

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff)

**Vergleichende Untersuchungen zur Osteoinduktivität verschiedener Stammzelltypen in Kombination mit genaktivierter Matrix an einem critical size Knochendefekt der Ratte mittels bildgebender Verfahren**

Marko Boškov

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Dr. Andreas Kolk
2. apl. Prof. Dr. Christian Plank

Die Dissertation wurde am 19.10.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.07.2019 angenommen.

*Meinem Großvater*

## **Abstract**

Up to date, bone defects of certain dimensions can only be covered by autologous bone transplants. However, the use of recombinant growth factors for bone regeneration is associated with several obstacles, the reason why it is approved for only few clinical settings. The alternative non-viral gene transfer of BMP-2 encoding DNA to stimulate cellular BMP-2 production carries immunogenic and carcinogenic risks due to the transient integration of DNA into the host's genome. These effects can be avoided by using mRNA, which must be chemically modified in order to increase its half-life period and therapeutic efficiency. Goal of this study was to analyse the osteogenic effects of a chemically modified mRNA (cmRNA) with and without stem cells of different origins.

Collagen sponges were implanted into critical size defects (CSD) of 5 mm diameter in the mandibles of rats. Before implantation, the sponges were coated with different concentrations of cmRNA or left uncoated.

Additionally, the osteoinductive effect of stem cells was analysed by injecting solutions of two different types of stem cells -mesenchymal stem cells (MSC) and adipose tissue derived stem cells (ADSC) - into the collagen sponges *in vivo*. Results were evaluated by X-ray and micro-computed tomography.

Therapy groups with high cmRNA doses showed no significant osteoinductive effects compared to those with lower concentrations. Groups with low cmRNA dosages demonstrated high osteoinductive capacity, even complete bone ingrowth when stem cells were applied additionally. ADSCs proved a higher osteoinductive effect compared to MSCs. A higher increase in bone volume was measured for the stem cells groups.

The positive interactions of gene therapy and stem cells demonstrate the feasibility and the therapeutic potential of the method applied in this study. Interestingly, ADSCs showed higher osteoinductive capacity compared to MSCs *in vivo*, although they were more difficult to handle *in vitro*.

This proof of principle study serves as a basis for the clinical applicability of cmRNA in the field of bone regeneration. It is to be discussed, whether stem cell application *in vivo* is advantageous to scaffold coating with stem cells *ex vivo*.

In conclusion, cmRNA and stem cells can be used as a combination coating for scaffolds containing clinically advanced material combinations for accelerated osseointegration.

## **Abstract**

Bisher lassen sich größere Knochendefekte nur durch autologe Knochentransplantate decken. Die Verwendung rekombinanter Wachstumsfaktoren zur Knochenregeneration ist aufgrund ihres Nebenwirkungsprofils jedoch in ihrer klinischen Einsetzbarkeit limitiert. Der alternative nicht-virale Gentransfer von BMP-2 kodierender DNA zur Stimulation der zellulären BMP-2-Produktion birgt immunogene und karzinogene Risiken durch die vorübergehende Integration der DNA ins Wirtsgenom. Dieser Effekt kann durch den Einsatz von mRNA vermieden werden, die chemisch modifiziert werden muss, um ihre Halbwertszeit und therapeutische Effizienz zu erhöhen. Das osteogene Differenzierungspotential von Stammzellen soll den therapeutischen Effekt weiter unterstützen.

Kollagenschwämme wurden in kritische Knochendefekte (CSD) von 5 mm Durchmesser in den Unterkiefer von Ratten implantiert. Präoperativ wurden die Schwämme mit verschiedenen Konzentrationen von cmRNA beschichtet bzw. unbeschichtet belassen. Zusätzlich wurden Lösungen mesenchymaler Stammzellen (MSC) und aus Fettgewebe gewonnener Stammzellen (ADSC) *in vivo* in die Kollagenschwämme injiziert. Die Auswertung erfolgte mittels Röntgen und Mikrocomputertomographie.

Im Tierexperiment zeigte die mittlere cmRNA Dosis eine gegenüber den anderen Gruppen signifikant gesteigerte, im zeitlichen Verlauf kontinuierliche Durchbauung des Knochendefektes. Ebenso zeigte sich eine deutlich gesteigerte Knochenneubildungsrate in der Kombinationstherapie. Bei den Stammzellgruppen wurde ein höherer Anstieg des Knochenvolumens gemessen.

Die positiven Wechselwirkungen von Gentherapie und Stammzellen zeigen das therapeutische Potenzial der in dieser Studie angewandten Methode. Interessanterweise zeigten ADSCs eine höhere osteoinduktive Kapazität als MSCs *in vivo*, obwohl sie *in vitro* schwieriger zu handhaben waren. Diese Proof of Principle Studie dient als Grundlage für den klinischen Einsatz der cmRNA im Bereich der Knochenregeneration. Zu diskutieren ist, ob die Anwendung von Stammzellen *in vivo* gegenüber der Materialbeschichtung mit Stammzellen *ex vivo* vorteilhaft ist. Stammzellen und cmRNA können als Kombinationsbeschichtung für Knochenersatzmaterialien die Osseointegration beschleunigen.

1	Einleitung.....	1
1.1	Knochen.....	3
1.1.1	Zusammensetzung und Funktion.....	3
1.1.2	Bildung.....	4
1.1.3	Regeneration und Defektheilung.....	5
1.1.4	Knochenassoziierte Wachstumsfaktoren.....	6
1.1.5	Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2).....	7
1.2	Die Rolle von Stammzellen in der Knochenneubildung und -heilung.....	8
1.2.1	Mesenchymale Stammzellen.....	9
1.2.2	Adipozytäre Stammzellen.....	10
1.3	Gentherapie.....	11
1.3.1	Transduktion durch virale Vektoren.....	12
1.3.2	Transfektion durch non-viralen Gentransfer.....	13
1.3.3	Das Prinzip der chemisch modifizierten messenger RNA (cmRNA).....	14
1.4	Tissue Engineering.....	15
1.5	Zielsetzung und Hypothese.....	17
1.5.1	Zielsetzung und Fragestellung.....	17
1.5.2	Hypothese.....	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Aufbau der Studie.....	19
2.2	Material.....	21
2.2.1	Kulturmedien.....	21
2.2.2	Genvektor- und Implantatherstellung.....	22
2.2.3	Stammzellen.....	23
2.2.4	OP-Ausstattung, Tierhaltung und Tierversuch.....	23
2.2.5	Geräte.....	24
2.3	Methoden <i>in vitro</i> .....	24
2.3.1	Vorbereitung und Herstellung der Implantate.....	24
2.3.1.1	Herstellung der cmRNA.....	24
2.3.1.1.1	Qualitätskontrolle der cmRNA (Gelelektrophorese).....	25
2.3.1.2	Herstellung des Genvektors.....	25
2.3.1.3	Beschichtung der Kollagenschwämme.....	25
2.3.2	Zellkultur.....	26
2.3.2.1	Zellkultur und Zählung.....	26

2.3.2.2 Vorbereitung der Zellsuspension .....	27
2.4 Methoden <i>in vivo</i> - Tierversuch .....	29
2.4.1 Gruppeneinteilung .....	29
2.4.2 Tierhaltung und Ernährung.....	30
2.4.3 Operation und Critical Size Defect .....	31
2.4.3.1 Perioperatives Handling .....	31
2.4.3.2 Operatives Vorgehen .....	31
2.4.4 Präparation der Explantate.....	32
2.5 Auswertung .....	33
2.5.1 Konventionelle Radiologie .....	33
2.5.2 Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT).....	33
2.6 Datenanalyse.....	36
3 Ergebnisse.....	38
3.1 Auswertungen der Kontrollgruppe.....	38
3.2 Auswertungen der Therapiegruppen mit cmRNA <sub>BMP-2</sub> .....	39
3.3 Auswertungen der Therapiegruppen mit Stammzellen .....	40
3.3.1 Einzeltherapie mit Stammzellen.....	40
3.3.2 Kombinationstherapie mit cmRNA <sub>BMP-2</sub> und Stammzellen .....	41
3.4 Kombinationstherapie von cmRNA und Stammzellen nach 14 Tagen .....	47
4 Diskussion.....	48
5 Zusammenfassung.....	68
6 Anhang .....	70
6.1 Literaturverzeichnis .....	70
6.2 Tabellenverzeichnis .....	83
6.3 Abbildungsverzeichnis.....	84
7 Danksagung.....	85
8 Curriculum vitae.....	86

**Abkürzungsverzeichnis**

%	Prozent
‰	Promille
°C	Grad Celsius
α-MEM	alpha Minimum Essential Medium
β-TCP	Beta-Tricalcium-Phosphat
μCT	Mikro-Computertomographie
ADSC	Adipose Tissue Derived Stem Cells; Adipozytäre Stammzellen
AP-1	Activator Protein 1
ARCA	Anti-reverse Cap Analogon
ATP	Adenosintriphosphat
BHA	Beam Hardening Effect
BMC	Bone Mineral Content
BMP	Bone Morphogenetic Protein
- pBMP	Plasmid-BMP
- rhBMP	rekombinantes humanes BMP
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Bone Volume; Neu gebildeter Knochen
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	Hydroxylapatit; s. HA
CCD	Charge-coupled Device
CCL3	CC-Chemokin-Ligand 3
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COL1A2	Alpha-2-Typ-I-Kollagen
CSD	Critical Size Defect; Defekt kritischer Größe
CTP	Cytosintriphosphat
CXCL 12	CXC-Motiv-Chemokin 12
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMG-PEG	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycerol-Methoxypolyethylen Glykol
DNA	Desoxyribonucleic Acid; Desoxyribonukleinsäure
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-Phosphocholin

---

ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
- µg	Mikrogramm
- kg	Kilogramm
- mg	Milligramm
GAM	Genaktivierte Matrix
GH	Growth Hormone; Wachstumshormon
GTP	Guanosintriphosphat
IGF-I	Insulin-like Growth Factor-I
HA	Hydroxylapatit
H <sub>2</sub> O	Wasser
IVT	<i>in vitro</i> Transkriptionsmischung
JAK	Januskinase
kba	kilo-Basen
Da	Dalton
- kDa	kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
kV	kilo-Volt
l	Liter
- µl	Mikroliter
- ml	Milliliter
LMO	LIM-domain only
min	Minute
M	Molar
- mM	milli-Molar
m	Meter
- µm	Mikrometer
- cm	Zentimeter
- cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
- mm	Millimeter
- mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mA	milli-Ampère
mbar	millibar
MMP	Matrix-Metalloproteinasen

---

MTF	Modulation Transfer Function
MSC	Mesenchymal Stem Cells; Mesenchymale Stammzellen
NaCl	Natriumchlorid
N/P	Stickstoff-Phosphat Quotient
PAX3	Paired Box 3
PBS	Phosphate Buffered Saline
- DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin-Komplex
PGF-BB	Platelet-derived growth factor BB
PROCOP	Protective Copolymer
PRR	Pattern-Recognition Receptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
RNA	Ribonucleic Acid; Ribonukleinsäure
- cmRNA	chemically modified messenger RNA;
- miRNA	chemisch modifizierte messenger RNA
- mRNA	micro RNA
	messenger RNA
ROI	Region of Interest
rpm	revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute
RUNX2	Runt-related Transcription Factor 2
sec	Sekunde
- ms	Millisekunde
SC	Stammzellen
SCID	Severe Combined Immunodeficiency; schwerer kombinierter Immundefekt
SPI1	Transkriptionsfaktor PU.1
STAT3	Signal Transducers and Activators of Transcription
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll-like Rezeptor
TMD	Tissue Mineral Density
TV	Tissue Volume

UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Wingless Int-1
ZNF45	Zinc Finger Protein 45

## **1 Einleitung**

Knochendefekte und ihre Heilung stellen eine große Herausforderung im Bereich der modernen plastisch-rekonstruktiven, orthopädischen und Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie dar (Meyer et al., 2006). So sieht sich die rekonstruktive Chirurgie vor der Aufgabe, den Regenerationsprozess zu unterstützen bzw. Knochendefekte vollständig zu rekonstruieren. Typischerweise finden dabei autologe und allogene Transplantate sowie alloplastische Implantate Anwendung.

Der Einsatz autologer Transplantate jedoch birgt den erheblichen Nachteil des begrenzten Angebots an Ersatzgewebe, teilweise hohen Aufwands und der Schaffung eines neuen Defektes an der Entnahmestelle (Donor Site). Dies führt zur Verzögerung der Rekonvaleszenz und induziert nicht zuletzt weitere Komplikationen wie Infektionen, Blutung, chronische Schmerzen (Ebraheim et al., 2001, St John et al., 2003, Banwart et al., 1995) und, daraus folgend, eine schlechte Heilungstendenz. Zudem weisen Patienten, die eines Gewebeersatzes bedürfen, gerade im cranio-maxillofazialen Bereich oft schlechte vaskuläre Verhältnisse auf, bedingt durch Vorerkrankungen oder Vorbehandlungen wie Bestrahlung oder Chemotherapie. Die Rekonstruktion von Knochendefekten durch autologe Transplantation ist vor diesem Hintergrund oft nicht mehr als Therapie der Wahl anzusehen (Meyer et al., 2006).

Eine Alternative hierzu bieten Biomaterialien in Form von alloplastischen dentalen Implantaten, Totalendoprothesen oder Stents, um einige Beispiele zu nennen. Biomaterialien ersetzen Organe, Gewebe oder Körperfunktionen durch ihre Interaktion mit dem Organismus (Williams, 2009).

Gerade für die Implantation dentaler Implantate müssen die umgebenden Hart- und Weichgewebe optimale Verhältnisse an Volumen und Qualität bieten, um einen dauerhaften Erfolg zu gewährleisten (Mittal et al., 2016). Diese Grundvoraussetzungen sind jedoch, wie oben beschrieben, aufgrund etwaiger Vorerkrankungen und damit einhergehender Therapien wie Bestrahlung, Chemotherapie oder bereits stattgehabter Operationen häufig nicht gegeben. Es findet sich ein geschwächtes Lagergewebe vor, welches die Voraussetzungen für den Therapieerfolg nicht erfüllt oder diesen sogar verhindert.

Inadäquate Knochenverhältnisse lassen sich durch unterschiedliche Rekonstruktions- und Augmentationsverfahren korrigieren und den Implantatbereich optimieren (Mittal et al., 2016, Bhumiratana and Vunjak-Novakovic, 2012).

Die moderne rekonstruktive Chirurgie bietet zahlreiche Möglichkeiten des Gewebeersatzes. Hierbei stehen Funktion und Ästhetik gleichermaßen im Vordergrund, da Knochenverlust und -deformitäten gerade im Gesichtsbereich für die Patienten nicht selten auch ein psychologisches Trauma darstellen. Die beschriebenen Nachteile und Schwachstellen des autologen Gewebeersatzes lassen sich durch den Einsatz von Tissue Engineering umgehen (Habal, 2004, Meyer and Wiesmann, 2005). Nach Reddi (Reddi, 2000) kommt dabei den drei Hauptkomponenten des Gewebewachstums und deren Zusammenspiel eine Schlüsselrolle zu: Intrazelluläre Induktionssignale, Besiedelung durch Stammzellen und die extrazelluläre Matrix.

In den letzten Jahrzehnten hat sich die rekonstruktive Medizin das Konzept des Tissue Engineering zunutze gemacht. Trotz weitreichender Entwicklungen, gerade für Gewebe wie Haut (Amini et al., 2012) konnte bisher kein Gewebeersatz entwickelt werden, welcher in der Lage ist, größere Defekte des Knochens, mit seiner weitaus komplexeren Struktur, insbesondere nach Trauma oder operativer Malignomtherapie nicht nur zu decken, sondern auch zu ersetzen und sich vollständig in das umgebende Gewebe dauerhaft zu integrieren. Somit gilt es, Biomaterialien zu entwickeln, welche das fehlende Gewebe nicht nur ersetzen, sondern auch dessen Regeneration durch exogene Impulse beschleunigen und aktiv unterstützen.

Klinisch eingesetzt werden derzeit mit rekombinanten Wachstumsfaktoren und deren Plasmiden beschichtete Implantate (Deppe et al., 2003, Lamberg et al., 2006, Schillinger et al., 2008). Erhebliche Nachteile dieser Technologie sind jedoch deren zeitlich limitierte Verfügbarkeit durch geringe Halbwertszeiten und der damit verbundene hohe Kostenfaktor (Fischer et al., 2011, Smeets et al., 2009). Die dadurch erforderliche wiederholte Applikation rekombinanter Wachstumsfaktoren hat neben dem hohen Kostenfaktor erhebliche unerwünschte systemische Nebenwirkungen zur Folge (Smeets et al., 2009, Bonadio et al., 1999), die eine klinische Etablierung als Therapie der Wahl als nicht praktikabel erscheinen lassen.

Es besteht also weiterhin der Bedarf nach Techniken, welche die Defektregion ersetzen und stützen und zudem deren Regeneration durch dauerhafte und kontrollierte exogene Förderung beschleunigen (Smeets et al., 2011).

Als vorteilhaft erweist sich dabei die Interaktion zwischen den oben beschriebenen Hauptkomponenten mit einer Matrix, die den strukturellen Anforderungen von Knochen und damit einhergehenden starken axialen Belastungen, gerecht wird, der Einsatz von

Wachstumsfaktoren, die kontinuierlich, praktisch unbegrenzt, freigesetzt werden können und die wachstumsfördernden Eigenschaften von Stammzellen.

## **1.1 Knochen**

### **1.1.1 Zusammensetzung und Funktion**

Neben Zahnhartgewebe stellt Knochen das härteste und schwerste Gewebe des menschlichen Körpers dar. Als zentrale Komponente des Stützskeletts ist er dauerhaft Zug-, Druck-, Torsions- und Scherkräften ausgesetzt und befindet sich damit entsprechend seinem Belastungsanspruch in ständigem Umbau.

Knochen besteht zu 65 % aus anorganischen Mineralstoffen, 25 % organischer Matrix und zu 10 % Wasser. Hauptbestandteil des Mineralanteils ist Calcium, welches als nanokristallines Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) vorliegt. Daneben beinhaltet der anorganische Anteil kleine Mengen Magnesium, Karbonat und Phosphorsäure. Die organische Matrix setzt sich zu 95 % aus Kollagen I und V und zu 5 % aus nicht kollagenen Substanzen wie Proteoglykanen, Glykoproteinen, Cytokinen, Serumproteinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren, zu denen auch die BMP-Familie gehört, zusammen, welche zeitlich und räumlich begrenzt interagieren (Young, 2003, Abe et al., 2000, Abiraman et al., 2002, Akizuki et al., 1997, Alden et al., 1999). Neben seiner Stützfunktion dient Knochen der Blutbildung und stellt mit 99 % des im Körper vorhandenen Kalziums einen wichtigen Faktor der Kalziumhomöostase dar.

Die dargelegte strukturelle Zusammensetzung des Knochens ermöglicht es, seinen unterschiedlichen Ansprüchen gerecht zu werden: Seine Biege- und Zugfestigkeit erhält der Knochen durch die spezielle Anordnung von Hydroxylapatit und Kollagenfibrillen, der Mineralanteil vermittelt Druckstabilität (McKibbin, 1978). Das Leichtbauprinzip durch die trajektorielle Bauweise von Knochengewebe aus einer außen gelegenen kompakten Schicht, der Substantia corticalis, und einer innen gelegenen maschenartigen Knochenbälkchenstruktur, Substantia spongiosa, gewährleistet einerseits ein Maximum an Stabilität bei einem Minimum an Material andererseits. Die knochenspezifischen Zellen Osteoblasten und Osteoklasten befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht (Mirtz et al., 2011). Als Knochenbildner steuern Osteoblasten die Mineralisierung und bilden das Osteoid (Felsenberg, 2001). Durch die Sekretion von Kollagen Typ I und weiteren Matrixproteinen synthetisieren aktive, reife Osteoblasten die Knochenmatrix

(Clarke, 2008). 20 % der Osteoblasten differenzieren während der Knochenbildung zu Osteozyten und unterstützen damit die Knochenstruktur und den –stoffwechsel (Clarke, 2008). Mit fortschreitendem Knochenanbau werden die Zellen in den mineralisierten Knochen integriert (Felsenberg, 2001). Eine charakteristische Eigenschaft von Knochen ist die Fähigkeit zur vollständigen organotypischen Regeneration – Restitutio ad integrum - wobei Defekte durch neu gebildeten Knochen statt durch Narbengewebe ersetzt werden (McKibbin, 1978, Salgado et al., 2004).

### **1.1.2 Bildung**

Die Knochenbildung erfolgt durch direkte, desmale, und indirekte, chondrale Ossifikation. Während bei der ersten Form Knochen aus dem mesenchymalen Gewebe entsteht, formiert sich der Knochen bei der chondralen Ossifikation, welche wesentlich häufiger ist, auf der Basis einer Knorpelmatrix, welche sukzessive durch Knochengewebe ersetzt wird.

Indem Mesenchymzellen aus dem embryonalen Bindegewebe zu Osteoblasten differenzieren, wird das Osteoid gebildet, in welchem durch Anlagerung von Calcium- und Phosphat-Ionen Hydroxylapatitkristalle entstehen. Dabei bilden sich zunächst kleinere Knochen trabekel, welche durch appositionelles Wachstum (Anlagerung von Knochensubstanz von außen) ein Knochenetzwerk bilden. Die durch die Osteoidbildung eingeschlossenen Osteoblasten differenzieren zu Osteozyten. Die platten Schädelknochen (z. B. Os frontale), sowie die Knochen des Gesichtsschädels (z. B. Mandibula) und die Clavicula entstehen durch desmale Ossifikation.

Als Zwischenstufe bildet hyaliner Knorpel bei der chondralen Ossifikation ein Primordialskelett. Dieses wird durch Chondroklasten sukzessive abgebaut und gleichzeitig durch Knochen ersetzt. Hierbei laufen zwei Prozesse weitgehend zeitgleich ab: Perichondral erfolgt die Osteogenese von außen, indem sich Osteoblasten im Bereich der Diaphyse bilden und den Knorpel im Inneren des Knochens manschettenartig umschließen (Dickenwachstum).

Im Gegensatz dazu findet bei der enchondralen Ossifikation die Osteogenese von Inneren der Knorpelmatrix heraus statt. Begleitet von Blutgefäßen wandern Mesenchymzellen in den Knorpel und differenzieren zu Osteoprogenitorzellen, welche sich weiter zu Osteoblasten entwickeln. Während Chondroklasten das Knorpelgewebe abbauen, wird dieses durch Spongiosabälkchen ersetzt. Diese Form der Knochenbildung wird beim Längenwachstum im Bereich der Epiphysenfugen beobachtet.

Erst durch die funktionelle Beanspruchung entsteht der reife Lamellenknochen auf Basis des Geflechtknochens mit einem unorganisierten Geflecht von Kollagenfaserbündeln.

### **1.1.3 Regeneration und Defektheilung**

Die Heilungstendenz von Knochenfrakturen bis hin zur vollständigen Konsolidierung des Gewebes in Struktur und Funktion (Mognetti et al., 2011) lässt sich anhand dreier Hauptkriterien beurteilen: die interfragmentäre Mobilität, d. h. die mechanische Stabilität der benachbarten Knochenfragmente, die interfragmentäre Distanz und die Qualität der umliegenden Weichteile. Diese Faktoren üben entscheidenden Einfluss auch auf die Wahl der Therapie. Wird die kritische Grenze eines dieser Parameter überschritten, ist eine Spontanheilung ausgeschlossen, es besteht die Gefahr der Ausbildung einer Pseudarthrose bei fehlender Ruhigstellung (Calori et al., 2011).

Im Heilungsprozess werden zwei Prinzipien unterschieden. Die primäre Frakturheilung entspricht dem physiologischen Knochenumbau durch längs wachsende Osteone (McKibbin, 1978) ohne Kallusbildung. Grundvoraussetzung hierfür sind eine ausreichende Blutversorgung sowie absolute Ruhigstellung durch exakte Reposition der Fragmente. Die sekundäre, wesentlich häufigere, Frakturheilung wird durch drei Phasen beschrieben (Wilkins, 2005):

In der initialen Entzündungsphase entsteht im Defekt ein Hämatom, es wandern Makrophagen, Entzündungszellen und Thrombozyten ein (Barnes et al., 1999). Granulozyten, Mastzellen, Monozyten und pluripotente mesenchymale Stammzellen sprossen in das Hämatom ein und sezernieren Wachstumsfaktoren und Cytokine, welche eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Zellinfiltration und Angiogenese ausüben. Der Heilungsprozess wird durch Steuerung der Zellinfiltration, Angiogenese und Zelldifferenzierung induziert (Einhorn, 1998).

In der reparativen Phase wird über einen Zeitraum von vier bis sechs Wochen über die desmale und chondrale Ossifikation Knochen gebildet. Ein die Fraktur ummantelnder bindegewebiger Kallus stabilisiert die Fragmente, während Wachstumsfaktoren den Reparaturprozess steuern. Dabei sind insbesondere Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Transforming Growth Factors (z. B. TGF- $\beta$ 1), Bone Derived Growth Factor ( $\beta$ 2-Mikroglobulin) zu nennen. Anschließend wird während des Remodelling Prozesses der initial gebildete Faser- und Geflechtknochen in funktionell stabileren reifen Lamellenknochen (Schenk and Buser, 1998) umgebaut. Dabei entsteht aus der beschriebenen Kallusmanschette der Fixationskallus, reife mineralisierte

Knochenmatrix. Der Knochen wird in dieser Phase durch organisierte An- und Abbauvorgänge entsprechend den mechanischen Ansprüchen und umgebenden Verhältnissen funktionell und strukturell angepasst (Wilkins, 2005).

Die Implantatsetzung in einen Knochendefekt initiiert vergleichbare Vorgänge wie bei der Frakturheilung. Albrektsson und Johansson (Albrektsson and Johansson, 2001) beschreiben drei voneinander abhängige Phasen der Implantatintegration: die Osteoinduktion, gefolgt von der Osteokonduktion und der Osteointegration.

Die erste Phase gleicht der physiologischen Osteogenese (Albrektsson and Johansson, 2001). Es werden extrazelluläre Flüssigkeit, nicht-kollagene Proteine und Wachstumsfaktoren aus dem das Implantat umgebenden Knochen und Blut sezerniert (Schenk and Buser, 1998). Dadurch angelockt, wandern Osteoprogenitorzellen in den Defektbereich und differenzieren schließlich zu Osteoblasten (Davies, 1998).

Während der Osteokonduktion kommt es zur Kapillareinsprossung und Knochenapposition auf der Implantatoberfläche (Albrektsson and Johansson, 2001, Marx and Garg, 1998).

Bei der anschließenden Osseointegration führt die Implantatsetzung zum Austritt von Blut aus dem Gewebe an die Implantatoberfläche. Es bildet sich eine Fibrinschicht, welche die Zellmigration stimuliert (Davies, 1998). Auf diese Weise differenzieren diese Zellen an der Implantatoberfläche zu Osteoblasten (Davies, 1998, Furlong and Osborn, 1991). Die Knochenbildung erfolgt durch Freisetzung der nicht-kollagenen Proteine Osteopontin und Sialoprotein, an die sich Kalziumphosphat anlagert und damit fächerförmige Kristalle bildet (Davies, 1998). Kollagenfasern binden an die Oberfläche und kalzifizieren zu Geflechtknochen.

Entscheidend für Knochenersatzverfahren durch Implantation sind gute Knochenqualität und adäquate Durchblutung sowie die operative Technik mit einem möglichst minimalen Präparationstrauma. Zudem ist auf eine sofortige Stabilisierung des Implantats zu achten (Soballe et al., 1990) und Sofortbelastung im Rahmen der Frakturversorgung zu vermeiden (Branemark, 1983, Brunski, 1999, Fritz, 1999, Gondolph-Zink, 1998, Huja et al., 1999, Schenk and Buser, 1998), um das Risiko der Ausbildung einer bindegewebigen Zwischenschicht zu minimieren (Branemark, 1983, Linder, 1989).

#### **1.1.4 Knochenassoziierte Wachstumsfaktoren**

Es ist allgemein bekannt, dass Wachstumsfaktoren eine zentrale Rolle in der Wundheilung und Geweberegeneration einnehmen, so auch im Knochen. Trotz ihres sehr

geringen Anteils an der nicht kollagenen Knochen Matrix mit weniger als 1 % sind Wachstumsfaktoren durch ihre Kontrollfunktion ein wichtiger Bestandteil des Gewebemetabolismus im Knochen. Zahlreiche Studien *in vitro* und *in vivo* konnten belegen, dass gewisse Wachstumsfaktoren besonders stark die Knochen(neu)bildung im positiven Sinne beeinflussen. Hierbei stehen Proteine der PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF- $\beta$  und der BMP Familie im Vordergrund.

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide mit einem mittleren Gewicht von 6 - 45 kDa und sind in der Lage, die Zellproliferation und -differenzierung während der Gewebeneubildung und -regeneration zu stimulieren und zu beschleunigen.

Das osteoinduktive Potential von Wachstumsfaktoren konnte im Rahmen zahlreicher *in vivo* Untersuchungen durch ektope Knochenbildung, also durch Knochenbildung außerhalb des originären Gewebes, nachgewiesen werden. Durch die Interaktion von Wachstumsfaktoren an transmembranöse Rezeptormoleküle ihrer Zielzellen induzieren sie auf endokrine, parakrine und autokrine Weise intrazelluläre Reaktionskaskaden, welche die Genexpression und folglich Proteinsynthese fördern.

Damit lenken Wachstumsfaktoren die Knochenregeneration auch auf indirekte Weise durch Stimulation systemischer Hormone wie Vitamin D, Wachstumshormon (GH) oder Kalzitinin.

Syntheszellen von Wachstumsfaktoren sind Stammzellen, Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten, welche auch ihre Zielzellen darstellen. Damit entsteht ein Kreislauf zahlreicher Effekte auf die Differenzierung und den Phänotyp der Zielzelle.

### **1.1.5 Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2)**

Proteine der BMP Gruppe wurden erstmals von Urist (Urist, 1965, Wozney, 1989) beschrieben und sind seitdem zentraler Gegenstand der Osteogeneseforschung. Als Teil des TGF- $\beta$  Signalwegs gehören sie zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren für die Osteogenese und nehmen eine zentrale Rolle während der enchondralen Ossifikation ein, indem sie mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark chemotaktisch anlocken und deren Differenzierung zu Osteoblasten induzieren können.

Zu der BMP Gruppe gehören ungefähr 20 Moleküle (Lavery et al., 2008), von denen gerade BMP-2 und BMP-7 Einzug in die Forschung und klinische Anwendung zu osteoregenerativen Therapien fanden. Darunter werden die Subtypen BMP-2/4/5/6/7/8 zu den knochen- und knorpelregenerativen Signalproteinen gezählt.

Dabei zeigte sich in zahlreichen *in vivo* Studien, dass BMP-2 im Vergleich zu anderen Wachstumsfaktoren ein deutlich stärkeres Potential auf die Differenzierung und das Wachstum umgebender Zellen ausübt und durch sein nebenwirkungsärmeres Profil als therapeutischer Bestandteil im Rahmen der Knochendefektheilung praktikabel erscheint. Es konnte in unterschiedlichen tierexperimentellen und klinischen Studien nachgewiesen werden, dass BMP-2 als osteoinduktives Signalprotein die Kallusbildung in einem iatrogenen Knochendefekt fördert und damit die Defektregeneration auf positive Weise beeinflusst und sogar beschleunigt (Kolk et al., 2016).

Studien zur Defektheilung in der Mandibula legten in ihren Ergebnissen eine Konsolidierung des Defektes mit neu gebildetem Knochen dar, der in seiner Stabilität den stetig wirkenden axialen Kräften Stand hält. Auf parakrine Weise stimuliert BMP-2 die osteoblastäre Differenzierung von Osteoprogenitorzellen wie mesenchymale, adipozytäre und periostale Stammzellen oder Fibroblasten und fördert die Mineralisierung der extrazellulären Matrix, womit es zur Stabilisierung des neu gebildeten Knochens beiträgt.

Das biologisch aktive BMP-2 setzt sich als Homodimer aus zwei Untereinheiten mit jeweils 114 Aminosäuren zusammen und liegt in einer physiologischen Konzentration von 1 µg/kg Knochen vor.

In seiner rekombinanten Form ist BMP-2 als off-label Therapie durch die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) zugelassen.

