

Untersuchungen zur Herstellung von biofunktionalisierten Implantaten für humane Kieferperiostzellen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Nina Ardjomandi

aus Stuttgart-Bad Cannstatt

Tübingen

2011

Tag der mündlichen Prüfung: 30.9.2011

Dekan: Prof. Dr. W. Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Konrad Kohler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	11
1.1	Stammzellen	11
1.2	Differenzierung der MSC in Knochengewebe.....	13
1.3	Potentielle mesenchymale Stammzellquellen.....	13
1.4	Periost	14
1.5	Osteogenese und extrazelluläre Knochenmatrix	15
1.6	Tissue Engineering (TE)	16
1.7	Eigenschaften von Trägermatrizen	18
1.8	Trägermatrizen für Knochen-Tissue Engineering	18
1.9	Biofunktionalisierung von Trägermatrizen.....	19
1.10	RGD Peptide	19
1.10.1	Vorteile der Peptidbeschichtung versus Proteinbeschichtung	21
1.10.2	Immobilisierung von RGD Peptiden auf Polymeren	22
1.11	Aptamere.....	23
1.11.1	SELEX - Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment.....	25
1.11.2	Zell-Selex	27
1.11.3	Die Aptameranwendung als Methode der Biofunktionalisierung von Matrizen in der regenerativen Medizin	28
2	Zielsetzung der Arbeit	29
3	Methoden	31
3.1	Isolation der humanen Kieferperiostzellen aus dem Gewebe	31
3.2	Isolation der PBMCs aus dem peripheren Blut.....	31
3.3	Zellkultur.....	32
3.4	Differenzierung der Kieferperiostzellen.....	32
3.4.1	Osteogene Induktion	32
3.4.2	Adipogene Induktion.....	33
3.4.3	Chondrogene Induktion	33
3.5	Besiedelung der Trägermatrizen mit Kieferperiostzellen	33
3.6	Alizarinrot-Färbung zur Detektion von Kalziumphosphaten.....	33
3.7	Quantifizierung der Kalziumphosphatpräzipitate	34
3.8	Beschichtung der Trägermatrizen mit RGD Peptiden.....	34
3.8.1	RGD Peptidbeschichtung der Nunc Immobilizer Platten/2D Adhäsionsassay.....	34
3.8.2	RGD Peptidbeschichtung der Polylaktid (OPLA) Trägermatrizen.....	35
3.8.2.1	Direkte Peptid Beschichtung	35
3.8.2.2	Indirekte Peptid Beschichtung mit Poly-L-Lysin	35
3.9	Fluoreszenzmikroskopie	36
3.10	Proliferationsanalysen.....	36

3.11	Proteom Profiler Arrays.....	37
3.12	Durchflusszytometrische Analysen (FACS).....	37
3.13	Aminosäure-Analysen.....	38
3.14	Rasterelektronenmikroskopische Analysen.....	38
3.14.1	EDX-Spektroskopie zur Elementaranalyse der Präzipitate.....	39
3.15	RNA-Extraktion.....	39
3.16	cDNA Synthese für die quantitative PCR (polymerase chain reaction).....	39
3.17	cDNA Synthese und Präamplifikation für RT ² Profiler™ PCR Arrays.....	40
3.18	RT ² Profiler™ PCR Array.....	41
3.19	Aptamer-Generierung mithilfe der Zell-SELEX Methode.....	41
3.19.1	Inkubation der Zellen.....	41
3.19.2	Qualitative PCR.....	42
3.19.3	Aufreinigung der Aptamer-DNA.....	43
3.19.4	Lambda-Exonukleaseverdau der dsDNA.....	44
3.19.4.1	Phenol / Chloroform-Aufreinigung der ssDNA.....	44
3.19.5	Elektrophoretische Auftrennung der dsDNA.....	45
3.19.5.1	Gelelution der ssDNA.....	45
3.19.6	Klonierung der Aptamere.....	46
3.19.6.1	Aufreinigung der Plasmid DNA mit dem <i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	47
3.19.7	Sequenzierung der Aptamere.....	47
3.19.8	Durchflusszytometrische Analysen der gewonnenen Aptamere.....	48
3.19.9	Durchflusszytometrische Sortierung der Aptamer 74-positiven und -negativen Zellpopulationen.....	48
3.19.9.1	Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Aptamer 74- positiven und negativen Zellpopulationen.....	49
3.19.10	Beschichtung und Besiedelung der <i>xCELLigence E-Plates</i> mit Aptamer 74.....	49
4	Ergebnisse.....	50
4.1	RGD-Peptid-Beschichtung.....	50
4.1.1	Immobilisierungseffizienz der Peptide auf den OPLA-Trägermatrizen durch Aminosäureanalysen - ASA.....	50
4.1.2	2D und 3D Zelladhäsionsassays.....	52
4.1.3	2D und 3D Proliferationsassays.....	54
4.1.4	Analyse der beteiligten Integrine.....	57
4.1.4.1	Integrinexpression der JPCs in undifferenziertem, unbeschichteten Status in 2D Kultur... ..	57
4.1.4.2	Integrinexpression der JPCs in undifferenziertem, beschichteten Status in 3D Kultur.....	58
4.1.4.3	Funktionelle Integrinassays.....	59
4.1.5	Genexpressionsanalyse von osteogenen Markern.....	60
4.1.6	Analyse des Mineralisierungspotentials der JPCs kultiviert und differenziert in beschichteten Aminoplaten auf 2D Ebene.....	62
4.1.7	Analyse des Mineralisierungspotentials der JPCs kultiviert und differenziert innerhalb beschichteter 3D Konstrukte.....	63

4.1.7.1	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der 3D Konstrukte.....	63
4.1.8	Energiedispersive röntgenspektroskopische Analyse (EDX-Spektroskopie) der gebildeten Präzipitate in den beschichteten 3D-Konstrukten	65
4.2	Aptamere:.....	67
4.2.1	Aptamergenerierung durch SELEX	67
4.2.2	Klonierung.....	69
4.2.3	Sequenzfamilien	70
4.2.4	Faltungsmuster der sequenzierten Aptamere	71
4.2.4.1	Bindungsassays des Aptamers 74 an adipogen-, chondrogen und osteogen andifferenzierte JPCs	74
4.2.4.2	Bindungsassay des Aptamer 74 an JPCs verschiedener Patienten	75
4.2.4.3	Bindungsassays des Aptamers 74 an verschiedene MSC-Typen	76
4.2.4.4	Bindungsassays des Aptamers 74 an verschiedene Zelltypen.....	77
4.2.5	Live Monitoring der JPC Proliferation auf oligonukleotidbeschichteten versus unbeschichteten <i>E-Plates</i>	79
4.2.6	Untersuchungen der Aptamer 74-sortierten Zellfraktionen	82
5	Diskussion	85
5.1	Beschichtung der OPLA Trägermatrizen mit RGD Peptiden	85
5.2	Aptamergenerierung gegen humane Kieferperiostzellen	89
5.3	Herstellung von biofunktionalisierten Implantaten mit den angewendeten Methoden.....	97
6	Zusammenfassung	99
7	Summary	101
8	Literaturverzeichnis	103
9	Danksagung.....	109

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1 Differenzierung von Stammzellen	12
Abb. 2 Histologie eines Gewebeknochens.....	14
Abb. 3 Grundprinzipien des Tissue Engineerings	17
Abb. 4 Konträre Effekte von Integrin-Liganden	21
Abb. 5 Strukturformel eines RGD Peptids.....	22
Abb. 6 Aptamer-Target-Erkennung	24
Abb. 7 Bisher bekannte bzw. generierte RNA-Aptamere.....	25
Abb. 8 Schematische Darstellung der Zell-Selex Prozedur	26
Abb. 9 p-Drive Cloning Vektor mit seinen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme.	46
Abb. 10 Schematische Darstellung der Peptidkoppelung an die OPLA-Trägermatrix.....	50
Abb. 11 Aminosäureanalyse der beschichteten OPLA-Konstrukte.....	51
Abb. 12 Untersuchung der Zelladhäsion auf zweidimensionaler Kultivierungsebene mittels Fluoreszenzmikroskopie	53
Abb. 13 Untersuchung der Zelladhäsion auf dreidimensionaler Kultivierungsebene mittels Fluoreszenzmikroskopie	54
Abb. 14 Untersuchung der Zellproliferation auf zweidimensionaler Kultivierungsebene mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie	55
Abb. 15 Untersuchung der Zelladhäsion auf dreidimensionaler Kultivierungsebene mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie	56
Abb. 16 Metabolischer Proliferationssassay der JPCs nach 16 Tagen in 3D Kultur auf beschichteten OPLA-Trägermatrizen.....	57
Abb. 17 Durchflusszytometrische Analysen der konstitutiven Integrinexpression in undifferenzierten JPCs in unbeschichteter 2D-Kultur.....	58
Abb. 18 Analyse der Integrin Proteinexpressionsmuster der JPCs in 3D-Kultur auf beschichteten OPLA-Trägermatrizen nach 16 Tagen Kultur anhand eines Proteom Profilers.	59
Abb. 19 Funktioneller Assay zur Untersuchung der Zelladhäsion nach Behandlung mit neutralisierenden Integrinantikörpern auf 3D Ebene mit beschichteten OPLA-Konstrukten.	60
Abb. 20 Genexpressionsanalyse von Osteogenese-assoziierten Genen auf 3D kultivierten und beschichteten Konstrukten.	61
Abb. 21 Alizarinfärbung der 2D beschichteten und mit JPCs bewachsenen Aminoplaten zum Nachweis der Kalziumphosphatpräzipitate.....	62
Abb. 22 Photometrische Quantifizierung der Alizarinfärbung aus Abb. 21	63
Abb. 23 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verschieden beschichteten und mit humanen Kieferperiostzellen besiedelten OPLA-Konstrukte.	64
Abb. 24 Vergrößerte Aufnahmen der PLL+linear und linear beschichteten Konstrukte mit vermehrter Präzipitatbildung auf deren Oberfläche.	65
Abb. 25 Energiedispersive Röntgenanalysen (EDX-Spektroskopie)	66

Abb. 26 Durchflusszytometrische Analysen der generierten Aptamere nach den verschiedenen SELEX-Runden.	68
Abb. 27 Übersicht über die verschiedenen SELEX-Runden.....	69
Abb. 28 EcoR1 Restriktionsverdau der pDrive Plasmid-DNA aus den isolierten Klonen	69
Abb. 29 Multiples Alignment der Sequenzen der 24 positiven Klone mithilfe der Software <i>ClustaW2</i>	70
Abb. 30 Sequenzfamilienbaum der 24 generierten Aptamere	71
Abb. 31 Sequenzfamilien der 24 generierten Aptamere und deren Faltungsmuster, ermittelt mithilfe des Software-Programms <i>RNA-Fold</i>	73
Abb. 32 Prozentzahl positiver Counts der verschiedenen Aptamere in Bezug auf ihre Sequenzfamilien.	74
Abb. 33 Durchflusszytometrische Bindungsanalysen des Aptamer 74 an humane Kieferperiozyten nach 5-tägiger osteogener, adipogener und chondrogener Andifferenzierung	75
Abb. 34 Durchflusszytometrische Bindungsanalysen des Aptamers 74 an Zellen verschiedener Donoren.	76
Abb. 35 Durchflusszytometrische Analysen des Aptamers 74 an verschiedene humane mesenchymale Stammzelltypen und Fibroblasten im differenzierten und undifferenzierten Zellstatus.....	77
Abb. 36 Übersicht der durchflusszytometrischen Analysen über die Bindungsaffinitäten des Aptamers 74 an verschiedene Zelltypen.....	78
Abb. 37 Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen über die Bindungsaffinitäten des Aptamers 74 an verschiedene Zelltypen.....	79
Abb. 38 Live Monitoring der JPC Proliferation auf beschichteten und unbeschichteten E-Plates.....	81
Abb. 39 Live Monitoring der Proliferation der Aptamer 74-positiven versus der Aptamer 74-negativen JPC Fraktionen über einen Zeitraum von 4 Wochen.	82
Abb. 40 Alizarinfärbung zum Nachweis der Kalziumphosphatpräzipitate in Aptamer 74-sortierten positiven und negativen Fraktionen nach 30 Tagen osteogener Differenzierung	83
Abb. 41 Genexpression der Aptamer 74-positiven versus den Aptamer 74-negativen Zellen	84

Abkürzungsverzeichnis

Amely	Amelogenin
AP	a lkalische P hosphatase
ASA	A minosäure a nalyse
BICR	humane Plattenepithelkarzinomzelllinie
bmMSC	Knochenmarkstammzellen
BMP	b one m orphogenic p rotein
BMMSC	b one m arrow m esenchymal s tem c ell
Bp	B asen p aar
BSP	B one s ialo p rotein
BSA	B ovines S erum a lbumin
Cal72	humane Osteoblastenzelllinie
CD	C luster of D ifferentiation
CDI	C arbonyl D iimidazol
Coll1a1	Kollagen 1 alpha 1
COMP	C artilage o ligomeric m atrix p rotein
DCC	D icyclohexylcarbodiimid
DNA	D esoxyribonukleinsäure
dsDNA	d oppelsträngige DNA
ECL	e nhanced C hemiluminescence
ECM	E xtrazelluläre M atrix
EDC	1- E thyl-3-[3- d imethylaminopropyl]carbodiimid hydrochlorid
FACS	Durchflusszytometer
FCS	f ötales K älberserum
FITC	F luorescein I sothiocyana t
HA	Hydroxyapatit
HLA	h uman l eukocyte a ntigen, major histocompatibility complex (MHC)
HSC	hämatopoietische Stammzellen
HRP	h orse r adish p eroxidase
IBMX	3- I sobutyl-1- m ethylxanthin
IGF2	I nsulin-like g rowth f actor 2

IPTG	I sopropyl- β -D-thiogalactopyranosi
ITGAV	I ntegrin a lpha V
ITGA5	I ntegrin a lpha 5
ITGA9	I ntegrin a lpha 9
ITGB3	I ntegrin b eta 3
ITGB5	I ntegrin b eta 5
JPC	J aw p erosteal c ells, humane Kieferperiostzellen
Ko	Kontrolle
Lama2	L aminin a lpha 2
MSC	m esenchymale S tammzellen
MSCA-1	m esenchymal s tem c ell a ntigen 1
NCAM	n eural c ell a dhesion m olecule
NHS	N -Hydroxysuccinimid
OB	O steoblasten-spezifisches Medium
OGN	O steoglycin
OPLA	O pen-cell p olylactic a cid
PBMC	P eripheral b lood m ononuclear c ell
PBS	P hosphat b uffered s aline
PCR	P olymerase- K ettenreaktion
PE	P hycoerythrin
PGA	P oly- G lycolsäure
PLA	P oly- L -Milchsäure
PLGA	Poly-DL-Milchglycolsäure
PLL	P oly- L -Lysin
pMSC	p lazentale m esenchymale S tammzellen
REM	R asterelektronen m ikroskop
RGD	Dreibuchstabencode für die Aminosäuren Arginin, Glyzin, Asparaginsäure
RNA	R ibonukleinsäure
Runx2	Runt-related protein 2
Scaffold	Trägermatrix, Grundgerüst
Selex	S ystematic E volution of L igands by E xponential E nrichment
SPDP	Succinimidyl 6-(3'-[2-pyridyldithio]-propionamido)hexanoat
ssDNA	single stranded DNA

TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCP	Trikalziumphosphat
TE	Tissue Engineering
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMP4	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4
TNAP	Tissue non-specific alkaline phosphatase
TSTU	O-(N-succinimidyl)-N,N,N,N-tetramethyluronium tetrafluoroborat)
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

Knochendefekte im Kieferbereich haben eine steigende Inzidenz in der alternden Bevölkerung. Knochenverlust wird unter anderem hervorgerufen durch Knochenschwund (Knochenatrophie), die im Alter auftreten können, durch Tumorresektionen im Gesichtsbereich oder Knochenzysten. Bei Kindern kommen mit einer Häufigkeit von 1:700 Lippen-Kiefer- und Gaumenspalten vor, bei denen ein gezielter Knochenaufbau (Knochenaugmentation) ebenfalls benötigt wird [1]. Der Goldstandard zur Knochenregeneration ist bisher immer noch die Entnahme von autologem (patienteneigenem) Knochenmaterial meist aus dem Beckenkamm, was jedoch zwangsläufig zu Donormorbiditäten führt [2]. Die Alternative hierzu ist tiefgefrorenes Spendermaterial von Leichen, wobei hier jedoch die Risiken einer Abstoßungsreaktion und einer Infektion eine große Rolle spielen [2].

