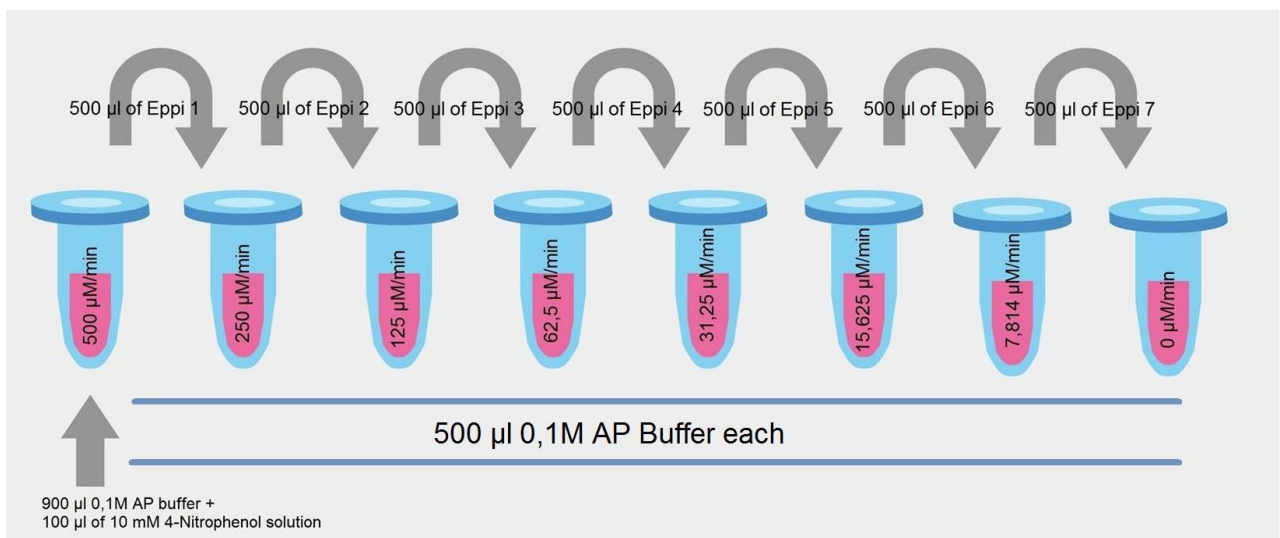


Abbildung 12: Pipettierschema der AP-Standardkurve

**Tabelle 22: Pipettierschema der AP-Standardkurve**

Standard	Substratkonzentration ( $\mu\text{M}$ )	AP-Reaktionspuffer ( $\mu\text{l}$ )	4-pNp-Lösung ( $\mu\text{l}$ )
1	500	450	50
2	250	250	250 von Standard 1
3	125	250	250 von Standard 2
4	62,5	250	250 von Standard 3
5	31,25	250	250 von Standard 4
6	15,625	250	250 von Standard 5
7	7,812	250	250 von Standard 6
8	0	500	0

#### **4.16.4.2 Durchführung: Pipettieren der Standardkurve:**

Das Pipettieren der Standardkurve (Abbildung 11) erfolgte mittels serieller 1:2 Verdünnung bei einer Maximalkonzentration von  $500\mu\text{M}$  (Abbildung 12, Tabelle 21). Die Standardkurve wurde mittels Excel in einem Punktdiagramm dargestellt. Die y-Werte der Graphik entsprechen der Absorption, die auf der x-Achse aufgetragenen Werte der Aktivität in  $\mu\text{M}$ . Die Punkte wurden mittels einer Ausgleichsgerade  $y = kx + d$  verbunden.

#### **4.17 Quantifizierung der hellfeldlichtmikroskopischen Bilder mittels Graustufenanalyse**

Die Graustufenanalyse diente der Quantifizierung der hellfeldlichtmikroskopischen Bilder. Hierbei sollte die in den lichtmikroskopischen Bildern bräunlich erscheinende Mineralisierung der Alginatbeads (siehe Abbildung 14, vergleiche Kapitel 4.13 und 5.1) quantifiziert und graphisch dargestellt werden.

Zur Auswertung beziehungsweise genaueren Analyse der mittels Hellfeldlichtmikroskop gefertigten und mit einer Kamera dokumentierten Bilder, wurden diese erst mit Hilfe des *Programmes BZ-II-Analyzer.INK* monochrom in ihr



Negativ konvertiert (siehe Abbildung 15). Somit ließ sich der Hell-Dunkel-Kontrast der Bilder optimieren und die Mineralisierungszunahme quantifizieren. Mineralisierte Alginatbeads bzw. Areale erschienen nun hell bis weißlich.

Mittels Auswahlwerkzeug wurden die dargestellten Beads eingekreist und gezählt. Die sich somit ergebende Hellfärbung der Fläche (*arbitrary units*) wurde durch das Programm *ImageJ* ausgewertet. So konnte die Intensität der Helligkeit (*Integrated Density*) in Verhältnis entweder zur Zahl der Beads oder zur Größe der Fläche gesetzt werden.

Zur graphischen Darstellung wurden die Messwerte der *Integrated Density* in Verhältnis zur Fläche gesetzt.

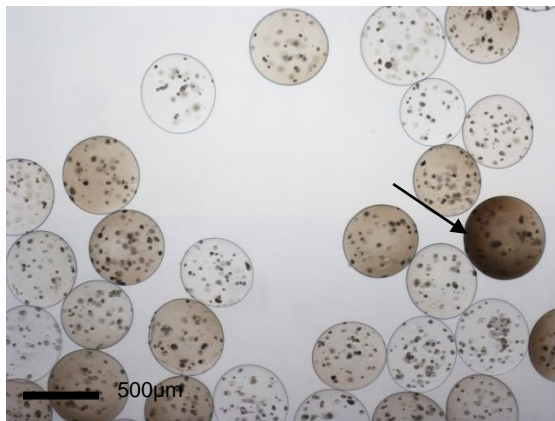


Abbildung 13

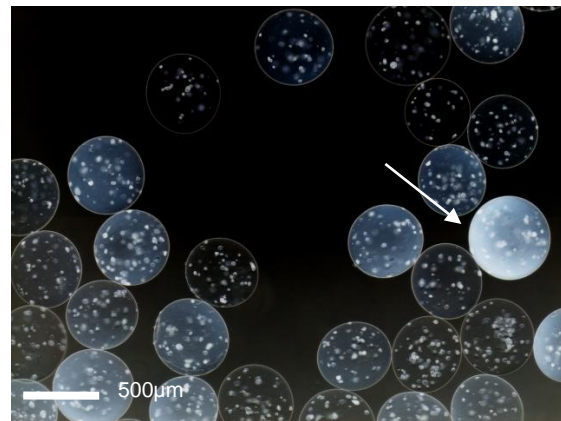


Abbildung 14

**Abbildung 13 und 14:** Vergleich hellfeldlichtmikroskopische Aufnahme (13) und für Graustufenanalyse konvertiertes Bild (14). In der Hellfeldlichtmikroskopie kommen mineralisierte Bereiche in den Alginatbeads bräunlich zur Darstellung (siehe Pfeil Abbildung 13). In dem monochrom konvertierten Bild erscheinen mineralisierte Areale hellgrau bis weiß (siehe Pfeil Abbildung 14).

## 4.18 Alizarin-Rot-Färbung

Zum Nachweis des Differenzierungsgrades der Zellen wurde eine Korrelation mit der Mineralisierung der Alginatbeads angenommen. Die Alizarin-Rot-Färbemethode basiert auf der Vorgehensweise, die bereits 1958 von McGee Russel und 1994 von Stanford et al beschrieben wurde [Mc, 1958], [Stanford et al., 1995].

### 4.18.1 Benötigte Materialien:

Die für die Alizarin-Rot-Färbung (ARS-Färbung) benötigten Materialien zeigt Tabelle 22.

Tabelle 23: Materialien für die ARS-Färbung

Menge	Material	Zusätzliche Information
0,5%ige	Alizarin Rot-Färbe-Lösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland  Herstellung: 500mg Alizarin Rot S (MW 342,3 g/mol) werden in 100mL H <sub>2</sub> O gelöst. (C <sub>final</sub> : 10mM) Der pH wird auf 4,0 kalibriert.
10%ige	Cetylpyridinium Chlorid Lösung mit EDTA	Herstellung: 10g Cetylpyridinium Chlorid werden in 10mL 0,5M EDTA-Lösung 50mM und 90mL dH <sub>2</sub> O gelöst.
98%iges	Ethanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
Leitungswasser		
	96-Well-Platte	
	50mL Falcon-Tubes	

#### **4.18.2 Durchführung:**

Aus einer mit Beads und Medium gefüllten 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen 1-2mL Bead-Suspension entnommen und in ein 50mL Falcon gefüllt. Je nachdem wie viele Beads sich in der Suspension befanden, wurden je zwischen 100 und 200µl der Suspension in je 3 Wells einer 96-Well-Platte pipettiert.

Mit Hilfe einer 200µl Pipette wurde das Medium aus den Wells abpipettiert, wobei drauf zu achten war, die Beads nicht auch zu verwerfen, die folgend einmal mit Leitungswasser gewaschen wurden. Die Alginatbeads wurden nun eine Stunde lang in 98%igem Ethanol bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurden sie zwei weitere Male mit Leitungswasser gewaschen und dann für 30 Minuten in 200µl Alizarin Rot-Färbelösung inkubiert. Die Inkubation sollte bei Raumtemperatur auf einem Schwenkinkubator erfolgen. Nach Inkubation wurde die Färbelösung abgenommen und die Beads mindestens vier Mal mit Leitungswasser gewaschen um noch mögliche Färbeüberstände zu beseitigen. Unter dem Lichtmikroskop erfolgte nun die Bestimmung der Zahl der Beads pro Well.

Anschließend wurden die Beads in 100µl vorgewärmter Cetylpyridinium Chlorid-Lösung für 3-4 Stunden auf einem Schwenkinkubator inkubiert.

War die Alizarin Rot-Farbe aus den zuvor gefärbten Beads extrahiert, wurde die nun „gefärbte“ Cetylpyridinium Chlorid-Lösung von den Beads getrennt in drei neue Wells der 96-Wellplatte pipettiert um die Absorption zu messen [Xie et al., 2010].

#### **4.18.3 Photometrische Messung**

Auch für die photometrische Messung der Absorption der Alizarin-Rot-Färbung wurde dasselbe Gerät verwendet, welches auch zur Messung des Resazurinumsatzes und der AP-Kinetik verwendet wurde.

Im Fall der Alizarin Rot-Absorptionsmessung wurde eine Wellenlänge von 562nm verwendet.

#### 4.18.4 Alizarin Rot-Standardkurve

Abbildung 13 zeigt die Alizarin Rot-Standardkurve, Tabelle 23 das zugehörige Pipettierschema.

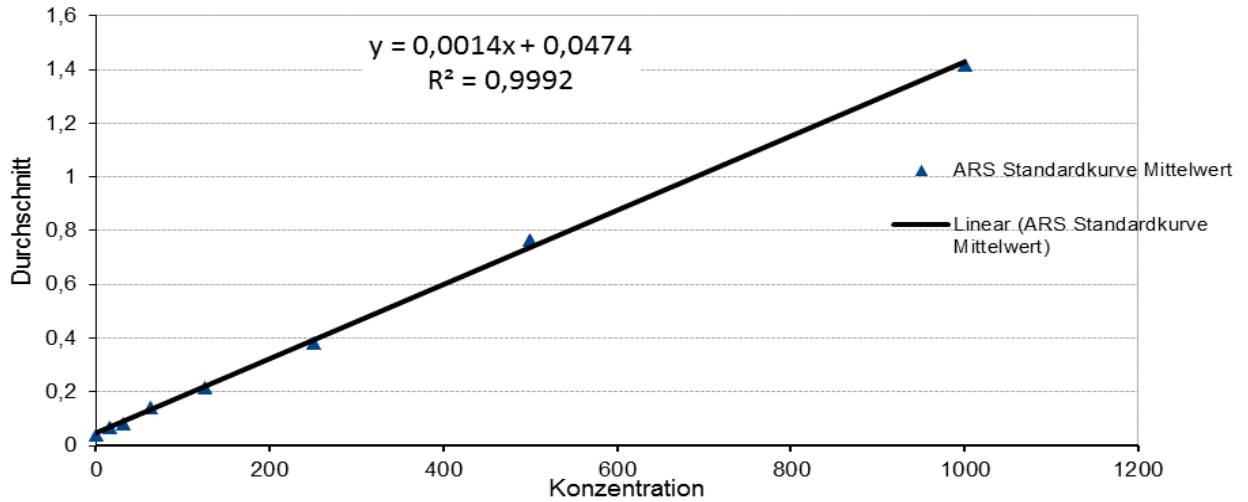


Abbildung 15: Alizarin-Rot-Standardkurve,  $C(\text{oncentration}) = (\text{OD} - 0,0801) / 0,00251$ , (Extinktion (OD) zu Konzentration (C))

##### 4.18.4.1 Pipettierschema für die Alizarin Rot-Standardkurve:

Tabelle 24: Pipettierschema für die Alizarin Rot Staining (ARS)-Standardkurve

Standard	C <sub>final</sub> (µM)	Alizarin red stock (µl)	10% Cetylpyridinium chloride (µl)
1	1000	68,4	931,6
2	500	500 (µl) von Standard 1	500
3	250	500 (µl) von Standard 2	500
4	125	500 (µl) von Standard 3	500
5	62,5	500 (µl) von Standard 4	500
6	31,25	500 (µl) von Standard 5	500
7	15,63	500 (µl) von Standard 6	500
8	0	0	1000

#### **4.18.4.2 Durchführung Pipettieren der Standardkurve:**

Der Blindwert der Messungen entspricht hierbei Standard 1. Hiervon ausgehend kann jedem gemessenen Extinktionswert eine spezifische Alizarin Rot-Konzentration zugeordnet werden (Tabelle 23).

Die Standardkurve (Abbildung 13) wurde mittels Excel in einem Punktdiagramm dargestellt, wobei die Extinktion auf der y-Achse und die Konzentration auf der x-Achse aufgetragen wurden. Die Punkte wurden mittels einer Ausgleichsgerade  $y = kx + d$  verbunden.

## 4.19 Isolation von Ribonukleinsäure aus in Alginatbeads eingekapselten Zellen in zwei Schritten:

### 4.19.1 Schritt 1: Herauslösen der Zellen aus den Alginatbeads

Die zum Herauslösen der Zellen aus den Alginatbeads benötigten Materialien und Lösungen sind in Tabelle 24 und 25 aufgelistet.

#### 4.19.1.1 Benötigte Materialien:

Tabelle 24 gibt eine Übersicht über die zur Lösung der Zellen aus den Aliginatbeads benötigten Materialien und Lösungen.

**Tabelle 25: Materialien zum Lösen der Zellen aus den Alginatbeads**

Menge	Material	Zusätzliche Information
	50mL Falcon Tube	
25mL	Citrat-Lösung	
	Dulbecco's PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAA, Pasching, Österreich
500µl	Trizol (TriFast)	Peqlab, Erlangen, Deutschland

#### 4.19.1.2 Durchführung: Herstellung der Citratlösung:

##### Benötigte Materialien:

Die für die Herstellung der Citratlösung benötigten Materialien zeigt Tabelle 25.

Tabelle 26: Materialien zur Herstellung der Citratlösung

Menge	Material	Zusätzliche Information
	Diethylpyrocarbonat (DEPC) -Water	Herstellung: 0,5mL DEPC werden zu einem Liter sterilem Wasser (B. Braun) zugegeben und für eine Stunde bei 37°C in ein Wasserbad gestellt und im Anschluss autoklaviert.
50mM entspricht 12,9g/l	Citric acid (Natriumcitrat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
77mM entspricht 4,5g/l	NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
10mM entspricht 2,38g/l	HEPES	PAA, Pasching, Österreich

Zur Herstellung eines Liters der Citratlösung wurden 12,9g Zitronensäure, 4,5g Natriumchlorid und 2,38g HEPES in dem zuvor hergestellten DEPC-Wasser gelöst. Der pH wurde auf 7,2-7,4 justiert. Anschließend wurde die so hergestellte Citratlösung steril gefiltert.

#### 4.19.1.3 Berechnung der benötigten Menge an Beads

Von der Ausgangsmenge der eingekapselten Zellen X ausgehend wurde berechnet: X Zellen befanden sich eingekapselt in 25mL Medium. 10% dieser Zellen wurden für die RNA-Isolation an Tag 1 benötigt. Dies entsprach 2,5mL Beadsuspension. Für die weiteren Tage der RNA-Isolation wurde die bereits entnommene Menge Zellen bzw. Beads von der für Tag 1 berechneten abgezogen.

Die ausgerechnete Menge an Bead-Suspension wurde aus der entsprechenden 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche entnommen und in ein 50mL Falcon-Tube gefüllt. War dies erfolgt, wurde gewartet, bis die Beads am Boden des Falcons abgesunken waren und dann das Medium abgesaugt. Nun wurden die Beads mit 25mL PBS gewaschen.

#### 4.19.1.4 Isolierung der Zellen aus den Alginatbeads:

Das im Rahmen des Waschvorganges zugegebene PBS wurde abgesaugt und durch 25mL Citrat-Lösung ersetzt. Die Beads wurden jetzt für bis zu 20 Minuten auf einem Schwenkinkubator inkubiert, bis sich das Alginat vollständig aufgelöst hatte.

Waren unter dem Lichtmikroskop keine Beads in dem Falcon-Tube mehr sichtbar, wurde die Citrat-Alginat-Zell-Lösung für 10 Minuten bei 650g zentrifugiert, wodurch sich die Zellen als Pellet am Boden des Tubes absetzten. Der Flüssigüberstand wurde abgesaugt, 25mL PBS zugegeben und nochmals zentrifugiert. Wieder wurde der Flüssigüberstand von dem kaum sichtbaren Pellet abgesaugt und dem Pellet 500µl Trizol zugegeben. Das Trizol-Pellet-Gemisch wurde nun in ein 2mL Eppendorf Gefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C tiefgefroren.

#### 4.19.2 Schritt 2: Isolierung der RNA

Anmerkung: Die Isolierung der RNA aus den Zellen erfolgte mittel TriFast (Peqlab, Erlangen, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben.

##### 4.19.2.1 Benötigte Materialien:

Tabelle 26 zeigt die zur Isolation von RNA aus den Alginatbeads verwendeten Materialien.

Tabelle 27: Materialien für die Isolation von RNA aus den Alginatbeads

Menge	Material	Zusätzliche Information
	Crushed-Eis	
	Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
100µl/500µl	Trizol	Peqlab, Erlangen, Deutschland
250µl/ Probe	Isopropanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
70%iges	Ethanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
	DEPC-Wasser	Siehe Herstellung der Citrat-Lösung



#### **4.19.2.2 Durchführung der RNA-Isolierung**

Die RNA-Proben wurden auf Crushed-Eis gelagert aufgetaut. Pro 500µl zuvor zugegebenes Trizol wurden nun 100µl Chloroform in das Eppendorfgefäß mit der zu isolierenden RNA gefüllt und die Probe für 15 Sekunden vorsichtig gevortext. Nach 10 bis 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Probe bei 4°C und 14000xg für 10 Minuten zentrifugiert. Währenddessen sollte ein neues, mit 250µl Isopropanol gefülltes Eppendorfgefäß vorbereitet werden. Nach der Zentrifugierung sah man in der Probe zwei bis drei Phasen, wovon die Oberste die RNA enthielt. Diese wurde nun vorsichtig in das vorbereitete Isopropanol pipettiert. Gut vermischt wurde die Probe dann wieder für mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert. Hiernach erfolgte die zweite Zentrifugation bei 4°C und 14000 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert, das RNA Pellet mit 1mL 70%igen Ethanol gewaschen und die Probe erneut zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden sowohl der Waschvorgang mit Ethanol als auch die Zentrifugation abermals wiederholt. Nach der vierten Zentrifugation wurde das RNA Pellet in 30µl DEPC Wasser resuspendiert. Das Eppendorfgefäß wurde schlussendlich für 10 bis 15 Minuten offen auf Eis inkubiert damit Überreste des Ethanol verdampfen konnten.