## **1.2 Die Rolle von Stammzellen in der Knochenneubildung und -heilung**

Adulte Stammzellen tragen zur Gewebeerhaltung und -regeneration entscheidend bei (Li and Clevers, 2010, Fuchs, 2009), indem sie auf den Reiz spezifischer Signale hin zwischen Ruhephase und Reaktivierung des Zellzyklus, insbesondere gekennzeichnet durch die Mitosephase, abwechselnd reagieren (Fuchs, 2009, Zon, 2008, He et al., 2009). Bedarfsabhängig generieren sie durch Proliferation weitere Stammzellen (Chen et al., 2012).

Durch ihr ubiquitäres Vorkommen und ihre pluripotenten Eigenschaften zeichnen sich adulte Stammzellen durch viele Vorteile aus, welche im Rahmen regenerativer Therapien erschlossen werden können.

Während der physiologischen Wundheilung ist eine schnelle Regeneration als Schutzmechanismus erwünscht (Caplan and Sorrell, 2015). Im adulten Gewebe findet dabei ein Wechselspiel zwischen regenerativen Prozessen im Sinne einer

Restitutio ad integrum und dem Immunsystem statt, wobei häufig der Einfluss des Immunsystems überwiegt, da somit die Heilung beschleunigt wird, mit dem Nachteil der Narbenbildung oder funktionell mangelhaften und unvollständigen Einheilung aufgrund inflammatorischer Prozesse (Li et al., 2012, Allen and Wynn, 2011). In diesem Zusammenhang nehmen Stammzellen eine wichtige Rolle ein, indem sie einen Ausgleich zwischen scheinbar konkurrierenden Systemen schaffen (Iyer and Rojas, 2008, Jones and McTaggart, 2008, Brockes and Kumar, 2002, Li et al., 2012). Durch ihre pluripotenten Eigenschaften sind Stammzellen in der Lage drei Aufgaben in gleichem Maße zu erfüllen: Indem sie bioaktive Moleküle wie CD39, CD73 und CD105 (Sattler et al., 2011, Ciciarello et al., 2013, Caplan and Correa, 2011b, Caplan and Correa, 2011a, Gao et al., 2014) produzieren und sezernieren, limitieren sie auf parakrine Weise überschießende Immunreaktionen durch das regenerierende Gewebe (Bonfield et al., 2010); gleichzeitig ermöglichen sie die Rekonsolidierung der Wundverhältnisse und bilden Regenerationszonen (Bensidhoum et al., 2005, Caplan and Sorrell, 2015), wobei Narbengewebe durch physiologisch intaktes Gewebe ersetzt wird. Diese beiden Prozesse stehen jedoch nicht im Gegensatz, da beispielsweise Perizyten im Falle einer Verletzung in der Lage sind, von der vaskulären Basallamina in die Defektregion zu migrieren, um sich dort zu Stammzellen zu entwickeln (Caplan, 2015). Folglich können Perizyten durch diesen Vorgang als Mediatorzellen zwischen den beschriebenen Vorgängen verstanden werden. Schließlich differenzieren Stammzellen zu vaskulären Zellen, und schaffen mit der Neovaskularisation die Grundlage für eine erfolgreiche Geweberegeneration.

Dadurch dass Stammzellen unabhängig von ihrer Herkunft dieselben immunmodulatorischen Eigenschaften, aber gewebespezifisches Verhalten aufweisen (Caplan, 2015, Dong and Caplan, 2012), gewannen sie im Bereich der regenerativen Medizin und im Bereich des Tissue Engineering in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Gerade mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (MSC) und adipozytäre Stammzellen (ADSC) stehen aufgrund ihres einfachen Zugangs und ihrer Transfizierbarkeit, und dem damit verbundenen genetischen Modifikationspotential, besonders im Vordergrund (Behr et al., 2011, Levi et al., 2011).

### **1.2.1 Mesenchymale Stammzellen**

Adulte mesenchymale Stammzellen sind ubiquitär und abhängig von ihrer Herkunft (Knochenmark, Fettgewebe, Zahnpulpa, Wharton-Sulze) (Gao et al., 2014) operativ leicht zugänglich. In zahlreichen Studien *in vitro* (Kanczler et al., 2010, Meinel et al., 2006, Yao

and Lane, 2015, Yao et al., 2013, Bianco and Robey, 2001) und *in vivo* (Peric et al., 2015, Pittenger et al., 1999, Grcevic et al., 2012, Khosla et al., 2010) konnte nachgewiesen werden, dass sich gerade mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (MSC) aufgrund ihrer pluripotenten Eigenschaften, in die adipogene (Pittenger et al., 1999, Mackay et al., 2006), myogene (Lennon et al., 2012), insbesondere aber in die chondrogene (Yoo et al., 1998) und osteogene (Haynesworth et al., 1992) Linie zu differenzieren, im Rahmen der Osteogenese zum Einsatz eignen und seit einigen Jahren den Goldstandard darstellen (Gao et al., 2014).

Die verzögerte Osteogenese im Rahmen der Regeneration und der Knochenabbau im adulten und alternden Organismus werden dem entkoppelten Zusammenspiel zwischen Osteoblasten und Osteoklasten zugeschrieben, wobei letztere überwiegen. MSC, welche osteoblastär differenzieren können, sind im adulten Organismus in ihrer Anzahl und Aktivität reduziert (Yao and Lane, 2015). Dabei ist es fraglich, ob das reduzierte Regenerationspotential von adultem Knochen nicht auch dem mangelnden Migrationsverhalten von MSC zuzuschreiben ist (Yao et al., 2013, Yao and Lane, 2015). Denn MSC müssen an der Knochenoberfläche, bzw. in der Defektregion resident sein, um spezifische Differenzierungskaskaden zu initiieren.

Als osteoblastäre Vorläuferzellen exprimieren MSC Proteine zur Adhäsion und Reifung von Osteoblasten, wie CXCL12 (Morrison and Scadden, 2014), Osteocalcin, Osteopontin, Knochen-Sialoprotein, Kollagen Typ I und Fibronectin (Gronthos et al., 1999), und unterstützen damit Zell-Matrix- und interzelluläre Interaktionen. Diese Effekte, jedoch, sind spezifisch und nur möglich, wenn lokale Stimulation erfolgt.

Die systemische Applikation von MSC im Rahmen von Regenerationsstudien *in vivo* zeigte, dass sich MSC im Bereich der Metaphyse, Epiphyse und den Havers'schen Kanälen ablagern (Cho et al., 2009, Granero-Molto et al., 2009), wo sie innerhalb weniger Wochen abgebaut werden, jedoch nicht in der Lage sind, in die Defektregion zu migrieren und damit kaum therapeutische Effekte erzielen. Aufgrund ihrer Pluripotenz sind MSC nicht in der Lage zur direkten Knochenmigration.

### **1.2.2 Adipozytäre Stammzellen**

Neben MSC erfüllen auch adipozytäre Stammzellen (ADSC) die wichtigsten Kriterien, die sie zum Einsatz in der regenerativen Medizin qualifizieren: Ubiquität und Quantität (Knochenmark und subkutanes Fettgewebe), multipotentes Differenzierungsverhalten, insbesondere in die osteogene und angiogene Linie, und ihr leichter Zugang, z. B. im

Rahmen von Liposuktionen oder durch Nadelbiopsie (Bunnell et al., 2008, Acil et al., 2014), wodurch ein minimal invasiver Zugang mit reduzierter Donor Site Morbidity ermöglicht wird. Klinische Anwendung finden ADSC bereits seit einigen Jahren in der plastischen Chirurgie, z.B. bei Brustaugmentationen (Matsumoto et al., 2006) oder bei der Behandlung der fazialen Lipoatrophie (Yoshimura et al., 2008) durch zellassistierte Eigenfetttransplantation. Der Einsatz von ADSC im Rahmen rekonstruktiver Therapien von Knochen jedoch ist klinisch noch nicht etabliert. Açil *et al* (Acil et al., 2014) konnten *in vitro* eine gute Biokompatibilität unterschiedlicher Materialien im Zusammenhang mit ADSC feststellen und neben dem adipogenen auch das osteogene Differenzierungspotential von ADSC durch erhöhte Expression des osteogenen Markers Alpha-2-Typ-I-Kollagen (COL1A2 ) untermauern.

Weiter gelang es Lui *et al* (Liu et al., 2016) die osteogene Differenzierung durch höhere Zellpassagen ohne die Zugabe von osteogenem Induktionsmedium nachzuweisen. Zellen aus der zehnten Passage zeichneten sich immunhistochemisch durch verstärkte Expression von BMP-2, sowie dem für Osteoblasten spezifischen Transkriptionsfaktor Runx2 aus. Folglich scheinen neben MSC auch ADSC gerade für nachhaltige osteoinduktive Verfahren geeignet. Während das funktionell regenerative Potential von ADSC in tierexperimentellen Modellen zum Myokardinfarkt nachgewiesen werden konnte (Schenke-Layland et al., 2009), sind die Entwicklung in knochenregenerativen Prozessen und das osteogene Potential von ADSC *in vivo* nicht hinreichend erforscht.

Eine wichtige Rolle im Differenzierungsverhalten von ADSC spielt microRNA (miRNA): Abhängig vom Expressionsverhalten spezieller miRNA Sequenzen, differenzieren ADSC zu Adipozyten (Überexpression) oder Osteoblasten (Inhibition) (Li et al., 2013).

Dieser Aspekt zeigt den Einfluss osteoinduktiver Faktoren auf residente Zellen und ihre Relevanz als Bestandteil regenerativer Therapien.

### **1.3 Getherapie**

Der Einsatz von Knochenersatzmaterialien wird vordergründig nach ihren osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften gewählt. Während das Material durch Osteokonduktivität das Knochenwachstum erleichtert, soll es durch seine osteoinduktiven Eigenschaften das Gewebewachstum unterstützen und beschleunigen. Dies ist individuell abhängig von der Fähigkeit des Materials, residente Vorläuferzellen zur Differenzierung und damit Gewebewachstum zu stimulieren (Lazard et al., 2011). Folglich kann das osteoinduktive Potential eines Materials durch Regulation des Angebots

an Zellen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen erhöht werden (Evans, 2012, Evans and Huard, 2015, Lazard et al., 2011). Der Einsatz rekombinanter Wachstumsfaktoren, wie z.B. rekombinantes humanes BMP-2 (rhBMP-2), hat sich in diesem Zusammenhang auch im klinischen Alltag durchsetzen können. Rekombinante Wachstumsfaktoren, jedoch, sind mit einigen Nachteilen vergesellschaftet: Hierzu zählt ihre kurze Halbwertszeit *in vivo*, wodurch nur unphysiologisch hohe Dosen eine therapeutische Wirkung erzielen, hohe Kosten und ihre nicht kontrollierbare Wirkung, die in einigen Studien zum ektope Knochenwachstum führte (Lohse et al., 2015).

Eine Alternative bietet die Gentherapie, durch welche lediglich die für den therapeutischen Faktor kodierende DNA-Sequenz im Sinne eines Gentransfers in die Zielzelle eingebracht wird.

Die beim Gentransfer integrierte Geninformation muss einerseits die regulatorischen Mechanismen der Zielzelle überwinden, gleichzeitig dürfen diese nicht aus dem Gleichgewicht gebracht werden, um schwerwiegende Nebenwirkungen zu vermeiden (Naldini, 2015).

Die US-Amerikanische FDA definiert Gentherapie als ein Produkt, welches seinen Effekt durch Transkription oder Translation des transferierten genetischen Materials oder durch Integration in das Empfänger genom erzielt. Dabei wird das genetische Material in Form von Nukleinsäuren, Viren oder genetisch modifizierten Mikroorganismen eingeschleust. Durch diese Genprodukte können Zellen *in vivo* oder vor der Implantation in den Empfängerorganismus *ex vivo* modifiziert werden (Wirth et al., 2013).

Zwei Methoden haben sich dabei durchgesetzt: Der Gentransfer mittels therapeutischer Viren und der non-virale Gentransfer durch DNA-Sequenzen.

### **1.3.1 Transduktion durch virale Vektoren**

Der virale Gentransfer kann auch als Transduktion verstanden werden. Dabei wird vorzugsweise Adenoviren, Lentiviren oder Onkoretroviren die Fähigkeit zur Replikation genommen, bevor sie in die Wirtszelle implantiert werden. Sie integrieren ihre Erbinformation in die chromosomale DNA ihrer Wirtszelle und erzielen damit eine langfristige therapeutische Wirkung. Während dieser Wirkmechanismus bei der Therapie genetischer Erkrankungen durchaus erwünscht ist, stellt diese Wirkweise im Rahmen von Heilungsprozessen von Frakturen sogar einen erheblichen Nachteil dar. Neben Entzündungsreaktionen auch nach abgeschlossener Regeneration stellt das virale

Potential der insertionellen Mutagenese in diesem Zusammenhang die schwerwiegendste Nebenwirkung der viralen Gentherapie dar.

Im Rahmen von *in vivo* Versuchen zur Knochenregeneration konnte gezeigt werden, dass adenovirale Partikel mit für BMP-9 kodierenden Sequenzen, welche in athymischen und Sprague-Dawley Ratten gleichermaßen injiziert worden waren, das Knochenwachstum in den immunkompetenten Tieren demjenigen der athymischen Ratten deutlich unterlegen war (Li et al., 2003). Dies lässt auf eine Immunantwort schließen (Kimelman Bleich et al., 2012), die es für eine erfolgreiche Therapie zu umgehen gilt.

Krebsleiden stellen mit über 60 % noch vor monogenetischen Mutationen die häufigsten Erkrankungen, welche gentherapeutisch behandelt werden. Dennoch ist der klinische Einsatz viraler Vektoren durch ihre Nachteile und die nicht vorhersehbaren Nebenwirkungen stark limitiert. So konnten virale Vektoren im Rahmen der Therapie des schweren kombinierten Immundefekts (SCID) erfolgreich eingesetzt werden. Einige Kinder entwickelten jedoch Leukämien bis hin zum Todesfall (Kohn et al., 2003, Somia and Verma, 2000).

### **1.3.2 Transfektion durch non-viralen Gentransfer**

Eine Alternative zum viralen Gentransfer bietet der Einsatz von Plasmid-DNA im Sinne einer Transfektion. Der Gentransfer kann hierbei mit einem Träger, z.B. Liposomen oder Nanopartikeln, unterstützt und damit seine Effizienz gesteigert werden.

Die durch non-virale Vektoren induzierte Immunantwort durch den Empfänger ist deutlich reduziert (Kimelman Bleich et al., 2012). Zudem wird die injizierte DNA nicht dauerhaft in den Empfänger integriert. Somit kommt es lediglich zu einer transienten Genexpression des gewünschten Faktors, ein Effekt, der gerade im Rahmen der Knochenheilung erwünscht ist. Die Menge des neu gebildeten Knochens ist damit limitiert und das Risiko für ossäre Malformationen auf ein Minimum gesenkt.

Gleichzeitig kann sich die transiente Genexpression nackter Plasmid-DNA auch als erheblicher Nachteil hinsichtlich ihrer Therapie-Effizienz erweisen. Hierzu beschreiben Osawa *et al* die Verteilung der Gesamtdosis auf einzelne Injektionen (Osawa et al., 2010). Dadurch kam es bei gleicher Gesamtdosis zu einer höheren und stetigen Knochenneubildungsrate. Diese Erkenntnis lässt schlussfolgern, dass durch die regelmäßige Zufuhr genetischer Information eine stetige Genexpression ermöglicht wird. Gleichzeitig wird die Gabe potentiell toxischer Dosen, welche bei einem „Single Shot“ für einen therapeutischen Effekt notwendig sind, umgangen.

Eine Möglichkeit, dieses Therapie-Konzept auf praktikable Weise umzusetzen, ist die Entwicklung genaktivierter Matrizes (GAM).

Das Prinzip der GAM besteht in der Beschichtung eines biodegradierbaren Materials mit Plasmid-DNA, welche kontinuierlich an die umliegenden Zellen freigesetzt wird und damit Regeneration und Wachstum induziert. Dabei kann die Kapazität des Gentransfers auf unterschiedliche Weise modifiziert werden, indem die DNA in biodegradierbare Komplexe kondensiert wird, aus welchen sie kontinuierlich freigesetzt werden kann.

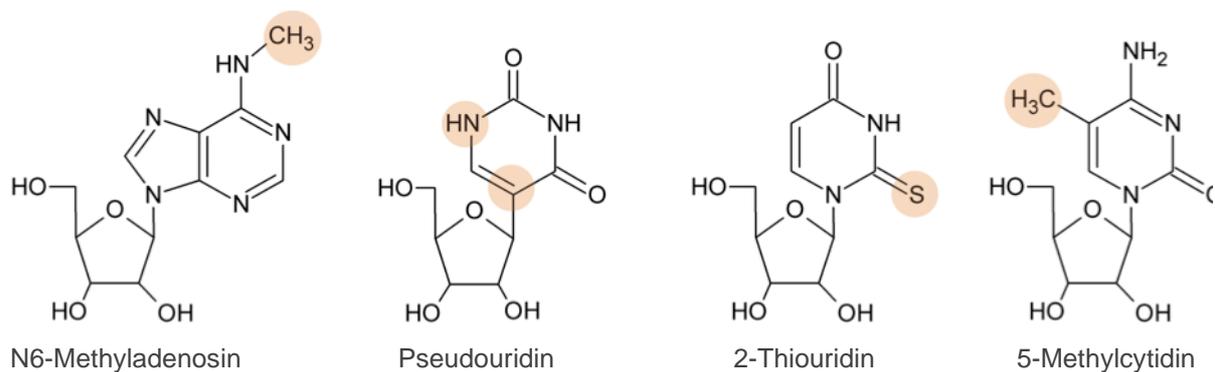
In einer Studie von Huang *et al* (Huang et al., 2005) wurde das Reporter-gen  $\beta$ -Galaktosidase in einen Polyethylenimin-Komplex (PEI) kondensiert. Bis zu 15 Wochen nach Implantation konnten hohe Genaktivitäten nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen zeigten die mit PEI beschichteten Implantate bis zu doppelt so hohe Genexpressionslevel (Huang et al., 2005).

### **1.3.3 Das Prinzip der chemisch modifizierten messenger RNA (cmRNA)**

Trotz der bereits beschriebenen Vorteile der Getherapie mittels DNA-Transfer gegenüber dem Einsatz rekombinanter Faktoren, ist auch erstere mit erheblichen Nachteilen verbunden. Plasmid-DNA wird im Zellkern transkribiert, damit muss sie bis zum Wirkort mehrere Barrieren überwinden, birgt aber gleichzeitig das Risiko der insertionellen Mutagenese. Eine Alternative hierzu bietet die Verwendung von messenger RNA (mRNA) (Esteller, 2011, Yamamoto et al., 2009). Durch die direkte ribosomale Translation wird der Zellkern umgangen, die genomische Integration entfällt. Zudem schützt ihre zirkuläre Molekülstruktur die mRNA vor vorzeitigem Abbau, gleichzeitig beschleunigt sie die Ribosomenaktivierung (Ferizi et al., 2015). Aufgrund der molekularen Instabilität (Tavernier et al., 2011) und stark immunogenen Wirkung (Ferizi et al., 2015) konventioneller mRNA konnte jedoch ihr Einsatz bisher weder präklinisch noch klinisch etabliert werden. Aber gerade die Stabilität der mRNA ist ein essentieller Parameter, da dadurch Dosierung und Therapieintervalle bestimmt werden. In einer *in vitro* Studie konnten Kormann *et al* nachweisen, dass der Ersatz von 25 % Uridin und Cytidin durch 2-Thiouridin und 5-Methyl-Cytidin (Abb. 2) bereits ausreichen, um eine erhöhte molekulare und funktionelle Stabilität und eine reduzierte Immunantwort zu gewährleisten (Kormann et al., 2011). Diese Nukleosidanaloga werden gleichermaßen durch Ribosomen detektiert, folglich wird der Translationsprozess nicht eingeschränkt. Gleichzeitig wird die Bindung der cmRNA an Toll-like Rezeptoren (TLR-3, 7 und 8) durch den Basenaustausch gehemmt und die immunogene Reaktionsrate um bis zu 90 %

reduziert (Badiyan et al., 2016). Durch die auf diese Weise erhöhte Halbwertszeit wird mit niedriger Wirkdosis die Transfektionseffizienz gesteigert. Eine möglichst niedrige Wirkdosis ist insbesondere in Hinblick auf toxische Effekte durch cmRNA auf transfizierte Zellen (Balmayor et al., 2016b) anzustreben.

Die maßgeblich wegweisende Wirkung der cmRNA ist die Wachstumsstimulation residenter Zellen, insbesondere Stammzellen, die synergistisch zur Differenzierung in bestimmte Phänotypen getriggert werden (Balmayor et al., 2016a).



**Abbildung 1: Strukturelle Darstellung der chemisch modifizierten RNA (cmRNA).**

Die mRNA-eigenen Nucleoside Adenosin, Uridin, Guanosin und Cytidin werden teilweise durch Analoga ersetzt. Dabei werden sie weiterhin ribosomal transkribiert, gleichzeitig wird die so modifizierte mRNA in ihrem immunogenen Potential reduziert und deren molekulare Stabilität erhöht.

## 1.4 Tissue Engineering

Der Ersatz großflächiger Gewebedefekte stellt bis heute eine große Herausforderung in der regenerativen Medizin dar. Während der autologe Gewebettransfer den Goldstandard darstellt, ist dieser mit erheblichen Nachteilen, welche im Text bereits beschrieben worden sind, vergesellschaftet. Implantatmaterialien bieten aber langfristig nur dann eine Alternative, wenn sie in der Lage sind, den Gewebedefekt anatomisch, mechanisch und physiologisch zu ersetzen (Bhumiratana and Vunjak-Novakovic, 2012, Langer and Vacanti, 1993). Das Konzept des Tissue Engineering besteht im Zusammenspiel dreier zentraler Faktoren des Gewebewachstums: ein Material als anatomisches Grundgerüst, das in seiner Struktur und Form den Gewebedefekt deckt, Osteoprogenitorzellen und Wachstumsfaktoren (Amini et al., 2012, Reddi, 2000, Dimarino et al., 2013).

Dabei sind Knochenersatzmaterialien meist dreidimensionale poröse Gerüste mit einem großen Flächen/Volumen Quotienten, der die Zellhaftung und -migration und die

Angiogenese begünstigt (Pan et al., 2014). Die Porengröße sollte mindestens 300 µm betragen, um Gefäßwachstum zu ermöglichen (Karageorgiou and Kaplan, 2005).

Im Jahr 2004 erfolgte die erste Implantation eines prävascularisierten künstlichen Transplantats am Patienten durch Warnke *et al* (Warnke et al., 2004). Nach subtotaler Mandibulektomie wurde ein Titannetz mit BMP-7 beschichteten Hydroxylapatit-Blöcken und Knochenmarkspirat ausgefüllt. Nach siebenwöchiger Prävascularisierung im M. latissimus dorsi konnte mit dem neu gebildeten Konstrukt als myo-ossären Lappen der Knochendefekt gedeckt werden. Trotz des erfolgreichen Remodelling verstarb der Patient jedoch an Komplikationen durch die Exposition des Titannetzes. Dieser Fall stellt eindrücklich den Bedarf an biomimetischen und biodegradierbaren Materialien dar, um Gewebedefekte langfristig erfolgreich zu ersetzen. So haben sich biodegradierbare Ersatzmaterialien durch ihre bessere Biokompatibilität, ihr reduziertes immunogenes und teilweise regenerationsförderndes Potential als vorteilhaft erwiesen.

Aufgrund ihrer osteokonduktiven Eigenschaften stehen derzeit Materialien auf Hydroxylapatit- und Tricalciumphosphatbasis im Zentrum der Forschung (Khademhosseini et al., 2009, Amini et al., 2012, Wehrhan et al., 2012). Zudem imitieren solche Materialien die anorganische Knochensubstanz und ermöglichen, abhängig von ihrer porösen Struktur und Größe, Gefäßwachstum in den neu gebildeten Knochen, indem sie gleichzeitig die Bildung von Bindegewebe, ein Nebeneffekt jeglicher Geweberegeneration, limitieren (Wehrhan et al., 2012).

Demgegenüber stehen Hydrogele, Produkte natürlicher und synthetischer Materialien wie Fibrinkleber, Hyaluronsäure, Chitosan, Seidenfibroin oder Polyethylenglykol (Garg et al., 2012, Kamata et al., 2014). Besonders im Gewebedefekt komplexer anatomischer Strukturen, wie sie auf dem Feld der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sehr häufig zu finden sind, erweisen sich solche Materialien als vorteilhaft, da sie sich bei der Applikation *in situ* formen lassen (Kamata et al., 2014).

In der vorliegenden Studie wurden Kollagenschwämme als Grundgerüst der GAM verwandt. Die Vektorfunktion von Kollagenschwämmen erfolgt über Adsorption und Desorption des Wachstumsfaktors (Boerckel et al., 2011, Chevally and Herbage, 2000). Als hydrophiles Material behalten sie ihre strukturelle Integrität *in situ* (Ruel-Gariepy and Leroux, 2004, Boerckel et al., 2011) und erlauben die Permeabilität von Wasser und Metaboliten sowie gleichzeitig den Abtransport von Abfallstoffen (Jiang et al., 2014). Zudem ist Kollagen primärer Bestandteil der extrazellulären Knochenmatrix und fördert damit die Knochenregeneration (Chevally and Herbage, 2000).

## 1.5 Zielsetzung und Hypothese

### 1.5.1 Zielsetzung und Fragestellung

Der nachhaltige Ersatz großflächiger Knochendefekte stellt in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie nach wie vor eine Herausforderung dar. Rekonstruktive Verfahren mittels autologem Gewebetransfer sind derzeit der Goldstandard. Gleichzeitig sind sie aber durch Nachteile wie die Schaffung eines neuen Gewebedefektes, dem Risiko eines erfolglosen Gefäßanschlusses und Donor Site Morbidity limitiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die *in vivo* Untersuchung und Etablierung eines alternativen Therapiekonzeptes auf der Grundlage der drei Komponenten des Tissue Engineering.

Rekombinante Bone Morphogenetic Proteins (rhBMPs) haben einen starken osteoinduktiven Effekt, der aber in der Anwendung mit vielen Nachteilen wie ektopes Knochenwachstum oder die notwendige Verwendung unphysiologisch hoher Dosen aufgrund kurzer Halbwertszeiten erkaufte wird. Diese Nachteile können durch lokal begrenzte Stimulation von Zellen zur Bildung von BMPs durch non-viralen Gentransfer kompensiert werden; die transiente genomische Integration der therapeutischen DNA ist aber nach wie vor mit Risiken verbunden. Die Arbeitskopie der DNA, mRNA, bietet hierzu die Alternative, da sie ihre therapeutische Wirkung unter Umgehung des Zellkerns im Zytoplasma entfaltet.

Stammzellen fördern nicht nur die Knochenentwicklung, sie reduzieren auch immunologische Reaktionen während des Heilungsprozesses. Daher wurde unterstützend der Einfluss verschiedener autologer Stammzellen auf die RNA und auf die entsprechende Knochenneubildung in einem definierten Defekt am Rattenkiefer untersucht.

Diese cmRNA wurde *ex vivo* in unterschiedlichen Konzentrationen in Kollagenschwämme, welche als Matrix fungierten, integriert.

Die beschichteten Kollagenschwämme wurden in einen Knochendefekt im Kieferwinkel der Ratte implantiert und *in vivo* jeweils mit autologen MSC oder ADSC besiedelt oder als Kontrolle unbesiedelt belassen. Zusätzliche Kontrollgruppen dienten der Evaluation des Einflusses der cmRNA auf das Knochenwachstum.

Die Ergebnisse wurden mittels konventioneller radiologischer Aufnahmen und Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT) evaluiert. Hauptparameter waren der quantitative und qualitative Knochenzuwachs zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Defektbereich.

### **1.5.2 Hypothese**

Der gentherapeutische Ansatz soll durch die zusätzliche Verwendung von Stammzellen, in seiner Wirkweise optimiert werden. Stammzellen sind in der Lage, Immunreaktionen während Heilungsprozessen zu limitieren, was einen Vorteil bei der Einheilung und Gewebeintegration von Implantaten darstellt. Zusätzlich lassen sich Stammzellen leicht transfizieren und sollen unter dem Einfluss der BMP-2 kodierenden cmRNA *in vivo* in die osteoblastäre Linie differenzieren. Damit soll ein Proof of Concept für einen Therapieansatz, der sich auch in seiner Anwendbarkeit klinisch etablieren lässt, geschaffen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Aufbau der Studie

In der vorliegenden Studie wurde das Modell des Critical Size Defect (CSD) gewählt, ein standardisiertes Verfahren, anhand dessen die osteoinduktive Wirkung von Knochenersatzmaterialien am besten evaluiert werden kann. Der CSD ist ein iatrogen gesetzter Defekt, der definitionsgemäß gerade so groß ist, dass er ohne Einwirkung von außen nicht in der Lage ist, zur Restitutio ad integrum spontan einzuheilen.

Es wurden im Sinne eines orthotopen Modells bilateral CSDs von 5 mm Durchmesser in den Bereich der Kieferwinkel von 70 Sprague Dawley® Ratten gesetzt. Die Tiere wurden in zwei Hauptfraktionen, Therapiegruppen und Kontrollgruppe, randomisiert, wobei den Therapiegruppen unterschiedliche Untergruppen zugeordnet wurden (nähere Beschreibung s. Tab. 1). Da es sich um ein lokales Therapiekonzept handelte und die Heilungsprozesse damit sowohl von der Therapie als auch vom Individuum abhängig waren (Balmayor et al., 2016a), konnte davon ausgegangen werden, dass sich unterschiedliche Therapien innerhalb eines Tieres und die Heilungsprozesse in den beiden Unterkieferhälften nicht gegenseitig beeinflussen würden. Somit konnte auch unnötiger Tierverbrauch vermieden werden.

Die drei Dosen der verwendeten cmRNA wurden anhand von *in vitro* Versuchen (Badiyan et al., 2016) orientierend definiert. Die Überlebenszeiten der Tiere wurden auf 14, 28 und 56 Tage angesetzt. Dadurch lassen sich initiale Wachstumsprozesse und Entwicklungen bis hin zur Konsolidierung des Defekts verfolgen und vergleichen. Jedoch wurden zu Beginn der Studie nur die Gruppen 2 und 4 (Tab. 1) zu allen drei Zeitpunkten untersucht, um einen Anhalt für das regenerative Potential des angewandten Therapiekonzeptes zu gewinnen. Hier ist zu erwähnen, dass aufgrund Erfahrungen aus Vorstudien (Bissinger et al., 2016) der Zeitpunkt von 28 Tagen zuerst gewählt wurde, um einen Anhalt über das Regenerationspotential der angewandten Therapie zu gewinnen. So wurde beispielsweise bei den Gruppe 3 und 5 auf eine Untersuchung nach 14 Tagen verzichtet, da bei der Konzentration von 1,25µg cmRNA eine ansetzende Defektheilung erst nach 28 Tagen messbar war.

In diesem Zusammenhang ist auch anzumerken, dass die Gruppengröße der nativen Kontrollgruppen bei lediglich jeweils 2 Unterkieferhälften gewählt wurde, da das

limitierte Ausmaß der osteoinduktiven Wirkung von Kollagen in Vorstudien bereits beschrieben wurde.

Aufgrund der geringen Gruppengröße wurden für die Gruppen 2 und 4 keine statistischen Berechnungen für den Überlebenszeitpunkt erhoben. Dieser Überlebenszeitpunkt wurde erst später aufgrund des teilweise starken Knochenwachstums nach bereits 28 Tagen gewählt. Da in diesem Fall vorrangig die Beurteilung des zellulären Mechanismus des initialen Knochenwachstums zu einem besseren Verständnis führt, wurden diese Präparate nach der orientierenden Auswertung durch  $\mu$ CT für die immunhistochemische Untersuchung aufbereitet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Die Gruppenaufstellung ist in Tab. 1 dargestellt.

Gruppe	Therapie	Tag 14 (n)	Tag 28 (n)	Tag 56 (n)
<b>1</b>	nativ	x	2	2
<b>2.1</b>	MSC	4	6	6
<b>2.2</b>	ADSC	4	6	6
<b>3.1</b>	1,25 $\mu$ g	x	6	6
<b>3.2</b>	1,25 $\mu$ g / MSC	x	6	6
<b>3.3</b>	1,25 $\mu$ g / ADSC	x	6	6
<b>4.1</b>	2,5 $\mu$ g	4	6	6
<b>4.2</b>	2,5 $\mu$ g / MSC	4	6	6
<b>4.3</b>	2,5 $\mu$ g / ADSC	4	6	6
<b>5.1</b>	5 $\mu$ g	x	6	6
<b>5.2</b>	5 $\mu$ g / MSC	x	6	6
<b>5.3</b>	5 $\mu$ g / ADSC	x	6	6

**Tabelle 1:** Aufstellung der Therapie- und Kontrollgruppen: Gruppe 1: Nativer Kollagenschwamm; Gruppe 2: Nativer Kollagenschwamm mit MSC- bzw. ADSC-Suspension; Gruppen 3-5: Mit cmRNA beschichtete Kollagenschwämme in drei unterschiedlichen Dosen, jeweils ohne Stammzellsuspension und in Kombination.

