

Aus der  
Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik  
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der Universität  
Tübingen

**Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen  
des Fettgewebes auf vier verschiedenen 3D-Trägermaterialien  
im Vergleich zu einer 2D-Kultur**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Deninger, Sebastian Johannes

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Gallwitz

Tag der Disputation: 10.05.2021

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Der medizinische Engpass von Knochenmaterial.....	1
1.2 Gegenwärtiger Behandlungs- und Forschungsstand im Kontext Knochen.....	1
1.3 Zukünftige Strategien der Knochenbehandlung und -forschung.....	2
1.4 Tissue Engineering - ein Überblick.....	4
1.5 Eigenschaften von Knochenmaterial.....	8
1.6 Knochenstoffwechsel.....	11
1.7 Tissue Engineering von Knochen.....	13
1.7.1 Trägermaterialien beim Tissue Engineering des Knochens.....	13
1.7.2 Zellkultur und mesenchymale Stammzellen.....	18
1.8 Dreidimensionale Kulturbedingungen.....	20
1.9 Strategie im vorliegenden Projekt.....	21
1.10 Ziel der Arbeit: Welche Kultur liefert die besten Bedingungen?.....	24
2. Methoden.....	25
2.1 Herstellung vier verschiedener Kryogele.....	25
2.2 Herstellung und Charakterisierung der Scaffolds .....	27
2.3 Bestimmung der Porengröße.....	28
2.4 Bestimmung der Porosität.....	30
2.5 Bestimmung des E-Moduls eines Scaffold.....	31

2.6 Lagerung & Verarbeitung von Scaffolds.....	32
2.7 Isolation von Ad-MSC.....	32
2.8 Herstellung des Kulturmediums.....	34
2.9 Kultivieren und Passagieren von Ad-MSC.....	34
2.10 Qualitätssicherung der kultivierten Ad-MSC.....	34
2.10.1 Adhärenz der Zellen auf Plastik und Differenzierung in drei Zellarten.....	35
2.10.2 PCR-basierte Charakterisierung der Ad-MSCs.....	37
2.11 Herstellung eines Kulturmediums für SCP-1 Zellen.....	40
2.12 Bestimmung der optimalen Inkubationszeit der Scaffolds.....	40
2.13 Bestimmung der optimalen Zellzahl zur Aussaat auf ein Scaffold.....	41
2.14 Aussaat von Ad-MSC auf den Kryogelen.....	41
2.15 Zellfärbung mit Calcein-AM.....	42
2.16 Zellkernfärbung mit Hoechst 33342.....	43
2.17 Eindringtiefe und Besiedelungsmusters der Ad-MSC auf den Scaffolds.....	44
2.18 Osteogene Differenzierung von Ad-MSC.....	44
2.19 Messung der Funktionsparameter.....	45
2.19.1 Resazurinumsatz.....	45
2.19.2 Glukoseverbrauch der besiedelten Zellen.....	46
2.19.3 Messung der alkalischen Phosphatase.....	46
2.20 Isolierung der DNA von 3D-Zellkulturen und Quantifizierung der DNA der Kulturbedingungen mittels Absorptionsmessung.....	47

2.21 Gewinnung von Protein-Lysaten der besiedelten Scaffolds.....	48
2.22 Methodik des Dot-Blots.....	48
2.23 Bestimmung der Steifigkeit nach Besiedelung.....	50
2.24 CT-Messungen der Scaffolds.....	51
2.25 Vergleich des Zytokingehalts in PRP und IKM.....	52
2.26 Statistische Auswertung.....	53
3. Ergebnisse.....	54
3.1 Eigenschaften der Scaffolds.....	54
3.1.1 Porengröße.....	54
3.1.2 Porosität der Scaffolds.....	55
3.1.3 E-Modul-Werte der Scaffolds.....	56
3.2 Überprüfung der Kriterien für mesenchymale Stammzellen nach Domi- nici.....	57
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Vorversuchen.....	61
3.4 Viabilität und Besiedlungsmuster der Zellen auf den Scaffolds.....	64
3.5 Auswertung der Funktionsparameter.....	66
3.5.1 Resazurinumsatz.....	66
3.5.2 Glukoseverbrauch der Zellen.....	67
3.5.3 Aktivität der alkalischen Phosphatase.....	68
3.6 Quantifizierung des DNA-Gehalts der besiedelten Scaffolds.....	69
3.7 Messung der Transkriptionsfaktoren Runx 2, Osterix und des Faktors OPG.....	70
3.8 Vergleich der Steifigkeit der Scaffolds vor und nach Besiedelung.....	72

3.9 Auswertung der CT-Grauwerte der Scaffolds.....	73
3.10 Auswertung von Zytokinarrays zum Vergleich des Scaffolds PRP und IKM.....	74
4. Diskussion.....	77
4.1 Rezeptur und Herstellung der Scaffolds.....	77
4.2 Die Wahl der Zusatzstoffe PRP, Koll, IKM und RGD.....	78
4.3 Die physikalischen Parameter der Scaffolds.....	79
4.4 Vorinkubation und Lagerung der Scaffolds.....	83
4.5 Wahl der mesenchymalen Stammzelle und Kulturverhalten.....	83
4.6 Erfüllung der Qualitätskriterien der Stammzellen vor der Aussaat.....	85
4.7 Besiedelungsverhalten der Zellen auf den Scaffolds.....	86
4.8 Messung der Funktionsparameter nach Besiedelung.....	87
4.9 Veränderung der Besiedelungszahl im Verlauf der Differenzierung.....	90
4.10 Sekretion spezifischer Marker.....	91
4.11 Veränderung der Scaffoldmatrix im Verlauf der Differenzierung.....	92
4.12 Zytokinarrays zur Untersuchung von Scaffold-Zusatzstoffen.....	94
4.13 Welche Kulturbedingung ist am geeignetsten?.....	95
5. Zusammenfassung.....	98
6. Ausblick.....	100
7. Literaturverzeichnis.....	101
8. Anhang.....	118
8.1 Material.....	118

8.1.1 Chemikalienliste.....	118
8.1.2 Primer, Antikörper und PCR-Kits.....	120
8.1.3 Verbrauchs- und Gebrauchsmaterial.....	122
8.1.4 Geräte.....	123
8.1.5 Verwendete Zelllinien.....	125
8.1.6 Medien und Lösungen.....	125
8.1.7 Software.....	126
8.1.8 Übersicht der Dot-Blot Signale.....	127
9. Erklärung zum Eigenanteil.....	128
10. Veröffentlichungen.....	129
11. Danksagung.....	129

## Abkürzungsverzeichnis

Ad-MSC	Aus Fettgewebe abgeleitete mesenchymale Stammzellen
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATF 4	Aktivierender Transkriptionsfaktor 4
BG-Klinik	Berufsgenossenschaftliche Klinik
BMP	Knochenmorphogenetisches Protein
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
Calcein-AM	Calcein Acetoxymethylester
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol - Dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat-haltiges Wasser
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-ISO	DNA-Isolation
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
DOC	Deoxycholsäure
E	E-Modul
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Endothelialer Wachstumsfaktor
EK	Endkonzentration
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
HEMA	Hydroxy-ethyl-methacrylat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IKM	Immunzellkonditioniertes Medium
Koll	Kollagen
MW	Medienswechsel
PBS	Phosphat gepufferte Saline
Präink	Präinkubation
Protein-Lys	Protein-Lysate

PRP	Plättchenreiches Plasma
RGD	Abkürzung der Aminosäuren Arginin, Glycin und Aspartat
RIPA	Radioimmunopräzipitations Assay
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
Runx 2	Runt-verknüpfter Transkriptionsfaktor 2
SRB	Sulforhodamin B
Sp	Spender
TBS	TRIS gepufferte Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kreislauf des Tissue Engineering.....	3
Abbildung 2: Architektur eines Röhrenknochens.....	10
Abbildung 3: Darstellung der Interaktionsprozesse zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, die die Knochenhomöostase regulieren.....	12
Abbildung 4: Prozess der Kryogelierung.....	22
Abbildung 5: Schneideapparat zum Schneiden der Scaffoldstifte in 1,5 mm hohe Scheiben.....	28
Abbildung 6: Gegossenes Kryogel nach Polymerisation.....	28
Abbildung 7: Porenübersicht eines Kollagenscaffolds im Fluoreszenzmikroskop.....	29
Abbildung 8: RT-PCR-Schema zur Herstellung von cDNA.....	38
Abbildung 9: Zeitliches Differenzierungsschema und Messpunkte während der Differenzierung.....	45
Abbildung 10: Porendurchmesser der Scaffolds.....	55
Abbildung 11: Wasseraufnahmekapazität der Scaffolds.....	56
Abbildung 12: Steifigkeit der unbesiedelten Scaffolds in kPa.....	57
Abbildung 13: Adhärenz der Ad-MSCs auf Plastik der Kulturflasche in der Aufsicht.....	58
Abbildung 14: Differenzierung der Ad-MSCs in Knorpel-, Fett- und Knochenzellen an Tag 14.....	59
Abbildung 15: PCR-Banden der CD-Marker nach Dominici.....	60
Abbildung 16: Vergleich von Trockenscaffolds zu Nasscaffolds.....	61
Abbildung 17: Vergleich des Resazurinumsatzes von SCP-1 Zellen auf Kollagenscaffolds bei unterschiedlicher Vorinkubationszeit.....	62
Abbildung 18: Durchschnittlicher Resazurinumsatz von SCP-1 Zellen in unterschiedlicher Besiedelungszahl pro Scaffold im Verhältnis zum Gesamtmittelwert der Scaffolds vom Typ Koll.....	63
Abbildung 19: Scaffoldbesiedelung an Tag 0 in Aufsicht und Querschnitt.....	64

Abbildung 20: Besiedelung der Scaffoldoberfläche während der Differenzierung an Tag 0, Tag 7 und Tag 14.....	65
Abbildung 21: Resazurinumsatz der Ad-MSCs auf den verschiedenen Scaffoldtypen.....	66
Abbildung 22: Glukoseverbrauch der Ad-MSCs auf Scaffolds.....	67
Abbildung 23: AP-Aktivität der Ad-MSCs auf den vier Scaffoldtypen.....	68
Abbildung 24: DNA-Gehaltsbestimmung der besiedelten Scaffoldtypen im zeitlichen Verlauf.....	69
Abbildung 25: Grauwerte der Dot-Signale im Dot-Blot von Runx 2 , Osterix und OPG.....	71
Abbildung 26: Steifigkeit der Scaffolds in kPa vor und nach Differenzierung.....	72
Abbildung 27: Delta des Grauwerts im CT zwischen unbesiedelten Scaffolds und nach 14 Tagen Differenzierung.....	73
Abbildung 28: Mittelwerte der Signalstärke verschiedener Zytokine in THP-1 Proben und Proben von PRP.....	74
Abbildung 29: Gegenüberstellung der Mittelwerte der Signalstärke von Zytokinen jeweils von Angiogenin, vaskulär-endotheliale Wachstumsfaktor-A (=VEGF-A), Interferon- $\gamma$ (=IFN- $\gamma$ ), Interleukin-1- $\alpha$ (=IL-1- $\alpha$ ), Fibroblasten-Wachstumsfaktor 6 (= FGF-6), FGF-7, FGF-9 und Leptin im THP-1 Medium im Vergleich zu PRP.....	76

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Übersicht verschiedener Einsatzgebiete des Tissue Engineerings.....	5
Tabelle 2: Übersicht einer Auswahl verwendeter Materialien zur Herstellung von Scaffolds).....	14
Tabelle 3: Übersicht einer Auswahl von Herstellungsverfahren und Entwicklungen für die Scaffoldproduktion.....	16
Tabelle 4: Zusammensetzung der Kryogele.....	27
Tabelle 5: Übersicht der Spenderinformationen.....	33
Tabelle 6: Übersicht der PCR-Spezifikationen.....	39

# **1. Einleitung**

## **1.1 Der medizinische Engpass von Knochenmaterial**

Die Versorgung von Knochendefekten ist einer der großen Schwerpunkte der Unfallchirurgie. Auch wenn Knochengewebe an sich großes Regenerationspotential besitzt, ist die Behandlung von großen Knochendefekten nach Trauma oder tumorbedingt weiterhin limitiert, da große Defekte ohne Überbrückung des Frakturspaltes schlecht heilen und nicht immer genügend Knochenersatzmaterial aufgebracht werden kann (Gómez-Barrena *et al.*, 2015). Im Kontext dieses Materialmangels rücken in einer wachsenden und alternden Bevölkerung alloplastische Transplantationsverfahren vermehrt in den Fokus (Amini *et al.*, 2012; Brydone *et al.*, 2010). Dabei handelt es sich um produziertes Ersatzgewebe aus Stammzellen des jeweiligen Patienten. Dieses Forschungsfeld der regenerativen Medizin, auch Tissue Engineering genannt, ist vergleichsweise jung, entwickelt sich jedoch in vielen medizinischen Disziplinen rasant (Shafiee und Atala, 2017). Es ist insofern sehr vielversprechend, da Nachteile wie Pseudarthrosen, Prothesenlockerung oder -versagen und immunologische Abstoßungen von Transplantaten in Zukunft verringert werden könnten und derzeit lediglich Herausforderungen in der Produktion eines optimalen Gewebeprodukts bestehen bleiben.

## **1.2 Gegenwärtiger Behandlungs- und Forschungsstand im Kontext Knochen**

Frakturen und Knochendefekte werden nach heutigem Standard je nach Lokalisation, Gelenkbeteiligung und Ausmaß unterschiedlich versorgt (Muminagic, 2011). Ist der Defekt klein und weitestgehend stabil, kann die Behandlung konservativ mittels Ruhigstellung beispielsweise im Gips behandelt werden (Broos und Sermon, 2004). Bei Instabilität und mittelgroßen Frakturen kommen Platten, Nägel, Schrauben und Zuggurtungsosteosynthesen zum Einsatz (Muminagic, 2011; Uhthoff *et al.*, 2006). Voraussetzung ist in beiden Fällen, dass ausreichend Knochenrestgewebe vorhanden ist, um das defekte Areal zu überbrü-

cken. Ist dies nicht der Fall, besteht ein deutlich erhöhtes Risiko für Pseudarthrosen (Romano *et al.*, 2009), weshalb eine Knochengewebestransplantation nötig ist. Diese kann mittels Spongiosaplastik aus einem anderen Knochen wie beispielsweise der Crista Iliaca des Beckenkamms erfolgen, allerdings kann hier nur eine limitierte Menge gewonnen werden. Eine autologe Transplantation ist ebenfalls möglich, wobei hier immunologische Risiken in Form von Abstoßungsreaktionen in Kauf genommen werden müssen. Bei großen Defekten kann die Masquelettechnik einen Nutzen erbringen (Giannoudis *et al.*, 2011), bei der der Defekt zunächst mit einer Zementfüllung überbrückt wird um den sich eine Knochenhautmembran bildet. In einem zweiten Eingriff wird dann die Füllung durch Spongiosa ersetzt, wobei die Wundheilungsmembran bestmöglich erhalten wird. Trotzdem ist die Versorgung von großen Defekten limitiert. So fehlt es an adäquatem Ersatzmaterial, das bei großen Läsionen als Defektfüller dienen kann.

### **1.3 Zukünftige Strategien der Knochenbehandlung und -forschung**

Um große Knochendefekte in Zukunft effektiv behandeln zu können, muss ausreichend Ersatzmaterial gewonnen werden, welches sich schadlos in das Organsystem Knochen einfügt. Dabei können einerseits technisch entwickelte Produkte im Sinne einer Prothese einen großen Defekt füllen, jedoch ist deren Verweildauer im Körper begrenzt ist und sie verhalten sich nicht wie vitaler Knochen. Im Gegensatz dazu besteht seit langem das Ziel Knochengewebe zu züchten, welches dann in den bestehenden Knochen integriert werden soll (Henkel *et al.*, 2013). Ein solche Strategie könnte darin bestehen nach einem Unfall oder bei einer Defektheilung dem Patienten auf schnellstem Wege Stammzellen zu entnehmen, zu kultivieren und zu vermehren. Parallel wird der Defekt vermessen und ein biokompatibles Trägermaterial passgenau gefertigt beziehungsweise eine Defektfüllmasse produziert. Sobald genügend Zellen gewonnen sind, wird das Trägermaterial mit den Zellen besiedelt und anschließend implantiert. Der gesamte Ablauf ist in Abbildung 1 zusammengefasst. Langfristig soll sich das Trägermaterial schadlos und abnutzungsfrei in die Um-

gebung integrieren oder über die Zeit vom Körper abgebaut werden (Amini *et al.*, 2012; Henkel *et al.*, 2013; Shafiee und Atala, 2017). Die mit diesem Prozess einhergehenden Herausforderungen wie Materialwahl, Zelleigenschaften, Vaskularisierung und Ernährung der Zellen sind noch zu bewältigen (Cowan *et al.*, 2005; Rose und Oreffo, 2002; Santos und Reis, 2010). Dieser Aufgabe nimmt sich das Forschungsfeld des Tissue Engineerings an.

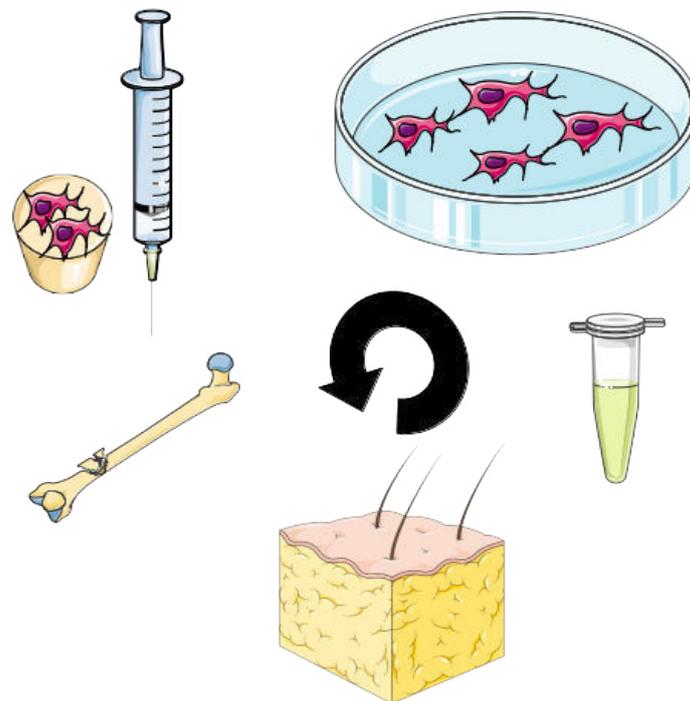


Abbildung 1: Kreislauf des Tissue Engineering. Stammzellen werden dem Patienten entnommen, kultiviert, vermehrt und auf Trägermaterial übertragen. Nach Differenzierung der Zellen wird das Produkt im defekten Gewebe implantiert. Graphik erstellt anhand von Graphiken von <https://smart.servier.com/>. Modifiziert nach Liu *et al.* (2017).

#### **1.4 Tissue Engineering - ein Überblick**

Eine Großzahl von Organen unterliegt gerade in einer alternden Gesellschaft, aber auch durch Unfälle und Krankheiten bedingt einem Verschleiß. Der Ersatz durch Spenderorgane ist limitiert und zugleich birgt er stets ein immunologisches Abstoßungsrisiko (Shlomchik, 2007). Diesen Engpass an Ersatzmaterial versucht das Tissue Engineering durch Reproduktion von möglichst funktionsgerechtem Ersatzmaterial zu lösen (Marot *et al.*, 2010). Der Schwierigkeitsgrad der Reproduktion verschiedener Gewebetypen variiert dabei mit der Struktur des Organs und lässt sich in vier Kategorien einteilen. Am Einfachsten zu produzieren sind flache Ersatzgewebe wie Haut, danach folgen tubuläre Organe wie Blutgefäße, dann Hohlorgane wie die Harnblase und am schwierigsten in der Reproduktion sind solide Organe wie die Leber (Shafiee und Atala, 2017).

Bereits sehr viele Forschungsdisziplinen beschäftigen sich mit der Herstellung von Ersatzgewebe. In Tabelle 1 ist ein Überblick über die Sparten und Zielgewebe gegeben:

Tabelle 1: Übersicht verschiedener Einsatzgebiete des Tissue Engineerings

Disziplin	Ersatzzielgewebe	Referenzen
Angiologie	Blutgefäße	L'Heureux <i>et al.</i> , 2006
Kardiologie	Herzklappen, Herzmuskelgewebe	Fallahiarezoudar <i>et al.</i> , 2015; Jawad <i>et al.</i> , 2007; Radisic und Christman, 2013; Reis <i>et al.</i> , 2016
Mund-Kiefer-Gesichts-chirurgie	Knochenersatz	Penolazzi <i>et al.</i> , 2016
Neurologie	Nerven	Gu <i>et al.</i> , 2014
Orthopädie/ Traumatologie	Knochen, Knorpel	Amini <i>et al.</i> , 2012; Hoburg <i>et al.</i> , 2019
Pharmakologie/ Viszeralchirurgie	Leber, Langerhanssche Inseln	Chang <i>et al.</i> , 2010; Ohashi <i>et al.</i> , 2007
Plastische Chirurgie	Haut	Centanni <i>et al.</i> , 2011
Pulmologie	Atemwegsabschnitte	Hamilton <i>et al.</i> , 2015
Urologie & Gynäkologie	Harnwegsabschnitte	Raya-Rivera <i>et al.</i> , 2011

Dabei haben die verschiedenen Sektoren bereits einige Erfolge erzielt, wie anhand einiger Beispiele verdeutlicht wird: Aus dem Bereich der Angiologie wurden aus Fibroblasten mittels Tissue Engineering generierte Blutgefäße mehrere Monate erfolgreich im Mausmodell verpflanzt (L'Heureux *et al.*, 2006). Hierbei gelang es den Autoren wichtige Eigenschaften wie geringe Thromboseneigung, Bildung von Vasa Vasorum und Bildung des von Willebrand-Faktor nachzubilden. Die Kardiologie beginnt sich das Tissue Engineering zunutze zu machen, indem sie versucht Herzklappen oder Herzmuskelzellen zu transplantieren, um bei Patienten mit Herzklappen- oder Herzmuskelpathologien eine bessere kardiale Funktion zu erzielen (Reis *et al.*, 2016). Aus dem Bereich der Orthopädie ist neben dem Tissue Engineering des Knochens oft Knorpel die Zielstruktur der Wahl (Hoburg *et al.*, 2019). Ziel ist es dabei zelltragende, gelartige Spheroide auf den Knorpeldefekt aufzutragen und diesen so zu reparieren (Liu *et al.*,

2017). Neben der Versorgung von Knorpeldefekten wird auch die Therapie von kutanen Wunddefekten verbessert. Forscher aus dem Bereich der plastischen Chirurgie konnten die Wunden von Verbrennungsoptern mit einer technisch produzierten Ersatzhaut decken, die in den untersuchten Parametern denen einer Spenderhaut gleichwertig war (Centanni *et al.*, 2011). Dass implantiertes Ersatzgewebe durchaus längere Zeiten funktionstüchtig bleiben kann, zeigt ein 4-Jahres Follow-up, bei dem eine Trachea erfolgreich reproduziert und einem Kind verpflanzt wurde (Hamilton *et al.*, 2015). Zuletzt soll auch ein urologisches Forschungsprojekt den Erfolg aufzeigen, bei dem das Ersatzgewebe – eine Urethra – hinsichtlich der Flussrate bis zu sechs Jahre zufriedenstellend funktionierte (Raya-Rivera *et al.*, 2011).

In all diesen Disziplinen liegen zwar unterschiedliche Zielgewebe und damit Zellgewinnungs- und Behandlungsverfahren vor, aber grundsätzliche Systematiken bleiben für alle Disziplinen gleich. So hängt die Gewebeproduktion stets von der Wahl des Trägermaterials, der Zelle und des Wachstumsmilieus ab (Baghaban und Faghihi, 2011; Polo-Corrales *et al.*, 2014). Zunächst definiert die Wahl des Trägermaterials grundlegende physikalische Eigenschaften wie Oberflächenbeschaffenheit, Strapazierfähigkeit, räumliche Anordnung und Durchlässigkeit (Polo-Corrales *et al.*, 2014). Für die Patientenanwendung muss der Grundstoff biokompatibel sein. Darüber hinaus bestimmt die mögliche Biodegradierbarkeit, ob es sich in das jeweilige Organsystem einfügt und wie es vom Körper abgebaut wird. Als Zweites bestimmt die Stammzelle und deren Gewinnungsverfahren und -ort wesentlich das Differenzierungs- und Teilungspotential (Baghaban und Faghihi, 2011; Reumann *et al.*, 2018). Ebenso entscheidend ist das Spenderalter und die Expansionszeit (McNeill *et al.*, 2020). Je nach Entnahmestelle und damit Invasivität ergeben sich für den Patienten Risiken der Entnahme, die der Eingriff mit sich bringt, zeitgleich birgt die Gabe von Stammzellen grundsätzlich ein Risiko der Entartung der Zellen (Herberts *et al.*, 2011). Als Drittes ist das Kulturmilieu für die Zellen von wesentlicher Bedeutung. Hier sollen optimale Wachstumsbedingungen für die Zellen durch die Bereitstellung von entsprechenden Temperatur- und Nährstoffbedingungen geschaffen werden (Sotiropoulou *et al.*, 2006). Langfristig ist die Versorgung nicht

mehr durch ein Nährmedium anzustreben, sondern durch körpereigene Gefäße, weshalb Vaskularisierungsprozessen große Aufmerksamkeit geschenkt werden muss. Aktuell gerät die Interaktion der Zellen mit der Umgebung bezüglich Zell-Zellinteraktion oder Adhäsion immer mehr in den Fokus (De Witte *et al.*, 2018).

Ausgehend von diesen drei Grundbedingungen für erfolgreichen Gewebeersatz ergeben sich in den unterschiedlichen Disziplinen spezifischere Überlegungen und Ansätze, um den organspezifischen Anforderungen gerecht zu werden. Um dieses zugrundeliegende Anforderungsprofil zu ermitteln, muss man sich die Eigenschaften und den Stoffwechsel des zu reproduzierenden Gewebes genauer vor Augen führen.

## 1.5 Eigenschaften von Knochenmaterial

Beim genaueren Blick auf Knochengewebe lassen sich folgende Feststellungen über Zusammensetzung, Architektur und Charakteristika von Knochensubstanz machen (siehe Abbildung 2): Bei Knochengewebe handelt es sich grundsätzlich um ein sehr festes, steifes Material. Gleichzeitig variiert die Steifigkeit des Knochenmaterials je nach Lokalisation deutlich. Die Corticalis als eine sehr feste äußere Schicht weist enorme Steifigkeit im Bereich von 7-30 GPa auf, die Spongiosa im Inneren präsentiert sich mit durchschnittlich 0,2-0,5 GPa deutlich weicher (Gao, 2017). Die Steifigkeit ist dabei abhängig von Alter, Gesundheitszustand, dem Grad mechanischer Belastung und hormonellen Einflüssen (Zioupos und Curry, 1998). Mechanische Belastungen wirken stimulierend auf den Knochenstoffwechsel (Krahl *et al.*, 1994). Hormonell wirken die Stoffe Östrogen und Calcitonin knochenaufbauend, während Parathormon kurzfristig aufbauend und Glucocorticoide und Parathormon langfristig knochenabbauend wirken (Rubin und Bilezikian, 2002). RANKL wirkt knochenabbauend, während dessen Antagonist Osteoprotegerin knochenerhaltend wirkt (Clarke, 2008).

Aufgrund der zahlreichen Hohlräume in der Spongiosa ergibt sich für Knochengewebe eine besondere Leichtbauweise (Kini und Nandeesh, 2012). Diese Poren bewirken eine spezifische Architektur. Außerdem agieren in Knochengewebe verschiedene Zellen, die die Stoffwechsellage bestimmen: Osteoblasten bauen neue Knochensubstanz auf und Osteoklasten bauen Knochensubstanz ab. Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die sich aus mononukleären Vorläuferzellen entwickeln und daher zum mononukleär-phagozytierenden System gehören (Lüllmann-Rauch, 2019). Osteoblasten hingegen entstehen aus mesenchymalen Stammzellen (Wei *et al.*, 2013). Neben diesen beiden sehr wichtigen Gegenspielern finden sich außerdem Zellen des Immunsystems, der Hämatopoese und des Gefäßsystems im Knochengewebe (Nagasawa, 2006; Yin, 2006).

In der makroskopischen Betrachtung des Knochens lassen sich Variationen der Architektur erkennen. So gibt es lange Röhrenknochen, Plattenknochen, würfelförmige Knochen, lufthaltige Knochen, Sesambeine und unregelmäßig geformte

Knochen. Die Einteilung eines Knochens bestehend aus einer Diaphyse, Epiphyse und Metaphyse gilt besonders für Röhrenknochen, wobei die Epiphysenfuge das Wachstum dirigiert. Wachstum des Knochens kann desmal oder chondral erfolgen, beim Röhrenknochen erfolgt das Wachstum chondral über knorpelige Vorstufen (Bartl, 2014; Clarke, 2008).

In der Bauweise unterscheidet man Geflechtknochen von lamellären Knochen. Beim Geflechtknochen liegen die Osteozyten ungeordnet im Raum und Fasern sind scheinbar ungeordnet verteilt. Diese Knochenbauweise liegt primär bei der Osteogenese vor, bei der Knochenheilung und bei wenigen Knochen mit Sonderfunktionen (Bartl, 2014; Lüllmann-Rauch, 2019). Beim Lamellenknochen sind Kollagenfibrillen gleichartig ausgerichtet. In der Corticalis liegen Osteozyten viel strukturierter und geordneter vor im Vergleich zur *Spongiosa* und bilden die lamellenartig organisierten Osteone (Bartl, 2014). Diese tragen im Zentrum den sogenannten Havers-Kanal mit einem Blutgefäß und senkrecht dazu verlaufen Volkmannkanäle, die Gefäße der Haverskanäle verbinden. Der Knochen steht unter einem ständigen Umbauprozess, dem sogenannten Remodelling, bei dem Osteoklasten alte Knochensubstanz abbauen und Osteoblasten neue Osteone bilden (Lüllmann-Rauch, 2019). In der *Spongiosa* werden die Osteozyten nicht wie in der Corticalis durch ein Blutgefäß, sondern durch Diffusion vom Knochenmarksraum versorgt. Der Knochenmarksraum beherbergt außerdem ein Reservoir für die Bildung von Blutzellen (Nagasawa, 2006).

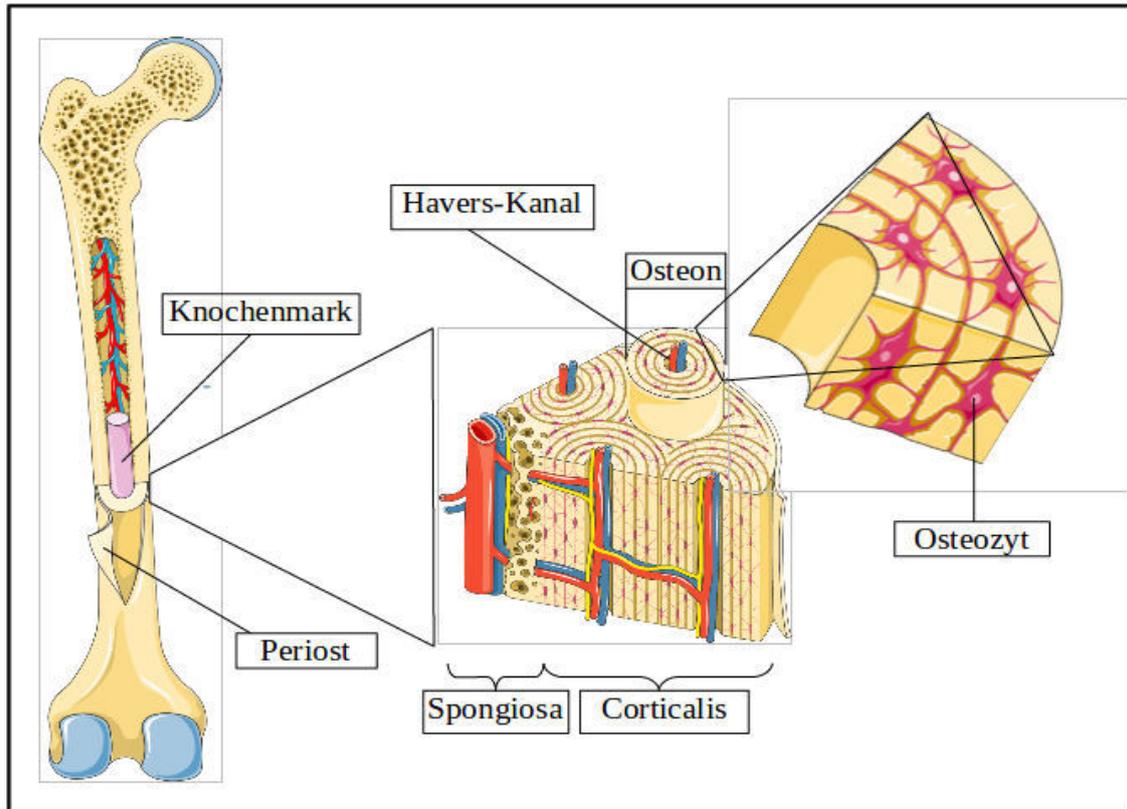


Abbildung 2: Architektur eines Röhrenknochens.

Lamellär angeordnete Osteozytenverbände bilden zusammen mit Gefäßen die Knocheneinheit eines Osteons. Viele Osteone finden sich in der Corticalis, der harten Mittelschicht des Knochens zwischen Periost und Spongiosa (Bartl, 2004). Graphik erstellt unter Verwendung von Materialien von <https://smart.servier.com/>.

Blickt man auf die Stoffe aus denen Knochen erbaut ist, liegt der organische Anteil bei etwa 30 % (Porter *et al.*, 2009). Dabei handelt es sich zum großen Teil um Kollagen Typ I und zu geringen Anteilen um Osteocalcin, Osteonectin und Osteopontin und zusätzliche Proteoglycane (Porter *et al.*, 2009). Für die Festigkeit des Knochens ist zusätzlich noch anorganisches Hydroxylapatit von großer Bedeutung. Diese Materialeigenschaften, physiologischen Gegebenheiten und anatomische Bauweise, ergeben die Basiseigenschaften, auf der Knochengewebe reproduziert werden kann.

## 1.6 Knochenstoffwechsel

Neben dem Aufbau des Knochens ist die Interaktion zwischen den Knochenzellen, den Osteoblasten und Osteoklasten, gemeinsam mit dem Immunsystem essentiell zur Steuerung der Knochenhomöostase (Boyce, 2013; Matsuo, 2009; Takayanagi, 2009). Verschiedene Proteine wirken stimulierend oder hemmend auf diverse Stoffwechsellaskaden. Die knochenaufbauenden Osteoblasten tragen beispielsweise auf ihrer Zelloberfläche das Protein RANKL, welches den Knochenaufbau fördert (Kohli und Kohli, 2011; Wright *et al.*, 2009). Wird jedoch RANKL von RANK, das von Osteoklasten Vorläuferzellen getragen wird, inhibiert, wird der Knochenaufbau gehemmt und zugleich die Differenzierung der Osteoklasten verstärkt (Choi, 2014.; Kohli und Kohli, 2011). Das lösliche Protein OPG kann mittels seines löslichen Decoy-Rezeptors ebenfalls an RANKL binden und die Knochenresorption verstärken, indem es die Osteoklastogenese stärkt (Kohli und Kohli, 2011). Einen Überblick über die vielfältigen Interaktionsprozesse soll Abbildung 3 geben.

Auch intrazellulär dirigieren Signalkaskaden entscheidende Prozesse des Knochenstoffwechsels. Über den WNT/ $\beta$ -Catenin-Weg wird die Osteoblastendifferenzierung entscheidend begünstigt, indem zahlreiche osteoblastische Gene hoch reguliert werden (Huang, 2007). Außerdem kann TGF- $\beta$  und davon besonders die Gruppe der knochenmorphogenetischen Proteine (= BMP) und Proteine der fibroblastischen Wachstumsfaktoren (= FGF) Signalkaskaden stimulieren, die den Knochenaufbau steuern (Huang, 2007).

Verschiedene Transkriptionsfaktoren stimulieren die Expression osteogener Gene. Intrazelluläre Proteine wie Runt-verknüpfter Transkriptionsfaktor 2 (= Runx 2), Osterix, Aktivierender Transkriptionsfaktor 4 (= ATF4) sind dabei entscheidende Mastergene (Huang, 2007; Kohli und Kohli, 2011). Besonders Runx 2 nimmt in der Regulierung eine Schlüsselstellung ein und wird unter anderem auch über die  $\beta$ -Catenin Kaskade stimuliert (Huang, 2007).

Ein entscheidendes Enzym für die Knochenaktivität ist die alkalische Phosphatase, welche neben dem Knochen auch von der Leber und der Plazenta produ-

ziert wird. Die alkalische Phosphatase ist dabei ein Marker der Differenzierung der Osteoblasten, der in der frühen Phase der Differenzierung einen Hochpunkt erreicht (Štefková *et al.*, 2015). Für ausdifferenzierte Knochenzellen dient die alkalische Phosphatase als Funktionsmarker (Christenson, 1997).