#### **4.19.3 Bestimmung der RNA Menge und Reinheit**

Zur photometrischen Bestimmung der RNA Menge und Reinheit wurde ein NanoDrop verwendet. Als erstes wurde der Blindwert des verwendeten DEPC-Wasser bestimmt, welchen das Gerät bei der Messung dann automatisch verrechnete. Zur Messung wurden 2µl der Probe (RNA-DEPC-Wasser-Mischung) auf den Photometer pipettiert und dann die Messung gestartet. Geeicht wurde das Gerät mit reinem DEPC-Wasser. Die Bestimmung des Absorptionsverhältnisses erfolgte bei einer Wellenlänge von 230nm und 260nm Wellenlänge, die Überprüfung der RNA-Reinheit bei 280nm Wellenlänge. 230nm entsprachen der Wellenlänge, welche die Verunreinigung der Probe durch Phenole, 280nm der Wellenlänge, welche die Verunreinigung durch Proteine maß. Die Quantifizierung der RNA erfolgte bei 260nm Wellenlänge.

Um zu überprüfen, ob ausreichend RNA ohne Verunreinigung vorhanden war, wurden die Quotienten 260/280 und 230/280 gemessen, welche Werte zwischen 1,8-2 annehmen sollten.

#### 4.19.4 Test der RNA auf Integrität:

##### 4.19.4.1 Benötigte Materialien:

Zum Testen der Integrität der RNA wurden die in Tabelle 27 aufgelisteten Materialien verwendet.

**Tabelle 28: Materialien für den Test auf die Integrität der RNA**

Menge	Material	Zusätzliche Information
	DEPC-Wasser	
1,5g	Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland
100mL	TBE	
7µl	Ethidium Bromid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
5µl/ Probe	PCR loading Puffer	
1µl	DNA - Größen – Marker	

##### 4.19.4.2 Durchführung: Integritäts-Testung

Vorbereitung des RNA-Agarose-Gels:

Zur Herstellung des Agarose-Gels wurden in einer Glasflasche 1,5g Agarose in 100mL TBE gelöst und anschließend in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Mit Hilfe eines Gummihandschuhs wurde die Flasche aus der Mikrowelle genommen und 7µl Ethidium-Bromid hinzugegeben. Durch vorsichtiges Schwenken der Flasche wurde das Ganze vermischt und in eine mit Gelkammerrechen vorbereitete Gelkammer gegossen. Hierbei war darauf zu achten, dass keine Blasen entstanden.

#### 4.19.5 Überprüfung der Intaktheit der RNA:

Mittels der photometrischen Bestimmung der RNA-Menge wurde der RNA-Gehalt der Probe berechnet. Für die Überprüfung der Intaktheit der RNA auf dem Agarosegel wurden 300ng RNA benötigt. Für die Bestimmung der benötigten Menge wurden die mittels NanoDrop gemessenen Werte verwendet und mittels der Formel:

RNA-Menge C =  $E_{260nm}$  x Verdünnungsfaktor x (40) µg/µl berechnet.

Für die Bestimmung der RNA von mehreren Proben wurde das größte Volumen genommen und die Proben durch entsprechende Verdünnung mit DEPC-Wasser auf gleiches Volumen gebracht.

Nun wurden 5 - 10µl PCR Ladepuffer zugegeben. Die Mischung wurde dann in komplett von TBE-Puffer umgebenes Agarosegel pipettiert. Als Kontrolle wurde 1-1,5µl DNA-Größen-Marker (pUC 19) in die erste Tasche des Gels pipettiert.

Für 30 - 40 Minuten wurde das Ganze nun einer Gleichspannung von 90 - 120V ausgesetzt, wodurch eine Aufteilung der RNA-Abschnitte entsprechend ihrer Größe erfolgte. Als Referenz diente hierbei der Größenmarker.

Beim Laufen der Proben in Richtung Positivpol interkalierte so das Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren der RNA. Unter UV-Licht wurden so die RNA-Banden sichtbar.

Die Fotodokumentation erfolgte mittels *Gel-Doc Systems*.

## **4.20 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Microsoftprogramms Excel sowie des Statistikprogramms SigmaStat und der „*One-way Anova*“ Datenanalyse.

Ausgewertet wurden dabei sowohl die Werte der Alizarin-Rot-Messungen, sowie auch die des Resazurin-Umsatzes und der AP-Kinetik.

Für die statistische Datenanalyse wurden ausschließlich Rohdaten verwendet.

### **4.20.1 statistische Testverfahren**

Entsprechend der Datenart kamen verschiedene statistische Testverfahren zur Anwendung.

Primär wurden die Daten mittels *One-Way Analysis of Variance* auf ihre Normalverteilung getestet, wobei als Signifikanzniveau  $P < 0,05$  angenommen wurde.

Waren die Daten normal verteilt, erfolgte die weitere Auswertung mittels des *Equal Variance Test*.

Entsprachen die Ergebnisverteilung nicht einer Gaußschen Verteilungskurve, erfolgte die weitere Datenauswertung mittels des *Kruskal-Wallis One-Way Analysis of*

*Variance on Ranks Test* oder der *Student-Newman-Keuls-Methode*. Bei fehlender Normalverteilung und Hinweisen auf eine Signifikanz der Datenlage erfolgte die weitere Testung paarweise mit der *Dunn's Methode*.

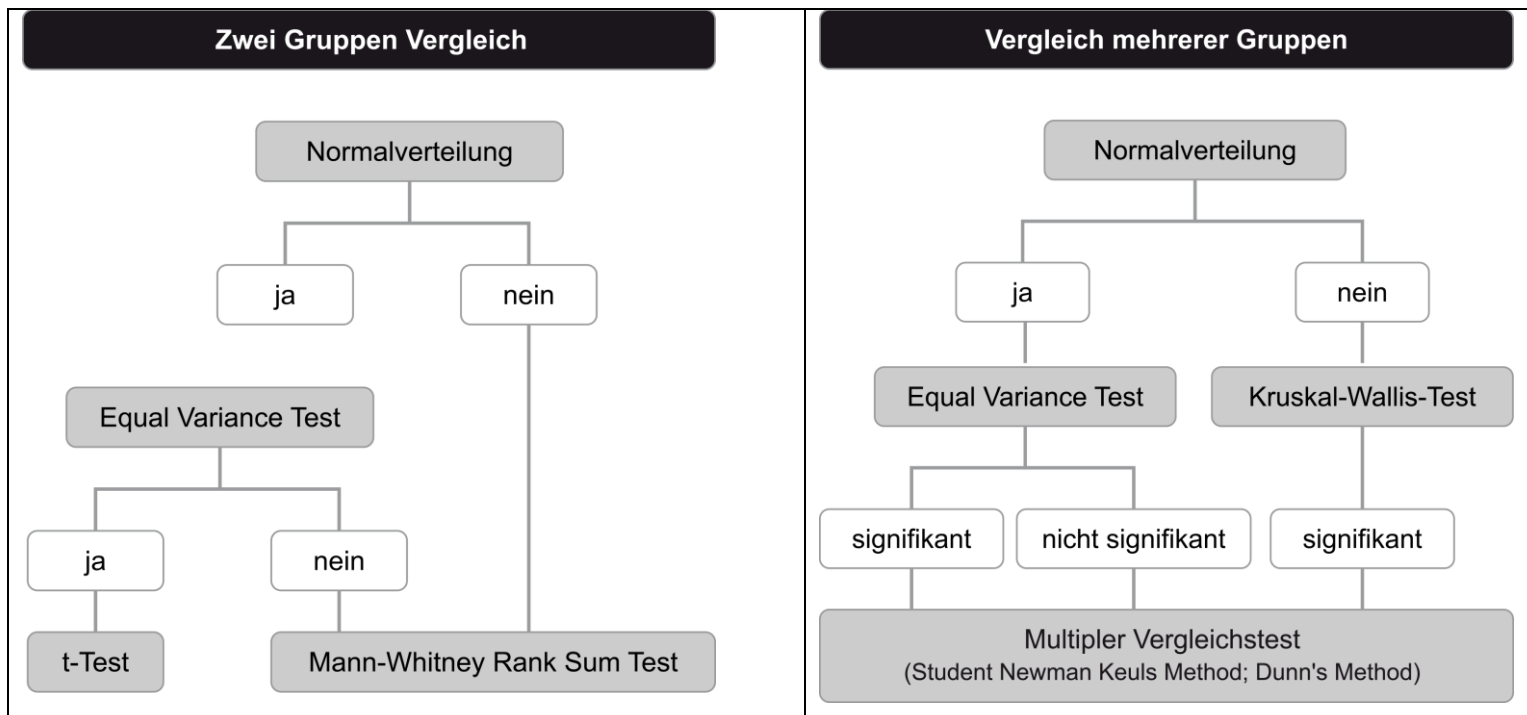
Für den paarweisen Vergleich zweier unterschiedlicher Tage wurde der *t-test*, für den Vergleich zweier Zelllinien gegeneinander, der *Mann-Whitney-Rank-Sum-Test* angewandt.

Analysiert wurden die erhobenen Messungen der Viabilität mittels Alamar-Blau, der Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie der Alizarin-Rot-Färbung.

Die graphische Darstellung der Daten zur Verlaufsübersicht erfolgte mit Excel.

Tabelle 28 gibt eine Übersicht der statistischen Testverfahren und deren Anwendung.

**Tabelle 29: Schematische Darstellung der statistischen Testverfahren**



#### 4.20.2 Spenderzahlen

Für alle Durchgeführten Untersuchungen wurden je Spender, 3 Messungen durchgeführt.

##### a) Alamar-Blau:

Im Fall der Alamar-Blau-Messungen galt für die Osteoblasten  $N= 6$  Spender bei 18 Messwerten, für die B-MS-C-Zellen  $N= 4$  bei 12 Messungen, die SCP-Zellen zeigten eine Spenderanzahl von  $N = 5$ , bei einer Variabilität zwischen 12 und 18 Messungen.

##### b) AP-Kinetik:

Ähnliche Werte zeigten sich auch bei der Auswertung der Messungen der AP-Kinetik. Hierbei fand sich für die Osteoblasten durchschnittlich  $N = 5$  Spender mit einer Variabilität zwischen 12 und 15 Messungen, für die BMSC galt  $N= 4$ , mit 12 Messungen und die SCP-Zellen variierten zwischen 15 und 18 Messungen, bei durchschnittlich  $N = 6$  Spendern.

##### c) Alizarin-Rot:

Bei der Auswertung der Alizarin-Rot-Statistik variierte die Zahl der Messungen zwischen 15 und 18 Messwerten, bei durchschnittlich  $N = 6$  Spendern. Für die BMSC wurden zwischen 12 und 15 Messungen, bei mehrheitlich  $N = 4$  Spendern, für die SCP 18 Messungen, bei einer Spenderzahl von  $N = 6$ , verwendet.

Für die Kontrollen entsprach  $N$  jeweils 3 Spendern bei 9 Messungen.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Beurteilung der Alginatebeads mittels Hellfeldlichtmikroskopie

Die in Abbildung 16-30 dargestellten Bilder zeigen den lichtmikroskopisch festgehaltenen Verlauf der Alginatebeads und der, in diese eingekapselten Zellen jeweils an Tag 1, 5, 15 und 21. Dabei stellten sich die Alginatebeads als kugelige Strukturen mit einer durchschnittlichen Größe von 500µm da. Deutlich zu erkennen ist jedoch, dass sowohl Form als auch Größe der einzelnen Beads minimal variierte (siehe Abbildung 16-30). Die eingekapselten Zellen können als dunkle Punkte in den Alginatebeads erkannt werden, wobei eine genauere Beurteilung der Zellen mittels Hellfeldlichtmikroskopie nicht möglich ist. Im Vergleich der Alginatebeads der verschiedenen Zelllinien fällt auf, dass die Beads, in welche die B-MSC eingekapselt wurden im Durchschnitt geringfügig größer erscheinen. Die Anzahl der Beads variiert je Bild, es lässt sich allerdings feststellen dass die Anzahl der Alginatebeads aller Zelllinien im Verlauf der 21 Tage Kultivierungszeit abnehmen.

Bezüglich der Färbung der Alginatebeads ist bei den Beads aller drei Zelllinien ein deutlicher Unterschied im Verlauf der 21 Tage zu erkennen. Die initial durchsichtig erscheinenden Alginatebeads färben sich während ihrer Kultivierungszeit bräunlich bis dunkelbraun. Während die Zunahme der Braunfärbung bei den B-MSC am deutlichsten erkennbar ist, zeigt sich bei den Osteoblasten im Verhältnis ein eher geringerer Kontrast. Die Färbung der Beads mit SCP-Zellen variiert dazwischen, wobei zu erwähnen ist, dass besonders die Färbung der Beads mit SCP-Zellen starken, spenderabhängigen Schwankungen unterworfen war.

Im Rahmen der Beurteilung des Färbungsverhaltens der Alginatebeads sei hier erwähnt, dass eine Zunahme der Braunfärbung auch einer Zunahme der Mineralisierung der Beads entspricht, und auf Kapitel 5.5 verwiesen.

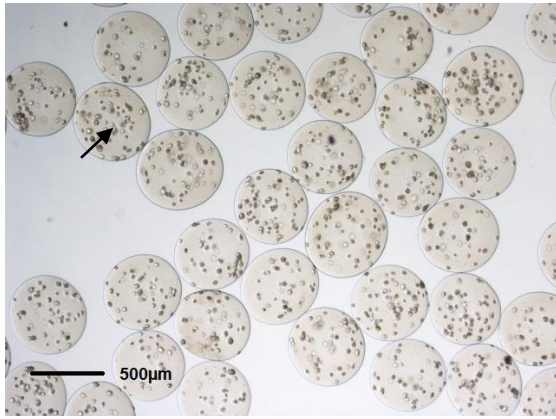


Abbildung 16: OSÜ Tag 0

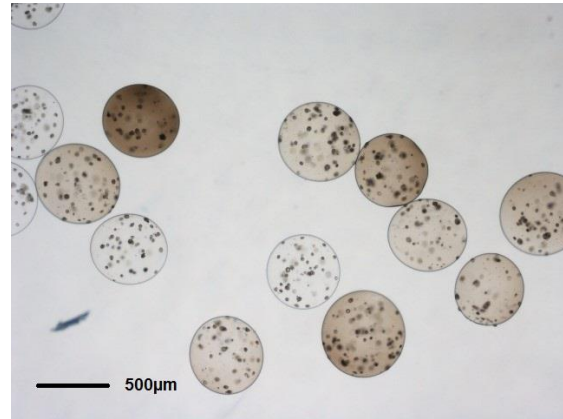


Abbildung 17: OSÜ Tag 5

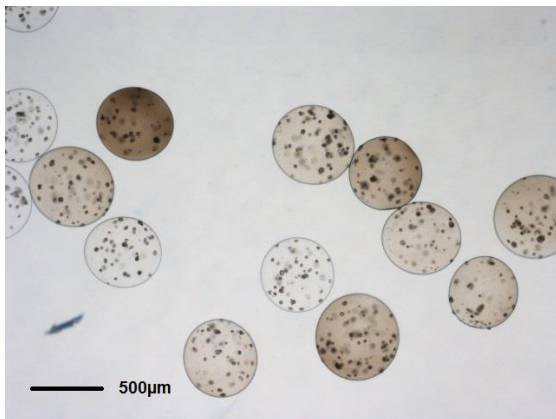


Abbildung 18: OSÜ Tag 10

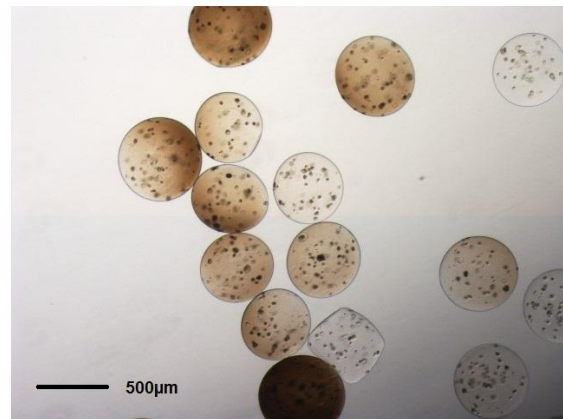


Abbildung 19: OSÜ Tag 15

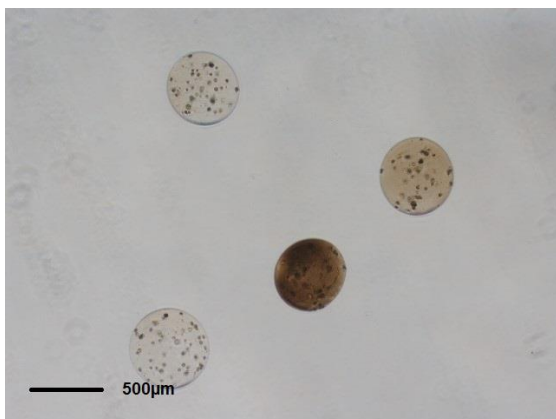


Abbildung 20: OSÜ Tag 21

Abbildung 16-20 zeigen den lichtmikroskopischen Verlauf der Alginatebeads mit eingekapselten Osteoblasten (siehe Pfeil Abb. 16). Zu erkennen ist die geringfügig unterschiedliche Größe der Beads (durchschnittlich 500µm) sowie die Zunahme der Braunfärbung (entsprechend der Mineralisierung) der Beads im Verlauf der Kultivierungszeit. Festzustellen ist insgesamt eine Zunahme der Mineralisierung, mit jedoch heterogenem Verlauf, die einzelnen Alginatebeads betreffend.