Die Evaluation der Defektheilung erfolgte mittels konventionell angefertigter Zahnfilmaufnahmen der Unterkiefer und Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT) in einer definierten Region of Interest (ROI) (Beck-Broichsitter et al.).

## 2.2 Material

Im Nachfolgenden sind die in dem Versuch verwendeten Materialien und Reagenzien tabellarisch in jeweils alphabetischer Reihenfolge gelistet.

Wenn nicht anders angegeben, wurden sämtliche verwendeten Reagenzien und Materialien von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA) erworben.

### 2.2.1 Kulturmedien

Medium	Hersteller
0,25% Trypsin – 0,04% EDTA	Gibco by Life Technologies GmbH, Darmstadt (Deutschland)
alpha Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM)	Gibco by Life Technologies GmbH, Darmstadt (Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco by Life Technologies GmbH, Darmstadt (Deutschland)
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline ohne Calcium und Magnesium (DPBS)	Gibco by Life Technologies GmbH, Darmstadt (Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco by Life Technologies GmbH, Darmstadt (Deutschland)

**Tabelle 2:** Reagenzien und Medien für Zellkultur

## 2.2.2 Genvektor- und Implantatherstellung

Reagenz	Hersteller
1 kb DNA Strang	Plasmid Factory, Bielefeld (Deutschland)
100bp DNA Strang	Plasmid Factory, Bielefeld (Deutschland)
1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycerol-Methoxypolyethylen Glykol (DMG-PEG) 2kDa	NOF America Corporation, White Plains, NY (USA)
96-Well Platten	OZ Biosciences, Marseille (Frankreich)
Agarose Standard	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Aqua ad iniectabilia	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
BioRAD protein assay reagent	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA (USA)
Cholesterin	Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL (USA)
Collagenasen I und II	Gibco by Life Technologies GmbH, Darmstadt (Deutschland)
Dinatrium-Hydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
D-Luciferin	Roche Diagnostics, Unterhaching (Deutschland)
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Ethidiumbromid Lösung	Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Helferlipide mit 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-Phosphocholine (DPPC)	Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL (USA)
Liposomales Transfektionsreagens DreamFect Gold (DF-Gold)	OZ Biosciences, Marseille (Frankreich)
Methanol 100%	Medline International Germany GmbH, Kleve (Deutschland)
Methyl-CTP	Jena Bioscience GmbH, Jena (Deutschland)
Non-viraler Vektor für cmRNA Transfer mit C12EPE	Ethris GmbH, Planegg (Deutschland)
Non-viraler Vektor für cmRNA Transfer mit PAA20k-EPE	Ethris GmbH, Planegg (Deutschland)
RiboMax Large Scale Production System – T7	Promega, Madison, WI (USA)
RNA loading dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Thio-UTP	Jena Bioscience GmbH, Jena (Deutschland)
XbaI (50 U/μl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)

**Tabelle 3:** Material und Reagenzien zur Herstellung der cmRNA und zur Beschichtung der Implantate

### 2.2.3 Stammzellen

Zellart	Hersteller	Kulturmedium
<b>Adipozytäre Stammzellen</b> OriCell™ Sprague Dawley Rat Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells	Cyagen Biosciences Inc., Santa Clara, CA (USA)	DMEM und 1% P/S
<b>Mesenchymale Stammzellen</b> OriCell™ Sprague Dawley Rat Mesenchymal Stem Cells	Cyagen Biosciences Inc., Santa Clara, CA (USA)	DMEM und 1% P/S

**Tabelle 4:** Stammzellen und Medium

### 2.2.4 OP-Ausstattung, Tierhaltung und Tierversuch

Produkt / Medikament	Hersteller
Atipamezol - Antisedan (5 mg/ml)	Orion Pharma, Hamburg (Deutschland)
Buprenorphin - Buprenodale (0,3 mg/ml)	Dechra Veterinary Products, Albrechts GmbH, Aulendorf (Deutschland)
Fentanyl - Fentadon (50 µg/ml)	Dechra Veterinary Products, Albrechts GmbH, Aulendorf (Deutschland)
Flumazenil (0,1 mg/ml)	Hexal, Holzkirchen (Deutschland)
Isofluran 5%	Baxter GmbH, Unterschleißheim (Deutschland)
Kollagenmembran (Epi Guide)	Riemser Arzneimittel AG, Greifswald (Deutschland)
Kollagenschwamm (KOLLAGEN <i>resorb</i> ™)	Resorba, Nürnberg (Deutschland)
Medetomidin - Sedator (1,0 mg/ml)	Dechra Veterinary Products, Albrechts GmbH, Aulendorf (Deutschland)
Midazolam (5 mg/ml)	Hexal, Holzkirchen (Deutschland)
Pentobarbital – Narcoren (16 g/100ml)	Merial GmbH, Hallbergmoos (Deutschland)
Rattenpellets	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage (Deutschland)
Nahtmaterial Vicryl 4-0 und 3-0	Johnson & Johnson GmbH, Ethicon Norderstedt (Deutschland)

**Tabelle 5:** Perioperativ verwendete Medikamente und Material

## 2.2.5 Geräte

Gerät	Hersteller
96-Well Platten aus Polypropylen	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
μCT Scanco 40	Scanco Medical® AG, Brüttisellen (Schweiz)
Dialysekassetten mit einem molekularen Cut-off von 7kDa	Pierce Biotechnologies, Waltham, MA (USA)
Electrophoresis Power Supply PS3002	Life Technologies, Darmstadt (Deutschland)
Hochvakuumanlage	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz (Deutschland)
Kodak Ultra-Speed Zahnfilm Nr. 2	Eastman Kodak Company, Rochester, NY (USA)
Laminar Flow Hood	BDL Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen (Deutschland)
Nanotrop 2000c Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Zahnfilmröntgengerät	Gendex Corporation, Des Plaines, IL (USA)
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

**Tabelle 6:** Zur Herstellung der Implantate und Evaluation der Versuchsergebnisse verwendete Geräte

## 2.3 Methoden *in vitro*

### 2.3.1 Vorbereitung und Herstellung der Implantate

#### 2.3.1.1 Herstellung der cmRNA

Die Herstellung der cmRNA erfolgte durch *in vitro* Transkription. Zuerst wurden die Plasmidvektoren mit XbaI linearisiert und danach mit Chloroform/Ethanol Niederschlag gereinigt. Für die *in vitro* Transkription wurde das RiboMax Large Scale RNA production System-T7 verwandt. Die Transkriptionsmischung beinhaltet die Nukleotide, wie sie in physiologische RNA vorkommen: Adenosintriphosphat (ATP), Uridintriphosphat (UTP), Guanosintriphosphat (GTP) und Cytosintriphosphat (CTP), sowie die chemisch modifizierten Nukleotide methyl-CTP und thio-UTP im Konzentrationsverhältnis von ATP : GTP : UTP : CTP : methyl-CTP : thio-UTP von 7,13mM : 1,14mM : 5,36mM : 5,36mM : 0,536mM : 0,536mM. Schließlich wurde der Nukleotidmischung das Anti-reverse Cap Analogon (ARCA), T7 RNA Polymerase und die

linearisierte Matrizen-DNA zugefügt, was zu einem Gesamtvolumen von 20 µl führte. Diese *in vitro* Transkriptionsmischung (IVT) wurde 2 h bei 37 °C inkubiert, um den Transkriptionsvorgang zu vervollständigen. Danach wurde die Matrizen-DNA nach Zugabe des Enzyms DNase I durch weitere 20 min Inkubationszeit bei 37 °C lysiert. Die cmRNA Ausfällung erfolgte durch Zugabe von vorgekühltem Ammoniumacetat bis zur endgültigen Konzentration von 2,5 M und wurde danach über 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugierung mit 14 000 rpm bei 4 °C wurde das RNA Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und nachfolgend 10 min zentrifugiert. Zuletzt wurde die RNA in 30 µl *aqua ad iniectabilia* resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt und die Qualität der cmRNA durch Gelelektrophorese untersucht.

#### **2.3.1.1.1 Qualitätskontrolle der cmRNA (Gelelektrophorese)**

Zunächst wurde die RNA-Suspension mit 0,5 µg RNA mittels DECP-H<sub>2</sub>O auf 10 µl verdünnt und mit 5 µl PCR-Ladepuffer versetzt. Anschließend wurden 10 µl des Gemisches und 2 µl DNA Größenmarker auf 1 % Agarosegel pipettiert. Nach 30 min unter 60 V bewegen sich die Proben vom Negativpol zum Positivpol und die RNA wird nach Interkalation von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar. Intakte RNA ist anhand zweier abgrenzbarer Banden erkennbar (18 s und 28 s).

#### **2.3.1.2 Herstellung des Genvektors**

Als non-viraler Vektor wurden Lipoplexe verwendet. Die Herstellung der Lipoplexe erfolgte, indem Lipidtransfektionsenhancer, z. B. Lipofectamine2000 (Invitrogene, CA, USA), DreamFect Gold (DF-Gold) und Dogtor (OzBiosciences, Marseille, Frankreich) oder verzweigtes Polyethylenimin. (bPEI) als Polymerenhancer mit entsprechenden cmRNAs vermengt wurden. Die verwendeten Volumen-Gewichts Verhältnisse von liposomalem Transfektionsenhancer zu cmRNA wurden nach den Anweisungen des Herstellers gewählt, z. B. 2 µl Lipofectamine2000, 4 µl DF-Gold bzw. 4 µl Dogtor pro µg cmRNA. Im Falle von bPEI wurde eine 10 mg/ml wässrige Lösung verwendet und der pH-Wert vor der Anwendung auf 7,0 titriert.

Die Komplexe wurden durch das Mischen von bPEI- und cmRNA-Lösungen unter N/P = 8 (Molverhältnis zwischen bPEI-Stickstoff (N) und cmRNA-Phosphat (P)), gefolgt von einer 20-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur, zusammengestellt. Der N/P Quotient

bezeichnet dabei das molare Verhältnis der im Lipoplex gebundenen Stickstoffgruppen (N) zu den Phosphatgruppen (P) der cmRNA (Jesorka and Orwar, 2008).

Für die Anwendung der Komplexe *in vivo* kamen kationisches Lipid C12-EPE sowie DOPE, Cholesterin und das PEG-Lipid DMG-PEG2k als Helferlipide in Molverhältnissen von 8:5, 29:4 und 41:0.88 zum Einsatz.

Anschließend wurden entsprechende Volumina der jeweiligen o. g. Lipid Stammlösungen als ethanolhaltige Lösung in Konzentrationen von je 50, 20, 20 und 20 mg/ml angewandt, um durch schnellen Austausch der Lösung die Liposomenbildung zu erreichen. Schließlich wurden 200 µl der Liposomenmischung mit 800 µl hBMP-2 cmRNA bis zur endgültigen cmRNA Konzentration von 200 µg/ml bei einem N/P Quotienten von 17 vermischt, 15 sec lang im Vortexmischer bei maximaler Geschwindigkeit vermengt und der Reaktionsansatz anschließend 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die so formulierten Lipoplexe wurden schließlich gegen doppeldestilliertes Wasser in Dialysekassetten mit einem molekularen Cut-off von 7 kDa über Nacht dialysiert.

### **2.3.1.3 Beschichtung der Kollagenschwämme**

Zuerst wurden die Kollagenschwämme unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar Flow Hood in kreisrunde Einzelteile mit 5 mm Durchmesser gestanzt (VBS Lochzange, Nr. 19970181). Die ausgestanzten Kollagenschwämme wurden in sterile 96-Well Platten aus Polypropylen gelegt. Die Lipoplexe wurden entsprechend der Gruppeneinteilung in unterschiedlichen Mengen (1,25 µg / 2,5 µg / 5 µg cmRNA) auf die einzelnen Kollagenschwämme getropft und danach 90 min lang bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Aufnahme der Lösung durch den Kollagenschwamm zu gewährleisten. Sucrose (2 %) diente als Lyoprotektiv. Die beladenen Kollagenschwämme wurden unter Hochvakuum 2 h lang bei 0,05 mbar getrocknet. Danach wurden die Kollagenschwämme vakuumversiegelt unter sterilen Bedingungen bis zur Implantation aufbewahrt.

## **2.3.2 Zellkultur**

### **2.3.2.1 Zellkultur und Zählung**

Beide in dieser Studie verwendeten Zellarten (MSC und ADSC) wurden kommerziell erworben. Die Sterilität und Reinheit der Stammzelllösung wurden durch den Hersteller garantiert.

Die Zellen wurden kryopreserviert in Eppendorf Röhrchen in einer Menge von jeweils  $10^6$  Zellen in 0,25 % Trypsin-0,04 % EDTA Lösung auf Trockeneis geliefert und bis zur Kultivierung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Die MSC entstammten dem Knochenmark von Sprague Dawley® Ratten und wurden in der fünften Passage geliefert.

Die ADSC waren aus dem Fettgewebe im Bereich der Leiste von Sprague Dawley® Ratten isoliert und wurden in der zweiten Passage geliefert.

Beide Zellarten wurden jeweils in DMEM unter feuchter Atmosphäre mit 5 %  $\text{CO}_2$  in einem Zellinkubator bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  angezüchtet. Bei einer Konfluenz von 85-90 % wurden die Zellen für die intraoperative Besiedelung der unter 2.3.1.3 beschriebenen Kollagenimplantate oder für weitere Passagen trypsiniert. Die Zellpassagen wurden zwei Mal wöchentlich bei einem Splitting-Verhältnis von 1:2 durchgeführt. Die Zellen wurden maximal bis zur zehnten Passage verwendet, da danach die Spontandifferenzierungsrate bei  $> 5\%$  lag. Die Zählung erfolgte durch Anwendung der Zählkammer nach Neubauer.

### **2.3.2.2 Vorbereitung der Zellsuspension**

Das in diesem Kapitel beschriebene Protokoll bezieht sich auf beide Zellarten gleichermaßen.

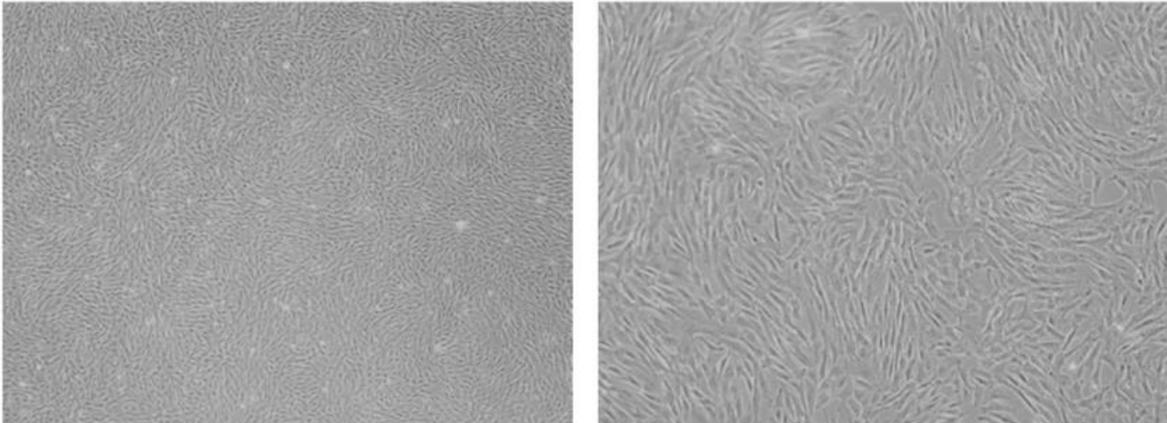
Sämtliche hier beschriebenen Schritte wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar Flow Hood durchgeführt.

#### **Auftauen der Zellen**

Nach Vorwärmen des DMEM auf  $37\text{ }^\circ\text{C}$  wurden 9 ml in ein Falcon Tube mit 15 ml Fassungsvermögen gegeben. Die Zellen wurden im Wasserbad bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  aufgetaut, bis keine Kristalle mehr sichtbar waren. Um die Zellvitalität zu erhalten, wurde die Tauprozedur auf maximal 3 min beschränkt. Entsprechend den Herstellerangaben wurden die Zellen danach dem Medium hinzu pipettiert, sodass die blasenfreie Lösung ein Gesamtvolumen von 10 ml ergab. Spülung und Mischung der Zellsuspension erfolgten entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden in eine T25 Zellkulturflasche verteilt und bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  unter feuchter Atmosphäre mit 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Mediumwechsel erfolgte im Rhythmus von zwei Tagen bzw. bei Konfluenz von 80 %.

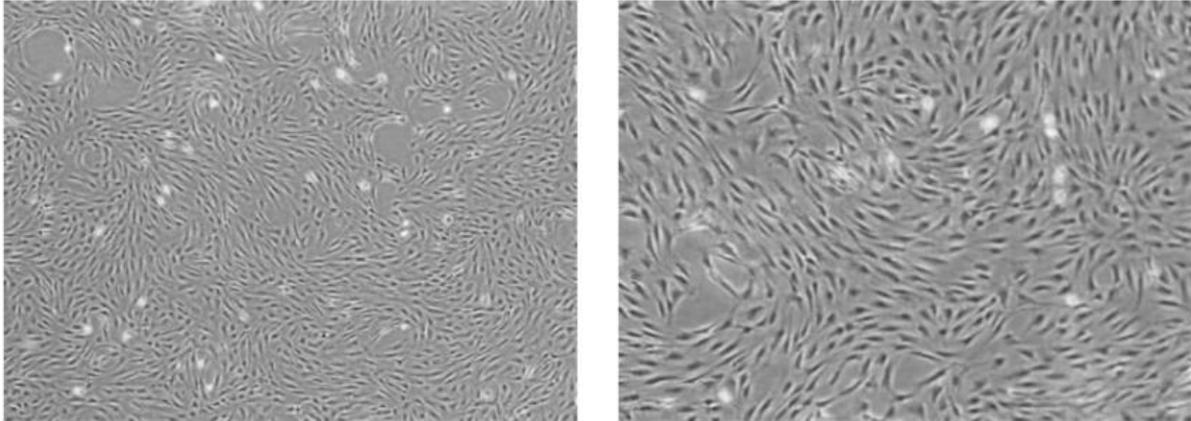
#### **Passagierung und Splitting**

Die Zellpassagen erfolgten bei einer Konfluenz von 80-90 %. Nach Aspiration des Mediums unter Schonung des Zellrasens wurden 3 ml 1 x PBS in die T25 Zellkulturflasche pipettiert. Nach vorsichtigem Hin- und Herschwenken wurde die PBS Lösung aspiriert und verworfen. Diese Schritte wurden drei Mal wiederholt. Nach Bedecken des Zellrasens mit 0,25 % Trypsin – 0,04 % EDTA Lösung und erfolgreicher Trypsinisierung der Zellen, wurde die Trypsin-EDTA Lösung unter Hinzugabe von 3 ml DMEM neutralisiert. Entsprechend den Herstellerangaben wurden die Zellen nach vollständigem Ablösen vom Boden der Zellkulturflasche in 15 ml Falcon Röhrchen pipettiert, zentrifugiert, der Überstand aspiriert und mit 2 ml DMEM resuspendiert, bevor sie auf weitere T25 Zellkulturflaschen verteilt wurden. Das Splitten erfolgte im Verhältnis 1:2. Die Abbildungen 3 und 4 zeigen mikroskopische Aufnahmen der beiden Stammzellarten vor ihrer operativen Anwendung, also in einem Zustand vor Spontandifferenzierung. Dabei ist das typische adhärente Wachstum mit fibroblastenähnlicher Morphologie zu erkennen.



**Abbildung 2: MSCs in der 5. Passage.**

**Links:** Vergrößerung 40x; **rechts:** Vergrößerung 100x.



**Abbildung 3: ADSCs in der 2. Passage.**  
**Links:** Vergrößerung 40x; **rechts:** Vergrößerung 100x.

### **Zellsuspension zur intraoperativen Beladung der Kollagenimplantate**

Nach dem Splitting im Verhältnis 1:2 wurden die Zellen auf Quantität, Vitalität und Differenzierungsgrad überprüft. Bei einer Differenzierung von < 5 % wurden unter Anwendung der Zählkammer nach Neubauer 100 000 Zellen (jeweils MSC oder ADSC) in einer DMEM Suspension von 50 µl in eine Insulinspritze pipettiert. Der Zellsuspension wurden weder ein Wachstumsmedium noch ein Differenzierungsmedium hinzugegeben, um den osteoinduktiven Effekt der Zellen allein besser evaluieren zu können.

Die Zellsuspension wurde nach Implantation des Kollagenschwamms unter Blutstillung in das Implantat *in situ* injiziert.

## **2.4 Methoden *in vivo* - Tierversuch**

### **2.4.1 Gruppeneinteilung**

Für den Tierversuch wurden 70 männliche Ratten (Sprague Dawley® Crl:SD, Charles River Laboratories, Sulzfeld (Deutschland)) mit einem mittleren Gewicht von 500-600 g ausgewählt. Die Tiere wurden randomisiert auf die in Tab. 1 dargestellten Gruppen verteilt. Für jede Therapiegruppe wurden zwei Überlebenszeitpunkte (28 und 56 Tage) untersucht und ausgewertet. Nachträglich wurden Gruppen mit 14 Tagen Überlebenszeit selektiert. Da in vorangegangenen Studien der eigenen Arbeitsgruppe eine Defektkonsolidierung nach 112 Tagen in jeder Therapiegruppe festgestellt worden war, wurde in der vorliegenden Studie auf den langen Zeitraum verzichtet. Das Knochenwachstum lässt sich über den hier untersuchten Zeitverlauf sowohl quantitativ

als auch qualitativ untersuchen. Gerade während der initialen Heilungsphase kann der Einfluss der Stammzelltherapie vergleichend evaluiert werden.

Da der Einfluss der hier angewandten cmRNA, sowohl bezüglich ihres regenerativen als auch ihres toxischen Potentials, nicht bekannt war, wurden, orientierend an Voruntersuchungen *in vitro* Beschichtungen mit unterschiedlichen Konzentrationen gewählt. Zudem erlaubte diese Vorgehensweise die Bewertung der Interaktion mit den verwendeten Stammzellen. Die Kontrollgruppe bestand aus nativen Kollagenschwämmen. Auf eine Kontrollgruppe ohne Defekt deckendes Implantat konnte verzichtet werden, da es hierzu bereits Daten aus Vorstudien der eigenen Arbeitsgruppe gab. Anhand dieser Daten wurden auch die Strukturparameter der  $\mu$ CT definiert.

#### **2.4.2 Tierhaltung und Ernährung**

Die Tierhaltung erfolgte in den Räumen des Zentrums für Präklinische Forschung im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München.

Die Tiere wurden unter konventionellen Hygienebedingungen in standardisierten Makrolonkäfigen (für bis zu 4 Ratten Typ IV (H: 20 cm, B: 35 cm, T: 55 cm)) in 3er Gruppen gehalten. Futter (Rattenpellets) und Wasser erhielten die Tiere *ad libitum*.

Als Enrichment wurden die mit Holzgranulatstreu ausgelegten Käfige mit Kriechröhrchen aus Kunststoff und Zellstoff als Nestbaumaterial ausgestattet. Der Haltungsraum wurde bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 50 % auf eine Temperatur  $22 \pm 2$  °C klimatisiert.

In Umsetzung der in der EU-Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen wurden die Tiere im Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden gehalten.

Nach mindestens 14-tägiger Eingewöhnungszeit und entsprechend ausreichendem Operationsgewicht standen die Tiere dem Versuch zur Verfügung.

Postoperativ erfolgten engmaschige Kontrollen des Körpergewichtes und des Gesundheitszustandes bis hin zum Zeitpunkt der Opferung.

### **2.4.3 Operation und Critical Size Defect**

#### **2.4.3.1 Perioperatives Handling**

##### **Narkose, OP-Vorbereitung und Antidot**

Die Narkose erfolgte durch gewichtsadaptierte intramuskuläre Injektion von Medetomidin (150 µg/kg KG), Midazolam (2 µg/kg KG) und Fentanyl (5 µg/kg KG) in den Oberschenkel des hinteren Laufes. Mithilfe eines Schergerätes wurde das Fell im Operationsgebiet entfernt und die Stelle vor dem Hautschnitt mit Cutasept® desinfiziert. Intraoperativ wurden die Tiere auf einem digitalen Heizkissen gelagert. Während des Eingriffs wurde bei Bedarf 100 % Sauerstoff zur Atemluft zugeführt.

Nach dem operativen Eingriff wurde die Narkose durch subkutane Applikation von Atipamezol (0,75 mg/kg KG) und Flumazenil (0,2 mg/kg KG) antagonisiert.

##### **Postoperative Nachsorge**

Postoperativ erfolgten bis zur Opferung engmaschige Kontrollen der Operationswunden, des Allgemeinzustands und des Körpergewichts der Tiere.

In den ersten drei Tagen *post operationem* wurden die Tiere mittels subkutaner Injektion von 0,075 mg/kg KG Buprenorphin alle 8 Stunden analgetisch behandelt.

##### **Euthanasie**

Die Tötung der Tiere erfolgte nach den entsprechenden Zeitpunkten mittels einer intrakardial verabreichten Überdosis von Narcoren (Pentobarbital 90 mg/kg KG) nach vorheriger Sedierung in Isofluran 5 %.

#### **2.4.3.2 Operatives Vorgehen**

Nach Rasur und Desinfektion des Operationsfeldes wurde ein submandibulärer Hautschnitt von ca. 3 cm gesetzt. Dabei wurde die Masseter-Pterygoid-Schlinge dargestellt und unter Schonung des N. facialis in Längsrichtung des Muskelfaserverlaufs scharf durchtrennt und der Basalbogen des Unterkiefers dargestellt. Das bukkale Periost wurde eingeschnitten und mit einem Raspatorium vom Knochen gelöst und nach kranial geschwenkt. Der Defekt wurde unter ständiger Wasserkühlung mit physiologischer Kochsalzlösung und niedriger Drehzahl mit einem Trepanbohrer mit 5 mm Außendurchmesser ca. 4 mm kranial des Basalbogens und 4 mm ventral des Ramus

ascendens des Unterkiefers bikortikal gesetzt. Blutstillung erfolgte mittels Elektrokoagulation. Nach Spülung und Trocknung des Defektbereiches wurde der Kollagenschwamm mit einer sterilen Kanüle in den Defekt gelegt. Je nach Therapiegruppe erfolgte dann zusätzlich die Besiedelung des Kollagenschwamms mit der in 2.3.2.2 beschriebenen Stammzellsuspension, indem die Suspension *in toto* mittels einer Insulinspritze langsam in den Kollagenschwamm injiziert wurde. Der Defekt wurde unmittelbar mit einer dem Defektbereich angepassten Kollagenmembran (ca. 8 mm Durchmesser), die dem Knochen aufgelegt wurde, gedeckt. Damit sollte ein Verbleiben des Kollagenschwamms und der Stammzellsuspension im Defektbereich gewährleistet werden. Nach Rückverlagerung der Masseter-Pterygoid-Schlinge wurde diese mittels Vicryl 4-0 refixiert. Der Hautverschluss erfolgte durch Einzelknopfnähte mittels Vicryl 3-0. Eine spätere Nahtentfernung war damit nicht notwendig. Der Vorgang wurde kontralateral wiederholt.

#### **2.4.4 Präparation der Explantate**

Nach Tötung, wie in 2.4.3.1 beschrieben, wurde der Unterkiefer des auf dem Rücken liegenden Tieres über eine median verlaufende Schnittführung von den Schneidezähnen bis zum Thymus dargestellt. Anschließend wurde der Unterkiefer von mesial nach lateral schonend freipräpariert. Dabei wurde von der Margo inferior hin ohne Inzision des Periosts nach kranial lateral präpariert. *In situ* wurden Teile des M. masseter gerade um den Defekt herum belassen, um ein Verrutschen des Implantates zu verhindern.

Nach Explantation wurden die Kieferhälften im Bereich der Symphyse getrennt und die Reste des M. masseter unter besserer Sicht restlos entfernt.

Es folgten unmittelbar Nummerierung, Fotodokumentation und konventionelle radiologische Kontrollaufnahmen. Die Explantate wurden unter Kühlung mit einer oszillierenden Diamantsäge zu der Größe eines Centstücks getrimmt, indem die Processus articularis und coronoideus und der anteriore Teil des Unterkiefers entfernt wurden, und danach in Falcon Röhrchen mit 100 % Methanol bei 4 °C konserviert.

## 2.5 Auswertung

### 2.5.1 Konventionelle Radiologie

Vor den  $\mu$ CT-Untersuchungen wurden konventionelle Röntgenaufnahmen von jedem Präparat von lateral angefertigt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Zahnfilmröntgengerät (Gendex Corporation, Des Plaines, IL, USA) auf einem Kodak Ultra-Speed Zahnfilm Nr. 2 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) bei 70 kV und 7 mA über 0,08 sec Belichtungszeit. Nach Entwicklung wurden die Röntgenbilder auf einem Betrachtungsschirm abgebildet und standardisiert von gleichem Abstand fotografiert und für die Auswertung digitalisiert. Für die Auswertung wurde den Bildern eine vorgefertigte Rasterschablone aufgelegt, welche den Defektbereich mit 9 gleich großen Feldern deckte. Konsolidierte Felder wurden mit 1 bewertet, nicht konsolidierte Bereiche mit 0, teilweise konsolidierte Felder wurden ab einer Defektdeckung von > 50 % mit 1 bewertet (Abb. 5). Aufgrund der Überlegenheit der  $\mu$ CT in Bezug auf die Messgenauigkeit und der objektiven und reproduzierbaren Analyseverfahren dienten die Röntgenaufnahmen lediglich dem orientierenden Vergleich und der Zuordnung der  $\mu$ -computertomographischen Aufnahmen, deren Auswertung in dieser Arbeit im Vordergrund stand. Aus Übersichtsgründen wurden zwei konventionelle Röntgenaufnahmen in Abbildung 5 exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 4: Zahnfilmaufnahmen zur initialen orientierenden Auswertung und Zuordnung.**

**Links:** Nicht abgeschlossene Knochenheilung nach 28 Tagen; **rechts:** Konsolidierter Defekt nach 28 Tagen.

### 2.5.2 Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT)

Mikrocomputertomographische Verfahren bilden die Grundlage jeder Untersuchung und Evaluation von Knochen und seiner morphologischen Struktur. In dieser Studie wurde das  $\mu$ CT-System  $\mu$ CT Scanco 40 der Fa. Scanco Medical® AG verwendet. Durch die  $\mu$ CT Analyse können Hartgewebe auf nicht destruktive Weise untersucht werden. Die Proben

stehen danach für weitere Untersuchungsmethoden wie Immunhistochemie oder Histologie zur Verfügung und erlauben damit einen Erkenntnisgewinn sowohl auf der makroskopischen als auch auf der zellulären Ebene. Die Präparate wurden in der vorliegenden Studie mit einer isotropen Auflösung von 8  $\mu\text{m}$  gemessen. Durch die isotrope Auflösung bei gleichmäßiger Strahlung in allen drei Dimensionen entspricht die Schichtdicke der Pixelgröße einer Schicht. Das  $\mu\text{CT}$  40 ist eine Kegelstrahl-Mikrofokusröhre mit einer Fokusgröße von 5  $\mu\text{m}$  als Quelle und einem CCD-Sensor als Detektor. Damit ist eine maximale Auflösung von 6  $\mu\text{m}$  nominal (Pixelgröße) bzw. 9  $\mu\text{m}$  (10 % MTF) gewonnen werden kann.

Die Präparate wurden, wie in 2.5.4 beschrieben, zur Messung vorbereitet und an einer konstruierten Halterung zu fünf Präparaten parallel zueinander befestigt. Danach konnten die Proben unter Erhalt der Fixierung in 100 % Methanol in das passende transparente Messröhrchen von 14 mm Durchmesser platziert werden. So konnte die Fixierung der Proben beibehalten und eine etwaige Austrocknung durch die variierenden Messzeiten vermieden werden. Um die parallele Anordnung während der Messung zu erhalten und etwaige Positionsumstellungen zu verhindern, wurden zugeschnittene Schaumstoffpellets zwischen die Proben gelegt, die eine zusätzliche Lagesicherung gewährleisteten.