Alternative Ansätze bieten Verfahren des Tissue Engineerings, bei denen *in vitro* ein mit geeigneten Patientenzellen besiedeltes, formgebendes Konstrukt gezüchtet wird, das zur Geweberegeneration in den Defekt implantiert wird. Als Zellquelle können autologe (körpereigene) Osteoblasten verwendet werden, die jedoch ein begrenztes Proliferationsverhalten aufgrund ihres differenzierten Stadiums aufweisen. Alternativ können autologe Stammzellen, die eine höhere Proliferationsrate besitzen und sich in verschiedene Zelltypen differenzieren lassen, verwendet werden. Als geeignetes Biomaterial kommen verschiedene Materialtypen und Formen in Frage, wie z.B. Hydroxylapatit, Trikalziumphosphat, Kollagen in Form von Schwämmen, Gelen und Granulat. Um Materialeigenschaften für eine verbesserte Zellproliferation und Differenzierung zu entwickeln, können diese Materialien auf verschiedene Art und Weise mit Proteinen, Peptiden, Wachstumsfaktoren etc. biofunktionalisiert werden.

1.1 Stammzellen

Im menschlichen Organismus kommen zwei verschiedene Differenzierungslinien der adulten, multipotenten Stammzellen vor. Aus den hämatopoetischen Stammzellen (HSC) gehen alle Blutzellen wie z.B. Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten hervor. Bei den mesenchymalen Stammzellen (MSC) hingegen handelt es sich um Vorläuferzellen für mesenchymale Gewebe wie z.B. Knochen, Knorpel und Muskelgewebe und diese lassen sich somit zu Osteoblasten, Chondroblasten [3] und Adipozyten [4] differenzieren.

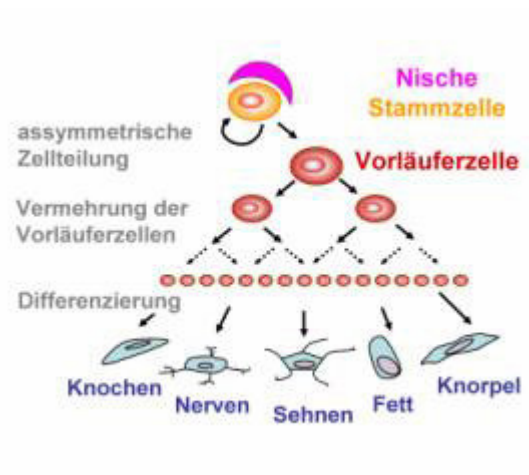


Abb. 1 Differenzierung von Stammzellen

http://www.oeaw.ac.at/shared/news/2006/img/bild_stemcell.jpg

Adulte mesenchymale Stammzellen fungieren als multipotente Zellquelle für die Entwicklung, Aufrechterhaltung und Regeneration von Geweben wie z.B. Knochen, Nerven, Sehnen, und Fett. Bei allen Stammzellen handelt es sich dabei um undifferenzierte Zellen, die per Definition dazu befähigt sind, sich selbst zu erneuern und in nahezu allen Körpergeweben vorhanden sind. In Bezug auf ihren Phänotyp, definierte Dominici und Ko-Autoren im Jahr 2006 die Minimal Kriterien für multipotente, mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark. Sie beschrieben diese Zellen zum einen als plastikadhärent unter normalen Zellkulturbedingungen und zum anderen ließen sich diese in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenzieren. Bezüglich der Oberflächenmarker exprimierten diese CD73, CD90, CD105, wohingegen sie keine Expression für CD11b, CD14, CD34, CD79alpha, CD19 und HLA-DR zeigten [5]. Wenn sie endogenen oder exogenen Stimuli z.B. nach einem Trauma oder im Laufe einer Erkrankung ausgesetzt sind beginnen sie sich zu den speziellen Zelltypen des jeweiligen beschädigten Gewebes zu differenzieren um dieses zu reparieren.

Für Applikationen in der regenerativen Medizin sind sie somit eine einfach zugängliche Zellquelle die zur Regeneration von verschiedenen Geweben beitragen kann.

1.2 Differenzierung der MSC in Knochengewebe

Die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten wird durch die Zugabe von Ascorbinsäure, Dexamethason und β -Glycerolphosphat stimuliert. Die Ascorbinsäure ist essentiell für die Kollagen-I-Synthese [6], wohingegen das β -Glycerolphosphat als Phosphat-Ionenquelle für die Synthese der anorganischen Knochenmatrix dient. Dexamethason gehört zu den biologisch stark aktiven Glucocorticoiden, die die Genexpression während der Differenzierung beeinflussen, wobei der Mechanismus noch weitgehend ungeklärt ist [7]. Für die Knochenregeneration wurden bisher MSC verschiedener Quellen wie z. B. embryonale-, Knochenmark-, Muskel-, Pulpa- und Perioststammzellen verwendet [8]. Ein Ziel zukünftiger Forschungsarbeiten ist die Identifizierung der für die verschiedenen Knochendefekte optimalen Stammzellquelle in Abhängigkeit von dem Ausmaß und Schweregrad des Defektes und der verlorengegangenen Funktion sein.

1.3 Potentielle mesenchymale Stammzellquellen

Adulte mesenchymale Stammzellen sind ein Leben lang in jedem Organ des Menschen zu finden. Sie sind multipotent und können zu Knorpel, Knochen, Muskel und Endothel differenzieren, jedoch unterliegen sie einem Alterungsprozess, weswegen ihre Vitalität und Potenz mit dem Alter abnimmt. Die gängigste Stammzellquelle ist nach wie vor das Knochenmark, wobei der MSC-Anteil dort recht gering ist (0,01%). Weiterhin können mesenchymale Stammzellen aus verschiedensten Geweben wie z. B. aus der Nabelschnur, Plazenta, Fett, Periost, Synovia, Pulpa, Haut etc gewonnen werden. Hierbei stellte man jedoch fest, dass die Qualität der Differenzierbarkeit in bestimmten Linien in Abhängigkeit von der Stammzellquelle variieren kann. Während z.B. die Stammzellen aus dem Periost ein sehr hohes osteogenes Potential aufweisen [9], zeigen diese Zellen eine schwächere Differenzierbarkeit zu Adipozyten, wie aus eigenen Arbeiten hervorging.

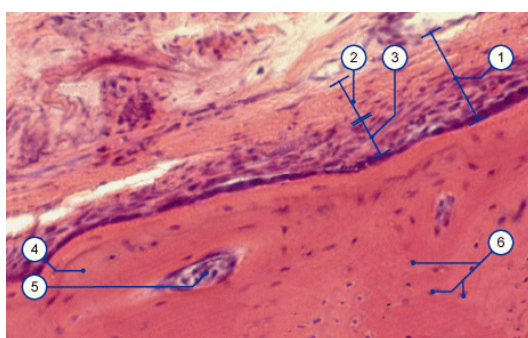
Im Jahre 2006 wurde der erste Nachweis für die epigenetische Reprogrammierung von somatischen Maus-Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen mit embryonalem Charakter erbracht [10]. Diese Umwandlung wurde durch die Transduktion der Zellen mit vier Transkriptionsfaktoren (Oct4, Sox2, Klf4 und c-myc) verwirklicht. Dadurch gelang zum ersten Mal der Durchbruch für die Generierung von pluripotenten Zellen aus bereits ausdifferenzierten Fibroblasten. Sehr viele

1 Einleitung

Arbeitsgruppen forschen inzwischen in diesem Gebiet, jedoch ist es immer noch ein sehr neuer Zweig in dem unbekannt ist, welche Risiken der Einsatz dieser Zellen über längeren Zeitraum *in vivo* birgt, da Langzeitergebnisse bisher fehlen. Jedoch ist bekannt, dass diese induzierten pluripotenten Stammzellen je nach Donorgewebe und Herstellungsmethode ein größeres Potential haben, Teratome zu bilden [11]. Durch die Transfektion der Zellen mit Retro- oder Lentiviren ist eine erhöhte Tumorgenität gegeben, was durch die Transfektion mit Plasmiden eingeschränkt werden soll [12].

1.4 Periost

Als Periost wird die knochen umhüllende Bindegewebsschicht bezeichnet, die den Knochen unmittelbar bedeckt und aus zwei Schichten besteht. Das Stratum osteogenicum (auch als Kambiumschicht bekannt) beinhaltet die innere Schicht, die Osteoblasten und mesenchymale Stammzellen enthält. Sie trägt zur Knochenregeneration und zum Knochen-Turnover bei und ist somit dazu befähigt, neues Knochenmaterial zu sezernieren. Das Stratum osteogenicum ist innerviert und mit Blutgefäßen durchzogen. Beim Stratum fibrosum handelt es sich um eine dickere Gewebsfibroblasten-Schicht, die hauptsächlich aus Kollagenen besteht und sehr elastisch ist. Das Periost ist im Gegensatz zum Knochen sehr schmerzempfindlich, dient zum Schutz des Knochens und stellt einen Ansatzpunkt für Bänder und Sehnen dar.



1. Periost
2. Stratum fibrosum
3. Stratum osteogenicum
4. Kortikalis
5. Haverscher Kanal

Abb. 2 Histologie eines Gewebeknochens

http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/stuetzgewebe/knochen/images/periost_mit.gif

Wie oben bereits erwähnt, besitzt das Periost als mesenchymale Stammzellquelle ein sehr hohes osteogenes Potential und verliert dieses interessanterweise im

Gegensatz zu den Stammzellen aus dem Knochenmark nicht in Abhängigkeit von dem Patientenalter [9]. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass das osteogene Potential dem der Knochenmarkstammzellen nicht ganz gleichkommt [13], jedoch wurde ebenfalls über erfolgreiches Tissue Engineering mit periostalen Stammzellen aus dem Kieferbereich (Jaw periosteal cells: JPCs) berichtet [14]. Die MSC aus dem Periost haben jedoch auch einige Vorteile gegenüber den Stammzellen aus dem Knochenmark. Der Eingriff zur Entnahme des Periosts ist weniger schmerzhaft als die Punktion zur Gewinnung der bmMSC. Außerdem werden diese Zellen aus dem Bereich der späteren Applikationsstelle entnommen, was ebenfalls Nischenvorteile mit sich bringen kann. Weiterhin verlieren die JPCs, wie oben bereits erwähnt, im höheren Patientenalter ihr osteogenes Potential nicht, ganz im Gegensatz zu den bmMSC. Die JPCs werden in der vorliegenden Arbeit als Zellquelle verwendet und stellen somit die Grundlage der hier beschriebenen Experimente dar.

1.5 Osteogenese und extrazelluläre Knochenmatrix

Das Knochengewebe entspringt im Embryo aus dem mesodermalen Gewebe, wird während des Wachstums ständig neu gebildet und im adulten Organismus stets umgebaut (bone remodeling). Im Knochengewebe kommen Osteoblasten, ausdifferenzierte Osteozyten und Osteoklasten vor. Die Zellen sind umgeben von anorganischen und organischen Komponenten, wie z.B. einem Netzwerk aus diversen Kollagenen, hauptsächlich Kollagen Typ I. Die Osteoblasten induzieren die Knochenneubildung, sezernieren zunächst in der Frühphase alkalische Phosphatase, Kollagen I und als späte Osteogenesemarker Osteocalcin und Osteopontin [15]. Im späteren Stadium entsteht dann die mineralisierte anorganische Komponente des Knochens - es handelt sich dabei hauptsächlich um Hydroxylapatit. Nachdem sie ihre Funktion ausgeübt haben und ausreichend Knochenmatrix gebildet haben wandeln sich die Osteoblasten in Osteozyten um oder durchlaufen die Apoptose. Osteoblasten und Osteoklasten sind für den Knochen-Turnover zuständig – im Gegensatz zu den Osteoblasten leiten sich die Osteoklasten von den HSC ab [16] und bauen die Knochensubstanz ab.

Die Osteoblastenreifung lässt sich in drei Phasen einteilen:

1. Zellproliferation,
2. Reifung und Sezernierung der extrazellulären Matrix,

3. Mineralisierung.

Proliferation und Differenzierung sind somit gegenläufig und zeitlich versetzte Vorgänge während der Osteogenese. Osteogene Markergene die in zeitlich verschobenen Abschnitten exprimiert werden und mit der Osteogenese in Verbindung gebracht werden, sind alkalische Phosphatase , Kollagen I, Runx-2 (Transkriptionsfaktor während der Osteogenese), IGF2 (Insulin-like-growth-factor 2) und Osterix (Osx) [17-20]. Es ist publiziert, dass Osteopontin und Osteocalcin späte Marker der Osteogenese darstellen, wobei dies bisher noch nicht bei allen Zelltypen nachgewiesen werden konnte [21].

Man unterscheidet zwischen Deck-, Beleg-, oder Bindegewebsknochen, die hauptsächlich in der Schädelregion vorkommen und aus kleineren Knocheninseln zu kompakteren Arealen zusammenwachsen. Der Ersatzknochen hingegen entsteht durch die chondrale Ossifikation, bei der der Knochen aus zuvor gebildetem Knorpel hervorgeht. Die eigentliche Anordnung des Knochens wird in die Substantia spongiosa, dem schwammartigen Bälkchenknochen im Zentrum des Knochens und die Substantia compacta, der stabilen Substanz im Rindenbereich unterteilt.

1.6 Tissue Engineering (TE)

Die Rekonstruktion von Hart- und Weichgewebe stellt eine große Herausforderung in der regenerativen Medizin dar, da Krankheiten und Traumata in einer steigenden Tendenz im Zuge der alternden Bevölkerung vorkommen. Das immer schneller wachsende Feld des Tissue Engineerings ist ein multidisziplinäres Feld, das Prinzipien der Biochemie, Zellbiologie, Technik und Materialwissenschaften vereinigt um Ersatz für verletzte oder zerstörte Gewebe zu entwickeln. Man bezeichnet damit ein zellbiologisches Verfahren, das eine Behandlung und Heilung von Gewebedefekten möglich macht, indem lebende, meist autologe Zellen auf eine Trägermatrix aufgebracht werden. Die adäquate Stammzellquelle wird dem Patienten entnommen, die Stammzellen werden außerhalb des Körpers im Labor isoliert, expandiert und in die gewünschte Richtung andifferenziert. Dreidimensionale Konstrukte werden anschließend mit diesen Zellen besiedelt und dem Patienten in den Defekt reimplantiert. Nach der Transplantation sollen die Zellen zur Wiederherstellung und Aufrechterhaltung des geschädigten Gewebes bzw. Organs und deren Funktionalität beitragen.

Die Tissue Engineering Prozedur besteht somit aus mindestens drei Elementen:

1. Entnahme von lebenden Zellen eines Donororganismus, die die Kapazität zur Proliferation und Matrixsynthese haben.
2. Verwendung eines strukturellen Gerüsts (Scaffold), das die Adhärenz der Zellen zulässt bzw. erleichtert.
3. Die Trägermatrix soll eine Umgebung schaffen, die den Transport von Nährstoffen und regulatorische Stimuli zu und von den Zellen ausgehend, ermöglicht.

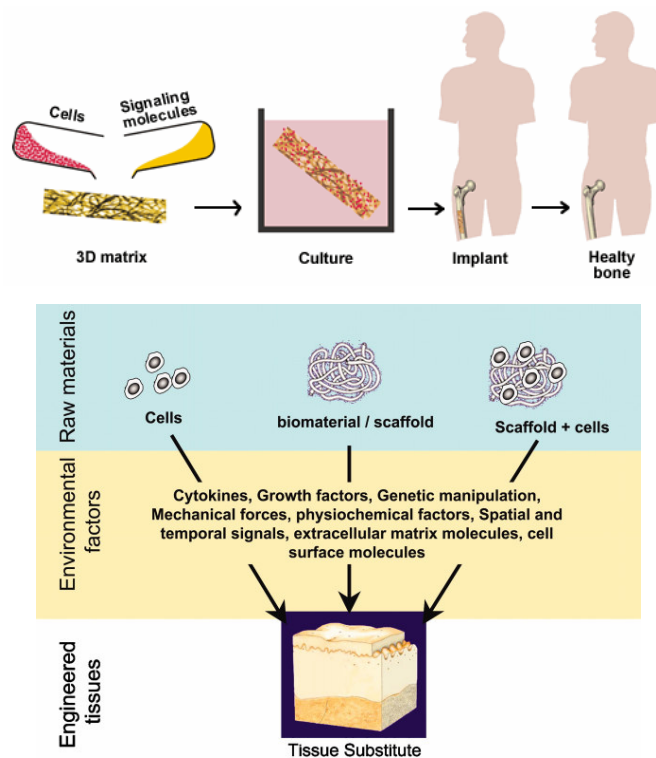


Abb. 3 Grundprinzipien des Tissue Engineerings

http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone_tissue_engineering/bone_tissue_engineering.htm

<http://www.pnas.org/content/103/8/2480/F1.medium.gif>

Der Trend im modernen „Tissue Engineering“ geht immer häufiger dazu über, dreidimensional strukturierte Biomaterialien in Kombination mit Stammzellen als Zellquelle zu verwenden. Bereits ausgereifte und ausdifferenzierte Zellen verlieren ihre Proliferationsfähigkeit und sind aus dem Grund für die Geweberegeneration nicht so gut geeignet.