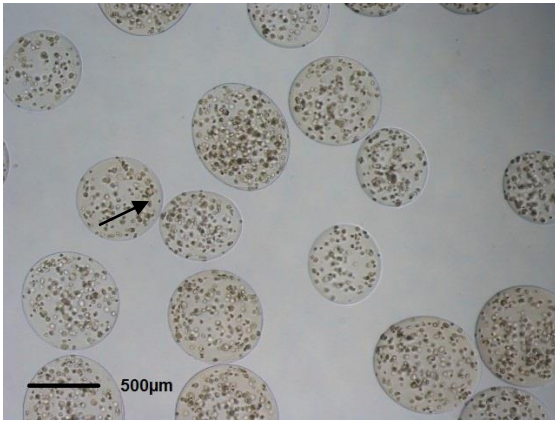


Abbildung 21: BMSC 130 Tag 0

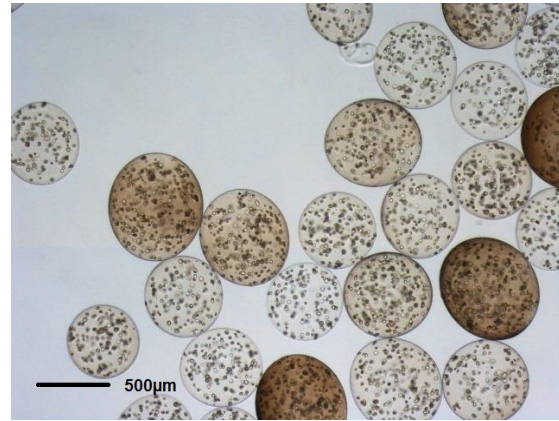


Abbildung 22: BMSC 130 Tag 5

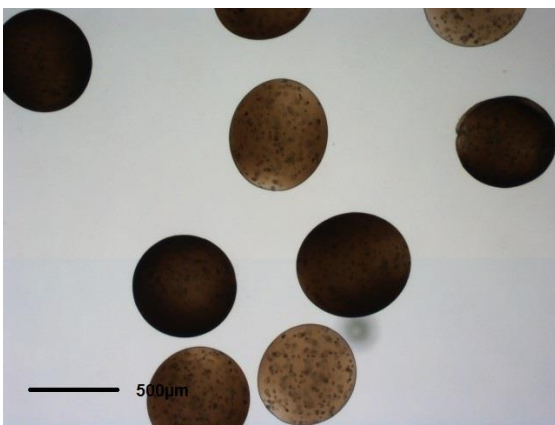


Abbildung 23: BMSC 130 Tag 10

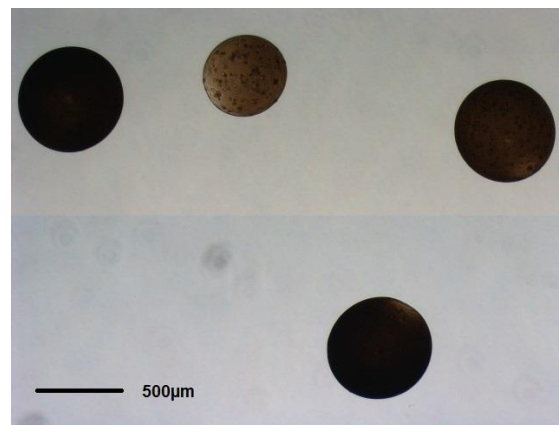


Abbildung 24: BMSC Tag 15

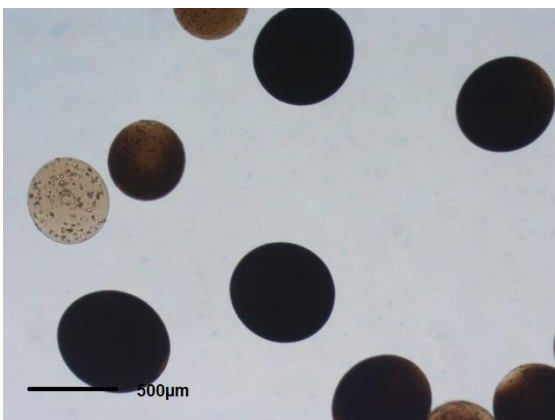
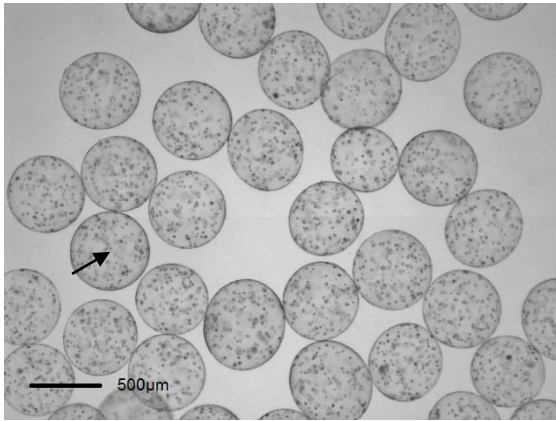


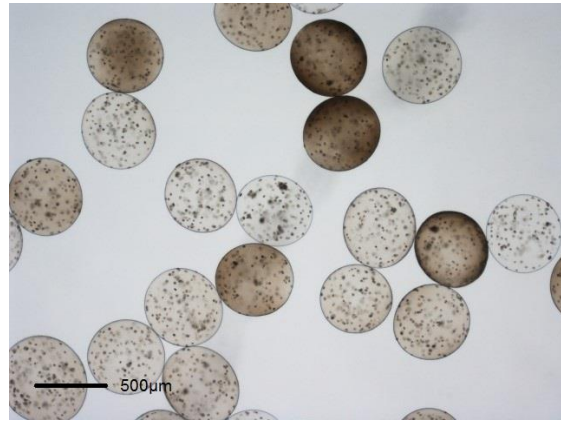
Abbildung 25: BMSC 130 Tag 21

Abbildung 21-25 zeigen den Verlauf der Alginatebeads mit eingekapselte B-MSC (siehe Pfeil Abb. 21). Auch hier variiert die Größe der Beads geringfügig, wobei sie durchschnittlich geringfügig größer als die Beads mit eingekapselten Osteoblasten oder SCP-Zellen erscheinen (Vergl. Abb 16-20 und Abb. 26-30). Deutlich zu erkennen die im Vergleich zu den Alginatebeads mit eingekapselten Osteoblasten, verehrte Braunfärbung der Beads, welche ihrer Mineralisierung entspricht.

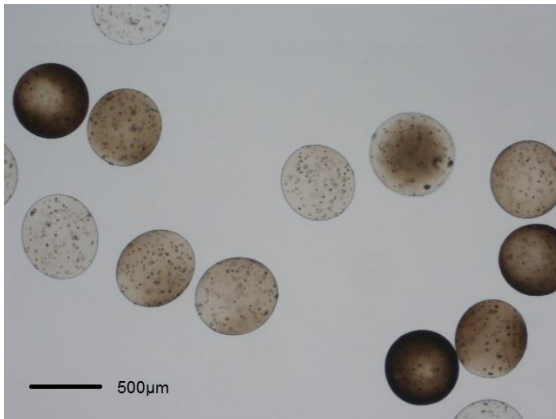




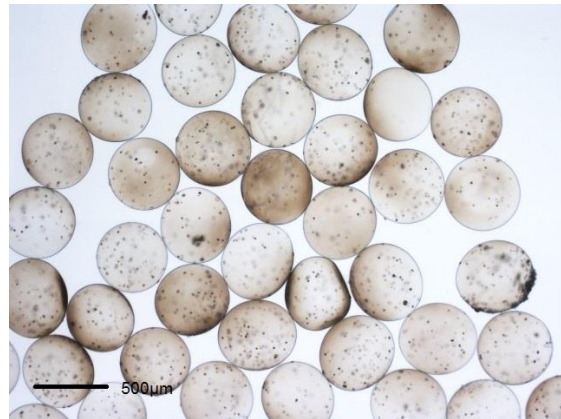
**Abbildung 26: SCP IB Tag 0**



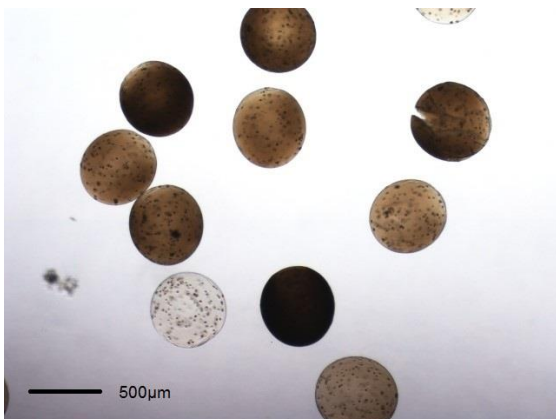
**Abbildung 27: SCP IB Tag 5**



**Abbildung 28: SCP IB Tag 10**



**Abbildung 29: SCP IB Tag 15**



**Abbildung 30: SCP IB Tag 21**

Abbildung 26-30 zeigt den Verlauf der Alginatbeads mit eingekapselten SCP-Zellen (siehe Pfeil Abbildung 26). Auch diese Alginatbeads variieren geringfügig in ihrer Größe. Die Braunfärbung (Mineralisierung) nimmt ebenfalls im Verlauf der Kultivierungszeit zu, variiert allerdings deutlich.

## **5.1 Darstellung der Viabilität der eingekapselten Zellen mittels Live-Dead- Färbung**

Die Live-Dead-Färbung erfolgte jeweils an Tag 1, 10 und 20. Schwerpunkt in der Auswertung des Live-Dead-Färbung wurde auf den Gehalt an überlebenden bzw. toten Zellen innerhalb der Alginatbeads gelegt, wobei dieser nur Dargestellt und nicht quantifiziert wurde. Das Overlay-Bild ermöglichte die Darstellung des Verhältnisses von lebenden zu toten Zellen.

Zusätzlich wurden auch hier Form, Größe und Anzahl der Alginatbeads beurteilt.

Abbildung 32 bis 58 zeigen das Zellüberleben mittels Live-Dead-Staining, wobei die grün gefärbten Zellen die überlebenden, die rot gefärbten die toten Zellen verbildlichen.

Die einzelnen farbigen Punkte sind die Zellen, während die flächenhafte Färbung mineralisierte Anteile der Beads darstellen.

Jeweils an Tag 1 und 20 zeigt ein Overlay-Bild die Lebend-Tot-Ratio der Zellen.

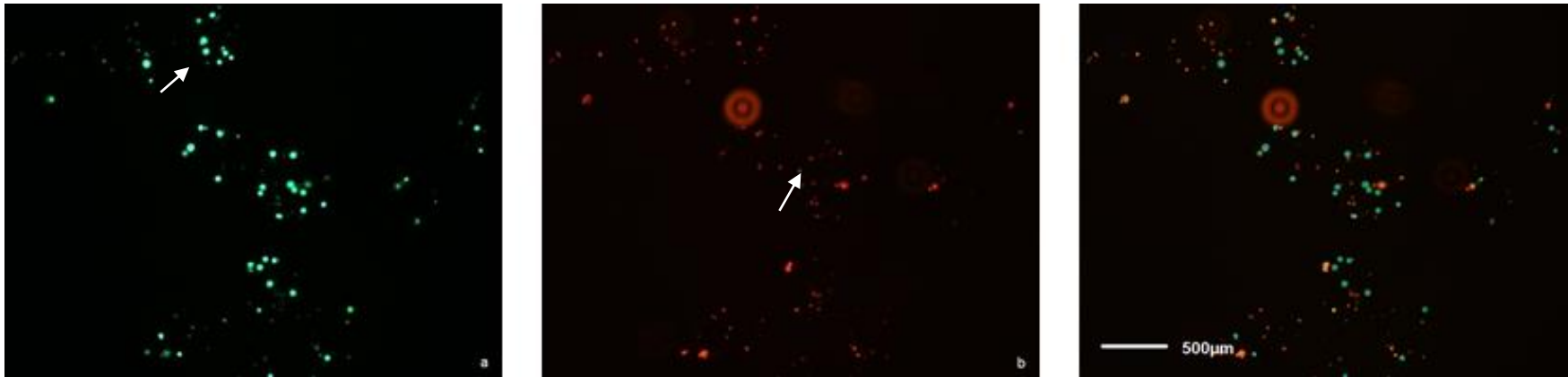


Abbildung 31 OSÜ 140 Tag 1; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay

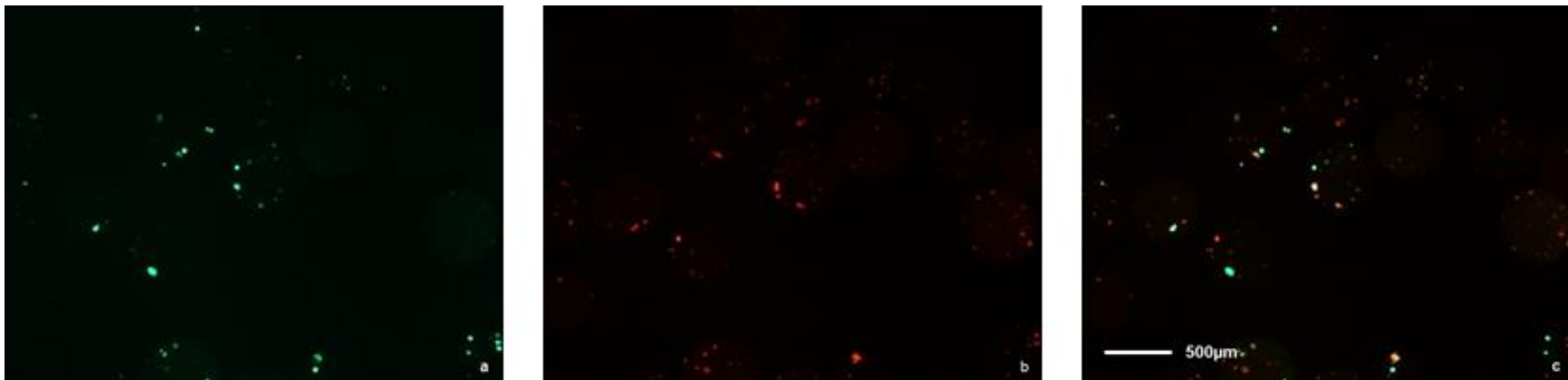


Abbildung 32 OSÜ 140 Tag 10; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay

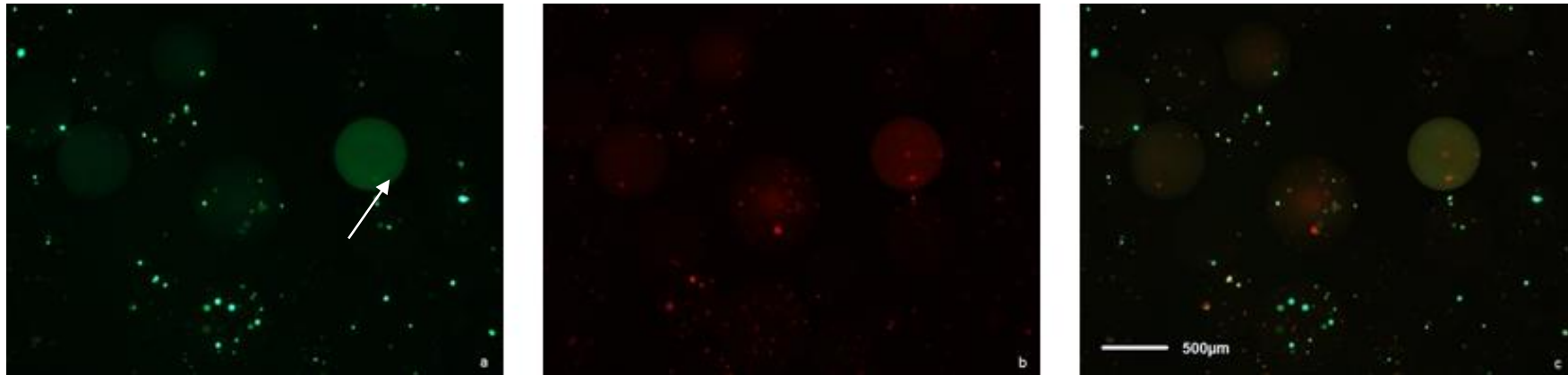


Abbildung 33 OSÜ 140 Tag 20, a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay

Abbildung 31-33 zeigen die Live-Dead-Färbung der Osteoblasten in den Alginatebeads jeweils an Tag 1,10 und 20. Die einzelnen Zellen sind in der „Live-Färbung“ grün dargestellt, in der „Dead-Färbung“ rot (siehe Pfeile Abbildung 31). In den „Live-Dead-Overlay-Bildern“ sind die Bilder, mit den lebenden Zellen und die mit den Toten übereinander gelegt. Areale mit verstärkter Mineralisierung kommen durch flächige Anfärbung zur Darstellung (siehe Pfeil Abbildung 33). Im Verlauf der 21 Tage Kultivierungszeit der Osteoblasten in den Alginatebeads lässt sich mittels Live-Dead-Färbung ein stets Verhältnis von lebenden zu toten Zellen, darstellen, wobei der Anteil der lebenden Zellen überwiegt.

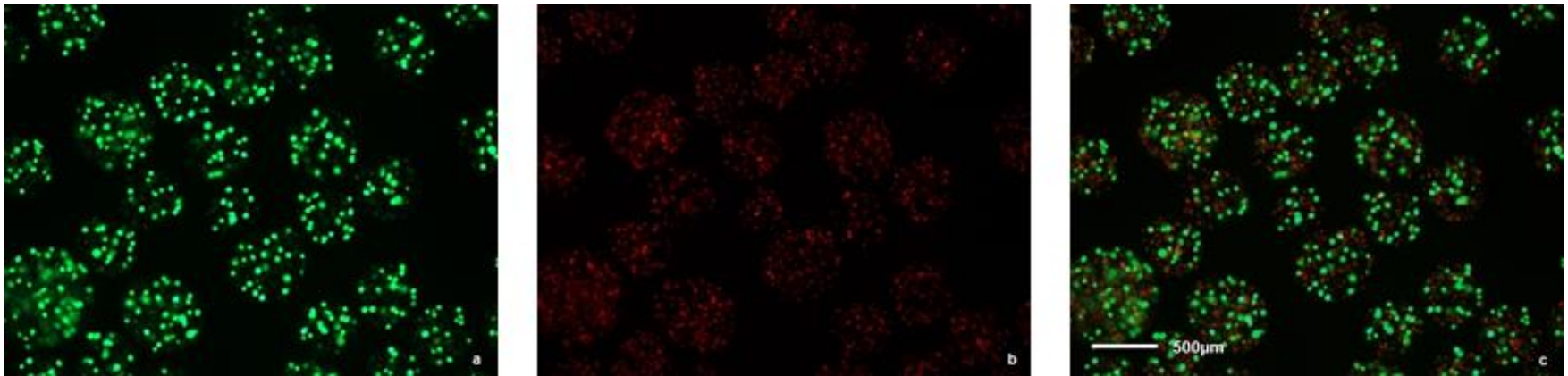


Abbildung 34 B-MSC 145 Tag 1; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay

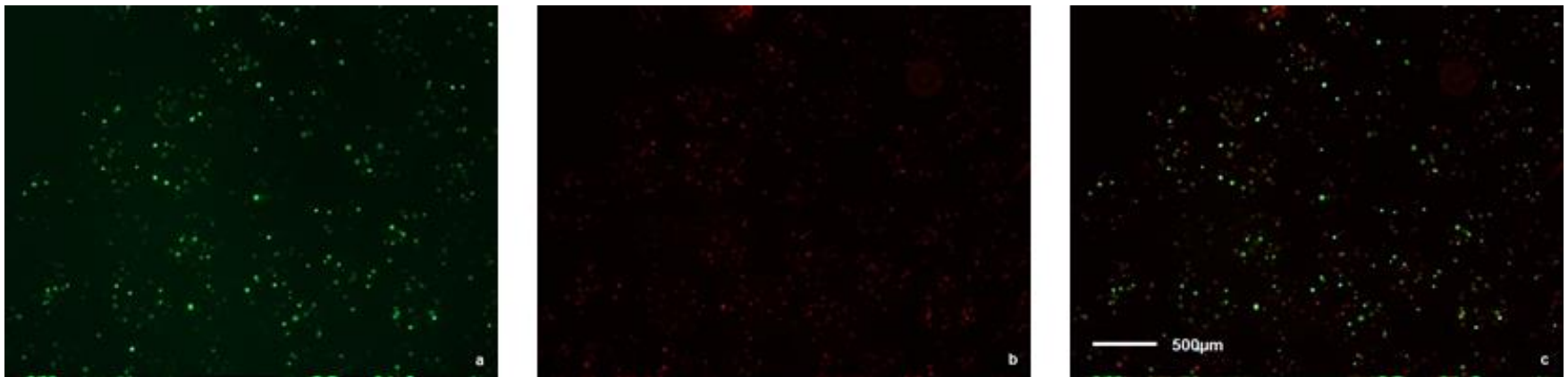


Abbildung 35 B-MSC 155 Tag 10; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay

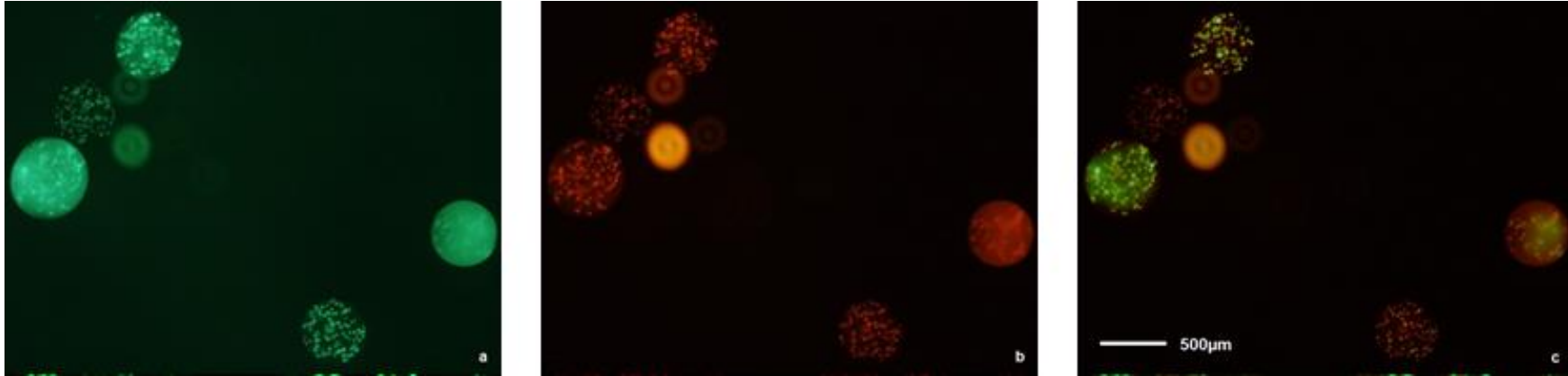


Abbildung 36 B-MSC 145 Tag 20; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay

Abbildung 34-36 zeigen exemplarische Bilder der Live-Dead-Färbung der in Alginatebeads eingekapselten B-MSC an Tag 1, 10 und 20. Die einzelnen Zellen sind in der „Live-Färbung“ grün dargestellt, in der „Dead-Färbung“ rot (siehe Pfeile Abbildung 31). In den „Live-Dead-Overlay-Bildern“ sind die Bilder, mit den lebenden Zellen und die mit den Toten übereinander gelegt. Insgesamt scheinen hier, v.a. zu Beginn der 21 Tage die überlebenden Zellen deutlich zu überwiegen. Gegen Ende der Kultivierungszeit sieht man auch bei den B-MSC eine Zunahme der toten Zellen (vergleiche Abb. 36c)



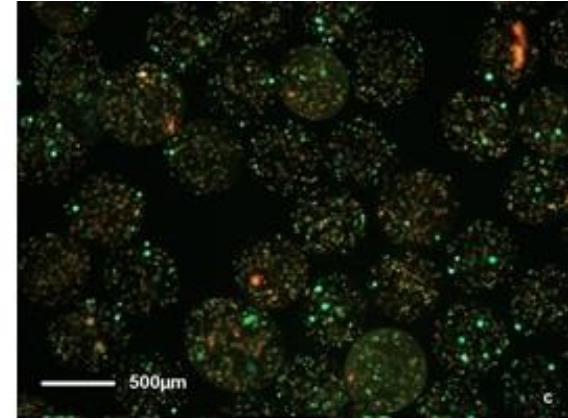
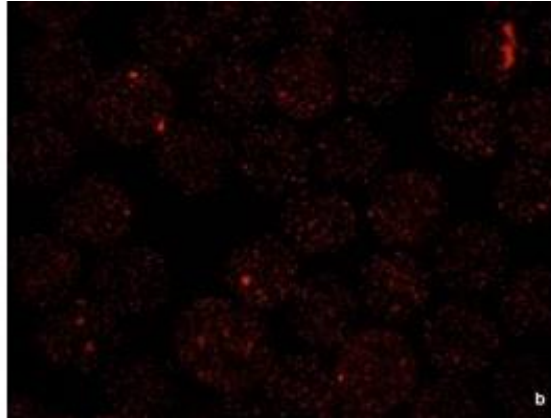
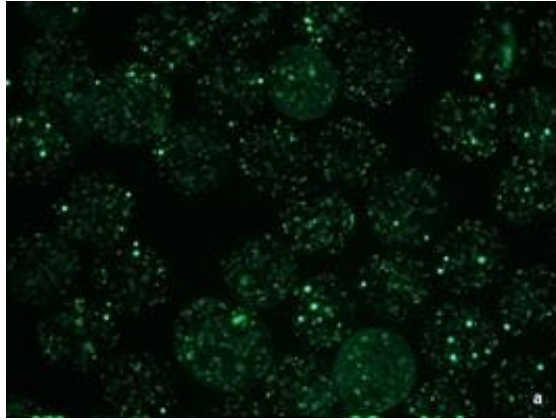


Abbildung 37 SCP-IB Tag 1; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay

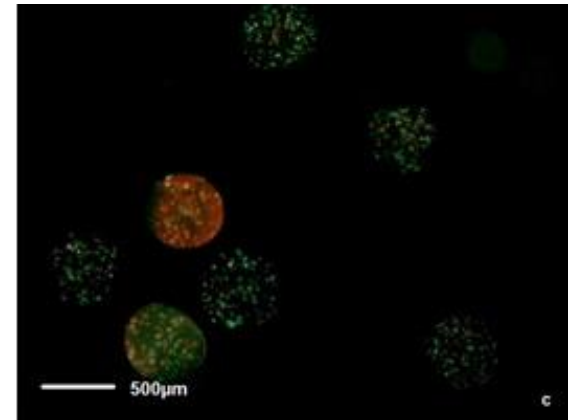
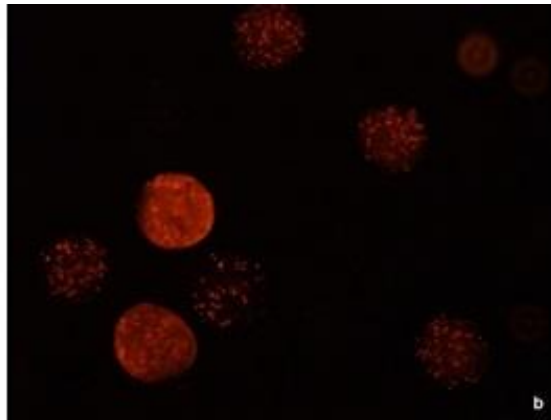
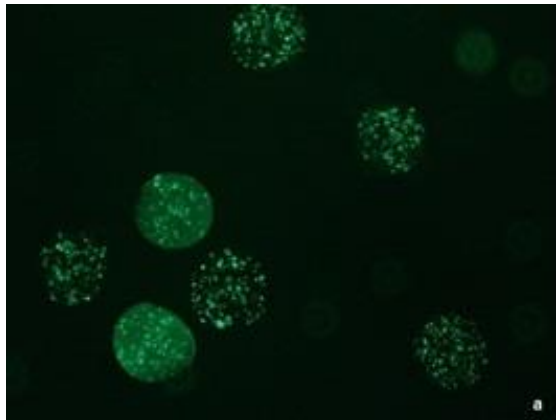


Abbildung 38 SCP-I Tag10; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay

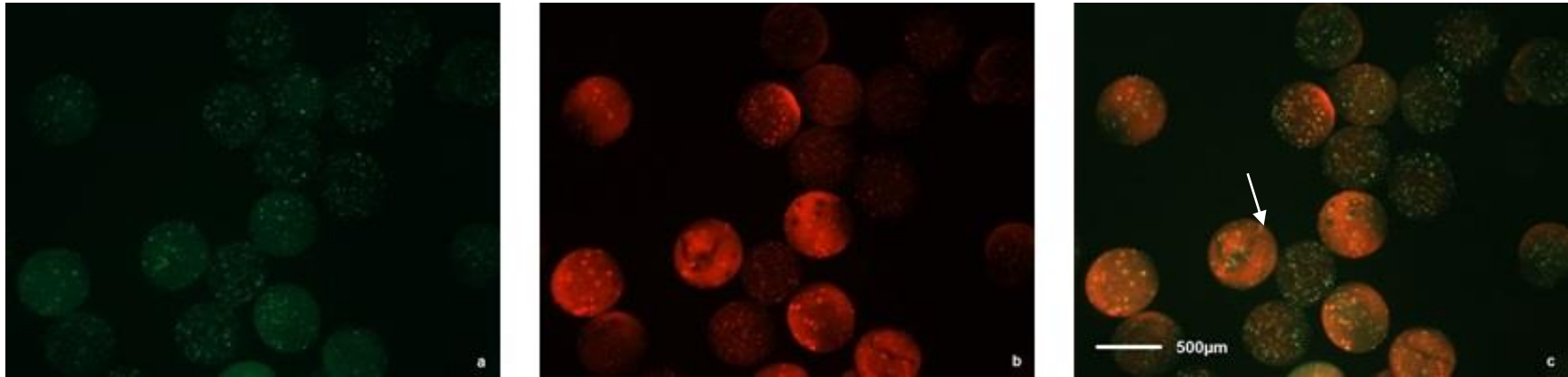


Abbildung 39 SCP-IB Tag 20; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay

Abbildung 37-39 zeigen die Bilder der Live-Dead-Färbung der in Alginatebeads eingekapselten SCP-Zellen an Tag 1, 10 und 20. Auch hier ist v.a. an Tag 1 und 10 ein Überwiegen der lebenden Zellen zu erkennen. An Tag 20 scheinen jedoch eher die toten Zellen zu überwiegen (vergleiche Abbildung 39c). Deutlich zu erkennen ist hier v.a. an Tag 20 die durch die Mineralisierung hervorgerufene flächige Verfärbung der Beads, wodurch die einzelnen Zellen nicht mehr klar zu unterscheiden sind (siehe auch Pfeil Abbildung 39c).



## **5.2 Beurteilung Viabilität mittels Alamar-Blau-Assay**

Um das Überleben der vier Millionen eingekapselten Zellen in den Alginatbeads zu überprüfen, wurde in regelmäßigen Zeitabständen (Tag 1, 6, 11, 16 und 21) eine Färbung der Zellen mittels Alamar-Blau durchgeführt und das in einer Redoxreaktion entstehende Resazurin gemessen.

### **5.2.1 Messung des Resazurinumsatzes innerhalb der einzelnen Zelllinien:**

#### **5.2.1.1 Stammzellen des Knochenmarks (B-MSK):**

Die statistische Auswertung des Alamar-Blau-Assay, alle Tage (1, 6, 11, 16 und 21) miteinander verglichen, zeigte bei  $p = 0,256$  keine signifikanten Unterschiede. Auch der Kontrollvergleich von Tag 1 mit Tag 21 ergab bei einem  $p = 0,356$  keinen signifikanten Unterschied im Überleben der Zellen zwischen den beiden Tagen.

#### **5.2.1.2 immortalisierte Stammzellen des Knochenmarks (SCP):**

Die Betrachtung des Überlebens der SCP-Zellen sowohl im Verlauf der Tage 1-21 als auch nur Tag 1 verglichen mit Tag 21 zeigte mit  $p = < 0,001$  eine signifikante Abnahme der Viabilität.

#### **5.2.1.3 humane Osteoblasten (OSÜ):**

Ebenfalls bei den humanen Osteoblasten wurde das Überleben sowohl im Vergleich der 21 Tage als auch im direkten Vergleich von Tag 1 mit Tag 21 betrachtet. In beiden Fällen zeigten die Zellen eine, mit  $p < 0,001$ , signifikante Abnahme des Überlebens im Verlauf der 21 Tage Kultivierungszeit.

### **5.2.2 Vergleich des Resazurinumsatzes zwischen den verschiedenen Zelllinien:**

Um die Umrechnung in Prozent zu ermöglichen, wurde jeweils die Zahl der Zellen nach dem Einkapseln in die Alginatebeads als 100% angenommen. Dies ermöglicht den Vergleich des Zellüberlebens der verschiedenen Spenderzelllinien im Verlauf von Tag 1-21.

Ausgehend von Tag 1 = 100% wurde an Tag 11, 16 und 21 auf signifikante Unterschiede im Überleben zwischen den Zelllinien getestet.

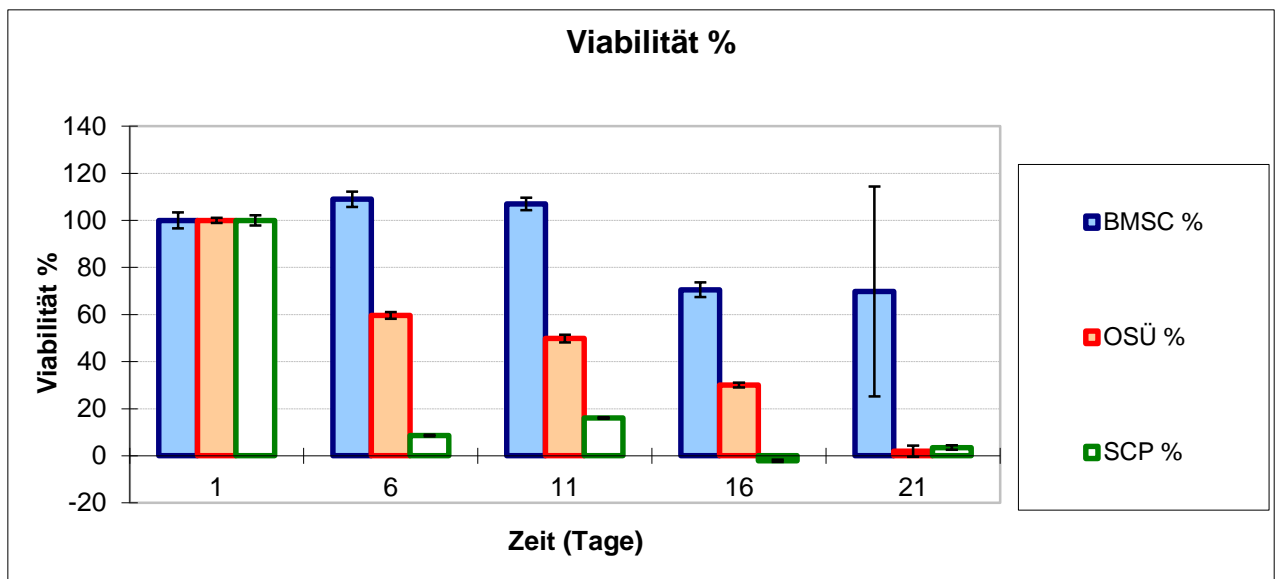
Als signifikant wurde  $p = < 0,001$  bei der statistischen Datenanalyse angenommen.

Bei dem Vergleich der Zelllinien an den einzelnen Tagen konnte für alle Tage bei  $p = 0,001$  oder  $p < 0,001$  ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Um diesen weiter zu analysieren, wurden sowohl jeweils die Tage 1 wie 21 der einzelnen Zelllinien ausgewertet, um zu sehen, welche Zellen am Ende der Kultivierungszeit das beste Überleben zeigten.

Durch den Vergleich der einzelnen Zelllinien an Tag 21 konnte festgestellt werden, dass die B-MSC sowohl im Vergleich mit den Osteoblasten als auch mit den SCP-Zellen ein signifikant besseres Überleben zeigten.

Verglich man dagegen die Viabilität der Osteoblasten mit der der SCP-Zellen an Tag 21, konnte mit  $p = 0,759$  kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Im Vergleich der nicht in Prozent umgerechneten Tage 1 miteinander zeigte sich ebenfalls schon zu Beginn der Kultivierungszeit ein signifikanter Unterschied zwischen BMSC mit Osteoblasten und SCP-Zellen. Der Vergleich zwischen den beiden letztgenannten Zellarten zeigte mit  $p = 0,986$  keine Signifikanz.



**Abbildung 40:** Darstellung der Zellviabilität in Prozent  $\pm$  avSEM, wobei das Überleben der Zellen an Tag 1 100% entspricht.

Abbildung 59 zeigt das Zellüberleben über den Zeitraum von 21 Tagen in Prozent. Mit 69,83% zeigen die Stammzellen des Knochenmarks das höchste Überleben. Die humanen Osteoblasten haben ein Überleben von 1,99%, wobei es allerdings erst ab dem elften Kultivierungstag signifikant abnimmt. Mit einem Zellüberleben von 3,48 % zeigen die immortalisierten Knochenmarksstammzellen am Ende der Kultivierungszeit ein gering höheres Überleben als die Osteoblasten, insgesamt jedoch die kürzeste Überlebenszeit.

### 5.3 Messung der Aktivität der spezifische alkalische Phosphatase

Die Messung der AP-Aktivität diene der Quantifizierung der Induktion der knochenbildenden Aktivität der Zellen durch die Reaktion in den mit  $\text{CaPO}_4$  versetzten Alginatbeads.

### **5.3.1 Messung der AP-Aktivität innerhalb der einzelnen Zelllinien im Verlauf von 21 Tagen**

#### **5.3.1.1 Spezifische AP-Aktivität von B-MSK**

Im Kruskal-Wallis Test zeigte sich im Verlauf der 21 Tage eine statistisch signifikante Änderung der AP-Aktivität bei  $p = 0,001$ . Auch der Vergleich von Tag 1 mit Tag 21 zeigte mit  $p = 0,002$  eine signifikante Abnahme der Aktivität

#### **5.3.1.2 Spezifische AP-Aktivität von SCP**

Auch die SCP-Zellen zeigten sowohl im Vergleich der 21 Tage miteinander, bei  $p = 0,029$ , als auch im Vergleich von Tag 1 mit 21, bei  $p = 0,052$ , eine signifikante Abnahme der AP-Aktivität.

#### **5.3.1.3 Spezifische AP-Aktivität von OSÜ**

Bei  $p = 0,049$  im Vergleich der einzelnen Tage untereinander und bei  $p = 0,008$  im Vergleich von Tag 1 mit 21 zeigten die humanen Osteoblasten ebenfalls eine signifikante Abnahme der AP-Aktivität.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei allen drei Zelllinien eine statistisch signifikante Änderung beziehungsweise Abnahme der AP-Aktivität gemessen werden konnte.