Vor jeder Messung wurden die Proben in der Scout View dargestellt. Hier war die Anordnung der Proben, entsprechend einem konventionellen Röntgenbild, erkennbar, wodurch die Messregion des zu scannenden Bereichs präzise definiert werden konnte. Es wurden für jedes Präparat durchschnittlich 302 Schichten (Schichtdicke von 8  $\mu\text{m}$ ) mit einem zylindrischen Volumen von 5 mm Durchmesser und einer durchschnittlichen Höhe von 4,53 mm gescannt. Für die Scans, deren Schichtdicke 8  $\mu\text{m}$  betrug, wurden der „High Resolution Scan Mode“ und eine Integrationszeit von 200 ms mit 600 Projektionen pro Schicht mit jeweils 1024 Messpunkten in einem Winkel von 180° gewählt (Nazarian et al., 2008). Die Integrationszeit entspricht dem Zeitraum, in dem Röntgenstrahlung pro Projektion auf den Detektor eintrifft. Strahlauvhärtungsartefakte (Beam Hardening Effect / BHA) entstehen durch den Einfluss der dreidimensionalen Präparatstruktur auf die rekonstruierten linearen Abschwächungskoeffizienten. Zur Abschwächung der BHA wurde ein scannerspezifischer Korrekturalgorithmus verwandt, der auf einem 1200 mg HA/cm<sup>3</sup> Phantom basierte. Dieses Phantom ist aus einer HA-Kunststoffmischung zusammengesetzt und ist dem früheren 200er Phantom gerade in Bezug auf Knochen höherer Dichte überlegen (Kazakia et al., 2008).

Die Analyse der rekonstruierten Daten wurde auf eine ROI von 5 mm Durchmesser und individueller Schichtdicke, basierend auf die Dicke des Präparats, beschränkt. Dadurch konnte die gesamte Ausdehnung der Knochenheilung sowohl in mesiodistaler wie auch in mediolateraler Ebene dreidimensional evaluiert werden. Gleichzeitig wurden die Messergebnisse durch die Aussparung für die Messung irrelevanter Gewebeanteile präzisiert. Für die Auswertung der Daten wurde die Software Image Processing Language (IPL von Scanco Medical AG; Brüttsellen, Schweiz) verwendet.

Zur Rauschunterdrückung und folglich einer möglichst exakten Datengenerierung wurden Schwellenwerte (Graustufe der Voxel) mit Hilfe eines Histogramms definiert. Hierbei bewegt sich der Schwellenwert innerhalb einer Grauskala, deren untere Grenze die Voxel als Knochenmark und deren obere Grenze die Voxel als Knochen definiert. Entsprechend Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe wurde für die Auswertung ein einheitlicher Schwellenwert festgesetzt, da es sich auch um denselben Knochentyp handelt, der in dieser Studie von vorrangigem Interesse war. Für den Kallus wurde der Schwellenwert auf 230 (‰ des maximalen Grauwerts), Gauß Sigma auf 1,2 und Gauß Support auf 2 definiert.

Damit konnten folgende Größen dreidimensional bestimmt werden:

Bone Volume (BV) in [mm<sup>3</sup>] und Tissue Mineral Density (TMD) in [g HA/cm<sup>3</sup>]. Diese beiden Parameter erlauben eine objektive qualitative bzw. strukturelle Darstellung und Quantifizierung des neu gebildeten Knochens im Vergleich zum bestehenden Knochen.

Um das Verhältnis des neu gebildeten Knochens zum bestehenden Knochen objektiv und individuell zu bestimmen, kann zusätzlich die Bone Volume Fraction (BV/TV) in [%] als Quotient zwischen BV und dem Gesamtvolumen (TV) der Probe errechnet werden. Da jedoch die Messungen ausschließlich auf den Defektbereich limitiert waren, fiel diese Größe nicht ins Gewicht.

Vor der Möglichkeit der dreidimensionalen nicht-destruktiven Auswertung durch  $\mu$ CT wurde Knochen durch histologische Schnitte histomorphometrisch untersucht. Dabei wurde anhand eines Stab- (Parfitt et al., 1987) und eines Plattenmodells (Parfitt, 1983) auf der Grundlage histologischer Schnitte die dreidimensionale Knochenstruktur interpretiert. Diese Auswertungsform berücksichtigt jedoch nicht die altersbedingten Strukturveränderungen des Knochens (Übergang vom plattenähnlichen in ein stabähnliches Geflecht) und ist durch die Tatsache, dass zumeist eine Übergangsform beider Muster vorliegt (Engelke et al., 1999), sehr unpräzise. Wenn nur ein Modell zugrunde liegt, kann Remodellingprozesse nicht miteinander verglichen werden.

Auswertungen durch  $\mu$ CT können diesen Mangel umgehen, indem unterschiedliche dreidimensionale Strukturparameter quantifiziert werden können:

Bone Volume (BV) in [ $\text{mm}^3$ ], Tissue Mineral Density (TMD) in [ $\text{g HA/cm}^3$ ], Bone Mineral Content, Trabecular Thickness, Degree of Anisotropy, Bone Surface und Structure Model Index. Durch diese Einflussgrößen kann die Mikroarchitektur des untersuchten Knochens nicht-destruktiv quantifiziert und beschrieben werden (Parfitt et al., 1987). Im Rahmen dieser Arbeit wurden aufgrund der Fragestellung und der später erfolgten histomorphometrischen und immunhistochemischen Untersuchungen, die eine Evaluation der Knochenentwicklung auf zellulärer bzw. molekularer Ebene erlauben, die in diesem Kapitel näher beschriebenen Parameter Bone Volume und Tissue Mineral Density ermittelt.

### **Bone Volume (BV)**

Das Volumen des neu gebildeten Knochens (BV) innerhalb des Defektes wurde in [ $\text{mm}^3$ ] abhängig vom Schwellenwert gemessen.

### **Tissue Mineral Density (TMD)**

Der Grauwert ist lediglich vom Schwellenwert, also nur vom Material (Knochen) abhängig. Zur Messung der Knochendichte (TMD) wurde ein fünfstufiger HA-Phantomkörper verwendet und in aufsteigender Konzentration (0,0 / 99,4 / 199,3 / 399,9 / 802,0  $\text{mg HA/cm}^3$ ) kalibriert. Der Knochendichtewert [ $\text{g HA/cm}^3$ ] wurde mit dem jeweiligen Wert der Hounsfield-Unit umgerechnet.

Nach den erfolgten Messungen wurden die digitalen Messdaten auf Magnetband gespeichert und können folglich mit den immunhistochemisch und histologisch gewonnenen Erkenntnissen verglichen werden. Somit bildeten die  $\mu$ CT-Messungen die Basis für weitere Analysemethoden.

## **2.6 Datenanalyse**

Da es sich bei der vorliegenden Studie um eine orientierende Vergleichsstudie handelte, wurde für die Auswertung und Analyse der  $\mu$ CT Daten zunächst ein T-Test für unverbundene Stichproben angewandt; dabei wurden die jeweiligen Gruppen sowie die Ergebnisse der unterschiedlichen Messzeitpunkte innerhalb der Gruppen untereinander verglichen. Bei ungleicher Verteilung der Standardabweichungen wurde zur Auswertung

auf den Mann-Whitney-U-Test zurückgegriffen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden ab einem p-Wert von  $p \leq 0.05$  bei einem 95 %-Konfidenzintervall mit einem Stern gekennzeichnet. Zur Analyse der Daten wurde das Programm GraphPad Prism 5.0 für Mac (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) angewandt.

### 3 Ergebnisse

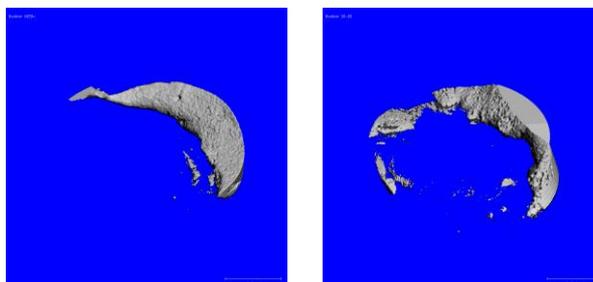
Alle Tiere haben bis auf 4 Ausnahmen die Operationen ohne Komplikationen überlebt. Für die Tierversuche, die aufgrund postoperativer Komplikationen (alle 4 Tiere entwickelten Wunddehiszenzen mit Abszess, vermutlich aufgrund einer generellen bakteriellen Infektion im Tierstall) frühzeitig abgebrochen werden mussten, standen Reservetiere zur Verfügung, sodass die Studie mit den vorgesehenen Gruppengrößen abgeschlossen werden konnte.

Nach Explantation der Unterkiefer befanden sich alle Implantate *in situ*. Somit konnten sämtliche Präparate evaluiert werden.

Alle Werte, die im Ergebnisteil genannt werden, gelten, wenn nicht anders angegeben, für die ROI von 5 mm Durchmesser. BV bezieht sich dabei folglich auf den neu gebildeten Knochen innerhalb des ursprünglichen Defektes von 5 mm Durchmesser. Da es sich bei den angewandten Kollagenschwämmen ebenso wie den Kollagenmembranen um radiolucente Materialien handelt, konnte eine Verfälschung der ermittelten Werte durch die Implantate ausgeschlossen werden.

#### 3.1 Auswertungen der Kontrollgruppe

Aufgrund der geringen Gruppengröße erfolgten die Auswertungen der Kontrollgruppe mit nicht beladenen Kollagenschwämmen nach jeweils 28 und 56 Tagen ohne eine statistische Datenanalyse. Der Maximalwert für das BV innerhalb der ROI, also dem neu gebildeten Knochen, betrug nach einem Überleben von 28 Tagen betrug  $1,47 \text{ mm}^3$ . Vergleichend dazu zeigte sich nach 56 Tagen ein maximales BV von  $2,56 \text{ mm}^3$ . Die dreidimensionale Rekonstruktion ist in Abbildung 6 dargestellt.

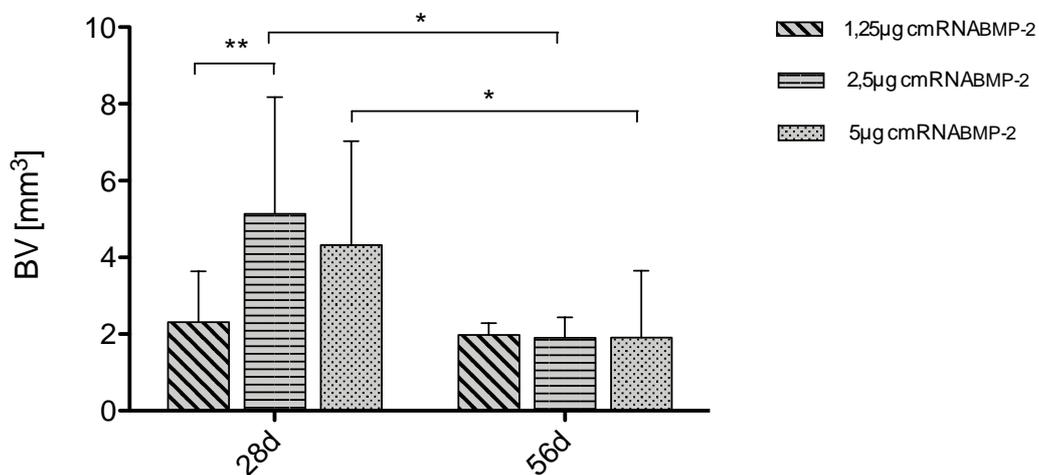


**Abbildung 5: Dreidimensionale Darstellung im  $\mu\text{CT}$  des CSD von Gruppe 1 (nativ).**

**Links:** Minimales zentripetales Knochenwachstum nach 28 Tagen. **Rechts:** Auch nach 56 Tagen kam es zu keiner Konsolidierung des Defektes. Das Knochenwachstum sistiert ohne Beschichtung der Kollagenschwämme. Messbalken: 1mm.

### 3.2 Auswertungen der Therapiegruppen mit cmRNA<sub>BMP-2</sub>

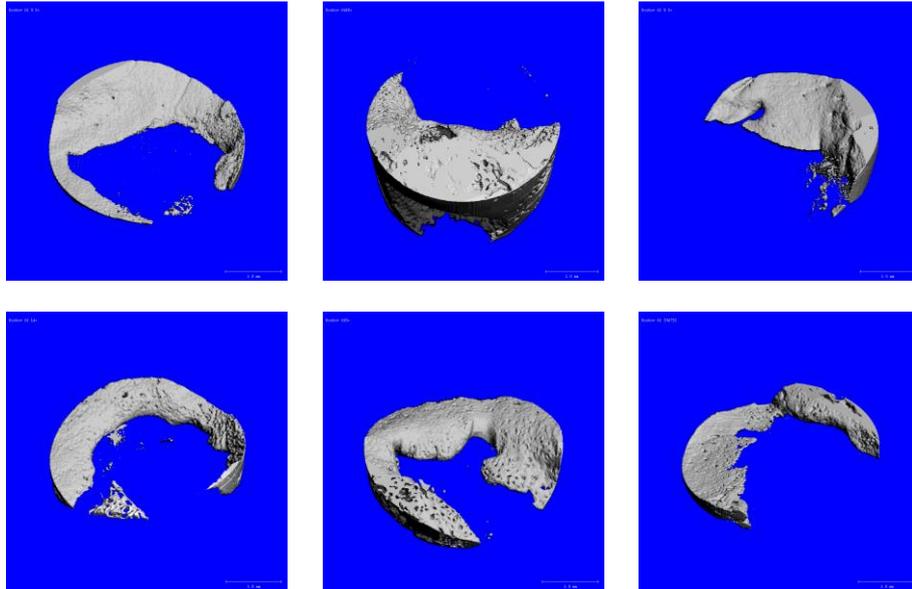
In der Therapiegruppe der mit cmRNA<sub>BMP-2</sub> behandelten Tiere kam es zu einem sichtbar stärkeren Knochenwachstum nach 28 Tagen für alle Konzentrationen (Abb. 7). Trotz der großen Varianz in der Gruppe mit der mittleren Konzentration von 2,5 µg cmRNA zeigte diese nach 28 Tagen die besten Ergebnisse gegenüber allen anderen Gruppen mit einem Zuwachs an neuem Knochen von 1,49 – 10,2 mm<sup>3</sup>. Damit waren die Ergebnisse dieser Gruppe gegenüber derjenigen mit 1,25 µg stark signifikant ( $p = 0,0025$ ). Wie in Abbildung 7 graphisch dargestellt, zeigte ein längeres Überleben von 56 Tagen keinen Vorteil auf den therapeutischen Effekt der cmRNA. Das Knochenwachstum nahm sogar ab und blieb für alle Konzentrationen in einem Bereich von 0,98 – 5,43 mm<sup>3</sup>, wobei der Median bei 1,84 mm<sup>3</sup> lag, was vergleichbar mit der Kontrollgruppe war. Die Therapiegruppen mit 2,5 und 5 µg cmRNA zeigten nach 28 Tagen ein signifikant höheres Knochenwachstum gegenüber den entsprechenden Therapiegruppen mit 56 Tagen Überlebenszeit ( $p = 0,05$ ). Dieser Effekt zeigte sich auch in der dreidimensionalen Rekonstruktion der Defekte, welche in Abbildung 8 illustriert ist. In keinem Präparat kam es zu einer vollständigen Konsolidierung des Defektes.



**Abbildung 6: Graphische Darstellung des BV der cmRNA Therapie Gruppe.**

Die mittlere Konzentration von 2,5 µg cmRNA zeigte nach 28 Tagen die besten Ergebnisse mit einem mittleren BV von 5,04 mm<sup>3</sup> und war damit beiden anderen Therapiegruppen überlegen. Eine Signifikanz bestand lediglich gegenüber der Gruppe mit 1,25 µg cmRNA (\*\*  $p = 0,0025$ ).

Nach 56 Tagen zeigten alle Gruppen keinen therapeutischen Vorteil gegenüber dem Überlebenszeitpunkt von 28 Tagen. Das Knochenwachstum für 2,5 / 5 µg cmRNA war nach 28 Tagen signifikant höher als nach 56 Tagen (\*  $p = 0,05$ ).



**Abbildung 7: Dreidimensionale Rekonstruktion im  $\mu$ CT der Therapiegruppen mit  $cmRNA_{BMP-2}$  nach 28 (obere Reihe) und 56 Tagen (untere Reihe).**

**Oben:** Von links nach rechts aufsteigende  $cmRNA_{BMP-2}$  Konzentrationen von 1,25 / 2,5 / 5  $\mu$ g. nach 28 Tagen. Zwischen der niedrigsten und höchsten Konzentration sind nach 28 Tagen kaum Unterschiede im BV erkennbar. Die mittlere Konzentration zeigt den am stärksten positiven Einfluss auf die Knochenregeneration.

**Unten:** Nach 56 Tagen ist ein deutlich gemindertes BV in allen drei Gruppen zu erkennen.

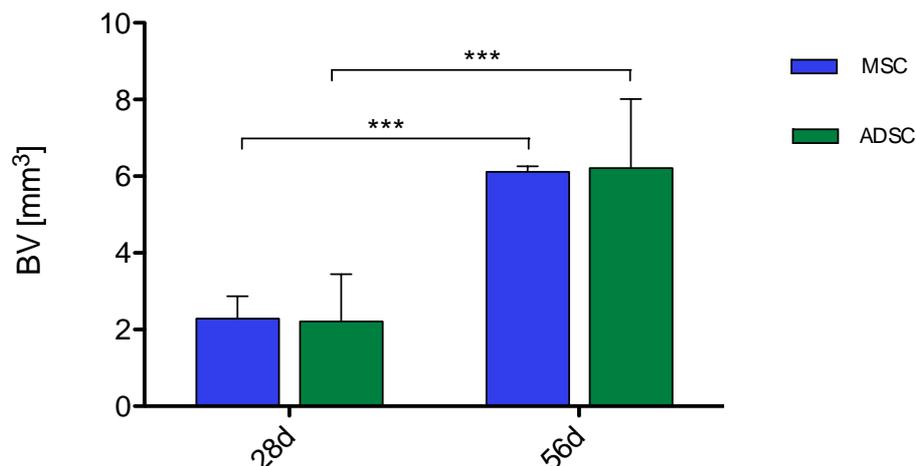
Messbalken: 1 mm.

### 3.3 Auswertungen der Therapiegruppen mit Stammzellen

#### 3.3.1 Einzeltherapie mit Stammzellen

Nach 28 Tagen zeigten sich in beiden Gruppen (MSC und ADSC) ähnliche Ergebnisse (Abb. 9) mit einem leichten Knochenwachstum von maximal 2,94  $mm^3$  für die MSC Gruppe bzw. 4,27  $mm^3$  für die ADSC Gruppe, wobei letzterer Wert einen Ausreißer darstellt. Der Median der MSC Gruppe lag nach 28 Tagen bei 2,36  $mm^3$ , während er für die ADSC Gruppe bei 2,09  $mm^3$  anzusetzen war. Es bestand keine Signifikanz innerhalb der Therapiegruppen.

Starker Knochenzuwachs zeigte sich im Gegensatz zu den mit  $cmRNA$  behandelten Tieren nach 56 Tagen. Hier war für beide Gruppen ein stark signifikantes Knochenwachstum ( $p < 0,001$ ) gegenüber dem kürzeren Überlebenzeitpunkt zu verzeichnen. Das mittlere Knochenvolumen fand sich in der MSC Gruppe bei 6,09  $mm^3$ , während die ADSC Gruppe leicht höhere Werte mit einem Median von 6,20  $mm^3$  zeigte. Die Ergebnisse der Therapiegruppen untereinander waren jedoch auch hier nicht signifikant.

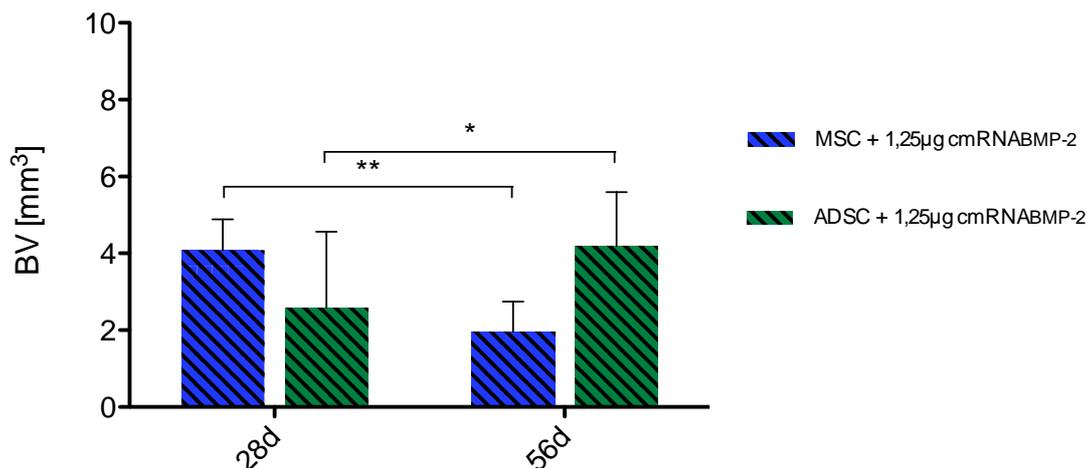


**Abbildung 8: Graphische Darstellung des BV der Therapiegruppen mit MSC und ADSC.**

Der längere Überlebenszeitpunkt von 56 Tagen zeigte signifikant bessere Ergebnisse bezogen auf das BV (\*\* $p < 0,001$ ). Innerhalb der einzelnen Therapiegruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede, wobei die Therapiegruppe mit MSC nach 28 Tagen die besseren Ergebnisse zeigte (2,36 mm<sup>3</sup> gegenüber 2,09 mm<sup>3</sup> für ADSC), während die ADSC erst nach 56 Tagen einen leicht stärkeren Wachstumseffekt zeigten (6,20 mm<sup>3</sup> gegenüber 6,09 mm<sup>3</sup> für die MSC Gruppe).

### 3.3.2 Kombinationstherapie mit cmRNA<sub>BMP-2</sub> und Stammzellen

In der ersten Gruppe mit 1,25 µg cmRNA und Stammzellen zeigten die Kombination aus cmRNA und MSC nach 28 Tagen stärkeres Knochenwachstum als die ADSC Gruppe. Obwohl der Unterschied innerhalb der Gruppen nach 28 Tagen nicht signifikant war, unterschied sich die MSC Gruppe mit einem mittleren BV von 4,24 mm<sup>3</sup> von der ADSC Gruppe mit einem deutlich niedrigeren mittleren BV von 1,79 mm<sup>3</sup> (Abb. 10). In der Gruppe mit 56 Tagen Überlebenszeit zeigte sich ein offenbar inverser Effekt der Kombinationstherapie auf das Knochenwachstum. In der MSC Gruppe nahm das BV nach 56 Tagen ab (2,05 mm<sup>3</sup>) und war damit signifikant niedriger als zum kürzeren Überlebenszeitpunkt ( $p = 0,0249$ ). In der ADSC Gruppe in Kombination mit 1,25 µg cmRNA wurde nach 56 Tagen ein mittleres BV von 4,17 mm<sup>3</sup> gemessen. Damit war es nicht signifikant größer als das BV der entsprechenden MSC Therapie, jedoch kam es nach der längeren Therapiedauer von 56 Tagen zu einem signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ).



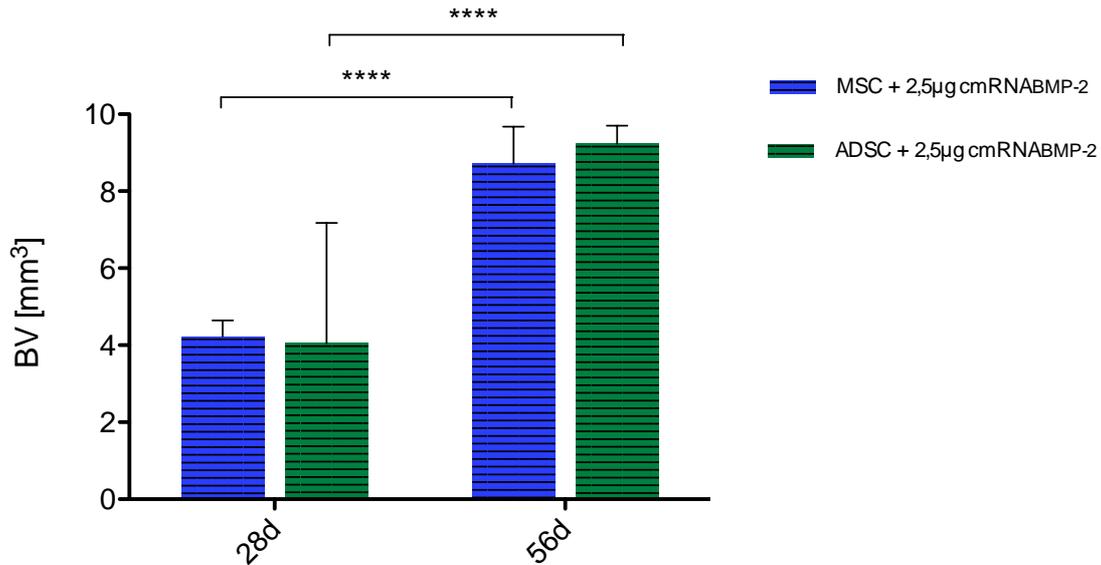
**Abbildung 9: Graphische Darstellung des BV der Therapiegruppen mit 1,25 µg cmRNA und MSC / ADSC.**

Während der längere Überlebenszeitpunkt von 56 Tagen signifikant bessere Ergebnisse bezogen auf das BV der ADSC Gruppe zeigte (\*  $p < 0,05$ ), war in der MSC Gruppe bezogen auf die Therapiedauer ein inverser Therapieeffekt zu erkennen. Hier zeigte sich nach 56 Tagen ein signifikant niedrigeres BV ( $2,05 \text{ mm}^3$ ) als nach 28 Tagen ( $4,24 \text{ mm}^3$ ). \*\*  $p = 0,0249$ .

Innerhalb der einzelnen Therapiegruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Vergleichend zu den Ergebnissen der Kombinationstherapie mit der niedrigsten cmRNA Konzentration ( $1,25 \mu\text{g}$ ) zeigte die Anwendung der nächsthöheren Dosis ( $2,5 \mu\text{g}$  cmRNA) in Kombination mit Stammzellen einen positiven Effekt auf das Knochenwachstum in beiden Gruppen. Während auch hier innerhalb der Gruppen keine signifikanten Unterschiede bestanden (Abb. 11), war nach 28 Tagen die Kombinationstherapie mit MSC (mittleres BV von  $4,10 \text{ mm}^3$ ) derjenigen mit ADSC (mittleres BV von  $3,18 \text{ mm}^3$ ) überlegen. Wie in der Kombinationsgruppe mit  $1,25 \mu\text{g}$  cmRNA und ADSC scheint die doppelte Überlebenszeit von 56 Tagen einen positiven Effekt mit einem stark signifikanten Unterschied ( $p < 0,0001$ ) auf das Knochenwachstum gezeigt zu haben.

Nach 56 Tagen war die ADSC Gruppe in der gegebenen Konzentration von  $2,5 \mu\text{g}$  cmRNA der entsprechenden Gruppe ohne signifikanten Unterschied überlegen. Das mittlere BV für die ADSC Gruppe betrug in diesem Fall nach 56 Tagen  $9,15 \text{ mm}^3$ , während es in der MSC Gruppe bei  $8,91 \text{ mm}^3$  lag. Damit war insbesondere in der ADSC Gruppe mit  $2,5 \mu\text{g}$  cmRNA in den meisten Präparaten eine vollständige Konsolidierung des CSD (Abb. 13) zu verzeichnen. Die Präparate aus dieser Gruppe, denen eine MSC Suspension zeigten in der dreidimensionalen Bildgebung einen nahezu vollständigen Verschluss der Defekte, wie in Abbildung 14 dargestellt wird.



**Abbildung 10: Graphische Darstellung des BV der Therapiegruppen mit 2,5 µg cmRNA und MSC / ADSC.**

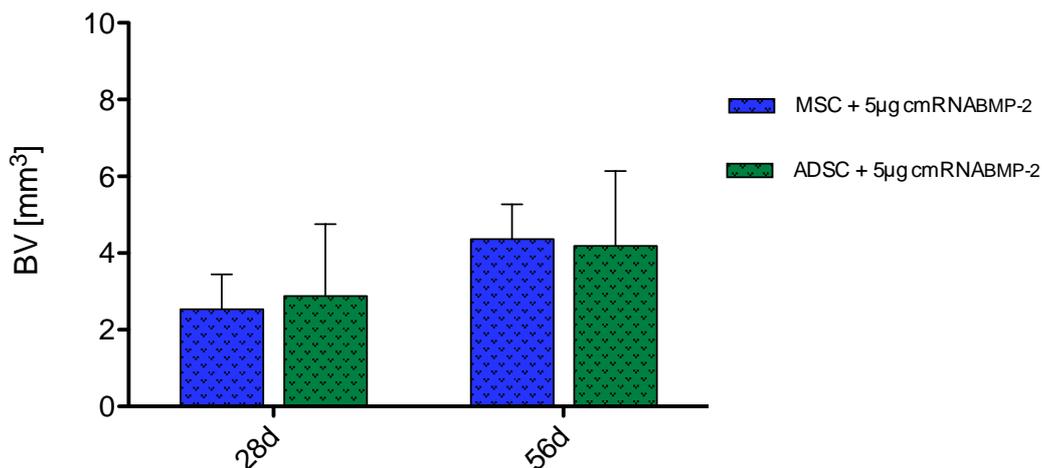
Bei mittleren BV-Werten von 4,10 mm<sup>3</sup> (MSC) und 3,18 mm<sup>3</sup> (ADSC) nach 28 Tagen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Der längere Überlebenszeitpunkt von 56 Tagen zeigte in beiden Gruppen signifikant bessere Ergebnisse (\*\*\*\* p < 0,0001) bezogen auf das BV. Hier war das mittlere BV der ADSC Gruppe etwas höher (9,15 mm<sup>3</sup>) als in der MSC Gruppe (8,91 mm<sup>3</sup>). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Für die Kombinationstherapie mit der höchsten cmRNA Konzentration von 5 µg wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie in der entsprechenden Gruppe ohne die zusätzliche Applikation von Stammzellen. Demnach war hier das BV in beiden Gruppen niedriger als in den Therapiegruppen mit den niedrigeren cmRNA Konzentrationen:

Das mittlere BV lag für die MSC Gruppe nach 28 Tagen bei 2,415 mm<sup>3</sup>, während für die ADSC Gruppe ein mittleres BV von 2,48 mm<sup>3</sup> zum selben Überlebenszeitpunkt verzeichnet wurde. Ein signifikanter Unterschied bestand nicht. Gleichzeitig stieg nach 56 Tagen in beiden Gruppen das mittlere BV auf 4,025 mm<sup>3</sup> in der MSC Gruppe und 4,11 mm<sup>3</sup> in der ADSC Gruppe. Auch hier war kein signifikanter Unterschied messbar.

Im Gegensatz zur alleinigen Therapie mit cmRNA in derselben Konzentration war hier bei einem längeren Überleben kein negativer Effekt auf das Knochenwachstum messbar.

Die Ergebnisse der BV-Messungen sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt. Signifikante Unterschiede bestanden weder zwischen den Gruppen untereinander noch im Vergleich beider Überlebenszeitpunkte. Bei Betrachtung der einzelnen Messwerte lässt sich feststellen, dass die ADSC Gruppe, obwohl nicht signifikant überlegen, vereinzelt deutlich größere Werte (BV<sub>max</sub> = 7,23 mm<sup>3</sup> nach 56 Tagen) zeigte als die MSC Gruppe (BV<sub>max</sub> = 6,20 mm<sup>3</sup> nach 56 Tagen).