Die Messung der Aktivität der genannten Signalkaskaden ist für das tiefgreifende Verständnis der Aktivitäts- und Differenzierungsphase der Knochenzellen essentiell und das Zusammenspiel der Proteine und Signalwege ergeben ein vollständiges Bild des Knochenstoffwechsels, das zur Messung in wissenschaftlichen Untersuchungen herangezogen werden kann.

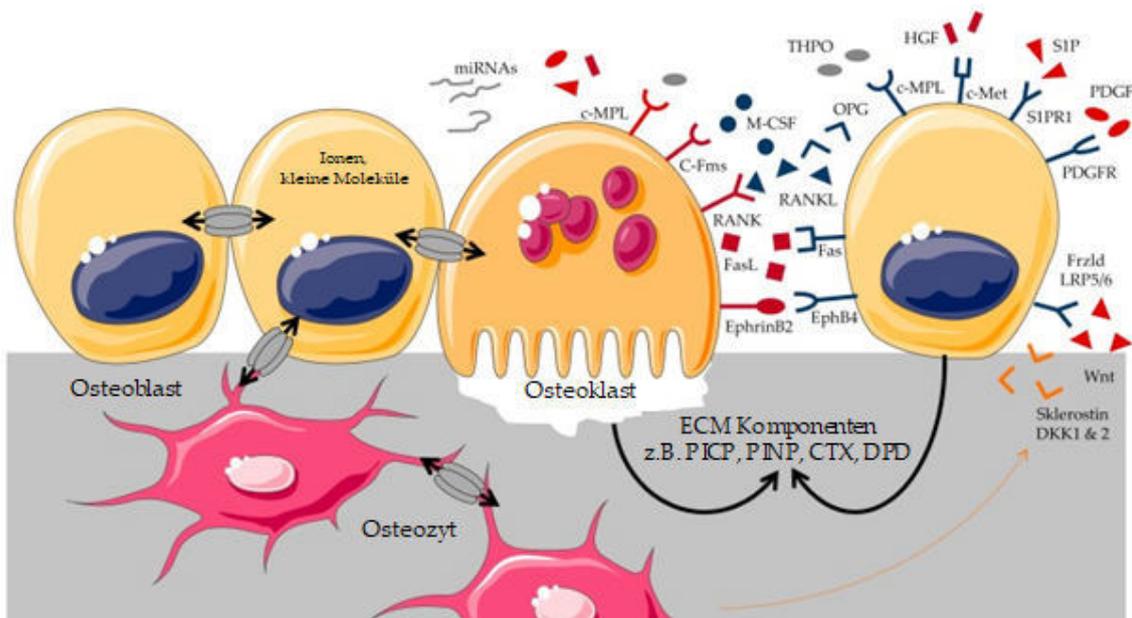


Abbildung 3: Darstellung der Interaktionsprozesse zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, die die Knochenhomöostase regulieren. Graphik modifiziert nach Zhu *et al.* (2018).

## **1.7 Tissue Engineering von Knochen**

Das Tissue Engineering des Knochens hat sich über die letzten Dekaden enorm entwickelt. Ziel ist es lebenden Knochen möglichst genau zu reproduzieren. Die Veränderungen lassen sich auch hier den drei Bereichen Trägermaterialien, Zellkultur und Umgebungsmilieu zuordnen.

### **1.7.1 Trägermaterialien beim Tissue Engineering des Knochens**

Bei den Trägermaterialien befindet man sich in einer fortgeschrittenen Entwicklungsphase, was man an den zahlreichen verschiedenen Materialien, die zum Einsatz kommen, erkennen kann (Polo-Corrales *et al.*, 2014). Hier konnte sich noch kein Material unangefochten durchsetzen.

Über die Zeit zeigten die Materialien aber stete Weiterentwicklungen, sodass sie sich technisch in drei Generationen unterteilen lassen (Henkel *et al.*, 2013): Die erste Generation der Materialien war gegenüber dem Knochen inert und biologisch inaktiv wie beispielsweise Titan (Polo-Corrales *et al.*, 2014). Die zweite Generation zeichnet sich dadurch aus, dass sie mit dem Gewebe interagiert und so beispielsweise biodegradibel und osteokonduktiv ist. Kollagen als Protein kann diese Eigenschaften beispielsweise erfüllen. Die dritte und damit neueste Generation hat das Ziel vom Gewebe nicht nur akzeptiert zu werden, sondern den Stoffwechsel aktiv zu unterstützen. Moderne Materialien enthalten daher Inhaltsstoffe, die osteoinduktiv wirken (Henkel *et al.*, 2013; Cowan *et al.*, 2005).

Als Trägermaterial dienen heute weiterhin viele Substanzen. Von der großen Gruppe der Polymere, die Kryogele, Alginate, Chitosan oder synthetische Polymere umfassen, über Keramiken, Kalzium-Phosphatverbindungen bis hin zu Metallen oder Titanverbindungen spannt sich ein weites Feld. Auch Produkte wie Kollagen, Seide und Korallen finden Verwendung (Chocholata *et al.*, 2019; Polo-Corrales *et al.*, 2014). In Tabelle 2 sind verschiedene Trägermaterialien aufgeführt.

Tabelle 2: Übersicht einer Auswahl verwendeter Materialien zur Herstellung von Scaffolds nach Polo-Corrales *et al.* (2014)

<b>Verwendete Scaffoldmaterialien</b>	<b>Beispiele</b>	<b>Referenzen</b>
Bioproteine	Albuminscaffolds Elastin als Scaffoldzutat Fibrinscaffolds Heparin als Scaffoldzutat Hyaluronsäure als Basiszutat für Scaffolds Kollagenscaffolds  Adhäsionspeptide als Scaffoldzutat	Li <i>et al.</i> , 2015 Liu <i>et al.</i> , 2017 Osathanon <i>et al.</i> , 2008 Liu <i>et al.</i> , 2017 Ström <i>et al.</i> , 2015  Aravamudhan <i>et al.</i> , 2013 Hersel <i>et al.</i> , 2003
Biopolymere	Chitosan als Scaffoldzutat Alginatscaffolds Scaffolds aus Seide	Peter <i>et al.</i> , 2010 Alnaief <i>et al.</i> , 2011 Park <i>et al.</i> , 2015
Dezellularisiertes Gewebe	Einsatz dezellularisierter Knochenmatrix für das Tissue Engineering	Cheng <i>et al.</i> , 2014
Gelatine	Gelatine als Scaffoldzutat	Peter <i>et al.</i> , 2010
Bioglas	Bioglas als Oberfläche zur Differenzierung von Knochenzellen	Kaufmann <i>et al.</i> , 2000
Hydroxylapatit	Scaffoldmischung mit Hydroxylapatit als Zutat	Peter <i>et al.</i> , 2010
Keramik	Keramik beim Bone Tissue Engineering	Deville, 2008
Kalzium-Phosphat-Verbindungen	Scaffolds auf Basis von Kalzium-Phosphat	Li <i>et al.</i> , 2014
Korallen	Korallenscaffolds im Tierversuch	Liu <i>et al.</i> , 2013
Metalle	Besiedelung von Titanscaffolds	Chen <i>et al.</i> , 2017
Synthetische Polymere: Polyglycolide, Polilactide, Polycaprolactone, Polyorthoester	Untersuchungen an Polycaprolacton Scaffolds	Tamjid <i>et al.</i> , 2013

Doch für die späteren Matrices ist nicht nur das Trägermaterial an sich, sondern auch dessen Herstellung und Zusammenmischung entscheidend. Hier existieren ähnlich viele Verfahren für die Herstellung wie Trägermaterialien selbst, wie Tabelle 3 zeigt. Neben thermischen Anwendungen, die zum Beispiel das Einfrieren oder Schmelzen eines Grundpulvers durch komplexe thermische Laser- oder Elektronenstrahlerhitzung umfassen, kommen Verfahren wie Electrospinning, verschiedene 3D-Drucktechniken und Formgebung durch Gasblasen zur Anwendung (Wubneh *et al.*, 2018). Die vielfältigen Herstellungsmethoden nutzen chemische und physikalische Reaktionsschritte, um als Produkt ein Trägermaterial hervorzubringen, dass in Formgebung und Beschaffenheit einem optimalen Produkt möglichst nahekommt. Auch auf Ebene der mechanischen Eigenschaften können hier Innovationen festgestellt werden. So konnte die Forschungsgruppe um Zhang *et al.* (2018) ein Trägermaterial entwickeln, dass nach Verformung wieder in seine Ursprungsform zurückkehrt. Dieser sog. *shape-memory* Effekt bewirkt, dass Trägermaterialien bei mikrochirurgischen Eingriffen durch kleine Öffnungen zum Defekt herangeführt werden können und sich dort wieder in ihre Ursprungsform ausdehnen und so den Defekt füllen.

Tabelle 3: Übersicht einer Auswahl von Herstellungsverfahren und Entwicklungen für die Scaffoldproduktion nach Wubneh *et al.* (2018)

<b>Herstellungsverfahren/ Werkzeugtool</b>	<b>Kurzbeschreibung</b>	<b>Beispiele/ Anwendung</b>	<b>Referenzen</b>
Additive Manufacturing	Überbegriff für Herstellungsverfahren, die dreidimensionales Endprodukt mittels Schicht-für-Schicht-Methode erzeugen	Selective Laser Sintering, Stereolithographie und Vat- Polymerisation	Ngo <i>et al.</i> , 2018; Wubneh <i>et al.</i> , 2018
Computer Aided Design	Programm, das Computer gesteuert Produktdesign entwickelt	Teilweise frei zugängliche Software für die Konstruktion von 3D-Objekten	www.freecadweb.org
Einfrier-/ Schmelzverfahren	Methoden, die mittels thermischer Anwendung chemische Reaktionswege der Polymerisation zur Materialerzeugung nutzen.	Herstellung von Kryogelen	Lozinsky und Okay, 2014
Electrospinning	Elektronisch geladenes Polymer wird im viskösen Zustand mittels elektrostatischer Kräfte Schicht für Schicht geformt	Herstellung eines Polylactid-Hydroxylapatit Scaffold mittels Electrospinning	Lao <i>et al.</i> (2011)
Gas-Schaumbildung	Amorphe Grundsubstanz wird mithilfe von Gas in Schaumzustand versetzt und ausgehärtet	Biodegradierbarkeit von Scaffolds nach der Gas-Schaumbildung Methode	Yoon und Park (2001)
Selectives Laser Sintering	Laser bringt Basispulver in Schicht-für-Schicht-Methode zur Anein-	Produktion von Scaffolds mittels Selective Laser Sintering	Williams <i>et al.</i> (2005)

	anderlagerung und Bildung spezifischer interpartikulärer Abstände		
Stereolithographie	Mittels Laser und Auskühlen können in einer Flüssigkeit nach Schicht-für-Schicht-Methode Objekte konstruiert werden	Herstellung von Scaffolds mittels Stereolithographie	Kim <i>et al.</i> (2010)
Vat Photopolymerisation	Löst mittels Licht Polymerisation der Grundsubstanz aus	Produktion und Eigenschaften von Scaffolds mittels Vat- Polymerisation	Ng <i>et al.</i> (2020)
3D-Druck	Drucken eines Objekts im dreidimensionalen Raum	Herstellung von Scaffolds aus Polymeren und Keramiken	Wang <i>et al.</i> (2020)

Um ein geeignetes Trägermaterial zu entwickeln, bedarf es also eines geeigneten Grundmaterials und einer Herstellungsmethode, die ein Produkt hervorbringt, das in den Dimensionen Bioreagibilität, Zell-Matrixkommunikation und physikalischen Eigenschaften den Ansprüchen gerecht wird (Amini *et al.*, 2012).

### 1.7.2 Zellkultur und mesenchymale Stammzellen

Neben der Frage des Trägermaterials sind parallel die Zellen zur Besiedelung zu gewinnen und kultivieren. Hier sind dem Spender für jedes Zielgewebe die entsprechenden Zellen zu entnehmen und zu vermehren, wobei verschiedene Zelltypen Verwendung finden können. Osteoblasten als die am weitesten entwickelten Zellen bieten hierbei den Vorteil direkt einen knochenspezifischen Stoffwechsel zu betreiben. Allerdings geht deren Gewinnung immer mit Knochenmaterialverlust an anderer Stelle einher und insgesamt ist deren Überlebensrate in Kultur begrenzt (Jayakumar und Di Silvio, 2010). Auf der Gegenseite haben pluripotente Stammzellen das vielfältigste Entwicklungspotential. Pluripotente Stammzellen haben sich als mögliche Zelle für das Tissue Engineering erwiesen, da sie in Osteoblasten differenziert werden konnten (Lou, 2015). Dennoch müssen nach dem Autor die Differenzierungsprotokolle noch verbessert werden und möglicherweise besteht bei diesen Zellen ein höheres Risiko für Entartung von Zellen. Als dritter Zelltyp können mesenchymale Stammzellen verwendet werden. Diese sind der am meisten verwendete Zelltyp und zeigen ein hohes Differenzierungspotential auf (Wei *et al.*, 2013). Mesenchymale Stammzellen finden sich in vielerlei Gewebe und die Wahl des Gewinnungsorgans hat einen Einfluss auf die Teilungsfähigkeit und Aktivität (Niemeyer *et al.*, 2010). Verschiedene Autoren weisen hier beispielsweise die Überlegenheit der mesenchymalen Zellen, die aus dem Knochenmark gewonnen werden, hinsichtlich Knochenneubildung nach (Liao, 2014; Niemeyer *et al.*, 2010; Shafiee *et al.*, 2011). Allerdings ist dieser Gewinnungsmechanismus aufwendiger, risikoreicher und weniger ertragreich als aus dem Fettgewebe und deshalb sehen andere Autoren den Entnahmeort aus dem Fettgewebe überlegen, auch weil sich hier die Zellen deutlich schneller teilen (Ehnert *et al.*, 2011; Liao, 2014). Hier lassen sich durch einen kleinen Eingriff sehr viele Stammzellen gewinnen und das Reservoir ist in der Regel weniger begrenzt im Vergleich zum Knochenmark (Ehnert *et al.*, 2011). Daher werden auch Ad-MSCs, also adipogene mesenchymale Stammzellen für Versuche mit Knochenzellen regelmäßig verwendet (Seong *et al.*, 2010). Doch auch hier zeigt sich ein großer Unterschied der Entnahmestelle, denn Fettgewebe des Abdomens und der Hüfte und des Oberschenkels

weist bessere osteogene Eigenschaften als Ad-MSCs des Knies oder des Unterschenkels (Reumann *et al.*, 2018). Im vorliegenden Projekt wurden Ad-MSCs verwendet, die überwiegend dem Bauchfett entstammten. Außer der Frage der jeweiligen Stammzelle und des Entnahmeortes ist zuletzt auch der Gesundheitszustand und das Alter des Spenders von signifikanter Bedeutung (Kim *et al.*, 2012). So konnten verschiedene Autoren zeigen, dass mit zunehmenden Alter die Fähigkeit der Proliferation und Differenzierung abnimmt (Choudhery *et al.*, 2014; Stolzing *et al.*, 2008). Gleichzeitig zeigen Liu und Rando (Liu und Rando, 2011) auf, dass diese altersbedingten Veränderungen noch keineswegs vollständig verstanden und womöglich, zumindest teilweise, reversibel sind. Somit könnten auch Stammzellen älterer Patienten unter entsprechender Behandlung ein ausreichendes Teilungspotential entfalten. Und nicht nur das Patientenalter, sondern auch Vorerkrankungen und körperliche Leistungsfähigkeit des Spendenden haben einen enormen Einfluss auf die Mitoserate und das osteogene Differenzierungspotential der Zellen (Wilson *et al.*, 2010).

## 1.8 Dreidimensionale Kulturbedingungen

Mit Beginn der Zellkulturen beschränkte man sich lange Zeit auf die Kultur in zweidimensionalen Kulturplatten. Diese Form der Kultur ist zwar deutlich leichter in der Handhabung und kostengünstiger, spiegelt jedoch die physiologischen Bedingungen sehr schlecht wider, da gerade für Knochenzellen die dreidimensionale Anordnung, Kommunikation mit der Umgebung und mechanische Belastung essentiell sind (Griffith und Swartz, 2006; Pampaloni *et al.*, 2007). Die Fertigung von 3D-Trägermaterialien war daher ein naheliegender Fortschritt. 3D-Trägermaterialien bilden ein Grundgerüst, auf dem sich Zellen im Raum dreidimensional ansiedeln können. Dieses Gerüst wird dabei aus der Englischen Fachsprache stammend Scaffold genannt.

Allerdings bringen diese 3D-Kulturen auch ein deutlich höheres Maß an Komplexität mit sich (Bouet *et al.*, 2015). Nun liegen Zellen nicht mehr nur an der Oberfläche, sondern auch im Trägermaterial und haben auch hier das Bedürfnis mit Nährstoffen versorgt zu werden. Die Diffusion oder auch Perfusion muss aufgrund mehrerer Zellschichten und Binnenlagen im Scaffold neu organisiert werden (Rouwkema *et al.* 2008). Außerdem gibt es in einer 3D-Kultur mit dem Trägermaterial einen ganz neuen Akteur, der Messverfahren verändern und stören kann, da das Trägermaterial potentiell mit dem Messreagenz reagieren kann. Der 3D-Träger bindet, dadurch, dass er sich oft schwammartig verhält, Flüssigkeit, was Messverfahren ebenfalls verzerren kann. Und nicht zuletzt ist das zusätzliche Fremdmaterial eine neue Kontaminationsquelle, welche bei 2D-Kulturen noch nicht vorhanden war.

## 1.9 Strategie im vorliegenden Projekt

Im vorliegenden Projekt sollten mesenchymale Stammzellen, die dem Fettgewebe entstammen auf einem Trägermaterial dreidimensional kultiviert und differenziert werden und auf die Eignung als Knochenersatzmaterial geprüft werden. Als Vergleich soll eine zweidimensionale Kultur Unterschiede deutlich machen.

Bei der Wahl eines Trägermaterials fiel die Entscheidung auf ein Material aus der Gruppe der Polymere. Genauer auf die Subgruppe der Kryogele, da diese zuletzt besonders überzeugten. Bei Kryogelen – oder ohne den Produktionsschritt des Einfrierens Hydrogele genannt – handelt es sich um 3D-Netzwerke aus Polymeren, die eine gelartige Substanz ausbilden (Lozinsky und Okay, 2014). Bei Kryogelen nutzt man den Effekt, dass sich beim Einfrierprozess Eiskristalle bilden, während die Substanz herum auspolymerisiert und dadurch eine stabile Matrix bildet. Nach erneutem Auftauen kann das nun zu Wasser geschmolzene Eis aus dem Produkt austreten und die beim Einfrierprozess gebildeten Strukturen bleiben als Poren bestehen, wie in Abbildung 4 zu sehen ist. Kryogele eignen sich mitunter deshalb besonders gut, da man die physikalischen Eigenschaften wie Steifigkeit gut verändern kann und das Endprodukt oft sehr gute Formeigenschaften und Biokompatibilität aufweist. Die Herstellung von Kryogelen ist technisch vergleichsweise einfach, sodass hier keine teuren Apparaturen zur Herstellung erforderlich sind (Hixon *et al.*, 2017).

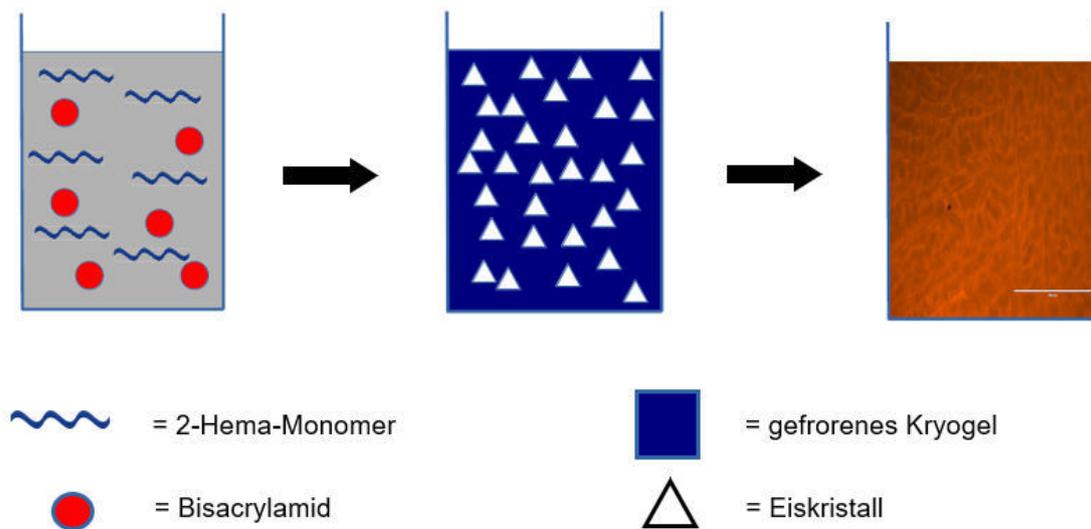


Abbildung 4: Prozess der Kryogelierung. Nach Start der Polymerisation und Einfrieren entstehen eisgefüllte Hohlräume, die späteren Poren (Ström *et al.*, 2015).

Die verwendeten Kryogele wurden wie in Tabelle 4 beschrieben hergestellt und um je eine Zutat erweitert, sodass vier verschiedene Kryogeltypen entstanden.

Scaffold PRP enthielt plättchenreiches Plasma (PRP), das aus Blutproben gewonnen wurde, indem nach Zentrifugation der gesamten Blutprobe der gelbliche Plasmaüberstand entnommen wurde. In PRP enthalten sind beispielsweise Zytokine, von denen man sich einen osteoinduktiven Effekt und eine bessere Akzeptanz des Materials von den Zellen erhofft (Arpornmaeklong *et al.*, 2004). Ein Nebeneffekt hierbei war, dass es sich um einen patienteneigenen Zusatzstoff handelte, was eine bessere Akzeptanz am Patienten erhoffen lässt.

Ähnlich lag die Theorie beim immunzellkonditionierten Medium (IKM) und dessen Scaffold IKM (Champagne *et al.*, 2002). Hierbei handelte es sich um das Medium einer inkubierten THP-1 Zelllinie, die aus Zellen einer akuten monozytären Leukämie gewonnen wurden. THP-1 Zellen wurden in Medium kultiviert und anschließend abzentrifugiert, sodass lediglich das Medium der THP-1 Zellen ergänzt um sezernierte Stoffe der THP-1 Zellen als Zusatzstoff im Scaffold verwendet wurde (Tsuchiya *et al.*, 1980).

Ein weiteres Scaffold war das Scaffold Koll, stehend für den Zusatzstoff Kollagen. Das Kollagen wurde aus Rattenschwänzen gewonnen (Ehrmann, 1956; Knobloch *et al.*, 2012). Da Kollagen den wesentlichen Proteinanteil in Knochenmaterial ausmacht (Clarke, 2008), wurde die Eignung als Zusatzstoff im Kryogel überprüft.

Im vierten und letzten Scaffold RGD wurden als Proteinzusatzquelle synthetisch hergestellte RGD-Peptide hinzugefügt. RGD-Peptide sind für die Zelladhärenz in verschiedenen Zellvorgängen von großer Bedeutung (Bellis, 2012; Bilem *et al.*, 2016; Huettner, 2018). Zwar gibt es hier einen großen Variantenreichtum von Aminosäuresequenzen für Zelladhärenz, im vorliegenden Fall wurde jedoch auf die ursprünglichste Aminosäuresequenz, die Sequenz RGD, abkürzend für Arginin, Glycin und Asparaginsäure, zurückgegriffen. Ziel dieses Zusatzstoffes war es, dass RGD als Adhäsionsprotein an der Materialoberfläche der Scaffolds vorliegt, sodass Stammzellen nach der Aussaat besser adhären und mit dem Material interagieren können.

### **1.10 Ziel der Arbeit: Welche Kultur liefert die besten Bedingungen?**

Das Ziel des vorliegenden Projekts war es vier verschiedene Scaffoldtypen physikalisch zu charakterisieren, um Auskunft über deren Eignung als Knochenersatzmaterial zu erhalten. Als Messparameter sollten dabei die Porengröße, Steifigkeit und Porosität dienen. Anschließend sollten die Scaffolds mit AdMSCs, die aus humanen Spendern der Berufsgenossenschaftlichen Klinik Tübingen (BG Klinik Tübingen) gewonnen wurden, besiedelt werden. Dabei galt es herauszufinden, ob die Zellen auf den jeweiligen 3D-Strukturen besser kultiviert werden können, als vergleichend in herkömmlicher 2D-Kultur und welche Kultur innerhalb der vier Typen die günstigsten Eigenschaften für die Knochenbildung aufweist. Als Messparameter dienten dabei das Zellüberleben und das Besiedlungsmuster, der Glukoseverbrauch, die Zellaktivität und die Produktion spezifischer Proteine. Final wurden die Eigenschaften der Scaffolds nach Differenzierung der Stammzellen durch Bestimmung der Mineralisierung und Steifigkeit erhoben.

Mittels Zytokinarrays wurden die Zytokinspiegel von PRP und IKM verglichen, um einen Einblick zu gewinnen, welche Zytokine besonders positive Effekte auf die Zelldifferenzierung haben.

Die Kultur mit den erfolgversprechendsten osteogenen Eigenschaften sollte identifiziert werden, um dem Ziel eines optimalen Knochenersatzmaterials näher zu kommen.

## 2. Methoden

Die verwendeten Materialien sind im Anhang aufgeführt.

### 2.1 Herstellung vier verschiedener Kryogele

Im vorliegenden Versuchsaufbau wurden vier verschiedene Kryogele nach dem Schema von Tabelle 4 produziert und auf ihre Eignung als Scaffoldmaterial geprüft. Die Rezeptur und Zusammensetzung ist das Ergebnis von Vorarbeiten des Siegfried-Weller-Instituts. Allen Kryogelen lag die grundlegende Reaktion einer radikalischen Polymerisation von 2-Hydroxyethyl-methacrylat (= HEMA) mit Bis-Acrylamid in einer wässrigen Lösung zugrunde. Charakteristisch für jedes der vier Kryogele ist die Zugabe von entweder PRP, Rattenschwanz-Kollagen, IKM oder die Zugabe von RGD-Peptiden.

PRP wurde durch venöse Blutabnahme in EDTA-Röhrchen von freiwilligen Spendern gewonnen. Das Plasma wurde durch dreimalige Zentrifugation für 10 min bei 800 x g und anschließendes Verwerfen des Pellets von den zellulären Anteilen getrennt und anschließend bei -18 °C gelagert. PRP zeichnet sich durch einen hohen Zytokingehalt aus, der die osteogene Differenzierung später unterstützen könnte (Arpornmaeklong *et al.*, 2004).

Kollagen (Koll) wurde aus dem Schwanz von Ratten gewonnen (Knobeloch *et al.*, 2012), indem dessen Sehnen extrahiert und über Nacht in UV-Licht getrocknet wurden. Danach wurden sie für weitere 48 h in Essigsäure eingelegt, um das Kollagen herauszulösen. Die Lösung wurde durch eine Mullkompressen gefiltert und zum herausgefilterten Kollagen wurden pro 2,5 g Kollagenmasse 1 l Essigsäure (1 %-ig in H<sub>2</sub>O) hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung direkt verwendet oder bei 4-8 °C im Kühlschrank gelagert. Kollagen ist das Protein mit dem größten Anteil in der Knochenmatrix und für die Knochenstruktur maßgeblich.

Konditioniertes Medium (IKM) wurde aus THP-1 Zellen und einem RPMI-Medium gewonnen. Die Zusammensetzung des Mediums bestand aus einem RPMI-1640 Medium, 1 % Penicillin/Streptomycin und 5 % fetales Kälberserum. 13 ml

dieses Mediums wurden mit  $4 \cdot 10^5$  THP-1 Zellen pro ml Medium für 48 h inkubiert. Nach Umfüllen der inkubierten Zell-Suspension in ein Reaktionsgefäß und dreimaliger Zentrifugation für 10 min bei  $800 \times g$ , Abfüllen des Überstands und dessen erneute Zentrifugation und Abfüllung, entstand das konditionierte Medium, welches bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert wurde. IKM zeichnet sich ähnlich wie PRP durch ein hohes Maß an Zytokinen aus (Tsuchiya *et al.*, 1980), jedoch mit einem anderen Mix. Der Vergleich zwischen PRP und IKM wird daher von besonderem Interesse sein.

Für die Herstellung des RGD-Scaffolds wurden synthetisch hergestellte RGD-Peptide der Firma Bachem verwendet, wobei es sich um die reine Aminosäuresequenz RGD (Arginin, Glycin, Asparaginsäure) handelte, nicht eingebettet in eine längere Sequenz. Die Konzentration der RGD-Peptide pro Scaffold wurde an den Versuchsaufbau von Macková *et al.* (Macková *et al.*, 2016) angepasst, bei welchem 0,0536 % des Scaffolds gebundenes RGD war. Dies wurde auf den vorliegenden Versuchsaufbau übertragen, indem eine 4 mM Stocklösung der Peptide mit Wasser angesetzt wurde und diese Lösung in die Rezeptur integriert wurde. In der Endlösung liegt Glutaraldehyd etwa 50-fach im Überschuss gegenüber den RGD-Peptiden vor.

Nach Mischen der Scaffold-Grundzutaten wurden die Mixturen für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde ein 0,3 M Di-Natrium-hydrogen-Phosphat-Puffer als Phosphatquelle hinzugegeben, der in der späteren Reaktion mit Kalzium knochenähnliche Wandstrukturen bilden soll. Dann wurde die radikalische Polymerisation folgendermaßen gestartet: Zunächst wurde APS mit einer Endkonzentration (= EK) von 0,2 % als Starter und TEMED (EK 0,2 %) als Katalysator unter einer Abzugshaube hinzugegeben. Nach Beimischung von Glutaraldehyd zur Quervernetzung der Proteine und Polymere wurde der Ansatz sofort in Gussformen gegeben. Die Proben wurden sofort in einer Kühltruhe bei  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert um zu gewährleisten, dass sich vor der Polymerisation der Scaffoldbestandteile die für das Kryogel notwendigen Eiskristalle bilden können.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Kryogele

Substanz	Konz. Stocklösung	PRP	Koll	IKM	RGD
HEMA	97,00 %	1320 µl	1320 µl	1320 µl	1320 µl
Bis-Acrylamid	2,00 %	1320 µl	1320 µl	1320 µl	1320 µl
Natrium-Phosphat Puffer	1,0 M	2400 µl	2400 µl	2400 µl	2400 µl
PRP	2,5 g/l	800 µl			
Kollagen aus Rattenschwänzen	2,5 g/l		800 µl		
IKM	5,00 %			1600 µl	
RGD Peptide	4 mM				400 µl
H <sub>2</sub> O		1952 µl	1952 µl	1152 µl	2352 µl
Glutaraldehyd	25,00 %	32 µl	32 µl	32 µl	32 µl
APS (10%)	10,00 %	160 µl	160 µl	160 µl	160 µl
TEMED	99,00 %	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl
<b>Volumen Ansatz</b>		8000 µl	8000 µl	8000 µl	8000 µl

## 2.2 Herstellung und Charakterisierung der Scaffolds (vgl. Häussling *et al.*, 2019)

Nach einer Nacht in der Tiefkühltruhe bei -18 °C wurden die Kryogele für eine Stunde bei -80 °C weiter heruntergekühlt, um Schneidvorgänge zu erleichtern. Anschließend wurden die Kryogele mit einem Metallstift aus der Gussform gedrückt. Das herausgedrückte Kryogel wurde mittels Hobels bestehend aus einer Rasierklinge und einer Apparatur zur Befestigung, wie in Abbildung 5 zu sehen, in 1,5 mm hohe Scheiben geschnitten. Durch diesen Schneidvorgang wurden aus den gegossenen Stiften einzelne Scaffolds mit einem Durchmesser von 6 mm, wie in Abbildung 6 zu sehen. Nach weiteren 24 h der Inkubation der Scaffolds in einem Bad bestehend aus 1 M Kalzium-Chlorid in H<sub>2</sub>O entstand mittels externer Kristallisation Hydroxylapatit.

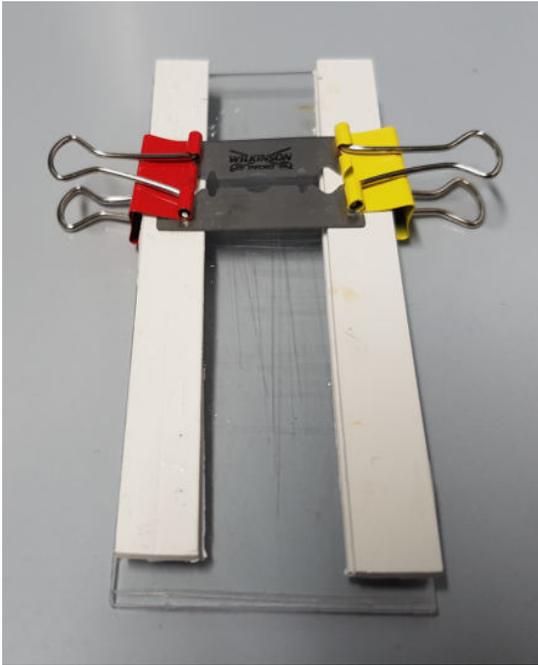


Abbildung 5: Schneideapparat zum Schneiden der Scaffoldstifte in 1,5 mm hohe Scheiben.

Foto aus dem Siegfried-Weller-Institut.



Abbildung 6: Gegossenes Kryogel nach Polymerisation.

Links als gegossenes Gel und rechts fertige Scaffolds im Wasserbad. Foto aus dem Siegfried-Weller-Institut.

Danach waren die Scaffolds bereit zur Charakterisierung. Bei nicht direkter Verwendung der Scaffolds wurde das Kalzium-Chlorid-Bad durch ein Wasserbad ausgetauscht, in dem die Scaffolds mehrere Tage haltbar sind. Der erste Verwendungsschritt der Scaffolds war die Charakterisierung. Die im Folgenden beschriebene durchschnittliche Porengröße, Porosität und das E-Modul stellen dabei die Parameter dar, die die wichtigsten physikalischen Eigenschaften widerspiegeln.

### 2.3 Bestimmung der Porengröße

Zur Bestimmung der Porengröße wurden die Scaffolds mit verdünnter SRB-Lösung (=Sulforhodamine B) gefärbt (Konzentration: 5 % SRB in H<sub>2</sub>O) und anschließend mit Wasser ausgewaschen. Da die Scaffolds teils eine Eigenfluoreszenz aufwiesen, wurde auf diesen Färbeschritt bei ausreichender Bildqualität verzichtet. Anschließend wurden mittels Fluoreszenzmikroskop Bilder der Scaf-

folgs aufgenommen (siehe Abbildung 7), von denen mittels Image J die Porengröße bestimmt wurde. Dabei wurden für jede der 3 Gussserien je 3 Scaffolds ausgewertet und pro Scaffold von einem Bild 10 Poren vermessen, insgesamt also 90 Poren. Die durchschnittliche Porengröße ließ sich dabei über zwei Wege näherungsweise bestimmen: Einerseits wurde die Fläche der Poren planimetrisch vermessen und unter der Annahme, dass sie näherungsweise einer Kugel beziehungsweise im 2D-Bild einem Kreis entspricht, konnte aus der Kreisformel ( $A=\pi*r^2$ ) der Radius und damit der durchschnittliche Porendurchmesser bestimmt werden. Auf alternativem Wege ließen sich mittels Image J aus der vermessenen Pore der maximale und der minimale Durchmesser bestimmen. Mittelt man diese beiden Werte, erhält man auf viele Poren gerechnet ebenfalls einen Näherungswert der durchschnittlichen Porengröße (vgl. Häussling *et al.*, 2019).

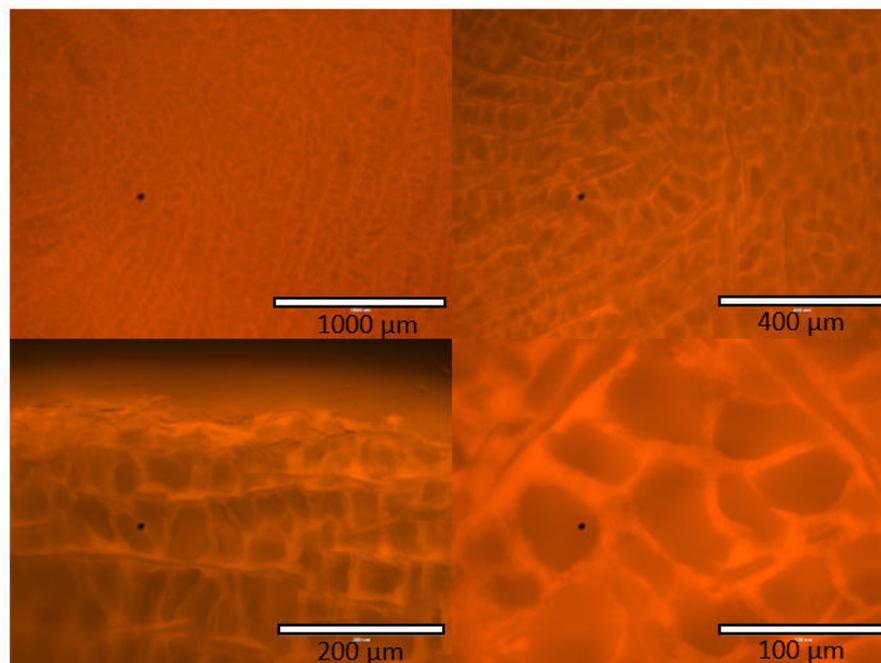


Abbildung 7: Porenübersicht eines Kollagenscaffolds im Fluoreszenzmikroskop. Links-oben 40-fach, rechts-oben 100-fach, links-unten 200-fach und rechts-unten 400-fach vergrößert.