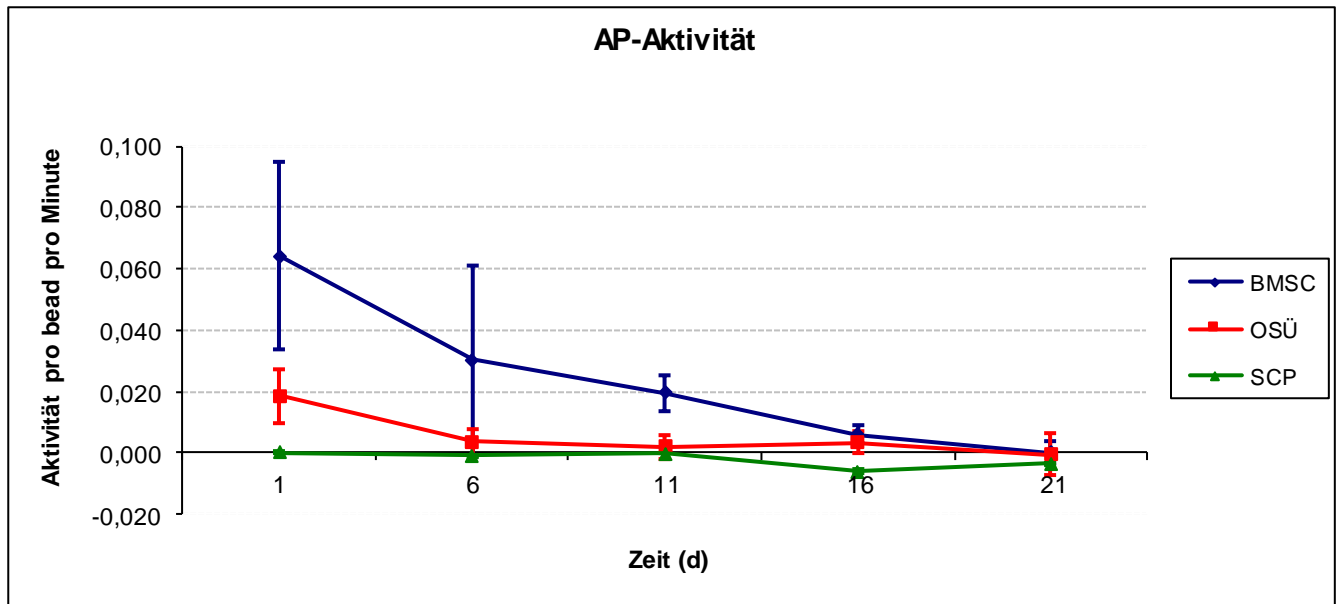
### **5.3.2 Vergleich der Aktivität der alkalischen Phosphatase der verschiedenen Zelllinien an Tag 21 und Tag 1**

Die Messungen der alkalischen Phosphatase-Aktivität der verschiedenen Zelllinien an Tag 21 zeigte weder bei dem Vergleich von B-MSK mit SCP-Zellen und Osteoblasten noch bei dem Vergleich von SCP-Zellen mit Osteoblasten einen signifikanten Unterschied.  $p$  variierte hierbei zwischen 0,054 und 0,751.

Da die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Verlauf der 21 Tage bei allen Zelllinien abnahm, sollen an dieser Stelle noch die Ergebnisse der Messungen der verschiedenen Zelllinien an Tag 1 verglichen werden.

Bei dem Vergleich der Werte von Tag 1 stellte sich heraus, dass zwar die Werte zwischen B-MSK und Osteoblasten mit  $p = 0,175$  keine Signifikanz zeigten. Vergleich

man dagegen sowohl B-MSC mit SCP als auch OSÜ mit SCP-Zellen, stellte sich in beiden Fällen mit  $p = < 0,001$  ein signifikanter Unterschied der Werte dar. Das bedeutet, dass sowohl B-MSC als auch OSÜ über signifikant erhöhte Ausgangswerte der AP-Aktivität, verglichen mit den SCP-Zellen, verfügen (Abbildung 41).



**Abbildung 41: Darstellung der AP-Aktivität über den Verlauf von 21 Tagen Mittelwert  $\pm$  avSEM. Für die Spenderzahlen gilt durchschnittlich: N = 5 (15 Messwerte) für OSÜ, N = 4 (12 Messwerte) für B-MSC und N = 6 (18 Messwerte) für SCP-Zellen.**

Abbildung 61 zeigt, dass bei allen Zellen die Aktivität der spezifischen alkalischen Phosphatase im Verlauf der 21 Tage Kultivierungszeit abnimmt. Bei einem initial signifikanten Unterschied der AP-Aktivität zwischen B-MSC und OSÜ verglichen mit den SCP-Zellen, ist an Tag 21 kein signifikanter Unterschied der AP-Aktivität mehr festzustellen. Bei genauerer Betrachtung der Stammzellen des Knochenmarks fällt auf, dass diese die stärkste Aktivität der alkalischen Phosphatase zeigen. Ihre Differenzierungsdynamik ist besonders zu Beginn der 21-tägigen Kultivierungszeit hoch, fällt bis zu Tag 11 jedoch konstant ab und hält sich ab diesem Zeitpunkt auf einem Niveau, welches in etwa dem der Osteoblasten entspricht. Die AP-Aktivität der immortalisierten Knochenmarksstammzellen weist konstant niedrige Werte auf.

## **5.4 Darstellung der Zellmineralisierung mittels Hellfeldlichtmikroskopie**

Wie bereits in Kapitel 5.1 besprochen, konnten Form, Größe, Anzahl und Farbe der Alginatbeads mittels Hellfeldlichtmikroskopie beurteilt werden. An dieser Stelle soll gesondert noch einmal auf die Verfärbung der Beads im Verlauf ihrer Kultivierungszeit eingegangen werden, da eine Zunahme der Mineralisierung mit einer entsprechenden Braunverfärbung der Beads einhergeht. Die in Abbildung 16 bis 30 dargestellten, lichtmikroskopischen Bilder (siehe Kapitel 5.1) zeigen die Zellmineralisierung jeweils an Tag 1, 5, 15 und 21. Anhand der Bilder lässt sich bei allen drei Zelllinien ein deutlicher Unterschied im Mineralisierungsgrad im Verlauf der 21 Tage erkennen.

Während die Zunahme der Braunfärbung bei den B-MS-C-Beads am deutlichsten erkennbar ist, zeigt sich bei den Osteoblasten im Verhältnis ein eher geringerer Kontrast. Die Mineralisierungszunahme der Beads mit SCP-Zellen liegt zwischen der der B-MS-C und derjenigen der Osteoblasten, wobei zu erwähnen ist, dass sie starken spenderabhängigen Schwankungen unterworfen ist.

## **5.5 Quantifizierung der Zellmineralisierung mittels Graustufenanalyse**

Abbildung 31 zeigt schematisch die Auswertung der lichtfeldmikroskopischen Bilder, wobei die Dunkelfärbung der Beads pro Fläche aufgetragen wurde. Dabei sieht man, dass der Mineralisierungsgrad der Alginatbeads mit B-MS-C den der Beads mit SCP-Zellen und Osteoblasten deutlich übertrifft.

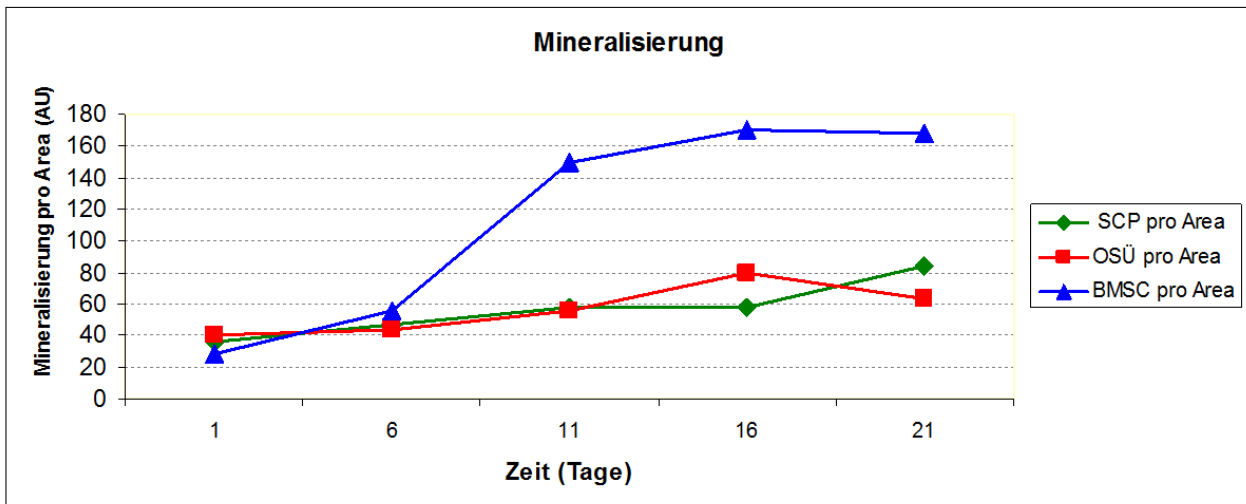


Abbildung 42: Auswertung der BF-Mikroskopie, Mineralisierung der Beads. Es wurden jeweils die Werte der Graustufenanalyse [AU] eines analysierten hellfeldlichtmikroskopischen Bildes einer Zellreihe an den verschiedenen Tagen aufgetragen.

## 5.6 Beurteilung der Zellmineralisierung in Alginatebeads mittels Alizarin-Rot-Färbung

Zur Bestimmung der Mineralisierung der verschiedenen Zelllinien, wurden diese jeweils an den Tagen 1, 6, 11, 16 und an Tag 21 mit Alizarin-Rot gefärbt sowie an Tag 0, 5, 10, 15 und 21 Brightfieldaufnahmen angefertigt. Als Kontrolle für die Bestimmung der Zellmineralisierung mittels Alizarin-Rot-Färbung dienten leere Alginatebeads ohne Zellen, die genau wie auch die Beads mit den eingekapselten Zellen über 21 Tage sowohl in MSC-Differenzierungsmedium als auch in Osteoblastendifferenzierungsmedium kultiviert wurden. Als signifikant wurde ein  $p < 0,05$  gewertet.

### 5.6.1 Messung der Zellmineralisierung innerhalb der einzelnen Zelllinien

#### 5.6.1.1 Mineralisierung der B-MSK

Die Analyse der Mineralisierung Alginatebeads mit B-MSK Zellen zeigt im Verlauf der 21 Tage mit  $p = 0,040$  eine statistisch signifikante Zunahme der Mineralisierung. Bei dem paarweisen Vergleich von Tag 1 mit Tag 21 zeigte sich mit  $p = 0,027$  das gleiche Ergebnis.

### **5.6.1.2 Mineralisierung der SCP**

Die SCP-Zellen zeigten mit  $p = 0,091$  keine signifikante Änderung der Mineralisierung im Vergleich der 21 Tage. Das gleiche Ergebnis ergab der Vergleich von Beginn der Kultivierungszeit mit ihrem Ende bei  $p = 0,097$ .

### **5.6.1.3 Mineralisierung der OSÜ**

Mit  $p = 0,055$  zeigte sich auch bei den Osteoblasten keine statistisch signifikanten Unterschiede der Mineralisierung im Vergleich der Tage 1 bis 21. Bei dem isolierten Vergleich des Tag 1 mit Tag 21 stellte sich, mit  $p = 0,004$ , eine signifikante Zunahme der Mineralisierung heraus.

### **5.6.1.4 Mineralisierung leerer Alginatbeads**

Im Fall der Alginatbeads in Osteoblastenkulturmedium ebenso wie bei den Beads in Stammzellkulturmedium konnte weder im Verlauf der 21 Tage, bei  $p = 0,620$  für die Alginatbeads in Osteoblastenkulturmedium und  $p = 0,094$  für die Beads in Stammzellkulturmedium, noch im Vergleich von Tag 1 mit Tag 21 bei  $p = 0,930$  und  $p = 0,596$  eine signifikante Änderung der Mineralisierung nachgewiesen werden.

## **5.6.2 Vergleich der Mineralisierung**

Im Vergleich der Zelllinien untereinander an den einzelnen Tagen zeigte sich bei einem p-Wert zwischen 0,562 und 0,109 an den Tagen 1, 6 und 11 kein signifikanter Unterschied. Mit  $p = 0,003$  konnte aber für Tag 16 ein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien festgestellt werden. Der Vergleich jeweils des Tages 21 der verschiedenen Zellen ergab für die B-MSC verglichen mit den Osteoblasten und SCP-Zellen, bei  $p$  zwischen 0,772 und 0,331, keinen signifikanten Unterschied. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei  $p = 0,320$  bei dem Vergleich von Osteoblasten mit SCP-Zellen an Tag 21.

Verglichen mit den Kontrollbeads zeigte sich bei den B-MSC in beiden Fällen, mit  $p = 0,015$  für die Beads in Osteoblastendifferenzierungsmedium und  $p = 0,002$  für die in Stammzellendifferenzierungsmedium, eine signifikant bessere Mineralisierung der B-MSC. Bei dem Vergleich der Kontrollen in Osteoblastendifferenzierungsmedium mit den Osteoblasten und SCP-Zellen, zeigte sich an Tag 21 bei  $p$  zwischen 0,095 und 0,589 kein signifikanter Unterschied.



Dagegen konnte eine signifikant bessere Mineralisierung dieser Zellen im Vergleich zu den Kontrollen in Stammzellendifferenzierungsmedium, bei  $p = 0,003$  und  $p = 0,009$ , festgestellt werden.

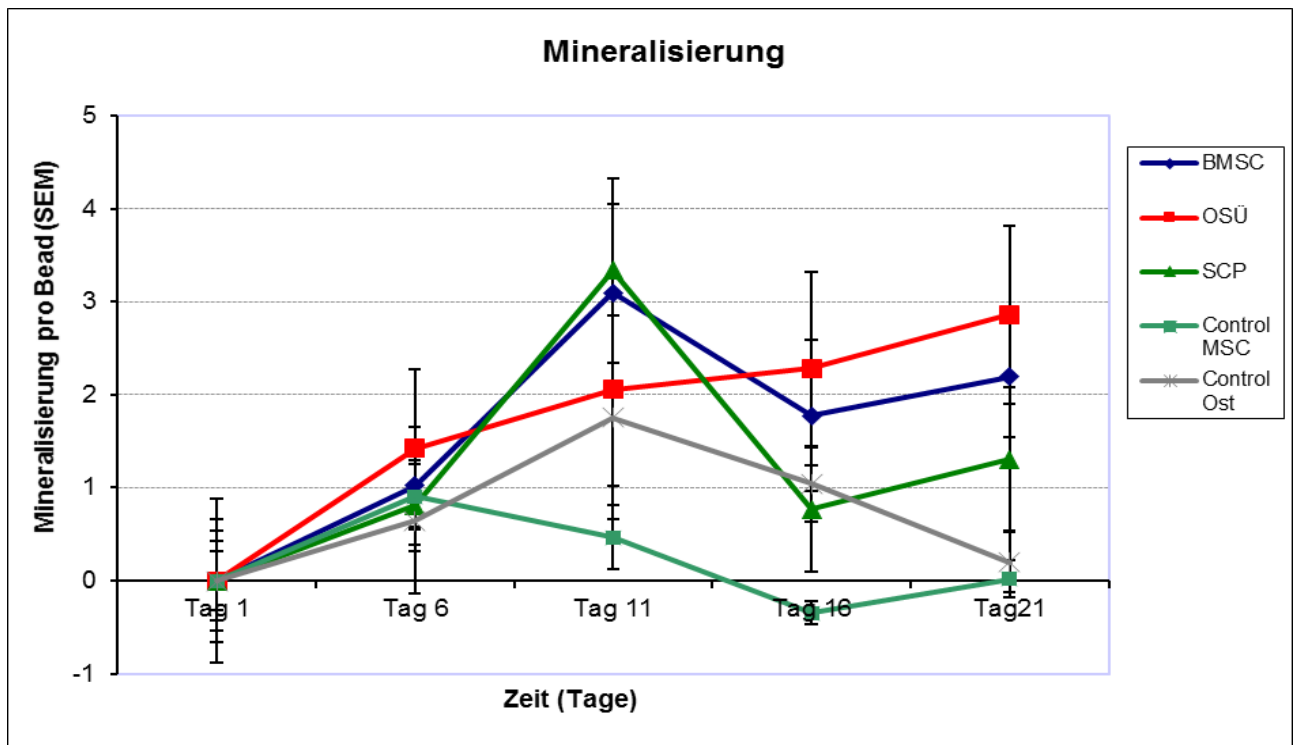


Abbildung 43 Darstellung der Zellmineralisierung  $\pm$  avSEM im Verlauf der 21 Tage Kultivierungszeit. Gemessen wurde die Absorption [OD]. Für den Vergleich Mineralisierung im Verlauf wurden die Werte zu Beginn der Kultivierungszeit auf 0 gesetzt. Als Kontrollen dienten leere Alginatbeads ohne eingekapselte Zellen (Control MSC, Control Ost). Als signifikant gilt ein  $p < 0,05$ . Dies trifft auf den Verlauf (Tag 1-21) der B-MSC (blau) zu. Für die OSÜ gilt  $p < 0,05$  im Vergleich Tag 1 mit Tag 21. Bei den SCP zeigte sich  $p > 0,05$  im Vergleich der Mineralisierung über den Kultivierungszeitraum. Auch die Kontrollen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Mineralisierung mit  $p > 0,05$ . Im Vergleich der Zelllinien gegeneinander an den einzelnen Tagen zeigte sich ein signifikanter Unterschied an Tag 16  $p < 0,05$ . Für die Spenderzahlen gilt durchschnittlich  $N = 6$  (18 Messwerte) für OSÜ,  $N = 4$  (12 Messwerte) für B-MSC,  $N = 6$  (18 Messwerte) für SCP.

Abbildung 60 zeigt die Mineralisierung der Alginatbeads im Verlauf der 21 Tage, wobei für den besseren Vergleich der Mineralisierungszunahme der Ausgangspunkt für den Beginn der Kultivierungszeit auf 0 gesetzt wurde.

Die Abstände der Mineralisierungspunkte zwischen den unterschiedlichen Zelllinien an Tag 21 zeigen keine Signifikanz. In ihrem Endpunkt übertreffen die Beads mit Osteoblasten sowohl die mit BMSC als auch die Beads mit SCP-Zellen, dies jedoch

nicht signifikant. Die Graphik zeigt eine bessere Mineralisierung der Alginatbeads BMSC als der mit SCP-Zellen. Deutlich zu sehen ist, dass die leeren Kontrollbeads nicht mineralisieren.

## **5.7 RNA-Isolierung**

Der Test auf Reinheit und Menge der RNA zeigte 260/280 Quotienten von Werten um 1, was bedeutete, dass der Reingehalt an RNA zu gering war.

Ein entsprechendes Ergebnis lieferte auch die Überprüfung der Intaktheit der RNA mittels Agarosegel, auf dem keine RNA-Banden sichtbar wurden. Somit konnten keine weiteren Tests mit dieser RNA durchgeführt werden.

## 6 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit ist eine experimentelle Studie die erstmalig den Einsatz von Alginatbeads als 3D-Scaffold für Zellkulturen und deren Differenzierungspotential zu Osteoblasten untersuchte. Die Studie entstand in Kooperation mit dem *Nanoinstitut der NTNU\_Trondheim*, das bereits Studien mit Alginat als 3D-Zellkultur durchgeführt hatte [de Vos et al., 2006].

Im Rahmen unserer Untersuchungen an Osteoblasten, Stammzellen des Knochenmarks sowie immortalisierten Stammzellen des Knochenmarks, konnten wir zeigen, dass die verwendeten Stammzelllinien über Differenzierungspotential in Osteoblasten verfügen und ein Überleben innerhalb der Alginatbeads für einen Mindestzeitraum von drei Wochen möglich ist.

Dieser Erkenntnis könnte im Rahmen des Tissue Engineerings von Knochen bzw. bei der Suche von Knochenersatz- bzw. Füllmaterial entscheidende Bedeutung zukommen.

Im Folgenden sollen die von uns erhobenen Ergebnisse anhand der bestehenden Daten und Literatur diskutiert werden.