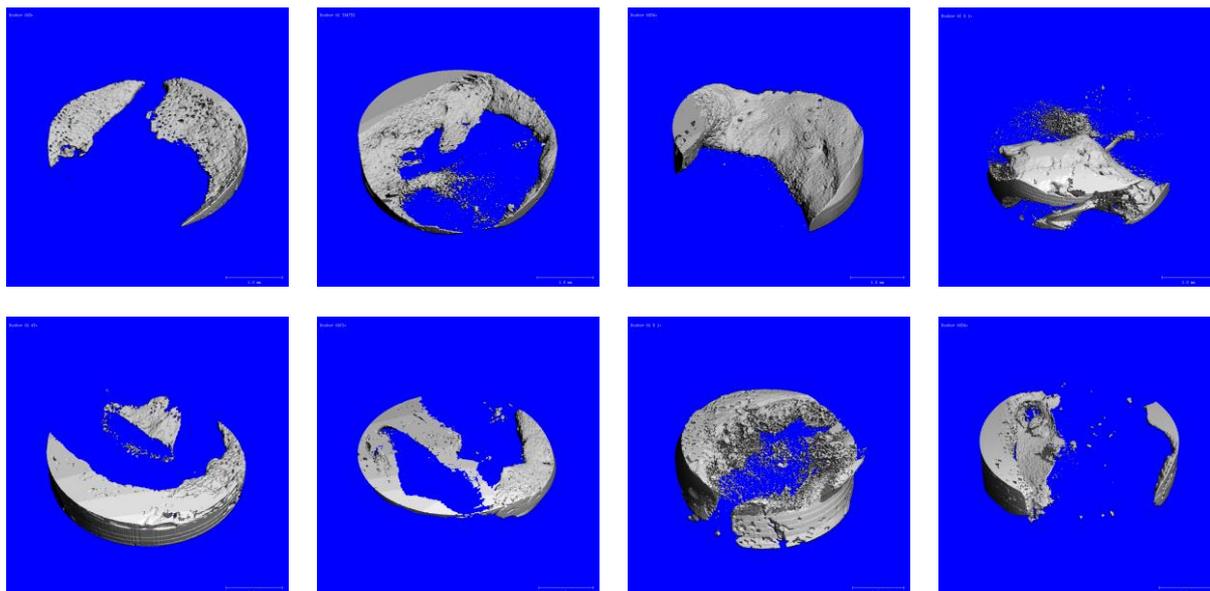
**Abbildung 11: Graphische Darstellung des BV der Therapiegruppen mit 5 µg cmRNA und MSC / ADSC.**

Die ADSC Gruppe erzielte zu beiden Überlebenszeitpunkt größere Werte als die MSC Gruppe: Das mittlere BV lag für ADSC nach 28 Tagen bei 2,48 mm<sup>3</sup>, während für die MSC Gruppe ein mittleres BV von 2,415 mm<sup>3</sup> gemessen wurde.

Nach 56 Tagen stieg das BV in beiden Gruppen leicht an mit einem mittleren BV von 4,11 mm<sup>3</sup> in der ADSC Gruppe und 4,025 mm<sup>3</sup> in der MSC Gruppe. Obwohl die ADSC Gruppe der MSC Gruppe überlegen war, waren die Unterschiede nicht signifikant.

Die dreidimensionalen Rekonstruktionen zu den oben beschriebenen Ergebnissen der Kombinationstherapien sind in den Abbildungen 13 und 14 vergleichend dargestellt. Dabei war stets eine zu den Gruppen, die lediglich mit cmRNA behandelt wurden, unterschiedliche Wachstumsstruktur des neu gebildeten Knochens zu erkennen. Während in den Therapiegruppen mit cmRNA zentripetales Wachstum zu erkennen war, wiesen alle Therapiegruppen mit SC knöcherne Brücken innerhalb der CSD, welche die Defektgrenzen miteinander verbanden (Abb. 13 und 14). Neben diesen Ausläufern waren in einigen Präparaten diffuse, punktuell angeordnete, radioopake Strukturen (Abb. 13), teilweise in inselartigen Formationen, erkennbar, die nicht mit den Defektgrenzen zusammenhingen (Abb. 14). Diese Morphologie schien für die Gruppen, die mit Stammzellen behandelt wurden, charakteristisch zu sein.

In den Abbildungen 15 und 16 sind die Kombinationstherapien entsprechend der Darstellung der Abbildungen 13 und 14 graphisch gegenübergestellt. Es zeigte sich in der MSC Gruppe (Abb. 15) zu beiden Überlebenszeitpunkten das stärkste Knochenwachstum in der Kombination mit der mittleren cmRNA Konzentration. Das Gleiche gilt für die Kombinationsgruppen mit ADSC. Einzelwerte sind den Beschreibungen der Abbildungen 15 und 16 zu entnehmen.



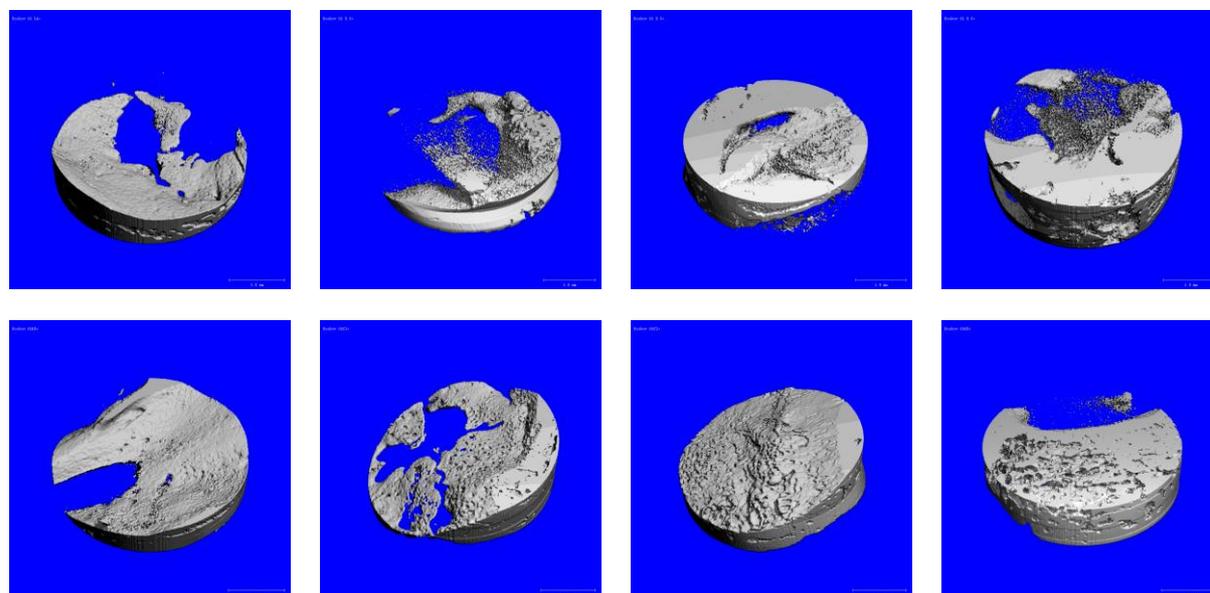
**Abbildung 12: Dreidimensionale Rekonstruktion der Gruppen mit Kombinationstherapie von cmRNA und Stammzellen nach 28 Tagen.**

**Obere Reihe:** Die Therapie mit 1,25 µg cmRNA + MSC (Mitte links) und 2,5 µg cmRNA + MSC (Mitte rechts) zeigt mehr Knochenwachstum als die Gruppen mit MSC (links) und 5 µg cmRNA + MSC (rechts).

**Untere Reihe:** Bei den Kombinationstherapien jeweils mit ADSC sind ähnliche Ergebnisse erkennbar.

**Reihenfolge von links nach rechts:** ADSC / 1,25 / 2,5 / 5 µg cmRNA je mit ADSC. Messbalken: 1 mm.

Beiden Gruppen ist gemeinsam, dass im Vergleich zu den Einzeltherapien mit cmRNA ein zentripetales Wachstum mit knöchernen Brücken, die sich über den gesamten Defekt erstrecken, vorweisen.

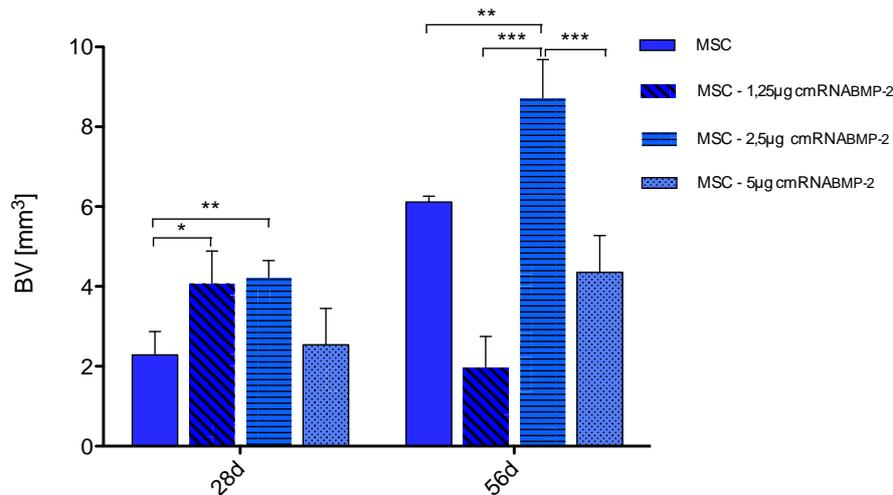


**Abbildung 13: Dreidimensionale Rekonstruktion der Gruppen mit Kombinationstherapie von cmRNA und Stammzellen nach 56 Tagen.**

**Obere Reihe:** Stärkeres Knochenwachstum bis zur fast vollständigen Defektkonsolidierung (2,5 µg cmRNA + MSC) in der Kombinationstherapie. Rückläufiges Wachstum bei 5 µg cmRNA + MSC.

**Untere Reihe:** Darstellung der Stammzelltherapiegruppen mit ADSC. Auch hier führte die Kombination aus cmRNA und Stammzellen zu einem positiven Wachstumseffekt, insbesondere in der Konzentration von 2,5 µg cmRNA. Hier wurden die Defekte vollständig mit neuem Knochen verschlossen.

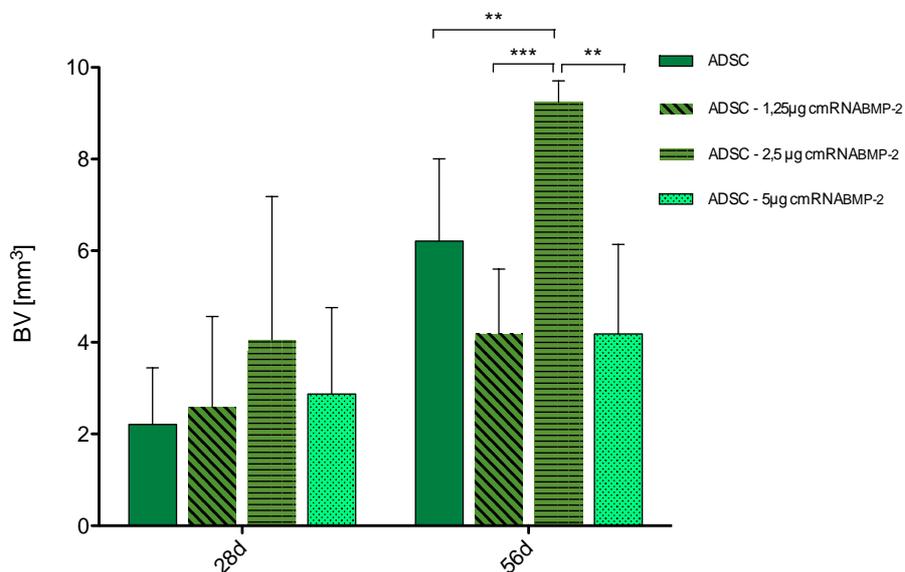
**Reihenfolge von links nach rechts:** ADSC / 1,25 / 2,5 / 5 µg cmRNA jeweils mit ADSC. Messbalken: 1 mm. Das charakteristische Wachstumsmuster mit einzelnen punktuellen oder brückenartigen Wachstumszonen ist in beiden Gruppen erkennbar.



**Abbildung 14: Graphische Darstellung des BV der Kombinationstherapien mit MSC und cmRNA.**

Nach 28 Tagen waren in den Kombinationstherapien mit 1,25 µg cmRNA und 2,5 µg cmRNA die höchsten Werte messbar. Die MSC Therapiegruppe mit einer Konzentration von 1,25 µg cmRNA hatte ein signifikant höheres BV als die Therapiegruppe, die nur MSC erhielt (\*  $p < 0,05$ ). Die MSC Gruppe, die mit 2,5 µg cmRNA beladene Kollagenschwämme erhielt, war gegenüber der Einzeltherapie mit MSC sogar stärker signifikant überlegen (\*\*  $p = 0,01$ ).

Nach 56 Tagen zeigte sich eine deutliche Zunahme Des BV, insbesondere in der Einzeltherapie mit MSC (mittleres BV: 6,09 mm<sup>3</sup>) und in der Kombinationstherapie mit 2,5 µg cmRNA. Hier wurden die höchsten Werte mit einem mittleren BV von 8,91 mm<sup>3</sup> gemessen. Die Gruppe mit 2,5 µg cmRNA + MSC war signifikant stärker als die MSC Gruppe (\*\*  $p = 0,01$ ). Die Unterschiede zu den beiden anderen Gruppen waren noch stärker signifikant: \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Abbildung 15: Graphische Darstellung des BV der Kombinationstherapien mit ADSC und cmRNA.**

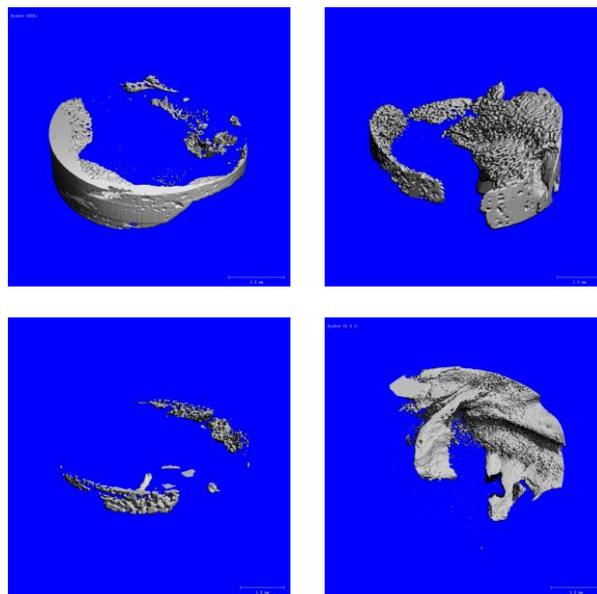
Die Therapiekombination mit ADSC und cmRNA zeigte ähnliche Verhältnisse wie der Einsatz von MSC. Bei deutlich höheren Wachstumswerten nach 56 Tagen war die Kombinationsgruppe aus 2,5 µg cmRNA und ADSC mit einem mittleren BV von 9,15 mm<sup>3</sup> signifikant stärker als die Einzeltherapiegruppe mit ADSC (mittlere BV = 6,20 mm<sup>3</sup>) sowie die beiden anderen Kombinationsgruppen (mittleres BV für 1,25 µg cmRNA + ADSC: 4,165 mm<sup>3</sup> / mittleres BV für 5 µg cmRNA + ADSC: 4,11 mm<sup>3</sup>). \*\*  $p = 0,0011$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . In allen Gruppen mit ADSC war die Varianz größer als in den Gruppen mit MSC.

### 3.4 Kombinationstherapie von cmRNA und Stammzellen nach 14 Tagen

Aufgrund der geringen Gruppengröße dienten die Präparate der Überlebenszeit von 14 Tagen dem orientierenden Vergleich und wurden daher keiner statistischen Auswertung zugeführt. Um eine Vorstellung über das initiale Knochenwachstum zu bekommen, wurden daher die Gruppen, die nur Stammzellen erhielten, und die Gruppe mit 2,5 µg cmRNA und Stammzellen über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Letztere wurde gewählt, da sie allen anderen Gruppen in Bezug auf das BV stets überlegen war.

Das mittlere BV lag für die Einzeltherapie mit MSC bei 1,24 mm<sup>3</sup>, während es bei der ADSC Gruppe mit 1,09 mm<sup>3</sup> etwas niedriger war. In der Kombinationstherapie mit 2,5 µg cmRNA zeigte sich in beiden Gruppen ein Anstieg des Knochenwachstums mit einem mittleren BV von 2,99 mm<sup>3</sup> für die MSC Gruppe und 3,23 mm<sup>3</sup> für die ADSC Gruppe.

Abbildung 17 illustriert die Wachstumsmorphologie mit knöchernen Ausläufern, die wie in allen Gruppen, die mit Stammzellen behandelt wurden, auch bereits nach 14 Tagen zu erkennen ist.



**Abbildung 16: Therapiegruppen mit MSC / ADSC und jeweils 2,5 cmRNA nach 14 Tagen.**

**Obere Reihe:** Sowohl in der Einzeltherapie mit MSC (links) wie auch in der Kombinationsgruppe mit 2,5 µg cmRNA (rechts) ist ein Knochenzuwachs festzustellen. Auch hier sind punktförmige knöcherne Strukturen innerhalb des Defektes erkennbar.

**Untere Reihe:** Ähnliche Ergebnisse zeigte die Gruppe mit ADSC. Links ist die Einzeltherapie nach 14 Tagen dargestellt. Rechts (2,5 µg cmRNA + ADSC) sieht man ebenfalls die sich bereits bildenden charakteristischen radioopaken Gewebebrücken innerhalb des Defektes.

Messbalken: 1 mm.

#### 4 Diskussion

Der demographische Wandel und die damit verbundene hohe und steigende Inzidenz degenerativer und onkologischer Erkrankungen des Knochens zeigen deutlich den Bedarf neuer Therapieansätze in der rekonstruktiven Chirurgie.

Dabei steht die vollständige Rekonstruktion eines Knochenareals im Sinne einer *Restitutio ad integrum* beispielsweise durch die Stimulation der körpereigenen Knochenregeneration im Vordergrund.

Das größte Augenmerk der regenerativen Medizin und des Tissue Engineering liegt auf der Regeneration und dem Ersatz geschädigten Gewebes, wobei Letzteres nicht nur in seiner Morphologie, sondern auch funktionell wiederhergestellt werden soll. Gerade in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie muss dabei auch der ästhetische Aspekt beachtet werden.

Um diese Ziele zu erreichen, hat man sich in der jüngsten Vergangenheit vermehrt die Eigenschaften von Stammzellen zur Differenzierung und Dedifferenzierung zunutze gemacht, indem der Entwicklung einer Zelle extrinsisch eine gewünschte Richtung vorgegeben werden kann. Hierbei verwenden die meisten Autoren Gen- oder Proteintransport. In der vorliegenden Arbeit hat unsere Arbeitsgruppe chemisch modifizierte messenger RNA (cmRNA) verwandt, welche sich durch erhebliche Vorteile gegenüber der klassischen Gentherapie mittels DNA bzw. physiologischer mRNA oder der Therapie mit rekombinantem Protein auszeichnet.

Es wurden sowohl der Einfluss durch cmRNA stimulierter lokaler Stammzellen auf die Knochenregeneration untersucht, als auch jener von extrinsisch zugeführten Stammzellen allein. Dabei zeigte sich, dass ein gentherapeutisches Konzept mittels cmRNA im Sinne einer Transkriptaktivierten Matrix gerade durch die zusätzliche lokale Zufuhr von Stammzellen einen gegenüber dem derzeitigen Goldstandard, also der autologen Gewebetransplantation, vorteilhaften Therapieansatz darstellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten diese Vorteile an und sollen im Folgenden erläutert werden. Die daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen basieren auf die Auswertung der Knochenneubildung durch  $\mu$ CT und durch *in vitro* Voruntersuchungen gewonnener Daten, deren Darstellung nicht Gegenstand dieser Arbeit war. Ziel der Arbeit war es, die *in vitro* nachgewiesenen osteoinduktiven Kapazitäten von cmRNA (Badiyan et al., 2016 2017) sowie den additiven Effekt in der Kombination mit Stammzellen (Balmayor, 2016) *in vivo* zu untermauern und die Grundlage für ein praktikables

Therapiekonzept für den klinischen Einsatz zu entwickeln. Am ehesten eignet sich hierzu das  $\mu$ CT. Dabei lässt sich nicht nur das Knochenvolumen, sondern auch der Mineralisierungsgrad des neu gebildeten Knochens präzise über die Definition einer ROI darstellen und messen. Die Knochenqualität wird so über mehrere Parameter bewertet, hierunter fallen die mineralisierte Mikroarchitektur, der Mineralisierungsgrad, die Übergangszonen und das trabekuläre System. Der Beurteilung der Knochenqualität über ihren Mineralisierungsgrad wird hohe Bedeutung beigemessen, da so Rückschlüsse auf die Qualität und Fragilität des neu gebildeten Knochens gezogen werden können (Larrue et al., 2011).

Die 3D Bildgebung mittels  $\mu$ CT ermöglicht die Darstellung und Messung der knöchernen Mikroarchitektur wie Trabekel, Kanälkel oder vereinzelte Lakunen, die im konventionellen Röntgenbild wie beispielsweise dem Zahnfilm verborgen bleiben. Somit können über das  $\mu$ CT möglichst exakte und zuverlässige Informationen über die Geometrie, das Ausmaß und die Topologie der dargestellten Knochenstrukturen gezogen werden. Die histomorphometrische Analyse von Knochen erlaubt hingegen nur eine begrenzte Beurteilung über den knöchernen Integrationsgrad eines Implantats, dadurch dass einzelne Bereiche nur lokal evaluiert werden können, ohne einen Überblick über den gesamten originären Zustand des Präparates zu erlauben. Zudem ist jede histologische Analyse mit einem destruktiven Prozess verbunden, der die Evaluation dadurch limitiert, dass nur einige Schnitte in die Analyse einfließen.

Die konventionelle Radiographie mittels Röntgen, in diesem Fall Zahnfilm, ermöglichte eine erste, nicht-destruktive, zweidimensionale Beurteilung des Präparates. Allerdings können auch hier wie in der Histomorphometrie weder die Mikroarchitektur noch der Grad der Mineralisierung von Hartgewebe analysiert werden. Ein dreidimensionales Verfahren mittels  $\mu$ CT ist folglich als Grundlage weiterer Analysen notwendig (Neldam and Pinholt, 2014). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten dienen der quantitativen Beurteilung des Effektes der angewandten Therapieansätze, gleichzeitig ließ sich durch die rekonstruierte dreidimensionale Struktur der Heilungsprozess morphologisch bewerten und differenzieren. Dies erlaubt die gezielte Planung und Durchführung weiterer qualitativer Untersuchungsverfahren im Rahmen einer Histologie oder Immunhistochemie.

Knochen befindet sich als stark vaskularisiertes Gewebe in ständigem Umbau. Dadurch ist Knochen in der Lage, schnell und narbenfrei zu verheilen, indem während der

Heilungsphase ständig Osteoprogenitorzellen, Wachstumsfaktoren und Substrate im Bereich der Regeneration im Umlauf sind. Hierzu bedarf es zahlreicher Trigger, wie Signalmoleküle und Transkriptionsregulatoren. So wird der Heilungsprozess von Knochen durch die Bildung eines Koagels eingeleitet, welches in der initialen Entzündungsphase dabei hilft, potentielle Antigene aus dem Wundbereich zu beseitigen und die Wiederherstellung des Gewebes zu gewährleisten. Es bildet sich daraufhin gefäßreiches Granulationsgewebe, das kontinuierlich durch Geflechtknochen ersetzt wird. Gerade in dieser Reparationsphase tragen Wachstumsfaktoren der TGF- $\beta$  Familie, Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zur Kallusbildung bei. Dieser Reparaturmechanismus ist bei weitgehenden Defekten aufgrund der mangelhaften interzellulären Kontakte limitiert, was den Einsatz eines Interponates innerhalb des Defektes notwendig macht.

Knochenersatzmaterialien als Scaffolds geben dem Defekt eine dreidimensionale Wachstumsstruktur vor, bieten biomechanische Stabilität und dienen als Transportmittel für biologische Therapiebestandteile (Kolk et al., 2015, Smeets et al., 2017).

Ideal handelt es sich dabei um ein biomimetisches Material, d. h. es ähnelt in seiner dreidimensionalen Struktur und Funktion dem originären Gewebe und kann fortwährend hierdurch ersetzt werden. Die Verwendung von Knochenersatzmaterialien ist in der Orthopädie und Gesichtschirurgie allgegenwärtig. So bilden aber Knochenersatzmaterialien allein bei größeren Defekten lediglich eine Art Platzhalter und führen damit zur Bildung minderwertigen Knochens innerhalb des Defektes. Folglich bildet die autologe Knochentransplantation nach wie vor den Goldstandard für die Deckung ausgedehnter knöcherner Defekte. Daher steht die Optimierung von Knochenersatzmaterialien, welche die Knochenheilung und die Osseointegration beschleunigen sollen, seit einigen Jahren im Mittelpunkt der Forschung.

Hierzu stehen als Basis unterschiedliche Materialien wie synthetische alloplastische Metalle, Polymere oder Keramiken zur Verfügung. Diese lassen sich in ihrer Struktur individuell formen, sind jedoch mit schwachen Integrationseigenschaften vergesellschaftet, da sie in keiner Weise dem natürlichen Knochen ähneln. Zudem können Metalle Infektionen induzieren und werden als Fremdkörper nicht resorbiert, Keramiken sind brüchig und können bei größeren Defekten mit starker mechanischer Beanspruchung (D'Mello et al., 2017) wie dem Unterkieferknochen nicht eingesetzt werden.

Proteine adsorbieren unspezifisch an Materialoberflächen und erhöhen damit das Interaktionspotential des Materials mit lokalen Zellen. Diese Adsorptionsfähigkeit ist erhöht bei Materialien mit einem hohen Oberflächen-Volumen-Verhältnis (Lacerda et al., 2010, Pan et al., 2014), am ehesten durch eine poröse Binnenstruktur. Lokale Zellen binden über Integrine an Proteinliganden, folglich kommt es zu verstärktem Materialkontakt und einer damit erhöhten Zellkonzentration im Defektbereich.

Um die Knochenregeneration optimal zu unterstützen, sollte sich das verwendete Material durch strukturelle und mechanische Stabilität auszeichnen. Eine zudem homogene poröse Struktur gestattet dabei bestmögliche Zelladhäsion und Gewebewachstum, wodurch das räumlich gerichtete Wachstum gewährleistet wird. Während des Regenerationsprozesses ist die Degradationsrate des Materials von entscheidender Bedeutung, da bei zu schneller Resorption die mechanische Stabilität und damit die Funktion verloren gehen. Der biologische Abbau, also die Resorption, muss folglich im zeitlichen Verhältnis zum Wachstum und der Regenerationsgeschwindigkeit stehen. Dieses Verhältnis lässt sich durch unterschiedliche Beschichtungen des Materials modifizieren und steuern.

In diesem Zusammenhang zeichnen sich Kollagenschwämme, wie in dieser Studie angewandt, für den Einsatz in der regenerativen Medizin durch einige Vorteile aus. Hier handelt es sich um ein bioaktives Material zweiter Generation durch die Aufnahme und Integration bioaktiver Genträger. Sie werden als bioaktive dreidimensionale Gerüste vielfältig in Zellkulturen eingesetzt und optimieren dabei sogar die interzellulären Signale durch ihren Einfluss auf die Genexpression von Zellen (Chevallay and Herbage, 2000). So wurde durch Badiéyan *et al* (Badiéyan et al., 2016) das Wachstum von Zellen auf beschichteten Kollagenschwämmen als 3D Matrix nachgewiesen.

Weiterhin finden Kollagenschwämme in unterschiedlichen Formen klinische Anwendung zur Wundheilung, als Hämostyptikum oder als Knochenersatzmaterial kleinerer ossärer Defekte (Khan et al., 2011).

Aufgrund seiner hohen Biokompatibilität ist Kollagen bisher das einzige zugelassene Trägermaterial für rhBMP-2 und dient daher in vielen *in vitro* und *in vivo* Studien als osteoinduktives Scaffold. Kollagenschwämme sind leicht in ihrer Handhabung *in vivo* und dadurch im Hinblick auf eine erstrebte klinische Zulassung der hier untersuchten Therapieform gut einsetzbar.

Der eingesetzte Kollagenschwamm besteht laut Herstellerangaben aus einem dreidimensionalen porösen Gerüst mit Porengrößen zwischen 50 und 200  $\mu\text{m}$ , wobei die

Kollagenfasern lose miteinander verbunden sind. Dieses poröse Netzwerk gibt eine Wachstumsrichtung vor und erlaubt das Zell- und Gefäßwachstum entlang der Fasern. Somit entsteht gerichtetes Wachstum, während das Biomaterial kontinuierlich durch den Körper resorbiert wird. Kollagen ist als Biomaterial vielseitig zur Haut- und Gefäßregeneration einsetzbar (Boccafoschi et al., 2005, Li et al., 2006, Venugopal and Ramakrishna, 2005, Park et al., 2004). Ferner ist die reduzierte Immunantwort des Empfängerorganismus durch das Kollagen-Scaffold (Sonobe et al., 2004) als erheblicher Vorteil im operativen Einsatz zu betrachten.

Die zusätzlich eingesetzte Kollagenmembran, welche subperiostal ans Knochenlager angelegt wurde, um ein postoperatives Abwandern des Implantates etwa durch den Zug der kräftigen Kaumuskulatur zu verhindern, konnte eine konkrete Einheit mit dem Implantat bilden, da sie über dieselben Eigenschaften verfügte. Eine Verfälschung der Ergebnisse konnte ausgeschlossen werden, da die Kollagenmembranen aufgrund ihrer dünnen Schichtstärke deutlich schneller resorbiert wurden als die Kollagenimplantate in den CSDs und folglich als Stützfunktion für den initialen Heilungsprozess betrachtet werden können.

Hauptziel der Untersuchungen dieser Studie war es, die osteoinduktiven Eigenschaften von cmRNA und Stammzellen auf ihre Eignung als neue Therapieform in rekonstruktiven chirurgischen Verfahren zu untersuchen. Dabei entschied sich unsere Arbeitsgruppe aufgrund der oben erörterten Eigenschaften für einen Kollagenschwamm als Trägermaterial. Die CSDs von 5 mm Durchmesser konnten somit stabil gedeckt werden und die Schwämme ihre Funktion als Platzhalter und Richtungsgeber für das Knochenwachstum vorgeben. Betrachtet man jedoch deren Konsistenz und die molekulare Struktur von Kollagen, eignen sich Kollagenschwämme in größeren ossären Defekten, z. B. Kontinuitätsdefekten, nicht zur dauerhaften Deckung. Hierzu muss auf ein Material zurückgegriffen werden, das nicht nur in seiner Biokompatibilität und porösen Struktur mit Kollagen vergleichbar ist, sondern auch in seiner molekularen Zusammensetzung dem funktionellen Knochen ähnlich ist, um sichere Stabilität über einen längeren Regenerationszeitraum zu ermöglichen. Dabei sollte das Implantatmaterial formbar sein, um die komplexen anatomischen Strukturen gerade im Gesichtsbereich wiedergeben zu können. Die osteokonduktiven Eigenschaften von  $\beta$ -Tricalcium-Phosphat ( $\beta$ -TCP) und Hydroxylapatit sind bekannt. Der Calciumgehalt fördert die Osteogenese u. a. dadurch, dass er die Bildung von Bindegewebe im Defekt reduziert.

Die Beschichtung von  $\beta$ -TCP (Cerasorb®) und MatrixMANDIBLE (Synthes) zur Rekonstruktion eines atrophen Unterkiefers zeigte in seiner Verwendung ein voll funktionsfähiges Knochenlager nach vierzehn Monaten (Lopes et al., 2012).

Limitierender Faktor der Calcium-basierten Implantatmaterialien, jedoch, sind die hohe Bruchanfälligkeit und die niedrige Hydrophilität. Alternativ lassen sich flüssige PEG-Membranen (Wehrhan et al., 2012) und Fibrinkleber, genau auf den Defekt abgemessen, implantieren. Diese bieten jedoch keine mechanische Stabilität und sind als Lastträger ungeeignet. Eine Alternative bieten Scaffolds auf Seidenfibroinbasis. Sie finden ebenfalls Anwendung und zeigen Erfolge bei der Regeneration von Knorpel (Meinel et al., 2004a) und Knochen (Jin et al., 2004, Meinel et al., 2004b, Vepari and Kaplan, 2007). Die Abbauraten von Seidenfibroin sind prognostizierbar (Vepari and Kaplan, 2007, Jin and Kaplan, 2003), die Entzündungsreaktion ist deutlich niedriger als bei Kollagen oder synthetischen Polymeren (Altman et al., 2003, Meinel et al., 2006).