## 2.4 Bestimmung der Porosität (vgl. Häussling *et al.*, 2019)

Die Porosität beschreibt den Hohlraum eines Volumens im Verhältnis zum Gesamtvolumen. Während die Porengröße also die Größe einer einzelnen Pore aufzeigt, gibt die Porosität eine Aussage über den gesamten Hohlraum eines Scaffolds an. In der Literatur werden verschiedenste Verfahren eingesetzt, um die Porosität zu bestimmen (Karageorgiou und Kaplan, 2005). Eine Methode besteht darin, aus der Dichte des Scaffolds und aus der Dichte der verwendeten Materialien die Porosität abzuleiten. Ein anderer Ansatz misst die Porosität durch mit Druck eingebrachtem Quecksilber und Bestimmung des Volumens, das dieser einnehmen kann. Ein dritter Ansatz nutzt lediglich Volumenmessungen durch eine nicht-wasserlösliche Flüssigkeit, die in die Hohlräume gefüllt wird (Karageorgiou und Kaplan, 2005; Loh, 2013). Im vorliegenden Projekt wurde aufgrund ihrer Einfachheit eine andere Methode verwendet, um das Verhältnis von Hohlraum zu Feststruktur zu vergleichen.

Nach der Formel

$$\text{Wasseraufnahmekapazität} = \frac{\text{Nassgewicht} - \text{Trockengewicht}}{\text{Nassgewicht}}$$

ergibt sich das Verhältnis von Wasseranteilen zum Gesamtgewicht im Nasszustand. Da sich das Wasser zu sehr großen Teilen in den Poren befindet, kann man sich durch dieses Verhältnis dem Hohlraum annähern. Dieser Wert wird in der Literatur auch Wasseraufnahmekapazität genannt (Park *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2012). Ein Wert von beispielsweise 10 % beschreibt also, dass ein Zehntel des Scaffoldgesamtgewichts Wasser ist. Unter der Annahme, dass Wasser zu sehr großen Teilen in den Poren vorliegt, lässt sich die Porosität abschätzen.

Zur Bestimmung des Nass- und Trockengewichtes wurde von 5 Gussserien je 3 Scaffolds einmal nass und nach 48 h Trockenzeit im Exsikator gewogen. Die erhaltenen Werte wurden entsprechend der Formel zur Bestimmung der Wasseraufnahmekapazität eingesetzt und für jeden Scaffoldtyp gemittelt.

## 2.5 Bestimmung des E-Moduls eines Scaffold

Das E-Modul (= E) stellt den Zusammenhang von Spannung und Dehnung unter Einfluss eines bestimmten Drucks dar. Unterscheiden kann man hier einen ersten Bereich plastischer Verformung gefolgt von einem linear verlaufenden Bereich der Elastizität. Bei steigendem Druck wird dieser letzten Endes wieder von einem Bereich erneuter plastischer Verformung abgelöst. Besonders relevant ist nun der Bereich der Elastizität, da aus der Steigung der Kraft-Dehnungskurve nun das E-Modul errechnet werden kann. Das E-Modul ist ein wichtiger Materialkennwert, der den Zusammenhang zwischen Spannung und Dehnung bündelt (Li und Aspden, 1997; Turner und Burr, 1993).

Für die Erstellung der Kraft-Dehnungskurve wurden Scaffolds mit einer Höhe von etwa 0,8 cm und einem Radius von 0,6 cm erstellt. Zur Messung der Kraft-Dehnungskurve wurde die Zwick-Maschine ZwickiLine Z 2.5TN der Firma Röll verwendet. Hierbei wurden Scaffolds auf das Messfeld aufgelegt und unter einer Vorkraft von 0,1 N die Verformung bis 80 % der Ausgangshöhe in der Kraft-Dehnungskurve dargestellt. Dies wurde mit Scaffolds aus 5 Gusserien durchgeführt. Für die weitere Auswertung wurden nur Werte aus dem Bereich des linearen Anstiegs der Kurve verwendet. Aus diesen Werten wurde anschließend mittels der Formel

$$E = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{l}{l_0}}$$

das E-Modul berechnet. F beschreibt die zu einem Messpunkt aufgebrachte Kraft, A die Scaffoldfläche, l die Dehnung des Scaffold zu einem bestimmten Messpunkt und  $l_0$  die Ausgangshöhe des Scaffold. Die Ausgangshöhe  $l_0$  und Scaffoldfläche bleiben bei der Messung konstant und die Kraft und Dehnung bilden die Variablen. Aus den erhobenen Messwerten ließ sich eine Kraft-Dehnungskurve bilden.

Das E-Modul gibt somit Auskunft über die Steifigkeit der Scaffolds (Ruoß *et al.*, 2018). Dieser Wert ist einerseits für die grundsätzliche Charakterisierung der vier Scaffolds von Interesse, andererseits für den Vergleich vor und nach Besiedelung. So kann im Verlauf untersucht werden, ob sich die Steifigkeit beispielsweise durch Produktion von Knochenmatrix oder durch andere Einflüsse ändert. Bei der statistischen Auswertung wurden die ermittelten Steifigkeitswerte der unabhängigen und abhängigen Versuchsansätze gemittelt und für jeden Scaffoldtyp in Gegenüberstellung dargestellt.

## **2.6 Lagerung & Verarbeitung von Scaffolds**

Bevor die Scaffolds besiedelt wurden, erfolgten Wasch- und Desinfektionsschritte zur Sterilisation. Die Scaffolds wurden dazu in 70 %-iger Ethanollösung für 24 h desinfiziert. Danach wurden die Scaffolds mehrmals mit sterilem PBS (= Phosphat- gepufferte Saline) gewaschen, um Ethanolrückstände möglichst vollständig zu beseitigen. Die Scaffolds wurden nach dem Waschen in sterilem PBS gelagert. Zur Trocknung und damit besseren Handhabbarkeit in der Verarbeitung wurden in diesem Projekt wurden zwei Verfahren getestet: Einerseits eine einfache Trocknung im Exsikator für etwa 48 h bei 45 °C und andererseits eine Gefriertrocknung (vgl. Nie *et al.*, 2012). Vorteil der Trocknung im Exsikator ist der geringe Aufwand, wobei die Scaffolds teils ihre Form verändern und es im Vergleich zum zweiten Verfahren länger dauert bis sie die ursprüngliche Form wieder annehmen. Die Gefriertrocknung stellt das aufwendigere Verfahren dar, wobei das Scaffold jedoch seine Form behält und die Rehydratisierung nach etwa 40 Sekunden abgeschlossen ist. Dazu wurden die Scaffolds tiefgefroren und in einem externen Labor des biochemischen Instituts der Universität Tübingen gefriergetrocknet.

## **2.7 Isolation von Ad-MSC**

Die Isolation von Ad-MSC erfolgte aus Fettgewebeentnahmen von Patienten der BG Klinik Tübingen. Die Probeentnahme erfolgt gemäß dem positiven

Ethikvotum (539/2016BO2) nach vorheriger ärztlicher Aufklärung und schriftlicher Zustimmung der Patienten, wobei infektiöse und nicht-einwilligungsfähige Patienten ausgeschlossen wurden. Das für die Versuche verwendete Patientenkollektiv bestand hierbei aus drei Patienten im Alter zwischen 51 und 58 Jahren, wobei es sich um zwei Frauen und einen Mann handelte (siehe Tabelle 5). Vor Ort wurde die Gewebeprobe zu Beginn unter sterilen Bedingungen auf einer Werkbank mittels zwei Skalpelln in einer Petrischale in 2 mm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten und mehrmals mit PBS gewaschen. Gewebe- und Blutreste wurden zwischen den Waschschritten für je 10 min bei 800 x g abzentrifugiert und das sich in der oberen Phase befindliche Fettgewebe in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Nach dem Waschen wurden pro ml Gewebevolumen 0,7 mg Kollagenase Typ II in 1 ml PBS gelöst und über einen Sterilfilter zum Gewebe hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Kollagenase wurden Kollagenverbindungen gelöst und die Ad-MSCs gingen in Lösung. Daraufhin wurde die Wirkung der Kollagenase durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium (DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 10 %-igem fetalem Kälberserum (= FCS) gestoppt und sorgfältig durchmischt. Anschließend wurde die Flüssigkeit bei 600 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand danach entfernt. Das Pellet wurde in Medium gelöst und in einer Kulturflasche zusammen mit einer Antibiotikumlösung aus Penicillin und Streptomycin (EK 1 %) und FCS (EK 10 %) bei 37 °C kultiviert.

Tabelle 5: Übersicht der Spenderinformationen

<b><u>Spender</u></b>	<b><u>Alter</u></b>	<b><u>Geschlecht</u></b>	<b><u>BMI</u></b>	<b><u>Raucher</u></b>	<b><u>Diabetes</u></b>
1	58	männlich	19,7	nein	nein
2	51	weiblich	27,7	nein	nein
3	56	weiblich	31,1	ja	nein

## **2.8 Herstellung des Kulturmediums**

Für die Kultivierung der Ad-MSCs wurde ein Kulturmedium aus 500 ml DMEM, 50 ml FCS (EK 10 %) und 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (EK 1 %) hinzugefügt (vgl. Seeliger *et al.*, 2013). Nach dem Ansetzen wurde das Medium nach 24 h auf Sterilität getestet und nachfolgend nur keimfreies Medium verwendet.

## **2.9 Kultivieren und Passagieren von Ad-MSC**

Das Medium wurde einmal wöchentlich auf Sterilität getestet und die Zellen auf Kontaminationen überprüft. Sobald eine Kulturflasche vollständig besiedelt war, wurde diese in die nächste Passage überführt, indem die Zellen in einem Verhältnis von maximal 1 zu 5 gesplittet wurden (vgl. Reumann *et al.*, 2018; Seeliger *et al.*, 2013). Für den Vorgang des Splittens wurde das Medium abgesaugt und durch PBS ersetzt. Nach 5 min Inkubation wurde das PBS wiederum abgesaugt. Um die adhärenierten Zellen vom Flaschenboden zu lösen, wurden je nach Flaschengröße 0,5 ml bzw. 1 ml oder 2 ml Trypsin/EDTA (= Ethylendiamintetraessigsäure; EK 10 %) hinzugegeben und für weitere 5 min inkubiert. Sobald sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, wurden sie in Medium gelöst in ein Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Pellet in Kulturmedium resuspendiert und auf die neuen Flaschen aufgeteilt wurde. Diese Teilungsvorgänge wurden wiederholt bis ausreichend Zellen in Passage 3 vorhanden waren.

## **2.10 Qualitätssicherung der kultivierten Ad-MSC**

Zur Qualitätssicherung der kultivierten Zellen wurde eine Kontrolle nach Dominici durchgeführt (Dominici *et al.*, 2006). Die Qualitätskriterien, welche das Vorhandensein einer reinen Stammzellkultur nahelegen, bestehen hierbei erstens in der Fähigkeit der Zellen auf Plastik zu adhärenieren, zweitens der phänotypischen Expression von spezifischen CD Markerproteinen (CD105, CD73, CD90) und drittens der Fähigkeit sowohl chondrogen, als auch adipogen und osteogen zu differenzieren. Darüber hinaus sollen die Zellen negativ für die Markerprotei-

ne CD45, CD34, CD14 CD19 und HLA-DR sein, um andere Zelltypen in der Kultur auszuschließen.

### **2.10.1 Adhärenz der Zellen auf Plastik und Differenzierung in drei Zellarten**

Die Adhärenz auf Plastik wurde in der Kulturflasche mittels Lichtmikroskop regelmäßig geprüft. Für den Differenzierungsnachweis wurden die Ad-MSCs für 14 Tage in einer 2D 96-Kavitätenplatte jeweils chondrogen, adipogen und osteogen differenziert. Hierzu wurden  $10^4$  Zellen pro Kavität ausgesät und in 100  $\mu$ l des jeweiligen Mediums differenziert, wobei das Medium alle 2-3 Tage gewechselt wurde. Die chondrogene Differenzierung erfolgte nach der Vorgehensweise einer Arbeit von Böcker *et al.* (Böcker *et al.*, 2008). Dazu wurde eine Kultur mit DMEM-Kulturmedium plus 100 nM Dexamethason, 1 mM Pyruvat, 195  $\mu$ M L-Ascorbin Säure-2-Phosphat, 350  $\mu$ M L-Prolin, 1.25% (v/v) Insulin, 5.35  $\mu$ g/ml Linolsäure und 1.25 mg/ml Bovines Serum Albumin (BSA) angelegt. Die adipogene Differenzierung wurde in DMEM-Medium durchgeführt, zu dem 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1  $\mu$ M Dexamethason und 1,5  $\mu$ M Insulin (100 i.E./ml) hinzugefügt wurden (Ciuffreda *et al.*, 2016). Die osteogene Differenzierung erfolgte nach folgendem Protokoll: Zu 500 ml DMEM-Medium wurden 5 ml FCS und 5 ml Penicillin/Streptomycin (EK je 1%) hinzugefügt. Die Zutaten 29 mg L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (EK 200  $\mu$ M), 1,08 g  $\beta$ -Glycerophosphat (EK 5 mM), 2,98 g HEPES (EK 25 mM), 83 mg Kalziumchlorid (EK 1,5 mM) und 250 mg Cholecalciferol (EK 5  $\mu$ M) Stocklösung wurden in je 10 ml der Mediumslösung gelöst und dem dem Gesamtmedium steril filtriert rückgeführt (vgl. Reumann *et al.*, 2018).

Nach 14 Tagen der Differenzierung wurden die Zellen jeweils zum Nachweis der spezifischen Differenzierung angefärbt. In den chondrogen differenzierten Zellen wurden mittels Alcianblau-Färbung die charakteristischen Mukopolysaccharide angefärbt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gereinigt. Anschließend wurden die Zellen mit 4 %-iger Formaldehydlösung für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und dann wieder dreimal mit PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen mit einer Alcianblau-Färbelösung beste-

hend aus 10 mg Alcianblau in 80 ml 95 %-igem Ethylalkohol für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Kulturplatten mehrmals mit Wasser gespült waren, wurden die gefärbten Zellen unter dem Lichtmikroskop untersucht (vgl. Ciuffreda *et al.*, 2016).

Lipidtröpfchen in den adipogen differenzierten Zellen wurden mittels Öl-Rot O angefärbt. Das Medium wurde entfernt und die Zellen dreimalig mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 4 %-iger Formaldehydlösung für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und wieder gewaschen. Nun wurden 20 µl ddH<sub>2</sub>O je Kavität vorgelegt und mit 30 µl Öl-Rot O Färbelösung (EK 0,35 % Öl-Rot O in Isopropanol) ergänzt. Nachdem diese Lösung für 15 min bei Raumtemperatur einwirken konnte, wurde sie entfernt, die Kavitäten mit Wasser gespült und das Ergebnis unter dem Lichtmikroskop bewertet (vgl. Ciuffreda *et al.*, 2016).

Osteogen differenzierte Zellen wurden mittels Alizarin-Rot Färbung (EK 0,5 % in ddH<sub>2</sub>O bei pH 4), welche freies Kalzium anfärbt, charakterisiert. Die differenzierten Zellen wurden für 60 min bei -20 °C in Ethanol fixiert und daraufhin dreimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 100 µl Alizarin-Rot Färbelösung bedeckt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abermals dreimaligem Waschen mit Leitungswasser und anschließender Trocknung an der Luft wurde die Zellen im Lichtmikroskop bewertet (vgl. Ciuffreda *et al.*, 2016).

### 2.10.2 PCR-basierte Charakterisierung der Ad-MSCs

Für die Charakterisierung der Ad-MSCs wurden PCRs durchgeführt (vgl. Rallapalli *et al.*, 2009). Dafür wurde mRNA der Zellen gewonnen. Die in einer T75 Flasche adhärenierten Zellen wurden mit 500 µl TriFast und einem Zellschaber gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur, Zugabe von 100 µl Chloroform, Vermischen und weiteren 5 min Inkubation wurde die Lösung 10 min bei 14 000 x g zentrifugiert. Die obere, klare Phase wurde zusammen mit 250 µl Isopropanol vorsichtig vermischt und anschließend bei -20 °C tiefgefroren. Vor der weiteren Verwendung wurde die RNA auf Eis aufgetaut und aufgereinigt. Dazu wurde die Probe zentrifugiert (14 000 x g für 10 min), der Überstand entfernt und zum Pellet 1 ml 70 %-iger Ethanol hinzugegeben. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Durchlauf wurden mögliche Ethanolreste verdunstet, bevor das Pellet in 50 µl DEPC H<sub>2</sub>O (= Diethylpyrocarbonat-haltiges Wasser) gelöst wurde. Zur Quantifizierung der RNA wurde mithilfe der LVIS-Platte photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 230$  nm,  $\lambda = 260$  nm und  $\lambda = 280$  nm die Konzentration der RNA von 2 µl Lösung bestimmt. Anschließend erfolgte die Integritätskontrolle. Hierzu wurde ein 1,5 %-iges Agarosegel aus Agarose mit 100 ml 1 M TBE-Lösung (10,8 g TRIS Base, 5,5 g Borsäure, 4 ml 0,5 M EDTA auf 1 l ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt) gemischt und in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurden 7 µl Ethidiumbromid (EK 0,07 %) hinzugefügt und das Gel in eine Kammer gegossen. Parallel wurde ein PCR-Ladepuffer bestehend aus 25 mg Bromphenolblau, 5 ml 10 M TBE-Lösung und 5 ml Glycerol (20%) gemischt. Zur Beladung der Agarosetaschen wurden daraufhin 200 ng RNA mit DEPC zu einem Volumen von 10 µl aufgefüllt und in eine Agarosegel-Tasche zusammen mit PCR-Ladepuffer im Verhältnis 1 zu 5 gefüllt und auf spezifische Banden der 28 S und 18 S überprüft. Sobald Menge (10 ng/µl) korrekt verdünnt war und Integrität der RNA mittels durchgeführten Integritätstest bestätigt werden konnte, wurde die RNA nach dem zeitlichen Schema von Abbildung 8 in cDNA (= Komplementär-DNA) umgeschrieben. Für die cDNA-Synthese wurden je 4,5 µl RNA-Probe, 1 µl Oligo-dt-Primer (finale Konzentration 2,5 µM), 1 µl Random-Primer (finale Konzentration 2,5 µM), 2,5 µl dNTPs (= Desoxyribonukleosid-Triphosphate) ange-

setzt und 1  $\mu$ l RT-Puffer (= Reverse Transkriptase-Puffer) und 1,5  $\mu$ l Reverse Transkriptase während des Prozesses hinzugefügt. Die RT-PCR (= Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion) erfolgte unter den Spezifikationen von Tabelle 6.

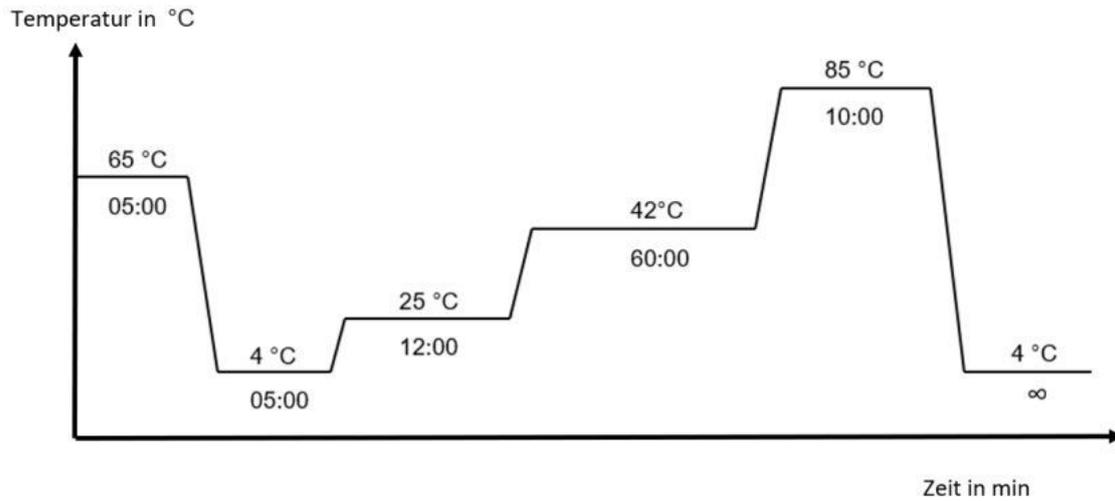


Abbildung 8: RT-PCR-Schema zur Herstellung von cDNA.

Tabelle 6: Übersicht der PCR-Spezifikationen.

Mar-ker	Ampli-kon	Primersequenz	Anneal-ing-Tem-peratur in °C	Zy-klus-zahl	Volu-men Tem-plate in µl	Posi-tiv-Kon-trolle
CD 105	288 Bp	forward TGACCCGCGCTT-CAGCTTCC reverse TTGCTGGGG-GAACGCGTGTG	60	35	2	SCP-1
CD 90	346 Bp	forward GTCTCCCGAGG-GCAGAAG reverse CACACTTGA-CAGTTTGTCTCT	60	35	2,5	SCP-1
CD 73	155 Bp	forward GAAGGCCTTT-GAGCATAGCG reverse AACTGGGCACTC-GACACTTG	60	35	2,5	SCP-1
CD4 5	360 Bp	forward TCTTCAGTGGTC-CCATTGTG reverse TTCCAATGT-GCTGTGTCCTC	60	35	2	THP-1
CD 34	311 Bp	forward AGAAAGGCTGG-GCGAAGACCC reverse AGTGGG-GAAGGGTTGGGCGT	58	35	4	THP-1
CD 19	132 Bp	forward GTGGT-GAAGGTGGAAGAGGG reverse CAGCCC-CAGGCTGAGTTTTA	54	35	4	jeko-1
CD 14	369 Bp	forward AGCATTGCC-CAAGCACACT reverse CTTGGCTGG-CAGTCCTTTAG	60	35	2	THP-1
HLA -DR	183 Bp	forward GTTTACGACTG-CAGGGTGA reverse GCTTTTGCG-CAATCCCTTGA	60	35	2	THP-1

Die produzierte cDNA wurde anschließend mittels PCR auf vorhandene Expression der Markergene untersucht. Zusätzlich konnte neben den drei beschriebe-

nen Spendern die cDNA von zwei früheren Spendern aus dem Labor verwendet werden.

### **2.11 Herstellung eines Kulturmediums für SCP-1 Zellen**

Für die Vorversuche der optimalen Inkubationszeit und -zahl wurden SCP-1 Zellen verwendet (Böcker *et al.*, 2008). Zur Kultur dieser Zellen wurde ein SCP-1 Kulturmedium bestehend aus 500 ml MEM alpha Medium, 10 % ml FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin angesetzt.

Als Grundlage für das Differenzierungsmedium dient ebenfalls das MEM alpha Medium der Firma Sigma Aldrich, ergänzt um 1 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin. Zusätzlich wurden folgende Chemikalien hinzugefügt:

29 mg L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (EK 200  $\mu$ M), 0,54 g  $\beta$ -Glycerphosphat (EK 10 mM), 2,98 g HEPES (EK 25 mM), 83 mg Kalziumchlorid (EK 1,5 mM) und 500 ml Dexamethason Stock-Lösung (EK 100 nM). Jede Chemikalie wurde in 10 ml MEM alpha Medium gelöst. Die gelösten Chemikalien wurden steril filtriert und dem Medium hinzugefügt.

### **2.12 Bestimmung der optimalen Inkubationszeit der Scaffolds**

Da einige Autoren einen Vorteil von vorinkubierten Scaffolds feststellen konnten (Amirikia *et al.*, 2017), wurde die Vorinkubationszeit der Scaffolds untersucht. Die vier Scaffoldtypen wurden jeweils null, ein, fünf und sieben Tage in Medium inkubiert und daraufhin mit  $1 \cdot 10^4$  SCP-1 Zellen besiedelt. Die Zählung der Zellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer, wobei 10  $\mu$ l der Zelllösung mit 10  $\mu$ l 0,125 %-iger Trypanblaulösung, in PBS verdünnt, gemischt und die Zellzahl bestimmt wurde. Die Aussaat der Zellen erfolgte in einer 96-Kavitätenplatte. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und durch 150  $\mu$ l verdünnte Resazurinlösung (EK 3,3 % in SCP-1 Medium) ersetzt. Nach 2 h der Inkubation wurde die Fluoreszenz von 20  $\mu$ l Resazurinlösung als Duplikat bei 530 nm Exzitation und 590

nm Emission photometrisch gemessen. Die gemessenen Werte wurden anschließend relativ zum Gesamtmittelwert aller Messbedingungen ausgewertet.

### **2.13 Bestimmung der optimalen Zellzahl zur Aussaat auf ein Scaffold**

Für die Besiedelung eines Scaffolds ist im Kontext der Scaffoldgröße und dem begrenzten Spenderaufkommen die optimale Zellzahl zur Besiedelung relevant. Deshalb wurden Scaffolds des Typs Kollagen mit unterschiedlichen Zellzahlen von SCP-1 Zellen besiedelt. Hierzu wurden die Scaffolds auf beschriebene Weise sterilisiert und für 24 h in Medium inkubiert. Anschließend wurden stufenweise beginnend bei  $8 \cdot 10^3$  eine ansteigende Reihe mit jeweils  $8 \cdot 10^3$  Zellen mehr auf verschiedene Scaffolds bis  $6,4 \cdot 10^4$  Zellen ausgesät. Am Folgetag wurde der Resazurinumsatz bestimmt (vgl. Ruoß *et al.*, 2019). Auch hierzu wurde das Medium entnommen und durch 150 µl verdünnte Resazurinlösung (EK 3,3 % Resazurin in SCP-1 Medium) ersetzt. Nach 2 h der Inkubation wurde die Fluoreszenz bei 530 nm Exzitation und 590 nm Emission photometrisch gemessen. Von den erhaltenen Messwerten wurde ein ein gemittelter Blankowert abgezogen und die Werte jedes Replikats und jeder unabhängigen Durchführung gemittelt und als Balkendiagramm dargestellt.

### **2.14 Aussaat von Ad-MSC auf den Kryogelen**

Zur Aussaat wurden Ad-MSC der Passage 3 mittels Trypsin/EDTA gelöst und anschließend in einem Reaktionsgefäß für 10 min bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in DMEM-Medium resuspendiert. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl und Anpassen der Konzentration, sodass eine Endkonzentration von 1333 Zellen pro µl erreicht wurde.

Zur Vorbereitung der Zellbesiedelung wurden die Scaffolds in eine 96-Kavitätplatte überführt und für 2 h UV-Licht zur Sterilisierung exponiert. Danach wurden sie 45 min in einer Wärmekammer inkubiert, um überschüssige Flüssigkeit zu verdampfen. Dieser Schritt soll ein besseres Aufsaugen der Zellaussaat bewirken. Zur Aussaat wurden 12,5 µl der Zellsuspension mittig auf die plane

Fläche des Scaffold pipettiert und für 1 h inkubiert. Nach 1 h wurde 154 µl DMEM- Wachstumsmedium zu den Scaffolds hinzugegeben. Durch das so erhaltene Mediumsvolumen betrug der Abstand von Scaffoldoberfläche zu Flüssigkeitsoberfläche etwa 2 µm. Dieser Abstand entspricht grob einem physiologischen O<sub>2</sub>-Partialdruck von 60 mmHg (Camp und Capitano, 2007). Auf Einhaltung dieses O<sub>2</sub>-Partialdrucks wurde auch später während der Differenzierung geachtet.

24 h nach Besiedelung der Scaffolds wurde das Wachstumsmedium durch Differenzierungsmedium ausgetauscht.

Für die 2D-Kulturen wurden die Zellen auf 333 Zellen/µl verdünnt und 30 µl der Suspension pro Kavität ausgesät. Hier wurde bei der Aussaat ein größeres Volumen im Vergleich zu 2D gewählt, da ansonsten aufgrund der Kapillarkräfte in der Kavität im Zentrum die Mediumshöhe zu gering war. Nach 4 Stunden der Adhärenz wurde das Medium auf 100 µl aufgefüllt und am nächsten Tag durch 100 µl Differenzierungsmedium ersetzt.

## **2.15 Zellfärbung mit Calcein-AM**

Nach erfolgter Inkubation der Zellen für 24 h auf dem Scaffold wurde die Viabilität der Zellen an Tag 0 bestimmt. Bei der Färbung mit Calcein-AM können lebende Zellen durch Fluoreszenz bei einer emittierten Wellenlänge von 510 nm im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden (vgl. Hale *et al.*, 2000; Tendulkar *et al.*, 2016). Der Mechanismus dahinter ist, dass Calcein-AM die Zellmembran passieren kann und von lebenden Zellen die Acetoxymethyl- und die Acetatgruppen des Calcein-AM durch Esterasen gespalten werden. Das Produkt Calcein fluoresziert durch Komplexbildung von Kalzium deutlich grün im Zytoplasma.

Im Versuch wurden die Scaffolds für 4 h in einer Mediumslösung mit 1 %-igem Calcein-AM inkubiert. Anschließend konnten die lebenden Zellen im Fluoreszenzmikroskop dargestellt, ausgezählt und das Besiedlungsmuster analysiert werden.

## **2.16 Zellkernfärbung mit Hoechst 33342**

Die Färbung mit Hoechst 33342 stellt alle Zellkerne im DAPI-Modus (= 4',6-Diamidino-2-phenylindol - Dihydrochlorid) des Fluoreszenzmikroskops blau dar (vgl. Tendulkar *et al.*, 2016). Hoechst 33342 hat die Eigenschaft DNA zu interkalieren und unter Anregung von UV-Licht blaues Licht zu emittieren. Eine Unterscheidung von lebenden zu toten Zellen findet hier also nicht statt.

Im Versuch wurde gleichzeitig zur Calcein-AM-Lösung Hoechst 33342 hinzugegeben, sodass auch hier eine Lösung von 0,1 %-igem Hoechst 33342 in Medium vorlag. Hier wurden die Zellen nach einer 4 h Inkubation anhand der Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop im DAPI-Kanal (447 nm Emissionswellenlänge) auf Anzahl, Besiedlungsmuster und Eindringtiefe in das Scaffold analysiert.

### **2.17 Eindringtiefe und Besiedelungsmusters der Ad-MSK auf den Scaffolds**

Die besiedelten und mit Calcein-AM und Hoechst 33342 für 4 h gefärbten Scaffolds wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Bilder mittels Image J ausgewertet (vgl. Häussling *et al.*, 2019). Die Besiedelung wurde einerseits anhand einer Aufsicht und andererseits anhand eines Querschnitts des Scaffolds beurteilt. Dazu wurde das Scaffold mittig mit einem Skalpell geteilt. Die Beurteilung des Querschnitts zeigt die Eindringtiefe der Zellen in das Scaffold.

### **2.18 Osteogene Differenzierung von Ad-MSK**

Zur osteogenen Differenzierung wurden die besiedelten Scaffolds für 14 Tage in Differenzierungsmedium inkubiert (vgl. Reumann *et al.*, 2018). An verschiedenen Tagen erfolgten Messschritte und Medienwechsel gemäß dem Schema in Abbildung 9. Alle 2 beziehungsweise 3 Tage wurde ein Mediumswechsel durchgeführt. An den definierten Zeitpunkten T1 = 7 Tage und T2 = 14 Tage erfolgten Messungen des DNA-Gehalts, des Resazurinumsatzes, der alkalischen Phosphatase Aktivität (= AP) und des Glukoseverbrauchs. Die Beschreibung der einzelnen Methoden wird im Folgenden näher erläutert. Darüber hinaus wurden Medienüberstände bei -20 °C konserviert, um später die Menge spezifischer sezernierter Proteine mittels Dot-Blot zu bestimmen. Die Mediumsüberstände wurden an Tag 2, Tag 7 und Tag 14 entnommen und waren hierbei immer für 48 h in Kontakt zu den Zellen. Nach 14 Tagen der Differenzierung wurden Endpunkte hinsichtlich der Scaffold-Steifigkeit und ein CT-Wert bestimmt.

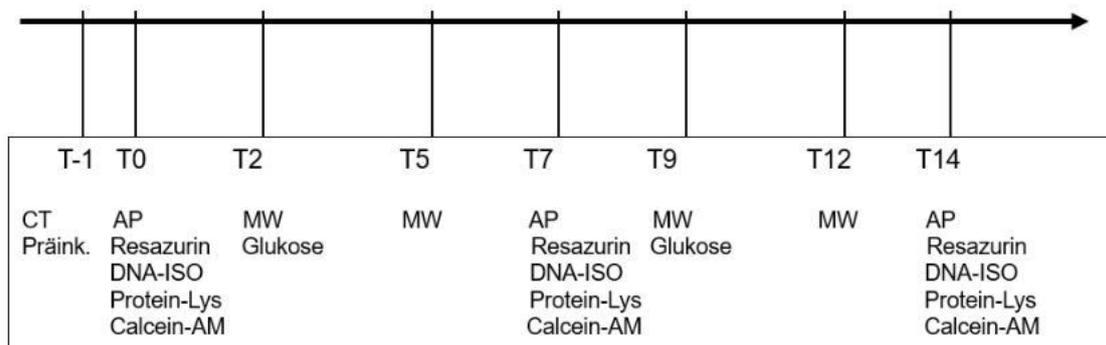


Abbildung 9: Zeitliches Differenzierungsschema und Messpunkte während der Differenzierung.

T= Tag, Präink= Präinkubation, AP= Alkalische Phosphatase, Resazurin= Resazurinmessung, DNA-ISO= DNA-Isolation, Protein-Lys= Gewinnung von Protein-Lysaten, MW= Medienwechsel

## 2.19 Messung der Funktionsparameter

### 2.19.1 Resazurinumsatz

Der blaue Farbstoff Resazurin hat die Eigenschaft von lebenden Zellen aufgenommen zu werden, dort zu Resorufin reduziert und wieder ausgeschleust zu werden. Resorufin ist rosafarben. Diese Unterschiede der Farbemission können gemessen und verglichen werden und auf diese Weise auf die Viabilität der Zellen verschiedener Kavitäten rückgeschlossen werden.

Für die Messung des Resazurinumsatzes wurde pro Kavität das Medium entnommen und durch 215 µl einer 3,3 %-igen Resazurin-Mediumslösung in 3D (130 µl in 2D) ersetzt. Nach 2 h der Inkubation bei 37 °C wurde 100 µl der Reaktionslösung wieder entnommen. Die 100 µl wurden auf zwei Duplikate geteilt und die Fluoreszenz bei 544 nm Exzitationswellenlänge und 590 nm Emissionswellenlänge für jedes Duplikat gemessen. Die Replikate jeder Bedingung wurden anschließend von einem Blankowert abgezogen und Ergebnis mit den Werten der verschiedenen Spender und Messzeitpunkte jeweils gemittelt.

### **2.19.2 Glukoseverbrauch der besiedelten Zellen**

Analog zum Resazurinumsatz kann auch der Glukoseverbrauch der Zellen eine indirekte Aussage über die Zellviabilität, wie auch Stoffwechselaktivität geben. Hierzu wurden mit einem Glukosometer der Firma Bayer die Menge der Glukose im Medium bestimmt, wobei die Medien von den Triplikaten vor der Messung gemischt wurden. Zur Messung der Glukose benötigt man neben dem Glukosometer für jede Messung ein Glukosestreifen, auf welchen wenige  $\mu\text{l}$  der Probe aufgetragen wurden, sobald dieser ins Glukosometer eingeführt wurde (vgl. Häussling *et al.*, 2019). Die gemessenen Glukosewerte wurden anschließend auf den Durchschnittswert der Bedingung 2D T0 normiert und der Mittelwert aller Spender für die unterschiedlichen Messzeitpunkte aufgetragen.

### **2.19.3 Messung der alkalischen Phosphatase**

Zur Messung der alkalischen Phosphatase (vgl. Ehnert *et al.*, 2010, 2015) wurde zunächst ein Assay-Puffer hergestellt. Für den Puffer wurden 50 mM Glycine, 100 mM TRIS Base und 1 mM  $\text{MgCl}_2$  mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  bis zu einem Volumen von 900 ml vermischt und mit NaOH auf einen pH Wert von 10,5 eingestellt. Dies wurde dann wiederum auf ein Volumen von 1 l mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  aufgefüllt. 1 ml dieses Puffers wurden mit 1,3 mg 4-Nitrophenyl-phosphat-dinatrium Hexahydrat Salz (= pnPP; EK 3,5 mM) vermischt. Diese Lösung wurde bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  bis zu 2 Monate gelagert. Zu Beginn der Messung wurde pro besiedelter Kavität das Medium entnommen und die Scaffolds für 1 min mit PBS gewaschen und anschließend wieder entfernt. Nach Zugabe von 215  $\mu\text{l}$  Assay-Puffer in 3D (130  $\mu\text{l}$  in 2D) pro Kavität wurde nach exakt 40 min zweimal je 50  $\mu\text{l}$  als Duplikat entnommen und die Absorption bei 405 nm gemessen. Parallel dazu erfolgte eine Blankomessung mit ebenfalls 215  $\mu\text{l}$  in 3D (130  $\mu\text{l}$  in 2D).