1.7 Eigenschaften von Trägermatrizen

Als Implantate, Operationsinstrumente und Prothesen werden bereits Trägermaterialien natürlicher (Kollagen, Zellulose, etc.) oder synthetischer Herkunft (Polymere, Keramik, Metall etc.) eingesetzt. Diese finden auch im Tissue Engineering als Träger für die Zellen ihre Anwendung. Sie verleihen eine strukturelle und logistische Grundlage für die Zelladhäsion und Gewebeentwicklung. Um diese Aufgabe zu erfüllen müssen diese Biomaterialien einigen grundlegenden Anforderungen gerecht werden [22]. Die Materialien sollen biodegradierbar sein, da das neu-synthetisierte Gewebe allmählich die Trägermatrix (Scaffold) ersetzen soll, so dass die Degradierungsrate ungefähr der Geweberegenerationsrate gleich kommt [23]. Ein weiterer sehr wichtiger Punkt ist die Biokompatibilität – d.h. die Matrix darf weder eine entzündliche Reaktion nach der Transplantation zur Folge haben, noch darf es eine hohe Immunogenizität oder Zytotoxizität aufweisen. Es muss auch untersucht werden, ob mögliche Degradierungsprodukte eine toxische Reaktion hervorrufen und somit nicht biokompatibel sind. Die Struktur der Matrix soll den Transport der Nährstoffe, Metabolite und regulatorischen Moleküle zu und von den Zellen ausgehend, ermöglichen. In diesem Zusammenhang soll die Porosität des Grundgerüsts auch eine ausreichende Neo-Vaskularisierung zulassen und evtl. durch die Beschichtung von angiogenen Faktoren verstärken [24].

Darüber hinaus muss die Trägermatrix die notwendige mechanische Stabilität, physikalische Struktur und Oberflächenchemie aufweisen um die Zelladhäsion und Proliferation zu aktivieren.

1.8 Trägermatrizen für Knochen-Tissue Engineering

Für das Knochen Tissue Engineering ist eine relativ offene, mit hoher Porendichte durchsetzte Oberfläche von Vorteil - die Oberfläche wird somit maximiert und ein gleichmäßiges Einwachsen der Zellen mit gleichzeitig guter Nährstoffversorgung ist dadurch garantiert [24]. Um eine ausreichende Neo-Vaskularisierung zuzulassen liegt nach Literaturangaben die optimale Porengröße zwischen 200 und 900 μM [25]. In früheren Studien wurde beschrieben, dass anorganische Materialien bestehend aus Tricalciumphosphat (TCP), Hydroxylapatit (HA) und bioaktivem Glas die Differenzierung zu Knochengewebe induzieren und gleichzeitig biokompatibel sind

[24]. Weiterhin finden Kollagenmatrizen in verschiedenen Formen wie z.B. Schwämme, Gele und Folien häufig Anwendung in der regenerativen Medizin [26]. Am weitesten im verbreitet Tissue Engineering von Knochen sind jedoch die synthetisch hergestellten Polymere wie Poly-Glykolsäure (PGA), Poly-L-Milchsäure (PLA) und die Ko-Polymere Poly-DL-Milchglykolsäure (PLGA) [27], [28]. Die Esterbindungen sind hydrolytisch labil und die Degradierungsrate kann über das Verhältnis von Milchsäure zu Glykol reguliert werden [29].

1.9 Biofunktionalisierung von Trägermatrizen

Heutzutage sind viele synthetische Materialien mit verschiedenen Eigenschaften auf dem Markt und werden für Prothesen, Implantate und Tissue Engineering Matrizen verwendet. Die physikalischen Eigenschaften, Toxizität und mechanische Stabilität der Matrizen muss ihrer Applikation relativ adäquat sein, wobei das Problem der schlechten Interaktion zwischen dem Polymer und den Zellen auftreten kann, so dass sich viele Materialien als bio-inert herausgestellt haben [30]. Inzwischen geht die Materialentwicklung eher dazu über Biomaterialien zu generieren, die nicht nur als Trägermatrix fungieren und als mechanische Stütze dienen, sondern viel mehr als solche, die die Zellantwort aktiv in Parametern wie Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung beeinflussen. Chemische Modifikationen wie z.B. die Inkorporation von chemotaktischen Faktoren oder Zelladhäsionsmolekülen wurden entwickelt, Wachstumsfaktoren eingebracht oder diverse Fängermoleküle wie z.B. Antikörper für die gewünschten Zellen immobilisiert. Ansätze um Biomaterialien zu verbessern beinhalten die Reduktion von unspezifischer Proteinadsorption, gleichzeitig die Förderung der spezifischen Proteinadsorption und die Modifikation durch Immobilisierung von Zell-Erkennungsmotiven um die Zell-Substrat-Interaktion zu kontrollieren und verstärken.

1.10 RGD Peptide

Modifikationen der Biomaterialien zur Verbesserung der Zelladhäsion und Proliferation beinhalten meist eine Immobilisierung mit extrazellulären Matrixkomponenten. Die extrazelluläre Matrix besteht hauptsächlich aus Proteinen wie Kollagene, Vitronectin, Osteopontin, von Willebrand Faktor, Tenascin, Bone

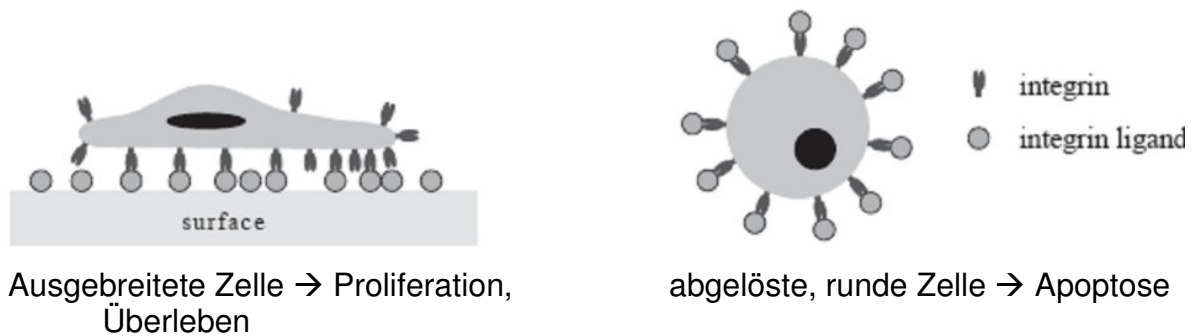
1 Einleitung

Sialoprotein, Fibrinogen und Laminin [31]. Die meisten extrazellulären Matrixproteine besitzen eine gemeinsame konservierte, funktionelle Domäne, die sich aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure zusammensetzt und im Dreibuchstabencode RGD Domäne genannt wird. Das RGD Motiv fördert aktiv die Zelladhäsion über die Bindung an Integrinrezeptoren und scheint auch das Zellwachstum und die Differenzierung zu verstärken [30].

Die RGD Domäne wird sehr häufig für Modifikationen der synthetischen Biomaterialien genutzt, da diese Domäne breit gefächert im ganzen Organismus vertreten ist. Als Bestandteil von vielen verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix bindet sie an mehr als nur einen Zell-Adhäsions-Rezeptor und kann somit verschiedene Zellfunktionen steuern.

In multizellulären Organismen werden die Zell-Zell- und die Zell-ECM Kontakte über Zelladhäsionsrezeptoren reguliert, wobei hier die Familie der Integrine die größte Rolle spielt. Diese sind nicht nur in ihrer Rolle als Ankermoleküle wichtig, sondern sind auch während der Embryogenese, Zelldifferenzierung, Immunantwort, Wundheilung und der Homöostase von wichtiger Bedeutung [32], [33]. Integrine bestehen aus zwei nicht kovalent assoziierten Transmembraneinheiten, die alpha- und beta-Einheiten genannt werden. Die Kombination der verschiedenen alpha- und beta-Untereinheiten legen die Ligandenspezifität der Integrine fest. Über die Hälfte der bisher 24 entdeckten Integrine bindet RGD-spezifisch an ECM-Komponenten: $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 11\beta 3$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$, und zum Teil auch $\alpha 2\beta 1$ und $\alpha 4\beta 1$ [34]. Neben der RGD Domäne wurden noch viele weitere wichtige Zelladhäsionsmotive bekannt, so dass man hier nicht von „der universellen Domäne“ sprechen kann, jedoch ist sie einmalig bezüglich ihres weitgefächerten Vorkommens im Organismus.

RGD Peptide haben jedoch auch einen konträren Effekt – sind sie auf einer Oberfläche immobilisiert, verstärken sie Zelladhäsion und Differenzierung. Liegen sie jedoch in Lösung vor, so blockieren sie die Integrin-Rezeptoren. Die Zellen können dadurch nicht adhären und gehen in die Apoptose über [30]. Somit ist eine kovalente Immobilisierung von RGD Peptiden auf Biomaterialien unumgänglich.



Ausgebreitete Zelle → Proliferation,
Überleben

abgelöste, runde Zelle → Apoptose

Abb. 4 Konträre Effekte von Integrin-Liganden

„RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond“, Hersel U, 2003, biomaterials

Der Prozess der Integrin-gesteuerten Zelladhäsion besteht aus vier Schritten:

1. Erster Zell-Matrix Kontakt, wobei der erste Ligand-Zellkontakt der Zelle hilft, gegen die Scherkräfte anzukommen,
2. Zellausbreitung bei der der Zellkörper sich auf dem Biomaterial abflacht,
3. Organisation des Aktin-Zytoskeletts in Mikrofilamentbündel, die sich „Stressfasern“ nennen,
4. Formierung von fokalen Adhäsionspunkten bestehend aus geclusterten Integrinen und mehr als 50 transmembran- und membranassoziierten Molekülen.

Neben diesen vier Schritten der Zelladhäsion sind die Integrine auch für Signaltransduktionen durch die Zellmembran verantwortlich. Der Mechanismus der Integrin-Ligandenbindung geht mit mehreren Konformationsänderungen der Integrine einher [35].

1.10.1 Vorteile der Peptidbeschichtung versus Proteinbeschichtung

Die Vorteile einer Peptidbeschichtung im Vergleich zur Proteinbeschichtung liegen vor allem darin, dass Peptide eine relativ kurze Kettenlänge haben und somit in einer höheren Dichte auf die Trägermatrix gepackt werden können. Des Weiteren kann durch einfache Proteinadsorption eine unspezifische Zelladhäsion stattfinden, die die gewollten spezifischen Eigenschaften des immobilisierten Proteins nicht erfüllen. Durch Beschichtung mit Peptiden kann eine beabsichtigte Orientierung des immobilisierten Peptids gesteuert werden, wohingegen dies bei Proteinen durch deren stochastischen Limitierungen nicht möglich ist. Ein weiterer Vorteil der Peptide besteht darin, dass sie aufgrund ihrer kurzen Sequenz nicht der proteolytischen

1 Einleitung

Degradierung unterliegen. Außerdem können Proteine eine Immunantwort hervorrufen, da es sich um bioaktive Moleküle handelt, die möglicherweise vom Organismus als fremd erkannt werden [30]. Ein weiterer sehr wichtiger Aspekt ist der sehr aufwändige Prozess der Proteingewinnung [30, 36]. Die Peptidsynthese stellt im Gegensatz dazu einen relativ einfachen Vorgang dar.

1.10.2 Immobilisierung von RGD Peptiden auf Polymeren

Die kovalente Bindung der Peptide auf den Oberflächen ist essentiell, da sie in Lösung wie oben erwähnt, konträre Effekte zeigen.

Da die meisten Polymere keine funktionellen Hydroxyl-, Amino- oder Carboxylgruppen besitzen, können diese durch verschiedene Methoden erzeugt werden. Zur Immobilisierung der Peptide sind verschiedene Ansätze denkbar:

1. Mischen mit anderen Polymeren, die eine funktionelle Gruppe besitzen [36], [37]
2. Ko-Polymerisation mit z.B. Acrylsäuren [38]
3. Chemische oder physikalische Behandlung durch alkalische oder saure Hydrolyse [39], [40].

In den meisten Fällen wird das RGD-Peptid über eine stabile Amidbrücke an das Polymer gebunden. Dafür wird eine freie Carboxylgruppe durch die oben genannten Methoden erzeugt und das Peptid über seinen nukleophilen N-Terminus immobilisiert. Carboxylgruppen können durch Peptid-Kupplungs-Reagenzien wie z.B. EDC (wasserlösliches Carbodiimid) oder DCC (Dicyclohexyl-Carbodiimid) oder CDI (Carbonyl-Diimidazol) erzeugt werden.

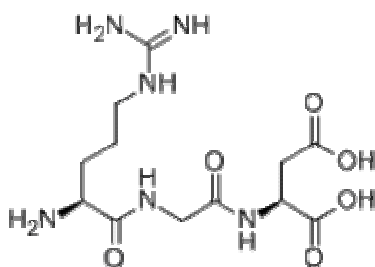


Abb. 5 Strukturformel eines RGD Peptids

<http://www.chemicalbook.com/CAS%5CGIF%5C99896-85-2.gif>

Bei dieser Methode können zwei Probleme auftreten, da es zum einen mehrere reaktive Gruppen im Peptid selber gibt, und zum anderen das Kopplungsreagenz relativ schnell durch Hydrolyse abgebaut werden kann [30].

Um dem Problem der reaktiven Gruppen entgegenzuwirken kann man entweder Schutzgruppen am Peptid einführen oder den Prozess der Carboxylgruppenerzeugung und der Peptidkopplung in zwei separaten Schritten durchführen. Zuerst wird die Carboxylgruppe auf der Oberfläche des Scaffolds durch einen aktiven Ester wie z.B. NHS (N-Hydroxy-succinimid mit DCC oder EDC) erzeugt, gefolgt von dem zweiten Schritt, der Peptidkopplung in wässriger Lösung [30].

In der vorliegenden Arbeit wurde durch saure Hydrolyse eine Carboxygruppe erzeugt, wodurch mit DCC oder EDC und NHS das Peptid im zweiten Schritt an das Scaffold gekoppelt werden konnte.

In dieser Arbeit kamen zur Oberflächenmodifizierung der OPLA Matrizen verschiedene Peptide und Beschichtungsvarianten zum Einsatz. Zum einen wurden das zyklische (RGDfK) und das lineare RGD-Peptid (GRGDS) verwendet und zum anderen wurde letzteres entweder direkt an die Matrix oder über einen Poly-L-Lysin-Spacer indirekt gekoppelt. Der Vorteil von einem Spacer beruht darauf, dass durch das Poly-L-Lysin mehr freie reaktive Gruppen für die Peptid-Immobilisierung zugänglich sind und zusätzlich kann der gewonnene Mikroabstand zur eigentlichen Trägermatrix sich positiv auf die Zelladhäsion- und Proliferation auswirken. Die zyklischen RGD Peptide sind stabiler als die linearen und es wurde bereits publiziert, dass diese die Osteogenese besser als die linearen RGD Peptide verstärken können [41].

1.11 Aptamere

Nukleinsäuren dienen nicht nur als Träger der genetischen Information, sondern sie sind auch dazu befähigt Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen auszubilden. Diese Eigenschaft kann man sich zur Generierung von spezifischen, hochaffinen Targetmolekülen zu Nutze machen. Der Name „Aptamer“ stammt aus dem lateinischen - „aptus“ und bedeutet passend. Erstmals gelang es zwei Arbeitsgruppen – Ellington, Szostak et. al. 1990 [42] und Tuerk, Gold et. al. 1990 [43], ein hochspezifisches RNA-Aptamer zu generieren.

1 Einleitung

Aptamere sind kurze, einzelsträngige DNA oder RNA Moleküle, die mittels ihrer dreidimensionalen Struktur bzw. Faltung hochspezifisch an ihr Target binden können, in ähnlicher Weise wie Antikörper es auch tun. Diese Targets können verschiedene Oberflächenstrukturen von lebenden Zellen wie Proteine, Peptide, Enzyme, Phospholipide, Zucker, Antikörper o.ä. sein. Aptamere können gegen die meisten Targets generiert werden – man spricht hierbei von „aptamerogenen Targets“. Welche Eigenschaften ein Target besitzen muss um als aptamerogen bezeichnet zu werden ist bisher weitgehend unbekannt. Aptamere können bis zu 100 bp lang sein und werden durch kombinatorische DNA-Bibliotheken im Zuge eines *in vitro* Selektionsprozesses generiert, der als SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*) bezeichnet wird.