Alle hier aufgeführten Materialien haben gemeinsam, dass deren Osteoinduktivität durch die Beschichtung mit Wachstumsfaktoren oder anderen wachstumsfördernden Molekülen optimiert werden kann. Diesen erheblichen Einfluss von Wachstumsfaktoren auf den Heilungsprozess hat man sich in zahlreichen Studien zur Optimierung von Knochenersatzmaterialien zunutze gemacht. So bestimmt die Konzentration der im Knochen gespeicherten Wachstumsfaktoren das Ausmaß der Knochenneubildung (Linkhart et al., 1996). Dabei ist anzumerken, dass die Serumhalbwertszeit von Wachstumsfaktoren durch proteasomale Degeneration reguliert wird (Zapf et al., 1986, Chen et al., 1998). Trägersysteme, wie sie Kollagenschwämme darstellen, können durch das Speichern von Wachstumsfaktoren der proteasomalen Degeneration entgegenwirken und auf diese Weise die Freisetzungskinetik drosseln (Takahashi et al., 2005), wodurch die Halbwertszeit aktiver Proteine von wenigen Stunden auf mehrere Tage erhöht werden kann (Winn et al., 1999); im Falle von rhBMP-2 konnten auf diese Art Winn *et al* (Winn et al., 1999) die Halbwertszeit von rhBMP-2 auf drei bis fünf Tage steigern. Als zentrales Protein im Wachstums- und Regenerationsprozess von Knochen befindet sich rhBMP-2 bereits seit einigen Jahren im klinischen Einsatz zur Frakturtherapie im Rahmen der Spondylodese (Einhorn and Gerstenfeld, 2015, Kimelman Bleich et al., 2012).

Der Zusatz von rekombinantem Protein zur konventionellen operativen Therapie von Non-Union Frakturen langer Röhrenknochen erwies sich in vielen Fällen als erfolgreich (Drosse et al., 2008, Kimelman Bleich et al., 2012). Dieser Therapieansatz ist jedoch mit sehr hohen Dosen und damit auch hohen Kosten verbunden (Balmayor et al., 2016b). Die

Verwendung von rekombinantem Protein, welches daher in seltenen klinischen Fällen wie der Spondylodese bereits zugelassen ist, ist mit etlichen Komplikationen, insbesondere mit ektopter Knochenbildung assoziiert (Bae et al., 2016, Devine et al., 2012, Mroz et al., 2010). So berichten Helgeson *et al* (Helgeson et al., 2011) von einer 54 % Rate an Osteolysen (Knochenresorption) nach rhBMP-2 gestützten Spondylodesen. Die Verwendung rekombinanter Proteine zur Unterstützung der Gewebeheilung bringt weitere erhebliche Nachteile mit sich, wie deren geringe Spezifität für Osteoblasten, ihre Heterogenität und damit auch Entzündungen und ektopes Gewebewachstum (Kolk et al., 2016, Shimer et al., 2009).

Eine Alternative zum Einsatz rekombinanter Wachstumsfaktoren bietet die Gentherapie. Nach Definition der European Medicines Agency (EMA) enthält ein gentherapeutisches Produkt einerseits eine aktive Substanz aus rekombinanter Nukleinsäure, die eine Gensequenz regulieren, reparieren, ersetzen oder ergänzen soll, und zum anderen soll der therapeutische oder diagnostische Effekt in direktem Zusammenhang zur Genexpression der angewandten Sequenz stehen (Wirth et al., 2013). Die US Food and Drug Administration (FDA) spezifiziert die Definition, indem sie Gentherapie als ein Produkt bezeichnet, welches seinen Effekt durch Transkription oder Translation erzielt, indem es ins lokale Genom integriert wird oder über *ex vivo* transfizierte Zellen in den Empfängerorganismus eingeschleust wird (Wirth et al., 2013).

Erste Anwendung fand der gentherapeutische Ansatz im Rahmen der Tumorthherapie des malignen Melanoms durch Rosenberg *et al* (Rosenberg et al., 1990, Rosenberg et al., 1994). Bis heute stellen onkologische Erkrankungen das Hauptziel gentherapeutischer Verfahren dar (Wirth et al., 2013). Bisher zugelassene Medikamente basieren jedoch auf dem virotherapeutischen Ansatz, der nach wie vor mit immunologischen Nebenwirkungen vergesellschaftet ist, beispielsweise Leukämie durch insertionelle Mutagenese (Cavazzana-Calvo et al., 2000, Donsante et al., 2001).

In *ex vivo* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die systemische Gentherapie der Proteintherapie in ihrer Effizienz dadurch überlegen ist, dass die Zufuhr von Genen in Form von Nukleotiden die Synthese physiologischer Proteinmengen induziert. Dadurch ist die Proteinsynthese effektiver und besser kontrollierbar, somit auch kostengünstiger. Die Therapiekosten sind dabei ein nicht zu vernachlässigender Faktor, wenn ein klinischer Einsatz realisiert werden soll.

Alternativ lässt sich der Umbauprozess von Knochen in seiner regenerativen Phase durch unterschiedliche Implantatbeschichtungen mit DNA- oder mRNA-Sequenzen, welche für

osteogene Cytokine kodieren, lokal unterstützen. Das Material soll dabei die Aktivität der inkorporierten Therapiebestandteile kontrollieren und ihren lokalen Aufenthalt verlängern. Die positive Wirkung von BMP-2 kodierender cmRNA in Fibrinmatrizen wurde von Balmayor *et al* (Balmayor et al., 2016b) nachgewiesen.

Die gentherapeutischen Ansätze vergleichend gegenübergestellt, zeichnet sich mRNA gegenüber DNA durch die Eigenschaft aus, dass die Proteinexpression und folglich der therapeutische Effekt direkt im Zytoplasma erfolgen, wobei der Transport des mRNA Moleküls in den Zellkern umgangen wird. So wird die Gefahr der insertionellen Mutagenese, und daraus eventuell resultierende maligne Entartungen, welche das größte Risiko der DNA-gestützten Gentherapie bergen, ausgeschlossen.

Zudem wird zugeführte mRNA durch den Expressionsmechanismus der Empfängerzelle weiter exprimiert, die exprimierten Proteine unterliegen damit auch den individuellen posttranslationalen Veränderungen der Empfängerzelle, sie besitzen in dem Sinne die individuellen physiologischen Eigenschaften. Dies ist ein erheblicher Vorteil, denn so können bereits niedrigere Dosen iatrogen zugeführter mRNA eine therapeutische Wirkung erzielen und damit eine deutlich höhere Effizienz aufweisen. Folglich kann eine Immunantwort, die mit rekombinanten Proteinen assoziiert wird, auf ein Minimum reduziert werden.

Dennoch fand bis in die späten 90er Jahre des 20. Jahrhunderts hinein die Gentherapie mittels mRNA bis auf wenige Ausnahmen keinen klinischen Einsatz. Dies liegt daran, dass mRNA als sehr instabiles Molekül intensiv mit ubiquitären Nukleasen reagiert und damit, im Gegensatz zur DNA, einen rapiden zytoplasmatischen Abbau zur Folge hat. Ferner wird mRNA von einer breiten Masse an Pattern-Recognition Receptors (PRRs), insbesondere Toll-Like Rezeptoren (TLR), detektiert, und aktiviert damit eine Reaktionskaskade an inflammatorischen Reaktionen, welche der immunologischen antiviralen Antwort gleichgesetzt werden können. Diese Probleme können mittlerweile umgangen werden, indem gewisse Nukleotide von mRNA Molekülen derart modifiziert werden, dass sie nicht mehr an TLR binden und die Immunantwort reduziert wird. In Falle der vorliegenden Studie wurden bis zu 50 % der Uridin- und Cytidinreste jeweils durch 2-Thiouridin und 5-Methylcytidin ersetzt. So wurde diese cmRNA in ihrer Funktion nicht verändert, jedoch ihre molekulare Stabilität erhöht und gleichzeitig ihr immunogenes Potential minimiert. Die virusfreie und genfreie Vektortechnik, welche später näher erörtert wird, gewährleistet einen auf cmRNA basierenden nachhaltigen Freisetzungsmechanismus von Geninformation, welcher nicht der zellulären RNA-Modifikation unterliegt, da der

nukleäre Weg, wie es bei DNA-Applikation der Fall ist, umgangen wird. Damit werden neue Wege der Gentherapie eröffnet, die durch ihre vereinfachte Darreichungsform Therapien mittels mRNA oder DNA gerade im Hinblick auf die Sicherheit und das Nebenwirkungsspektrum übertreffen.

Ein weiterer wichtiger Parameter ist die molekulare Stabilität der eingesetzten mRNA. Deren Einfluss auf die Therapieeffizienz und die Kontrolle der Translation ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Carballo and Blackshear, 2001, Grishok et al., 2001, Knight and Bass, 2001). Hier sind zwei Größen zu unterscheiden: die physikalische und die funktionelle Halbwertszeit. Dabei bezeichnet die physikalische Halbwertszeit die gemessene Gesamtmenge an translatierbarer und nicht translatierbarer mRNA in einem Medium, während die funktionelle Halbwertszeit lediglich die mRNA-Menge bestimmt, welche tatsächlich translatiert wird. Für den hier vorgestellten Versuchsaufbau ist die funktionelle Halbwertszeit von größerem Interesse, denn obwohl cmRNA eine erhöhte Translationsrate, also eine hohe funktionelle Halbwertszeit, aufweist, bleibt ihre physikalische Halbwertszeit unverändert (Ferizi et al., 2015).

Im Gegensatz zum Einsatz rekombinanter Proteine ist die Expression eines extrinsisch eingebrachten Gens, insbesondere in Form von mRNA, zeitlich begrenzt. Das betroffene Gewebe ist folglich nicht einer ständigen Stimulation durch Wachstumsfaktoren ausgesetzt und die Gefahr von Nebenwirkungen wie eine potentielle maligne Entartung der Zellen wird reduziert. Andererseits bietet die mRNA-Therapie die Möglichkeit des Einsetzens zweier oder mehrerer co-induktiver Gene, da ein mutagenes Risiko weitgehend ausgeschlossen werden kann. Die Kombination zweier osteoinduktiver Gene führt folglich nicht nur zur Co-Expression, sondern steigert auch die Sekretion weiterer osteogener Marker wie RUNX2 und Osteocalcin (Atluri et al., 2015, D'Mello et al., 2017). Zusammenfassend steht die Gentherapie derjenigen mit rekombinanten Proteinen im Vorteil, da sie erlaubt, die Genexpression quantitativ und zeitlich zu regulieren. Somit werden unphysiologisch hohe Konzentrationen an BMP-2 oder anderen Wachstumsproteinen vermieden, welche durch die Induktion entzündlicher Prozesse und damit verbundener Knochenresorption die Osteogenese kompromittieren würden.

Altersbedingter Knochenverlust hängt mit einer erhöhten Knochenresorption durch Osteoklasten bei gleichzeitig vermindertem Anstieg an Osteoblasten zusammen, die auf eine reduzierte Anzahl an MSC zurückzuführen ist. Folglich kommt es zu einer

reduzierten Osteogenese (Yao and Lane, 2015). Somit stellt die Anwesenheit von Stammzellen einen essentiellen Faktor der Regeneration dar.

Im Gegensatz zum Heilungsprozess von Knorpel, welcher nicht durchblutet ist, kann Knochenheilung in Zusammenhang mit allogenen Zellen nur erfolgen, wenn diese mit Immunsuppressiva kombiniert werden (Tsuchida et al., 2003). Sonnet *et al* (Sonnet et al., 2013) konnten zeigen, dass der Einsatz genetisch modifizierter Zellen trotz niedriger BMP-2 Expression zu einem signifikanten Gewebewachstum in CSDs in Ratten führte. Aus diesem Grund eignet sich die Transplantation autologer Stammzellen hervorragend zur Unterstützung der Knochenheilung.

Durch ihre Fähigkeit, genetische Information aufzunehmen und sie in die physiologische Proteinsynthese zu integrieren, können Zellen mittlerweile zur Synthese bestimmter Proteine angeregt und damit auch das Differenzierungsverhalten von Stammzellen gesteuert werden. Gerade Stammzellen weisen eine hohe Transfektionsrate auf. Damit eignen sich Gewebe mit hoher Stammzellendichte hervorragend für gentherapeutische Anwendungen. Zudem können Stammzellen aus verschiedenen Geweben gewonnen werden und autolog übertragen werden. Im Rahmen operativer Eingriffe eignet sich hierzu besonders Fettgewebe, welches ständig exponiert wird. Genauso bietet Knochenmark eine leicht zugängliche Quelle durch minimal invasive Methoden. In dieser Arbeit wurden auf der Grundlage von genträgerbeschichteten Kollagenschwämmen diese beiden Stammzelltypen gegenübergestellt und deren osteoinduktive Wirkung als Teil einer Kombinationstherapie gerade im Hinblick auf eine spätere klinische Einsatzfähigkeit verglichen. Der Einsatz von Stammzellen erhöht also die Effektivität des gentherapeutischen Ansatzes dadurch, dass die Therapie nicht vom lokalen Angebot an zur Verfügung stehenden transfizierbaren Zellen abhängig ist, sondern die Zellzahl eben gesteuert werden kann. Die zusätzliche Expression eines osteogenen Gens erhöht das therapeutische Potential zusätzlich.

Hier unterscheidet die Gentherapie zwei Kategorien: Beim *in vivo* Ansatz wird das Gen in die lokalen Zellen des Defekts appliziert, während *in vitro* Stammzellen mit einem bestimmten Gen ausgestattet werden, um so deren Differenzierung zu induzieren und zu lenken. Hierbei können Zeitpunkt der Implantation, Anzahl der zu implantierenden Zellen und Grad der Expansion individuell bestimmt werden.

Beide Fälle resultieren in einer Reaktionskaskade, die zu einer verstärkten DNA-Expression führt, welche wiederum von etlichen lokalen Faktoren unterschiedlich beeinflusst werden kann. Bisher durchgeführte Vergleichsstudien zeigten, dass beide

Ansätze ähnliche Ergebnisse im Sinne der Knochenneubildung erzielten (Zachos et al., 2007, Kimelman Bleich et al., 2012). Zachos *et al* (Zachos et al., 2007) sehen den Vorteil der zellvermittelten Gentherapie, also *ex vivo*, in der besseren Kontrollmöglichkeit des Expressionsgrades. Zudem können hier die Empfängerzellen spezifisch ausgezielt werden. Der *in vivo* Ansatz, wie in dieser Studie angewandt, gestattet keine zielgerichtete Transfektion einer bestimmten Zellpopulation, lediglich die Transfektion innerhalb des Defektes. Hier entfallen aber die komplexen Schritte der Zellisolierung, Charakterisierung und Expansion. Eine Kombination beider Methoden bietet die Implantation eines zellulär beschichteten Scaffolds, dessen Zellen sowohl *in vitro* als auch *in situ*, also *in vivo*, transfiziert werden können. Beim *ex vivo* Gentransfer werden körpereigene Zellen entnommen, in einem Bioreaktor expandiert, modifiziert, auf ein Scaffold übertragen und vor der Reimplantation inkubiert. Dies ist ein kostspieliger, langer und zweizeitiger Prozess (Evans and Huard, 2015), der damit auch die Risiken der zweiten Operation mit sich birgt und eine höhere Belastung für den häufig bereits kompromittierten Patienten darstellt. Stattdessen kann der Patient selbst als Bioreaktor in einer *in vivo* Transfektion, wie in dieser Arbeit angewandt, dienen.

Voruntersuchungen zeigten einen rapiden Zellverlust im Injektionsgebiet in den ersten zwei postoperativen Wochen, der einerseits mit dem Mangel an Gefäßangebot und andererseits der natürlichen Apoptose, die mit der osteogenen Differenzierung von Stammzellen einhergeht, zuzuschreiben ist (Sheyn et al., 2011). Es ist weiterhin nicht vollständig geklärt, ob MSCs *in vivo* tatsächlich differenzieren oder eher als parakrine Mediatoren dienen und den Differenzierungsprozess lokaler Stammzellen lediglich ankurbeln (Sheyn et al., 2011).

In der hier vorgestellten Studie wurden zwei Arten von Stammzellen untersucht, MSC und ADSC, die in ihrer Verfügbarkeit leicht zugänglich sind - wodurch sie einen praktikablen klinischen Einsatz darstellen - und deren osteoinduktives Potential bereits bekannt ist, nicht jedoch deren Reagibilität mit der von uns angewandten cmRNA *in vivo*.

MSC stellen eine sehr heterogene Gruppe von Zellen dar, von denen *in vitro* nur einige ein verlängertes Proliferationspotential oder pluripotente Eigenschaften aufweisen.

In der konfluenten Kultur zeigte sich bei Olivo *et al* für MSC ein hoher Mineralisierungsgrad. Auf der anderen Seite hatte die Erhöhung der Zellzahl in der konfluenten Kultur keinen Einfluss auf den Mineralisierungsgrad (Olivo et al., 2008). Es kann folglich nicht sichergestellt werden, ob durch eine höhere Zellkonzentration auch das osteogene Potential erhöht wird oder ob MSC lediglich einen osteoinduktiven

Initiator darstellen. Die Ergebnisse dieser Studie legen letztere Hypothese nahe, da die Regeneration und die Menge neu gebildeten Knochens der Therapiegruppe mit ADSC unterlegen war (Abb. 9).

Implantierte MSC üben Einfluss auf die Knochenentwicklung über zwei Hauptwege:

Zum einen bilden sie eine neue Population von Osteoprogenitorzellen innerhalb des Defekts. Durch ihre Proliferation bilden sie zum anderen ein über Tight und Gap Junctions zusammenhängendes Netzwerk an Osteoprogenitorzellen, welche über Chemokine die osteogene Differenzierung anregen und steuern. Zusätzlich fungieren implantierte MSC als Initiatoren für osteogene Prozesse, welche, dadurch angekurbelt, von residenten Osteoprogenitorzellen übernommen werden.

Über ihren engen vaskulären Zusammenhang sind MSC in der Lage, weitere Osteoprogenitorzellen über Kapillaren zu rekrutieren (Caplan and Correa, 2011a). Für die programmierte Zelldifferenzierung aber stellen die niedrige Effizienz und die unbedingt notwendige verlängerte Proteinexpression die größten Hürden. Um diese Hürden zu bewältigen, ist ein repetitives Retransfektionssystem erforderlich.

Im ersten Fall haben Badieyan *et al* (Badieyan et al., 2017) Magnetofektion für den dauerhaften und verstärkten Transport von cmRNA in Stammzellen *in vitro* angewandt.

Im Gegensatz zu naiven MSC, führten mit DNA<sub>BMP-7</sub> transfizierte MSC zu einer stärkeren Kallusbildung und schnelleren Mineralisierung des Defektes im Rattenmodell (Hu et al., 2007). Es zeigte sich, dass der Gentransport von zwei osteogenen Faktoren nicht nur kombinierbar ist, sondern der therapeutische Effekt auch dadurch erhöht wird.

Adulte MSC sind ubiquitär und können aus dem Knochenmark, Fettgewebe, der Zahnpulpa oder der Nabelschnur entnommen werden. Aus dem Knochenmark entnommene MSC sind bisher am besten untersucht und können als der Goldstandard für präklinische Versuchsreihen im Rahmen der Genterapie betrachtet werden. Ihre Wirksamkeit zur Osteogenese in Non-Union Frakturen (Connolly et al., 1991, Behr et al., 2011, Quarto et al., 2001) oder Untersuchungen zur Knochenverlängerung (Kitoh et al., 2004) ist bereits nachgewiesen. Weiter zeigen MSC ein hohes osteogenes Potential (Bonfield et al., 2010, Caplan and Correa, 2011a) und sind in der Lage, sowohl parakrin als auch autokrin weitere Zellen in den Defekt zu rekrutieren und zur Differenzierung anzuregen.

Es ist jedoch bis heute nicht geklärt, bis zu welchem Grad und in welchem quantitativen Ausmaß MSC im Rahmen der Knochenheilung zu Osteoblasten differenzieren. Dieser Differenzierungsprozess kann durch genetische Modifizierung entweder beschleunigt

oder verstärkt werden. Ebenso können alternativ andere Zellen wie Fibroblasten aus der Haut oder ADSC verwendet werden. Der Vorteil von MSC gegenüber den anderen Zellarten ist deren Fähigkeit, in ossäre Defekte zu migrieren (Evans and Huard, 2015). Nachhaltig bewiesen ist dies jedoch nicht. In diesem Zusammenhang ist jedoch bekannt, dass MSC bereits früh eine Differenzierung in die chondro- und osteoblastäre Linie aufweisen (Noel et al., 2008).

Gerade während Heilungsprozessen kommt es physiologisch zu einer Aktivierung des Immunsystems, die zu einer Überaktivierung und damit autoimmunen Reaktionen führen kann. MSCs spielen bei dem Schutz vor Autoimmunreaktionen eine aktive Rolle, indem sie Kontrollfunktionen ausüben (Li et al., 2012, Pittenger et al., 1999, Caplan and Dennis, 2006). So sind MSC in der Lage, eine Regenerationszone zu bilden: Nach Inhibition der Apoptose aufgrund der Ischämie durch Gefäßmangel folgt die Stimulierung zur Angiogenese und die Stabilisation der neu gebildeten Gefäße durch Adenosinsekretion (Adair, 2005) sowie die Sekretion trophischer Faktoren, welche die Replikation gewebespezifischer Vorläuferzellen triggern (Caplan, 2015, Caplan and Correa, 2011a, Caplan and Dennis, 2006) – anti-inflammatorisch, immunsuppressiv und pro-angiogen. Diese Zellen sind mithin in der Lage, eine Graft-versus-Host Reaktion zu verhindern.

Geweberegeneration und gerade Knochenneubildung kann nicht ohne eine stabile Gefäßversorgung stattfinden. Eine mangelnde oder insuffiziente Gefäßversorgung resultiert in der Bildung von Knorpel und unreifem Knochen. Ein dreidimensionales Scaffold, das die Bildung eines Gefäßbetts und die Migration, Differenzierung und Organogenese durch MSC ermöglicht, stellt die Basis für eine erfolgreiche Therapie (Bianco and Robey, 2001).

ECM Remodelling, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Hypoxie induzieren die Angiogenese, u. a. indem sie gleichzeitig mit der Ablösung von Perizyten von der Gefäßoberfläche assoziiert sind. Diese Destabilisierung kann entweder zu erhöhter Angiogenese führen oder zur Regression des Gefäßwachstums. Angiogene Faktoren wie VEGF und PGF-BB können dies steuern.

Aus MSC differenzierte Adipozyten sind in der Lage, in Osteoblasten zu differenzieren. Dabei kommt es initial nicht zu einer Dedifferenzierung zu MSC, sondern vielmehr wird die Adipogenese herunterreguliert und die Osteogenese hochreguliert, d. h. es kommt zu einer Transdifferenzierung (Caplan and Correa, 2011b). Wenn die Differenzierungseigenschaften der beiden hier angewandten Stammzelltypen gegenübergestellt werden, so können MSC zu Perizyten differenzieren und so die

Angiogenese unterstützen (Caplan and Correa, 2011b). Dies lässt sich dadurch erklären, dass MSC in ihrem Differenzierungsverhalten deutlich schneller sind als ADSC (Sekiya et al., 2002, Colter et al., 2000) und dadurch gerade in einem osteogenen Medium, welches durch die Applikation der MSC *in vivo* induziert wurde, bereits die osteoblastäre Differenzierung noch vor der Freisetzung von cmRNA aus den Lipoplexen ansteuern. Dieser Effekt ist auch auf die Anwesenheit von anderen Wachstumsfaktoren und Zytokinen *in vivo* (Lynch et al., 1991, Wan et al., 2008, Mountziaris and Mikos, 2008) zurückzuführen. Im Hinblick auf einen klinischen Einsatz ist zu prüfen, ob die Besiedelung von Implantaten mit Zellen und Genträgern *in vitro* derjenigen *in situ* von Vorteil ist. Hierbei ließe sich die Differenzierung von Stammzellen gezielter steuern, indem zusätzlich zur cmRNA Zytokine in das Trägermaterial appliziert werden können und damit die Integration der Zellen ins Trägermaterial optimieren (Xu et al., 2010, Wu and Zhao, 2012) und auf diese Weise auch die Transfektions- und Therapieeffizienz steigern können. Stellt man die oben beschriebenen Möglichkeiten der Transfektion in Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit und den zugrundeliegenden Ergebnissen, lässt sich nicht klar beurteilen, ob eine *in vivo* Transfektion (wie hier erfolgt) der präoperativen Transfektion *in vitro* im Sinne des therapeutischen Erfolgs überlegen ist. Jedoch wurde die hier gewählte Methode aufgrund ihrer Praktikabilität in einem möglichen späteren klinischen Einsatz gewählt. Ein Nachteil dabei war, die unbedingt notwendige ständige präoperative Kontrolle der Zellpopulationen und das damit zusammenhängende Passagieren. Der Zeitpunkt der Operation war stark vom Zustand der Zellen, deren Konfluenz- und Differenzierungsgrad abhängig. So kann bei einer Transfektion *in vitro* und ebenfalls einer präoperativen Implantatbeschichtung die Qualität der Zellen besser gewährleistet werden. Dieser Prozess ist derzeit jedoch deutlich zeit- und kostenaufwändiger.

Wie Knochenmark eignet sich auch Fettgewebe aufgrund der großen Verfügbarkeit und des leichten Zugangs sehr gut als Reservoir regenerativer Zellen. Die beiden Zellarten unterscheiden sich in ihrem zellspezifischen Expressionsverhalten: Während in MSC hauptsächlich Proteine des Wnt-Signalwegs exprimiert werden, werden in ADSC Gene der Zellkommunikation (CCL3) und der Transkriptionskontrolle (PAX3, SPI1, ZNF45) exprimiert (Noel et al., 2008). Dafür wurden für die Osteogenese essentielle Moleküle wie Osteocalcin, Osterix, TGF $\beta$ 1 und VEGF in MSC deutlich stärker exprimiert (Noel et al., 2008). In der geeigneten Zellkultur sind ASDSC jedoch in der Lage, die osteogene, adipogene, chondrogene, neurogene und myogene Differenzierungslinie einzuschlagen

(Liu et al., 2016). Ähnlich wie MSC können ADSC eine Immunreaktion in Autografts reduzieren. In diesem Zusammenhang fanden ADSC bereits Einsatz nicht nur in der Therapie von Knochendefekten (Carvalho et al., 2014, Parrilla et al., 2011), sondern auch Nervenverletzungen (Liu et al., 2014). Über den Einfluss der Passagenzahl (üblich 3-5) auf das Differenzierungsverhalten gibt es keine eindeutigen Angaben in der Literatur. Es ist ebenfalls unsicher, ob ADSC ohne Kulturmedium spontan differenzieren können (Liu et al., 2016). Um den Einfluss der Zellen auf die Defektregeneration besser zu beurteilen, wurde in der vorliegenden Studie nicht, wie üblich, BSA als Grundlage für die Suspension angewandt. Durch den Einsatz von DMEM konnte ein etwa osteogener Einfluss durch das Suspensionsmedium ausgeschlossen werden.

In der ersten Passage entwickelten sich die ADSC von runden, nicht adhären Zellen am ersten Tag zu einer Kolonie spindelförmiger, fibroblastenähnlicher Zellen, welche sehr schnell proliferierten, am fünften Tag. Nach der zweiten Passage entwickelten die ADSC eine homogene fibroblastenähnliche Struktur. Mit steigender Passage verloren die Zellen ihre homogene Struktur und Kohärenz. Liu *et al* (Liu et al., 2016) beobachteten nach der zehnten Passage eine Umformung der spindelartigen Zellen in eine mehr kuboidale Form mit Calciumablagerungen. Nach der zwölften Passage konnten auch BMP-2 und RUNX2, knochenspezifische Wachstumsproteine, nachgewiesen werden, ohne den Zusatz eines osteogenen Kulturmediums. Das Gleichgewicht zwischen osteogener und adipogener Differenzierung kann durch den Einsatz von Glukokortikoiden, Überlagerung der JAK/STAT3 Stoffwechselwegewege und nachfolgender Aktivierung des AP-1-Reaktionswegs beeinflusst werden (Carcamo-Orive et al., 2010). Es muss jedoch beachtet werden, dass eine hohe *ex vivo* Expansion von Stammzellen zu tumorigener Transformation führen kann (Tarte et al., 2010).

Sheyn *et al* (Sheyn et al., 2011) zeigten im Rattenmodell, dass Knochen, der durch genetische Modifizierung von ADSC entstand, dem natürlichen Gewebe in der anatomischen Gestalt und mechanischen Funktion als äquivalent betrachtet werden kann. Der Einsatz von ADSC erwies sich dadurch als sehr vorteilhaft, da die Knochenregeneration signifikant schneller erfolgte als auf physiologischem Weg.

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben kein abschließendes Urteil darüber, welche Zellart als vorteilhaft bezeichnet werden kann. Einerseits waren die MSC im präoperativen Handling deutlich leichter, das Passagieren und Splitting liefen einfacher ab und die Zellüberlebensrate war deutlich höher als die der ADSC. Zudem war, bezogen auf die quantitativen Ergebnisse, die Varianz in den Therapiegruppen, in denen MSC Anwendung

fanden, nicht so stark ausgeprägt wie in den entsprechenden Gruppen mit ADSC. Insgesamt zeigten jedoch die ADSC höhere Knochenneubildungsraten, insbesondere in Interaktion mit der angewandten cmRNA in der mittleren Dosis. Vollständige Defektkonsolidierungen waren nur in den Therapiegruppen mit ADSC zu beobachten. Allerdings zeigten die ADSC Gruppen ihren therapeutischen Effekt in den langen Überlebenszeitpunkten. MSC führten in den Ergebnissen zu schnelleren Erfolgen (Abb. 9; Abb. 10). Ein therapeutischer Peak, gerade in Kombination mit cmRNA, scheint aber früher erreicht zu werden als durch ADSC. Dieses Verhalten hängt wahrscheinlich mit dem schnelleren Stoffwechsel und dem breiteren Differenzierungspotential von MSCs *in vivo*. Die Applikation der gleich hohen Zelldosis kann im Vergleich folglich dazu führen, dass bei der Anwendung von MSC, im Gegensatz zu derjenigen von ADSC, der osteoblastären Differenzierungslinie effektiv weniger Zellen zur Verfügung stehen.

Die hohe Knochenneubildungsrate in beiden Gruppen kann auf die hohe Zellüberlebensrate innerhalb der Implantate, die *in vitro* bereits nachgewiesen werden konnte, zurückgeführt werden. Durch die poröse Struktur konnten sich Zellen wahrscheinlich auf gleichmäßige Weise auf dem dreidimensionalen Gerüst verteilen und somit eine optimale interzelluläre Kommunikation arrangieren. Kennzeichnend hierbei war das diffuse Wachstumsverhalten des neu gebildeten Knochens auch innerhalb des Defekts (Abb. 12; Abb. 13). Im Gegensatz zur cmRNA Therapiegruppe (Abb. 7), in welcher der Knochen streng zentripetal wuchs, zeigte das Knochenwachstum in den Therapiegruppen mit Stammzellen keine eindeutige Richtung. Vielmehr waren bereits nach 14 Tagen (Abb. 16) knöcherne Brücken zu beobachten, welche einzelne Inseln vollständig entwickelten Knochens gerüstartig miteinander verbanden. Vereinzelt wurden auch punktförmige radioopake Strukturen beobachtet, welche aufgrund ihrer Dichte als Knochen zu interpretieren sind.

Diese Beobachtungen hängen vermutlich mit der höheren lokalen Population von Stammzellen zusammen, die nicht nur defektnah in den Defekt migrieren, sondern sich durch die externe Applikation über den gesamten Defekt verteilen und damit die Transfektionsrate der cmRNA-Vektoren deutlich erhöhen.

Für die höheren cmRNA Dosen konnte hingegen kein gesteigertes Knochenwachstum nachgewiesen werden. Im Gegenteil, die Wachstumsrate war niedriger als in den Gruppen mit den mittleren Dosen. Vergleichend dazu konnten die *in vitro* Versuche auch für höhere cmRNA Dosen eine gleich hohe Überlebensrate der Zellen wie für niedrigere Dosen nachweisen. Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen sich folglich weniger auf eine

toxische Wirkung der cmRNA auf Stammzellen als auf einen Sättigungseffekt zurückführen, durch welchen höhere Dosen cmRNA das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung wahrscheinlich nicht beschleunigen oder unterstützen.

Ebenso konnten Vorversuche zeigen, dass das Trocknen der Kollagenschwämme unter Vakuum den verzögerten Freisetzungsmechanismus unterstützte. Die cmRNA in vakuumgetrockneten Kollagenschwämmen hatte *in vitro* eine längere Translationsrate und eine höhere Halbwertszeit. Dies hängt mit der dichteren Struktur vakuumgetrockneter Kollagenschwämme zusammen, wodurch die Lipoplexe länger in der Matrix verbleiben und damit über einen längeren Zeitraum verfügbar bleiben (Lee et al., 2011).