### 6.1 Studiendesign

Ziel der unserer Untersuchungen war die Eignung von Alginatbeads als Matrix für Osteoblasten, B-MSC und SCP-Zellen zu testen. Voraussetzung hierfür war herauszufinden, ob sich diese Zellen in Alginatbeads einkapseln lassen und den Vorgang überleben. Weiter wollten wir herausfinden, wie lange ein Überleben der Zellen in den Beads möglich ist und ob sich die Alginatbeads selbst im Verlauf der Kultivierungszeit verändern bzw. ob es zu einer Mineralisierung der Beads kommt. Schließlich sollten die verschiedenen Zelltypen gegeneinander verglichen werden, um zu untersuchen, ob sie sich in Überleben, Differenzierung oder Mineralisierungsverhalten der Beads unterscheiden.

Bei unserer Studie handelt es sich um eine experimentelle Untersuchung von aus intraoperativ gewonnenem Knochen, isolierten Osteoblasten und Knochenmarksstammzellen, sowie mittels hTERT immortalisierten Knochenmarksstammzellen, welche uns von Herrn Professor Schieker, Leiter der

experimentellen Unfallchirurgie München Innenstadt (LMU), zur Verfügung gestellt wurden.

## 6.2 Alginat

Ziel dieser experimentellen Studie war die Idee der Alginatbeads als potentielles Scaffold für das Tissue Engineering von Knochen aufzugreifen, ein Überleben von Zellen der osteogenen Linie innerhalb des Alginatsystems nachzuweisen und eine mögliche Stimulation der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks zu Osteoblasten innerhalb des Alginatsystems zu erreichen.

In unserer Studie wurden Alginatbeads aus 2%igem Alginat, mit einem Durchmesser von 500µm mittels eines Beadgenerator hergestellt. Die Alginatbeads dienten als Matrix für die darin eingekapselten Zellen und stellten gleichzeitig eine 3D-Zellkultur dar.

Bereits 1980 wurden Alginatmikrokapseln als mögliches 3D-Scaffold für Zellkulturen beschrieben [Lim et al., 1980]. Aufgrund seiner Bioresorbierbarkeit [Pawar et al., 2012] weist Alginat eine Eigenschaft auf, die unter anderem die Problematik der Abstoßungsreaktionen bei seinem klinischen Einsatz umgehen würde [de Vos et al., 2006, Rokstad et al., 2001].

Alginatbeads können in verschiedensten Größen hergestellt werden [Olderoy et al., 2012], da aber sowohl die Größe der Poren in den Alginatbeads als auch die Größe der Beads selbst eine nicht unerhebliche Rolle für das Zellüberleben innerhalb der Beads spielt [Hwang et al., 2010, Leal-Egana et al., 2011], wurde für unsere Beads eine Größe von 500µm gewählt. Dabei ist bekannt, dass sowohl die Größe als auch die strukturelle Beschaffenheit des Scaffolds beeinflussen, in welche Richtung sich Zellen innerhalb der Matrix weiter differenzieren [Meyer et al., 2004].

In Anlehnung an die Forschungsergebnisse des *Nanoinstitutes der NTNU Trondheim* wurde in unserer Studie das Alginat zusätzlich mit Calciumphosphat versetzt, welches zusätzlich zu einer Mineralisierung der Beads führen sollte [Xie et al., 2010]. Die Mineralisierung der Beads sollte die osteogene Differenzierung der Zellen stimulieren. [Bottaro et al., 2002, Popp et al., 2010].

Da es durch die Mineralisierung des Alginats zu einer Bildung von Hydroxyapatit kommt [Xie et al., 2010] wäre dies eine optimale Voraussetzung für den Einsatz im

Bereich des Tissue Engineering, da Hydroxyapatit ebenfalls Bestandteil des menschlichen Knochens ist [Dessi et al., 2012] und mit dieser Eigenschaft sowohl biokompatibel ist als auch osteokonduktiv wirkt [Popp et al., 2010].

In wie weit mineralisiertes Alginat genügend Stabilität aufweist, um der des Knochens zu entsprechen, zeigen die neuesten Ergebnisse des *Nanoinstitutes* bezüglich der Viskoelastizität von Alginat [Olderoy et al., 2012]. Darin wird beschrieben, dass die Mineralisierung des Alginates, welches, wie in unserer Studie mittels Diffusion mineralisiert wurde, geringer ist, als die Mineralisierung, die mittels enzymatischer Aktivität erzielt wurde. Der Mineralisierungsunterschied zeigte im gleichen Versuch auch Auswirkungen auf die Stabilität des Alginates, wobei das enzymatisch mineralisierte Alginat durch gleichmäßigere Mineralisierung eine höhere Stabilität aufwies, als das durch Diffusion mineralisierte [Olderoy et al., 2012].

### **6.3 Zellen**

Als Zellen wurden von uns mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (B-MS) sowie immortalisierte Stammzellen und als Kontrollen Osteoblasten eingekapselt.

Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarkes wurden verwendet da sie als Stammzellen die Fähigkeit besitzen, sich in die verschiedensten Richtungen zu entwickeln, so auch in Richtung Osteoblasten [Bruder et al., 1997]. Des Weiteren spielen B-MS eine entscheidende Rolle in dem komplexen Prozess der Frakturheilung, bei welchem sie in das zerstörte Gewebe einwandern und dort an der Heilung beteiligt sind [Fayaz et al., 2011]. Neben der Frakturheilung sind Stammzellen auch für den Gewebeersatz bei von beispielsweise durch Alterungsprozesse bedingten Knochenerkrankungen beteiligt [Ehnert et al., 2009].

Neben dieser zentralen Bedeutung von mesenchymalen Stammzellen darf man allerdings nicht außer Acht lassen, dass diese Zellen im Rahmen von längerer in vitro Kultivierung ihre stammzellspezifischen Fähigkeiten bis zu einem gewissen Grad verlieren [Baxter et al., 2004, Bruder et al., 1997].

Unter diesem Gesichtspunkt wurden von uns die mittels hTERT immortalisierten Stammzellen als dritte Zelllinie verwendet. Die immortalisierten Stammzellen haben den Vorteil der unbeschränkten Proliferationsfähigkeit, was bedeutet, dass man bereits aus einer sehr kleinen Anzahl von Zellen eine ausreichend große Zellzahl in

vitro züchten kann, um diese dann in vivo als allogenes Transplantat auch für größere Knochendefekte einzusetzen [Boker et al., 2008]. Trotz dieses bestechenden Aspektes der SCP-Zellen, dürfen die Risiken einer genetischen Veränderung von Zellen jedoch nicht außer Acht gelassen werden. Zwar besteht die Hypothese, die maligne Entartung mittel hTERT immortalisierter Zellen beruhe auf dem verwendeten Vektor [Boker et al., 2008], jedoch darf man die Tatsache, dass eine exzessive Zellvermehrung auch mit Genominstabilität verbunden sein kann, nicht ignorieren [Kassem et al., 2004]. Ein weiterer Punkt ist, dass durch die Transfektion mittel hTERT nicht nur die Proliferationsfähigkeit der Zellen gesteigert wird [Kassem et al., 2004], sondern auch deren funktionelle Aktivität [Kassem et al., 2004, Yang et al., 2001].

#### **6.4 Überleben in den Alginatbeads - Alamar-blau-Assay und Live-Dead-Staining**

Um das Überleben der Zellen in den Beads zu quantifizieren, wurde von uns der Resazurin Umsatz mittels Alamar-Blau -Assay gemessen. Diese Methode beruht auf einem Redox-sensitiven Indikator [Shearman et al., 1995]. Bei dieser Redox-Reaktion wird Resazurin von metabolisch aktiven Zellen durch das Co-enzym Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat ( $\text{NADPH}+\text{H}^+$ ) zu dem fluoreszierenden Resorufin reduziert, der Umsatz kann mittels Platerreader gemessen werden [Borra et al., 2009, Holzer et al., 2011].

Durch den in regelmäßigen Zeitabständen gemessenen Resazurinumsatz war es uns möglich, mittels einer validen Methode das Zellüberleben innerhalb der Beads über den gesamten Zeitraum nachzuverfolgen.

Eine Ergänzung zum Alamar-Blau-Assay war die Live-Dead-Färbung der Beads. Bei dieser Färbung handelt es sich um ein gängiges Verfahren, um mittels Calcein und Ethidiumbromid Zellaktivität darzustellen und bildgebend festzuhalten.

Für den Vergleich der mittels Alamar-Blau-Assay gemessenen Ergebnisse ist dieses Verfahren jedoch nur unzureichend, da es sich nur um eine zweidimensionale Aufnahme handelt, wobei die Messung des Resazurinumsatzes jedoch das Überleben in der 3D-Kultur quantifiziert.

Es gelang uns nachzuweisen, dass die Stammzellen des Knochenmarks das beste Überleben im Verlauf der 21 Tage zeigten. Ihr Überleben war sowohl besser als das

der Osteoblasten (Kontrolle) als auch als das der SCP-Zellen. Bei keiner der drei Zelllinien zeigte sich eine weitere Proliferation der Zellen in den Beads. Des Weiteren stellte sich heraus, dass der Prozess des Einkapselns der Zellen in die Beads bereits anfangs zu einer vermehrten Zellsterblichkeit führte und die Zellzahl signifikant reduzierte. Dennoch überlebten die B-MSC auch den Prozess des Einkapselns besser als beide anderen Zelllinien, was für eine höhere Sensibilität der Osteoblasten und SCP-Zellen sprechen könnte. Für eine erhöhte Sensibilität gegenüber Stress vor allem bei den SCP-Zellen spricht auch, dass diese bereits an Tag 6 drastisch reduziert waren, wohingegen die Osteoblasten eine kontinuierliche Abnahme über den Kultivierungszeitraum zeigten.

Eine weitere Hypothese ist, dass sich B-MSC und Osteoblasten besser an die Umgebung in der 3D-Alginatkultur adaptieren können, da bereits bekannt ist, dass Zellen unterschiedlich auf verschiedene Methoden der Kultivierung in Alginatbeads reagieren [Rokstad et al., 2006].

## **6.5 Differenzierungspotential der Zellen in den Alginatbeads, AP-Aktivität**

Zur Bestimmung der Differenzierung in Richtung Osteoblasten wurde die alkalische Phosphatase-Aktivität der Zellen gemessen.

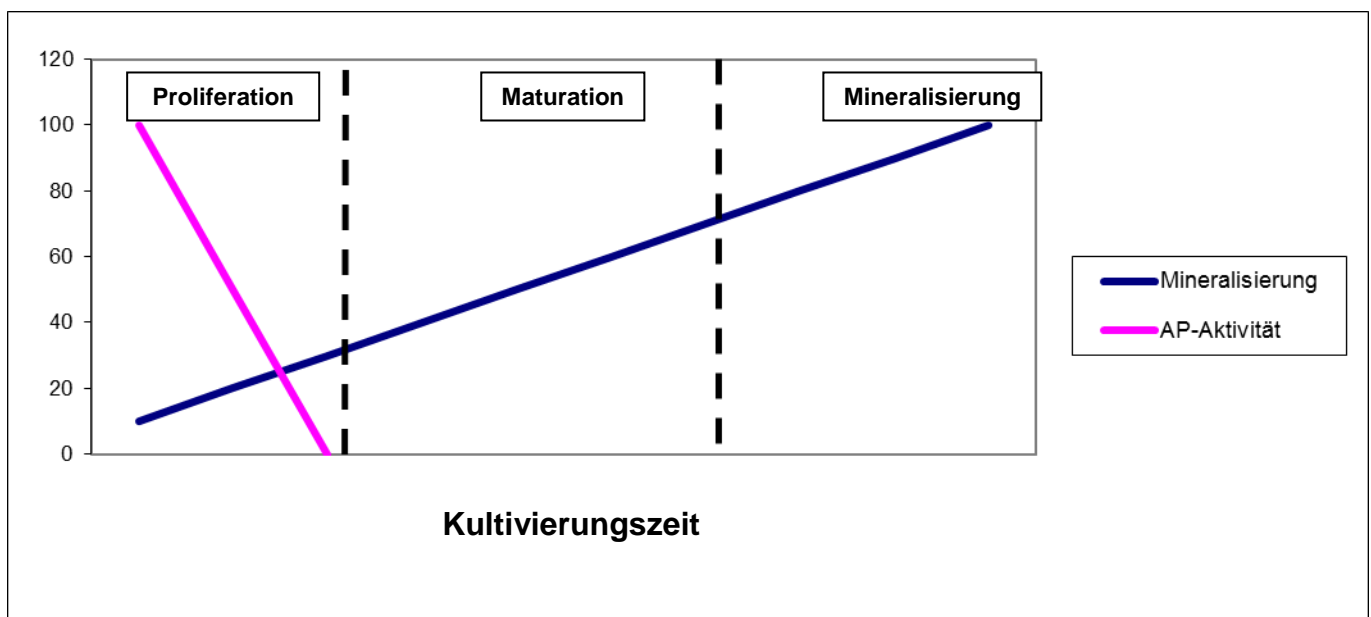
Die alkalische Phosphatase ist ein vielfältig angewandtes Enzym, das, obwohl es in vielen Geweben vorkommt, vor allem in Bezug auf Knochen- und Leber-Studien verwendet wird [Coleman, 1992].

Da das Enzym, das unter anderem von extrazellulärmatrixproduzierenden Osteoblasten gebildet wird [Kim et al., 2012], die Differenzierungsfähigkeit von Zellen in Richtung Osteoblasten misst, schien diese Methode für uns geeignet, um die Differenzierung der Zellen zu beurteilen.

Im Verlauf der 21 Tage konnten wir beobachten, dass die AP-Aktivität bei allen drei Zelllinien deutlich abnahm. Dies war besonders bei den B-MSC der Fall. Es ist bekannt, dass die AP-aktivität, als Marker für die osteogene Differenzierung, nach Abschluss der Proliferationsphase mit einem Peak in der Phase der Reifung, zu Beginn der Bildung von Extrazellulärmatrix (ECM) wieder abnimmt [Lian et al., 1995]. Die Zeit bis zum Beginn der Bildung von ECM soll durchschnittlich 7-14 Tage betragen [Polini et al., 2011]. Da bei unseren Zellen, B-MSC und Osteoblasten, die

AP-Aktivität ab Tag 6 deutlich abnahm, ist eine These, dass die Zellen in den Alginatebeads eine verkürzte Proliferationszeit zeigen und schneller ECM produzieren. Bei den SCP-Zellen konnten wir schon zu Beginn der Kultivierungszeit kaum AP-Aktivität nachweisen, was jedoch nicht bedeutet, diese hätten sich nicht in Richtung Osteoblasten differenziert, vielmehr liegt die Hypothese nahe, dass die Differenzierung dieser Zellen wesentlich schneller von statten ging und sie zur Zeit der ersten AP-Messung bereits ECM produzierten. Diese These wird durch den gleichzeitigen Vergleich mit der Mineralisierung der Alginatebeads gestützt. Ein weiteres Zeichen für die Differenzierung von Zellen in Richtung Osteoblasten ist die Produktion von mineralisierter ECM [Lian et al., 1995].

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die AP-Aktivität der Osteoblasten bei fehlender Mineralisierung nicht absinkt. Ebenso wie die Mineralisierung erst mit Absinken der AP-Aktivität beginnt, ergo im Anschluss an die Reifungsphase der Zellen [Lian et al., 1995].



**Abbildung 44: Phasen der Zellreifung, Verlauf der AP-Aktivität im Vergleich zur Mineralisierung der ECM modifiziert nach [Lian et al., 1995]**



## **6.6 Mineralisierung der Alginatbeads - Alizarin-Rot-Färbung und Graustufenanalyse**

Auch die Alizarin-Rot-Färbung ist eine altbewährte Methode. Sie ermöglicht die Messung der Mineralisierung beziehungsweise des Calciumgehaltes [Gregory et al., 2004, Paul et al., 1983].

Da der Prozess der Mineralisierung ein Marker, sowohl für die Funktion reifer Osteoblasten ist, als auch den Reifezustand ihres Kulturzustandes widerspiegelt [Wang et al., 2006], schien uns diese Methode zur Überprüfung der Entwicklung und Reifung der Zellen in den Beads geeignet. Des Weiteren erlaubte uns diese Methode die Interaktion der Zellen mit dem Alginat nachzuvollziehen und zu quantifizieren, in wie weit sowohl das Calciumphosphat als auch die Zellen eine Mineralisierung der Beads bewirken.

Um auch einen visuellen Eindruck der Zellentwicklung innerhalb der Beads zu erhalten, wurden von uns zu festgelegten Zeitpunkten lichtmikroskopische Aufnahmen gefertigt. Dies ermöglichte den Vergleich der Mineralisierung anhand der Braunverfärbung der Beads bzw. durch Bildinversion und Graustufenanalyse. An dieser Stelle muss allerdings bemerkt werden, dass diese Aufnahmen nur einen partiellen Eindruck erlauben, da es sich bei den Aufnahmen um 2-D Bilder handelt, die Beads allerdings eine 3-D Zellkultur darstellen.

Die Untersuchung beziehungsweise die Beurteilung des Mineralisierungsgehaltes der Alginatbeads stellte sich in unserer Arbeit als nicht einfach heraus. Die Ergebnisse der Alizarin-Rot-Färbung zeigten Unterschiede in der Mineralisierung ab Tag 16 der Kultivierungszeit und für Tag 21 den höchsten Mineralisierungsgrad der Beads mit Osteoblasten, gefolgt von denjenigen mit B-MSc, dies jedoch ohne statistische Signifikanz. Der statistische Vergleich Alginatbeads der einzelnen Zelllinien im Verlauf der 21 Tage zeigt für die B-MSc-Beads einen statistisch signifikanten Verlauf, für die OSÜ-Beads allerdings keine statistische Signifikanz. Bei dem Vergleich der Anfangs- und Endpunkte der Alginatbeads der verschiedenen Zelllinien gegeneinander zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei den B-MSc-Beads (Tag 1 vs. 21) sowie bei den OSÜ-Beads (Tag 1 vs. 21). Diese, auf den ersten Blick widersprüchliche Aussage, die Ergebnisse der OSÜ-Beads betreffend, erklärt

sich bei näherer Betrachtung der p-Werte. Diese zeigen sich bei der Auswertung des Verlaufes nur knapp über der Signifikanzgrenze mit  $p = 0,055$ . Die Alginatebeads der SCP-Zellen zeigen sowohl im Verlauf der 21 Tage, als auch bei dem Vergleich des Anfangs- und Endpunktes keinen signifikanten Unterschied in ihrer Mineralisierungszunahme. Bei dem Vergleich mit den Kontrollen (leere Alginatebeads), bestätigt sich diese Aussage.

Bei dem statistischen Vergleich der Endpunkte (Tag 21) der Alginatebeads der verschiedenen Zelllinien, zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich allerdings bei dem Vergleich der Endpunkte der Alginatebeads der Zelllinien mit den leeren Alginatebeads. Die Interpretation dieser Ergebnisse legt nahe, dass die Mineralisierungsunterschiede nur geringfügig sind, wobei die Beads mit SCP-Zellen verglichen mit B-MSC-Beads und OSÜ-Beads am geringsten mineralisieren.

Dieses Ergebnis widerspricht dem Ergebnis unserer Graustufenanalyse, bei dem die B-MSC-Beads die stärkste Mineralisierung aufweisen, gefolgt von den Beads mit SCP-Zellen. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen ist auch zu sehen, dass die Alginatebeads mit SCP-Zellen, allerdings spenderabhängig, bereits an Tag 5 eine deutliche Mineralisierung zeigen. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen ARS-Färbung und Graustufenanalyse können u.a. darauf zurückgeführt werden, dass bei der Graustufenanalyse für die verschiedenen Tage nur ein 2-D Bild ausgewertet wurde.