Für die Auswertung des gemessenen Wertes wurde eine Standardkurve angefertigt und auch von dieser die Absorption bei 405 nm gemessen. Der Wert der alkalischen Phosphatase eines besiedelten Scaffolds ergab sich nun aus dem Absorptionswert, der in dieser Kavität gemessen wurde abzüglich des Blanko-

wertes und genormt auf die Standardkurve. Dieser Wert wurde gemittelt über alle Spender für jede Bedingung als Graphik dargestellt.

## **2.20 Isolierung der DNA von 3D-Zellkulturen und Quantifizierung der DNA der Kulturbedingungen mittels Absorptionsmessung**

Zur Isolierung und Quantifizierung des DNA-Gehalts (vgl. Wang *et al.*, 1993) wurden die Scaffolds zunächst mit PBS gewaschen, um Medienrückstände zu entfernen und anschließend 10 min bei 800 x g zentrifugiert. Daraufhin wurde das besiedelte Scaffold in 160 µl 50 mM NaOH inkubiert und für 30 min bei 98 °C erhitzt. Danach wurde zur NaOH-Lösung 160 µl ddH<sub>2</sub>O zugegeben und das Scaffold entnommen. Zur Neutralisation des NaOH wurden 16 µl 100 mM TRIS/HCl bei einem pH von 8 zur Lösung hinzugefügt, für 10 min bei 14 000 x g und 4 °C zentrifugiert und die Lösung anschließend bei -20 °C bis zur Verwendung konserviert. Für die 2D-Kultur wurde entsprechend der niedrigeren Zellzahl verfahren: Zunächst wurde das Medium abgesaugt anschließend mit PBS gewaschen. Es wurden 100 µl 50 mM NaOH bei 98 °C der Kavität zugegeben und für 5 min inkubiert und mit der Pipettenspitze vermischt. Danach wurde die Lösung in ein Reaktionsgefäß umgefüllt und weitere 30 min bei 98 °C erhitzt. Zuletzt wurden 100 µl ddH<sub>2</sub>O und 10 µl TRIS/HCl bei einem pH von 8 hinzugefügt und die Lösung bei -20 °C bis zur Verwendung konserviert.

Für die photometrische Quantifizierung der DNA wurden die Absorptionseigenschaften von DNA genutzt. Hierzu wurden auf einer LVis-Plate mit 2 µl ddH<sub>2</sub>O ein sog. Dustcheck durchgeführt, um die Platte auf Verunreinigungen zu testen. War der Grenzwert von 0,3 nicht überschritten, wurde mit 2 µl TRIS ein Blankowert der Absorption bei 260 nm gemessen, dann die Messstelle gereinigt und wiederum 2 µl der zu testenden Probe aufgetragen. Darauf wurde die Absorption bei 260 nm gemessen und vom Messwert der Blankowert abgezogen und die gemittelten Werte für jede Bedingung der Spender als Graphik aufgetragen.

## 2.21 Gewinnung von Protein-Lysaten der besiedelten Scaffolds

Zur Gewinnung von Protein-Lysaten (vgl. Ehnert *et al.*, 2010) wurde im ersten Schritt das Medium abgesaugt und die Kavitäten der 2D- und 3D-Kultur mit PBS gewaschen. Die Scaffolds wurden anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl RIPA Lösung (= Radioimmunopräzipitations Assay) bedeckt. Für die 2D-Kultur wurden in jede der drei Kavitäten je 30 µl Lösung hinzugegeben. Die RIPA Lösung setzt sich dabei aus einer Stocklösung und einer Arbeitslösung zusammen. Für die Stocklösung benötigt man 10 mM TRIS Base, 10 mM NaCl, 0,5 % Tergitol-Lösung, 0,3 % Desoxycholsäure und 10 mM EDTA in 50 ml ddH<sub>2</sub>O bei pH 7,6 ergänzt zu 100 ml Gesamtlösung durch Zugabe von H<sub>2</sub>O. Für die Arbeitslösung ergänzt man die Stocklösung um 1 µl/ml Pepstatin A, 5 µl/ml Leupeptin A, 1 mM PMSF, 5 mM NaF Stocklösung und 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Nach Zugabe der RIPA-Gesamtlösung wurden die Scaffolds bei -80 °C tiefgefroren.

## 2.22 Methodik des Dot-Blots

Ähnlich zur Methodik eines Western Blots konnte die Menge eines spezifischen Proteins mittels Dot-Blot bestimmt werden (vgl. Guillemin *et al.*, 2009; Putra *et al.*, 2014). Zunächst musste hierzu der Gesamtproteingehalt einer Probe nach der Methode von Lowry bestimmt werden. Hierzu wurde eine Standardkurve bestehend aus BSA (= Bovines Serum Albumin) und ddH<sub>2</sub>O angesetzt und parallel folgende drei Lösungen vorbereitet: Erstens eine Na-K-Stocklösung bestehend aus 2 g Na-K-Tartrat in 100 ml ddH<sub>2</sub>O (EK 2 %). Zweitens eine CuSO<sub>4</sub>-Stocklösung bestehend aus 1 g CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O und 100 ml ddH<sub>2</sub>O (EK 1%). Drittens wurde eine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Stocklösung bestehend aus 20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (EK 2 %) in 950 ml ddH<sub>2</sub>O und 50 ml 2 M NaOH (EK 100 mM) vorbereitet.

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts wurden nun als Triplikat je 2 µl der BSA-Standardreihe oder der zu bestimmenden Proteinprobe in einer 96-Kavität vorgelegt. Dazu wurden 150 µl einer sogenannten Lösung A (Zusammensetzung: 20 µl der Na-K-Stocklösung mit EK 0,02 % plus 20 µl CuSO<sub>4</sub>- Stocklö-

sung mit EK 0,01 %, ergänzt auf 2 ml mit der Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Stocklösung) hinzugefügt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzufügen von 30 µl der Lösung B (Zusammensetzung: 500 µl Folin Reagens (EK 33 %), mit 1000 µl ddH<sub>2</sub>O vermischt) und direktem Vermischen wurden die Proben für 1-6 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nun konnte die Absorption bei 750 nm gemessen werden. Die Werte konnten anschließend anhand der mitgeführten Standardkurve in µg/ml umgerechnet werden.

Die maximale Gesamtproteinmenge wurde anschließend auf ein Nitrozellulosepapier aufgetragen und bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Die Nitrozellulosemembran wurde nun mit 5 % BSA in TBS-T (= TRIS gepufferte Saline; Zusammensetzung aus 12,1 g TRIS mit EK 100 mM, 87,66 g NaCl mit EK 1,5 M in 800 ml ddH<sub>2</sub>O und mit HCL auf pH von 7,6 eingestellt) für 1 h geblockt. Danach wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen, bevor sie zur Markierung mit Antikörpern verwendet werden konnte. Die Inkubation mit spezifischen Antikörpern an der Membran (0,1 % in TBS-T) erfolgte bei 4 °C über Nacht. Im vorliegenden Projekt wurde von den verschiedenen Scaffoldbedingungen und Messzeitpunkten jeweils der Proteingehalt von Runx 2, Osterix und Osteoprotegerin (= OPG) gemessen.

Nachdem die Membranen mit den primären Antikörpern über Nacht inkubiert waren, wurden sie dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für weitere 2 h mit einem zweiten, sekundären Antikörper (EK 0,1 % in TBS-T) inkubiert, an dessen Fc-Fragment eine „Horseradish-Peroxidase“ gebunden war. Nach Inkubation erfolgten weitere Waschschrte mit TBS-T entsprechend dem obigen Protokoll und das Einwirken in ECL-Lösung, sodass eine Detektion mit der CCD Kamera möglich wurde. Die ECL-Lösung wurde wie folgt hergestellt: Vorbereitend wurde eine 100 mM TRIS-Pufferlösung mit 12,1 g TRIS und 800 ml ddH<sub>2</sub>O hergestellt und mit HCL auf einen pH von 8,5 eingestellt. Außerdem wurde eine 250 mM Luminol-Stocklösung aus 0,88 g Luminol und 20 ml DMSO hergestellt. Als drittes wurde eine 90 mM p-Coumarin-Säurelösung mit 0,15 g p-Coumarinsäure und 10 ml DMSO vorbereitet. Sowohl Luminol-, als auch die p-Coumarin-Säurelösung konnten bei 20 °C aufbewahrt und

wiederverwendet werden. Zur Herstellung von ECL-Lösung wurden die Stocklösungen zu einer sogenannten Lösung A und einer Lösung B zusammengesetzt. Lösung A bestand aus 2,5 ml 100 mM TRIS, 25 µl 250 mM Luminol-Stocklösung (EK 2,5 mM) und 11 µl 90 mM p-Coumarin-Säurelösung (EK 0,4 mM). Lösung B bestand aus 2,5 ml 100 mM TRIS und 5 µl einer 30 %-igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (EK 0,06 %). Mischte man zu gleichen Anteilen Lösung A und Lösung B erhielt man die ECL-Lösung. Diese Lösung wurde auf die Blots aufgetragen und für 1 min inkubiert. Indem die ECL-Lösung mit der Horseradish-Peroxidase reagierte, entstanden chemilumineszierende Produkte, die detektiert werden konnten. Die gemessenen Grauwerte der Detektion wurden anschließend für jede Bedingung gemittelt.

### **2.23 Bestimmung der Steifigkeit nach Besiedelung**

Äquivalent zur Messung der Steifigkeit der unbesiedelten Scaffolds anderer Größe wurde die Steifigkeit der Scaffolds vor und nach Besiedelung getestet und verglichen. Dazu wurde die Steifigkeit der Scaffolds mittels der Zwickmaschine bis 10 % Verformung und 0,1 N Vordehnung die Kraft-Dehnungskurve gemessen und anschließend entsprechend der Formel für das E-Modul (siehe Abschnitt oben) berechnet, wobei nur Werte innerhalb des linearen Bereichs ausgewertet wurden. Verwendung fand von jedem der drei Spender ein Triplikat. Entsprechend der statistischen Auswertung der Steifigkeitswerte von unbesiedelten Scaffolds wurde für jede Bedingung der mittlere Steifigkeitswert gebildet und die erhaltenen Mittelwerte vor und nach Besiedelung gegenübergestellt.

## **2.24 CT-Messungen der Scaffolds**

Vor und nach Besiedelung mit Ad-MSCs wurden in der BG Klinik Tübingen CT-Aufnahmen der Scaffolds durchgeführt. Die Scaffolds verblieben hierzu in der 96-Kavitätenplatte und wurden mittels der Innenohrfunktion des Siemens CT-Gerätes „Somatom“ der BG Klinik Tübingen mit coronaren Schnitten vermessen. Die Messung erfolgte einmal vor der Besiedelung und anschließend nach 14 Tagen Differenzierung ein zweites Mal.

Die erhaltenen Dicom-Dateien mit Bildern verschiedener coronarer Schnittebenen wurden mittels der Image J-Software ausgelesen und im Verlauf nur Schnittebenen weiterverwendet, bei denen pro Kavität ein Scaffold vollständig coronar angeschnitten zu sehen war.

Um jede Kavität mit Scaffold wurde anschließend auf dem Schnittbild ein Kreis gleicher Größe gelegt und von dessen Fläche der Grauwert mittels Image J bestimmt. Man erhielt pro Bedingung aus verschiedenen Schnittebenen einen Grauwert, welcher über die Schnittebenen gemittelt wurde. Das Ergebnis war damit ein für jeden Spender, Scaffoldtyp und Differenzierungszeitpunkt über die Schnittebenen gemittelter Grauwert. Die Differenz des Wertes nach Besiedelung und vor Besiedelung sollte Aufschluss darüber geben, ob Knochenmatrix produziert wurde unter der Annahme, dass der Grauwert daraufhin steigt. Zuletzt wurde diese Differenz der Grauwerte der drei Spender gemittelt und in einer Graphik zusammengefasst.

## **2.25 Vergleich des Zytokingehalts in PRP und IKM**

Da der Unterschied des Zytokingehalts bei PRP und IKM ein wesentliches Merkmal für die beiden Spezialzutaten und damit für das gesamte Scaffoldmilieu ist, wurde deren Gehalt von Zytokinen eingehender geprüft. Anhand von Zytokinarrays der Firma RayBiotech (Ray-Bio C-Series) konnte der Gehalt der Zytokine per Signalstärke der Chemilumineszenz entsprechend des Protokolls des Herstellers bestimmt werden. Dazu wurden die Signalstärken detektiert und mittels Image J die Signalstärken verglichen, indem in Image J ein Kreis über das Leuchtsignal gelegt wurde und die Intensität bestimmt wurde. Von diesen Signalstärken der verschiedenen Zytokine wurde anschließend ein Blankowert abgezogen, zwischen den Replikaten jeweils der Mittelwert gebildet und zwischen PRP und IKM verglichen. Zur weiteren Auswertung wurden Zytokine besonders betrachtet, deren Unterschied zwischen PRP und IKM besonders groß ist. Die Liste dieser Zytokine lässt sich dabei grob eingrenzen in Zytokine, die überwiegend für Immunprozesse zuständig sind, und welche die Vaskularisierungsprozesse unterstützen und zuletzt Zytokine, die die Proliferation steuern. Gesondert untersucht wurden daher Angiogenin und VEGF-A als Zytokine, die Vaskularisierungsprozesse abbilden (Kim, *et al.*, 2015). Interferon- $\gamma$  und Interleukin-1-alpha dienen zur Abbildung von Immunprozessen (Zha *et al.*, 2017) und Zytokine der FGF-Gruppe, sowie Leptin zur Abbildung der Proliferation (Behr *et al.*, 2010; Floss *et al.*, 1997; Liu, *et al.*, 2018; Upadhyay *et al.*, 2015).

## 2.26 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die gewonnenen Rohdaten aus den Versuchen in Excel übertragen. Dort wurden die Daten entsprechend der Beschreibung der jeweiligen Methode genormt, verrechnet beziehungsweise gemittelt. Die gewonnenen Datensätze wurden anschließend in die GraphPad-Software übertragen und mittels Balkendiagramm dargestellt. Neben dem Mittelwert der Messwerte wurde das 95 %-ige Konfidenzintervall als Graphik abgebildet. Anschließend diente der Kruskal-Wallis Test und bei multiplen Vergleichen Dunn's Test zur Überprüfung auf Signifikanz. Die Signifikanz wurde dabei abgestuft auf eine Signifikanz höchster Stufe mit  $p < 0,001$ , Signifikanz hoher Stufe mit  $p < 0,01$  und Signifikanz niedriger Stufe mit  $p < 0,05$ . Lag die Fehlerwahrscheinlichkeit über einem Wert von 0,05 im Test, wurde das Ergebnis als nicht-signifikant gewertet. Für den Vergleich zwischen Trocken- und Nassscaffolds, sowie den Vergleich der beiden Zusatzstoffe PRP und IKM in den Zytokinarrays, diente aufgrund lediglich zweier vorliegender, nicht-parametrischer Bedingungen der Mann-Whitney U Test.

Bei der Auswertung der Daten und der Festlegung der statistischen Tests stand Frau Inka Rösel vom Institut für Biometrie der Universität Tübingen beratend zur Seite.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Eigenschaften der Scaffolds

#### 3.1.1 Porengröße

Nach Auswertung von je 90 Poren der Scaffolds PRP, Koll, IKM und RGD wurde die durchschnittliche Porendurchmesser einmal anhand der Formel für Kreisflächen errechnet und einmal aus dem Mittelwert des kleinsten und größten gemessenen Mittelwerts bestimmt (vgl. Häussling *et al.*, 2019; Ruoß *et al.*, 2018). Wie Abbildung 10 zeigt, ergibt sich meist kein signifikanter Unterschied in der Bestimmung je nach Methode, wobei der linke Balken jedes Scaffoldtyps die Bestimmung mittels der Flächenformel und der rechte Balken die Bestimmung mittels Durchmesseremethode aufzeigt. Insgesamt präsentiert sich der Scaffold Koll mit durchschnittlich 80,44  $\mu\text{m}$  als der mit den größten Poren. Es folgen das Scaffold IKM mit 73,52  $\mu\text{m}$ , RGD mit 45,02  $\mu\text{m}$  und zuletzt PRP mit 39,03  $\mu\text{m}$ . Die unterschiedlichen Scaffoldtypen zeigen mit Ausnahme zwischen Scaffold Koll und IKM, sowie Scaffold PRP und RGD einen statistisch signifikanten Unterschied in der Porengröße.

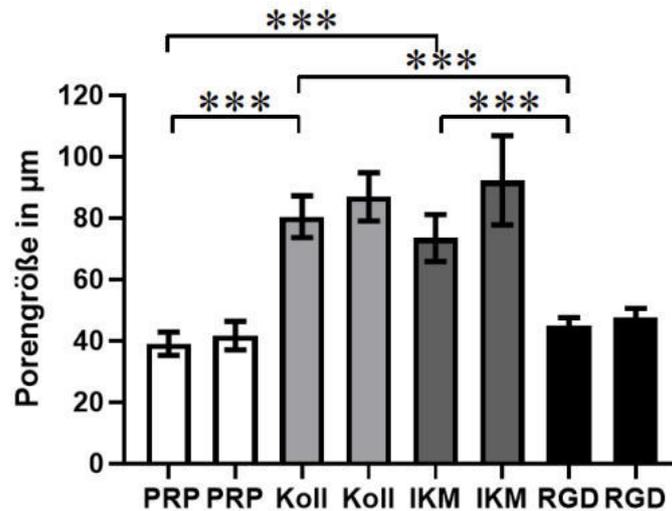


Abbildung 10: Porendurchmesser der Scaffolds.

Die Berechnung erfolgte jeweils nach der Flächenformel (linker Balken) und Durchmesserformel (rechter Balken) für jeden Scaffoldtyp mit  $N = 3$  unabhängigen Ansätzen und  $n = 10$  Replikaten. Darstellung der Mittelwerte als Balkendiagramm mit 95%-Konfidenzintervall. \*\*\* =  $p < 0,001$  im Kruskal-Wallis Test und Dunn's Test für multiple Vergleiche.

### 3.1.2 Porosität der Scaffolds

Die Wasseraufnahmekapazität der vier Scaffolds ergibt für die vier Scaffolds folgende Durchschnittswerte: Scaffold PRP weist eine Kapazität von 76 % auf, Scaffold Koll von 79 %, Scaffold IKM 77 % und Scaffold RGD liegt bei 77 % im Durchschnitt. Die Unterschiede liegen damit sehr nahe beieinander und es ergeben sich statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Scaffolds, wie in Abbildung 11 zu sehen ist. Legt man den Ergebnissen das vereinfachte Modell zugrunde, dass sich das Wasser zu großen Teilen in den Poren befindet, ergibt sich eine Porosität von grob 75 % bei den vier Scaffoldtypen.

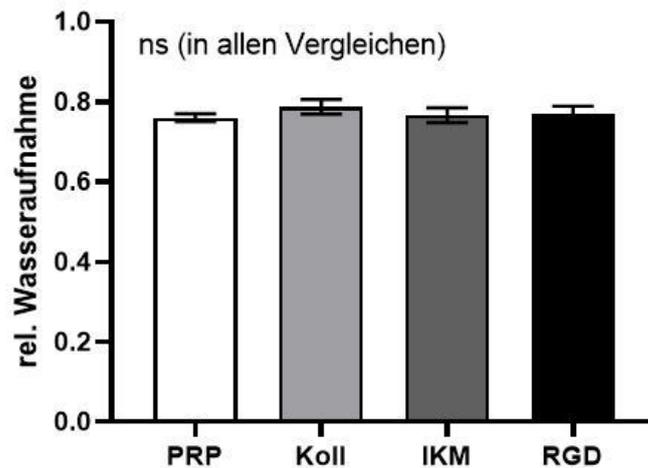


Abbildung 11: Wasseraufnahmekapazität der Scaffolds.

Die Messung von Trocken- und Nassgewicht erfolgte mit  $N = 5$  unabhängigen Ansätzen und  $n = 3$  Replikaten. Darstellung der Mittelwerte als Balkendiagramm mit 95%-Konfidenzintervall. *ns* = nicht-signifikant im Kruskal-Wallis Test und Dunn's Test für multiple Vergleiche.

### 3.1.3 E-Modul-Werte der Scaffolds

Das mittlere E-Modul aller Scaffolds und damit die Steifigkeit ist in Abbildung 12 aufgeführt. Dabei präsentiert sich das PRP-Scaffold als das mit dem durchschnittlich höchsten E-Modul mit einem Wert von 36,40 kPa, gefolgt vom Koll-Scaffold mit 26,66 kPa, dem IKM-Scaffold mit 21,47 kPa und dem RGD-Scaffold mit rund 15,91 kPa. Die unterschiedlichen Steifigkeitswerte sind hier zwischen allen Scaffolds statistisch signifikant auf einem Niveau von  $p < 0,001$  im Kruskal-Wallis Test.

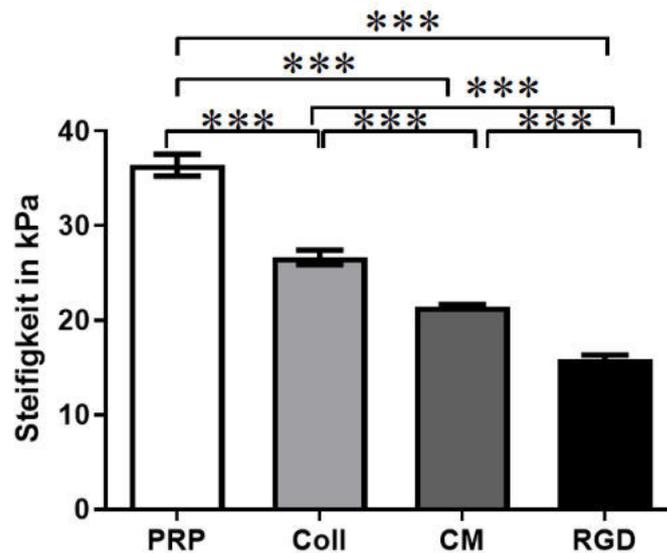


Abbildung 12: Steifigkeit der unbesiedelten Scaffolds in kPa. Es wurden von 5 unterschiedlichen Herstelltagen (N = 5) mindestens ein Scaffold gemessen (n > 1). Darstellung der Mittelwerte als Balkendiagramm mit 95%-Konfidenzintervall. \*\*\* =  $p < 0,001$  im Kruskal-Wallis Test und Dunn's Test für multiple Vergleiche.

### 3.2 Überprüfung der Kriterien für mesenchymale Stammzellen nach Dominici

Für standardisierte Ausgangsbedingungen und zur Qualitätssicherung der Zellkulturen mit mesenchymalen Stammzellen wurden die Qualitätskriterien von Dominici *et al.* (Dominici *et al.*, 2006) definiert und sollten vorab entsprechend getestet werden.

Die Adhärenz auf Plastik wurde laufend und insbesondere vor der Aussaat im Lichtmikroskop überprüft und ist in Abbildung 13 zu erkennen. Die Adhärenz lässt sich daran zeigen, dass sich die Zellen beim Schwenken in der Zellkulturflasche nicht bewegen und sich mit rankenartigen Ausläufern an Plastik anheften. Dabei ändert die Zelle die Form von rund zu sternförmig mit Ausläufern.

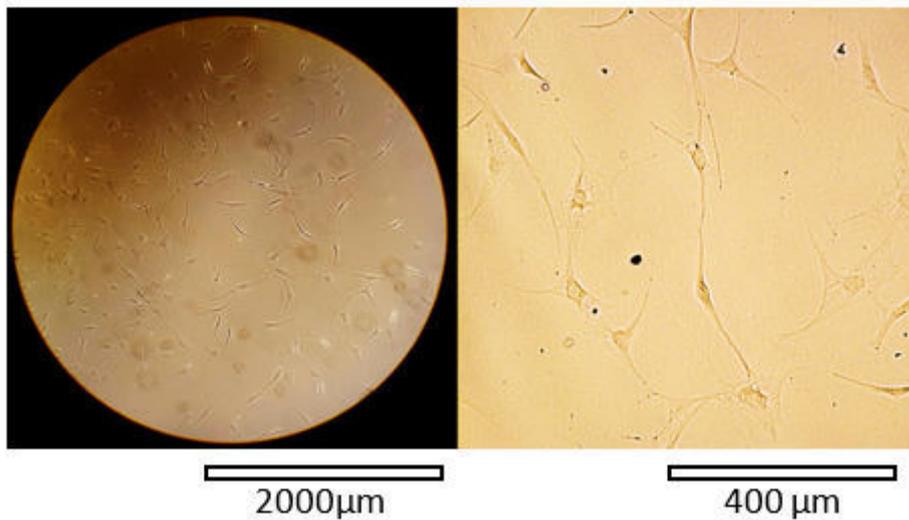


Abbildung 13: Adhärenz der Ad-MSCs auf Plastik der Kulturflasche in der Aufsicht.

Darstellung in 100-facher und 200-facher Vergrößerung. Anhand der Formänderung der Zelle von rund zu sternförmig lässt sich die Adhärenz erkennen. Rankenartige Zellausläufer sichern die Anheftung der Zelle auf dem Plastik der Kulturflasche.

Zweiter Qualitätspunkt ist der Nachweis des Differenzierungspotentials der Ad-MSCs in Knorpel-, Fett- und Knochenzellen. Mittels der oben beschriebenen Färbungen lassen sich die verschiedenen Gewebetypen nach 14 Tagen Differenzierung wie folgt darstellen:

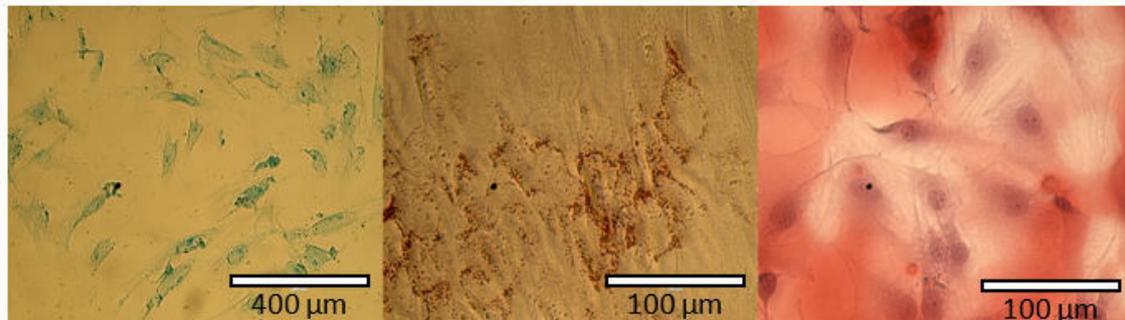


Abbildung 14: Differenzierung der Ad-MSCs in Knorpel-, Fett- und Knochenzellen an Tag 14.

Darstellung in 200- bzw. 400-facher Vergrößerung. Links zeigt sich die chondrogene Differenzierung mittels Alcianblau. Mittig die adipogene Differenzierung durch Öl-Rot O angefärbte Adipozyten und rechts die osteogene Differenzierung mit Alizarin-Rot gefärbten Osteozyten.

Im linken Bild der chondrogenen Differenzierung ist zu erkennen, dass die Mucopolysaccharide der zu Chondrozyten differenzierten Ad-MSCs bläulich gefärbt sind. Die adipogene Färbung mittig zeigt wie Öl-Rot O an die lipophilen Fettvakuolen von adipogen differenzierten Ad-MSCs bindet. Hier ist außerdem zu erkennen, dass nicht alle Zellen gleich viele gefärbte Lipide enthalten. Als Drittes zeigt die Alizarin-Rot Färbung rechts die typisch rote Verfärbung der Zellen, die durch das Anfärben freier Kalziumionen entsteht. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Zellen in die jeweiligen Zelltypen differenzieren können.

Als drittes Qualitätskriterium wurde die aus RNA synthetisierte cDNA der Kulturen mittels PCR daraufhin geprüft, ob spezielle Markergene exprimiert und weitere, wie zu erwarten, nicht exprimiert werden. Nach den Kriterien von Dominici *et al.* (2006) sollen die Marker CD105, CD 90, CD73 positiv sein und die Marker CD 45, CD 34, CD 19, CD 14 und HLA-DR negativ.

Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, exprimierten alle Spender, wenn auch in unterschiedlicher Konzentration, die Markergene CD 105, CD 90 und CD 73, welche nach Dominici *et al.* als spezifisch für mesenchymale Stammzellen gelten (Dominici *et al.*, 2006). Mithilfe der Negativmarker soll der Ausschluss getroffen

werden, dass die Kultur nicht mit anderen Zellen verunreinigt ist. Dies gilt zwar für die Marker CD 45 und CD 19, denn hier ist keine Bande bei den Spendenden auf Höhe der Positivkontrolle erkennbar, nicht jedoch für die Marker CD 34, CD 14 und HLA-DR. Hier zeigen sich bei CD 34 und CD 14 bei allen, und bei HLA-DR bei allen ausgenommen eines Spendenden Banden und damit die Expression des Markergens in den Zellen.

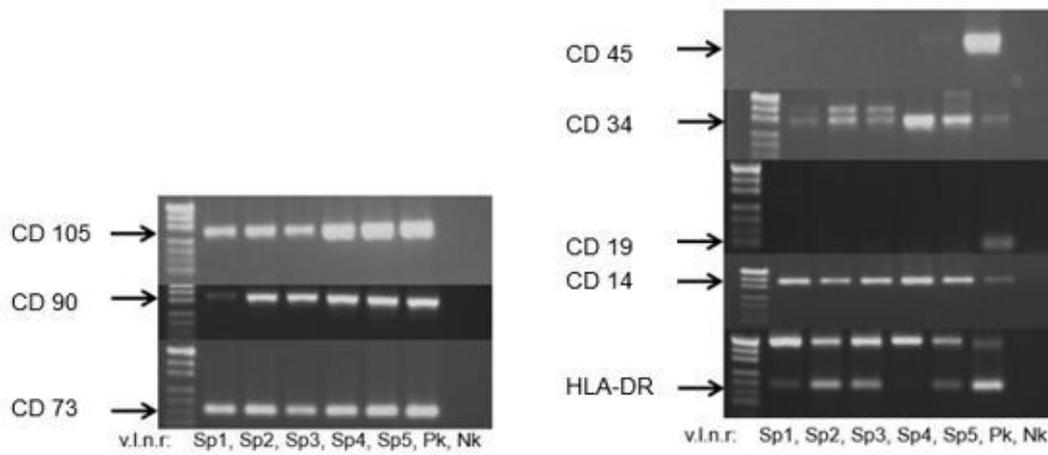


Abbildung 15: PCR-Banden der CD-Marker nach Dominici

Die cDNA-Proben von N = 5 Spendern (= Sp) sind von links nach rechts aufgetragen mit jeweils einer Positivkontrolle (=Pk) und einer Negativkontrolle ohne cDNA Zugabe (=Nk). Die Amplikonlängen liegen für CD 105 bei 288 Bp, für CD 90 bei 346 Bp, für CD 73 bei 155 Bp, für CD 45 bei 360 Bp, für CD 34 bei 311 Bp, für CD 19 bei 132 Bp, für CD 14 bei 396 Bp und für HLA-DR bei 183 Bp.

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Vorversuchen

Die Vorversuche beinhalteten Überlegungen zur Lagerungsfähigkeit und damit Trocknung von Scaffolds, die optimale Vorinkubationszeit der Scaffolds in Medium und die optimal auszusäende Zellzahl.

Beim Resazurinumsatz von SCP-1 Zellen auf Kollagenscaffolds zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Resazurinumsatzes zwischen Zellen auf zuvor getrockneten und dann in Medium eingelegten Scaffolds oder direkt in Medium eingelegten Scaffolds, wie in Abbildung 16 zu sehen.

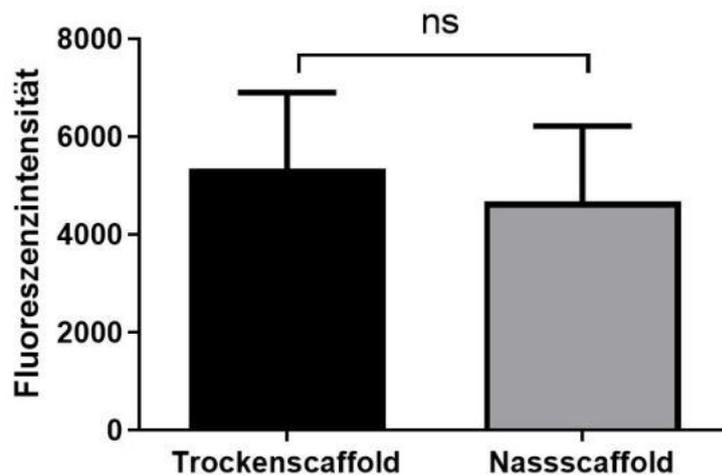


Abbildung 16: Vergleich von Trockenscaffolds zu Nassscaffolds. Fluoreszenzintensität bei Exzitationswellenlänge von 544 nm und Emissionswellenlänge von 590 nm. Resazurinumsatz von SCP-1 Zellen auf im Trocken- und Nasszustand vom Typ Koll mit N = 3 unabhängigen Ansätzen und n = 3 Replikaten. Darstellung der Mittelwerte als Balkendiagramm mit 95 %-Konfidenzintervall. *ns* = nicht-signifikant im Mann-Whitney U Test.

Weiterer Teil der Vorversuche war die Überlegung der optimalen Inkubationszeit der Scaffolds in Medium vor Aussaat. Wie Abbildung 17 zeigt, profitieren die Scaffolds nicht von einer längeren Inkubation in Medium vor der Aussaat, da die Mittelwerte der jeweiligen Kulturbedingungen im Verhältnis zum Gesamtmittelwert aller Bedingungen keine deutlichen Unterschiede aufzeigen. Die Vorinkubation der Scaffolds wurde aufgrund dieser Ergebnisse für die weiteren Versuche auf einen Tag festgelegt.

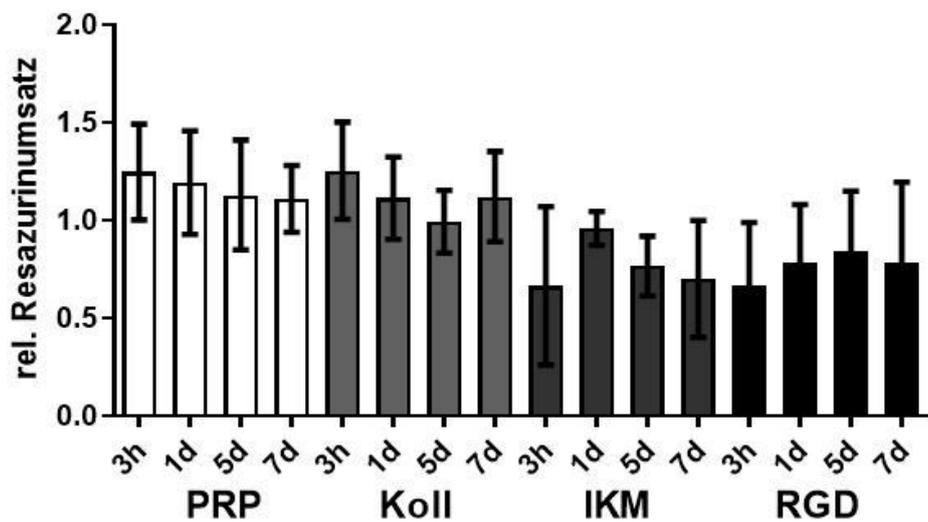


Abbildung 17: Vergleich des Resazurinumsatzes von SCP-1 Zellen auf Kollagenscaffolds bei unterschiedlicher Vorinkubationszeit. Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei Exzitationswellenlänge von 544 nm und Emissionswellenlänge von 590 nm mit N = 3 unabhängigen Ansätzen und jeweils n = 3 Replikaten. Darstellung der Mittelwerte im Verhältnis zum Mittelwert aller Bedingungen als Balkendiagramm mit 95%-Konfidenzintervall.

Zuletzt war es von Bedeutung mit welcher Zellzahl die Scaffolds besiedelt werden. Wie Abbildung 18 zeigt, gibt es grob einen linearen Anstieg des Resazurinumsatzes bis knapp über  $3 \cdot 10^4$  Zellen pro Scaffold. Eine zweite Phase des stärker linear ansteigenden Bereichs bis zu einer Besiedelung von knapp  $5 \cdot 10^4$  Zellen und eine dritte Phase noch größerer Steigung jenseits der  $5 \cdot 10^4$  Zellen. Im Kontext der Zahl der verfügbaren Spender wurde die Zahl der ausgesäten Zellen infolge auf 16 666 Zellen in 3D und  $10^4$  Zellen in 2D festgelegt.