Im Folgenden soll auf das Prinzip der genaktivierten Matrix eingegangen werden. Um das mehrzeitige Vorgehen durch die Injektion nackter DNA zu umgehen und die Gentherapie praktikabler zu gestalten, wurde das Konzept der genaktivierten Matrix (GAM) entwickelt. Hierbei wird ein bioresorbierbares Scaffold vor der Implantation mit DNA beschichtet, um dann *in situ* eine kontinuierliche DNA-Freisetzung in die umgebenden Zellen zu gewährleisten. Ein Grundsatz der Gentherapie, insbesondere mit mRNA, ist die schnelle und episodische, also kurzweilige, Proteinsynthese. Dieser Nachteil muss mit einem Transportsystem ausgeglichen werden, welches eine nachhaltige mRNA-Freisetzung ermöglicht, um die Therapieeffizienz zu erhöhen. Wichtig hierbei ist es, einen mit dem Immunsystem kompatiblen Gentransfer zu gestalten. Hierzu haben sich mehrfach Viren, insbesondere Adenoviren, als einsatzfähige Vektoren bewiesen. Allerdings bergen diese stets das Risiko einer Immunreaktion: Im Gegensatz zu Versuchstieren haben die meisten Menschen eine angeborene Immunität gegenüber das am häufigsten angewandte Adenovirus Serotyp 5, wodurch die Transduktion *in vivo* erschwert oder gar verhindert wird. Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass das Virus das gewünschte Wachstumsprotein nicht in anderen Geweben, wie der Leber oder der Lunge exprimiert wird (Baltzer et al., 2000, Gelse et al., 2001). Die alternativ eingesetzten Retroviren integrieren ihre Gensequenz ins Genom und bergen damit das langfristige Risiko der insertionellen Mutagenese. Die Insertion, welche im Genom neben dem LMO Onkogen lokalisiert ist, führte in manchen Individuen zu Leukämie (Kohn et al., 2003).

Obwohl die meisten Viren attenuiert sind, d. h. nach erfolgter Transduktion nicht mehr replikationsfähig sind, ist dies ambivalent zu betrachten, da auf diese Weise ihr Nebenwirkungsprofil reduziert wird, sie gleichzeitig aber in ihrer therapeutischen

Effizienz limitiert werden. Li *et al* (Li et al., 2003) konnten nachweisen, dass die intramuskuläre Applikation eines mit BMP-9 beladenen adenoviralen Vektors in den Oberschenkel athymischer Ratten ein drei Mal höheres Knochenvolumen zeigte als die Anwendung auf immunkompetente Tiere. Dies lässt auf eine immunologische Antwort auf den viralen Vektor schließen, die für die Etablierung einer erfolgreichen Therapie zu umgehen ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Retroviren und Adenoviren aufgrund Sicherheitsbedenken zunehmend in ihrem Einsatz limitiert werden (Schillinger et al., 2008). Non-virale Vektoren bieten hierzu eine Alternative. Sie haben eine deutlich niedrigere Halbwertszeit, dies ist jedoch im Rahmen der Osteoinduktion kein Nachteil, da bereits eine kurze Expressionsphase an osteogenen Genen ausreicht, um eine Reparaturkaskade des knöchernen Defektes auszulösen (Wirth et al., 2013). Zudem zeigen non-virale Vektoren ein deutlich niedrigeres immunogenes Potential als virale Vektoren (Evans and Huard, 2015). Die transiente Genexpression, welche von non-viralen Vektoren induziert wird, also die zeitlich limitierte Genexpression, ist durchaus wünschenswert, da auf diese Weise das Risiko von Malformationen durch das Empfängergewebe auf ein Minimum reduziert wird.

Zu Beginn der Entwicklung non-viraler Vektoren in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde nackte DNA angewandt, was zur Folge hatte, dass diese *in vivo* rasant abgebaut wurde und mehrere Injektionen des Vektors nötig waren, um Therapieerfolge zu erzielen (Barron et al., 1999, Naldini, 2015, Kimelman Bleich et al., 2012).

Liebermann *et al* haben aus dem Knochenmark entnommene MSC mit adenoviral verpackter DNA<sub>BMP-2</sub> infiziert und in Segmentdefekte der Femora syngener Tiere implantiert. Die Heilungstendenz war die Gleiche wie in der Gruppe mit rekombinantem Protein, allerdings unterschied sich die Qualität des neu gebildeten Knochens zugunsten der Gentherapie-Gruppe (Lieberman et al., 1999).

Non-virale Vektoren zeigen eine sehr gute Wirkung *in vitro*, dennoch lässt sich ihre Wirkungsweise *in vitro* nicht immer auf ein Tiermodell übertragen, da in diesem Fall die Interaktionen des Vektors mit dem physiologischen Milieu im Tier berücksichtigt werden müssen. So interagieren non-virale Genvektoren insbesondere mit Blutzellen und nicht-zellulären Blutkomponenten (Plank et al., 1996). Gerade diese Opsonierung, welche die chemischen Eigenschaften des Vektors verändern kann, ist vor der Anwendung im humanen Organismus zu berücksichtigen. Somit eignen sich Vektoren, die in der Transportphase *in vivo* inert sind und erst am Zielort aktiviert werden. Hierbei können

virale Eigenschaften imitiert werden, um extrazelluläre Barrieren vor der intrazellulären Aktivierung zu überwinden (Plank et al., 1994, Honig et al., 2010).

Ein Nachteil non-viraler Vektoren ist dabei die starke positive Ladung der Lipoplexe, die wiederum eine vollständige DNA Kompaktierung und Nuklease-Resistenzen gewährleisten. Durch diese positive Ladung des Vektorträgers kommt es *in vivo* zu Interaktionen mit negativ geladenen Serumproteinen und Erythrozyten (Plank et al., 1996) sowie mit der ECM. Die Aktivierung des Komplementsystems (Plank et al., 1996), Vektorinaktivierung und Lyse durch das retikuloendotheliale Netzwerk sind dabei Folgen, die für einen effektiven Einsatz vermieden werden müssen.

Kationische Lipide erhöhen nicht nur die molekulare Stabilität von Nukleinsäuren, sondern ermöglichen auch die intrazelluläre Passage. Die Komplexe interagieren durch elektrostatische Kräfte und bilden damit stabile Aggregate (Finsinger et al., 2000, Honig et al., 2010).

Einen möglichen extrazellulären Schutz und höhere zirkulatorische Halbwertszeiten bietet Poly(ethylenglykol) (PEG) während der Transportphase und lässt sich mit Lipoplexen als Genvektor verbinden. Die niedrige Spezifität von PEG und inhibitorische Eigenschaften auf die Verbindung mit Membranproteinen von Zielzellen senken jedoch die Transfektionseffizienz (Honig et al., 2010). Hingegen resultierte ein N/P Quotient von 10 in PEI-DNA Komplexen in ein Zellüberleben von 75 % und einer Transfektionseffizienz von MSCs von 14 % *in vitro* (D'Mello et al., 2017). Die verzögerte Freisetzung von BMP-2 ist dabei für den Heilungsprozess von Knochen erwünscht, da hohe BMP-2-Konzentrationen nicht nur zur Knochenheilung, sondern auch zu Entzündungsvorgängen und damit zu Knochenresorption führen können. Durch Gentransfer können die Konzentration und das Expressionslevel individuell gesteuert werden. Das Immunsystem, das gerade während Umbauvorgängen im Körper vermehrt aktiviert wird, ist ein wichtiger Parameter, der die Heilung auf unterschiedliche Weise beeinflussen kann. So kann es die Regenerationstendenz reduzieren, indem es mit viralen Vektoren interagiert und damit eine Transfektion *in vivo* erschwert. Gleichzeitig sind MSC in der Lage, eine Immunantwort zu reduzieren, und so den Weg für die Regeneration zu erleichtern.

Lipoplexe weisen dosisabhängige zytotoxische Effekte auf, die *in vitro* zur Zellschrumpfung und reduzierter Mitoserate führten (Ma et al., 2007). Zudem wurde durch Dass *et al* (Dass, 2004) eine immunvermittelte Zytokinkaskade nachgewiesen. Diese Interaktion mit dem Immunsystem, die sich teilweise auf eine systemische Entzündungsreaktion ausweitete,

wurde auch *in vivo* zusammen mit Thrombusbildungen und Mikroinfarkten beobachtet (Dass, 2004, Ma et al., 2007).

## 5 Zusammenfassung

Frakturheilung und Knochenbildung haben spezifische zeitliche und örtliche Genaktivitäten, die in unterschiedlichen Stadien ablaufen (Evans, 2012, Wozney, 1989). Die Gabe eines therapeutischen Gens muss zeitlich genau gewählt werden, da sich der Heilungsprozess in eine entzündliche Phase, chondrogene Phase, Neubildungsphase und Remodelling Phase unterteilen lässt. Entsprechend müssen die Zielzellen dem gewünschten Effekt angepasst werden. Dieses Hindernis lässt sich durch die zellvermittelte Gentherapie umgehen.

Hierbei können ein oder mehrere Zytokine mit einem Implantatmaterial kombiniert und somit zu einem individuell beschichteten Scaffold konfiguriert werden. So lassen sich nicht nur unterschiedliche Faktoren, sondern auch resorbierbare Materialien, wie z.B.  $\beta$ -TCP und Kollagen kombinieren. Auf diese Weise können positive Eigenschaften verschiedener Materialien addiert werden. Dabei steht vermehrt der Einsatz von mRNA aufgrund der Umgehung des nukleären Wegs, wie im Fall von DNA und dem damit verbundenen Risiko der insertionellen Mutagenese, im Vordergrund.

Stammzellen können vielseitig als zentrale Therapiebestandteile eingesetzt werden: Asthma, akuter Myokardinfarkt, Graft-versus-Host Reaktion, Multiple Sklerose, systemischer Lupus erythematosus oder im Rahmen des Tissue Engineering, wie in dieser Arbeit dargestellt wurde. Durch ihre Pluripotenz lässt sich die Frage aufwerfen, wie diese mit ihren immunmodulatorischen Eigenschaften und ihrer trophischen Fähigkeit verbunden sind und sie zum therapeutischen Vorteil genutzt werden können.

Nicht nur mRNA, sondern auch das Transportmolekül ist in der Lage, eine Immunantwort zu induzieren. Die Verwendung viraler Vektoren weicht zunehmend dem Einsatz non-viraler Vektorsysteme aufgrund ihrer höheren Effizienz und ihres niedrigeren Risikoprofils.

Die dargelegte Studie zeigt, dass die Kombination der drei wichtigsten Faktoren der Defektregeneration – Stammzellen, mRNA und bioaktive Implantate – im symbiotischen Zusammenhang zu betrachten sind. Dabei erwies sich ein stabiles Vektorsystem als vorteilhaft, indem es nicht nur eine protektive Wirkung auf den Genträger ausübte, sondern auch das immunogene Potential des therapeutischen Ansatzes reduzieren konnte.

Intrazellulär, also *in situ*, spielt die molekulare Stabilität des Genträgers eine tragende Rolle für den therapeutischen Effekt. In diesem Fall erwies sich cmRNA als vorteilhaft, da durch die molekulare Veränderung einzelner Nukleoside das Molekül einerseits stabilisiert wird, andererseits sein immunogenes Potential reduziert wird. Diese Modifizierung wirkt sich auf die Therapie positiv aus, da die funktionelle Halbwertszeit des cmRNA Moleküls deutlich länger ist und es somit länger zur Translation zur Verfügung steht. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass höhere Dosen und längere Überlebenszeiten sogar einen negativen Effekt auf die Knochenneubildungsrate ausüben können. Eventuell toxische Effekte können nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die therapeutische Wirkung der cmRNA weist durch den lokalen Einsatz von Stammzellen einen additiven Effekt auf. Dabei zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass sich die Beschichtung der Implantate mit Stammzellen positiv auf die Knochenentwicklung auswirkte. Es wurden zwei Zellarten gewählt, die auch in einem möglichen späteren klinischen Einsatz aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens praktikabel erscheinen: MSC und ADSC. Es lässt sich nicht abschließend beurteilen, welche Entität den größeren Vorteil bot. MSC erzielten schnellere therapeutische Effekte und waren im präoperativen Handling einfacher, ADSC zeigten in den längeren Überlebenszeitpunkten, insbesondere mit mittleren Konzentrationen cmRNA, bessere Ergebnisse bis hin zur vollständigen Defektkonsolidierung. Charakteristisch waren nicht nur die unterschiedlichen quantitativen Ergebnisse der Knochenneubildung der Therapiegruppen mit cmRNA und der Kombinationstherapien mit cmRNA und Stammzellen. Die Wachstumsmorphologie der Therapiegruppen mit MSC und ADSC war im Gegensatz zur regelmäßigen zentripetalen Struktur der cmRNA-Therapie deutlich diffuser und wies insuläre knöcherne Formationen sowie brückenartige knöcherne Verbindungen auf. Diese bieten dem regenerierenden Knochen mehr mechanische Stabilität und unterstützen damit die Defektheilung zusätzlich.

Welche Zellart vorteilhaft ist, lässt sich abschließend durch weiterführende immunhistochemische Untersuchungen beurteilen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Kombination von cmRNA und Stammzellen einen wertvollen therapeutischen Ansatz für die Regeneration ossärer Defekte darstellt, der hier als Proof of Principle im Hinblick auf weitere präklinische Untersuchungen, insbesondere auf die noch nicht vollständig verstandene Dosis-Wirkungs-Beziehung von cmRNA und Stammzellen, vorgestellt werden konnte.

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

- ABE, E., YAMAMOTO, M., TAGUCHI, Y., LECKA-CZERNIK, B., O'BRIEN, C. A., ECONOMIDES, A. N., STAHL, N., JILKA, R. L. & MANOLAGAS, S. C. 2000. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J Bone Miner Res*, 15, 663-73.
- ABIRAMAN, S., VARMA, H. K., UMASHANKAR, P. R. & JOHN, A. 2002. Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials*, 23, 3023-31.
- ACIL, Y., ZHANG, X., NITSCHKE, T., MOLLER, B., GASSLING, V., WILTFANG, J. & GIERLOFF, M. 2014. Effects of different scaffolds on rat adipose tissue derived stroma cells. *J Craniomaxillofac Surg*, 42, 825-34.
- ADAIR, T. H. 2005. Growth regulation of the vascular system: an emerging role for adenosine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289, R283-R296.
- AKIZUKI, S., YASUKAWA, Y. & TAKIZAWA, T. 1997. A new method of hemostasis for cementless total knee arthroplasty. *Bull Hosp Jt Dis*, 56, 222-4.
- ALBREKTSSON, T. & JOHANSSON, C. 2001. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*, 10 Suppl 2, S96-101.
- ALDEN, T. D., PITTMAN, D. D., HANKINS, G. R., BERES, E. J., ENGH, J. A., DAS, S., HUDSON, S. B., KERNS, K. M., KALLMES, D. F. & HELM, G. A. 1999. In vivo endochondral bone formation using a bone morphogenetic protein 2 adenoviral vector. *Hum Gene Ther*, 10, 2245-53.
- ALLEN, J. E. & WYNN, T. A. 2011. Evolution of Th2 immunity: a rapid repair response to tissue destructive pathogens. *PLoS Pathog*, 7, e1002003.
- ALTMAN, G. H., DIAZ, F., JAKUBA, C., CALABRO, T., HORAN, R. L., CHEN, J., LU, H., RICHMOND, J. & KAPLAN, D. L. 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 24, 401-16.
- AMINI, A. R., LAURENCIN, C. T. & NUKAVARAPU, S. P. 2012. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*, 40, 363-408.
- ATLURI, K., SEABOLD, D., HONG, L., ELANGO VAN, S. & SALEM, A. K. 2015. Nanoplex-Mediated Codelivery of Fibroblast Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein Genes Promotes Osteogenesis in Human Adipocyte-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Mol Pharm*, 12, 3032-42.
- BADIEYAN, Z. S., BEREZHANSKY, T., UTZINGER, M., ANEJA, M. K., EMRICH, D., ERBEN, R., SCHULER, C., ALTPETER, P., FERIZI, M., HASENPUSCH, G., RUDOLPH, C. & PLANK, C. 2016. Transcript-activated collagen matrix as sustained mRNA delivery system for bone regeneration. *J Control Release*, 239, 137-48.
- BADIEYAN, Z. S., PASEWALD, T., MYKHAYLYK, O., RUDOLPH, C. & PLANK, C. 2017. Efficient ex vivo delivery of chemically modified messenger RNA using lipofection and magnetofection. *Biochem Biophys Res Commun*, 482, 796-801.
- BAE, H. W., PATEL, V. V., SARDAR, Z. M., BADURA, J. M., PRADHAN, B. B., SEIM, H. B., 3RD, TURNER, A. S. & TOTH, J. M. 2016. Transient Local Bone Remodeling Effects of rhBMP-2 in an Ovine Interbody Spine Fusion Model. *J Bone Joint Surg Am*, 98, 2061-2070.
- BALMAYOR, E. R., GEIGER, J. P., ANEJA, M. K., BEREZHANSKY, T., UTZINGER, M., MYKHAYLYK, O., RUDOLPH, C. & PLANK, C. 2016a. Chemically modified RNA

- induces osteogenesis of stem cells and human tissue explants as well as accelerates bone healing in rats. *Biomaterials*, 87, 131-46.
- BALMAYOR, E. R., GEIGER, J. P., KOCH, C., ANEJA, M. K., VAN GRIENSVEN, M., RUDOLPH, C. & PLANK, C. 2016b. Modified mRNA for BMP 2 in combination with biomaterials serves as a transcript activated matrix for effectively inducing osteogenic pathways in stem cells. *Stem Cells Dev.*
- BALTZER, A. W., LATTERMANN, C., WHALEN, J. D., GHIVIZZANI, S., WOOLEY, P., KRAUSPE, R., ROBBINS, P. D. & EVANS, C. H. 2000. Potential role of direct adenoviral gene transfer in enhancing fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*, S120-5.
- BANWART, J. C., ASHER, M. A. & HASSANEIN, R. S. 1995. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine (Phila Pa 1976)*, 20, 1055-60.
- BARNES, G. L., KOSTENUK, P. J., GERSTENFELD, L. C. & EINHORN, T. A. 1999. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res*, 14, 1805-15.
- BARRON, L. G., MEYER, K. B. & SZOKA, F. C., JR. 1998. Effects of complement depletion on the pharmacokinetics and gene delivery mediated by cationic lipid-DNA complexes. *Hum Gene Ther*, 9, 315-23.
- BARRON, L. G., UYECHI, L. S. & SZOKA, F. C., JR. 1999. Cationic lipids are essential for gene delivery mediated by intravenous administration of lipoplexes. *Gene Ther*, 6, 1179-83.
- BECK-BROICHSITTER, B. E., BECKER, S. T., SEITZ, H., WILTFANG, J. & WARNKE, P. H. 2015. Endocultivation: Histomorphological effects of repetitive rhBMP-2 application into prefabricated hydroxyapatite scaffolds at extraskeletal sites. *J Craniomaxillofac Surg*, 43, 981-8.
- BEHR, B., TANG, C., GERMANN, G., LONGAKER, M. T. & QUARTO, N. 2011. Locally applied vascular endothelial growth factor A increases the osteogenic healing capacity of human adipose-derived stem cells by promoting osteogenic and endothelial differentiation. *Stem Cells*, 29, 286-96.
- BENSIDHOUM, M., GOBIN, S., CHAPEL, A., LEMAITRE, G., BOUET, S., WAKSMAN, G., THIERRY, D. & MARTIN, M. T. 2005. [Therapeutic effect of human mesenchymal stem cells in skin after radiation damage]. *J Soc Biol*, 199, 337-41.
- BHUMIRATANA, S. & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2012. Concise review: personalized human bone grafts for reconstructing head and face. *Stem Cells Transl Med*, 1, 64-9.
- BIANCO, P. & ROBEY, P. G. 2001. Stem cells in tissue engineering. *Nature*, 414, 118-21.
- BISSINGER, O., KIRSCHKE, J. S., PROBST, F. A., STAUBER, M., WOLFF, K. D., HALLER, B., GOTZ, C., PLANK, C. & KOLK, A. 2016. Micro-CT vs. Whole Body Multirow Detector CT for Analysing Bone Regeneration in an Animal Model. *PLoS One*, 11, e0166540.
- BOCCAFOSCHI, F., HABERMEHL, J., VESENTINI, S. & MANTOVANI, D. 2005. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 26, 7410-7.
- BOERCKEL, J. D., KOLAMBKAR, Y. M., DUPONT, K. M., UHRIG, B. A., PHELPS, E. A., STEVENS, H. Y., GARCIA, A. J. & GULDBERG, R. E. 2011. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials*, 32, 5241-51.
- BONADIO, J., SMILEY, E., PATIL, P. & GOLDSTEIN, S. 1999. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med*, 5, 753-9.
- BONFIELD, T. L., NOLAN KOLOZE, M. T., LENNON, D. P. & CAPLAN, A. I. 2010. Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo. *J Inflamm (Lond)*, 7, 51.
- BRANEMARK, P. I. 1983. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*, 50, 399-410.

- BROCKES, J. P. & KUMAR, A. 2002. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 566-74.
- BRUNSKI, J. B. 1999. In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface. *Adv Dent Res*, 13, 99-119.
- BUNNELL, B. A., FLAAT, M., GAGLIARDI, C., PATEL, B. & RIPOLL, C. 2008. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45, 115-20.
- CALORI, G. M., MAZZA, E., COLOMBO, M., RIPAMONTI, C. & TAGLIABUE, L. 2011. Treatment of long bone non-unions with polytherapy: indications and clinical results. *Injury*, 42, 587-90.
- CAPLAN, A. I. 2015. Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem Cells Int*, 2015, 628767.
- CAPLAN, A. I. & CORREA, D. 2011a. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*, 9, 11-5.
- CAPLAN, A. I. & CORREA, D. 2011b. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. *J Orthop Res*, 29, 1795-803.
- CAPLAN, A. I. & DENNIS, J. E. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 98, 1076-84.
- CAPLAN, A. I. & SORRELL, J. M. 2015. The MSC curtain that stops the immune system. *Immunol Lett*, 168, 136-9.
- CARBALLO, E. & BLACKSHEAR, P. J. 2001. Roles of tumor necrosis factor-alpha receptor subtypes in the pathogenesis of the tristetraprolin-deficiency syndrome. *Blood*, 98, 2389-95.
- CARCAMO-ORIVE, I., GAZTELUMENDI, A., DELGADO, J., TEJADOS, N., DORRONSORO, A., FERNANDEZ-RUEDA, J., PENNINGTON, D. J. & TRIGUEROS, C. 2010. Regulation of human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation capacity by glucocorticoid receptor and AP-1 crosstalk. *J Bone Miner Res*, 25, 2115-25.
- CARVALHO, P. P., LEONOR, I. B., SMITH, B. J., DIAS, I. R., REIS, R. L., GIMBLE, J. M. & GOMES, M. E. 2014. Undifferentiated human adipose-derived stromal/stem cells loaded onto wet-spun starch-polycaprolactone scaffolds enhance bone regeneration: nude mice calvarial defect in vivo study. *J Biomed Mater Res A*, 102, 3102-11.
- CAVAZZANA-CALVO, M., HACEIN-BEY, S., DE SAINT BASILE, G., GROSS, F., YVON, E., NUSBAUM, P., SELZ, F., HUE, C., CERTAIN, S., CASANOVA, J. L., BOUSSO, P., DEIST, F. L. & FISCHER, A. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288, 669-72.
- CHEN, D., JI, X., HARRIS, M. A., FENG, J. Q., KARSENTY, G., CELESTE, A. J., ROSEN, V., MUNDY, G. R. & HARRIS, S. E. 1998. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol*, 142, 295-305.
- CHEN, T., HELLER, E., BERONJA, S., OSHIMORI, N., STOKES, N. & FUCHS, E. 2012. An RNA interference screen uncovers a new molecule in stem cell self-renewal and long-term regeneration. *Nature*, 485, 104-8.
- CHEVALLAY, B. & HERBAGE, D. 2000. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput*, 38, 211-8.
- CHO, S. W., SUN, H. J., YANG, J. Y., JUNG, J. Y., AN, J. H., CHO, H. Y., CHOI, H. J., KIM, S. W., KIM, S. Y., KIM, D. & SHIN, C. S. 2009. Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing RANK-Fc or CXCR4 prevents bone loss in ovariectomized mice. *Mol Ther*, 17, 1979-87.
- CICIARELLO, M., ZINI, R., ROSSI, L., SALVESTRINI, V., FERRARI, D., MANFREDINI, R. & LEMOLI, R. M. 2013. Extracellular purines promote the differentiation of human

- bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the osteogenic and adipogenic lineages. *Stem Cells Dev*, 22, 1097-1111.
- CLARKE, B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 3, S131-9.
- COLTER, D. C., CLASS, R., DIGIROLAMO, C. M. & PROCKOP, D. J. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3213-8.
- CONNOLLY, J. F., GUSE, R., TIEDEMAN, J. & DEHNE, R. 1991. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*, 259-70.
- D'MELLO, S., ATLURI, K., GEARY, S. M., HONG, L., ELANGOVAN, S. & SALEM, A. K. 2017. Bone Regeneration Using Gene-Activated Matrices. *AAPS J*, 19, 43-53.
- DASS, C. R. 2004. Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. *J Mol Med (Berl)*, 82, 579-91.
- DAVIES, J. E. 1998. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont*, 11, 391-401.
- DEPPE, H., STEMBERGER, A. & HILLEMANN, M. 2003. Effects of osteopromotive and anti-infective membranes on bone regeneration: an experimental study in rat mandibular defects. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 18, 369-76.
- DEVINE, J. G., DETTORI, J. R., FRANCE, J. C., BRODT, E. & MCGUIRE, R. A. 2012. The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk? *Evid Based Spine Care J*, 3, 35-41.
- DIMARINO, A. M., CAPLAN, A. I. & BONFIELD, T. L. 2013. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol*, 4, 201.
- DONG, F. & CAPLAN, A. I. 2012. Cell transplantation as an initiator of endogenous stem cell-based tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant*, 17, 670-4.
- DONSANTE, A., VOGLER, C., MUZYCZKA, N., CRAWFORD, J. M., BARKER, J., FLOTTE, T., CAMPBELL-THOMPSON, M., DALY, T. & SANDS, M. S. 2001. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther*, 8, 1343-6.
- DROSSE, I., VOLKMER, E., CAPANNA, R., DE BIASE, P., MUTSCHLER, W. & SCHIEKER, M. 2008. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury*, 39 Suppl 2, S9-20.
- EBRAHEIM, N. A., ELGAFY, H. & XU, R. 2001. Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications. *J Am Acad Orthop Surg*, 9, 210-8.
- EINHORN, T. A. 1998. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, S7-21.
- EINHORN, T. A. & GERSTENFELD, L. C. 2015. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*, 11, 45-54.
- ENGELKE, K., KAROLCZAK, M., LUTZ, A., SEIBERT, U., SCHALLER, S. & KALENDER, W. 1999. [Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure]. *Radiologe*, 39, 203-12.
- ESTELLER, M. 2011. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, 12, 861-74.
- EVANS, C. H. 2012. Gene delivery to bone. *Adv Drug Deliv Rev*, 64, 1331-40.
- EVANS, C. H. & HUARD, J. 2015. Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system. *Nat Rev Rheumatol*, 11, 234-42.
- FELSENBERG, D. 2001. [Supporting function of collagen and hydroxyapatite. Structure and function of bone]. *Pharm Unserer Zeit*, 30, 488-94.
- FERIZI, M., LEONHARDT, C., MEGGLE, C., ANEJA, M. K., RUDOLPH, C., PLANK, C. & RADLER, J. O. 2015. Stability analysis of chemically modified mRNA using micropattern-based single-cell arrays. *Lab Chip*, 15, 3561-71.

- FINSINGER, D., REMY, J. S., ERBACHER, P., KOCH, C. & PLANK, C. 2000. Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery. *Gene Ther*, 7, 1183-92.
- FISCHER, J., KOLK, A., WOLFART, S., PAUTKE, C., WARNKE, P. H., PLANK, C. & SMEETS, R. 2011. Future of local bone regeneration - Protein versus gene therapy. *J Craniomaxillofac Surg*, 39, 54-64.
- FRITZ, M. E. 1999. Two-stage implant systems. *Adv Dent Res*, 13, 162-9.
- FUCHS, E. 2009. The tortoise and the hair: slow-cycling cells in the stem cell race. *Cell*, 137, 811-9.
- FURLONG, R. J. & OSBORN, J. F. 1991. Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings. *J Bone Joint Surg Br*, 73, 741-5.
- GAO, X., USAS, A., TANG, Y., LU, A., TAN, J., SCHNEPPENDAHL, J., KOZEMCHAK, A. M., WANG, B., CUMMINS, J. H., TUAN, R. S. & HUARD, J. 2014. A comparison of bone regeneration with human mesenchymal stem cells and muscle-derived stem cells and the critical role of BMP. *Biomaterials*, 35, 6859-70.
- GARG, T., SINGH, O., ARORA, S. & MURTHY, R. 2012. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 29, 1-63.
- GELSE, K., JIANG, Q. J., AIGNER, T., RITTER, T., WAGNER, K., POSCHL, E., VON DER MARK, K. & SCHNEIDER, H. 2001. Fibroblast-mediated delivery of growth factor complementary DNA into mouse joints induces chondrogenesis but avoids the disadvantages of direct viral gene transfer. *Arthritis Rheum*, 44, 1943-53.
- GONDOLPH-ZINK, B. 1998. [Effect of hydroxyapatite layering on the osteo-integration of weightbearing and non-weightbearing implants. Comparison to other microporous surfaces in animal experiments]. *Orthopade*, 27, 96-104.
- GRANERO-MOLTO, F., WEIS, J. A., MIGA, M. I., LANDIS, B., MYERS, T. J., O'REAR, L., LONGOBARDI, L., JANSEN, E. D., MORTLOCK, D. P. & SPAGNOLI, A. 2009. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells*, 27, 1887-98.
- GRCEVIC, D., PEJDA, S., MATTHEWS, B. G., REPIC, D., WANG, L., LI, H., KRONENBERG, M. S., JIANG, X., MAYE, P., ADAMS, D. J., ROWE, D. W., AGUILA, H. L. & KALAJZIC, I. 2012. In vivo fate mapping identifies mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells*, 30, 187-96.
- GRISHOK, A., PASQUINELLI, A. E., CONTE, D., LI, N., PARRISH, S., HA, I., BAILLIE, D. L., FIRE, A., RUVKUN, G. & MELLO, C. C. 2001. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106, 23-34.
- GRONTHOS, S., ZANNETTINO, A. C., GRAVES, S. E., OHTA, S., HAY, S. J. & SIMMONS, P. J. 1999. Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res*, 14, 47-56.
- HABAL, M. B. 2004. Bone tissue engineering applications in craniofacial reconstructive surgery. *Clin Plast Surg*, 31, 387-92, v.
- HAYNESWORTH, S. E., GOSHIMA, J., GOLDBERG, V. M. & CAPLAN, A. I. 1992. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 13, 81-8.
- HE, S., NAKADA, D. & MORRISON, S. J. 2009. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, 377-406.
- HELGESON, M. D., LEHMAN, R. A., JR., PATZKOWSKI, J. C., DMITRIEV, A. E., ROSNER, M. K. & MACK, A. W. 2011. Adjacent vertebral body osteolysis with bone morphogenetic protein use in transforaminal lumbar interbody fusion. *Spine J*, 11, 507-10.