Betrachtet man nun die Mineralisierung im Vergleich mit der AP-Aktivität im Verlauf der Kultivierungszeit, lässt das an der Sensitivität der Alizarin-Rot-Färbung zweifeln. Für die Hypothese, dass die SCP-Zellen schon zu Beginn der 21 Tage gereift sind und Extrazellulärmatrix produzieren, sprechen sowohl die Ergebnisse der Messungen der AP-Aktivität als auch die der Graustufenanalyse und Hellfeldlichtmikroskopie. Das gleiche trifft auch auf B-MSC und Osteoblasten zu, deren AP-Aktivität auch eher mit besagten Ergebnissen korreliert als mit denen der ARS-Färbung.

## 6.7 RNA-Isolation aus den Alginatbeads und PCR

Unser Versuch intakte RNA aus den mineralisierten Alginatbeads zu isolieren war leider nicht erfolgreich, folglich war es uns auch nicht möglich, eine weitere Genanalyse der differenzierten Zellen durchzuführen. Vermutlich lag das Problem des Herauslösen der RNA aus den Beads an der nur unvollständigen Auflösung des mineralisierten Alginats, was ein Ansatzpunkt für eine Weiterentwicklung dieser Methode wäre.

Die Knochenheilung ist ein komplexer Prozess, an dem verschiedene Regulationsmechanismen beteiligt sind. Es sind nur sehr wenige Gene bekannt, die spezifisch für Osteoblasten sind, dabei ist Osteocalcin das einzige, das in Osteoblasten und sonst keiner anderen extrazellulärmatrixbildenden Zelle exprimiert wird [Ducy et al., 1997]. Weitere Gene, die während der Knochenbildung gebildet werden, sind beispielsweise Osteopontin oder Osteonectin, welches allerdings in vielen Geweben exprimiert wird [Lian et al., 1992]. Erwähnenswert ist auch der Transkriptionsfaktor *RUNX<sub>2</sub>*, welcher als spezifischer Marker für die osteoblastäre Differenzierung gilt und bei Überexpression die Bildung von Genen wie Osteocalcin oder alkalischer Phosphatase induzieren kann [Hofmann et al., 2009].

Da es uns leider nicht gelang, erfolgreich RNA aus den Alginatbeads zu isolieren, konnten wir diese Gene nicht analysieren und somit unsere mittels beispielsweise Alizarin-Rot gemessenen Ergebnisse überprüfen.

## 6.8 Vergleich der unterschiedlichen Zelllinien im Kontext des Tissue Engineerings mit Alginatbeads

Betrachtet man nun die vorgelegte Studie und Ergebnisse bezüglich der Eignung im Einsatz als Gewebeersatz im Rahmen des Tissue Engineerings, lässt sich folgendes feststellen:

Prinzipiell eignet sich Alginat als 3D-Matrix und ermöglicht ein Zellüberleben von bis zu 21 Tagen. Da sich die hier gezeigten Untersuchungen auf *in vitro* Zellkulturen

beschränkten, lässt sich hinsichtlich des *in vivo* Einsatzes und der Stabilität von Alginat im Einsatz in Knochen noch keine Aussage treffen.

Des Weiteren konnten wir feststellen, dass Hydroxyapatit auch als Ersatz der im Rahmen des Tissue Engineerings verwendeten Wachstumsfaktoren eine Differenzierung der Zellen in Richtung Osteoblasten bewirken kann. Hierbei war natürlich die genaue Analyse, mangels PCR-Gen-Analyse, eingeschränkt.

Hinsichtlich der Zellen lässt sich feststellen, dass alle drei Zelltypen, B-MSC, SCP-Zellen und Osteoblasten den Vorgang des Einkapselns und die Kultivierung in den Alginatbeads überleben. Sowohl B-MSC als auch SCP differenzieren in Richtung Osteoblasten. Da beide Zelllinien innerhalb des Alginatsystems ein Überleben zeigten, stellt sich nun erneut die eingangs gestellte Frage, welcher der Zelltypen nun am besten für den Einsatz im Rahmen des Knochen-Tissue-Engineering geeignet wäre. Zum derzeitigen Stand der Forschungen auf dem Gebiet der gentransfizierten Zellen, wären wohl hinsichtlich des Entartungsrisikos der SCP-Zellen, die B-MSC die Zellen der Wahl für den *in vivo* Einsatz. Des Weiteren konnten wir feststellen, dass diese auch ein besseres Überleben als die SCP-Zellen zeigten. Dieses Ergebnis bedeutet jedoch nicht, dass nicht womöglich in näherer Zukunft die Forschung auf dem Gebiet der Transfizierung beziehungsweise Immortalisierung von Zellen einen weiteren Schritt nach vorne macht und SCP-Zellen in Zukunft tatsächlich die Lösung für das Problem der begrenzten Verfügbarkeit der B-MSC-Zellen werden könnten.

## **6.9 Ausblick**

Da wir in unserer Studie nachweisen konnten, dass ein Überleben und die Differenzierung von Zellen in mineralisierten Alginatbeads möglich ist, dieses jedoch auf 21 Tage beschränkt, gilt es unter anderem die Kultivierungsmethode zu optimieren.

Im Rahmen von Alginat-3D-Zellkulturen besteht zum Beispiel die Möglichkeit die 3D-Zellkultur, die bei uns statisch war, mittels eines dynamischen Bioreaktors während der Kultivierungszeit zu bewegen, was das Überleben der Zellen womöglich optimieren würde [Pound et al., 2007].

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die osteogene Differenzierung und Proliferation hat, ist Kollagen Typ I, welches Bestandteil des menschlichen Knochens ist [Pound et al., 2007]. In einer Studie von 2007 [Pound et al., 2007] wurden Knochenmarksstammzellen in ein Alginat-Chitosan-Scaffold eingekapselt und mit Kollagen Typ I versetzt. Sie zeigten eine erhöhte Differenzierungsfähigkeit.

In diesem Zusammenhang sollte allerdings nicht vergessen werden, dass bei der in vivo Implantation von den Alginatbeads in Knochen, auch Kollagen Typ I vorhanden wäre und somit womöglich ohnehin die Differenzierung der Zellen in den Beads beeinflussen würde.

Für weitere Forschung im Rahmen von Alginatbeads sollte auch der Schritt der RNA-Isolation aus den Beads weiterentwickelt werden, um eine genaue Genanalyse der Zellen zu ermöglichen. Bisher beschrieben ist beispielsweise die Isolation von Hefen aus Alginatbeads mittels Phenol und Stickstoff (N<sub>2</sub>) [Kruckeberg et al., 2009].

Alles in allem ist festzuhalten, dass mineralisiertes Alginat eine Option für das Tissue Engineering von Knochengewebe ist, auch wenn es gilt, in weiteren Studien Techniken und Ergebnisse zu optimieren.

## **6.10 Einschränkungen: Kritische Betrachtung des Studiendesigns und Methodik**

Bei unserer Studie handelt es sich um eine experimentelle Untersuchung von aus intraoperativ gewonnenem Knochen isolierten Osteoblasten sowie Knochenmarksstammzellen. Im Verlauf wurde die Untersuchung auf mittels hTERT immortalisierte Knochenmarksstammzellen ausgedehnt, die uns von Herrn Professor Schieker, Leiter der experimentellen Unfallchirurgie München Innenstadt (LMU), zur Verfügung gestellt wurden.

Besondere Einschlusskriterien für die Zellspender lagen, da es sich um eine Vorläuferstudie handelt, noch nicht vor. Im Genaueren bedeutet das, dass bei unserer Spenderauswahl weder das Alter noch die Knochenqualität der Spender berücksichtigt wurden.

Da die Spenderzahlen in unserer Studie gering gehalten wurden, wurden, um trotzdem eine ausreichende Validität der Daten zu garantieren, die jeweiligen Messungen mehrmals als Einzelmessungen durchgeführt.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Verletzungen mit langstreckigen Knochendefekten stellen ein großes klinisches Problem dar. Die bisherigen Behandlungsmethoden reichten vom Einsatz autologer Knochentransplantation bis hin zum Einsatz von synthetischen oder halbsynthetischen Materialien. Keine dieser bisherigen Methoden löste jedoch das Problem der Knochendefektdeckung zufriedenstellend, da sie entweder bezüglich der Menge des verfügbaren Materials oder aber hinsichtlich ihres Einwachsverhaltens in den Empfängerknochen, Mängel aufzeigten. In diesem Kontext ist die Forschung auf dem Gebiet des Tissue Engineerings verstärkt in den Blickpunkt gerückt.

Aufbauend auf drei Säulen, ist die Idee des Tissue Engineerings die Entstehung von neuem Gewebe auf Grundlage einer Matrix, Zellen sowie Wachstumsfaktoren.

Ziel dieser Arbeit war es:

- a) herauszufinden, ob sich Osteoblasten, mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (B-MSC) und immortalisierte Stammzellen (SCP) in Alginatbeads, einkapseln lassen und diesen Vorgang überleben.
- b) zu überprüfen, wie lange eine Überleben der Zelllinien in den Alginatbeads möglich ist
- c) in einem weiteren Schritt, zu untersuchen ob sich die Zellen in den Alginatbeads differenzieren
- d) ob es zu einer Mineralisierung der Alginatbeads im Verlauf der Kultivierungszeit kommt.
- e) Schließlich, die verschiedenen Zelltypen gegeneinander zu vergleichen, um somit, den hinsichtlich Überleben und Differenzierungsverhalten potentesten Zelltyp herauszufinden.

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Vorläuferstudie, die in Zusammenarbeit mit dem *Nanoinstitut der NTNU Trondheim* den Einsatz von mineralisiertem Alginat als 3D-Scaffold für in vitro generiertes Knochengewebe im Rahmen von Tissue Engineering untersucht.

In unserer Studie wurden humane Stammzellen des Knochenmarks (B-MSK), immortalisierte Stammzellen (SCP) und Osteoblasten in mit Calciumphosphat versetzte Alginatebeads eingekapselt und über einen Zeitraum von 21 Tagen kultiviert.

Die von uns verwendeten Zellen wurden aus Hüftköpfen, welche im Rahmen eines endoprothetischen Gelenkersatzes entfernt wurden, gewonnen. Die mittels hTERT immortalisierten Stammzellen wurden uns von Herrn Professor Schieker, Leiter der experimentellen Unfallchirurgie München Innenstadt (LMU), zur Verfügung gestellt.

Die Alginatebeads dienten als Matrix, welche im Sinne einer 3-D-Zellkultur die Grundlage für das Überleben der Zellen darstellte. Aufgrund der Reaktion von Alginate mit Calciumphosphat kommt es zur Bildung und Interaktion mit Hydroxyapatit, welches als Stimulus für die Zelldifferenzierung dienen sollte.

In regelmäßigen Zeitabständen erfolgte die Beurteilung der Alginatebeads mittels Hellfeldlichtmikroskopie auf Form, Größe, Anzahl und Farbe der Alginatebeads.

Die eingekapselten Zellen wurden mittels Live-Dead-Färbung sowie mittels Alamar-Blau-Assay hinsichtlich ihres Überlebens untersucht.

Die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase diente der Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Hinsichtlich ihres Mineralisierungsverhaltens erfolgte die Untersuchung der Alginatebeads mittels Hellfeldlichtmikroskopie, Graustufenanalyse und Alizarin-Rot-Färbung.

Mittels Alamar-Blau-Assay und der Live-Dead-Färbung gelang es uns, Fragestellung a) und b) klar zu beantworten und nachzuweisen, dass sich die Zellen in die Alginatebeads einkapseln lassen und ein Überleben in den Alginatebeads prinzipiell möglich ist. Für alle Zelltypen konnte ein Überleben von 21 Tagen nachgewiesen werden, wobei die Überlebenden Zellen im Verlauf der Kultivierungszeit abnahmen.

Hervorzuheben ist dabei, dass die B-MSK sowohl den Prozess des Einkapselns als auch die Kultivierungszeit am besten überlebten. [BMSK Tag 1 100% (avSEM 3,4) vs. Tag 21 70% (avSEM 44), OSÜ Tag 1 100% (avSEM 1,2) vs. Tag 21 2% (avSEM 2,4), SCP Tag 1 100% (avSEM 2,1) vs. Tag 21 3% (avSEM 0,9), als signifikant galt  $p < 0,001$ ].

Fragestellung c), betreffend die Differenzierung der Zellen konnten wir mittels Messung der alkalischen-Phosphatase-Aktivität beantworten.

Hier konnten wir zeigen, dass alle Zellen in Richtung Osteoblasten differenzierten, wobei die SCP-Zellen die wahrscheinlich schnellste Differenzierungsfähigkeit aufweisen. [BMSC Tag 1 0,06 (avSEM 0,03) vs. Tag 21 0 (avSEM 0,003), OSÜ Tag 1 0,02 (avSEM 0,009) vs. Tag 21 (avSEM 0 0,007), SCP Tag 1 0 (avSEM 0,0005) vs. Tag 21 0 (avSEM 0,0002), als signifikant galt  $p < 0,05$ ].

Fragestellung d), betreffend das Mineralisierungsverhalten der Alginatbeads konnte mittels Auswertung der Ergebnisse der Alizarin-Rot-Färbung sowie Beurteilung der Ergebnisse der Hellfeld-Lichtmikroskopie beantwortet werden, wobei die Ergebnisse partiell Widersprüche zeigten. Es gelang uns allerdings auch hier in Zusammenhang mit den hellfeldlichtmikroskopischen Ergebnissen die Hypothese aufzustellen, dass sowohl B-MSC als auch Osteoblasten eine geringfügig höhere Mineralisierung zeigen als SCP-Zellen, wobei die Mineralisierung der SCP-Zellen spenderabhängigen Schwankungen unterworfen war. [BMSC Tag1 1,0 (avSEM 0,63) vs. Tag 21 2,2 (avSEM 0,65), OSÜ Tag 1 1,4 (avSEM 0,8) vs. Tag 21 2,8 (avSEM 0,9), SCP Tag1 0,8 (avSEM 0,5) vs. Tag 21 1,3 (avSEM 0,7), Control MSC Tag 1 0,9 (avSEM 0,3) vs. Tag 21 0,02 (avSEM 0,2), Control OST Tag 1 0,6 (avSEM 0,8) vs. Tag 21 0,2 (avSEM 0,3), als signifikant galt  $p < 0,05$ ].

Aufgrund dieser Ergebnisse war es uns abschließend möglich Fragestellung e) wie folgt zu beantworten:

Sowohl B-MSC als auch SCP-Zellen zeigen ein Überleben innerhalb des Alginsystems und differenzieren in Richtung Osteoblasten, wobei jedoch die B-MSC nicht nur den Vorgang des Einkapselns besser überleben, sondern auch im Verlauf der Kultivierungszeit ein besseres Überleben als die SCP-Zellen, zeigten.

Ein weiterer Punkt, welcher bei der Entscheidung, welche Zellen besser für den Einsatz im Tissue Engineering geeignet wären, das Entartungsrisiko der SCP-Zellen, welches zum derzeitigen Stand der Forschung noch nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Dieses Ergebnis bedeutet jedoch nicht, dass nicht womöglich in näherer Zukunft die Forschung auf dem Gebiet der Transfektion beziehungsweise Immortalisierung von Zellen einen weiteren Schritt nach vorne



macht und SCP-Zellen in Zukunft tatsächlich die Lösung für das Problem der begrenzten Verfügbarkeit der B-MSC-Zellen werden könnten.

Ausblick:

Im Rahmen von zukünftigen Studien gilt es, das Überleben der Zellen in den Alginatebeads, vor allem das der SCP-Zellen, zu optimieren. Des Weiteren ist zu untersuchen, in wie weit sich SCP-Zellen für den in vivo-Einsatz eignen und ob sie in Langzeitstudien Mutagenität zeigen.

Betreffend der mineralisierten Alginatematrix sollte in weiteren Studien untersucht werden, ob ihre Stabilität in vivo für den Einsatz als Knochenersatz ausreichend ist.

Letztlich lässt sich sagen, dass mineralisiertes Alginate durchaus das Potential hätte, um im Rahmen von Bone Engineering zum Einsatz zu kommen, allerdings müssen nichts desto trotz unsere bisherigen Methoden weiter optimiert und die Ergebnisse weiter analysiert werden, was den Rahmen dieser Arbeit jedoch sprengen würde.

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Muskuloskelettale Erkrankungen 1993-2009 [WHO, 2012a] .....	3
Abbildung 2: Knochenersatzmaterial aus $\beta$ -Trikalziumphosphat [synthes, 2012a]....	6
Abbildung 3: Knochenersatzmaterial aus Trikalziumphosphat und Hyaluronat [synthes, 2012b] .....	6
Abbildung 4: trianguläres Prinzip des Tissue Engineering.....	8
Abbildung 5: trianguläre Prinzip des Tissue Engineering: beispielhafte Darstellung einer 3-D-Matrix mit Zellen und Wachstumsfaktoren.....	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung der 21 Tage Kultivierungszeit.....	17
Abbildung 7: Osteoblasten in Zellkulturflasche .....	22
Abbildung 8: Falcon Tube mit Interphasenzellgemisch nach Zentrifugation .....	29
Abbildung 9: Bead-Generator unter der Reinbank.....	34
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Multi-needle-head bei der Herstellung von Alginatbeads. Modifiziert nach [Xie et al., 2010] .....	35
Abbildung 11: AP-Standardkurve .....	49
Abbildung 12: Pippetierschema der AP-Standardkurve.....	49
Abbildung 13: Vergleich: hellfeldlichtmikroskopische Aufnahme .....	51
Abbildung 14 Vergleich: für Graustufenanalyse konvertiertes Bild .....	51
Abbildung 15: Alizarin-Rot-Standardkurve.....	54
Abbildung 16: OSÜ Tag 0.....	65
Abbildung 17: OSÜ Tag 5.....	65
Abbildung 18: OSÜ Tag 10.....	65
Abbildung 19: OSÜ Tag 15.....	65
Abbildung 20: OSÜ Tag 21.....	65
Abbildung 21: BMSC 130 Tag 0 .....	66
Abbildung 22: BMSC 130 Tag 5 .....	66
Abbildung 23: BMSC 130 Tag 10 .....	66
Abbildung 24: BMSC Tag 15 .....	66
Abbildung 25: BMSC 130 Tag 21 .....	66
Abbildung 26: SCP IB Tag 0.....	67
Abbildung 27: SCP IB Tag 5.....	67
Abbildung 28: SCP IB Tag 10.....	67

Abbildung 29: SCP IB Tag 15.....	67
Abbildung 30: SCP IB Tag 21.....	67
Abbildung 31 OSÜ 140 Tag 1; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay .....	69
Abbildung 32 OSÜ 140 Tag 10; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay .....	69
Abbildung 33 OSÜ 140 Tag 20, a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay .....	70
Abbildung 34 B-MSC 145 Tag 1; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay .....	71
Abbildung 35 B-MSC 155 Tag 10; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay .....	71
Abbildung 36 B-MSC 145 Tag 20; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay .....	72
Abbildung 37 SCP-IB Tag 1; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay .....	73
Abbildung 38 SCP-I Tag10; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay .....	73
Abbildung 39 SCP-IB Tag 20; a: Live, b: Dead, c: Live-Dead-Overlay .....	74
Abbildung 40: Darstellung der Zellviabilität in Prozent + avSEM .....	77
Abbildung 41: Darstellung der AP-Aktivität über den Verlauf von 21 Tagen.....	79
Abbildung 42: Auswertung der BF-Mikroskopie, Mineralisierung der Beads. ....	81
Abbildung 43 Darstellung der Zellmineralisierung + avSEM im Verlauf der 21 Tage Kultivierungszeit. ....	83
Abbildung 44: Phasen der Zellreifung, Verlauf der AP-Aktivität im Vergleich zur Mineralisierung der ECM modifiziert nach [Lian et al., 1995].....	90