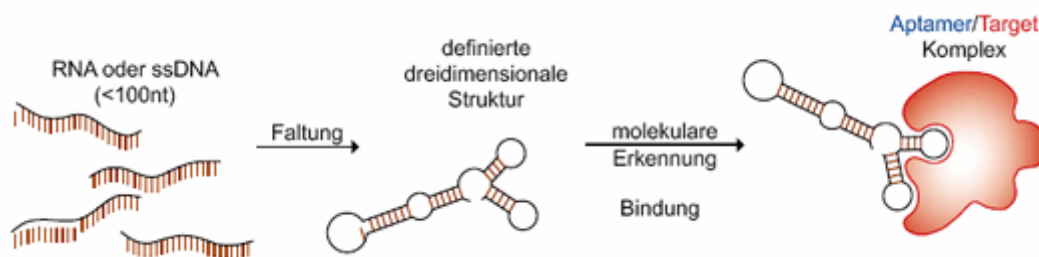


Abb. 6 Aptamer-Target-Erkennung

<http://www.ufz.de/data/9780.gif>

Sie binden mit einer sehr hohen Affinität an ihr Target und haben ohne Modifikationen keine toxischen oder immunologischen Effekte auf den Organismus [44] und werden sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie als einen viel versprechenden Ansatz gesehen. Diese Target-Liganden können in der Diagnose und Behandlung von Krankheiten helfen, indem sie z.B. die Sensitivität und/oder die Spezifität von diagnostischen Assays durch molekulares Imaging verbessern [45], [46]. Eine weitere mögliche Applikation ist, dass Aptamere gekoppelt an bestimmte Wirkstoffe das Medikament direkt an das erwünschte Target übermitteln [47],[48] oder durch Bindung an ein Target Krankheitsprozesse inhibieren [49],[50] kann. Ein weiterer Vorteil der Aptamere besteht darin, dass sobald ihre Sequenz und Struktur entschlüsselt ist, diese sehr leicht und günstig in großen Mengen mit minimalen Batchunterschieden für klinische Anwendungen produziert werden können, im Gegensatz zu anderen Targetmolekülen wie z.B. Antikörper, die sehr aufwändig produziert werden müssen. Im Vergleich zu Antikörpern treten Aptamere aufgrund

ihrer Größe schneller mit ihren Zielgeweben in Kontakt und sie zeigen eine langsame Degradierungskinetik [51]. Außerdem lassen sich Aptamere sehr leicht modifizieren werden, indem z. B. fluoreszente Reporter oder Affinitäts-Tags zur molekularen Wiedererkennung angehängt werden.

Bisher sind folgende Aptamere für biomedizinische Zwecke bekannt:

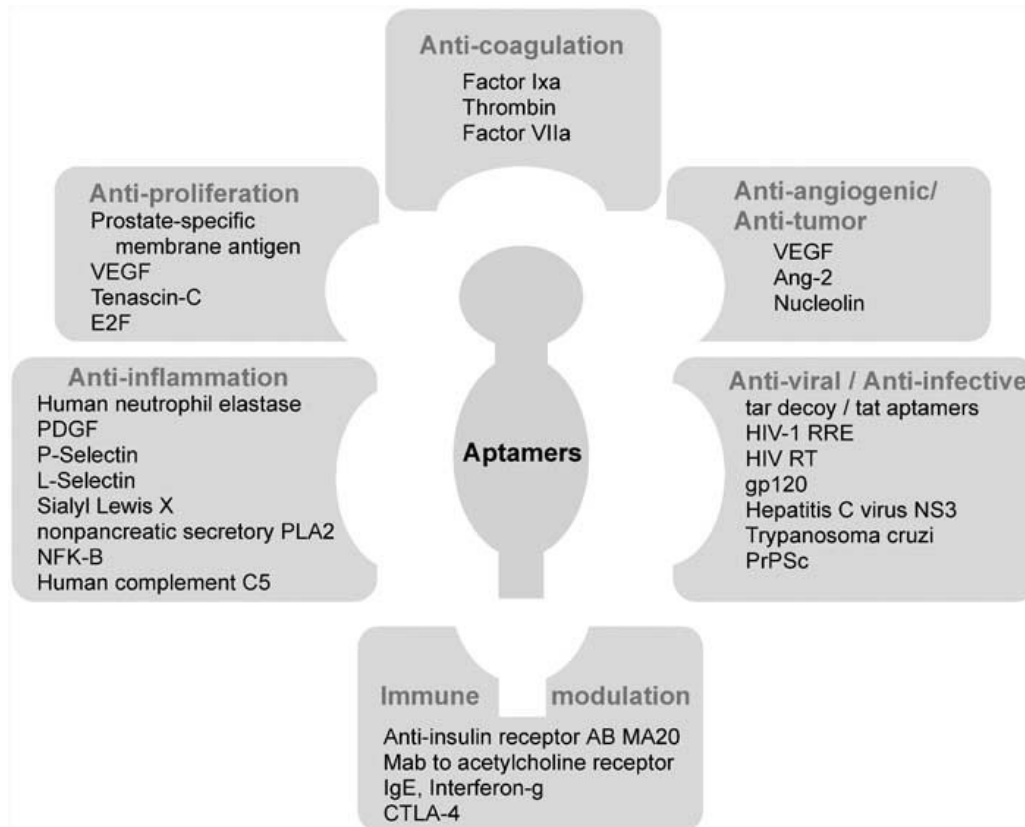


Abb. 7 Bisher bekannte bzw. generierte RNA-Aptamere

“Gene therapy progress and prospects: RNA aptamers. Gene Ther, 2007.“ [52]

1.11.1 SELEX - Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment

Die SELEX-Methode - „*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*“ wurde erstmals von den Arbeitsgruppen Tuerk et al. [43] und Ellington et al. [42] unabhängig voneinander veröffentlicht. Szostak et al. postulierten, dass bei einer Zahl von ca. 10^{10} RNA-Sequenzen mit ihrer jeweiligen Tertiärstruktur mindestens ein paar Sequenzen dabei sein müssen, die spezifisch an ein Target binden [42]. Das Grundprinzip der SELEX basiert auf drei Schritten:

1. Diversifikation
2. Selektion

3. Replikation

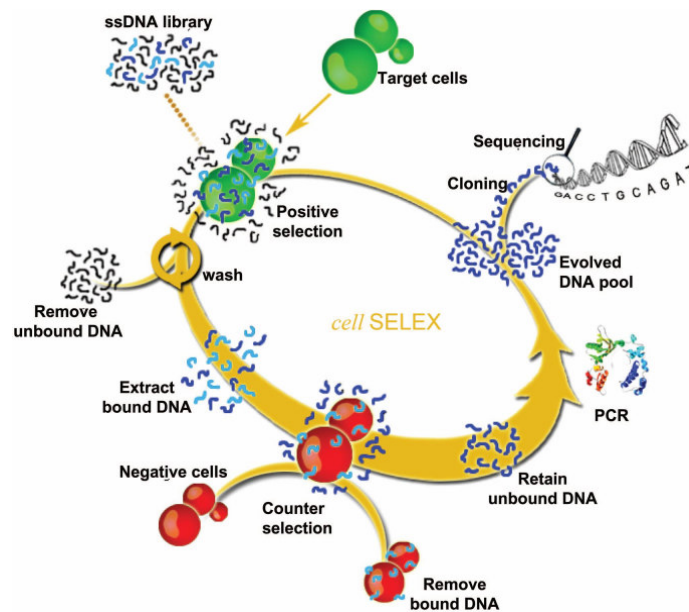


Abb. 8 Schematische Darstellung der Zell-SELEX Prozedur

<http://www.chem.ufl.edu/~tan/group/Images/Paper%20Figures/Whole%20Cell%20SELEX%20-PNAS-2006.JPG>

Das typische Selex-Protokoll besteht aus einem initialen ssDNA- oder RNA-Pool aus ca. 10^{15} verschiedenen Oligonukleotidsequenzen, der mit dem jeweiligen Target inkubiert wird. Die Oligonukleotidsequenzen besitzen sowohl 5' als auch 3' eine flankierende, zwischen 15 und 35 bp definierte Sequenz, die die Annealingregion der Primer für die Amplifikation mittels PCR darstellen. Nach der Inkubation werden die ungebundenen Sequenzen gewaschen und eine negative Gegenselektion mit einem anderen Target durchgeführt, an das das Oligonukleotid nicht binden soll. Die negative Gegenselektion kann entweder vor der Inkubation mit dem gewünschten Target erfolgen oder unmittelbar danach durchgeführt werden. Sinnvollerweise wird diese jedoch erst nach den ersten paar SELEX-Durchgängen durchgeführt, um bereits einen etwas spezifischeren Pool negativ gegen zu selektieren. Nach der Inkubation muss die an das gewünschte Target gebundene DNA extrahiert und per PCR amplifiziert werden. Da es sich bei Aptameren immer um ssDNA handelt, muss die gewonnene dsDNA entweder durch enzymatischen Verdau, Gelelektion, Streptavidin-Beads o.ä. zu ssDNA modifiziert werden, die dann wieder für die nächste SELEX-Runde eingesetzt wird [53]. Somit steigt theoretisch die Spezifität in jeder folgenden SELEX-Runde exponentiell und nach 10-25 Runden sind hochspezifische bindende Aptamere generiert worden sein. Um eine Sequenzanalyse durchführen zu können, müssen die gewonnenen Aptamere einzeln

vorliegen, wobei eine Klonierung zur Vereinzelung der Sequenzen dient. Nachdem die Plasmid-DNA mit jeweils einem Insert vorliegt, können die Sequenzen analysiert werden und unter den generierten Klonen evtl. Sequenzfamilien festgestellt werden.

1.11.2 Zell-Selex

Die Generierung der Aptamere kann wie oben erwähnt gegen verschiedene Targets erfolgen. Mögliche Zielmoleküle können Oberflächenantigene von lebenden Zellen sein, um bestimmte Zellsubpopulationen mit dem generierten Fängermolekül zu binden. Es wurden schon erfolgreich Aptamere gegen komplexe Targets wie lebende prokaryontische und eukaryontische Zellen, z.B. verschiedene Tumorzellen [54],[55, 56], Leukämiezellen [57], humane Knochenmarkstammzellen [58] und Endothelzellen generiert [59], wobei es eine größere Herausforderung darstellt als die Generierung gegen tumorassoziierte Proteine (Beispiele siehe Abb. 7) [60]. Ein weiteres Target, das aus einer Zell-Selex hervorging war der RET receptor tyrosine kinase [61]. Die Zell-SELEX Methode ist durch die zahlreichen potentiellen Oberflächenantigene an die das Aptamer binden kann limitiert. Die Aptamer/Zell Bindung muss unter physiologischen Bedingungen stattfinden, ohne dass die Oberflächenladungen der Zellen verändert werden bzw. ihre Vitalität eingeschränkt wird. Für die Aptamer-Anreicherung ist es weniger problematisch, wenn nur ein definiertes Molekül an die DNA hochaffin bindet und der Selektionspuffer ohne Rücksicht auf die Vitalität der Zellen nehmen zu müssen, gewählt wird. In früheren Studien wurden bereits zahlreiche Puffersysteme und Selexvarianten angewendet, um die Spezifität der Aptamere zu optimieren [62]. Um die Aptamergenerierung gegen ein definiertes Zielprotein vitaler Zellen zu erleichtern ist es von Vorteil, das gewünschte Protein zur Überexpression bringen zu bringen um somit die Bindungswahrscheinlichkeit an das Protein zu erhöhen [63]. Für die späteren *in vivo* Applikationen ist die Aptamergenerierung im nativen Zustand der Zellen besonders wichtig. Eine mögliche Konformitätsveränderung der Targetmoleküle falls kein nativer Zustand vorliegt, kann die Bindungsaffinität durch die 3D-Strukturen der Aptamere beeinflussen.

Die Identifizierung von Aptameren mit Hilfe derer sich spezielle Zell-Subpopulationen für die es keine spezifischen Marker gibt, isolieren und charakterisieren lassen, ist für

viele Bereiche der molekularen und regenerativen Medizin von großem Interesse [64].

1.11.3 Die Aptameranwendung als Methode der Biofunktionalisierung von Matrizen in der regenerativen Medizin

Mit der Charakterisierung der Oberflächenantigenexpression von mesenchymalen Stammzellen wird versucht, diese Zelltypen aufgrund ihrer Heterogenität genauer zu beschreiben [5], [65].

Periostale Stammzellen stellen bisher eine noch wenig charakterisierte Zellquelle dar. Die isolierte Zellpopulation ist recht heterogen und enthält neben den osteogenen Vorläuferzellen zu einem großen Teil Gewebsfibroblasten, aber auch z. T. Muskel-, Fett- und Endothelzellen. Da für regenerative Zwecke die osteogenen Vorläufer von großer Bedeutung sind, ist es eine große Herausforderung, diese Zellen aus dem gesamten Zellverbund aufzureinigen, um eine homogene Stammzellquelle zu erhalten. Spezifische Marker bzw. Aptamere für die periostalen Stammzellen können gezielt für eine Biofunktionalisierung von Trägermaterialien eingesetzt werden. Diese werden entweder *in vivo* die JPCs anlocken oder es werden bereits zell-besiedelte Implantate für die Knochenregeneration verwendet.

2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, ein biofunktionelles, osteoinduktives Implantat zu generieren, das für kritische Defektgrößen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Verwendung findet und die autologe Knochentransplantation ersetzen kann. In den meisten Anwendungen des modernen Tissue Engineerings spielt die biochemische und physikalische Interaktion der Zellen mit dem Biomaterial eine große Rolle. Die Extrazelluläre Matrix (ECM) hat einen sehr großen Einfluss auf zelluläre Phänomene wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung. Aufgrund dessen stellt das Designen einer ECM-ähnlichen, dreidimensionalen Umgebung einen vielversprechenden Ansatz zur Biofunktionalisierung von Biomaterialien dar.

Zahlreiche ECM-Proteine besitzen eine konservierte Wiedererkennungssequenz – die RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) Domäne. Es ist bekannt, dass diese kurze Peptidsequenz unter anderem verantwortlich für die oben genannten Zellparameter ist. Darüber hinaus sind osteoinduktive Biomaterialien dadurch gekennzeichnet, dass sie durch die Biofunktionalisierung die mineralisierende Fähigkeit der verwendeten Zellen triggern, was durch die Oberflächenbeschichtungen erreicht werden soll.

Um die Eigenschaften der Poly-Laktid-Matrizen für Kieferperiostzellen zu optimieren, sollen verschiedene RGD Peptide auf deren Oberfläche durch mehrere Kopplungsvarianten immobilisiert werden. Zum einen werden zyklische und lineare Peptide direkt auf der Polylaktidmatrizen immobilisiert. Zum anderen dient Poly-L-Lysin als Platzhalter (Spacer) für das lineare RGD Peptid, das somit indirekt an der Trägermatrix immobilisiert wird. Anhand von Aminosäureanalysen soll die immobilisierte Peptidmenge sowie die Immobilisierungseffizienz durch die verschiedenen Kopplungsreagenzien ermittelt werden. Die Untersuchung der Zelladhäsion und Proliferation in Abhängigkeit der Peptidbeschichtung wird fluoreszenzmikroskopisch untersucht und anhand eines metabolischen Assays verifiziert. Weiterhin sollen Gen- und Proteinexpressionsanalysen den Grad der osteogenen Differenzierung bzw. Unterschiede zwischen den verschiedenen Immobilisierungsvarianten aufzeigen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit soll ein Marker für Kieferperiostzellen identifiziert werden, der zur Separation entweder der periostalen Progenitorzellen oder der Gewebsfibroblasten dient. Im ersten Fall werden Biomaterialien mit dem Aptamer für die *in vitro* oder *in vivo* Rekrutierung von osteogenen Progenitorzellen immobilisiert werden. Im zweiten Fall werden die identifizierten Aptamere für die

2 Zielsetzung der Arbeit

Depletierung der Gewebsfibroblasten aus der heterogenen Periostzellpopulation eingesetzt. Dabei wird versucht, durch einen Selektionsprozess spezifische, kurze Oligonukleotidsequenzen (Aptamere) mit einer Länge von ca. 80 bp gegen humane Kieferperiostzellen zu generieren, die durch ihre 3D-Struktur und nicht durch deren Komplementarität hochaffin an die Kieferperiostzellen (JPCs) binden. Diese Moleküle sollen immobilisiert auf den Oberflächen in 2D und 3D Ebene die Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung der JPCs in osteogenes Gewebe verstärken.

3 Methoden

3.1 Isolation der humanen Kieferperiostzellen aus dem Gewebe

Das humane Periostgewebe wurde in Routineoperationen aus dem Kieferbereich entnommen. Die ca. 1 cm² großen Stücke wurden in PBS mithilfe von Skalpell in einer Petrischale mechanisch zerkleinert, in ein Falconröhrchen überführt und durch Auffüllen des Röhrchens mit PBS 1x gewaschen. Nach dem Zentrifugieren für 7 Min. bei 8°C und 1400 U/Min. wurde das Pellet in 3 ml Kollagenase XI (Sigma-Aldrich, Deutschland) resuspendiert und für 90 Min. bei 37°C enzymatisch verdaut. Nach dem Verdau wurde das Falconröhrchen mit Medium (Medium:Kollagenase 1:1) zum Deaktivieren der Kollagenase und mit PBS auf etwa 40 ml aufgefüllt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in Medium (DMEM/F12 + Glutamax, GIBCO, Deutschland) aufgenommen und je nach Gewebemenge in eine, zwei oder mehrere Zellkulturflaschen überführt. Bei den ersten Medienwechseln wurden schrittweise nur 1/3, dann die Hälfte des Mediums, anschließend das komplette Medium ersetzt und erfolgte erst, als etwa 40-50% der Kulturflasche Konfluenz erreicht hatte, was nach frühestens zwei Wochen der Fall war.