- HONIG, D., DEROUCHÉY, J., JUNGSMANN, R., KOCH, C., PLANK, C. & RADLER, J. O. 2010. Biophysical characterization of copolymer-protected gene vectors. *Biomacromolecules*, 11, 1802-9.
- HU, J., QI, M. C., ZOU, S. J., LI, J. H. & LUO, E. 2007. Callus formation enhanced by BMP-7 ex vivo gene therapy during distraction osteogenesis in rats. *J Orthop Res*, 25, 241-51.
- HUANG, Y. C., RIDDLE, K., RICE, K. G. & MOONEY, D. J. 2005. Long-term in vivo gene expression via delivery of PEI-DNA condensates from porous polymer scaffolds. *Hum Gene Ther*, 16, 609-17.
- HUJA, S. S., KATONA, T. R., BURR, D. B., GARETTO, L. P. & ROBERTS, W. E. 1999. Microdamage adjacent to endosseous implants. *Bone*, 25, 217-22.
- IYER, S. S. & ROJAS, M. 2008. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin Biol Ther*, 8, 569-81.
- JESORKA, A. & ORWAR, O. 2008. Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 1, 801-32.
- JIANG, Y., CHEN, J., DENG, C., SUURONEN, E. J. & ZHONG, Z. 2014. Click hydrogels, microgels and nanogels: emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 35, 4969-85.
- JIN, H. J., CHEN, J., KARAGEORGIU, V., ALTMAN, G. H. & KAPLAN, D. L. 2004. Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats. *Biomaterials*, 25, 1039-47.
- JIN, H. J. & KAPLAN, D. L. 2003. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*, 424, 1057-61.
- JONES, B. J. & MCTAGGART, S. J. 2008. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp Hematol*, 36, 733-41.
- KAMATA, H., AKAGI, Y., KAYASUGA-KARIYA, Y., CHUNG, U. I. & SAKAI, T. 2014. "Nonswellable" hydrogel without mechanical hysteresis. *Science*, 343, 873-5.
- KANCZLER, J. M., GINTY, P. J., WHITE, L., CLARKE, N. M., HOWDLE, S. M., SHAKESHEFF, K. M. & OREFFO, R. O. 2010. The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation. *Biomaterials*, 31, 1242-50.
- KARAGEORGIU, V. & KAPLAN, D. 2005. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26, 5474-91.
- KAZAKIA, G. J., BURGHARDT, A. J., CHEUNG, S. & MAJUMDAR, S. 2008. Assessment of bone tissue mineralization by conventional x-ray microcomputed tomography: comparison with synchrotron radiation microcomputed tomography and ash measurements. *Med Phys*, 35, 3170-9.
- KHADEMHOSEINI, A., VACANTI, J. P. & LANGER, R. 2009. Progress in tissue engineering. *Sci Am*, 300, 64-71.
- KHAN, W., MUTHUPANDIAN, S., FARAH, S., KUMAR, N. & DOMB, A. J. 2011. Biodegradable polymers derived from amino acids. *Macromol Biosci*, 11, 1625-36.
- KHOSLA, S., WESTENDORF, J. J. & MODDER, U. I. 2010. Concise review: Insights from normal bone remodeling and stem cell-based therapies for bone repair. *Stem Cells*, 28, 2124-8.
- KIMELMAN BLEICH, N., KALLAI, I., LIEBERMAN, J. R., SCHWARZ, E. M., PELLED, G. & GAZIT, D. 2012. Gene therapy approaches to regenerating bone. *Adv Drug Deliv Rev*, 64, 1320-30.
- KITOH, H., KITAKOJI, T., TSUCHIYA, H., MITSUYAMA, H., NAKAMURA, H., KATOH, M. & ISHIGURO, N. 2004. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases. *Bone*, 35, 892-8.

- KNIGHT, S. W. & BASS, B. L. 2001. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 293, 2269-71.
- KOHN, D. B., SADELAIN, M. & GLORIOSO, J. C. 2003. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer*, 3, 477-88.
- KOLK, A., KOHNKE, R., SAELY, C. H. & PLODER, O. 2015. Are Biodegradable Osteosyntheses Still an Option for Midface Trauma? Longitudinal Evaluation of Three Different PLA-Based Materials. *Biomed Res Int*, 2015, 621481.
- KOLK, A., TISCHER, T., KOCH, C., VOGT, S., HALLER, B., SMEETS, R., KREUTZER, K., PLANK, C. & BISSINGER, O. 2016. A novel nonviral gene delivery tool of BMP-2 for the reconstitution of critical-size bone defects in rats. *J Biomed Mater Res A*, 104, 2441-55.
- KORMANN, M. S., HASENPUSCH, G., ANEJA, M. K., NICA, G., FLEMMER, A. W., HERBER-JONAT, S., HUPPMANN, M., MAYS, L. E., ILLENYI, M., SCHAMS, A., GRIESE, M., BITTMANN, I., HANDGRETINGER, R., HARTL, D., ROSENECKER, J. & RUDOLPH, C. 2011. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice. *Nat Biotechnol*, 29, 154-7.
- LACERDA, S. H., PARK, J. J., MEUSE, C., PRISTINSKI, D., BECKER, M. L., KARIM, A. & DOUGLAS, J. F. 2010. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. *ACS Nano*, 4, 365-79.
- LAMBERG, A., SCHMIDMAIER, G., SOBALLE, K. & ELMENGAARD, B. 2006. Locally delivered TGF-beta1 and IGF-1 enhance the fixation of titanium implants: a study in dogs. *Acta Orthop*, 77, 799-805.
- LANGER, R. & VACANTI, J. P. 1993. Tissue engineering. *Science*, 260, 920-6.
- LARRUE, A., RATTNER, A., PETER, Z. A., OLIVIER, C., LAROCHE, N., VICO, L. & PEYRIN, F. 2011. Synchrotron radiation micro-CT at the micrometer scale for the analysis of the three-dimensional morphology of microcracks in human trabecular bone. *PLoS One*, 6, e21297.
- LAVERY, K., SWAIN, P., FALB, D. & ALAOUI-ISMAILI, M. H. 2008. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*, 283, 20948-58.
- LAZARD, Z. W., HEGGENESS, M. H., HIPPEL, J. A., SONNET, C., FUENTES, A. S., NISTAL, R. P., DAVIS, A. R., OLABISI, R. M., WEST, J. L. & OLMSTED-DAVIS, E. A. 2011. Cell-based gene therapy for repair of critical size defects in the rat fibula. *J Cell Biochem*, 112, 1563-71.
- LEE, J. W., KANG, K. S., LEE, S. H., KIM, J. Y., LEE, B. K. & CHO, D. W. 2011. Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly(propylene fumarate)/diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres. *Biomaterials*, 32, 744-52.
- LENNON, D. P., SCHLUCHTER, M. D. & CAPLAN, A. I. 2012. The effect of extended first passage culture on the proliferation and differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med*, 1, 279-88.
- LEVI, B., NELSON, E. R., BROWN, K., JAMES, A. W., XU, D., DUNLEVIE, R., WU, J. C., LEE, M., WU, B., COMMONS, G. W., VISTNES, D. & LONGAKER, M. T. 2011. Differences in osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells from murine, canine, and human sources in vitro and in vivo. *Plast Reconstr Surg*, 128, 373-86.
- LI, H., LI, T., WANG, S., WEI, J., FAN, J., LI, J., HAN, Q., LIAO, L., SHAO, C. & ZHAO, R. C. 2013. miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and

- adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res*, 10, 313-24.
- LI, J. Z., HANKINS, G. R., KAO, C., LI, H., KAMMAUFF, J. & HELM, G. A. 2003. Osteogenesis in rats induced by a novel recombinant helper-dependent bone morphogenetic protein-9 (BMP-9) adenovirus. *J Gene Med*, 5, 748-56.
- LI, L. & CLEVERS, H. 2010. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*, 327, 542-5.
- LI, W., REN, G., HUANG, Y., SU, J., HAN, Y., LI, J., CHEN, X., CAO, K., CHEN, Q., SHOU, P., ZHANG, L., YUAN, Z. R., ROBERTS, A. I., SHI, S., LE, A. D. & SHI, Y. 2012. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ*, 19, 1505-13.
- LI, X., FENG, Q., LIU, X., DONG, W. & CUI, F. 2006. Collagen-based implants reinforced by chitin fibres in a goat shank bone defect model. *Biomaterials*, 27, 1917-23.
- LIEBERMAN, J. R., DALUISKI, A., STEVENSON, S., WU, L., MCALLISTER, P., LEE, Y. P., KABO, J. M., FINERMAN, G. A., BERK, A. J. & WITTE, O. N. 1999. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg Am*, 81, 905-17.
- LINDER, L. 1989. Osseointegration of metallic implants. I. Light microscopy in the rabbit. *Acta Orthop Scand*, 60, 129-34.
- LINKHART, T. A., MOHAN, S. & BAYLINK, D. J. 1996. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone*, 19, 1S-12S.
- LIU, X. L., ZHANG, W. & TANG, S. J. 2014. Intracranial transplantation of human adipose-derived stem cells promotes the expression of neurotrophic factors and nerve repair in rats of cerebral ischemia-reperfusion injury. *Int J Clin Exp Pathol*, 7, 174-83.
- LIU, Y., ZHANG, Z., ZHANG, C., DENG, W., LV, Q., CHEN, X., HUANG, T. & PAN, L. 2016. Adipose-derived stem cells undergo spontaneous osteogenic differentiation in vitro when passaged serially or seeded at low density. *Biotech Histochem*, 91, 369-76.
- LOHSE, N., MOSER, N., BACKHAUS, S., ANNEN, T., EPPLE, M. & SCHLIEPHAKE, H. 2015. Continuous delivery of rhBMP2 and rhVEGF165 at a certain ratio enhances bone formation in mandibular defects over the delivery of rhBMP2 alone--An experimental study in rats. *J Control Release*, 220, 201-9.
- LOPES, N. M., VAJGEL, A., DE OLIVEIRA, D. M., DE SANTANA SANTOS, T. & WASSALL, T. 2012. Use of rhBMP-2 to reconstruct a severely atrophic mandible: a modified approach. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 41, 1566-70.
- LYNCH, S. E., BUSER, D., HERNANDEZ, R. A., WEBER, H. P., STICH, H., FOX, C. H. & WILLIAMS, R. C. 1991. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol*, 62, 710-6.
- MA, B., ZHANG, S., JIANG, H., ZHAO, B. & LV, H. 2007. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *J Control Release*, 123, 184-94.
- MACKAY, D. L., TESAR, P. J., LIANG, L. N. & HAYNESWORTH, S. E. 2006. Characterizing medullary and human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *J Cell Physiol*, 207, 722-8.
- MARX, R. E. & GARG, A. K. 1998. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent*, 7, 267-76.
- MATSUMOTO, D., SATO, K., GONDA, K., TAKAKI, Y., SHIGEURA, T., SATO, T., AIBA-KOJIMA, E., IIZUKA, F., INOUE, K., SUGA, H. & YOSHIMURA, K. 2006. Cell-assisted

- lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng*, 12, 3375-82.
- MCKIBBIN, B. 1978. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br*, 60-B, 150-62.
- MEINEL, L., HOFMANN, S., BETZ, O., FAJARDO, R., MERKLE, H. P., LANGER, R., EVANS, C. H., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. & KAPLAN, D. L. 2006. Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2. *Biomaterials*, 27, 4993-5002.
- MEINEL, L., HOFMANN, S., KARAGEORGIU, V., ZICHNER, L., LANGER, R., KAPLAN, D. & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2004a. Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotechnol Bioeng*, 88, 379-91.
- MEINEL, L., KARAGEORGIU, V., HOFMANN, S., FAJARDO, R., SNYDER, B., LI, C., ZICHNER, L., LANGER, R., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. & KAPLAN, D. L. 2004b. Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 71, 25-34.
- MEYER, U. & WIESMANN, H. P. 2005. Tissue engineering: a challenge of today's medicine. *Head Face Med*, 1, 2.
- MEYER, U., WIESMANN, H. P., BERR, K., KUBLER, N. R. & HANDSCHEL, J. 2006. Cell-based bone reconstruction therapies-principles of clinical approaches. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 21, 899-906.
- MIRTZ, T. A., CHANDLER, J. P. & EYERS, C. M. 2011. The effects of physical activity on the epiphyseal growth plates: a review of the literature on normal physiology and clinical implications. *J Clin Med Res*, 3, 1-7.
- MITTAL, Y., JINDAL, G. & GARG, S. 2016. Bone manipulation procedures in dental implants. *Indian J Dent*, 7, 86-94.
- MOGNETTI, B., MARINO, S., BARBERIS, A., MARTIN, A. S., BALA, Y., DI CARLO, F., BOIVIN, G. & BARBOS, M. P. 2011. Experimental stimulation of bone healing with teriparatide: histomorphometric and microhardness analysis in a mouse model of closed fracture. *Calcif Tissue Int*, 89, 163-71.
- MORRISON, S. J. & SCADDEN, D. T. 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 505, 327-34.
- MOUNTZIARIS, P. M. & MIKOS, A. G. 2008. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, 14, 179-86.
- MROZ, T. E., WANG, J. C., HASHIMOTO, R. & NORVELL, D. C. 2010. Complications related to osteobiologics use in spine surgery: a systematic review. *Spine (Phila Pa 1976)*, 35, S86-104.
- NALDINI, L. 2015. Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, 526, 351-60.
- NAZARIAN, A., SNYDER, B. D., ZURAKOWSKI, D. & MULLER, R. 2008. Quantitative micro-computed tomography: a non-invasive method to assess equivalent bone mineral density. *Bone*, 43, 302-11.
- NELDAM, C. A. & PINHOLT, E. M. 2014. Synchrotron muCT imaging of bone, titanium implants and bone substitutes - a systematic review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg*, 42, 801-5.
- NOEL, D., CATON, D., ROCHE, S., BONY, C., LEHMANN, S., CASTEILLA, L., JORGENSEN, C. & COUSIN, B. 2008. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res*, 314, 1575-84.

- OLIVO, C., ALBLAS, J., VERWEIJ, V., VAN ZONNEVELD, A. J., DHERT, W. J. & MARTENS, A. C. 2008. In vivo bioluminescence imaging study to monitor ectopic bone formation by luciferase gene marked mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 26, 901-9.
- OSAWA, K., OKUBO, Y., NAKAO, K., KOYAMA, N. & BESSHO, K. 2010. Osteoinduction by repeat plasmid injection of human bone morphogenetic protein-2. *J Gene Med*, 12, 937-44.
- PAN, H., ZHENG, Q., YANG, S., GUO, X., WU, B., ZOU, Z. & DUAN, Z. 2014. A novel peptide-modified and gene-activated biomimetic bone matrix accelerating bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*, 102, 2864-74.
- PARFITT, A. M. 1983. Assessment of trabecular bone status. *Henry Ford Hosp Med J*, 31, 196-8.
- PARFITT, A. M., DREZNER, M. K., GLORIEUX, F. H., KANIS, J. A., MALLUCHE, H., MEUNIER, P. J., OTT, S. M. & RECKER, R. R. 1987. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*, 2, 595-610.
- PARK, S. N., KIM, J. K. & SUH, H. 2004. Evaluation of antibiotic-loaded collagen-hyaluronic acid matrix as a skin substitute. *Biomaterials*, 25, 3689-98.
- PARRILLA, C., SAULNIER, N., BERNARDINI, C., PATTI, R., TARTAGLIONE, T., FETONI, A. R., POLA, E., PALUDETTI, G., MICHETTI, F. & LATTANZI, W. 2011. Undifferentiated human adipose tissue-derived stromal cells induce mandibular bone healing in rats. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 137, 463-70.
- PERIC, M., DUMIC-CULE, I., GRCEVIC, D., MATIJASIC, M., VERBANAC, D., PAUL, R., GRGUREVIC, L., TRKULJA, V., BAGI, C. M. & VUKICEVIC, S. 2015. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *Bone*, 70, 73-86.
- PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S. & MARSHAK, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.
- PLANK, C., MECHTLER, K., SZOKA, F. C., JR. & WAGNER, E. 1996. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery. *Hum Gene Ther*, 7, 1437-46.
- PLANK, C., OBERHAUSER, B., MECHTLER, K., KOCH, C. & WAGNER, E. 1994. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J Biol Chem*, 269, 12918-24.
- QUARTO, R., MASTROGIACOMO, M., CANCEDDA, R., KUTEPOV, S. M., MUKHACHEV, V., LAVROUKOV, A., KON, E. & MARCACCI, M. 2001. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*, 344, 385-6.
- REDDI, A. H. 2000. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng*, 6, 351-9.
- ROSENBERG, S. A., AEBERSOLD, P., CORNETTA, K., KASID, A., MORGAN, R. A., MOEN, R., KARSON, E. M., LOTZE, M. T., YANG, J. C., TOPALIAN, S. L. & ET AL. 1990. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*, 323, 570-8.
- ROSENBERG, S. A., YANNELLI, J. R., YANG, J. C., TOPALIAN, S. L., SCHWARTZENTRUBER, D. J., WEBER, J. S., PARKINSON, D. R., SEIPP, C. A., EINHORN, J. H. & WHITE, D. E. 1994. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst*, 86, 1159-66.

- RUEL-GARIEPY, E. & LEROUX, J. C. 2004. In situ-forming hydrogels--review of temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm*, 58, 409-26.
- RUPONEN, M., YLA-HERTTUALA, S. & URTTI, A. 1999. Interactions of polymeric and liposomal gene delivery systems with extracellular glycosaminoglycans: physicochemical and transfection studies. *Biochim Biophys Acta*, 1415, 331-41.
- SALGADO, A. J., COUTINHO, O. P. & REIS, R. L. 2004. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*, 4, 743-65.
- SATTLER, C., STEINSDOERFER, M., OFFERS, M., FISCHER, E., SCHIERL, R., HESELER, K., DAUBENER, W. & SEISSLER, J. 2011. Inhibition of T-cell proliferation by murine multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by CD39 expression and adenosine generation. *Cell Transplant*, 20, 1221-30.
- SCHENK, R. K. & BUSER, D. 1998. Osseointegration: a reality. *Periodontol 2000*, 17, 22-35.
- SCHENKE-LAYLAND, K., STREM, B. M., JORDAN, M. C., DEEMEDIO, M. T., HEDRICK, M. H., ROOS, K. P., FRASER, J. K. & MACLELLAN, W. R. 2009. Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction. *J Surg Res*, 153, 217-23.
- SCHILLINGER, U., WEXEL, G., HACKER, C., KULLMER, M., KOCH, C., GERG, M., VOGT, S., UEBLACKER, P., TISCHER, T., HENSLER, D., WILISCH, J., AIGNER, J., WALCH, A., STEMBERGER, A. & PLANK, C. 2008. A fibrin glue composition as carrier for nucleic acid vectors. *Pharm Res*, 25, 2946-62.
- SEKIYA, I., LARSON, B. L., SMITH, J. R., POCHAMPALLY, R., CUI, J. G. & PROCKOP, D. J. 2002. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells*, 20, 530-41.
- SHEYN, D., KALLAI, I., TAWACKOLI, W., COHN YAKUBOVICH, D., OH, A., SU, S., DA, X., LAVI, A., KIMELMAN-BLEICH, N., ZILBERMAN, Y., LI, N., BAE, H., GAZIT, Z., PELLED, G. & GAZIT, D. 2011. Gene-modified adult stem cells regenerate vertebral bone defect in a rat model. *Mol Pharm*, 8, 1592-601.
- SHIMER, A. L., ONER, F. C. & VACCARO, A. R. 2009. Spinal reconstruction and bone morphogenetic proteins: open questions. *Injury*, 40 Suppl 3, S32-8.
- SMEETS, R., BARBECK, M., HANKEN, H., FISCHER, H., LINDNER, M., HEILAND, M., WOLTJE, M., GHANAATI, S. & KOLK, A. 2017. Selective laser-melted fully biodegradable scaffold composed of poly(D,L-lactide) and beta-tricalcium phosphate with potential as a biodegradable implant for complex maxillofacial reconstruction: In vitro and in vivo results. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 105, 1216-1231.
- SMEETS, R., GERHARDS, F., STEIN, J. M., PAZ, R. M., VOGT, S., PAUTKE, C., WEITZ, J. & KOLK, A. 2011. A novel hemostatic delivery device for thrombin: biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50 microspheres. *J Biomed Mater Res A*, 96, 177-85.
- SMEETS, R., MACIEJEWSKI, O., GERRESSEN, M., SPIEKERMANN, H., HANISCH, O., RIEDIGER, D., BLAKE, F., STEIN, J., HOLZLE, F. & KOLK, A. 2009. Impact of rhBMP-2 on regeneration of buccal alveolar defects during the osseointegration of transgingival inserted implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 108, e3-e12.
- SOBALLE, K., HANSEN, E. S., BROCKSTEDT-RASMUSSEN, H., PEDERSEN, C. M. & BUNGER, C. 1990. Hydroxyapatite coating enhances fixation of porous coated implants. A comparison in dogs between press fit and noninterference fit. *Acta Orthop Scand*, 61, 299-306.
- SOMIA, N. & VERMA, I. M. 2000. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet*, 1, 91-9.
- SONNET, C., SIMPSON, C. L., OLABISI, R. M., SULLIVAN, K., LAZARD, Z., GUGALA, Z., PERONI, J. F., WEH, J. M., DAVIS, A. R., WEST, J. L. & OLMSTED-DAVIS, E. A. 2013.

- Rapid healing of femoral defects in rats with low dose sustained BMP2 expression from PEGDA hydrogel microspheres. *J Orthop Res*, 31, 1597-604.
- SONOBE, J., OKUBO, Y., KAIHARA, S., MIYATAKE, S. & BESSHO, K. 2004. Osteoinduction by bone morphogenetic protein 2-expressing adenoviral vector: application of biomaterial to mask the host immune response. *Hum Gene Ther*, 15, 659-68.
- ST JOHN, T. A., VACCARO, A. R., SAH, A. P., SCHAEFER, M., BERTA, S. C., ALBERT, T. & HILIBRAND, A. 2003. Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 32, 18-23.
- TAKAHASHI, Y., YAMAMOTO, M. & TABATA, Y. 2005. Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 26, 4856-65.
- TARTE, K., GAILLARD, J., LATAILLADE, J. J., FOUILLARD, L., BECKER, M., MOSSAFA, H., TCHIRKOV, A., ROUARD, H., HENRY, C., SPLINGARD, M., DULONG, J., MONNIER, D., GOURMELON, P., GORIN, N. C., SENSEBE, L. & SOCIETE FRANCAISE DE GREFFE DE MOELLE ET THERAPIE, C. 2010. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*, 115, 1549-53.
- TAVERNIER, G., ANDRIES, O., DEMEESTER, J., SANDERS, N. N., DE SMEDT, S. C. & REJMAN, J. 2011. mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression. *J Control Release*, 150, 238-47.
- TSUCHIDA, H., HASHIMOTO, J., CRAWFORD, E., MANSKE, P. & LOU, J. 2003. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. *J Orthop Res*, 21, 44-53.
- URIST, M. R. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150, 893-9.
- VENUGOPAL, J. & RAMAKRISHNA, S. 2005. Biocompatible nanofiber matrices for the engineering of a dermal substitute for skin regeneration. *Tissue Eng*, 11, 847-54.
- VEPARI, C. & KAPLAN, D. L. 2007. Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci*, 32, 991-1007.
- WAN, C., GILBERT, S. R., WANG, Y., CAO, X., SHEN, X., RAMASWAMY, G., JACOBSEN, K. A., ALAQL, Z. S., EBERHARDT, A. W., GERSTENFELD, L. C., EINHORN, T. A., DENG, L. & CLEMENS, T. L. 2008. Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 686-91.
- WARNKE, P. H., SPRINGER, I. N., WILTFANG, J., ACIL, Y., EUFINGER, H., WEHMOLLER, M., RUSSO, P. A., BOLTE, H., SHERRY, E., BEHRENS, E. & TERHEYDEN, H. 2004. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet*, 364, 766-70.
- WEHRHAN, F., AMANN, K., MOLENBERG, A., LUTZ, R., NEUKAM, F. W. & SCHLEGEL, K. A. 2012. PEG matrix enables cell-mediated local BMP-2 gene delivery and increased bone formation in a porcine critical size defect model of craniofacial bone regeneration. *Clin Oral Implants Res*, 23, 805-13.
- WILKINS, K. E. 2005. Principles of fracture remodeling in children. *Injury*, 36 Suppl 1, A3-11.
- WILLIAMS, D. F. 2009. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 30, 5897-909.
- WINN, S. R., ULUDAG, H. & HOLLINGER, J. O. 1999. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop Relat Res*, S95-106.
- WIRTH, T., PARKER, N. & YLA-HERTTUALA, S. 2013. History of gene therapy. *Gene*, 525, 162-9.
- WOZNEY, J. M. 1989. Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res*, 1, 267-80.
- WU, Y. & ZHAO, R. C. 2012. The role of chemokines in mesenchymal stem cell homing to myocardium. *Stem Cell Rev*, 8, 243-50.

- XU, F., SHI, J., YU, B., NI, W., WU, X. & GU, Z. 2010. Chemokines mediate mesenchymal stem cell migration toward gliomas in vitro. *Oncol Rep*, 23, 1561-7.
- YAMAMOTO, A., KORMANN, M., ROSENECKER, J. & RUDOLPH, C. 2009. Current prospects for mRNA gene delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 71, 484-9.
- YAO, W., GUAN, M., JIA, J., DAI, W., LAY, Y. A., AMUGONGO, S., LIU, R., OLIVOS, D., SAUNDERS, M., LAM, K. S., NOLTA, J., OLVERA, D., RITCHIE, R. O. & LANE, N. E. 2013. Reversing bone loss by directing mesenchymal stem cells to bone. *Stem Cells*, 31, 2003-14.
- YAO, W. & LANE, N. E. 2015. Targeted delivery of mesenchymal stem cells to the bone. *Bone*, 70, 62-5.
- YOO, J. U., BARTHEL, T. S., NISHIMURA, K., SOLCHAGA, L., CAPLAN, A. I., GOLDBERG, V. M. & JOHNSTONE, B. 1998. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*, 80, 1745-57.
- YOSHIMURA, K., SATO, K., AOI, N., KURITA, M., INOUE, K., SUGA, H., ETO, H., KATO, H., HIROHI, T. & HARII, K. 2008. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg*, 34, 1178-85.
- YOUNG, M. F. 2003. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int*, 14 Suppl 3, S35-42.
- ZACHOS, T., DIGGS, A., WEISBRODE, S., BARTLETT, J. & BERTONE, A. 2007. Mesenchymal stem cell-mediated gene delivery of bone morphogenetic protein-2 in an articular fracture model. *Mol Ther*, 15, 1543-50.
- ZAPF, J., HAURI, C., WALDVOGEL, M. & FROESCH, E. R. 1986. Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulinlike growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. *J Clin Invest*, 77, 1768-75.
- ZON, L. I. 2008. Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature*, 453, 306-13.

**6.2 Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1:</b>	Aufstellung der Therapie- und Kontrollgruppen.....	20
<b>Tab. 2:</b>	Reagenzien und Medien für Zellkultur.....	21
<b>Tab. 3:</b>	Material und Reagenzien zur Herstellung der cmRNA und zur Beschichtung der Implantate.....	22
<b>Tab. 4:</b>	Stammzellen und Medium.....	23
<b>Tab. 5:</b>	Perioperativ verwendete Medikamente und Material.....	23
<b>Tab. 6:</b>	Zur Herstellung der Implantate und Evaluation der Versuchsergebnisse verwendete Geräte.....	24

### 6.3 **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1:</b>	Strukturelle Darstellung der chemisch modifizierten RNA (cmRNA).....	15
<b>Abb. 2:</b>	MSCs in der 5. Passage.....	28
<b>Abb. 3:</b>	ADSCs in der 2. Passage.....	29
<b>Abb. 4:</b>	Zahnfilmaufnahmen zur initialen orientierenden Auswertung und Zuordnung.....	33
<b>Abb. 5:</b>	Dreidimensionale Darstellung im $\mu$ CT des CSD von Gruppe 1 (nativ).....	38
<b>Abb. 6:</b>	Graphische Darstellung des BV der cmRNA Therapie Gruppe.....	39
<b>Abb. 7:</b>	Dreidimensionale Rekonstruktion im $\mu$ CT der Therapiegruppen mit cmRNA <sub>BMP-2</sub> nach 28 (obere Reihe) und 56 Tagen (untere Reihe).....	40
<b>Abb. 8:</b>	Graphische Darstellung des BV der Therapiegruppen mit MSC und ADSC.....	41
<b>Abb. 9:</b>	Graphische Darstellung des BV der Therapiegruppen mit 1,25 $\mu$ g cmRNA und MSC / ADSC.....	42
<b>Abb. 10:</b>	Graphische Darstellung des BV der Therapiegruppen mit 2,5 $\mu$ g cmRNA und MSC / ADSC.....	43
<b>Abb. 11:</b>	Graphische Darstellung des BV der Therapiegruppen mit 5 $\mu$ g cmRNA und MSC / ADSC.....	44
<b>Abb. 12:</b>	Dreidimensionale Rekonstruktion der Gruppen mit Kombinationstherapie von cmRNA und Stammzellen nach 28 Tagen.....	45
<b>Abb. 13:</b>	Dreidimensionale Rekonstruktion der Gruppen mit Kombinationstherapie von cmRNA und Stammzellen nach 56 Tagen.....	45
<b>Abb. 14:</b>	Graphische Darstellung des BV der Kombinationstherapien mit MSC und cmRNA.....	46
<b>Abb. 15:</b>	Graphische Darstellung des BV der Kombinationstherapien mit ADSC und cmRNA.....	46
<b>Abb. 16:</b>	Therapiegruppen mit MSC / ADSC und jeweils 2,5 cmRNA nach 14 Tagen.....	47

## **7 Danksagung**

Zunächst gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Andreas Kolk, der mir das Thema dieser Arbeit überließ und mich nach einer herzlichen Aufnahme in seine Arbeitsgruppe stets bei der Arbeit motivierte und unterstützte.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christian Plank vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München bedanken, der mit seinem Forschungsschwerpunkt auf dem Bereich der Genterapie maßgeblich zur Etablierung des genterapeutischen Konzeptes beigetragen hat und die dieser Arbeit zugrundeliegende Technologie entwickelte und freundlicherweise zur Verfügung stellte. Bei seinen Mitarbeiterinnen Frau Dr. Ulrike Schillinger, Frau Dr. Mehrije Ferizi und Frau Dr. Zohreh Badiyan möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit, die aufwändige präoperative Vorbereitung der Implantate und nicht zuletzt für die ständige und sehr hilfsbereite Unterstützung und konstruktiven Anregungen herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Kunzelmann, Leitender Oberarzt der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, und dessen Labor gilt mein Dank für die Bereitstellung des Mikrocomputertomographie-Gerätes.

Besonders danke ich meiner Familie und Univ.-Prof. Dr. Giovanni Puglisi für die immerwährende und geduldige Unterstützung bei der Arbeit.

**8 Curriculum vitae**

Name Marko Boškov  
Geburtstag 05. September 1987  
Geburtsort Skopje, Republik Makedonien  
Staatsangehörigkeit deutsch

**Schulbildung und akademische Laufbahn**

04/2014 - **Ludwig-Maximilians-Universität München**  
04/2018 Studium der Zahnheilkunde

10/2009 - **Technische Universität München**  
06/2014 Studium der Humanmedizin (klinischer Abschnitt)

10/2006 - **Ludwig-Maximilians-Universität München**  
10/2009 Studium der Humanmedizin (vorklinischer Abschnitt)

08/2011 - **Klinik und Poliklinik für Viszeralchirurgie der Universität**  
10/2011 **Skopje**

04/2010 **Guy's Hospital (Guy's & St. Thomas' – King's College London)**  
Department for Plastic Surgery

09/1997 - **Karls gymnasium Stuttgart**  
06/2006

**Berufliche und wissenschaftliche Tätigkeiten**

04/2016 **Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München**  
08/2018 Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter

04/2015 - **Ludwig-Maximilians-Universität München**  
04/2016 Anatomische Anstalt Lehrstuhl I  
Dozent im Anatomischen Präparationskurs für Zahnmediziner

Seit 04/2016 **Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München**  
Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie  
Promotion zum Dr. med. dent.  
Doktorvater: Prof. Dr. Dr. Andreas Kolk

## **Publikationen**

Haidari S, **Boskov M**, Schillinger U, Bissinger O, Wolff KD, Plank C, Kolk A  
Functional analysis of bioactivated and antiinfective PDLLA-coated surfaces  
**J Biomed Mater Res A** 2017 Jun; 105(6):1672-1683

Boxberg M, Dorfner C, Jesinghaus M, Götz C, Haidari S, **Boskov M**, Drecol E et al.  
**Immunohistochemical expression of CD44 in oral squamous cell carcinoma in relation to histomorphologic parameters and clinicopathological factors**  
**Histopathology** 2018 Feb; doi: 10.1111/his.13496.

Kolk A, **Boskov M**, Haidari S, Tischer T, van Griensven M, Bissinger O, Plank C  
Comparative analysis of bone regeneration behaviour using recombinant human BMP-2 versus plasmid DNA of BMP-2  
Angenommen zur Veröffentlichung in **J Biomed Mater Res A**