## 9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht: häufigste Knochenersatzmaterialien und Transplantate .....	5
Tabelle 2: Begriffsklärung.....	7
Tabelle 3: Materialien für die Isolierung humaner Osteoblasten.....	19
Tabelle 4: Materialien für das Osteoblastenkulturmedium .....	23
Tabelle 5: Materialien für das Osteoblastendifferenzierungsmedium .....	25
Tabelle 6: Materialien für die Kultivierung humaner Osteoblasten.....	26
Tabelle 7: Materialien für die Isolierung von B-MSC.....	28
Tabelle 8: Materialien zur Herstellung von Stammzellkulturmedium .....	30
Tabelle 9: Materialien zur Herstellung von Stammzellendifferenzierungsmedium.....	31
Tabelle 10: Materialien zur Kultivierung von MSC .....	32
Tabelle 11: Materialien zur Herstellung von Alginatebeads .....	34
Tabelle 12: Materialien zur Herstellung von Alginatebeads.....	36
Tabelle 13: Lösungen zur Herstellung von Alginatebeads.....	36
Tabelle 14: Materialien für die Zellvorbereitung vor dem Einkapseln .....	36
Tabelle 15: Materialien zur Herstellung der NaCl - Lösung .....	37
Tabelle 16: Materialien zur Herstellung der CaCl <sub>2</sub> - Lösung.....	38
Tabelle 17: Materialien zur Herstellung der Alginatelösung.....	38
Tabelle 18 Übersicht über die angewendeten Methoden und deren Ziel.....	42
Tabelle 19: Materialien für die Live-Dead-Färbung.....	44
Tabelle 20: Materialien für den Alamar-Blau-Assay.....	45
Tabelle 21: Materialien zur Messung der AP-Aktivität .....	47
Tabelle 22: Pipettierschema der AP-Standardkurve.....	50
Tabelle 23: Materialien für die ARS-Färbung.....	52
Tabelle 24: Pipettierschema für die Alizarin Rot Staining-Standardkurve.....	54
Tabelle 25: Materialien zum Lösen der Zellen aus den Alginatebeads.....	56
Tabelle 26: Materialien zur Herstellung der Citratlösung .....	57
Tabelle 27: Materialien für die Isolation von RNA aus den Alginatebeads .....	58
Tabelle 28: Materialien für den Test auf die Integrität der RNA.....	60
Tabelle 29: Schematische Darstellung der statistischen Testverfahren .....	62

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

Abdallah, B.M., Haack-Sorensen, M., Burns, J.S., Elsnab, B., Jakob, F., Hokland, P., Kassem, M.

Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation.

Biochemical and biophysical research communications. 326 (2005) 527-538

Augst, A.D., Kong, H.J., Mooney, D.J.

Alginate hydrogels as biomaterials.

Macromolecular bioscience. 6 (2006) 623-633

Baxter, M.A., Wynn, R.F., Jowitt, S.N., Wraith, J.E., Fairbairn, L.J., Bellantuono, I.

Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion.

Stem cells. 22 (2004) 675-682

Bocker, W., Yin, Z., Drosse, I., Haasters, F., Rossmann, O., Wierer, M., Popov, C., Locher, M., Mutschler, W., Docheva, D., 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 (2008) 1347-1359

Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., Wright, W.E.

Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells.

Science. 279 (1998) 349-352

Boker, W., Yin, Z., Drosse, I., Haasters, F., Rossmann, O., Wierer, M., Popov, C., Locher, M., Mutschler, W., Docheva, D., 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 (2008) 1347-1359

Borra, R.C., Lotufo, M.A., Gaglioti, S.M., Barros Fde, M., Andrade, P.M.

A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays.

Brazilian oral research. 23 (2009) 255-262

Bottaro, D.P., Liebmann-Vinson, A., Heidaran, M.A.

Molecular signaling in bioengineered tissue microenvironments.

Annals of the New York Academy of Sciences. 961 (2002) 143-153

Bruder, S.P., Fink, D.J., Caplan, A.I.

Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy.

Journal of cellular biochemistry. 56 (1994) 283-294

- Bruder, S.P., Jaiswal, N., Haynesworth, S.E.  
Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation.  
Journal of cellular biochemistry. 64 (1997) 278-294
- Burg, K.J., Porter, S., Kellam, J.F.  
Biomaterial developments for bone tissue engineering.  
Biomaterials. 21 (2000) 2347-2359
- Calori, G.M., Mazza, E., Colombo, M., Ripamonti, C.  
The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs?  
Injury. 42 Suppl 2 (2011) S56-63
- Coleman, J.E.  
Structure and mechanism of alkaline phosphatase.  
Annual review of biophysics and biomolecular structure. 21 (1992) 441-483
- de Vos, P., Faas, M.M., Strand, B., Calafiore, R.  
Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets.  
Biomaterials. 27 (2006) 5603-5617
- Dessi, M., Raucci, M.G., Zeppetelli, S., Ambrosio, L.  
Design of injectable organic-inorganic hybrid for bone tissue repair.  
Journal of biomedical materials research. Part A. (2012)
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., Karsenty, G.  
Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.  
Cell. 89 (1997) 747-754
- Ehnert, S., Glanemann, M., Schmitt, A., Vogt, S., Shanny, N., Nussler, N.C., Stockle, U., Nussler, A.  
The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality?  
Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. 394 (2009) 985-997
- Ehnert S, H.J., Kerler I, Schmitt A, Olderoy M, Freude T, et al.  
Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe. Die bessere Alternative zu Knochenmarkszellen für das Tissue Engineering von Knochen?  
Regenerative Medizin. (2011)
- El-Amin, S.F., Botchwey, E., Tuli, R., Kofron, M.D., Mesfin, A., Sethuraman, S., Tuan, R.S., Laurencin, C.T.  
Human osteoblast cells: isolation, characterization, and growth on polymers for musculoskeletal tissue engineering.  
Journal of biomedical materials research. Part A. 76 (2006) 439-449
- El-Ghannam, A.  
Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering.  
Expert review of medical devices. 2 (2005) 87-101

Eriksen, E.F.

Cellular mechanisms of bone remodeling.

Reviews in endocrine & metabolic disorders. 11 (2010) 219-227

Fayaz, H.C., Giannoudis, P.V., Vrahas, M.S., Smith, R.M., Moran, C., Pape, H.C., Krettek, C., Jupiter, J.B.

The role of stem cells in fracture healing and nonunion.

International orthopaedics. 35 (2011) 1587-1597

Finkemeier, C.G.

Bone-grafting and bone-graft substitutes.

The Journal of bone and joint surgery. American volume. 84-A (2002) 454-464

Giannoudis, P.V., Dinopoulos, H., Tsiridis, E.

Bone substitutes: an update.

Injury. 36 Suppl 3 (2005) S20-27

Gregory, C.A., Gunn, W.G., Peister, A., Prockop, D.J.

An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction.

Analytical biochemistry. 329 (2004) 77-84

Haberstroh, K., Ritter, K., Kuschnierz, J., Bormann, K.H., Kaps, C., Carvalho, C., Mulhaupt, R., Sittinger, M., Gellrich, N.C.

Bone repair by cell-seeded 3D-bioplotting composite scaffolds made of collagen treated tricalciumphosphate or tricalciumphosphate-chitosan-collagen hydrogel or PLGA in ovine critical-sized calvarial defects.

Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials. 93 (2010) 520-530

Harley, C.B.

Telomerase is not an oncogene.

Oncogene. 21 (2002) 494-502

Heinemann, S., Gelinsky, M., Worch, H., Hanke, T.

[Resorbable bone substitution materials: An overview of commercially available materials and new approaches in the field of composites].

Der Orthopade. 40 (2011) 761-773

Hofmann, A., Mattyasovszky, S.G., Bruning, C., Ritz, U., Mehling, I., Meurer, A., Rommens, P.M.

[Osteoblasts : cellular and molecular regulatory mechanisms in fracture healing].

Der Orthopade. 38 (2009) 1009-1019

Holzer, N., Braun, K.F., Ehnert, S., Egana, J.T., Schenck, T.L., Buchholz, A., Schyschka, L., Neumaier, M., Benzing, S., Stockle, U., Freude, T., Nussler, A.K.

Green tea protects human osteoblasts from cigarette smoke-induced injury: possible clinical implication.

Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie. (2011)

- Hunt, N.C., Grover, L.M.  
Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine.  
Biotechnology letters. 32 (2010) 733-742
- Hwang, C.M., Sant, S., Masaeli, M., Kachouie, N.N., Zamanian, B., Lee, S.H., Khademhosseini, A.  
Fabrication of three-dimensional porous cell-laden hydrogel for tissue engineering.  
Biofabrication. 2 (2010) 035003
- Kassem, M., Abdallah, B.M., Yu, Z., Ditzel, N., Burns, J.S.  
The use of hTERT-immortalized cells in tissue engineering.  
Cytotechnology. 45 (2004) 39-46
- Kim, J.L., Park, S.H., Jeong, D., Nam, J.S., Kang, Y.H.  
Osteogenic activity of silymarin through enhancement of alkaline phosphatase and osteocalcin in osteoblasts and tibia-fractured mice.  
Experimental biology and medicine. 237 (2012) 417-428
- Kolambkar, Y.M., Dupont, K.M., Boerckel, J.D., Huebsch, N., Mooney, D.J., Hutmacher, D.W., Guldberg, R.E.  
An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects.  
Biomaterials. 32 (2011) 65-74
- Krishnamurthy, N.V., Gimi, B.  
Encapsulated cell grafts to treat cellular deficiencies and dysfunction.  
Critical reviews in biomedical engineering. 39 (2011) 473-491
- Kruckeberg, A.L., Nagarajan, S., McInerney, K., Rosenzweig, F.  
Extraction of RNA from Ca-alginate-encapsulated yeast for transcriptional profiling.  
Analytical biochemistry. 391 (2009) 160-162
- Leal-Egana, A., Braumann, U.D., Diaz-Cuenca, A., Nowicki, M., Bader, A.  
Determination of pore size distribution at the cell-hydrogel interface.  
Journal of nanobiotechnology. 9 (2011) 24
- Lian, J.B., Stein, G.S.  
Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation.  
Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists. 3 (1992) 269-305
- Lian, J.B., Stein, G.S.  
Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation.  
The Iowa orthopaedic journal. 15 (1995) 118-140
- Lim, F., Sun, A.M.  
Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas.  
Science. 210 (1980) 908-910



- Liu, X., Smith, L.A., Hu, J., Ma, P.X.  
Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering.  
Biomaterials. 30 (2009) 2252-2258
- Mc. Gee-Russell, S.  
Histochemical methods for calcium.  
The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society. 6 (1958) 22-42
- Meyer, U., Joos, U., Wiesmann, H.P.  
Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part III.  
International journal of oral and maxillofacial surgery. 33 (2004) 635-641
- Morais, J.M., Papadimitrakopoulos, F., Burgess, D.J.  
Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response.  
The AAPS journal. 12 (2010) 188-196
- Morch, Y.A., Donati, I., Strand, B.L., Skjak-Braek, G.  
Effect of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, and Sr<sup>2+</sup> on alginate microbeads.  
Biomacromolecules. 7 (2006) 1471-1480
- Moreau, J.L., Xu, H.H.  
Mesenchymal stem cell proliferation and differentiation on an injectable calcium phosphate-chitosan composite scaffold.  
Biomaterials. 30 (2009) 2675-2682
- Olderoy, M.O., Xie, M., Andreassen, J.P., Strand, B.L., Zhang, Z., Sikorski, P.  
Viscoelastic properties of mineralized alginate hydrogel beads.  
Journal of materials science. Materials in medicine. (2012)
- Paul, H., Reginato, A.J., Schumacher, H.R.  
Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid.  
Arthritis and rheumatism. 26 (1983) 191-200
- Pawar, S.N., Edgar, K.J.  
Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications.  
Biomaterials. 33 (2012) 3279-3305
- Polini, A., Pisignano, D., Parodi, M., Quarto, R., Scaglione, S.  
Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors.  
PloS one. 6 (2011) e26211
- Popp, J.R., Laffin, K.E., Love, B.J., Goldstein, A.S.  
In vitro evaluation of osteoblastic differentiation on amorphous calcium phosphate-decorated poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds.  
Journal of tissue engineering and regenerative medicine. (2010)

- Porter, J.R., Ruckh, T.T., Popat, K.C.  
Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies.  
Biotechnology progress. 25 (2009) 1539-1560
- Pound, J.C., Green, D.W., Roach, H.I., Mann, S., Oreffo, R.O.  
An ex vivo model for chondrogenesis and osteogenesis.  
Biomaterials. 28 (2007) 2839-2849
- Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., Boccaccini, A.R.  
Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering.  
Biomaterials. 27 (2006) 3413-3431
- Robey, P.G., Termine, J.D.  
Human bone cells in vitro.  
Calcified tissue international. 37 (1985) 453-460
- Rokstad, A.M., Donati, I., Borgogna, M., Oberholzer, J., Strand, B.L., Espevik, T., Skjak-Braek, G.  
Cell-compatible covalently reinforced beads obtained from a chemoenzymatically engineered alginate.  
Biomaterials. 27 (2006) 4726-4737
- Rokstad, A.M., Kulseng, B., Strand, B.L., Skjak-Braek, G., Espevik, T.  
Transplantation of alginate microcapsules with proliferating cells in mice: capsular overgrowth and survival of encapsulated cells of mice and human origin.  
Annals of the New York Academy of Sciences. 944 (2001) 216-225
- Schaefer, D.J., Klemt, C., Zhang, X.H., Stark, G.B.  
[Tissue engineering with mesenchymal stem cells for cartilage and bone regeneration].  
Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin. 71 (2000) 1001-1008
- Schmidt-Rohlfing, B., Tzioupis, C., Menzel, C.L., Pape, H.C.  
[Tissue engineering of bone tissue. Principles and clinical applications].  
Der Unfallchirurg. 112 (2009) 785-794; quiz 795
- Shapiro, L., Cohen, S.  
Novel alginate sponges for cell culture and transplantation.  
Biomaterials. 18 (1997) 583-590
- Shearman, M.S., Hawtin, S.R., Tailor, V.J.  
The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides.  
Journal of neurochemistry. 65 (1995) 218-227
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R.  
New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening.  
Journal of the National Cancer Institute. 82 (1990) 1107-1112

Stanford, C.M., Jacobson, P.A., Eanes, E.D., Lembke, L.A., Midura, R.J.  
Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP).  
The Journal of biological chemistry. 270 (1995) 9420-9428

Stevens, M.M., George, J.H.  
Exploring and engineering the cell surface interface.  
Science. 310 (2005) 1135-1138

synthes

Bild: chronOS (2012a)  
<http://www.synthes.com/sites/intl/DE/Products/Biomaterials/Trauma/Pages/chronOS.aspx>

synthes

Bild: chronOS Putty (2012b)  
<http://www.synthes.com/sites/intl/Products/Biomaterials/Trauma/Pages/chronOS-Putty.aspx>

Theler, J.M.

Bone tissue substitutes and replacements.  
Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery. 19 (2011) 317-322

Thomson, R.C., Yaszemski, M.J., Powers, J.M., Mikos, A.G.  
Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone.  
Journal of biomaterials science. Polymer edition. 7 (1995) 23-38

Unger, R.E., Halstenberg, S., Gunther, H., Sartoris, A., Brochhausen, C., Kirkpatrick, C.J.

[In vitro trials with single and co-cultures of osteoblasts and endothelial cells :  
evaluation of new biomaterials for bone reconstruction and regeneration].

Der Orthopade. 38 (2009) 1020-1028

Wang, Y.H., Liu, Y., Maye, P., Rowe, D.W.

Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using  
fluorescent dyes.

Biotechnology progress. 22 (2006) 1697-1701

Whang, K., Tsai, D.C., Nam, E.K., Aitken, M., Sprague, S.M., Patel, P.K., Healy, K.E.

Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer  
scaffolds.

Journal of biomedical materials research. 42 (1998) 491-499

WHO

Bild: Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems in Deutschland.

(2012a) <http://data.euro.who.int/hfadb/linecharts/linechart.php?w=1366&h=1768>

WHO

Muskuloskelettale Erkrankungen.

[http://data.euro.who.int/hfadb/linecharts/drawlchart.php?id=lchart\\_383725001336741443&ind=2531&w=1024&h=576&xpt=-1](http://data.euro.who.int/hfadb/linecharts/drawlchart.php?id=lchart_383725001336741443&ind=2531&w=1024&h=576&xpt=-1). (2012b)

Wulsten, D., Glatt, V., Ellinghaus, A., Schmidt-Bleek, K., Petersen, A., Schell, H., Lienau, J., Sebald, W., Ploger, F., Seemann, P., Duda, G.N.  
Time kinetics of bone defect healing in response to BMP-2 and GDF-5 characterised by in vivo biomechanics.  
European cells & materials. 21 (2011) 177-192

Xiao, Y., Mareddy, S., Crawford, R.  
Clonal characterization of bone marrow derived stem cells and their application for bone regeneration.  
International journal of oral science. 2 (2010) 127-135

Xie, M., Olderoy, M.O., Andreassen, J.P., Selbach, S.M., Strand, B.L., Sikorski, P.  
Alginate-controlled formation of nanoscale calcium carbonate and hydroxyapatite mineral phase within hydrogel networks.  
Acta biomaterialia. 6 (2010) 3665-3675

Yang, J., Nagavarapu, U., Relloma, K., Sjaastad, M.D., Moss, W.C., Passaniti, A., Herron, G.S.  
Telomerized human microvasculature is functional in vivo.  
Nature biotechnology. 19 (2001) 219-224

## 11.DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Nüssler bedanken, welcher mir diese Arbeit ermöglichte und das Thema überließ. Weiter möchte ich mich auch bei Dr. Sabrina Ehnert bedanken, welche uns in die Grundsätze des experimentellen Arbeitens einführte.

Mein ausdrücklicher Dank gilt weiter Herrn Prof. Dr. Peter Biberthaler, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie der TU-München, für seine allzeit wohlwollende klinische und wissenschaftliche Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich auch meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Dr. van Griensven, danken, der zu meinem Doktorvater wurde, diese Arbeit bis zum Schluss geduldig und hilfsbereit begleitete und ohne dessen Unterstützung diese nicht fertig geworden wäre.

Weiter möchte ich mich ganz herzlich bei unseren norwegischen Kooperationspartnern des Nanoinstitutes *der NTNU\_Trondheim* und hier insbesondere bei Magnus Olderoy, welcher uns vor allem in der Anfangsphase der experimentellen Arbeit, in diese einführte, bedanken,

Besonders hervorheben möchte ich die stetige Unterstützung durch das Team der unfallchirurgischen Forschung, die immer mit Rat und Tat zur Seite standen und einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung dieser Arbeit leisteten.

Auch möchte ich mich bei meinem Co-Doktoranden, Volker Hofer, für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Abschließend möchte ich mich noch bei Skippi (W.M.\*11.02.1961, † 23.08.2013) bedanken, dem diese Arbeit gewidmet ist und der die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben konnte- (ohne weitere Worte, denn diesen sind Grenzen gesetzt).