3.2 Isolation der PBMCs aus dem peripheren Blut

Das Blut wurde 1:1 mit PBS verdünnt und über einen Ficollgradienten durch Zentrifugation bei 800 g, für 30 Min. bei Raumtemperatur ohne Bremse aufgetrennt. Im Pellet befanden sich die roten Blutkörperchen, gefolgt von der Ficoll-Fraktion. In der Interphase befanden sich die PBMCs und in der obersten Schicht sammelte sich das Blutplasma. Die dünne PBMC-Schicht wurde vorsichtig abpipettiert und die Zellen wurden dreimal mit PBS durch Zentrifugation bei 300 g und Raumtemperatur gewaschen. Die Zellen wurden in *X-vivo* Medium (Invitrogen, Deutschland) aufgenommen und kultiviert. Für die längere Aufbewahrung wurden die Zellen in RPMI mit 40% FCS und 20% DMSO im flüssigen Stickstoff eingefroren.

3.3 Zellkultur

Die Kieferperiostzellen, ebenso MSCs aus dem Knochenmark und der Plazenta wurden in DMEM/F12 + Glutamax (GIBCO, Deutschland) unter Zugabe von 10 % FCS (Sigma-Aldrich, Deutschland), 1% Penicillin/Streptomycin (Lonza, Deutschland) und 1% Fungizone (Biochrom, Deutschland) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das foetale Kälberserum wurde vor der Zugabe zunächst für 30 Min. bei 56°C hitzeinaktiviert, anschließend mit einer Spatelspitze Aktivkohle für weitere 30 Min. ausgeschüttelt und sterilfiltriert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 95% nach einem Waschschrift mit PBS und anschließender Zugabe von 0,25% Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst und passagiert. Nach dem Abzentrifugieren bei 1400 U/Min. wurde das Zellpellet 1:3 verdünnt und in neue Zellkulturflaschen überführt. Für die längere Aufbewahrung wurden die Zellen in DMEM/F12, 30% FCS und 10% DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die humane Plattenepithelkarzinomzelllinie BICR 56 wurde in RPMI Medium mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Fungizone bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.4 Differenzierung der Kieferperiostzellen

Um die Kieferperiostzellen oder die MSCs aus dem Knochenmark oder der Plazenta in die verschiedenen Zelltypen auszudifferenzieren, wurden diese mit dem Zellkulturmedium DMEM/F12 unter Zugabe von verschiedenen Aktivatoren, wie unten angegeben, behandelt:

3.4.1 Osteogene Induktion

Um die Zellen osteogen zu differenzieren, wurde das Vollmedium mit 10% FCS mit 4 µM Dexamethason, 10 mM β-Glycerolphosphat und 100 µM Ascorbinsäure versetzt. Für die Genexpressionsanalysen auf 3D-Ebene wurden die Zellen über 14 Tage, für die Mineralisierungsexperimente über 20 - 30 Tage mit dreimaligem Medienwechsel pro Woche osteogen induziert. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit Normalmedium ohne osteogene Aktivatoren behandelt wurden.

3.4.2 Adipogene Induktion

Zur Differenzierung der Progenitorzellen in die adipogene Linie wurden die Zellen mit Vollmedium und den Zusätzen 1 μ M Dexamethason, 0,2 mM Indomethacin, 0,5 mM 3-Isobutylxanthin (IBMX) und 0,01 mg/ml Insulin über einen Zeitraum von 20 Tagen behandelt.

3.4.3 Chondrogene Induktion

Zur Differenzierung der Stammzellen in die chondrogene Linie wurden die Zellen mit DMEM/F12 mit 1% FCS und den Zusätzen von, 10 ng/ml TGF β 1, 0,5 μ g/ml Insulin, 2 mM L-Glutamin, 50 μ M Ascorbinsäure behandelt.

3.5 Besiedelung der Trägermatrizen mit Kieferperiostzellen

Die Trägermaterialien (Scaffolds) wurden nach der Beschichtung mit Peptiden (siehe Kapitel 1.9.2.) dreimal mit Aqua dest. gewaschen und für 1 Std. im Kulturmedium mit 10% FCS vorinkubiert. Die Zellen wurden von den Zellkulturflaschen abgelöst und pro Matrix oder beschichtetes Well der speziellen Aminoplatten (siehe Kapitel 3.8.1.) 5×10^4 Zellen in 50 μ l Medium mit einer Eppendorfpipette aufgebracht. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension auf die Trägermatrix wurden die besiedelten Konstrukte für 2 Std. im Brutschrank inkubiert bevor weitere 200 μ l Kulturmedium hinzugegeben wurden.

3.6 Alizarinrot-Färbung zur Detektion von Kalziumphosphaten

Der Zellmonolayer wurde zunächst mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol für 1 Min. fixiert. Die folgenden Schritte beinhalteten das Färben mit 40 mM Alizarinlösung S (Sigma-Aldrich, Deutschland) für 20 Min. und intensive Waschschrte mit Aqua dest. und PBS. Im letzten Schritt wurden die Zellen mit eiskaltem Ethanol dehydriert und luftgetrocknet. Die Kalziumphosphatpräzipitate erschienen hell- bis dunkelrot.

3.7 Quantifizierung der Kalziumphosphatpräzipitate

Die Alizarinrot-gefärbten Wells wurden mit 10%iger Essigsäure versetzt um den Farbstoff wieder in Lösung zu bringen und der Zellmonolayer wurde mithilfe eines Spatels vom Plattenboden abgelöst. Die Proben wurden in ein Röhrchen überführt, für 30 Sek. stark gevortext und für 10 Min. auf 85 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben für 5 Min. auf Eis inkubiert, bei 20000 g für 20 Min. zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit 400 µl Ammoniumhydroxidlösung neutralisiert. Um eine Quantifizierung der Proben durchführen zu können, wurde eine Standardreihe nach Herstellerangaben („*Osteogenesis Quantitation Kit*“, Milipore, Deutschland) aus der Alizarinlösung erstellt.

Die photometrische Detektion der Triplikate erfolgte bei 405 nm im *Elx-800* Photometer (Biotek, Deutschland).

3.8 Beschichtung der Trägermatrizen mit RGD Peptiden

3.8.1 RGD Peptidbeschichtung der Nunc Immobilizer Platten/2D Adhäsionsassay

Für die 2D Adhäsionsanalysen wurden die verschiedenen Peptide kovalent an 96-Well Platten gebunden. Spezielle Gewebekulturplatten, die aktive Aminogruppen aufwiesen (Nunc, Deutschland), wurden mit der 2 µM Peptidlösung oder PLL (Poly-L-Lysin, 2 µM, Sigma-Aldrich, Deutschland) über Nacht inkubiert. Für die indirekte Immobilisierung wurden die Platten nach der PLL Beschichtung mit Aqua dest. gewaschen und in 1 mM SPDP Lösung (Succinimidyl 6-(3-[2-pyridyldithio]propionamido)hexanoat; Pierce, USA) in HEPES-Puffer vor der Peptidzugabe in einer Konzentration von 2 µM für 30 Min. inkubiert. Danach wurden die Wells dreimal mit PBS/0,1% Tween gewaschen und für 1 Std. mit PBS/1% BSA geblockt um Peptid-unspezifische Adhäsion zu vermeiden. Die Zellen wurden abgelöst, in DMEM mit 0,1% BSA, 1 x Ionenmix (Stock: 100 x Ionenmix – 100 mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂, 2,5 mM MnCl₂ in Wasser) aufgenommen und 3x 10⁵ Zellen pro Well der Immobilizer Platten ausgesät. Nach einer Stunde wurden die nicht adhärenen Zellen mit PBS abgewaschen, die adhärenen Zellen fixiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen (Phalloidin für die Zytoplasma Färbung (Invitrogen, Deutschland) und DAPI (Sigma-Aldrich, Deutschland) für die Kernfärbung, siehe Kapitel 3.9) für die konfokale Mikroskopie gefärbt. Die Detektion erfolgte am *ApoTome* (Zeiss, Deutschland).

3.8.2 RGD Peptidbeschichtung der Polylaktid (OPLA) Trägermatrizen

Bei den Trägermatrizen handelte es sich um zylinderförmige Polylaktid Matrizen (Scaffolds) der Firma BD Biosciences (Deutschland), die einen Durchmesser und Höhe von 3-5 mm aufwiesen und aus D,D,-L,L Polylaktid bestanden. Die Porengröße des nicht komprimierbaren Schwammes betrug zwischen 100- und 200 μm , die Hydratationskapazität 30 μL . Das Trockengewicht der Trägermatrix betrug 5,2 mg und das Nassgewicht 34 mg.

3.8.2.1 Direkte Peptid Beschichtung

Um eine freie reaktive Gruppe auf dem Polylaktid Trägermaterial zu erzeugen, wurde durch Anhydrolysieren bei 60°C für 60 Min. in 3 M Salzsäure eine freie Carboxylgruppe erzeugt, an die die Kopplungsreagenzien binden konnten. Die Trägermatrizen wurden nach dem Anhydrolysieren mit Aqua dest. aufgeschlämmt, mit 37%-igem Dioxan gewaschen und in einer 0,2 M N-Hydroxysuccinimid / 0,2 M N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (Pierce, USA) Lösung, die 37% Dioxan enthielt über Nacht inkubiert.

Danach wurden die Matrizen erneut 2x mit 37%-igem Dioxan gewaschen, für 10 Min. in Methanol zur Entfernung des ausgefallenen Harnstoffes inkubiert und anschließend für 2 Std. getrocknet. Die Kopplung der 100 μM RGD Peptidlösung erfolgte in einem 0,1 M Natrium-Hydrogencarbonat Puffer, bei pH 8,3 über Nacht bei 4°C.

3.8.2.2 Indirekte Peptid Beschichtung mit Poly-L-Lysin

Die Kopplung des Poly-L-Lysins (Sigma-Aldrich, Deutschland) erfolgte analog zur direkten Beschichtungsvariante in 0,2 M N-Hydroxysuccinimid / 0,2 M N,N-Dicyclohexylcarbodiimid.

Anschließend wurden die Trägermatrizen mit Aqua dest. gewaschen und in 1 mM SPDP Lösung (Succinimidyl 6-(3-[2-pyridyldithio]-propionamido)hexanoat, Pierce, USA) in HEPES-Puffer für 30 Min. inkubiert. Danach wurden die Trägermatrizen 1x mit PBS/0,1% Triton-X 100, 3x mit PBS gewaschen und mit einer 100 μM CGRGDS Peptidlösung über Nacht inkubiert. Ein zusätzliches Cystein wurde an das lineare

3 Methoden

Peptid hinzugefügt um eine funktionelle Sulfhydryl- (SH) Gruppe für die Koppelung mit SPDP zu erzeugen.

3.9 Fluoreszenzmikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurden eine Zytoskelett- und Kernfärbung durchgeführt. Dafür wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit einer 3,7%-igen Formaldehydlösung für 10 Min. fixiert. Anschließend erfolgte ein Zell-Permeabilisierungsschritt für 10 Min. mit PBS/0,1% Triton-X 100. Nach zwei Waschrissen mit PBS wurde der Farbstoff Alexa-Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen, Deutschland) in einer Konzentration von 5 U/ml in PBS/0,1% BSA zu den Zellen gegeben und für 20 Min. im Dunkeln inkubiert. Nach weiteren Waschrissen mit PBS wurden die Zellkerne auf den Trägermatrizen mit Sytox Orange (Invitrogen, Deutschland) in einer Konzentration von 5 mM (in Wasser gelöst), die Zellkerne im Monolayer mit DAPI (0,1 mg/ml) für 10 Min. gegengefärbt und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Färbung der Zellmonolayern innerhalb der Immobiliser Platten als auch der Zellen, die innerhalb der Polylaktidmatrizen proliferierten, erfolgte analog, mit Ausnahme der Kernfärbung. Die Visualisierung erfolgte bei den Monolayern am konfokalen Mikroskop *ApoTome* (Zeiss, Deutschland) und bei den zell-besiedelten 3D Trägermatrizen am Laserscanning Mikroskop (*CLSM SP5*, Leica, Deutschland).

3.10 Proliferationsanalysen

Die Zellproliferation wurde mittels einer kolorimetrischen Messung mithilfe eines kommerziellen Kits (EZ4U, Biozol, Deutschland) durchgeführt. Das Prinzip basiert darauf, dass in die Mitochondrien eingeschleuste Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate umgesetzt wurden. Dieser Farbumschlag wurde im Elisa-Reader (ELX 800, Biotec, Land) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm detektiert.

Für die Substratherstellung wurden nach Herstellerangaben 2,5 ml der Aktivatorlösung zum Substratlyophilisat gegeben und zu jeweils 200 µl frisch gewechseltem Kulturmedium 20 µl Substratlösung hinzupipettiert. Die Inkubation erfolgte für 4 Std. im Brutschrank.

3.11 Proteom Profiler Arrays

Nach Herstellerangaben wurden die Membranen für 1 Std. mit *Puffer 8/1* (8 mL Puffer 1, 1 ml Puffer 8) geblockt. Währenddessen wurden 500 µl der zu analysierenden Zellkulturüberstände oder Zelllysaten mit 0,3 ml *Puffer 8* versetzt und auf 3 ml mit *Probenpuffer 1* aufgefüllt. Nach dem Absaugen des Blockingpuffers wurden die jeweiligen Proben auf die Membranen gegeben und über Nacht leicht schüttelnd bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in separaten Containern für 10 Min. mit 1x Waschpuffer (25x Waschpuffer 1:25 verdünnt mit Aqua dest.) wurden die Membranen für 2 Std. mit dem Sekundärantikörper (Membran N mit *Detection Antibody Cocktail N*, Membran C mit *Detection Antibody Cocktail C*) bei RT leicht schüttelnd inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen (s.o.) wurden die Membranen mit 1,5 ml Streptavidin/HRP Lösung (1:2000 verdünnt in *Puffer 8/1*) für 30 Min. geschüttelt und wieder gewaschen. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz mithilfe des *ECL-Advance Detection Kits* (GE Healthcare, Deutschland), die über Röntgenfilme (Hyperfilm MP, 13x18 mm, Bender, Deutschland) sichtbar gemacht wurde. Für das Exponieren der Membranen auf Röntgenfilme betrug die optimale Belichtungszeit ca. 90 Sek.

3.12 Durchflusszytometrische Analysen (FACS)

Die Zellen wurden zunächst von den Zellkulturflaschen abgelöst und pro Messansatz zwischen 3×10^5 bis 5×10^5 Zellen eingesetzt. Um eine unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper zu verhindern, wurden die Zellen mit Gammunex (1:100 in FACS-Puffer (PBS, 10% BSA, 0,001% Natriumazid) verdünnt) für 15 Min. inkubiert, anschließend mit 1 x FACS-Puffer gewaschen und bei 300 g, 8°C für 7 Min. zentrifugiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 20 Min. bei 4°C im Dunkeln. Die Antikörpermengen der verschiedenen Maus anti-human Integrin-Antikörper (ITGA5 (Klon SAM-1), ITGA9 (Klon Y9A2), ITGAV / ITGB5, ITGB1 (Klon 4B4), ITGB3 (Klon SZ21), dankend erhalten von der AG Klein) betragen jeweils 1 µL.

Die Kontrollproben wurden im ersten Schritt mit FACS-Puffer und beim zweiten Schritt mit dem PE-gelabelten Sekundär-Antikörper (Biozol, Goat anti-mouse, RPE, 1:100 Verdünnung) inkubiert, ebenso wie die Proben die mit Erstantikörper gelabelt

3 Methoden

waren. Nach drei Waschschritten, erfolgten die FACS-Messungen mithilfe eines *FACScan* Gerätes der Firma Becton Dickinson.

3.13 Aminosäure-Analysen

Die Aminosäureanalyse (ASA) wurde von der Firma *Frank Gutjahr Chromatographie* (Deutschland) durchgeführt.

Die zu untersuchenden Proben wurden jeweils in ein Hydrolyseröhrchen eingewogen und mit 6 M HCl versetzt und unter Vakuum für 24 Std. bei 110°C hydrolysiert. Anschließend wurden die Proben bei 36°C für 8 Std. in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die getrockneten Proben wurden jeweils in 500 µl Probenverdünnungspuffer (Na-Acetatpuffer, pH 2,2) aufgenommen und chromatographisch gemessen mithilfe eines Aminosäureanalysator LC3000 (Eppendorf Biotronik, Deutschland). Die Analysen erfolgten mittels Auftrennung des Probengemisches über eine Polymer-Kationenaustauschersäule mit einer Partikelgröße von 4 µm. Bei der Nachsäulenderivatisierung wurde Ninhydrin bei 125°C verwendet und die photometrische Detektion erfolgte bei 570 nm. Das Probenvolumen betrug 20 µl. Die Kalibrierung des Systems erfolgte mit einem Standard (A2908, *Amino Acid Standards for hydrolysates containing norleucin*) der Firma Sigma-Aldrich (Deutschland), der eine Konzentration der Aminosäuren von 200 nmol/ml betrug. Die Daten wurden über die Chromatographie-Software ChromStar 600 aufgenommen und ausgewertet.