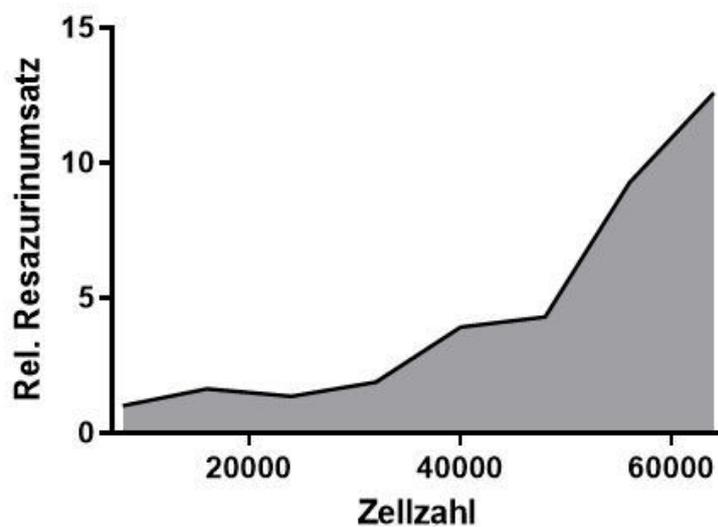


Abbildung 18: Durchschnittlicher Resazurinumsatz von SCP-1 Zellen in unterschiedlicher Besiedelungszahl pro Scaffold im Verhältnis zum Gesamtmittelwert der Scaffolds vom Typ Koll.

Auswertung von  $N = 3$  unabhängigen Ansätzen und  $n = 3$  Replikaten.

### 3.4 Viabilität und Besiedelungsmuster der Zellen auf den Scaffolds

Lebende Zellen auf den Scaffolds wurden mittels Calcein-AM an den Messpunkten während der Differenzierung angefärbt.

Folgende Bilderserie (Abbildung 19) zeigt die besiedelten Scaffolds an Tag 0 in der Aufsicht und im Querschnitt im Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung:

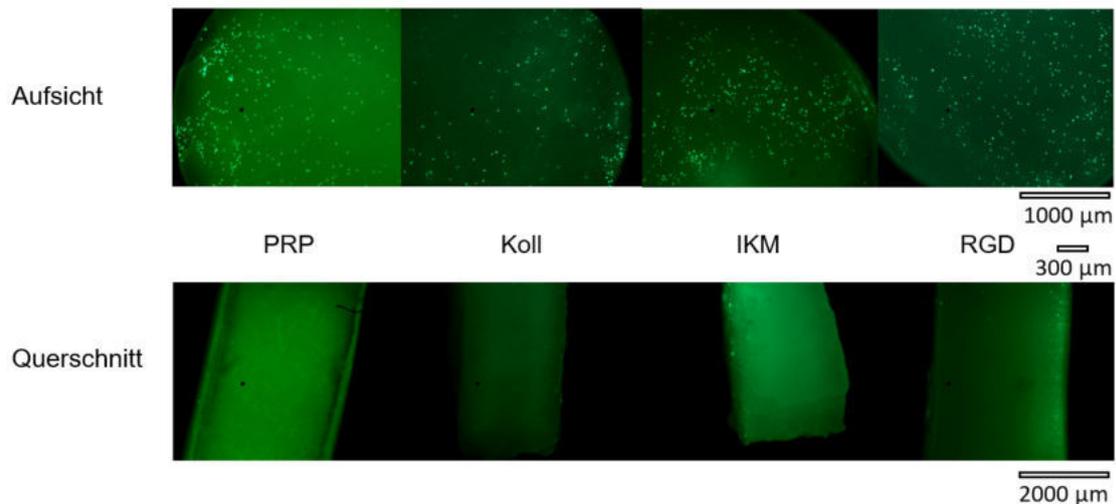


Abbildung 19: Scaffoldbesiedelung an Tag 0 in Aufsicht und Querschnitt Ansicht bei 100-facher und 200-facher Vergrößerung. Ein gleichmäßiges Besiedelungsmuster an der Scaffoldoberfläche und eine wenige µm in das Scaffold hineinreichende Besiedelung sind zu erkennen.

In den Abbildungen ist zu erkennen, dass sich die Zellen gleichmäßig auf der oberen Fläche verteilen, die Besiedelung im Inneren der mittig, vertikal geschnittenen Scaffolds jedoch gering ist. Von den 1,5 mm Scaffoldhöhe drangen die Zellen bis zu 300 µm in die Scaffolds ein, sodass in diesem Bereich eine dreidimensionale Kultur entstand.

Weiterhin ist es von großer Relevanz zu untersuchen wie sich das Besiedelungsmuster im Verlauf der Differenzierung ändert. Da Calcein-AM lediglich lebende Zellen färbt, ist die Färbung und Untersuchung an Tag 14 ein indirekter Marker, um die Viabilität im Verlauf der Differenzierung zu beurteilen. In folgen-

der Abbildung 20 sind die Aufsichten der Scaffolds im Verlauf der Differenzierung im Fluoreszenzmikroskop bei 100-facher Vergrößerung zu sehen:

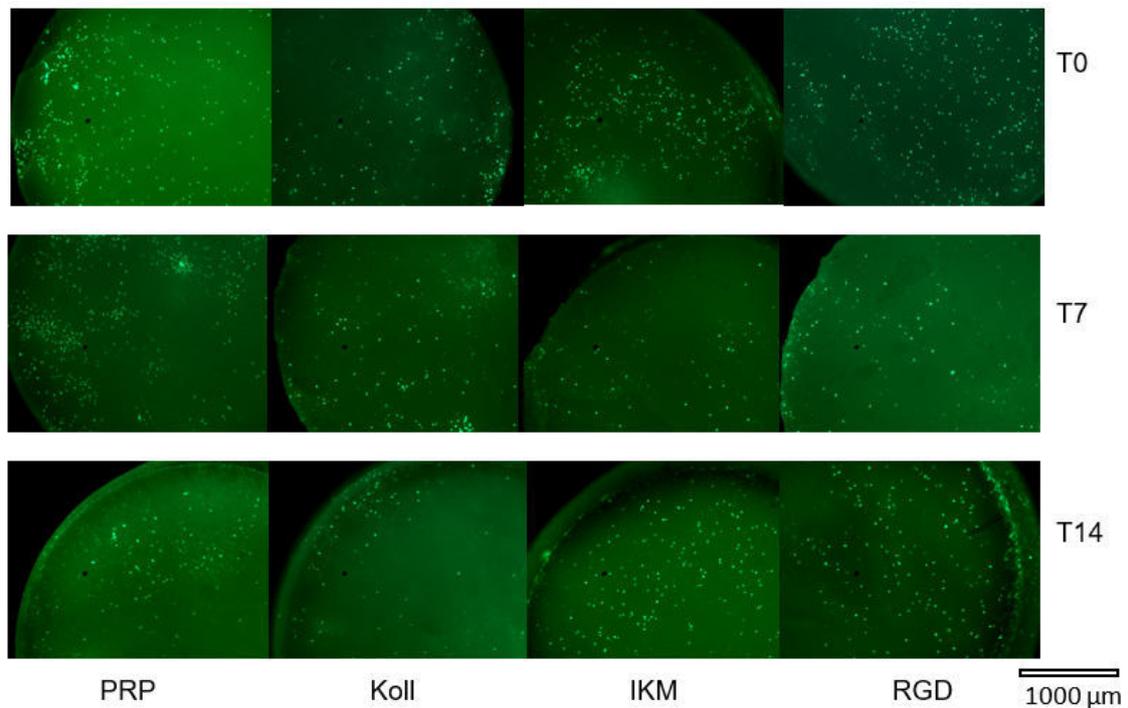


Abbildung 20: Besiedelung der Scaffoldoberfläche während der Differenzierung an Tag 0, Tag 7 und Tag 14. Aufsicht bei 100-facher Vergrößerung nach Färbung der lebenden Zellen mit Calcein-AM.

In den Abbildungen ist zu erkennen, dass die Oberfläche der Scaffolds im Verlauf der Differenzierung von Tag 0 bis zum Ende der Differenzierung lebende Zellen trägt. Ein Überleben der Zellen auf den Scaffolds ist somit sichergestellt. Die Zellzahl pro Scaffold scheint dem optischen Eindruck nach grob gleichbleibend zu sein.

### 3.5 Auswertung der Funktionsparameter

#### 3.5.1 Resazurinumsatz

Der Resazurinumsatz der Kulturen wurde an den jeweiligen Messtagen bestimmt und von einem Blankowert abgezogen, wie in

dargestellt. Auffällig ist, dass der Resazurinumsatz in der 2D-Kultur stets deutlich höher ist als die Werte der 3D-Kulturen. Außerdem zeigen sich die höchsten Werte des Resazurinumsatzes jeweils an Tag 0, während sie im Verlauf der weiteren Differenzierung abfallen.

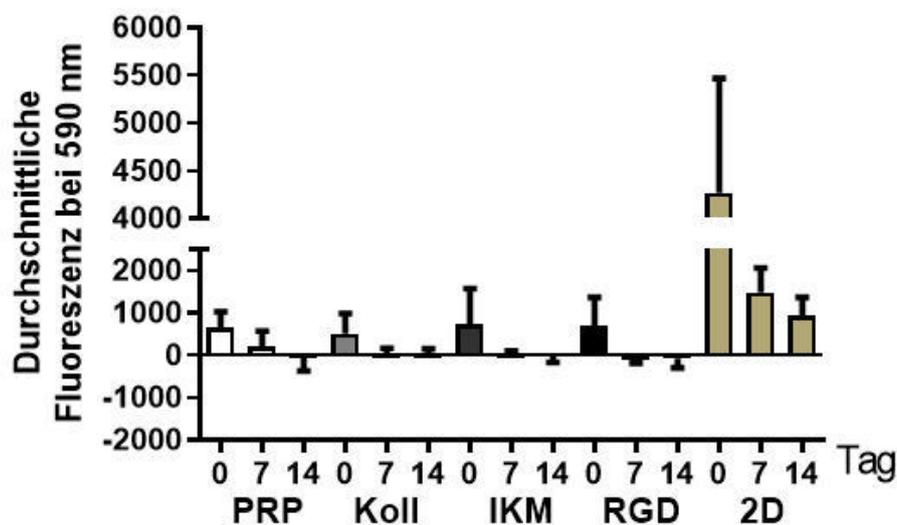


Abbildung 21: Resazurinumsatz der Ad-MSCs auf den verschiedenen Scaffoldtypen.

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität des Resorufin bei Exzitationswellenlänge von 544 nm und Emissionswellenlänge von 590 nm. Darstellung der Mittelwerte als Balkendiagramm mit 95%-Konfidenzintervall an Tag 0,7 und 14 von den Scaffoldtypen PRP, Koll, IKM, RGD und 2D nach Abzug eines Blankowerts mit  $N = 3$  unabhängigen Ansätzen und  $n = 3$  Replikaten. Die Werte zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede im Resazurinumsatz zwischen den verschiedenen Scaffolds und den jeweiligen Zeiträumen im Kruskal-Wallis Test und Dunn's Test für multiple Vergleiche.

### 3.5.2 Glukoseverbrauch der Zellen

Von den 5 Kulturbedingungen wurde jeweils an den Tagen 0, 7 und 14 der Glukoseverbrauch gemessen. Hier zeigte sich ein sehr heterogener Verbrauch, wie in Abbildung 22 zu sehen ist. Für die 3D-Kulturen ist dabei der Trend zu erkennen, dass der Verbrauch an Tag 14 geringer ist im Vergleich zu Beginn der Kultur, während in der 2D-Kultur der genau gegenteilige Effekt zu erkennen ist. Die Verbrauchswerte zeigen zwischen den verschiedenen Bedingungen eine erhebliche Streubreite auf, sodass die Unterschiede nicht signifikant waren.

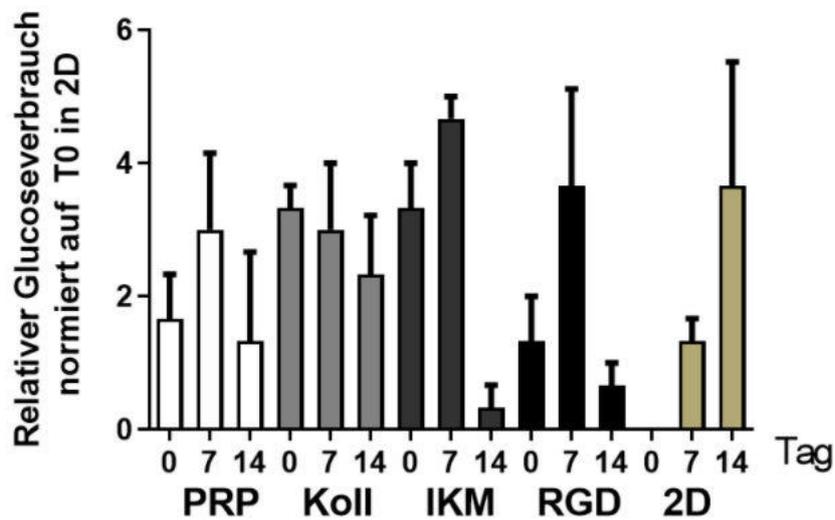


Abbildung 22: Glukoseverbrauch der Ad-MSCs auf Scaffolds. Auswertung von N = 3 unabhängigen Ansätzen nach Poolen von n = 3 Triplikaten. Darstellung der Mittelwerte als Balkendiagramm mit dem Standardfehler des Mittelwerts an Tag 0, 7 und 14 der vier Scaffoldtypen. Werte normiert auf Tag 0 der 2D-Kultur.

### 3.5.3 Aktivität der alkalischen Phosphatase

Mit Werten zwischen 0,2 bis 0,4 pmol/min in der 3D-Kultur ist die gemessene alkalische Phosphatase Aktivität an Tag 0 in allen Bedingungen mit Ausnahme der Bedingung PRP am höchsten und fällt im Verlauf ab (siehe Abbildung 23). Der Wert an Tag 0 der 2D-Kultur ist mit 1,6 pmol/ min deutlich höher im Vergleich zu 3D-Kultur. Während der Differenzierung nimmt die Aktivität der AP in allen Kulturbedingungen ab, und steigt nur bei PRP und IKM zum Ende der Differenzierung hin an. Die Werte unterliegen dabei einer sehr großen Streuung und zeigen nur zwischen Tag 0 und 14 der 2D-Kultur signifikante Unterschiede. Die Werte der 2D-Kultur sind von Tag 0 bis Tag 14 konstant fallend.

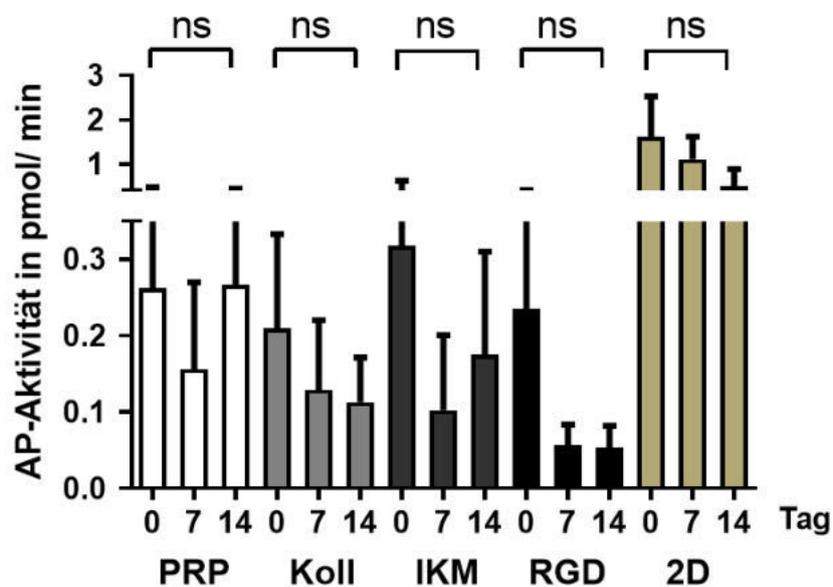


Abbildung 23: AP-Aktivität der Ad-MSCs auf den vier Scaffoldtypen. Darstellung der Mittelwerte als Balkendiagramm mit 95 %-Konfidenzintervall an Tag 0,7 und 14 von den Scaffoldtypen PRP, Koll, IKM, RGD, sowie der 2D-Kultur nach Abzug eines Blankowerts mit N = 3 unabhängigen Ansätzen und n = 3 Replikaten; *ns* = nicht-signifikant im Kruskal-Wallis Test und Dunn's Test für multiple Vergleiche.

### 3.6 Quantifizierung des DNA-Gehalts der besiedelten Scaffolds

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts erfolgte eine photometrische Bestimmung, deren Ergebnisse in der Abbildung 24 zu sehen sind. Hier zeigt sich ein nicht-signifikanter Unterschied des DNA-Gehalts zwischen den 3D- und 2D-Kulturen zugunsten der 3D-Kultur. Generell zeigt sich in den vier Kulturbedingungen in 3D ein tendenziell gleichbleibender Gehalt der DNA im Verlauf der Differenzierung. In der 2D-Kultur steigt der gemessene Wert im Verlauf der Differenzierung kontinuierlich an.

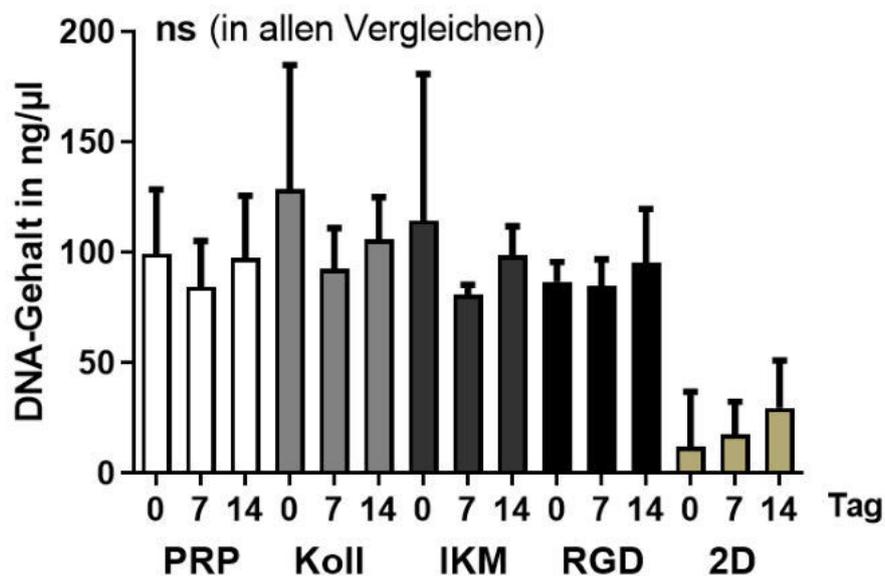
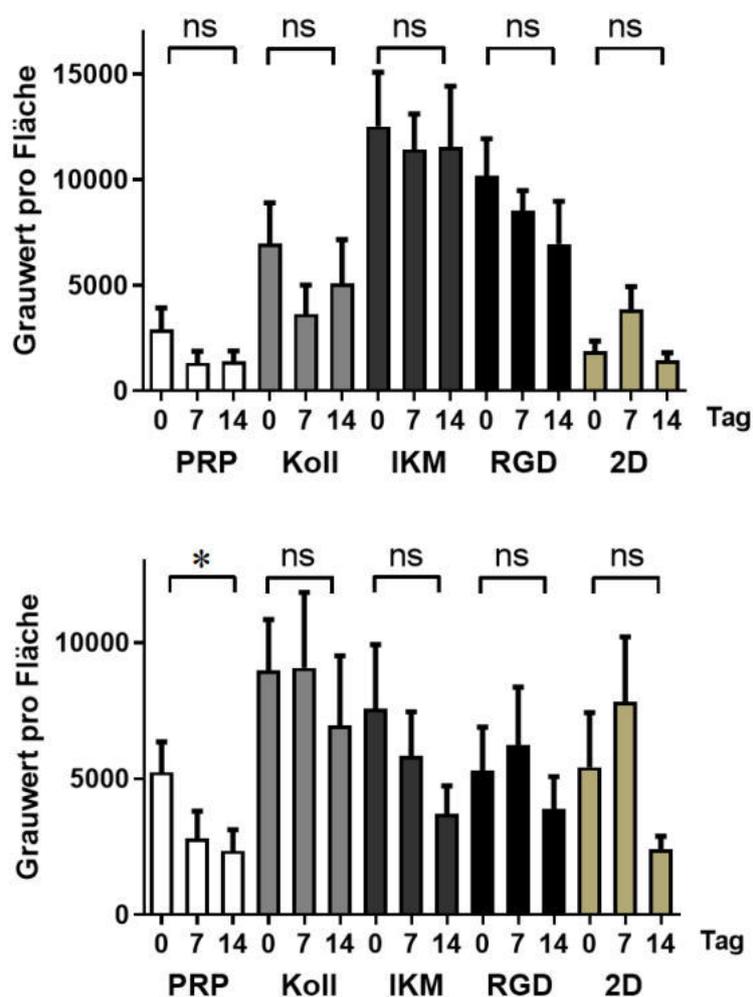


Abbildung 24: DNA-Gehaltsbestimmung der besiedelten Scaffoldtypen im zeitlichen Verlauf.

Darstellung der Mittelwerte des DNA-Gehalts in ng/μl als Balkendiagramm mit 95 %-Konfidenzintervall an Tag 0,7 und 14 von den Scaffoldtypen PRP, Koll, IKM, RGD, sowie der 2D-Kultur nach Bestimmung durch Absorptionmessung. Auswertung von N = 3 unabhängigen Ansätzen und n = 3 Replikaten; ns = nicht-signifikant im Kruskal-Wallis Test und Dunn's Test für multiple Vergleiche.

### 3.7 Messung der Transkriptionsfaktoren Runx 2, Osterix und des Faktors OPG

Bei der Auswertung der Proteinquantifizierungen wurden die Marker Osteocalcin und RANKL ausgeschlossen, da die Signale bei der Detektion nicht ausreichend waren. Die Proteine Runx 2, Osterix und OPG ließen sich hingegen ausreichend detektieren und die Leuchtintensität der verschiedenen Bedingungen miteinander vergleichen, wie in Abbildung 25 zu sehen ist.



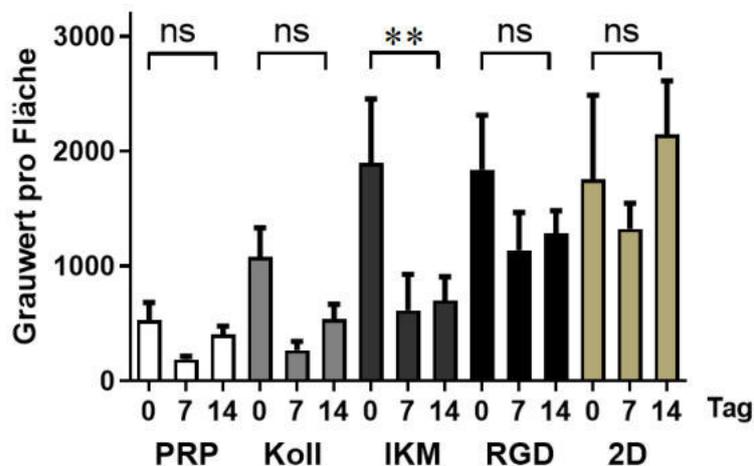


Abbildung 25: Grauwerte der Dot-Signale im Dot-Blot von Runx 2 , Osterix und OPG.

Für Runx 2 (oben), Osterix (mittig) und OPG (unten) wurden N = 3 unabhängige Ansätze durchgeführt. Auf die Membranen wurden pro Dot je 3 Replikate gepoolt aufgetragen. Die Detektion erfolgte bei Belichtungszeiten von 20 s, 30 s und 40 s. Darstellung der Mittelwerte als Balkendiagramm mit 95 %-Konfidenzintervall an Tag 0, 7 und 14 von den Scaffoldtypen PRP, Koll, IKM, RGD, sowie der 2D-Kultur. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; und *ns* = nicht-signifikant im Kruskal-Wallis Test und Dunn's Test für multiple Vergleiche.

Die gemessenen Werte und damit spezifischen Proteinkonzentrationen zeigen für nahezu alle Blots der 3D-Kultur das stärkste Signal an Tag 0, während das Signal an Tag 7 meist abfällt. An Tag 14 kann bei einigen Blots ein Wiederanstieg des Signals erkannt werden. Gegenteiliges zeigt sich in der 2D-Kultur: Hier ist das Signal von Tag 0 zu Tag 7 hin meist ansteigend und gegen Tag 14 hin wieder fallend mit Ausnahme von OPG. Diese Blots verhalten sich dazu gegensätzlich mit zwei Hochpunkten an Tag 0 und Tag 14. Auffällig ist, dass die Grauwerte zu Beginn der Differenzierung in vielen Bedingungen der 3D-Kultur am höchsten sind.

### 3.8 Vergleich der Steifigkeit der Scaffolds vor und nach Besiedelung

Zur Überprüfung, ob die osteogen-differenzierenden Zellen auf den Scaffolds Knochenmatrix bilden, wurde die Steifigkeit vor Besiedelung und nach Differenzierung gemessen. Die Annahme hierbei ist, dass die Zellen knochenspezifische Matrix bilden, die die Steifigkeit des Scaffolds steigen lassen. In Abbildung 26 ist die Entwicklung der Steifigkeit der Scaffolds vor und nach Besiedelung zu sehen.

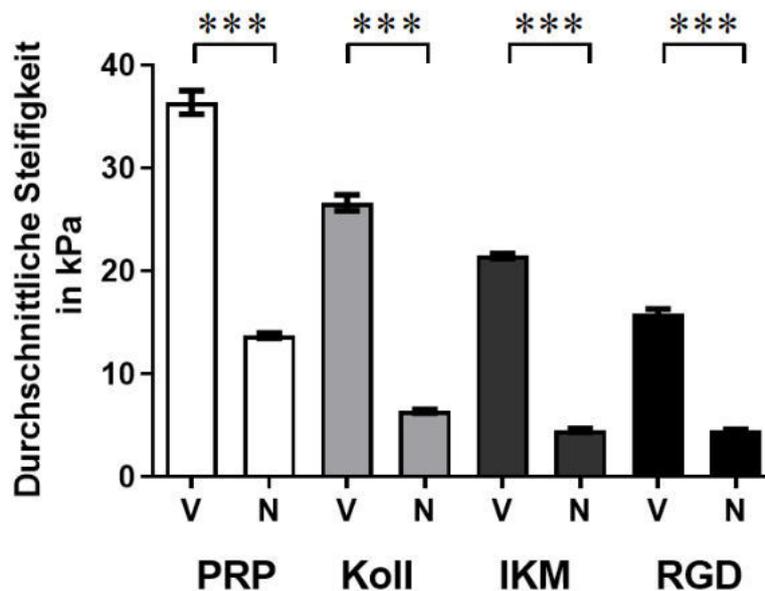


Abbildung 26: Steifigkeit der Scaffolds in kPa vor und nach Differenzierung. Auswertung von N= 3 unabhängigen Ansätzen und n > 1 Replikaten. Darstellung der Mittelwerte als Balkendiagramm mit 95 %-Konfidenzintervall. \*\*\* =  $p < 0,001$  im Kruskal-Wallis Test und Dunn's Test für multiple Vergleiche.

Unter den vier verschiedenen 3D-Kulturbedingungen zeigt sich vor und nach Besiedelung in jeder Bedingung eine signifikante Abnahme der Steifigkeit mit Werten bis zu etwa 23 kPa Steifigkeitsverlust beim Scaffold PRP. Auch nach der Differenzierung bleibt die Reihenfolge der Steifigkeit zueinander unverändert und PRP ist weiterhin das steifste Scaffold, gefolgt von Koll, IKM und RGD. Der Steifigkeitsverlust scheint bei jedem Scaffold etwa im gleichen Verhältnis stattzufinden.

### 3.9 Auswertung der CT-Grauwerte der Scaffolds

Sollten knochendifferenzierte Zellen Knochenmatrix produzieren, ist davon auszugehen, dass im CT die Dichte und damit der sogenannte Grauwert zunimmt. Die erhaltenen Resultate legen jedoch anderes nahe, wie in Abbildung 27 zu sehen.

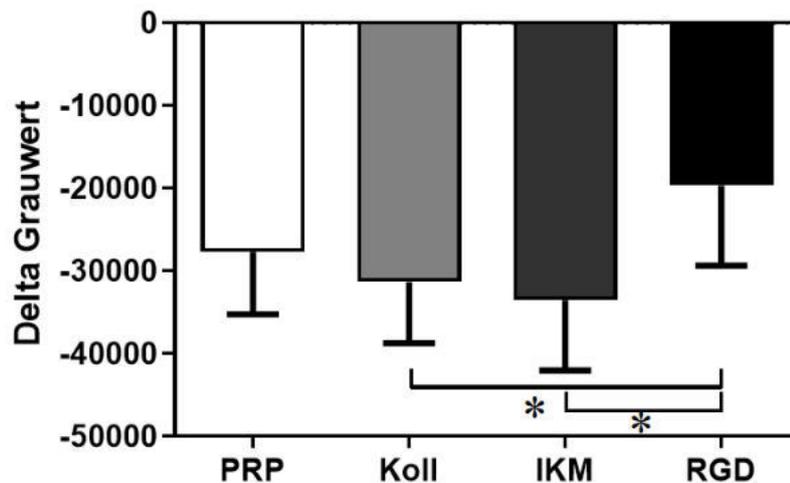


Abbildung 27: Delta des Grauwerts im CT zwischen unbesiedelten Scaffolds und nach 14 Tagen Differenzierung.

Auswertung von N = 3 unabhängigen Ansätzen und n = 3 Replikaten. Darstellung der Mittelwerte als Balkendiagramm mit 95 %-Konfidenzintervall. \* =  $p < 0,05$  im Kruskal-Wallis Test und Dunn's Test für multiple Vergleiche.

Die Differenz der Grauwerte der unbesiedelten Scaffolds nach Abzug des Blankwertes und der besiedelten Scaffolds nach 14-tägiger Differenzierung und Abzug des Blankwertes zeigt sich negativ. Die Unterschiede zwischen den Scaffolds sind dabei zwischen den Bedingungen Koll und RGD, sowie IKM und RGD signifikant. Auffällig ist, dass der Unterschied bei den Scaffolds mit den größten Poren tendenziell höher ausfällt.

### 3.10 Auswertung von Zytokinarrays zum Vergleich des Scaffolds PRP und IKM

Ein weiterer Fokus des Projekts bestand darin genauere Unterschiede auf Ebene der Zytokine zwischen PRP aus Blutproben und IKM von THP-1 Zellen herauszuarbeiten. Von den insgesamt 80 untersuchten Zytokinen ergab sich bei 42 Zytokinen ein relativer Unterschied von mehr als 20 % Signalstärke, in 38 Fällen fielen die Unterschiede geringer aus. In 31 Fällen war dabei die Konzentration der Zytokine der THP-1 Zellen höher, in 11 Fällen die Konzentration des PRP. In Abbildung 28 sind die Signalwerte der Zytokine dargestellt, bei denen der Unterschied besonders groß ausfiel:

	THP-1	PRP		THP-1	PRP		THP-1	PRP
<b>Angiogenin</b>	539	676	<b>IL-10</b>	7	12	<b>MDC</b>	129	28
<b>BDNF</b>	265	103	<b>IL-12</b>	75	99	<b>MIG</b>	36	17
<b>BLC</b>	74	53	<b>IL-13</b>	25	18	<b>MIP-1 delta</b>	49	61
<b>Ck-beta 8-1</b>	80	56	<b>IL-1-alpha</b>	32	25	<b>MIP-3</b>	53	42
<b>EGF</b>	233	325	<b>IL-4</b>	66	44	<b>NAP-2</b>	84	114
<b>FGF-6</b>	81	60	<b>IL-5</b>	26	19	<b>OPN</b>	150	75
<b>FGF-7</b>	40	27	<b>IL-6</b>	13	4	<b>OSM</b>	137	72
<b>FGF-9</b>	234	113	<b>IL-7</b>	38	64	<b>SCF</b>	70	24
<b>G-CSF</b>	8	4	<b>IP-10</b>	181	239	<b>SDF-q</b>	146	205
<b>GM-CSF</b>	10	4	<b>I-8</b>	24	8	<b>TGF beta 1</b>	44	32
<b>GRO alpha</b>	103	56	<b>Leptin</b>	92	135	<b>TGF beta 2</b>	168	322
<b>HGF</b>	81	41	<b>MCP-1</b>	42	32	<b>TNF beta</b>	64	166
<b>IFN-gamma</b>	81	61	<b>MCP-3</b>	62	43	<b>TPO</b>	62	28
<b>IGFBP-3</b>	39	31	<b>M-CSF</b>	109	30	<b>VEGF-A</b>	123	80

Abbildung 28: Mittelwerte der Signalstärke verschiedener Zytokine in THP-1 Proben und Proben von PRP.

Bei verschiedenen Belichtungszeiten wurde die Signalintensität der verschiedenen Zytokine bestimmt und nach Abzug eines Blankowerts deren Mittelwert errechnet. Mit rot-weißen Kontrasten wird die Größe des Unterschieds der durchschnittlichen Signalstärken farblich dargestellt, wobei rot einen im Verhältnis höheren Wert und weiß den niedrigeren Wert repräsentiert.

Herausgreifend sollen einige Zytokine in Gegenüberstellung genauer betrachtet werden, da diese für die Differenzierungsprozesse von Ad-MSCs besonders entscheidend sein können (vgl. *Ducy et al.*, 2000; *Kim et al.*, 2015; *Upadhyay et al.*, 2015; *Zha et al.*, 2017; *Zheng et al.*, 1992) und in Abbildung 29 aufgeführt sind. Angiogenin als Zytokin zur Unterstützung der Angiogenese (*Kim et al.*, 2015) ist nicht signifikant höher in PRP im Vergleich zu THP-1, VEGF-A ist hingegen signifikant höher im Überstand von THP-1. Das Zytokin Interferon- $\gamma$  als Modulator von Immunprozessen (*Zha et al.*, 2017) ist im Überstand von THP-1 signifikant höher vertreten. Auch bei der Liste der Interleukine zeigt sich eine höhere Konzentration beim Kulturüberstand von THP-1, während hemmende Interleukine wie IL-10 (*Zheng et al.*, 1992) im THP-1 Medium geringer vorhanden sind. Der Blick auf die Zytokine der FGF-Gruppe, die die Zellproliferation beeinflussen (*Zheng et al.*, 1992), zeigt teils signifikant, aber mitunter auch nicht signifikant höhere Konzentrationen bei THP-1. Leptin als Zytokin mit einem entscheidenden Einfluss auf den Fettstoffwechsel (*Ducy et al.*, 2000; *Upadhyay et al.*, 2015) zeigt signifikant höhere Konzentrationen im Zusatzstoff PRP.

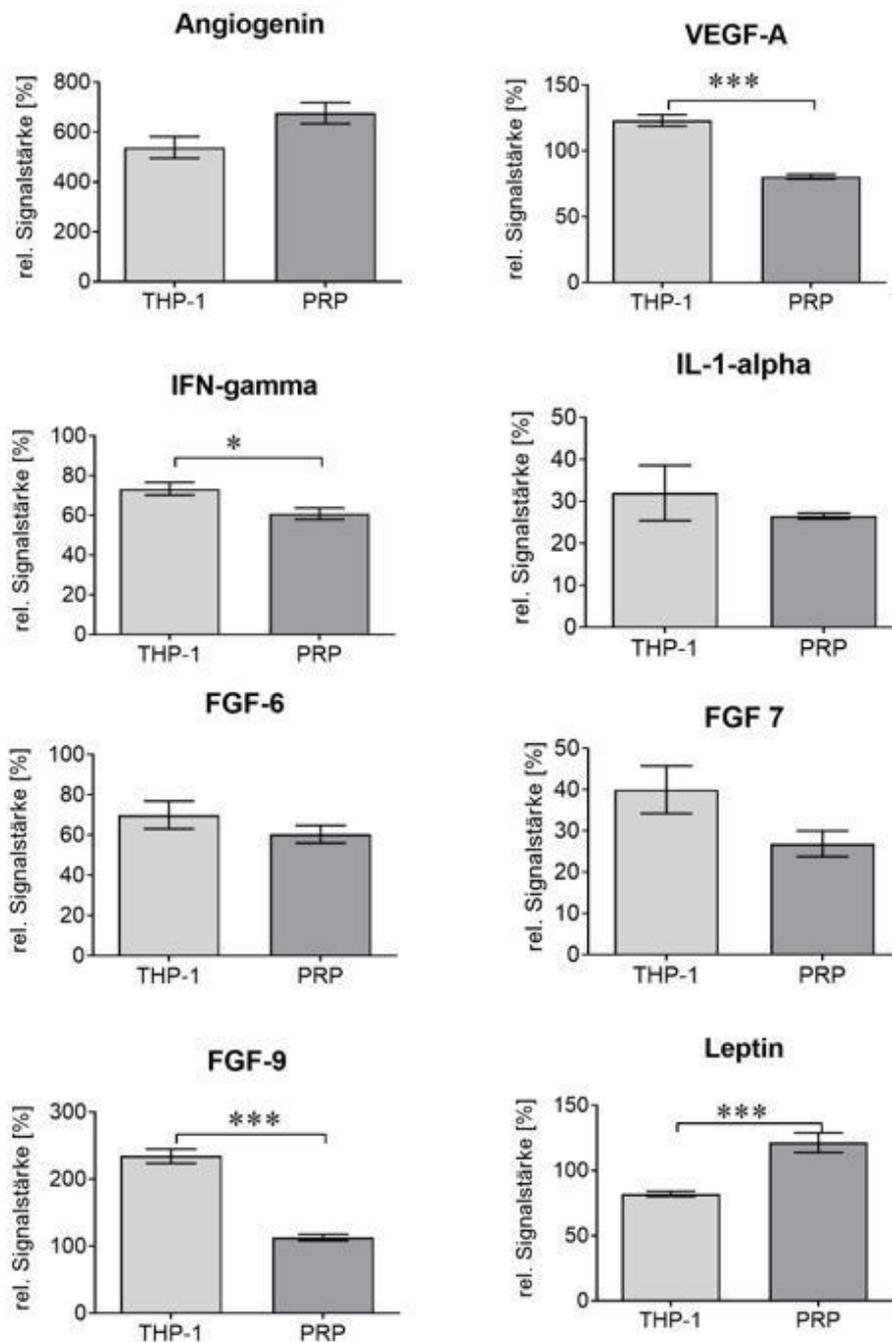


Abbildung 29: Gegenüberstellung der Mittelwerte der Signalstärke von Zytokinen jeweils von Angiogenin, vaskulär-endothelialelem Wachstumsfaktor-A (=VEGF-A), Interferon- $\gamma$  (=IFN- $\gamma$ ), Interleukin-1- $\alpha$  (=IL-1- $\alpha$ ), Fibroblasten-Wachstumsfaktor 6 (= FGF-6), FGF-7, FGF-9 und Leptin im THP-1 Medium im Vergleich zu PRP.