3.14 Rasterelektronenmikroskopische Analysen

Die 3D Konstrukte wurden mit 2% Glutaraldehyd/1mM Kakodylatpuffer für 1 Std. bei RT fixiert und für 30 Min. mit Aqua dest. gewaschen. Zur Entwässerung wurde eine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt, beginnend mit einer Inkubation für 15 Min. in 30% Ethanol, gefolgt von 50%, 70%, 90% und anschließend zweimal in 100%-igem Ethanol. Mithilfe der Critical Point Trocknungsmethode wurden die Konstrukte zur vollständigen Entwässerung gebracht. Bei dieser Methode wird der Ethanol durch Kohlendioxid in flüssigem Zustand innerhalb einer speziellen Druckkammer völlig verdrängt. Das flüssige Kohlendioxid wurde dabei in die Druckkammer gepumpt, um den Ethanol Schritt für Schritt in mehreren Durchgängen zu verdrängen. Nach dem

letzten Durchgang wurde die Druckkammer langsam auf 41 °C erhitzt, wodurch das Kohlendioxid in den gasförmigen Zustand überging und den verbliebenen Ethanol vollständig eliminierte.

Nach der Trocknung wurden die Konstrukte auf kompatible Objekthalter aufgeklebt und mit Goldpalladiumpartikeln besputtert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mithilfe eines Leo 1430 Gerätes (Zeiss, Deutschland) durchgeführt.

3.14.1 EDX-Spektroskopie zur Elementaranalyse der Präzipitate

Bei der EDX-Spektrometrie (energy dispersive X-ray spectrometry) wurden die Elemente aus den zu untersuchenden Partikeln durch einen Elektronenstrahl angeregt. Die Elemente reagieren mit einer für die einzelnen Komponenten charakteristischen Röntgenstrahlung, die dann zugeordnet werden kann. Die goldpalladiumbesputterten 3D Konstrukte, die bereits für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen aufbereitet wurden, dienten für die Elementanalysen, die ebenfalls im *Leo 1430* Elektronenmikroskop mithilfe eines Roentec UHV-Si(Li)- Detektor durchgeführt wurden.

3.15 RNA-Extraktion

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mithilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden abgelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1400 U/min wurde die Gesamt-RNA mithilfe des Rneasy Micro Kit (Qiagen, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Die hierbei gewonnene RNA-Menge wurde mithilfe eines Photometers (*GeneQuant Pro*, GE Healthcare, Deutschland) quantifiziert und für alle PCR Ansätze 1 µg Gesamt-RNA für die cDNA Synthese (siehe 3.16) eingesetzt.

3.16 cDNA Synthese für die quantitative PCR (polymerase chain reaction)

Die cDNA-Synthese wurde mithilfe des kommerziell erhältlichen *Clontech Advantage^R for RT-PCR Kit* durchgeführt und jeweils 1 µg Gesamt-RNA für die cDNA Umschreibung eingesetzt. Im ersten Schritt hybridisierten die Oligo dT-Primer (2 µl) mit der mRNA für zwei Min. bei 70 °C. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis

3 Methoden

wurden die Proben mit 4 µl *5x Reaktionspuffer*, 0,5 µl *rekombinanten Inhibitor*, 1 µl *dNTP-Mix* und 1 µl *reverser Transkriptase* zu einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Die cDNA Synthese erfolgte für 60 Min. bei 42 °C im *Thermocycler personal* (Eppendorf, Deutschland) durchgeführt. Nach der Synthese wurden die Proben für 10 Min. auf 95 °C erhitzt und nach dem Abkühlen auf ein Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt. Für die quantitative PCR wurden jeweils 0,02 µg DNA pro Probe eingesetzt.

3.17 cDNA Synthese und Präamplifikation für RT² Profiler™ PCR Arrays

Für die Präamplifikation der Genarrays (Qiagen, Deutschland) wurden insgesamt 50 ng Gesamt-RNA umgeschrieben. Zur Elimination der genomischen DNA wurde *5x GE DNA Elimination Mixture* zur aufgereinigten RNA hinzugegeben, auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und anschließend für 5 Min. bei 42 °C inkubiert. Danach wurde zu den 10 µl RNA ein Cocktail von 4 µl *5x RT Buffer*, 3,1 µl Primer, 2 µl *RT Enzym Mix 3* und 3 µl RNase-freies Wasser hinzupipettiert.

Die cDNA Synthese erfolgte für 30 Min. bei 42 °C, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung bei 95 °C für 5 Min.

Um bereits mit sehr geringen mRNA-Mengen (50 ng) Genarrays durchführen zu können, wurden diese Themen-spezifisch für den jeweils gewählten Genarray mithilfe des *RT² Nano PreAMP cDNA-Synthese Kits* präamplifiziert. Dazu wurden 12,5 µl *2 x RT² PreAMP PCR Master Mix* mit 7,5 µl *RT Nano PreAMP cDNA Primer Mix* (Array spezifisch – hier für extrazelluläre Matrix Proteine und Osteogenese) und 5 µl cDNA Template versetzt. Mit diesem Ansatz wurden 12 Zyklen im Thermocycler mit folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	10 Min.
12 Zyklen:		
Denaturierung	95 °C	15 Sek.
Amplifikation	60 °C	2 Min.

Anschließend wurde zu jedem Ansatz 2 µl *Side Reagent reducer* pipettiert und bei 37°C für 15 Min. inkubiert. Zuletzt wurde das Präamplifikat mit 84 µL Rnase-freiem Wasser verdünnt und auf ein Gesamtvolumen von 111 µl gebracht.

3.18 RT² Profiler™ PCR Array

102 µL Präamplifikat wurden mit 1275 µl 2x SYBR Green Master Mix und 1173 µl Rnase-freiem Wasser versetzt, gemischt und jeweils 25 µl in jede der 96 Wells des Genarrays pipettiert. Die Proben wurden kurz anzentrifugiert um sicherzustellen, dass sich keine Luftblasen mehr in den Wells befinden. Die Amplifikation erfolgte im ICycler (Biorad, Deutschland) mit folgendem Protokoll des Herstellers:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95°C	10 Min.
40 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	15 Sek.
Amplifikation	60°C	1 Min.

Die Auswertung der quantitativen PCRs erfolgte mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

Bei dieser Methode wurde zunächst der ΔC_t -Wert ermittelt, bei dem der C_t -Wert des Zielgens von dem Durchschnitt der C_t -Werte der Referenzgene subtrahiert wurde. Der $\Delta\Delta C_t$ -Wert setzt sich zusammen, indem man die ΔC_t -Werte der Kontrollgruppe von der Experimentgruppe subtrahiert. Um die Induktion zu errechnen, wird der ermittelte $\Delta\Delta C_t$ -Wert in die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ eingesetzt.

$$\Delta C_t = C_t^{\text{Zielgen}} - C_t^{\text{Durchschnitt der Referenzgene}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t^{\text{Experimentgruppe}} - \Delta C_t^{\text{Kontrollgruppe}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

3.19 Aptamer-Generierung mithilfe der Zell-SELEX Methode

3.19.1 Inkubation der Zellen

Die Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff aufgetaut, eine Zellzahl von 2×10^5 in 6-Well Platten ausgesät und für zwei Tage unter Normalbedingungen kultiviert. Zur

3 Methoden

Denaturierung der Oligos wurde die Startbibliothek mit ca. 10^{15} verschiedenen Sequenzen im Selexpuffer (DMEM/F12, 0,1% BSA, 3 mM $MgCl_2$) und 100 $\mu g/ml$ Hefe-t-RNA bei 85°C schüttelnd für 10 Min. inkubiert und anschließend auf Eis gebracht. Die Zellen wurden mit Selexpuffer gewaschen und mit dem Aptamer/Puffer/Hefe-t-RNA-Cocktail für 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Aptamerlösung abgesaugt, die Zellen 5x mit Selexpuffer, 1x mit PBS gewaschen und anschließend in einem Volumen von 200 μl Wasser mithilfe eines Zellkratzers vom Zellkulturschalenboden abgelöst und in ein Röhrchen überführt. Zum Ablösen der DNA von den Zelltrümmern wurde die Lösung für 10 Min. bei 95°C gekocht, gemischt und anschließend bei 13000 g bei RT für 5 Min. zentrifugiert. Die DNA blieb im Überstand, der für die PCR-Ansätze verwendet wurde.

3.19.2 Qualitative PCR

Für die qualitative PCR wurde das *Fast Start PCR Master Kit* (Roche, Deutschland) und synthetisierte Oligos der Firma Ella Biotech (Deutschland) in einer Konzentration von 1 mM, verwendet. Es wurde ein Verhältnis von 1:1 Mastermix zu Template hergestellt und das Template dementsprechend verdünnt. Die erste PCR mit nur 10 Zyklen diente zur qualitativen Amplifikation der Sequenzen (12 Ansätze a 100 μl), die zweite PCR dazu, das Amplifikat quantitativ zu vermehren und erfolgte mit doppelt so vielen Ansätzen wie die erste (24 Ansätze a 100 μl). Die Proben wurden nach der ersten Amplifikation gepoolt. Es wurden folgende Protokolle für die PCRs verwendet:

	Schritt	Temperatur	Dauer
PCR 1 10 Zyklen	Initiale Denaturierung	95 °C	5 Min.
	Denaturierung	95 °C	30 Sek.
	Annealing	55 °C	30 Sek.
	Amplifikation	72 °C	30 Sek.
PCR 2 20 Zyklen	Initiale Denaturierung	95 °C	5 Min.
	Denaturierung	95 °C	30 Sek.
	Annealing	55 °C	30 Sek.
	Amplifikation	72 °C	30 Sek.

Verwendete Oligos:

Start-Bibliothek:

- a) 5'-GGGAGACAAGAATAAACGCTCAA-N40-
TTCGACAGGAGGCTCACAAACAGGC-3'

modifizierte Primer für die PCR der Selexprozedur:

- b) 5'Phosphat-C18-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTGCGAA-3'
c) FITC-C18 - GGGAGACAAGAATAAACGCTCAA -3'

Zum Ausschneiden aus dem Gel:

- d) A20 - C18 -5' GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTGCGAA-3'

Zum Koppeln an Dynabeads, zum Westernblotting:

- e) 5'-Biotin-C18-GGGAGACAAGAATAAACGCTCAA-3'

Die Startbibliothek bestand aus der jeweiligen Primersequenz und einer 40-Basen langen „wobble-position“, durch die die Variabilität von ca. 10^{15} verschiedenen Oligonukleotiden zustande kam (a). Die normale Selexamplifikation erfolgte mit einem FITC-gelabelten Primer, damit die DNA fluoreszenzmarkiert ist für durchflusszytometrische Analysen (b) und einem Primer der einen Phosphatrest angehängt hatte, als Angriffspunkt für die Lambda-Exonuklease für den Strangverdau der dsDNA zu ssDNA (c). Wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten, da durch Fehlamplifikationen eine Leiter aus verschiedenen Fragmentgrößen erschien, so wurde die gewünschte Fragmentlänge von 80 bp aus dem Gel ausgeschnitten. Hierfür wurde ein Primer mit einem Poly-A-Anhang am 5'-Ende verwendet (d). Werden die Aptamere in verschiedenen Applikationen wie z.B. der Immobilisierung der Aptamere an Dynabeads oder dem Westernblotting verwendet bei denen eine Bindung an Streptavidin notwendig ist, so wurde ein Primer mit einem Biotinrest am 5'-Ende synthetisiert (e).

3.19.3 Aufreinigung der Aptamer-DNA

Das Amplifikat wurde mit Hilfe des *MinElute-Kit* (Qiagen, Deutschland) nach Instruktionen des Herstellers aufgereinigt. Zunächst wurden die Proben mit 500 µl (1:5 Verhältnis) mit *PB Puffer* versetzt und auf die Säulen pipettiert und bei 13000 g

3 Methoden

für 1 Min. bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen, die Säule mit *PE-Puffer* gewaschen, bei 13000 g erneut zentrifugiert und der Durchfluss wiederum verworfen. Nach dem erneuten einminütigem Leerzentrifugieren der Säulen um alle Alkoholreste zu entfernen, wurde die DNA mit Elutionspuffer von der Membran gelöst und in neue Auffanggefäße durch Zentrifugieren bei 13000 g mit 25 µl *EB-Puffer* eluiert. Der DNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt, indem die Proben 1:50 verdünnt wurden und für die Berechnung der Konzentrationen der DNA Umrechnungsfaktor von 50 verwendet wurde.

3.19.4 Lambda-Exonukleaseverdau der dsDNA

Um die doppelsträngige (dsDNA) zu einzelsträngiger ssDNA zu modifizieren, wurde ein Lambda-Exonukleaseverdau durchgeführt, der den Phosphatgelabelten Strang am 5' Ende abbaut. Dafür wurde der DNA-Gehalt der Lösung bestimmt und pro µg DNA 1 µl Lambda-Exonuklease (NewEngland BioLabs, Deutschland) eingesetzt. Der Verdau erfolgte bei 37°C für 4 Std. leicht schüttelnd. Die Inaktivierung der Lambda-Exonuklease wurde anschließend für 10 Min. schüttelnd bei 70°C durchgeführt.

3.19.4.1 Phenol / Chloroform-Aufreinigung der ssDNA

Zur Aufreinigung der gewonnenen ssDNA wurden 0,3 Volumina Phenol zum Exonukleaseverdau hinzugefügt, über Kopf geschüttelt und für 5 Min. bei 13000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, zu 0,3 Volumina Chloroform hinzupipettiert und erneut bei 13000 g für 5 Min. zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut abgenommen und für die Fällung verwendet. Hierbei wurden 3 Volumina 100% Ethanol und 0,1 Volumina Natriumacetat, (3 M, pH 5,1) zu der aufgereinigten Lösung pipettiert und über Nacht bei -20°C ausgefällt. Anschließend wurde die präzipitierte DNA für 20 Min. bei 13000 g und 4°C pelletiert und zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen ohne das Pellet zu brechen. Danach wurde die ssDNA in 30 µl Wasser eluiert und der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt. Das Verhältnis der Extinktion von 260 nm zu 280 nm muss zwischen 1,8 und 2 liegen, um die Reinheit der DNA zu gewährleisten. Der Extinktionskoeffizient für ssDNA betrug 37.

Die aufgereinigte ssDNA wurde für die nächste SELEX-Runde und die FACS-Analysen verwendet.

3.19.5 Elektrophoretische Auftrennung der dsDNA

Zur Analyse der Fragmentgröße der Amplifikate wurden die Proben mit Sanger-Probenpuffer (0,05% Xylencyanol, 0,05% Bromphenolblau, 10 mM EDTA, 95% Formamid) versetzt, für 10 Min. bei 95 °C zur Denaturierung der DNA aufgekocht und auf das Urea-Gel (6,31 g Urea, 3,75 ml Roti Phores 40, 125 µl APS, 10,5 µl TEMED, 0,75 ml 10 x TBE-Puffer) aufgetragen und für ca.1 Std. bei 120 V in TBE (89 mM Borsäure, 89 mM Tris, 2 mM EDTA) als Laufpuffer aufgetrennt.

3.19.5.1 Gelelution der ssDNA

Zur Eliminierung der unerwünschten DNA-Leiter durch Fehlamplifikationen der Polymerase wurde alternierend jede dritte Runde anstelle des Lambda-Exonukleaseverdau die gewünschte 80 bp Aptamer-Bande aus einem denaturierenden Urea-Gel in zweifacher Dicke ausgeschnitten. Um dickere Gele herzustellen, wurden diese zwischen Glasplatten mit zwei übereinandergelegten Spacern gegossen. Dafür musste zur Amplifikation die PCR mit einem Reverse-Primer mit Poly-A-Anhang durchgeführt werden. Der Poly-A-Anhang am Primer diente dazu, dass der Strang etwas verlängert war und somit visuell vom anderen Strang zum Ausschneiden aus dem Gel nach elektrophoretischer Auftrennung im Ureagel in der Länge unterscheidbar war.

Die 100 bp Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten, zerkleinert, in ein Röhrchen überführt und durch passive Elution mit *PN-Puffer* (Bindungspuffer für ssDNA) aus dem MinElute Kit über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und mehrmals mit *PN Puffer* gespült. Das Volumen wurde mit 100%-igem Isobutanol durch mehrmalige Zyklen von Zugabe, Invertieren und Abnehmen des wässrigen Überstands eingeengt.

3 Methoden

Die Selex-Prozedur wurde über 17 Runden durchgeführt. Um die Spezifität der Aptamere zu erhöhen wurde ab Runde 8 mit der Zelllinie BICR (Plattenepithelkarzinomzelllinie) und ab Runde 14 jede weitere Runde mit humanen PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) negativ gegenselektiert. Hierfür wurde der Aptamer-Cocktail vor der Inkubation mit den Periostrazellen mit BICR oder PBMCs für 1 Std. auf Eis inkubiert, danach der Überstand mit den ungebundenen Oligos abgenommen und dann erst auf die Periostrazellen gegeben.