Darstellung der Mittelwerte als Balkendiagramm mit Standardfehler. \*\*\* =  $p < 0,001$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$  im Mann-Whitney U Test.

## 4. Diskussion

Für die bessere Versorgung von Knochendefekten wurden vier verschiedene Kryogeltypen, die zuvor im Labor entwickelt wurden, auf Ihre physikalischen Parameter überprüft und die Inhaltsstoffe des PRP und IKM Scaffolds nochmals speziell mittels Zytokinarrays verglichen.

Auf dieser Basis wurden die Scaffolds mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe besiedelt und für 14 Tage differenziert. Aus verschiedenen Perspektiven wurden mittels Resazurinmessung, Glukoseumsatzbestimmung, Messung der AP-Aktivität und der Sekretion verschiedener Proteine die Stoffwechselaktivität gemessen. Die Bestimmung des DNA-Gehalts diente zur Überwachung des Überlebens. Zuletzt wurde durch Messung der Steifigkeitsveränderungen und Änderungen des Grauwerts im CT untersucht, ob die 3D- Kultur der 2D- Kultur überlegen ist und welcher Scaffoldtyp hierbei die besten Ergebnisse liefert.

### 4.1 Rezeptur und Herstellung der Scaffolds

In Vorversuchen des Siegfried-Weller-Instituts wurde die Grundrezeptur der Scaffolds entwickelt. Hierbei konnte von Häussling *et al.* gezeigt werden, dass sich bei Änderung der Rezeptur, Verhalten und physikalische Parameter, insbesondere die Steifigkeit und Porengröße, verändern (Häussling *et al.*, 2019). Auf diese Weise können die Scaffolds für die Erfordernisse eines adäquaten Knochenersatzes weiterentwickelt werden und an die physiologischen Bedingungen im Körper bezüglich Nährstoffaustausch und Funktionalität angepasst werden.

Bei der Rezeptur der Scaffolds wurden mit TEMED und Bisacrylamid sehr toxische Substanzen dem Scaffold hinzugefügt, sodass gewährleistet sein muss, dass diese Substanzen zu nicht toxischen Produkten reagieren (Jain und Kumar, 2013). Dies kann durch eine vollständige Polymerisation erreicht werden. Daher gelten die verwendeten Scaffolds als nicht-toxisch und sind bei der Besiedelung für die Zellen nicht schädlich (Kumari und Kumar, 2017).

## 4.2 Die Wahl der Zusatzstoffe PRP, Koll, IKM und RGD

Mithilfe der Grundrezeptur der Scaffolds wurden durch Zusatz verschiedener Proteinquellen vier verschiedene Scaffolds entwickelt. PRP im ersten Scaffold sollte durch die im Plasma enthaltenen Zytokine die osteogene Differenzierung verbessern. Zukünftig könnte hier direkt patienteneigenes Plasma verwendet werden und nicht wie im vorliegenden Fall eine Standardprobe, so dass sich weitere Vorteile bei der Biokompatibilität und Transplantationsakzeptanz ergeben könnten (Nikolidakis und Jansen, 2008). PRP konnte bereits einen Zusatznutzen hinsichtlich der Knochenneubildung in anderen Versuchen zeigen (Yamada *et al.*, 2004). Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen auf, dass PRP als Zutat günstige Wachstumsbedingungen für das Scaffold erbringen kann, da es Scaffolds akzeptabler physikalischer Parameter hervorbrachte, auf denen die Zellen 14 Tage überlebten. Die Zellen wurden in ihrem Stoffwechsel durch die enthaltenen Zytokine angeregt und die Differenzierung und Zellaktivität dadurch unterstützt.

Beim zweiten Scaffold wurde Kollagen aus Rattenschwänzen extrahiert (vgl. Knobloch *et al.*, 2012) und der Scaffoldgrundrezeptur zugefügt. Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein im menschlichen Knochen (Clarke, 2008) und soll daher eine physiologische Umgebungsbedingung für die Zellen erbringen. Kollagen wurde zugleich bereits vielfach im Tissue Engineering eingesetzt und gilt als bewährtes Material (Chen *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2003). Allerdings verhält sich Kollagen als Material komplex, dadurch dass es relativ leicht durch Zellen abgebaut werden kann (Ferreira *et al.*, 2012). Die im CT gezeigten Befunde der Matrixdegradierung könnten deshalb mit der Materialwahl Kollagen zusammenhängen.

Die dritte Proteinquelle, das IKM, bietet ähnlich wie PRP verbesserte Umgebungsbedingungen durch die darin enthaltenen Zytokine (Braddock *et al.*, 2001), allerdings in anderer Konzentration. Die Gegenüberstellung dieser beiden Proteinquellen kann daher den Nutzen der Beiden im Vergleich herausarbeiten. Hier zeigte sich in den Versuchen, dass das Scaffold IKM mehr Zytokine beinhaltet, die die Proliferation stützen, allerdings auch inhibierende Zytokine

wie INF- $\gamma$ - und IL-1- $\alpha$  (Zha *et al.*, 2017). Auf Seiten der Zytokine, die die Vaskularisierung verstärken, konnte kein eindeutiger Vorteil zwischen den beiden Zusatzstoffen ausgemacht werden. Insgesamt sind beim Scaffold IKM mehr Zytokine der Zellproliferation aktiviert (FGF-Gruppe), während gleichzeitig die osteogene Differenzierung hemmende Zytokine wie Interferon- $\gamma$  höher vorliegen.

Beim vierten Scaffold wurden RGD-Peptide der Grundrezeptur hinzugefügt. RGD-Peptide werden vielfach benutzt, um Zellen die Anheftung an Materialien zu erleichtern (Bellis, 2012; Hersel *et al.*, 2003; Muduli *et al.*, 2017). Im Projekt wurde bei der Konzentration der RGD-Peptide auf den Versuchsansatz von Mackova *et al.* (Mackova *et al.*, 2016) zurückgegriffen. Dabei sollen ausreichend RGD-Peptide nicht nur in der Tiefe der Matrix, sondern auch an den Wandoberflächen vorhanden sein. Da die Scaffolds RGD in der Gesamtbeurteilung, sowohl bei den physikalischen Parametern, als auch bei den Parametern der Zellaktivität und Differenzierung hinter den anderen Scaffolds zurückblieben, ist die RGD-Dosis nochmals zu überprüfen.

#### **4.3 Die physikalischen Parameter der Scaffolds**

Für die Versuchsreihen wurden Kryogele produziert und mit einem Hobel in Scaffolds mit 6 mm Durchmesser und 1,5 mm Höhe geschnitten. Aufgrund dieser Maße passt das Scaffold passgenau in eine 96-Kavitätenplatte. Für das Fernziel der Verwendung als Knochenersatzmaterial wirft diese Form Vorteile und Risiken auf. Je kleiner das Scaffold, desto besser sind Vaskularisierung und gleichmäßige Besiedelung zu erreichen, weil die nötige Eindringtiefe von Zellen und neu ausgebildeten Gefäßen geringer ist (Ko, 2007). Für die Knochenrekonstruktion sind daher diese beiden Effekte besonders wichtig (Hutmacher, 2001). Gleichzeitig verlässt das Produkt immer weiter die Zielvorgabe, nämlich den menschlichen Knochen zu rekonstruieren, der sich in der Regel mit deutlich größeren Maßen präsentiert. Für Modellsysteme könnte das kleine Format jedoch ideal sein, um viele Kulturbedingungen parallel zu erstellen. Für das Rekonstruieren eines Knochendefekts könnte es jedoch von Vorteil sein größere Matrices zu verwenden, weil diese direkt an die menschliche Knochenkontur

angepasst werden könnten (Hutmacher, 2001). Die Perspektive zukünftig Matrices direkt mittels 3D-Druck in der physiologischen Knochenkontur zu drucken, eröffnet daher neue Therapiepotentiale (De Mori *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2020).

Besonders untersuchenswert wäre außerdem ein Vergleich zwischen großen und kleinen Scaffolds dieser Herstellungsart, da sie anteilmäßig einen unterschiedlich hohen Anteil an Oberfläche bieten. Da die Kulturbedingungen zwischen randständig und tief angesiedelten Zellen hinsichtlich Zell-Zell-Interaktion und Nährstoffversorgung womöglich sehr unterschiedlich ausfallen, wären die Unterschiede von großem Interesse. Ein kleines Scaffold bietet relativ zum Volumen betrachtet viel Oberfläche, ein großes Scaffold im Verhältnis zum Volumen wenig, sodass die physikalischen Ausgangsbedingungen daher stark variieren (Kapfer *et al.*, 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der Zellen zudem von der Rauigkeit der Scaffolds abhängt, weshalb auch hier die Scaffoldstruktur und der Schneidevorgang das Besiedelungsverhalten beeinflussen (Faia-Torres *et al.*, 2014).

Die in diesem Projekt verwendeten Scaffolds wurden in den Dimensionen Porengröße, Steifigkeit und Porosität vermessen.

Die Porengröße lag dabei bei den verwendeten Scaffolds rund 20 % unterhalb des in der Literatur für Knochenzellen als minimal angesehenen Wertes von 100  $\mu\text{m}$  (Bose *et al.*, 2012; Murphy und O'Brien, 2010) beim Scaffold mit den größten Poren. Diese Abweichung von rund 20  $\mu\text{m}$  bzw. 61  $\mu\text{m}$  bewirkt für die Zellen eine veränderte Stoffwechselumgebung. Bei kleinen Poren können Zellen wesentlich schlechter in das Innere des Scaffolds eindringen. Entscheidend ist hier zudem die Interkonnektivität der Poren. Zellen, die ins Innere eingedrungen sind, werden durch geringeren Nährstoffaustausch wesentlich schlechter versorgt (Murphy und O'Brien, 2010). Zusätzlich werden Vaskularisierungsprozesse im Scaffold bei geringer Porengröße behindert. Einige Studien legen deshalb sogar nahe Porengrößen von über 300  $\mu\text{m}$  zu produzieren, da hier Vaskularisierungsprozesse und die osteogene Differenzierung verbessert werden können (Roosa *et al.*, 2010; Tsuruga *et al.*, 1997). Entscheidend ist außerdem,

dass Zellen je nach Porengröße ebenfalls ein verändertes Differenzierungsverhalten zeigen können (Di Luca *et al.*, 2016; Karageorgiou und Kaplan, 2005; Kim *et al.*, 2010). Die Ursache wird von den Autoren in Nährstoffmangelzuständen vermutet, welche wiederum die Differenzierung in Knorpelzellen begünstigt (Matsiko *et al.*, 2015). Diese Tatsache würde die osteogene Differenzierung negativ beeinflussen und die Knochenfunktionsparameter und Stoffwechselprofile verändern.

Gleichzeitig ist eine Porengröße von 20 % unterhalb des Zielwertes in einer Reichweite, bei dem man durch Änderung des Produktionsverfahrens möglicherweise Poren erreichen kann, welche den Größekriterien entsprechen. Die Möglichkeiten zur Optimierung der Porengröße sind dabei mannigfaltig: Anpassung der Rezeptur, Änderungen des Produktionsprozesses wie der Einfriergeschwindigkeit oder Verwendung eines anderen Materials, in dem die Scaffolds produziert werden, konnten die physikalischen Parameter deutlich verändern, wie nicht publizierte Vorversuche in der Arbeitsgruppe zeigten. Durch weitere Anpassung der Produktion könnten wahrscheinlich Scaffolds noch größerer Porengröße generiert werden. Li *et al.* (Li *et al.*, 2002) ist es beispielsweise gelungen durch Anpassung eines Produktionsschritts die Porengröße durch Schaumbildung um 70 % zu erhöhen.

Zu beachten ist ebenfalls, dass die negativen Versorgungseffekte überwiegend die Zellen, die tief im Scaffold liegen, betreffen. Zellen, die den Rand des Scaffolds besiedeln, könnten sich davon unbeeindruckt zeigen und bei den Messtechniken negative Effekte von kleinen Poren überlagern. Ziel gerade für die spätere Anwendung am Patienten sollte es jedoch sein, das Material gleichmäßig zu besiedeln. Nur auf diese Weise entfalten die Kulturen das Potential der Dreidimensionalität. Außerdem könnte nicht besiedelte Matrix den Knochenheilungsprozess stören.

Die erreichte Porengröße reicht aber grundsätzlich aus, dass Ad-MSCs das Scaffoldinnere erreichen können. Da eine Stammzelle im adhären Zustand nach im Labor durchgeführter Messung im Mikroskop einen Durchmesser von ~50 µm misst, ist die vorhandene Porengröße für die Penetration grundsätzlich

ausreichend. Die Literatur beschreibt die Größe von mesenchymalen Stammzellen mit Werten zwischen circa 18  $\mu\text{m}$  bis 30  $\mu\text{m}$  sogar als noch kleiner, so dass die Zellgröße alleine nicht das Limit für das Eindringen in die produzierten Scaffolds zu sein scheint (Ge *et al.*, 2014).

In den Versuchen wurde anhand der Wasseraufnahmekapazität die Porosität der Scaffolds abgeschätzt. Ohne dass die genaue Bindungskapazität des Wassers an die Scaffoldmatrix bekannt ist, bleibt die Messung jedoch ein Richtwert, da unklar bleibt wie viel Wasser gebunden vorliegt. Unter der Annahme, dass das meiste Wasser frei in den Poren vorliegt, ergeben sich Werte, die geeignet für eine 3D-Kultur erscheinen. Diese Annahme wird zusätzlich durch die Bildaufnahmen der Scaffolds gestützt, die eine Porosität von rund 75 % realistisch erscheinen lassen. Werte in diesem Bereich sind für das Tissue Engineering des Knochens optimal, da sich gezeigt hat, dass niedrige Porositätswerte mit schlechterer Zelldifferenzierung einhergehen (Karageorgiou und Kaplan, 2005).

Die Steifigkeitswerte der Scaffolds lagen zwischen 15,91 kPa und 36,40 kPa. Die Steifigkeit eines Trägermaterials hat generell einen entscheidenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung (Chen *et al.*, 2015). So konnten Chen *et al.* in Ihren Versuchen aufzeigen, dass Stammzellen bei Steifigkeitswerten zwischen 11 kPa und 30 kPa am besten differenzieren. Da sich 3 von 4 Scaffolds innerhalb dieser Spanne befinden, sind die Gegebenheiten zur osteogenen Differenzierung aus Sicht der Scaffoldsteifigkeit optimal. Die obere und untere Spanne des Optimums lässt sich durch die drei Scaffolds sogar breit abbilden. Dadurch könnten Erkenntnisse für das optimale Spektrum der Steifigkeit vertieft werden, wobei jedoch immer auch die weiteren Parameter bei der Differenzierung ins Urteil miteinbezogen werden müssen. Scaffold PRP, dessen Steifigkeit leicht oberhalb der Referenzschwelle liegt, kann verwendet werden, um eine Matrix abzubilden, die näher am Steifigkeitswert einer *Spongiosa* von bis zu 0,5 GPa liegt (Gao, 2017). Die Steifigkeit hat neben der Differenzierungskapazität auch einen Einfluss auf die Expression verschiedener Gene wie beispielsweise Runx 2 (Murphy *et al.* 2012). Murphy *et al.* beschreiben hier, dass eine höhere Steifig-

keit mit höherer Expression von Runx 2 einhergeht. Diese Erkenntnis konnte anhand der vorliegenden Daten nicht bestätigt werden.

#### **4.4 Vorinkubation und Lagerung der Scaffolds**

Wie Abbildung 16 und 17 gezeigt haben, profitieren die Zellen nicht von einer mehrtägigen Vorinkubation der Scaffolds in Medium und zeigen nach Trocknung ähnliche Eigenschaften. Diese beiden Tatsachen machen die Scaffolds für die Zukunft gerade in Hinblick auf logistische Prozesse besonders handlich. So könnten Scaffolds an zentraler Stelle vielfach produziert, verpackt und verschickt werden und beim Endanwender eingesetzt werden. Dies könnte die Versorgung auch von peripheren Einrichtungen sichern und Kostenvorteile in der Produktion aufweisen. Die Zeit von der Entnahme aus der Packung bis zur Einsatzbereitschaft ist dabei vernachlässigbar, da eine lange Inkubationszeit keinen Mehrwert bietet. Diese Eigenschaften können sich als vorteilhaft für die maschinelle Massenproduktion erweisen.

#### **4.5 Wahl der mesenchymalen Stammzelle und Kulturverhalten**

Für die Reproduktion von Knochengewebe wurden mesenchymale Stammzellen verwendet, da diese ein hohes osteogenes Potential aufweisen (Wei *et al.*, 2013). Aufgrund der geringen Invasivität, der einfachen Entnahmemöglichkeiten und des guten Differenzierungspotentials fiel in diesem Projekt die Wahl auf mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe mit einem Schwerpunkt auf dem Bauchfett, da dieses in den Versuchen von Reumann *et al.* (Reumann *et al.*, 2018) neben anderen ein gutes Differenzierungspotential aufzeigen konnte. Auch in den vorliegenden Versuchen differenzierten sich die Zellen in die unterschiedlichen Gewebetypen. Weiterhin ist das Spenderalter und der Gesundheitszustand hinsichtlich Vorerkrankungen der Spendenden im Kontext des Differenzierungspotentials stets zu berücksichtigen (Labunets, 2014). Da das Spenderalter im vorliegenden Fall bei 55 Jahren liegt, kann von einem guten Differenzierungspotential ausgegangen werden, gerade weil die Patienten in ei-

nem guten Gesundheitszustand waren. Es zeigte sich jedoch auch im Labor bei wenigen, sehr alten Spendern eine limitierte Proliferation der mesenchymalen Stammzellen. Diese Spenderzellen wurden für die Versuche ausgeschlossen.

Auch andere Zellen neben mesenchymalen Stammzellen des Fettgewebes haben sich beim Tissue Engineering bewährt. Da verschiedene Autoren die Überlegenheit der mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark zeigen konnten (Liao, 2014; Niemeyer *et al.*, 2010), wäre eine Besiedelung mit diesen Zellen oder auch Osteoblasten untersuchenswert, um das Potential der vorliegenden Scaffoldtypen weiter zu untersuchen. Ebenso besteht die Möglichkeit durch Co-Kulturen das Zusammenspiel von verschiedenen Zelltypen auf den Scaffolds nachzubilden (Zhu *et al.*, 2018).

Je nach Anwendung des besiedelten Scaffolds kann es von großer Bedeutung sein wie lange die Zeitperiode bis zur letztlichen Besiedelung beziehungsweise Anwendung am Patienten ist. Gerade für Anwendungen in der Akutversorgung von Patienten der Wiederherstellungschirurgie ist es günstig diese Zeit gering zu halten. Die Dauer der Zellkultur in der Expansionsphase hängt stark von der Menge des entnommenen Fettgewebes, dem generellen Teilungsverhalten der Zellen und den Kulturbedingungen ab. Für eine schnelle Anwendung sollten deshalb möglichst viel Fettgewebe aus Körperbereichen mit hoher Teilungsrate entnommen werden, die bei häufigen Medienwechseln inkubiert werden um eine hohe Ausbeute zu erreichen (Musina *et al.*, 2005). Neben der reinen Kulturzeit muss nach vorliegender Strategie zusätzlich die Zeit der osteogenen Differenzierung hinzugerechnet werden. Deshalb müssen weitere 14-21 Tage vom Zeitpunkt der Zellaussaat einkalkuliert werden, um das besiedelte Scaffoldprodukt zu entwickeln (Sundelacruz *et al.*, 2008). Manche Autoren schaffen es diese Zeitspanne zu verkürzen, indem dem Medium Substanzen wie Antioxidantien hinzugefügt werden (Sun *et al.*, 2013). Im vorliegenden Projekt dauerte die Phase der Zellexpansion rund vier Wochen, sodass man von einer Zeitspanne von knapp zwei Monaten rechnen muss, bis zur möglichen Anwendung des Endprodukts samt Differenzierung, sofern man patienteneigene Ad-MSCs verwendet. Für Anwendungen an chronisch kranken Patienten wie bei Fällen von

Pseudarthrosen oder auch osteolytischen Tumoren kann diese Zeitspanne akzeptabel sein, für die zukünftige Anwendung in der akuten Traumaversorgung ist es allerdings anzustreben diese Zeit zu verkürzen. Dies kann über die erwähnten Parameter Wahl des Zelltyps, Menge der Zellentnahme, Ort der Zellentnahme und Kulturbedingungen erfolgen.

#### **4.6 Erfüllung der Qualitätskriterien der Stammzellen vor der Aussaat**

Häufig erfolgt die Bestimmung der Qualitätskriterien mittels Durchflusszytometrie, indem die jeweiligen Marker mit Antikörpern markiert werden und anschließend mittels Laser nach Fluoreszenz, Größe oder Granularität sortiert werden (Araña *et al.*, 2013). Im vorliegenden Projekt wurde auf die alternative Bestimmung mittels RT-PCR zurückgegriffen. Nach Analyse lassen sich einige Marker entgegen der Qualitätskriterien nachweisen (Dominici *et al.*, 2006). Dies sind CD 34, CD 14 und HLA-DR. Die Tatsache, dass diese Marker positiv sind, lässt nicht zwingend darauf schließen, dass sich in der Kultur noch Immunzellen befinden müssen, schließt sie aber auch nicht aus. Mesenchymale Stammzellen beschreiben keinesfalls eine immer identische Population, sondern es existieren zahlreiche Subpopulationen mit teils unterschiedlich exprimierten Markergenen, wie bei Mo *et al.* (Mo *et al.*, 2016) beschrieben. Es scheint daher genauso möglich, dass die Ad-MSCs Markerproteine an der Oberfläche tragen, die sonst üblicherweise von Immunzellen getragen werden (Szade *et al.*, 2011). Szade *et al.* Beschrieb hier beispielsweise eine Population von MSCs, die die Marker CD 45 nicht trugen, dafür hingegen CD 14 und CD 34. In üblichen MSC-Kulturen, wie auch beim Autor Dominici beschrieben, ist dies genau gegenteilig (Dominici *et al.*, 2006).

Die in den Versuchen verwendeten Kulturen exprimierten die beschriebenen charakteristischen Gene von mesenchymalen Stammzellen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den Zellen im Wesentlichen um mesenchymale Stammzellen gehandelt hat. Allerdings werden in der Kultur auch weitere Gene exprimiert, die nach Dominici *et al.* nicht exprimiert werden sollen (Dominici *et al.*, 2006).

#### **4.7 Besiedelungsverhalten der Zellen auf den Scaffolds**

Beim Besiedelungsverhalten zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Scaffoldoberfläche, bei einer Eindringtiefe von etwa einem Fünftel der Scaffoldhöhe ins Scaffoldinnere. Die Eindringtiefe hängt direkt von der Porengröße, der Interkonnektivität und der Besiedlungsstrategie ab (Logeart-Avranioglou *et al.*, 2005; Zeltinger *et al.*, 2001). Da die Eindringtiefe der Scaffolds begrenzt war, würden die Scaffolds womöglich von einer veränderten Rezeptur, die größere Poren hervorbringt, profitieren. Auch Wahl *et al.* (Wahl *et al.*, 2015) konnten zeigen, dass die Eindringtiefe in manchen Scaffolds begrenzt ist. Beim Vorgang der Besiedelung kann es bereits einen großen Unterschied machen mit welcher Technik die Zellen auf das Scaffold aufgetragen werden (Schieker *et al.*, 2006). So konnten Schieker *et al.* dabei durch direktes Wenden des Scaffolds oder Spülen mit Medium ein tieferes Eindringen der Zellen erreichen. Mit einem ähnlichen Ansatz konnten Godbey *et al.* (Godbey *et al.*, 2004) zeigen, dass ausgesäte Zellen nach Zentrifugation tiefer in das Scaffold eindringen. Der zusätzliche Zentrifugationsschritt birgt allerdings auch das Risiko für mögliche Kontaminationen. Ein Antrocknen des Scaffolds könnte ähnliche, wenn auch schwächere, Kräfte durch Sog entwickeln, sodass man die Scaffoldbesiedelung durch Optimierung der vorbereitenden Prozesse steuern kann. Dieser Effekt wurde durch das Antrocknen der Scaffolds vor Besiedelung genutzt, da Vorversuche ein positives Ergebnis gezeigt haben.

Zur gleichmäßigeren Besiedelung der Scaffolds besonders in der Tiefe liegt nach Analyse unserer Ergebnisse noch ein großes Optimierungspotential vor, das darin besteht Scaffolds größerer Poren zu konstruieren und die Aussaat zu modifizieren. Druck- oder Saugeffekte könnten die Eindringtiefe erhöhen.

Für die Weiterentwicklung wäre es zudem ein großer Fortschritt, die Nährstoffverhältnisse zwischen zentralen und oberflächlichen Scaffoldlagen anzugleichen, da hier ein großer Versorgungsgradient bestehen kann (Botchwey *et al.*, 2003). So könnten gleiche Nährstoffbedingungen sowohl für die Zellen in der Tiefe des Scaffolds, als auch an der Oberfläche geschaffen werden (Yeatts und

Fisher, 2011). Dies wäre sehr gut in einem Bioreaktorsystem möglich, indem man aus einer statischen 3D-Kultur eine dynamische 3D-Kultur entwickelt. Hier konnte in anderen Versuchen gezeigt werden, dass die Überlebensrate der Zellen ansteigt und die Sauerstoffversorgung verbessert ist (Volkmer *et al.*, 2008). Gleichzeitig wird der Versuchsaufbau durch derartige Vorhaben immer komplexer und bietet Eintrittspforten für Kontaminationen. Auch ein Transfer des Produkts in die klinische Anwendung ist erschwert, solange die Zellen vom dynamischen Kultursystem abhängig sind.

#### **4.8 Messung der Funktionsparameter nach Besiedelung**

Die Parameter Resazurinumsatz, Glukoseverbrauch und AP-Aktivität dienen im Kontext der Differenzierung dazu die Stoffwechselaktivität der Zellen zu bewerten. Resazurin diene als Marker der Viabilität, der Glukoseverbrauch als Marker des Metabolismus und die AP-Aktivität als repräsentativer Marker des knochenspezifischen Stoffwechsels.

Die Übertragung der Arbeitsschritte von 2D in 3D ist komplex, da das in der 3D-Kultur vorhandene Scaffold die Ausgangsbedingungen tiefgreifend verändert. Es führt dazu, dass Flüssigkeiten wie das Medium nicht vollständig aus der Kavität entfernt werden können, da immer ein Restvolumen in den Poren des Scaffolds verbleibt. Dieses Restvolumen ist dabei variabel, weil es von der Porengröße und der Wasseraufnahmekapazität abhängig ist. Auch Kapillarkräfte halten in der 3D-Kultur Mediumvolumen in der Kavität. Außerdem zeigt sich durch die 3D-Anordnung der Zellen ein ganz anderer Interaktionsspielraum zwischen Zelle und Medium beziehungsweise Messsubstrat, wenn man davon ausgeht, dass Zellen an der Scaffoldoberfläche stärker am Kontaktaustausch teilnehmen. Zellen im Inneren des Scaffolds sind an diesen Austauschprozessen geringfügiger beteiligt. Hier bedarf es einer Analyse wie unterschiedlich sich Zellen in verschiedenen Scaffoldlagen bezüglich ihres Stoffwechsels verhalten. So könnten Zellen in einer oberflächlichen Lage beispielsweise eine höhere Stoffwechselaktivität aufgrund besserer Nährstoffversorgung aufweisen (Zhu *et al.*, 2018; Volkmer *et al.*, 2008). Umgekehrt könnten Zellen im Inneren des Scaf-

olds einen höheren knochenspezifischen Stoffwechsel zeigen, da sie einen positiven Effekt durch die dreidimensionale Umgebung erfahren (Kale *et al.*, 2000).

Ein weiterer möglicher Aspekt für Messverzerrungen ist, dass es beim Entfernen und Hinzufügen von Flüssigkeiten in den Kavitäten durch das geringe Eigengewicht der Scaffolds gelegentlich zur Drehung der Scaffolds auf den Kopf kam. Beim gleichmäßig besiedelten Scaffold wäre dies nicht so bedeutend, im Kontext von ungleichmäßig besiedelten Scaffolds verändert es jedoch Interaktionsprozesse zwischen Flüssigkeit und Zelle. Es ändert Sauerstoffpartialdrücke, die auf die Zelle einwirken und könnte damit zur Streuung der Werte beitragen (Gomes *et al.*, 2016). Die Komplexität der 3D-Kultur nimmt deshalb um ein Vielfaches zu und Messmethoden, die in der 2D-Kultur als präzise galten, unterliegen plötzlich zahlreichen Verzerrungseffekten (Bouet *et al.*, 2015).

Die beschriebenen Probleme lassen sich möglicherweise dadurch lösen, dass das Scaffold vor Messung in ein neues Reaktionsgefäß transferiert wird. Hierdurch könnten die Kapillarkräfte minimiert und eine Drehung verhindert werden. Auch die Möglichkeit das Scaffold vor Messung auszuwringen und damit verbliebenes Medium im Scaffold zu minimieren besteht als Option, birgt jedoch ein großes Risiko für Schwankungen und Zelltod. Eine Änderung der Reaktionsgefäßgröße oder der Scaffoldgröße könnte Handlungseffekte ebenfalls positiv beeinflussen.

Für die Resazurinmessung kann festgestellt werden, dass die Werte im Verlauf der Differenzierung abnehmen und damit die gesamte mitochondriale Aktivität abnimmt. Die Ursache der verminderten Aktivität im Verlauf der Differenzierung kann verschiedene Ursachen haben: Einerseits können weniger lebende Zellen insgesamt vorhanden sein oder die Zellen weisen eine erniedrigte mitochondriale Aktivität auf (Sathishkumar *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2016). Eine erniedrigte mitochondriale Aktivität wäre bei ausdifferenzierten Zellen durchaus zu erwarten. Eine erhöhte mitochondriale Aktivität kann bei Stress der Zellen beobachtet werden (McMilian *et al.*, 2002). Welche Ursache im Fall der Versuche vorliegt oder ob sich beide Effekte überlagern, lässt sich nicht direkt ableiten. In Kombi-

nation mit der DNA-Gehaltsbestimmung und der optischen Beurteilung, die sich eher gleichbleibend entwickeln, liegt jedoch die Vermutung einer geringeren Stressrate näher. In der Messung sind auch negative Werte zu identifizieren. Der Effekt des Restvolumens im Scaffold kann hier für unterschiedliche Verdünnungseffekte des Substrats führen und so Werte nach Abzug des Blankowerts mit negativen Vorzeichen ergeben. Die höheren Werte in 2D können möglicherweise auf eine unterschiedliche Substratinteraktion zurückgeführt werden. Da die Zellen alle in einer Schicht liegen und direkten Kontakt zum Substrat haben, ermöglicht eine höhere Umsatzrate (Duval *et al.*, 2017).

Der Glukoseverbrauch der Zellen zeigte keine klare Tendenz. Bei den meisten Bedingungen zeigte sich in der Frühphase der Differenzierung ein höherer Verbrauch als zum Ende der Differenzierung. Ein fraglicher Befund waren die teils negativen Glukoseverbrauchswerte nach Abzug des Blankowerts. Sofern man Messfehler ausschließt, wäre davon auszugehen, dass die Zellen gerade an Tag 14 des IKM und RGD Scaffolds Glukoneogenese betreiben, ein Befund, der sich in der Literatur nicht bestätigen ließ.

Die Messwerte der alkalischen Phosphatase zeigen eine sehr große Streuung auf. Gerade bei dieser Messung reagiert das Substrat aufgrund seiner chemischen Eigenschaften besonders sensibel auf Verdünnungseffekte und Veränderungen der Zell-Substrat-Interaktion. Daher ist diese Messung für Störfaktoren besonders anfällig (Sabokbar *et al.*, 1994). Rückschlüsse aus den Ergebnissen lassen sich hier nur sehr vage ziehen. Grundsätzlich konnte eine höhere Aktivität in der Frühphase der Differenzierung beobachtet werden, wie auch eine höhere Aktivität in 2D. Diese Tatsache könnte damit zusammenhängen, dass die alkalische Phosphatase ein Frühmarker der Differenzierung ist (Štefková *et al.*, 2015). Die höhere Aktivität in 2D lässt sich mit dem Effekt der 2D-Kultur mit besserer Zell-Substrat-Interaktion erklären (Duval *et al.*, 2017). Die Entwicklung der AP-Aktivität im zeitlichen Verlauf zeigt zwischen den verschiedenen Scaffolds unterschiedliche Trends. Bei PRP und IKM steigt sie zum Ende wieder an, bei Koll und RGD fällt sie weiter ab. Diese Kurvenverläufe könnten anzeigen, dass bei Koll und RGS die Differenzierung abgeschlossen ist, beziehungswei-

se, dass PRP und IKM den höheren knochenspezifischen Stoffwechsel aufweisen.

#### **4.9 Veränderung der Besiedelungszahl im Verlauf der Differenzierung**

Das Überleben der Zellen wurde durch Anfärbung lebender Zellen mittels Calcein-AM und Bestimmung des DNA-Gehalts gemessen. Ein langfristiges Überleben der Zellen ist jedoch essentiell für die spätere klinische Anwendung. Vergleicht man die mikroskopischen Bilder während der Differenzierung ergibt sich eine Übereinstimmung des gleichbleibenden DNA-Gehalts in 3D.

Mittels der DNA-Messung wurde gezeigt, dass die DNA-Konzentrationen in 3D höher sind als in 2D. Da dieser Effekt bereits für Tag 0 darstellbar ist, wo nach Aussaat die gleiche Konzentration vorlag, wäre es möglich, dass die Messung in 3D von Scaffoldrückständen in der Probe beeinflusst wird. Ebenso wäre es denkbar, dass das Ablösen der Zellen vom Scaffold und dem Boden einer Kavität unterschiedlich erfolgreich ist. Eine höhere DNA-Konzentration in den 3D-Kulturen steht damit offen. Um die Fehlerquellen der Messung zu untersuchen, wäre eine Alternative DNA-Gehaltsbestimmung denkbar wie beispielsweise die PCR basierte Methode nach Ruoß *et al.* (Ruoß *et al.*, 2019).

Bei den 2D-Kulturen ist festzustellen, dass der DNA-Gehalt im Laufe der Differenzierung weiter steigt, während er in 3D eher konstant bleibt. Auch hier ist der Verunreinigungseffekt der Scaffoldreste in der Messung in Erwägung zu ziehen, doch öffnet es auch Interpretationsspielraum dafür, dass die Zellzahl in 2D während der Differenzierungszeit weiter steigt, während sie in 3D konstant bleibt.

Insgesamt zeigt sich bei der Bestimmung des DNA-Gehalts ein ähnliches Bild wie bei den Funktionsparametern: Der Vergleich zwischen 2D- und 3D-Kulturen ist keineswegs trivial und die grundlegend unterschiedlichen Bedingungen machen einen Vergleich schwierig.

#### 4.10 Sekretion spezifischer Marker

Das knochenzellenspezifische Sekretionsprofil verschiedener Proteine kann die Aktivität von Knochenzellen widerspiegeln (Wright *et al.*, 2009). Im vorliegenden Projekt wurden deshalb die Marker Runx 2, Osterix und OPG ausgewählt, um Knochenstoffwechselprozesse genauer zu analysieren. Runx 2 wird besonders früh in der Differenzierung stark exprimiert, während Osterix eher im Verlauf der Differenzierung von Entscheidung ist (Huang, 2007). Eine hohe Sekretion von Runx 2, Osterix und OPG deutet auf eine knochenaufbauende Stoffwechsellage hin (Huang, 2007).