3.19.6 Klonierung der Aptamere

Die dsDNA Fragmente wurden zunächst mithilfe des *Qiagen Cloning Kits* in den pDrive Vektor hineinligiert. Für jede Ligation wurden 13 ng dsDNA eingesetzt und damit ein 10 molarer Überschuss an Aptamer zum Vektor erzeugt.

Dafür wurden 5 µl *Ligation-Mastermix* zu 1 µl *pDrive Vektor*, zwischen 1-4 µl DNA pipettiert und mit Wasser auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Ligation erfolgte für 2 Std. bei 4 °C.

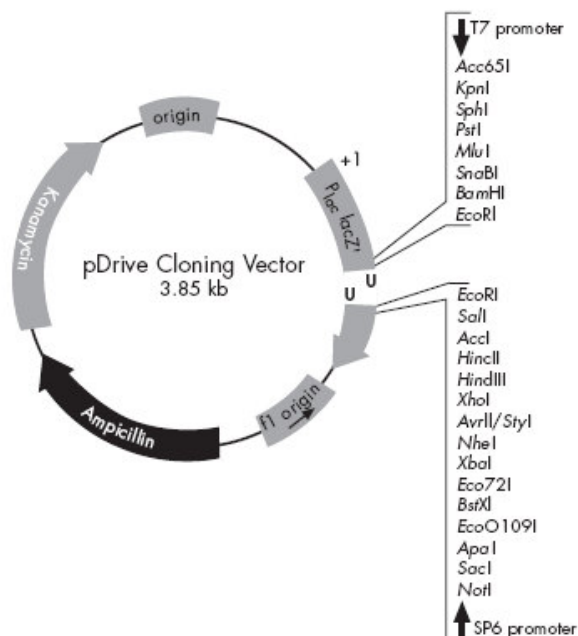


Abb. 9 p-Drive Cloning Vektor mit seinen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme.

Die Transformation erfolgte mit kompetenten E.coli Stämmen, die im Klonierungs-Kit enthalten waren. Die Bakterien wurden auf Eis auftgetaut und das Gesamtvolumen

des Ligationsansatzes zu den Bakterien pipettiert. Anschließend wurden die Bakterien auf 42 °C für 30 Sek. erhitzt und sofort danach für 2 Min. auf Eis gestellt. Danach wurden 250 µl des mitgelieferten *SOC-Mediums* zu den Bakterien pipettiert und jeweils 60 µl auf den LB-Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin, 40 mg/ml X-Gal, 100 mM IPTG, LB-Pulver, AppliChem, Deutschland) ausplattiert. Nach 16 Std. wurden die weißen Kolonien gepickt und mit den Pipettenspitzen in ein Falconröhrchen mit 2 ml LB-Medium überführt.

3.19.6.1 Aufreinigung der Plasmid DNA mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit*

Das Bakterienpellet wurde in 250 µl *P1 Puffer* mit RNase versetzt aufgenommen und in ein frisches Eppi überführt. Nach Zugabe von 250 µl *Puffer 2* wurde durch 4-6 maliges Invertieren der Röhrchen gut gemischt und anschließend 350 µl *Puffer N3* hinzupipettiert und erneut 4-6 Mal invertiert. Danach wurde für 10 Min. bei 13000 g zentrifugiert und der Überstand auf die *QIAprep* Säulchen überführt, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt für 60 Sek. bei 13000 g. Zum Waschen der Säulchen wurden zuerst 500 µl *PB Puffer* auf die Membran pipettiert, für 60 Sek. zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und anschließend 750 µl *PE Puffer* hinzupipettiert und für 60 Sek. zentrifugiert. Um die restliche Flüssigkeit bzw. den restlichen Alkohol nach den Waschungen zu eliminieren, wurden die Säulchen für weitere 60 Sek. leer zentrifugiert und zur Elution in ein neues Eppendorf Röhrchen überführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl *EB-Puffer* von der Säulchenmembran eluiert, für 60 Sek. inkubiert, zentrifugiert und anschließend in das Eppi überführt.

3.19.7 Sequenzierung der Aptamere

Die positiven Klone mit der Insertgröße von etwa 100 bp wurden mit dem *QiaPrep Spin Miniprep Kit* aufgereinigt und zur Sequenzierung in einem Volumen von 5 µl an die Firma *4baselab* (Reutlingen) eingeschickt. Die erhaltenen Aptamer-Sequenzen wurden zur Synthese an die Firma *Ella-Biotech* (Deutschland) weitergeleitet, die die generierten Aptamere herstellte und an FITC koppelte.

Um Sequenzfamilien unter den analysierten Klonen identifizieren zu können, wurde das Programm *ClustalW2* und um die DNA-Faltung der generierten Aptamere zu

3 Methoden

visualisieren wurde das Programm *RNA-Fold* (*RNA fold webserver*, Universität Wien) verwendet.

3.19.8 Durchflusszytometrische Analysen der gewonnenen Aptamere

Zur Analyse der Bindungsaffinität der Aptamere an die Primärzellkulturen wurden die durch die qualitative PCR mithilfe der FITC-Primer gewonnenen und somit gelabelten Aptamere, durchflusszytometrisch analysiert.

Die Zellen wurden dafür mit Trypsin von der Flasche abgelöst, mit SELEX-Puffer gewaschen und mit dem Aptamer/Hefe-t-RNA/Selexpuffercocktail (Zusammensetzung siehe 3.18.1), der zuvor für 5 Min. bei 85°C erhitzt wurde und anschließend auf Eis gestellt wurde, für 1 Std. auf Eis leicht schüttelnd inkubiert. Es wurden 5 µg DNA (jeweils Aptamer und Startbibliothek) eingesetzt und als Kontrolle fungierten sowohl die gelabelte Startbibliothek als auch die ungelabelte Kontrolle.

Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, 3x mit SELEX-Puffer und 1x mit FACS-Puffer (PBS, 1% BSA, 0,001% Natriumazid) gewaschen, in FACS-Röhrchen überführt und im Durchflusszytometer (*FACSScan*, Becton Dickinson, USA) analysiert.

Für alle durchflusszytometrischen Bindungsassays wurde die Startbibliothek als Isotypenkontrolle verwendet. Die Bindungsaffinität in Prozent wurde ermittelt, indem die Fluoreszenzintensität der Bibliothek von der Bindungsaffinität des Aptamers an den jeweiligen Zelltypen abgezogen wurde, wodurch die unspezifische Hintergrundbindung eliminiert wurde.

3.19.9 Durchflusszytometrische Sortierung der Aptamer 74-positiven und -negativen Zellpopulationen

Unter allen generierten Aptameren wies das Aptamer 74 die höchste Bindungsaffinität auf und wurde für alle weiteren Analysen verwendet. Die Färbung mit dem Aptamer 74 wurde erfolgte steril und analog der oben genannten durchflusszytometrischen Analysen. Die Zellen wurden im letzten Schritt allerdings nicht in FACS-Puffer aufgenommen, sondern in PBS, damit die Zellen unter physiologischen Bedingungen ohne Natriumazid gehalten und nach der Sortierung

weiter kultiviert werden konnten. Die Zellen wurden mit dem *BD FACS Aria cell sorter* (Becton Dickinson, USA) separiert und jeweils nur die stark Aptamer 74-positive Fraktion für die Untersuchungen des Mineralisierungspotentials und die Genexpressionsanalysen verwendet.

3.19.9.1 Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Aptamer 74-positiven und -negativen Zellpopulationen

Direkt nach der Zellsortierung wurden die Populationen mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und in einer Zellzahl von 5×10^2 auf spezielle *E-Plates* (Roche, Deutschland) ausgesät und das Proliferationsverhalten im *xCELLigence System* (Roche, Deutschland) über einen Zeitraum von 4 Wochen kontinuierlich (Live-Monitoring) analysiert. Der Boden der speziellen *E-Plates* ist mit Goldelektroden beschichtet. Sobald die Zellen adhärent wurden und proliferierten, veränderte sich die Impedanz, die kontinuierlich vom Messgerät erfasst wurde. Die Messreihen wurden so eingestellt, dass das Gerät im Zeitintervall von 15 Min. die Impedanzmessungen über vier Wochen durchführte. Aus der gemessenen Impedanz konnte man Rückschlüsse auf die Zellproliferation schließen. Der Vorteil dieses Gerätes ist, dass alle auch geringfügigen Änderungen der Zellproliferation erfasst werden, im Vergleich zu den üblichen kolorimetrischen Nachweismethoden, die lediglich Endpunktmessungen darstellen. Der Medienwechsel erfolgte dreimal wöchentlich.

3.19.10 Beschichtung und Besiedelung der *xCELLigence E-Plates* mit Aptamer 74

Die Goldelektroden der *E-Plates* wurden mit Isopropanol gereinigt und mit Aqua dest. gewaschen. Um die Koppelung der Thiolaptamere zu erleichtern wurden diese mit 0,5 M NaHCO_3 für 15 Min. in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Das Aptamer 74 wurde auf eine Gebrauchslösung von 1 nM in Aqua dest. verdünnt und in einem Volumen von 100 μl pro Well in die *E-Plate* pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 4 Std. in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Platten mit sterilem Wasser gewaschen und mit 1×10^3 Zellen/Well besiedelt. Die Detektion erfolgte alle 15 Min. und das Live-Monitoring ging über 13 Tage.

4 Ergebnisse

4.1 RGD-Peptid-Beschichtung

4.1.1 Immobilisierungseffizienz der Peptide auf den OPLA-Trägermatrizen durch Aminosäureanalysen - ASA

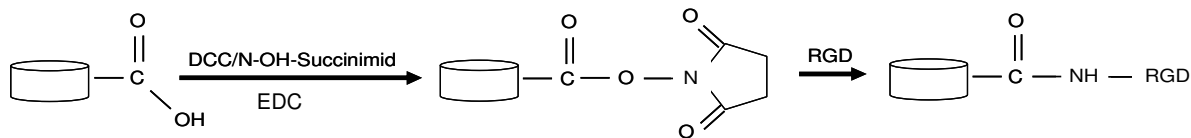


Abb. 10 Schematische Darstellung der Peptidkoppelung an die OPLA-Trägermatrix

Die RGD Peptide wurden beim direkten Coating mit den Kopplungsreagenzien Dicyclohexylcarbodiimid und N-Hydroxy-Succinimid kovalent an die Scaffolds gebunden (Abb. 10). Das Prinzip basierte darauf, dass der Crosslinker (EDC/NHS oder DCC/NHS) sich an die freie Carboxylgruppe des Scaffolds anlagerte und dann über eine Abgangsreaktion das RGD-Peptid mit seiner Aminogruppe gebunden hat. Um die Kopplungseffizienz als eine Funktion der verschiedenen Kopplungsvarianten, Crosslinkern und der verwendeten Peptidkonzentration zu analysieren, wurde eine Aminosäureanalyse durchgeführt.

Bei der Verwendung der wasserlöslichen Coatingvariante EDC/NHS wurde eine Immobilisierungseffizienz von 87 (+/-9) nm/scaffold erreicht, verglichen mit 203 (+/-17) nmol/scaffold bei der DCC/NHS Crosslinker-Variante, die die höchste Effizienz aufzeigte (Abb. 11A). Die Immobilisierungseffizienz war ebenso abhängig von der verwendeten Peptidkonzentration, denn die Reduktion der Peptidmenge von 100 μM auf 2 μM verringerte signifikant die Menge an immobilisiertem Peptid bei der Verwendung von DCC/NHS von 203 (+/- 17) nmol/scaffold zu 14 (+/-8) nmol/scaffold. Beim indirekten Beschichten über Poly-L-Lysin als Platzhalter wurde zunächst versucht, das PLL mechanisch über ein Einweichen durch Aceton-DMSO in die Trägermatrix einzuschließen, wie in der Literatur [30],[66] beschrieben. Die Aminosäureanalyse ergab jedoch, dass diese Methode nicht effizient war und bei RGD-Immobilisierungen zwischen 0 (+/-2,3) nmol/Scaffold PLL lagen. Somit wurde dazu übergegangen PLL ebenfalls über DCC und NHS kovalent an die Matrix zu koppeln. Anschließend wurde das RGD Peptid über einen zweiten Crosslinker SPDP mit seiner freien SH-Gruppe am Cystein (CGRGDS) gebunden. Es wurden jedoch auch Unterschiede bezüglich der Immobilisierungseffizienz hinsichtlich der

verwendeten RGD Peptide beobachtet. Das Maximum an gebundenem Peptid wurde mit dem linearen GRGDS-Peptid erreicht (87 ± 8 nmol/Scaffold), wohingegen die zyklischen Peptide und PLL bei etwa 45-50 nmol/Scaffold lagen (Abb. 11 B).

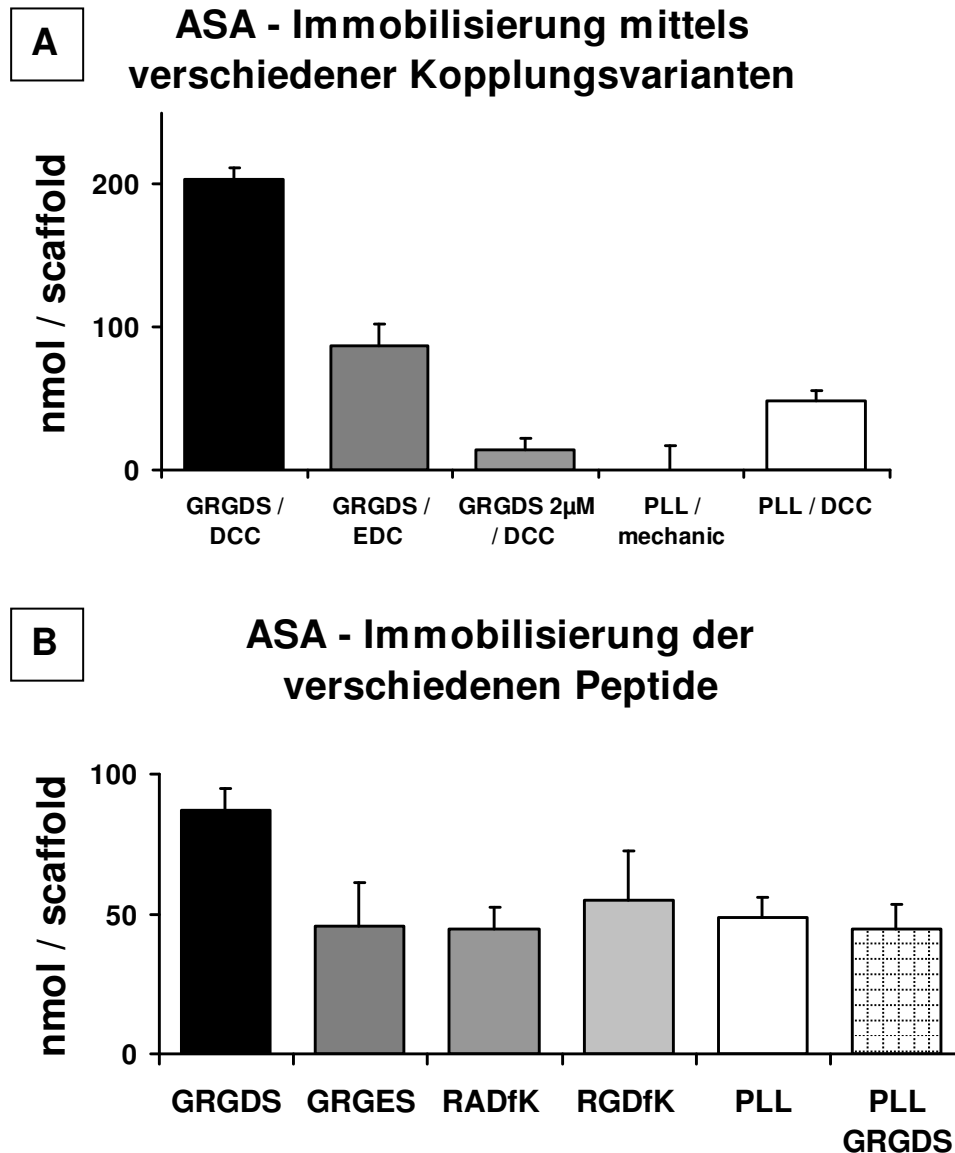


Abb. 11 Aminosäureanalyse der beschichteten OPLA-Konstrukte

A: Dargestellt sind die Beschichtungen durch verschiedene Crosslinker und die jeweils gemessenen Beschichtungskonzentrationen in nmol/Scaffold. Schwarz: GRGDS-Peptid (100 µm) mit DCC/NHS als Crosslinker, dunkelgrau: GRGDS (100 µm) mit EDC/NHS als Crosslinker, helleres grau: GRGDS (2 µm) mit DCC/NHS als Crosslinker, hellgrau: Poly-L-Lysin, mechanisch, ohne Crosslinker immobilisiert, weiß: Poly-L-Lysin mit DCC/NHS immobilisiert. B: Aminosäureanalyse der verschiedenen immobilisierten Peptide. Schwarz: GRGDS, dunkelgrau: GRGES, helleres grau: RADfK, hellgrau: RGDfK, weiß: PLL, weiß kariert: PLL mit indirekt gekoppeltem GRGDS-Peptid.