Blickt man auf die Ergebnisse der Dot-Blots zeigt sich, dass Runx2 in der Frühphase der Differenzierung höhere Werte aufweist, die im Verlauf sinken. Dieser Befund deckt sich mit der Literatur (Huang, 2007). Die erwartete höhere Aktivität von Osterix in der Spätphase der Differenzierung lässt sich allerdings so nicht zeigen. Bei OPG zeigen sich hohe Werte zu Beginn und am Ende der Differenzierung, was dahingehend interpretiert werden kann, dass womöglich eine hohe osteoanabole Aktivität vorliegt (Wright *et al.*, 2009).

Für die präzise Messung der Marker bleibt die Technik des Dot-Blots jedoch weiter zu optimieren. So konnten 2 der 5 erstellten Blots nicht ausgewertet werden, da die Signalintensität nicht ausreichte. Auch bei den verbleibenden 3 Markern zeigen sich mögliche Fehlereffekte. Einerseits blieb das Signal von den Dots gerade am Bildrand oft dunkel. Andererseits zeigten sich auch zentral in der Messplatte Verwaschungen, die die Signale verfälschten. Da die Signale zuletzt mittels der Image J-Software auf Signalstärke durch Bestimmung des Grauwerts gemessen wurden, zeigen sich durch diese beiden Faktoren beträchtliche Fehlerquellen (siehe Anhang).

Die Messung der Signale mittels Dot-Blot und deren Veränderung im zeitlichen Verlauf bleiben aber auch eine günstige Methode, um ein Profil sezernierter Proteine zu erheben. Neben den ausgewählten Markern können viele weitere Marker zur Zusammenfügung eines Gesamtbildes dienen. Marker wie Atf4, *Wnt*/Notch, BMPs, TGF- $\beta$ , IGF, FGF oder Osteopontin könnten hier für weitere

Untersuchung in den Fokus rücken und das Wissen um den Knochenstoffwechsel erweitern (Rutkovskiy *et al.*, 2016).

Die Methode des Dot-Blots enthält Teilschritte des Western Blots und kann ähnlich wie dieser Proteinkonzentrationen bestimmen (Dennis-Sykes *et al.*, 1985). Der Dot-Blot bietet dabei den Vorteil, dass er zeitlich und technisch weniger aufwendig ist und dabei dem Western Blot in der Quantifizierung von Proteinexpressionen gleichwertige Ergebnisse liefern kann, allerdings kann nicht anhand eines Markers überprüft werden, ob das Signal wirklich vom gesuchten Protein stammt (Guillemin *et al.*, 2009; Putra *et al.*, 2014). Beim Western Blot kann hingegen auf jahrelange Erfahrung zurückgegriffen werden und es handelt sich um eine sehr etablierte Methode mit hoher Messgenauigkeit, besonders bei nicht-sezernierten Proteinen, die jedoch einen höheren Arbeitsaufwand erfordert (Dennis-Sykes *et al.*, 1985).

#### **4.11 Veränderung der Scaffoldmatrix im Verlauf der Differenzierung**

Andere Projekte konnten bereits zeigen, dass die Vermessung der Scaffolds im  $\mu$ CT Zusatzinformationen über den Mineralisierungsgrad bringen kann (Tuan und Hutmacher, 2005; van Lenthe, 2006). Deshalb wurden die Scaffolds auch im vorliegenden Projekt vor und nach Besiedelung im CT vermessen, um Entwicklungen herauszuarbeiten. Die beschriebene Veränderung der Scaffoldmatrix hin zum Dichteverlust in der CT-Messung gehörte zu den unerwarteten Ergebnissen der Versuchsreihen.

Interessanterweise ist dieser Befund in Einklang zu bringen mit dem Ergebnis des gemessenen Verlusts der Steifigkeit vor und nach Besiedelung. Hier zeigt sich während der Differenzierung eine Abnahme der Steifigkeit. Die Ursache des Verlusts von Grauwert und Steifigkeit könnte in einem Abbau der Scaffoldmatrix über die Zeit hinweg liegen, beispielsweise durch Auswaschung der Matrix bei Medienwechseln. Das Scaffold würde dieser Interpretation zufolge über die Zeit hinweg an Substanz verlieren. Gerade bei Kollagen ist dieser Proteinabbau bekannt (Ferreira *et al.*, 2012), doch konnte die Tatsache hier bei sämtli-

chen Scaffolds beobachtet werden. Diese Entwicklung kann von Vorteil sein, wenn man sich vorstellt, dass ein im Patienten implantiertes Scaffold nicht auf Dauer persistieren soll, sondern biologisch abbaubar sein soll. Dies kann für den Wundheilungsprozess günstig sein und Vaskularisierungsprozesse unterstützen (Amini *et al.*, 2011). Allerdings kann ein solcher Substanzverlust auch einen Nachteil bedeuten, dadurch, dass das Scaffold damit auch Steifigkeit verliert und damit die Differenzierung aufgrund seiner veränderten physikalischen Eigenschaften weniger stützen kann.

Als weitere spekulative Möglichkeit erscheint, dass die Scaffolds in Medium anschwellen könnten und so der Grauwert in der CT-Messung pro Schnittebene abnimmt. Verzögerte Schwellungsprozesse wurden bereits bei anderen Materialien beschrieben (Draghi *et al.*, 2015). Dieser Fall der Anschwellung würde mit einer Vergrößerung der Poren einhergehen, was den Ernährungszustand der Zellen und Vaskularisierungsprozesse positiv beeinflussen würde. Es bleibt daher zu prüfen, ob sich die Porengröße und das Scaffoldvolumen über die Zeit ansteigen. Als weitere Möglichkeit ist denkbar, dass sich die Substanz des Kalzium-Phosphats vom Scaffold löst. Dies ließe sich testen, indem als Gegenprobe Scaffolds verwendet werden, die nicht-lösliches Hydroxylapatit enthalten. Derartige Scaffolds wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits hergestellt und könnten diese Fragestellung beantworten (Häussling *et al.*, 2019). Ein extrem hochauflösendes CT könnte dem Problem der Substanzablösung ebenfalls valide nachgehen.

Dennoch würde eine gleichbleibende oder sogar steigende Steifigkeit der Scaffolds die osteogene Differenzierung aus Sicht der Zellen stützen und es sollte daher eher Ziel sein diese Steifigkeit zu erhalten. Guvendiren *et al.* (Guvendiren *et al.*, 2012) konnte zeigen, dass es möglich ist Scaffolds herzustellen, die während der Differenzierung an Steifigkeit gewinnen. Dies konnte durch ein Material erreicht werden, das sekundär nach Produktion durch UV-Licht gesteuerte Polymerisation weiter aushärtet. Auch wenn zu prüfen bleibt wie sich dies auf die physikalischen Parameter im Gesamten auswirkt, wäre es denkbar diesen Effekt durch Rezeptanpassung auf die vorliegenden Scaffolds zu übertragen.

#### **4.12 Zytokinarrays zur Untersuchung von Scaffold-Zusatzstoffen**

Parallel zur Besiedelung der Scaffolds wurden die Scaffold-Zusatzstoffe PRP und IKM mittels Zytokinarrays auf ihren Nutzen untersucht. Dabei konnte ein breites Spektrum an Zytokinen untersucht werden und ein Vergleich zahlreicher Inhaltsstoffe gezogen werden.

Beim Vaskularisierungspotential ließen sich keine eindeutigen Vorteile für einen der Zusatzstoffe finden und das Urteil der Überlegenheit bleibt vom jeweiligen Zytokin abhängig.

Für Zytokine, die die Proliferation unterstützen, zeigte sich insgesamt für das IKM ein leichter Vorteil, wenngleich hier die hemmenden Zytokine ebenfalls höher ausfallen. Die Ergebnisse der AP-Aktivität, des DNA-Gehalts und der Proteinmarker Runx2, Osterix und OPG können die These der höheren Proliferation stützen, da sie zu vielen Messzeitpunkten bei IKM höhere Werte aufweisen als bei PRP.

Der Inhaltsstoff Leptin war beim immuzellkonditionierten Medium geringer, was günstig ist, da sich in Versuchen von *Ducy et al.* (*Ducy et al.*, 2000) zumindest an Mäusen gezeigt hat, dass Leptin über indirekte Wege der Hypothalamus-Achse den Knochenaufbau hemmt.

Insgesamt kann so ein leichter Vorteil zugunsten des Scaffold Typ IKM angenommen werden. Dieses zeigt hinsichtlich Proliferation und Knochenaufbau ein geringfügig besseres Abschneiden als die Zusatzstoffe für das Scaffold PRP. Gerade für PRP konnte die Literatur bei der Unterstützung der Knochenbruchheilung zuletzt nur in begrenzten Rahmen einen Nutzen nachweisen und dementsprechend ist die Anwendungsempfehlung in der Klinik eingeschränkt (*Arpornmaeklong et al.*, 2004; *Griffin et al.*, 2009; *Kasten et al.*, 2008; *Malhotra et al.*, 2013).

#### **4.13 Welche Kulturbedingung ist am geeignetsten?**

Die entscheidendste Frage ist es herauszufinden, welche der vorliegenden Kulturbedingungen nun die Stoffwechselprozesse eines Knochens am besten widerspiegelt. Ein Vergleich zwischen 3D und 2D ist anhand dieser Experimente nur sehr schwer zu ziehen, da sich gezeigt hat, dass hier die Messbedingungen kaum vergleichbar sind. In vielen Fällen würde die 2D-Kultur im Vergleich zu 3D die besseren Parameter aufzeigen, wobei Substratinteraktions- und Verdünnungseffekte gerade bei den Funktionsparametern die Messwerte derart beeinflussen, dass es zu vage wäre hieraus einen Schluss zu ziehen. Weiterhin gelten die theoretischen Überlegungen, dass eine 3D-Kultur die wichtigen Interaktionsprozesse der Zellen deutlich besser widerspiegelt als eine 2D-Kultur. Knochenzellen sind bei ihrem Stoffwechsel stark abhängig von ihrer Umgebungsstruktur (Griffith und Swartz, 2006). Nicht nur die Matriceigenschaften, sondern auch die mechanischen und chemischen Einflüsse sind entscheidend (Bouet *et al.*, 2015). Diese Einflüsse sind in 3D-Kulturen deutlich vorteilhafter, weil Zellen dreidimensional von anderen Zellen umgeben sind, die wichtige Stoffe sezernieren (Pampaloni *et al.*, 2007). Ein höher gemessener DNA-Gehalt an Tag 14 in 3D im Vergleich zu 2D-Kultur könnte dies stützen.

Die Frage welche der getesteten 3D-Kulturbedingungen am geeignetsten ist, sollte hinsichtlich der Vergleichbarkeit deutlich leichter sein. Allein aus Perspektive der physikalischen Eigenschaften weist das Scaffold Koll die günstigsten Bedingungen auf. Mit den größten Poren sind Nährstoffaustausch und Eindringen der Zellen bei Besiedelung am günstigsten. Bei der Steifigkeit weisen alle Scaffolds Werte auf, die günstige Ausgangsbedingungen zur Differenzierung bieten (Chen *et al.*, 2015). Die Tatsache, dass die Scaffolds während der Differenzierung Steifigkeit verlieren, ist dabei zu berücksichtigen und eher ein Wert im oberen Bereich anzustreben. Bei der Wasseraufnahmekapazität schneiden die Scaffolds ähnlich gut ab, wobei der Kollagenscaffold minimal höhere Werte im Vergleich zu PRP und IKM aufweist.

Diese physikalischen Grundwerte allein heranzuziehen wäre nicht ausreichend, sodass auch die Betrachtung unter Besiedelung herangezogen werden muss.

Das Gesamtbild der Messungen im Verlauf der Differenzierung ist heterogen, sodass es auf den jeweiligen Parameter Messung ankommt, welches Scaffold die besten Eigenschaften aufweist.

Hinsichtlich des Wachstums und des Zellüberlebens lässt sich zusammenfassen, dass in allen Kulturbedingungen die Zellen 14 Tage überleben. Die höchsten Werte beim DNA-Gehalt weist hier zu vielen Zeitpunkten das Scaffold Koll auf. Dies spiegelt sich auch besonders an Tag 14 beim Glukoseverbrauchs wieder, an dem die Zellen des Scaffold Koll einen überdurchschnittlichen Verbrauch haben. Aus dem Blickwinkel der Differenzierung mit dem Marker der AP-Aktivität, können die Scaffolds PRP und IKM stärker überzeugen. Bei den Profilen der Proteine im Dot-Blot ist das Bild sehr heterogen. Für den Marker Osterix weist das Scaffold Koll überdurchschnittlich hohe Werte auf, bei Runx 2 und OPG schneiden die Scaffolds IKM und RGD-Peptide höher ab. Die Ergebnisse der Matrixuntersuchungen im Verlauf der Differenzierung zeigen bei den CT-Messungen einen synchronen Substanzverlust der Scaffolds, der sich bei den Steifigkeitsmessungen vor und nach Besiedelung ebenfalls feststellen lässt.

In der Gesamtperspektive zeigt das Scaffold vom Typ Kollagen aufgrund der günstigsten physikalischen Parameter und während der Differenzierungsphase hohem DNA-Gehalt und hohem Glukoseverbrauch die besten Eigenschaften auf. Kollagen ist das wesentliche Protein zum Aufbau von Knochenmaterial und vielfacher Strukturgeber (Clarke, 2008).

Allerdings handelt es sich bei dem verwendeten Kollagen um ein tierisches Produkt. Ist es Ziel ein Scaffold ohne tierische Produkte zu erzeugen, rückt das Scaffold PRP in den Fokus. Es bietet zusätzlich den Vorteil, dass es möglich ist das Plasma ganz patientenindividuell zu verwenden. Wie das Scaffold Koll besitzt das Scaffold PRP eine hohe Steifigkeit, wohingegen die Porengröße noch zu optimieren wäre. Großer Vorteil hier wäre, dass die Knochenformation durch entsprechende Zytokine unterstützt wird, auch wenn der biomechanische Nutzen hinsichtlich Stabilität letzten Endes begrenzt ist laut Kasten *et al.* (Kasten *et al.*, 2008).

Eine Überlegung, die in diesen Versuchen nicht getestet wurde, aber bei weiteren Versuchen in Betracht gezogen werden könnte, ist es die jeweiligen Proteinzusatzstoffe zu mischen und beispielsweise so ein Scaffold zu konstruieren, das Kollagen und PRP enthält. Hier könnte das Potential eines noch besseren Scaffolds liegen, welches die Struktureigenschaften des Kollagenproteins mit den Signalstoffen wie sie in PRP beispielsweise enthalten sind zu kombinieren.

Auch in der 3D-Kultur wäre es denkbar weitere Zellen des Knochenstoffwechsels mit anzusiedeln. Knochenzellen stehen auch physiologischerweise in Interaktion mit diversen anderen Zellen, die nur zusammen den Knochenstoffwechsel betreiben (Bar-Shavit, 2008; Takayanagi, 2009). Viele Versuche solcher sogenannten Co-Kulturen existieren bereits und versuchen den Nutzen, den Zellen durch Interaktionsprozesse mit anderen Zellen in der Umgebung haben, aufzuzeigen (Penolazzi *et al.*, 2016; Schmid *et al.*, 2018; Schulze *et al.*, 2018). Osteoblasten-Osteoklasten Co-Kulturen können das physiologische Gesamtbild vollständiger darstellen, aber auch weitere Zellen können unterstützend wirken. Immunzellen einerseits können einen Stimulus für die Differenzierung und Entwicklung darstellen, aber auch Endothelzellen können Vaskularisierungsprozesse vorantreiben (Choi *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018).

## 5. Zusammenfassung

Im vorliegenden Projekt wurden vier verschiedene Scaffolds für die Anwendung als Knochenersatz im Rahmen des Tissue Engineerings getestet und mit einer 2D-Kultur verglichen. Hierzu wurden die vier Scaffoldtypen durch Zugabe von entweder PRP, Koll, IKM oder RGD-Peptiden hergestellt und auf ihre physikalischen Grundparameter Steifigkeit, Porengröße und Porosität getestet. Das Zytokinprofil von PRP und IKM wurden genauer auf dessen Inhaltsstoffe überprüft. Parallel dazu wurden aus Fettgewebeproben mesenchymale Stammzellen kultiviert, vermehrt und qualitativ überprüft. In Passage 3 wurden die Zellen auf den verschiedenen Scaffolds ausgesät und parallel zu einer 2D-Kultur 14 Tage differenziert.

An Tag 0, 7 und 14 der Differenzierung wurde die Entwicklung der Zellen aus vielerlei Blickwinkeln überprüft, indem einerseits Bilder der Besiedelung und Funktionsparameter gemessen wurden und andererseits von den Zellen produzierte Proteine, wie auch die Veränderung der Scaffoldmatrix genauer untersucht wurden.

Auf Basis der physikalischen Scaffoldcharakterisierung konnte das Scaffold Typ Kollagen aufgrund seiner großen Porengröße gepaart mit sehr günstigen Steifigkeitswerten am meisten überzeugen. Während die Steifigkeitswerte aller Scaffolds als sehr geeignet gewertet werden können und auch die Porosität zufriedenstellend ist, zeigte sich bei der Porengröße aller Scaffolds, dass sie von größeren Poren profitieren würden.

Bei den Eigenschaften der Zusatzstoffe des PRP und des IKM konnte mithilfe von Zytokinarrays gezeigt werden, dass das IKM ein leicht günstigeres Profil aufweist, da hier ein höherer Anteil an Zytokinen wie aus der Gruppe der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren vorliegt, die von den Immunzellen in das Medium sezerniert wurden und so den osteogenen Stoffwechsel induzieren (Behr *et al.*, 2010; Floss *et al.*, 1997; Liu, *et al.*, 2018).

Die Qualitätssicherung bei der Kultur der mesenchymalen Stammzellen zeigte, dass in der Kultur Ad-MSCs vorliegen, jedoch auch Negativmarker unerwarte-

terweise positiv sind. Dies kann entweder auf Verunreinigung der Kultur oder einen speziellen Subtyp an Ad-MSCs zurückzuführen sein.

Die gemessenen Funktionsparameter wie auch die Profile der produzierten Proteine der ausgesiedelten Zellen lassen keinen eindeutigen Rückschluss zu, welche Kulturbedingung die Geeignetste ist. Ein Vergleich zu 2D ist schwierig, da die Bedingungen kaum vergleichbar gemacht werden können. Die Messungen selbst zeigen verschiedene Verzerrungseffekte auf, die die komplexe 3D Kultur mit sich bringt. Zukünftig sollten diese Verzerrungseffekte durch Änderung der Kulturbedingungen, Präzision der Messtechniken und Erhöhung der unabhängigen Durchführungen überwunden werden.

Dennoch können Tendenzen der Ergebnisse abgeschätzt werden. Insgesamt weist das Scaffold Koll bei den physikalischen Parametern die besten Bedingungen auf und zeigt nach Besiedelung einen hohen DNA-Gehalt und Glukoseverbrauch.

In der Überprüfung der Matrices vor und nach Besiedelung mittels CT- und Steifigkeitsmessungen kam es zu dem nicht erwarteten Effekt, dass sich Matrix während der Differenzierung zu lösen scheint und kein anaboler Effekt durch die Zellen mit höherer Dichte der Matrix und Steifigkeit vorliegt. Ein Nachweis wie sich die Scaffolds bei noch längeren Kulturzeiträumen verhalten steht dabei noch aus.

Insgesamt können 3D-Kulturbedingungen physiologische Gegebenheiten genauer abbilden, wobei die Verfahren hier deutlich an Komplexität gewinnen. Um gleichbleibende Produktqualität und präzise Messung durch Verringerung der Verzerrungseffekte zu garantieren sollte zukünftig vermehrt auf technische Herstellungs- und Messverfahren zurückgegriffen werden.

## **6. Ausblick**

Auch für die Zukunft bleiben Kryogele ein vielversprechendes Material für das Tissue Engineering. Sie sind einfach und kostengünstig zu produzieren, sind aus Sicht der Biokompatibilität verträglich und in ihrer physikalischen Ausgestaltung sehr geeignet. Dennoch muss die Suche nach der optimalen Scaffoldzusammensetzung weiter fortgeführt werden, damit die Eigenschaften für eine Besiedelung noch näher an die physiologischen Parameter wie Porengröße und Steifigkeit heranreichen. 3D Kulturen sind die Kulturen, die die Zellanordnung und -interaktionen physiologischer widerspiegeln und sollen deshalb in Zukunft weiter untersucht werden. Die in diesem Projekt angewandten Methoden und Rezepturen sollten weiter ausreifen, um der Komplexität der 3D-Kultur gerecht zu werden. Der maschinelle Einsatz von 3D-Druck kann in Zukunft helfen Erkenntnisse schneller zu gewinnen, indem die Produktionstypen auf ein Vielfaches skaliert werden können. Die Messmethoden bringen in 3D-Kulturen teilweise veränderte Bedingungen mit sich, sodass deren Messpräzision durch Verringerung der Verzerrungseffekte in Zukunft noch erhöht werden muss.

Vorerst bleiben die verwendeten Scaffolds nur für den außerklinischen Bereich von Nutzen, können aber hier wichtige Erkenntnisse in Bezug auf den Knochenstoffwechsel liefern. Wenn die Eigenschaften der Kulturen weiter optimiert werden können, ist der Einsatz am Patienten anzustreben. Denn auf Patientenseite gibt es eine große Gruppe derer, die von klinischen Anwendungen des Tissue Engineering am Knochen profitieren können.

## 7. Literaturverzeichnis

- Alnaief, M., Alzaitoun, M. A., García-González, C. A., and Smirnova, I. (2011) Preparation of biodegradable nanoporous microspherical aerogel based on alginate. *Carbohydrate Polymers* 84(3): 1011–1018.
- Amini, A. R., Laurencin, C. T., und Nukavarapu, S. P. (2012) Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering* 40: 363–408.
- Amini, A. R., Wallace, J. S., und Nukavarapu, S. P. (2011) Short-Term and Long-Term Effects of Orthopedic Biodegradable Implants. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants* 21(2): 93–122.
- Araña, M., Mazo, M., Aranda, P., Pelacho, B., and Prosper, F. (2013) Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Expansion, and Characterization. In Kao, R. L. (Ed.), *Cellular Cardiomyoplasty* (Vol. 1036): 47–61.
- Aravamudhan, A., Ramos, D. M., Nip, J., Harmon, M. D., James, R., Deng, M., Laurencin, C. T., Yu, X., and Kumbar, S. G. (2013) Cellulose and Collagen Derived Micro-Nano Structured Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 9(4): 719–731.
- Arpornmaeklong, P., Kochel, M., Depprich, R., Kübler, N. R., und Würzler, K. K. (2004) Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 33(1): 60–70.
- Baghaban, M., und Faghihi, F. (2011) Mesenchymal Stem Cell-Based Bone Engineering for Bone Regeneration. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*: 57-70.
- Bar-Shavit, Z. (2008) Taking a Toll on the bones: Regulation of bone metabolism by innate immune regulators. *Autoimmunity* 41(3): 195–203.
- Bartl, R. (2014) Klinische Osteologie: Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenerkrankungen. Thieme Verlag, Stuttgart. Kapitel 1.3
- Behr, B., Leucht, P., Longaker, M. T., und Quarto, N. (2010) Fgf-9 is required for angiogenesis and osteogenesis in long bone repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(26): 11853–11858.
- Bellis, S. L. (2012) Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials* 32(18): 4205–4210.

- Bilem, I., Chevallier, P., Plawinski, L., Sone, E. D., Durrieu, M. C., und Laroche, G. (2016) RGD and BMP-2 mimetic peptide crosstalk enhances osteogenic commitment of human bone marrow stem cells. *Acta Biomaterialia* 36: 132–142.
- Böcker, W., Yin, Z., Drosse, I., Haasters, F., Rossmann, O., Wierer, M., Popov, C., Locher, M., Mutschler, W., Docheva, D., und Schieker, M. (2008) Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12(4): 1347–1359.
- Bose, S., Roy, M., und Bandyopadhyay, A. (2012) Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology* 30(10): 546–554.
- Botchwey, E. A., Dupree, M. A., Pollack, S. R., Levine, E. M., und Laurencin, C. T. (2003) Tissue engineered bone: Measurement of nutrient transport in three-dimensional matrices. *Journal of Biomedical Materials Research* 67A(1): 357–367.
- Bouet, G., Marchat, D., Cruel, M., Malaval, L., and Vico, L. (2015) *In Vitro* Three-Dimensional Bone Tissue Models: From Cells to Controlled and Dynamic Environment. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 21(1): 133–156.
- Boyce, B. F. (2013) Advances in the Regulation of Osteoclasts and Osteoclast Functions. *Journal of Dental Research* 92(10): 860–867.
- Braddock, M., Houston, P., Campbell, C., and Ashcroft, P. (2001) Born Again Bone: Tissue Engineering for Bone Repair. *Physiology* 16(5): 208–213.
- Broos, P. L. O., und Sermon, A. (2004) From Unstable Internal Fixation to Biological Osteosynthesis A Historical Overview of Operative Fracture Treatment. *Acta Chirurgica Belgica* 104(4): 396–400.
- Brydone, A. S., Meek, D., und Maclaine, S. (2010) Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 224(12): 1329–1343.
- Camp, J. P., und Capitano, A. T. (2007) Induction of Zone-Like Liver Function Gradients in HepG2 Cells by Varying Culture Medium Height. *Biotechnology Progress* 23(6): 1485–1491.
- Centanni, J. M., Straseski, J. A., Wicks, A., Hank, J. A., Rasmussen, C. A., Lokuta, M. A., Schurr, M. J., Foster, K. N., Faucher, L. D., Caruso, D. M., Comer, A. R., und Allen-Hoffmann, B. L. (2011) StrataGraft Skin Substitute Is Well-tolerated and Is Not Acutely Immunogenic in Patients With Traumatic Wounds: Results From a Prospective, Randomized, Controlled Dose Escalation Trial. *Annals of Surgery* 253(4): 672–683.

- Champagne, C. M., Takebe, J., Offenbacher, S., and Cooper, L. F. (2002) Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone* 30(1): 26–31.
- Chang, R., Emami, K., Wu, H., and Sun, W. (2010) Biofabrication of a three-dimensional liver micro-organ as an *in vitro* drug metabolism model. *Biofabrication* 2(4): 045004.
- Chen, G., Dong, C., Yang, L., and Lv, Y. (2015) 3D Scaffolds with Different Stiffness but the Same Microstructure for Bone Tissue Engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces* 7(29): 15790–15802.
- Chen, G., Lv, Y., Dong, C., and Yang, L. (2015) Effect of Internal Structure of Collagen/Hydroxyapatite Scaffold on the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy* 10(2): 99–108.
- Chocholata, P., Kulda, V., and Babuska, V. (2019) Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials* 12(4): 568.
- Choi, J.-W., Shin, S., Lee, C. Y., Lee, J., Seo, H.-H., Lim, S., Lee, S., Kim, I.-K., Lee, H.-B., Kim, S. W., and Hwang, K.-C. (2017) Rapid Induction of Osteogenic Markers in Mesenchymal Stem Cells by Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 44(1): 53–65.
- Choi, Y. (2014) Biology of the RANKL–RANK–OPG system in immunity, bone, and beyond. *Frontiers in Immunology* 5(511): 1-11.
- Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J., and Harris, D. T. (2014) Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *Journal of Translational Medicine* 12(1): 8.
- Christenson, R. H. (1997) Biochemical Markers of Bone Metabolism: An Overview. *Clinical Biochemistry* 30(8): 573–593.
- Ciuffreda, M. C., Malpasso, G., Musarò, P., Turco, V., and Gnocchi, M. (2016) Protocols for *in vitro* Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic, Chondrogenic and Adipogenic Lineages. *Mesenchymal Stem Cells*. New York 1416 (8):149-157
- Clarke, B. (2008) Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3: 131–139.
- Cowan, C. M., Soo, C., Ting, K., and Wu, B. (2005) Evolving Concepts in Bone Tissue Engineering. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 66). Elsevier 46(8): 239-285.
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B., and Dockrell, D. H. (2010) The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in

- PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS ONE* 5(1): 8668
- De Mori, A., Peña Fernández, M., Blunn, G., Tozzi, G., und Roldo, M. (2018) 3D Printing and Electrospinning of Composite Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering. *Polymers* 10(3): 285.
- De Witte, T.-M., Fratila-Apachitei, L. E., Zadpoor, A. A., und Peppas, N. A. (2018) Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. *Regenerative Biomaterials* 5(4): 197-211.
- Dennis-Sykes, C. A., Miller, W. J., und McAleer, W. J. (1985) A quantitative Western Blot method for protein measurement. *Journal of Biological Standardization* 13(4): 309–314.
- Deville, S. (2008) Freeze-Casting of Porous Ceramics: A Review of Current Achievements and Issues. *Advanced Engineering Materials* 10(3): 155–169.
- Dhurat, R., und Sukesh, M. (2014) Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* 7(4): 189.
- Di Luca, A., Ostrowska, B., Lorenzo-Moldero, I., Lepedda, A., Swieszkowski, W., Van Blitterswijk, C., und Moroni, L. (2016) Gradients in pore size enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional scaffolds. *Scientific Reports* 6 (22898).
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. ., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., und Horwitz, E. M. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 8(4): 315–317.
- Draghi, L., Brunelli, D., Farè, S., und Tanzi, M. C. (2015) Programmed cell delivery from biodegradable microcapsules for tissue repair. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 26(15): 1002–1012.
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A. F., Beil, F. T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J. M., and Karsenty, G. (2000) Leptin Inhibits Bone Formation through a Hypothalamic Relay: A Central Control of Bone Mass. *Cell* 100: 197-207
- Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., und Chen, Z. (2017) Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* 32(4): 266–277.
- Ehnert, S., Baur, J., Schmitt, A., Neumaier, M., Lucke, M., Dooley, S., Vester, H., Wildemann, B., Stöckle, U., und Nussler, A. K. (2010) TGF- $\beta$ 1 As Possible Link between Loss of Bone Mineral Density and Chronic Inflammation. *PLoS ONE* 5(11): e14073.

- Ehnert, S., Freude, T., Ihle, C., Mayer, L., Braun, B., Graeser, J., Flesch, I., Stöckle, U., Nussler, A. K., und Pscherer, S. (2015) Factors circulating in the blood of type 2 diabetes mellitus patients affect osteoblast maturation – Description of a novel in vitro model. *Experimental Cell Research* 332(2): 247–258.
- Ehnert, S., Häuser, J., Kerler, I., Schmitt, A., Freude, T., Neumaier, M., Egaña, T., Schenck, T., Stöckle, U., und Nüssler, A. K. (2011) Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe 1: 3-8.
- Ehrmann, R. L. (1956) The Growth of Cells on a Transparent Gel of Reconstituted Rat-Tail Collagen. *Journal of the National Cancer Institute* 16:1375-1403.
- Faia-Torres, A. B., Guimond-Lischer, S., Rottmar, M., Charnley, M., Goren, T., Maniura-Weber, K., Spencer, N. D., Reis, R. L., Textor, M., und Neves, N. M. (2014) Differential regulation of osteogenic differentiation of stem cells on surface roughness gradients. *Biomaterials* 35(33): 9023–9032.
- Fallahiazouard, E., Ahmadipourroudposht, M., Idris, A., and Mohd Yusof, N. (2015) A review of: Application of synthetic scaffold in tissue engineering heart valves. *Materials Science and Engineering: C* 48: 556–565.
- Ferreira, A. M., Gentile, P., Chiono, V., und Ciardelli, G. (2012) Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia* 8(9): 3191–3200.
- Floss, T., Arnold, H.-H., und Braun, T. (1997) A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes & Development* 11(16): 2040–2051.
- Gao, C. (2017) Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Research* 5: 17059.
- Ge, J., Guo, L., Wang, S., Zhang, Y., Cai, T., Zhao, R. C. H., und Wu, Y. (2014) The Size of Mesenchymal Stem Cells is a Significant Cause of Vascular Obstructions and Stroke. *Stem Cell Reviews and Reports* 10(2): 295–303.
- Giannoudis, P. V., Faour, O., Goff, T., Kanakaris, N., und Dimitriou, R. (2011) Masquelet technique for the treatment of bone defects: Tips-tricks and future directions. *Injury* 42(6): 591–598.
- Godbey, W. T., Stacey Hindy, B. S., Sherman, M. E., und Atala, A. (2004) A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds. *Biomaterials* 25(14): 2799–2805.
- Gomes, A., Guillaume, L., Grimes, D. R., Fehrenbach, J., Lobjois, V., und Ducommun, B. (2016) Oxygen Partial Pressure Is a Rate-Limiting Parameter for Cell Proliferation in 3D Spheroids Grown in Physioxenic Culture Condition. *PLOS ONE* 11(8): 0161239.

- Gómez-Barrena, E., Rosset, P., Lozano, D., Stanovici, J., Ermthaller, C., und Gerbhard, F. (2015) Bone fracture healing: Cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone* 70: 93–101.
- Griffin, X. L., Smith, C. M., und Costa, M. L. (2009) The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: A systematic review. *Injury* 40(2): 158–162.
- Griffith, L. G., und Swartz, M. A. (2006) Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(3): 211–224.
- Gu, X., Ding, F., und Williams, D. F. (2014) Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 35(24): 6143–6156.
- Guillemin, N., Meunier, B., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J.-F., Leveziel, H., und Picard, B. (2009) Validation of a Dot-Blot quantitative technique for large scale analysis of beef tenderness biomarkers. *Journal of Physiology and Pharmacology* 60 (3): 91–97.
- Guvendiren, M., und Burdick, J. A. (2012) Stiffening hydrogels to probe short- and long-term cellular responses to dynamic mechanics. *Nature Communications* 3(1): 792.
- Hale, L. V., Ma, Y. F., und Santerre, R. F. (2000) Semi-Quantitative Fluorescence Analysis of Calcein Binding as a Measurement of In Vitro Mineralization. *Calcified Tissue International* 67(1): 80–84.
- Hamilton, N. J., Kanani, M., Roebuck, D. J., Hewitt, R. J., Cetto, R., Culme-Seymour, E. J., et al. (2015) Tissue-Engineered Tracheal Replacement in a Child: A 4-Year Follow-Up Study: 4-Year Review of a Tissue-Engineered Trachea. *American Journal of Transplantation* 15(10): 2750–2757.
- Häussling, V., Deninger, S., Vidoni, L., Rinderknecht, H., Ruoß, M., Arnscheidt, C., Athanasopulu, K., Kemkemer, R., Nussler, A. K., und Ehnert, S. (2019) Impact of Four Protein Additives in Cryogels on Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Bioengineering* 6(3): 67.
- Henkel, J., Woodruff, M. A., Epari, D. R., Steck, R., Glatt, V., Dickinson, I. C., Choong, P. F. M., Schuetz, M. A., und Huttmacher, D. W. (2013) Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. *Bone Research* 1(3): 216–248.
- Herberts, C. A., Kwa, M. S., und Hermsen, H. P. (2011) Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of Translational Medicine* 9(1): 29.
- Hersel, U., Dahmen, C., und Kessler, H. (2003) RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 24: 4385–4415.

- Hixon, K. R., Lu, T., und Sell, S. A. (2017) A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* 62: 29–41.
- Hoburg, A., Löer, I., Körsmeier, K., Siebold, R., Niemeyer, P., Fickert, S., und Ruhнау, K. (2019) Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation Is an Effective Treatment at Midterm Follow-up in Adolescents and Young Adults. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine* 7(4)
- Huang, W. (2007) Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Frontiers in Bioscience* 12(8–12): 3068.
- Huang, Y., Zhang, X.-F., Gao, G., Yonezawa, T., und Cui, X. (2017) 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. *Biotechnology Journal* 12(8): 1600734.
- Hutmacher, D. W. (2001) Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 12(1): 107–124.
- Huettner, N. (2018) Discovering Cell-Adhesion Peptides in Tissue Engineering: Beyond RGD. *Trends in Biotechnology* 36(4)
- Jain, E., und Kumar, A. (2013) Disposable polymeric cryogel bioreactor matrix for therapeutic protein production. *Nature Protocols* 8(5): 821–835.
- Jawad, H., Ali, N. N., Lyon, A. R., Chen, Q. Z., Harding, S. E., und Boccaccini, A. R. (2007) Myocardial tissue engineering: a review. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 1(5): 327–342.
- Jayakumar, P., and Di Silvio, L. (2010) Osteoblasts in bone tissue engineering. (Tanner, K. E. and Dalby, M. J., Eds.) *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 224(12): 1415–1440.
- Kale, S., Biermann, S., Edwards, C., Tarnowski, C., Morris, M., und Long, M. W. (2000) Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone. *Nature Biotechnology* 18(9): 954–958.
- Kapfer, S., Hyde, S., Mecke, K., Arns, C., und Schröder-Turk, G. (2011) Minimal surface scaffold designs for tissue engineering. *Biomaterials* 32(29): 6875–6882.
- Karageorgiou, V., und Kaplan, D. (2005) Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26(27): 5474–5491.
- Kasten, P., Vogel, J., Geiger, F., Niemeyer, P., Luginbühl, R., und Szalay, K. (2008) The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. *Biomaterials* 29(29): 3983–3992.

- Kim, B.-S., Kim, J.-S., Yang, S.-S., Kim, H.-W., Lim, H. J., und Lee, J. (2015) Angiogenin-loaded fibrin/bone powder composite scaffold for vascularized bone regeneration. *Biomaterials Research* 19(1).
- Kim, K., Yeatts, A., Dean, D., und Fisher, J. P. (2010) Stereolithographic Bone Scaffold Design Parameters: Osteogenic Differentiation and Signal Expression. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 16(5): 523–539.
- Kim, M., Kim, C., Choi, Y. S., Kim, M., Park, C., und Suh, Y. (2012) Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: Implication to age-associated bone diseases and defects. *Mechanisms of Ageing and Development* 133(5): 215–225.
- Kini, U., und Nandeesh, B. N. (2012) Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism, *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Springer-Verlag Berlin. Kapitel 2
- Knobeloch, D., Ehnert, S., Schyschka, L., Büchler, P., Schoenberg, M., Kleeff, J., Thasler, W. E., Nussler, N. C., Godoy, P., Hengstler, J., und Nussler, A. K. (2012) Human Hepatocytes: Isolation, Culture, and Quality Procedures. *Human Cell Culture Protocols* 806 (8): 99-119
- Ko, C., Milthorpe, B., und McFarland, C. (2007) Engineering thick tissues - the vascularisation problem. *European Cells and Materials* 14: 1–19.
- Kohli, S., und Kohli, V. (2011) Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 15(3): 175.
- Krahl, H., Michaelis, U., Pieper, H.-G., Quack, G., und Montag, M. (1994) Stimulation of Bone Growth Through Sports: A Radiologic Investigation of the Upper Extremities in Professional Tennis Players. *The American Journal of Sports Medicine* 22(6): 751–757.
- Kumari, J., und Kumar, A. (2017) Development of polymer based cryogel matrix for transportation and storage of mammalian cells. *Scientific Reports* 7(1): 41551.
- Labunets, I. F. (2014) The peculiarities of age-related changes in the cellular composition of bone marrow, pineal melatonin-forming function, and thymus endocrine function in mice of different strains. *Advances in Gerontology* 4(2): 134–139.
- Lao, L., Wang, Y., Zhu, Y., Zhang, Y., and Gao, C. (2011) Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22(8): 1873–1884.

- L'Heureux, N., Dusserre, N., Konig, G., Victor, B., Keire, P., Wight, N., Chronos, N. A. F., Kyles, A. E., Gregory, C. R., Hoyt, G., and McAllister, T. N. (2006) Human Tissue Engineered Blood Vessel For Adult Arterial Revascularization 12(3): 361–365.
- Li, B., und Aspden, R. M. (1997) Composition and Mechanical Properties of Cancellous Bone from the Femoral Head of Patients with Osteoporosis or Osteoarthritis. *Journal of Bone and Mineral Research* 12(4): 641–651.
- Li, J., Baker, B. A., Mou, X., Ren, N., Qiu, J., Boughton, R. I., and Liu, H. (2014) Biopolymer/Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials* 3(4): 469–484.
- Li, P.-S., -Liang Lee, I., Yu, W.-L., Sun, J.-S., Jane, W.-N., and Shen, H.-H. (2015) A Novel Albumin-Based Tissue Scaffold for Autogenic Tissue Engineering Applications. *Scientific Reports* 4(1).
- Li, S. H., De Wijn, J. R., Layrolle, P., und De Groot, K. (2002) Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 61(1): 109–120.
- Liao, H.-T. (2014) Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells* 6(3): 288.
- Liu, G., Zhang, Y., Liu, B., Sun, J., Li, W., and Cui, L. (2013) Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold. *Biomaterials* 34(11): 2655–2664.
- Liu, L., und Rando, T. A. (2011) Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *The Journal of Cell Biology* 193(2): 257–266.
- Liu, M., Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., Mou, X., Li, S., Deng, Y., und He, N. (2017) Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Research* 5(1): 17014.
- Liu, X.-Y., Li, X., Bai, M.-R., Chen, X., Wang, C.-L., Xie, J., und Ye, L. (2018) FGF-7 Dictates Osteocyte Cell Processes Through Beta-Catenin Transduction. *Scientific Reports* 8(1):14792.
- Logeart-Avramoglou, D., Anagnostou, F., Bizios, R., und Petite, H. (2005) Engineering bone: challenges and obstacles. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9(1): 72–84.
- Loh, Q. L. (2013) Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering: Part B* 19(6): 485-501
- Lozinsky, V. I., und Okay, O. (2014) Basic Principles of Cryotropic Gelation. *Polymeric Cryogels* 263: 101-153.

- Lüllmann-Rauch, R. (2019) Taschenlehrbuch Histologie. *Thieme Verlag, Stuttgart* Kapitel 8.4
- Macková, H., Plichta, Z., Proks, V., Kotelnikov, I., Kučka, J., Hlídková, H., Horák, D., Kubinová, Š., und Jiráková, K. (2016) RGDS- and SIKVAVS-Modified Superporous Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Macromolecular Bioscience* 16(11): 1621–1631.
- Malhotra, A., Pelletier, M. H., Yu, Y., und Walsh, W. R. (2013) Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 133(2): 153–165.
- Marot, D., Knezevic, M., und Novakovic, G. (2010) Bone tissue engineering with human stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* 1(2): 10.
- Matsiko, A., Gleeson, J. P., und O'Brien, F. J. (2015) Scaffold Mean Pore Size Influences Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation and Matrix Deposition. *Tissue Engineering Part A* 21(3–4): 486–497.
- Matsuo, K. (2009) Cross-talk among bone cells: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 18(4): 292–297.
- McMillian, M., Li, L., Parker, J. *et al.* (2002) An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biol Toxicol* 18, 157–173
- McNeill, E. P., Zeitouni, S., Pan, S., Haskell, A., Cesarek, M., Tahan, D., Clough, B. H., Krause, U., Dobson, L. K., Garcia, M., Kung, C., Zhao, Q., Saunders, W. B., Liu, F., Kaunas, R., und Gregory, C. A. (2020) Characterization of a pluripotent stem cell-derived matrix with powerful osteoregenerative capabilities. *Nature Communications* 11(1): 3025.
- Mo, M., Wang, S., Zhou, Y., Li, H., und Wu, Y. (2016) Mesenchymal stem cell subpopulations: phenotype, property and therapeutic potential. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(17): 3311–3321.
- Muduli, S., Chen, L.-H., Li, M.-P., Heish, Z., Liu, C.-H., Kumar, S., Alarfaj, A. A., Munusamy, M. A., Benelli, G., Murugan, K., Wang, H.-C., Chen, D.-C., Hsu, S.-T., Chang, S.-C., und Higuchi, A. (2017) Stem cell culture on polyvinyl alcohol hydrogels having different elasticity and immobilized with ECM-derived oligopeptides. *Journal of Polymer Engineering* 37(7): 647–660.
- Muminagic, S. (2011) History of Bone Fracture: Treatment and Immobilization. *Materia Socio Medica* 23(2): 111.
- Murphy, C. M., Matsiko, A., Haugh, M. G., Gleeson, J. P., und O'Brien, F. J. (2012) Mesenchymal stem cell fate is regulated by the composition and mechanical properties of collagen–glycosaminoglycan scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 11: 53–62.

- Murphy, C. M., und O'Brien, F. J. (2010) Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adhesion & Migration* 4(3): 377–381.
- Musina, R. A., Bekchanova, E. S., und Sukhikh, G. T. (2005) Comparison of Mesenchymal Stem Cells Obtained from Different Human Tissues. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 139(4): 504–509.
- Nagasawa, T. (2006) Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature Reviews Immunology* 6(2): 107–116.
- Ng, W. L., Lee, J. M., Zhou, M., Chen, Y.-W., Lee, K.-X. A., Yeong, W. Y., and Shen, Y.-F. (2020) Vat polymerization-based bioprinting—process, materials, applications and regulatory challenges. *Biofabrication* 12(2): 022001.
- Ngo, T. D., Kashani, A., Imbalzano, G., Nguyen, K. T. Q., and Hui, D. (2018) Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B: Engineering* 143: 172–196.
- Nie, L., Chen, D., Suo, J., Zou, P., Feng, S., Yang, Q., Yang, S., und Ye, S. (2012) Physicochemical characterization and biocompatibility in vitro of biphasic calcium phosphate/polyvinyl alcohol scaffolds prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 100: 169–176.
- Niemeyer, P., Fechner, K., Milz, S., Richter, W., Suedkamp, N. P., Mehlhorn, A. T., Pearce, S., und Kasten, P. (2010) Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials* 31(13): 3572–3579.
- Nikolidakis, D., und Jansen, J. A. (2008) The Biology of Platelet-Rich Plasma and Its Application in Oral Surgery: Literature Review. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 14(3): 249–258.
- Ohashi, K., Yokoyama, T., Yamato, M., Kuge, H., Kanehiro, H., Tsutsumi, M., Amanuma, T., Iwata, H., Yang, J., Okano, T., und Nakajima, Y. (2007) Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nature Medicine* 13(7): 880–885.
- Osathanon, T., Linnes, M. L., Rajachar, R. M., Ratner, B. D., Somerman, M. J., und Giachelli, C. M. (2008) Microporous nanofibrous fibrin-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 29(30): 4091–4099.
- Pampaloni, F., Reynaud, E. G., und Stelzer, E. H. K. (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(10): 839–845.
- Park, H. J., Lee, O. J., Lee, M. C., Moon, B. M., Ju, H. W., Lee, J. min, Kim, J.-H., Kim, D. W., und Park, C. H. (2015) Fabrication of 3D porous silk scaffold

- folds by particulate (salt/sucrose) leaching for bone tissue reconstruction. *International Journal of Biological Macromolecules* 78: 215–223.
- Penolazzi, L., Lolli, A., Sardelli, L., Angelozzi, M., Lambertini, E., Trombelli, L., Ciarpella, F., Vecchiatini, R., und Piva, R. (2016) Establishment of a 3D-dynamic osteoblasts–osteoclasts co-culture model to simulate the jawbone microenvironment in vitro. *Life Sciences* 152: 82–93.
- Peter, M., Ganesh, N., Selvamurugan, N., Nair, S. V., Furuike, T., Tamura, H., und Jayakumar, R. (2010) Preparation and characterization of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers* 80(3): 687–694.
- Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M., und Ramirez-Vick, J. E. (2014) Scaffold Design for Bone Regeneration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 14(1): 15–56.
- Porter, J. R., Ruckh, T. T., und Popat, K. C. (2009) Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology Progress* 25(6): 1539–1559.
- Putra, S., Tsuprykov, O., Websky, K., Ritter, T., Reichetzedler, C., und Hocher, B. (2014) Dealing with Large Sample Sizes: Comparison of a New One Spot Dot Blot Method to Western Blot. *Clinical Laboratory* 60: 1–7.
- Radisic, M., und Christman, K. L. (2013) Materials Science and Tissue Engineering: Repairing the Heart. *Mayo Clinic Proceedings* 88(8): 884–898.
- Rallapalli, S., Bishi, D. K., Verma, R. S., Cherian, K. M., und Guhathakurta, S. (2009) A multiplex PCR technique to characterize human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Biotechnology Letters* 31(12): 1843–1850.
- Raya-Rivera, A., Esquiliano, D. R., Yoo, J. J., Lopez-Bayghen, E., Soker, S., und Atala, A. (2011) Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *The Lancet* 377(9772): 1175–1182.
- Reis, L. A., Chiu, L. L. Y., Feric, N., Fu, L., und Radisic, M. (2016) Biomaterials in myocardial tissue engineering: Biomaterials in myocardial tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 10(1): 11–28.
- Reumann, M., Linnemann, C., Aspera-Werz, R., Arnold, S., Held, M., Seeliger, C., Nussler, A., und Ehnert, S. (2018) Donor Site Location Is Critical for Proliferation, Stem Cell Capacity, and Osteogenic Differentiation of Adipose Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Implications for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* 19(7): 1868.
- Rodrigues, C. V. M., Serricella, P., Linhares, A. B. R., Guerdes, R. M., Borojevic, R., Rossi, M. A., Duarte, M. E. L., und Farina, M. (2003) Characteriza-

- tion of a bovine collagen–hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 24(27): 4987–4997.
- Romano, C. L., Romano, D., und Logoluso, N. (2009) Low-Intensity Pulsed Ultrasound for the Treatment of Bone Delayed Union or Nonunion: A Review. *Ultrasound in Medicine & Biology* 35(4): 529–536.
- Roosa, S. M. M., Kempainen, J. M., Moffitt, E. N., Krebsbach, P. H., und Hollister, S. J. (2010) The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an *in vivo* model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 92A(1): 359–368.
- Rose, F. und Oreffo, R. (2002) Bone Tissue Engineering: Hope vs Hype. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292(1): 1–7.
- Rouwkema, J., R. J. et al (2008) Vascularization in tissue engineering. *Trends in Biotechnology* 26(8): 434–441
- Rubin, M. R., und Bilezikian, J. P. (2002) The Role of Parathyroid Hormone in the Pathogenesis of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: A Re-Examination of the Evidence. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(9): 4033–4041.
- Ruoß, M., Kieber, V., Rebholz, S., Linnemann, C., Rinderknecht, H., Häussling, V., Häcker, M., Olde Damink, L. H. H., Ehnert, S., und Nussler, A. K. (2019) Cell-Type-Specific Quantification of a Scaffold-Based 3D Liver Co-Culture. *Methods and Protocols* 3(1): 1.
- Rutkovskiy, A., Stensløyken, K.-O., und Vaage, I. J. (2016) Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical Science Monitor Basic Research* 22: 95–106.
- Sabokbar, A., Millett, P. J., Myer, B., und Rushton, N. (1994) A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone and Mineral* 27(1): 57–67.
- Santos, M. I., und Reis, R. L. (2010) Vascularization in Bone Tissue Engineering: Physiology, Current Strategies, Major Hurdles and Future Challenges. *Macromolecular Bioscience* 10(1): 12–27.
- Sathishkumar, K., Gao, X., Raghavamenon, A. C., Murthy, S. N., Kadowitz, P. J., und Uppu, R. M. (2010) Determination of Glutathione, Mitochondrial Transmembrane Potential, and Cytotoxicity in H9c2 Cardiomyoblasts Exposed to Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Methods in Molecular Biology* 610(4):41-61
- Schieker, M., Seitz, H., Drosse, I., Seitz, S., und Mutschler, W. (2006) Biomaterials as Scaffold for Bone Tissue Engineering. *European Journal of Trauma* 32(2): 114–124.

- Silva, F. S. G., Starostina, I. G., Ivanova, V. V., Rizvanov, A. A., Oliveira, P. J., und Pereira, S. P. (2016) Determination of Metabolic Viability and Cell Mass Using a Tandem Resazurin/Sulforhodamine B Assay: SRB/Resazurin Assay for Cell Viability and Metabolism. *Current Protocols in Toxicology* 68(1): 2.24.1-2.24.15.
- Schmid, F., Kleinhans, C., Schmid, F., und Kluger, P. (2018) Osteoclast Formation within a Human Co-Culture System on Bone Material as an In Vitro Model for Bone Remodeling Processes. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology* 3(1): 1-16.
- Schulze, S., Wehrum, D., Dieter, P., und Hempel, U. (2018) A supplement-free osteoclast-osteoblast co-culture for pre-clinical application. *Journal of Cellular Physiology* 233(6): 4391–4400.
- Seeliger, C., Culmes, M., Schyschka, L., Yan, X., Damm, G., Wang, Z., Kleeff, J., Thasler, W. E., Hengstler, J., Stöckle, U., Ehnert, S., und Nüssler, A. K. (2013) Decrease of Global Methylation Improves Significantly Hepatic Differentiation of Ad-MSCs: Possible Future Application for Urea Detoxification. *Cell Transplantation* 22(1): 119–131.
- Seong, J. M., Kim, B.-C., Park, J.-H., Kwon, I. K., Mantalaris, A., und Hwang, Y.-S. (2010) Stem cells in bone tissue engineering. *Biomedical Materials* 5(6): 062001.
- Shafiee, A., und Atala, A. (2017) Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annual Review of Medicine* 68(1): 29–40.
- Shafiee, A., Seyedjafari, E., Soleimani, M., Ahmadbeigi, N., Dinarvand, P., und Ghaemi, N. (2011) A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnology Letters* 33(6): 1257–1264.
- Shlomchik, W. D. (2007) Graft-versus-host disease. *Nature Reviews Immunology* 7(5): 340–352.
- Silva, F. S. G., Starostina, I. G., Ivanova, V. V., Rizvanov, A. A., Oliveira, P. J., und Pereira, S. P. (2016) Determination of Metabolic Viability and Cell Mass Using a Tandem Resazurin/Sulforhodamine B Assay: SRB/Resazurin Assay for Cell Viability and Metabolism. *Current Protocols in Toxicology* 68(1): 2.24.1-2.24.15.
- Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Salagianni, M., Baxevanis, C. N., und Papamichail, M. (2006) Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 24(2): 462–471.
- Štefková, K., Procházková, J., und Pacherník, J. (2015) Alkaline Phosphatase in Stem Cells. *Stem Cells International* 2015: 1–11.

- Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., und Scutt, A. (2008) Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development* 129(3): 163–173.
- Ström, A., Larsson, A., und Okay, O. (2015) Preparation and physical properties of hyaluronic acid-based cryogels. *Journal of Applied Polymer Science* 42194: 1-11.
- Sun, L.-Y., Pang, C.-Y., Li, D.-K., Liao, C.-H., Huang, W.-C., Wu, C.-C., Chou, Y.-Y., Li, W., Chen, S.-Y., Liu, H.-W., Chang, Y.-J., und Cheng, C.-F. (2013) Antioxidants cause rapid expansion of human adipose-derived mesenchymal stem cells via CDK and CDK inhibitor regulation. *Journal of Biomedical Science* 20(1): 53.
- Sundelacruz, S., Levin, M., und Kaplan, D. L. (2008) Membrane Potential Controls Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. (Giannobile, W., Ed.) *PLoS ONE* 3(11): 3737
- Szade, K., Zuba-Surma, E., Rutkowski, A. J., Jozkowicz, A., und Dulak, J. (2011) CD45–CD14+CD34+ murine bone marrow low-adherent mesenchymal primitive cells preserve multilineage differentiation potential in long-term in vitro culture. *Molecules and Cells* 31(6): 497–507.
- Takayanagi, H. (2009) Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. *Nature Reviews Rheumatology* 5(12): 667–676.
- Tendulkar, G., Grau, P., Ziegler, P., Buck, A., Buck, A., Badke, A., Kaps, H.-P., Ehnert, S., und Nussler, A. K. (2016) Imaging Cell Viability on Non-transparent Scaffolds – Using the Example of a Novel Knitted Titanium Implant. *Journal of Visualized Experiments* (115). e54537
- Tamjid, E., Simchi, A., Dunlop, J. W. C., Fratzl, P., Bagheri, R., und Vossoughi, M. (2013) Tissue growth into three-dimensional composite scaffolds with controlled micro-features and nanotopographical surfaces: Tissue Growth with Controlled Topographical Surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 101(10): 2796–2807.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., und Tada, K. (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer* 26(2): 171–176.
- Tsuruga, E., Takita, H., Itoh, H., Wakisaka, Y., und Kuboki, Y. (1997) Pore Size of Porous Hydroxyapatite as the Cell-Substratum Controls BMP-Induced Osteogenesis. *Journal of Biochemistry* 121(2): 317–324.
- Tuan, H. S., und Hutmacher, D. W. (2005) Application of micro CT and computation modeling in bone tissue engineering. *Computer-Aided Design* 37(11): 1151–1161.

- Turner, C. H., und Burr, D. B. (1993) Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone* 14(4): 595–608.
- Uthoff, H. K., Poitras, P., und Backman, D. S. (2006) Internal plate fixation of fractures: short history and recent developments. *Journal of Orthopaedic Science* 11(2): 118–126.
- Upadhyay, J., Farr, O. M., und Mantzoros, C. S. (2015) The role of leptin in regulating bone metabolism. *Metabolism* 64(1): 105–113.
- van Lenthe (2006) Nondestructive micro-computed tomography for biological imaging and quantification of scaffold–bone interaction in vivo. *Biomaterials* 28 (15): 2479-2490
- Volkmer, E., Drosse, I., Otto, S., Stangelmayer, A., Stengele, M., Kallukalam, B. C., Mutschler, W., und Schieker, M. (2008) Hypoxia in Static and Dynamic 3D Culture Systems for Tissue Engineering of Bone. *Tissue Engineering Part A* 14(8): 1331–1340.
- Wahl, E. A., Fierro, F. A., Peavy, T. R., Hopfner, U., Dye, J. F., Machens, H.-G., Egaña, J. T., und Schenck, T. L. (2015) *In Vitro* Evaluation of Scaffolds for the Delivery of Mesenchymal Stem Cells to Wounds. *BioMed Research International* 2015: 1–14.
- Wang, C., Huang, W., Zhou, Y., He, L., He, Z., Chen, Z., He, X., Tian, S., Liao, J., Lu, B., Wei, Y., und Wang, M. (2020) 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioactive Materials* 5(1): 82–91.
- Wang, H., Qi, M., und Cutler, A. J. (1993) A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Research* 21(17): 4153–4154.
- Wei, X., Yang, X., Han, Z., Qu, F., Shao, L., und Shi, Y. (2013) Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica* 34(6): 747–754.
- Williams, J. M., Adewunmi, A., Schek, R. M., Flanagan, C. L., Krebsbach, P. H., Feinberg, S. E., Hollister, S. J., und Das, S. (2005) Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials* 26(23): 4817–4827.
- Wilson, A., Shehadeh, L. A., Yu, H., und Webster, K. A. (2010) Age-related molecular genetic changes of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Genomics* 11(1): 229.
- Wright, H. L., McCarthy, H. S., Middleton, J., und Marshall, M. J. (2009) RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine* 2(1): 56–64.

- Wubneh, A., Tsekoura, E. K., Ayranci, C., und Uludağ, H. (2018) Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 80: 1–30.
- Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Takahashi, M., Hata, K.-I., und Nagasaka, T. (2004) Autogenous Injectable Bone for Regeneration with Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma: Tissue-Engineered Bone Regeneration. *Tissue Engineering* 10(5–6): 955–964.
- Yeatts, A. B., und Fisher, J. P. (2011) Bone tissue engineering bioreactors: Dynamic culture and the influence of shear stress. *Bone* 48(2): 171–181.
- Yin, T. (2006) The stem cell niches in bone. *Journal of Clinical Investigation* 116(5): 1195–1201.
- Yoon, J. J., und Park, T. G. (2001) Degradation behaviors of biodegradable macroporous scaffolds prepared by gas foaming of effervescent salts. *Journal of Biomedical Materials Research* 55(3): 401–408.
- Zeltinger, J., Sherwood, J. K., Graham, D. A., Müller, R., und Griffith, L. G. (2001) Effect of Pore Size und Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition. *Tissue Engineering* 7(5): 557–572.
- Zha, Z., Bucher, F., Nejatfard, A., Zheng, T., Zhang, H., Yea, K., und Lerner, R. A. (2017) Interferon- $\gamma$  is a master checkpoint regulator of cytokine-induced differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(33): E6867–E6874.
- Zhang, K., Wang, S., Zhou, C., Cheng, L., Gao, X., Xie, X., Sun, J., Wang, H., Weir, M. D., Reynolds, M. A., Zhang, N., Bai, Y., und Xu, H. H. K. (2018) Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration. *Bone Research* 6(1): 31.
- Zhang, X., Cao, C., Ma, X., und Li, Y. (2012) Optimization of macroporous 3-D silk fibroin scaffolds by salt-leaching procedure in organic solvent-free conditions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23(2): 315–324.
- Zheng, M. H., Wood, D. J., und Papadimitriou, J. M. (1992) What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation? *Pathology - Research and Practice* 188(8): 1104–1121.
- Zhu, S., Ehnert, S., Rouß, M., Häussling, V., Aspera-Werz, R., Chen, T., und Nussler, A. (2018) From the Clinical Problem to the Basic Research—Co-Culture Models of Osteoblasts and Osteoclasts. *International Journal of Molecular Sciences* 19(8): 2284.
- Ziopoulos, P., und Currey, J. D. (1998) Changes in the Stiffness, Strength, and Toughness of Human Cortical Bone With Age. *Bone* 22(1): 57-66.

## 8. Anhang

### 8.1 Material

#### 8.1.1 Chemikalienliste

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Alcianblau	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Alizarin-Rot	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammonium Persulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bis-Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA (Bovines Serum Albumin)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calcein-AM	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cholecalciferol	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Demineralisiertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Apotheke der Universitätsklinik Tübingen, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dexamethason	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA des Kälberthymus	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's Phosphat gepufferte Saline ohne Kalzium und Magnesium	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland

(DPBS)	
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70%	SAV Liquid Production, Flintsbach am Inn, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Formaldehyd	Bezogen über BG Klinik Tübingen, Deutschland
Glutaraldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Hydroxy-ethyl-methacrylat (HEMA)	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hoechst 33342	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Honeywell, Morris Plains, USA
Kalziumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kollagenase	Nordmark Biochemicals, Uertersen, Deutschland
Kupfersulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luminol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Kalzium Tartrat (Na-Ca-Tartrat)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Öl-Rot O	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin (1000E/ml) /Streptomycin (10mg/ml)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Pepstatin A	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Plättchenreiches Plasma	Gewonnen aus laborinternen Blutproben
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rattenschwanz-Kollagen (2,5g/l)	Eigene Herstellung nach Knobeloch <i>et al.</i> (2012)
Resazurin	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
RGD Peptide Art. 4009173	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Sodium-dodecyl-sulfat (SDS)	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tergitol-Lösung	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TriFast	VWR LifeSciences, Radnor, USA
Trinatriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Base (TRIS)	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Tween-20 Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Glycerophosphat	AppliChem, Omaha, USA

### 8.1.2 Primer, Antikörper und PCR-Kits

Die Primer wurden mithilfe der Software Primer-BLAST von Pubmed designed und bei Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland, bestellt.

<u>Verwendete Primer</u>			
Marker	Amplikon mit Länge in Basenpaare (Bp)	Sequenz	Gen-ID
CD 105	288 Bp	Fw: TGACCCGCGCTTCAGCTTCC Rv: TTGCTGGGGGAACGCGTGTG	NM_001114753.2
CD 90	346 Bp	Fw: GTCTCCCGAGGGCAGAAG	NM_001311162.2

		Rv:CACACTTGACCAGTTTGTCTCT	
CD 73	155 Bp	Fw:GAAGGCCTTTGAGCATAGCG Rv:AACTGGGCACTCGACACTTG	NM_002526.4
CD 45	360 Bp	Fw:TCTTCAGTGGTCCCATTGTG Rv:TTCCAATGTGCTGTGTCCTC	NM_002838.5
CD 34	311 Bp	Fw:AGAAAGGCTGGGCGAAGACCC Rv:AGTGGGGAAGGGTTGGGCGT	NM_001025109.2
CD 19	132 Bp	Fw:GTGGTGAAGGTGGAAGAGGG Rv:CAGCCCCAGGCTGAGTTTTA	NM_001770.6
CD 14	369 Bp	Fw:AGCATTGCCCAAGCACACT Rv:CTTGGCTGGCAGTCCTTTAG	NM_001174105.2
HLA-DR	183 Bp	Fw:GTTTACGACTGCAGGGTGA Rv:GCTTTTGCGCAATCCCTTGA	NM_019111.5

<u>Verwendete Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-Mouse IgG HRP-gebundener Antikörper: sc-7076	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Deutschland
Anti-Rabbit IgG HRP-gebundener Antikörper: sc-7074	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Deutschland
OPG (IgG Kaninchen): sc-11383	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Deutschland
Osterix AK (IgG Maus): MAB7547	R&D Systems, Minneapolis, USA
Runx 2 AK (IgG Kaninchen): sc-10758	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Deutschland

<u>PCR-Kits</u>	<u>Hersteller</u>
Biozym Red HS Master Mix Art.-Nr.: 331126S	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Erststrang cDNA Synthese Kit für RT-PCR	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland

### 8.1.3 Verbrauchs- und Gebrauchsmaterial

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
24-, 48-, 96-Kavitätenplatte	Corning LSE, Corning, USA
15 ml, 50 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	BIO-Rad, Hercules, USA
Glukosemessstreifen Contour Next	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Handschuhe	Paul Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Kassette für Western Blot: Rothiphorese PROclamp MINI System	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nitrozellulose Papier	Biostep, Burkhardtsdorf, Deutschland
Parafilm	Bemis, Oshkosh, USA
Pasteur-Pipette	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR- Gefäße	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rasierklinge	Wilkinson sword, Solingen, Deutschland
Skalpell Feather 20	Dr. Junghans Medical, Bad Lausick, Deutschland
Spritze 10 ml	B.Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Sterilfilter	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Stripette (5ml, 10ml, 25ml, 50 ml)	Corning LSE, Corning, USA
Zellkulturflasche Cellstar T25, T75, T175	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zytokinarray Testset „RayBio C-Series – Human Cytokine Antibody Array C5“	RayBiotech, Norcross, USA

### 8.1.4 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Abzugshaube Secuflow 1200	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
ChemoCam Imager 3.2	INTAS Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
Computertomograph Somatom	Siemens, Berlin, München, Deutschland
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Halls, USA
Elektrophoresekammer	Peqlab Biosysteme, Erlangen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop, AMG evos fl	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland,
Fluostar Omega	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Kirchberg an der Iller, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Glukosometer Contour Next	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Kirchberg an der Iller, Deutschland
LVIS-Platte	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Mikroskop, Licht Typ Primo Vert 415510-1101-000	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop, Phasenkontrast Typ EVOS-fl	Peqlab Biosysteme, Erlangen, Deutschland
Mikrowellenofen	Severin, Sundern, Deutschland
Mikrozentrifuge Typ Fresco 17	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
PH-Meter Typ Five Easy FE 20	Mettler-Toledo, Columbus, USA
Pipettierhilfe Rota- Filler	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Plate Reader	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Sicherheitswerkbank Maxisafe S2020	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Thermocycler	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Vortex Mixer	Corning LSE, Corning, USA
Waage Kern PCB 250-3	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Waage Typ PCB 250-3, Typ ABJ 120-4 M	Kern und Sohn, Balingen, Deutschland
Wasserbad Aqualine AL25	LAUDA, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 40 R	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Zwickmaschine ZwickiLine Z 2.5TN	Zwick, Ulm, Deutschland

### 8.1.5 Verwendete Zelllinien

<u>Zelltyp</u>	<u>Hersteller</u>
SCP-1 Zelllinie	Bereitgestellt von Dr. Schieker (Böcker <i>et al.</i> , 2008)
THP-1 Zelllinie	Erhalten von Leibniz-Institut-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
Jeko-1 Zelllinie	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland

### 8.1.6 Medien und Lösungen

<u>Medium</u>	<u>Herstellung/ Hersteller</u>
Bovines Serumalbumin (BSA) Blockierlösung	5% BSA in TBS-T
Dulbecco's modifiziertes Eagles Medium (DMEM Medium)	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Immunzellkonditioniertes Medium	Gewonnen aus THP-1 Zellen in Kultur mit RPMI-1640 Medium mit L-Glutamin (Daigneault <i>et al.</i> , 2010)
Minimum Essential Medium (MEM Alpha Medium)	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Plättchenreiches Plasma	Gewonnen aus Blutproben von Mitarbeitern des Siegfried-Weller-Instituts nach Häussling <i>et al.</i> , 2019)
Radioimmunoprecipitationsassay (RIPA- Stocklösung)	10 mM TRIS Base, 100 mM NaCl, 0,5 % Tergitol, 0,5 % Desoxycholsäure, 10 mM EDTA

### **8.1.7 Software**

Excel Softwareprogramm, Microsoft, Redmond, USA

Graphiken von servier (<https://smart.servier.com/>), Suresnes, Frankreich

GraphPad Prism Version 8.00, San Diego, USA

Image J, Version 1.52e, Bildbearbeitungsprogramm

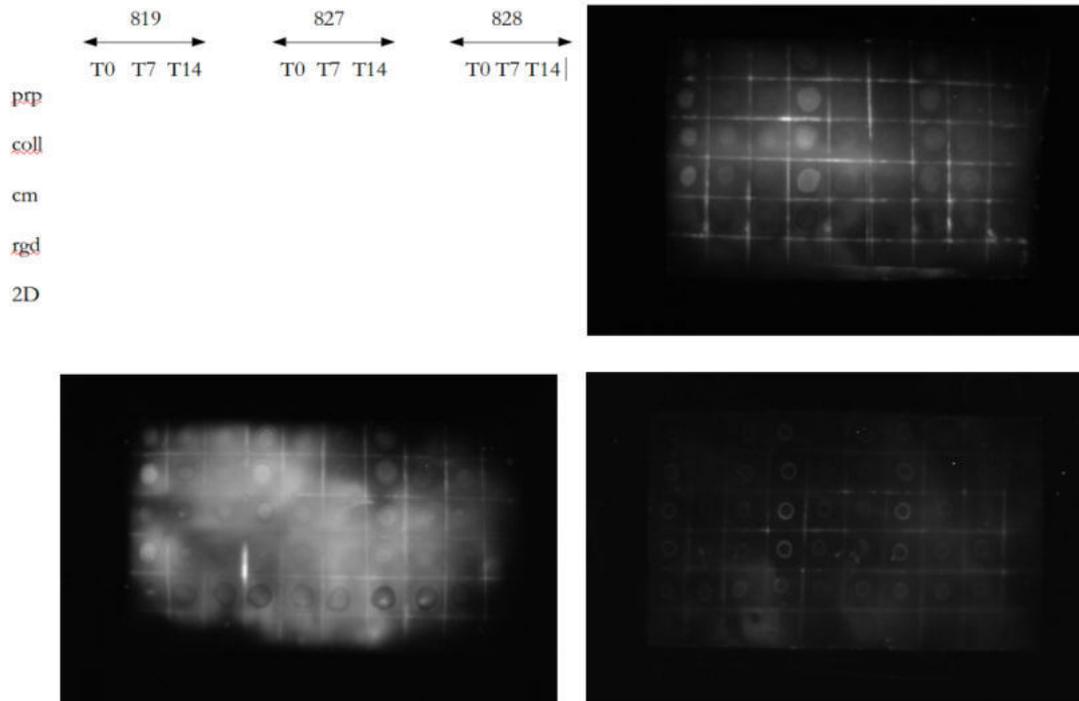
testXpert II, Testsoftware von Zwick, Ulm, Deutschland

Word Softwareprogramm, Microsoft, Redmond, USA

zotero 5.0.80, Literaturverwaltungsprogramm, Washington DC, USA

### 8.1.8 Übersicht der Dot-Blot Signale

Anordnung und Übersicht über die Dot-Signale der verschiedenen Dot-Blots. Entsprechend dem Pipettierschema links oben folgend Runx 2 (rechts oben), Osterix (links unten) und OPG (rechts unten)



## **9. Erklärung zum Eigenanteil**

Diese Arbeit wurde im Siegfried-Weller-Institut unter Betreuung von Prof. Dr. A. K. Nüssler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. A. K. Nüssler und PD Dr. Sabrina Ehnert.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Sabrina Ehnert, Victor Häussling, Marc Ruoß, Caren Linnemann, Hanna Schäffler und Bianca Braun von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich, wobei ich während der Laborarbeit von meiner Betreuerin PD Dr. Sabrina Ehnert betreut wurde und die Datenauswertung mit dem Institut für Biometrie Tübingen besprochen wurden.

Ich versichere, die Dissertation selbständig nach Anleitung durch PD Dr. Sabrina Ehnert verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

## **10. Veröffentlichungen**

Erste Daten des vorliegenden Projekts wurden in Form eines Posters auf den Chirurgischen Forschungstagen 2018 in Erlangen präsentiert.

Die Daten des vorliegenden Projekts wurden am 07.08.2019 im Journal Bioengineering als Teil des Manuskripts "Impact of Four Protein Additives in Cryogels on Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells" von den Autoren Victor Häussling, Sebastian Deninger, Laura Vidoni, Helen Rinderknecht, Marc Ruoß, Christian Arnscheidt, Kiriaki Athanasopulu, Ralf Kemkemer, Andreas K. Nüssler und Sabrina Ehnert publiziert.

## **11. Danksagung**

Ein herzlicher Dank für das Gelingen des Projekts gilt dem Siegfried-Weller-Institut, welches das Projekt überhaupt ermöglicht hatte.

Größter Dank geht an Herrn Prof. Dr. A. K. Nüssler für seine Betreuung und Unterstützung, sowie Frau PD Dr. Sabrina Ehnert für Betreuung und Anleitung.

Ein herzlicher Dank gilt außerdem den weiteren Mitarbeitern des Labors, die viele Dinge erklärt hatten und beratend zur Seite standen. Diese sind namentlich Marc Ruoß, Victor Häussling, Bianca Braun, Hanna Scheffler, Caren Linne-  
mann, Romina Aspera-Werz, Tao Chen, Sheng Zhu und Svetlana Gasimova.

Die statistische Beratung durch das Institut für Biomatrie in Person von Frau Inka Rösel war sehr hilfsbereit und kompetent und dafür danke ich sehr.

Besten Dank auch an das Promotionskolleg der Universität Tübingen für finanzielle und ideelle Unterstützung des Projekts. Herzlichen Dank an Frau Dr. Montero für beratende Gespräche und gedanklichen Austausch.