4.1.2 2D und 3D Zelladhäsionsassays

Nachdem die OPLA Matrizen erfolgreich mit Peptiden beschichtet wurden, folgte die Analyse der Zelladhäsion von Kieferperiostzellen mithilfe fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen. Dafür wurde das Zytoskelett der Zellen mit Phalloidin im Grünkanal und die Zellkerne blau im UV-Kanal angefärbt.

Für die 2D Zelladhäsionsassays wurden spezielle Immobilizer Platten (Nunc, Deutschland) benutzt, die eine freie Aminogruppe aufwiesen. Über diese reaktiven Gruppen konnten die Peptide kovalent an die Platte gebunden werden. Diese Methode wurde der herkömmlichen Spotting-Methode, bei der man die Peptide auf der Polystyrenoberfläche antrocknen lässt bevorzugt, da hierbei die wasserlöslichen Peptide während der Blockierung und den darauffolgenden Schritten nicht abschwimmen konnten.

Die unbeschichtete Kontrolle zeigte, dass eine Zelladhäsion auf den speziellen Immobilizer Platten innerhalb eines Zeitintervalls zwischen 15 Min. und 4 Std. nicht möglich war (Abb. 12A). Weiterhin zeigte sich, dass die Kieferperiostzellen auf Trägermatrizen beschichtet mit der Negativkontrolle GRGES (Austausch der Aminosäure Asparaginsäure gegen Glutaminsäure) ebenfalls nicht adhärirten (Abb. 12B). Die Beschichtung mit dem linearen Peptid GRGDS erbrachte eine relativ schwache Zelladhäsion, eine gute Zelladhäsion konnte auf zyklisch- und PLL-beschichteten Konstrukten beobachtet werden, wie in Abb. 12D und E zu sehen ist. Schließlich konnte das stärkste Adhäsionsverhalten auf indirekt beschichteten Matrizen mit dem linearen GRGDS Peptid mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden (Abb 12F). Sowohl bezüglich der Zelldichte- als auch der Morphologie zeigten sich hier die besten Resultate.

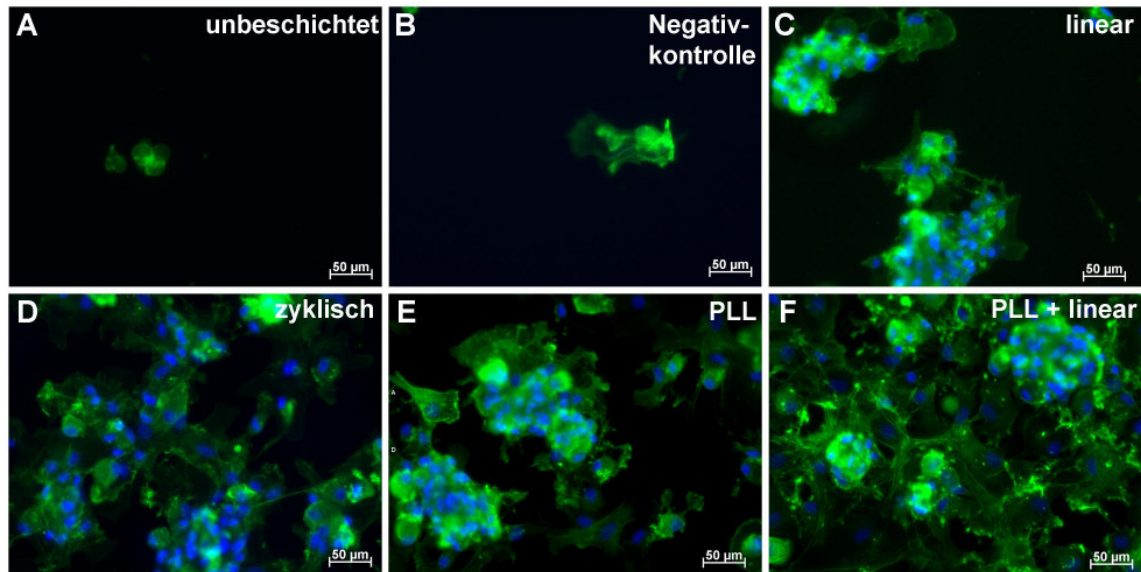


Abb. 12 Untersuchung der Zelladhäsion auf zweidimensionaler Kultivierungsebene mittels Fluoreszenzmikroskopie

JPCs wurden auf unbeschichteten und beschichteten Wells von speziellen Aminoplaten 1 Std. inkubiert, fixiert und angefärbt. Grün: Phalloidin färbung / Zytoskelett, blau: DAPI / Zellkernfärbung. A: unbeschichtete Kontrolle, B: Negativkontrolle GRGES, C: GRGDS, D: zyklisches RGDfK, E: Poly-L-Lysin, F: indirekt gekoppeltes GRGDS über Poly-L-Lysin. Maßstab: 50 µM.

Der Zelladhäsionsassay der 3D kultivierten und beschichteten Konstrukte zeigte ein anderes Muster (Abb. 13) im Vergleich zu den 2D kultivierten Zellen (Abb. 12). Hierbei wurde das Zytoskelett ebenfalls mit Phalloidin gefärbt, die Zellkerne mit Sytox Orange. Bei den unten dargestellten Abbildungen handelt es sich um Maxiprojektionen von Z-Stacks, durch die man bis ca. 50-100 µm tief in das Präparat einsehen kann. Da die Oberfläche der Trägermaterialien mit zahlreichen Poren durchsetzt und nicht eben war, war eine tiefenscharfe Darstellung in starker Vergrößerung nicht möglich.

Während JPCs auf Konstrukten beschichtet mit zyklischen Peptiden in der 2D Kultur eine relativ gute Zelladhäsion zeigten, konnte dies auf 3D Ebene nicht bestätigt werden (Abb. 13C). Direkt GRGDS und PLL beschichtete Trägermatrizen zeigten eine mittlere Zelldichte nach der einstündigen Inkubation auf (Abb. 13B und D). Die höchste Zelldichte hingegen wurde wiederum auf indirekt CGRGDS beschichteten Trägermatrizen detektiert (Abb. 13E).

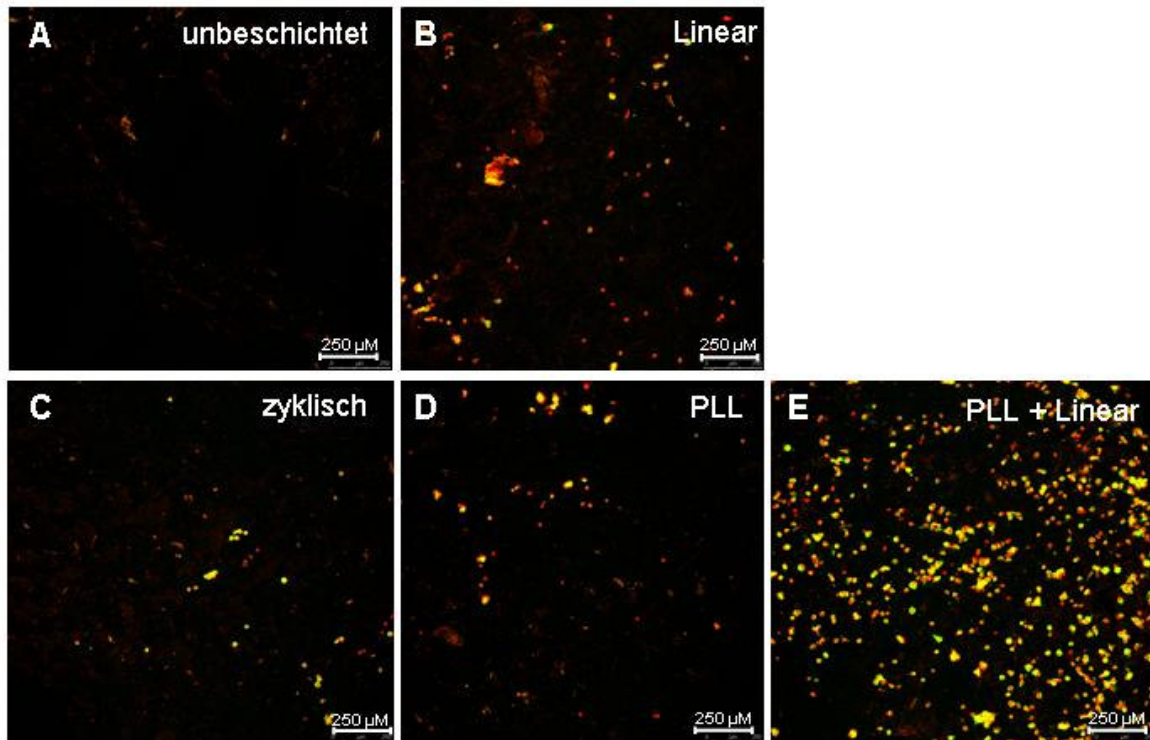


Abb. 13 Untersuchung der Zelladhäsion auf dreidimensionaler Kultivierungsebene mittels Fluoreszenzmikroskopie

Grün: Phalloidin / Zytoskelett, rot: Sytox Orange / Zellkernfärbung. A: unbeschichtete Trägermatrix, B: OPLA-Trägermatrix mit linearem Peptid beschichtet (GRGDS), C: RGDfK Beschichtung (zyklisches Peptid) D: Poly-L-Lysin Beschichtung, E: indirekte Beschichtung des Peptids GRGDS über Poly-L-Lysin. Maßstab: 250 µM

4.1.3 2D und 3D Proliferationsassays

Neben dem Adhäsionsverhalten der JPCs wurde ebenso das Proliferationsverhalten auf 2D und 3D Ebene mittels konfokaler Mikroskopie untersucht und mithilfe eines metabolischen Assays auf 3D Ebene verifiziert. In der 2D Kultur konnten lediglich Unterschiede im Wachstumsverhalten in Bezug auf die Morphologie und den Zell-Zell Kontakten festgestellt werden. Die unbeschichteten und die Negativkontrollen sowie auch die linear beschichteten Wells zeigten im Gegensatz zu den zyklischen und indirekt beschichteten Wells ein eher parallel verlaufendes Zellwachstum, wohingegen bei den zyklisch, PLL und indirekt beschichteten Wells nach 16 Tagen in Kultur ein orthogonales Wachstum, das eher osteoblastentypisch ist, beobachtet werden konnte (Abb. 14).

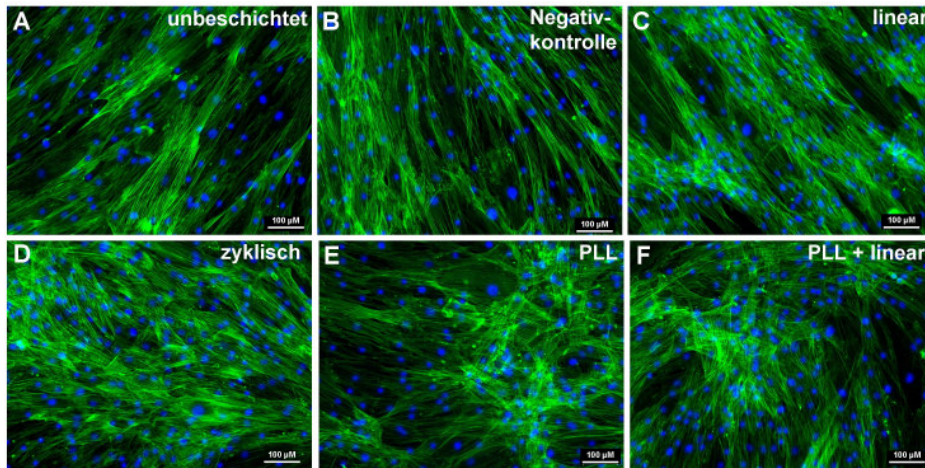


Abb. 14 Untersuchung der Zellproliferation auf zweidimensionaler Kultivierungsebene mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie

JPCs wurden auf beschichteten Aminoplaten 16 Tage kultiviert und angefärbt. Grün: Phalloidin färbung / Zytoskelett, blau: DAPI / Zellkernfärbung. A: unbeschichtete Kontrolle, B: Negativkontrolle GRGES, C: GRGDS, D: zyklisches RGDfK, E: Poly-L-Lysin, F: indirekt gekoppeltes GRGDS über Poly-L-Lysin. Maßstab: 100 µM.

Auf 3D Ebene zeigte die Proliferation der JPCs auf den verschieden beschichteten Konstrukten größere Unterschiede auf. Selbst nach 16 Tagen zeigten kultivierte JPCs auf zyklisch beschichteten Konstrukten, die auf 2D Ebene sowohl ein gutes Adhäsions- als auch Proliferationsverhalten aufwiesen ein nur sehr spärliches Wachstum (Abb. 15C). Die unbeschichtete Kontrolle als auch das linear und PLL-beschichtete Konstrukt ließ auf ein mäßiges Proliferationsverhalten schließen, wohingegen das stärkste Proliferationsverhalten erneut auf indirekt CGRGDS beschichteten Konstrukten beobachtet werden konnte. Wie bereits in den vorangegangenen Analysen gezeigt wurde, wiesen die JPCs innerhalb der PLL+linear beschichteten Konstrukte die schönste Zellmorphologie, ein vermehrtes und über das komplette Scaffold homogen verteiltes Zell-Spreading mit zahlreichen Zell-Zell-Kontakten auf.

4 Ergebnisse

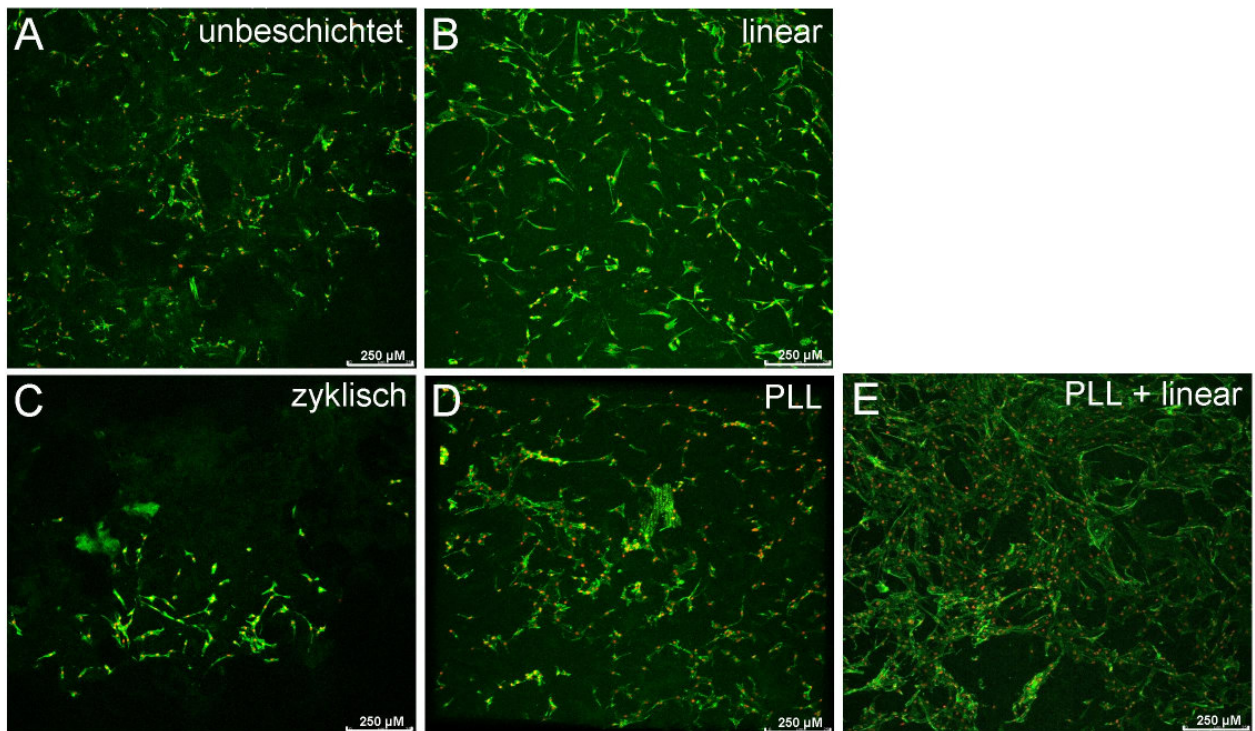


Abb. 15 Untersuchung der Zelladhäsion auf dreidimensionaler Kultivierungsebene mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie

Grün: Phalloidin / Zytoskelett, rot: Sytox Orange / Zellkernfärbung. A: unbeschichtete Trägermatrix, B: OPLA-Scaffold mit zyklischen Peptid RGDfK beschichtet, C: GRGDS Beschichtung, D: Poly-L-Lysin Beschichtung, E: indirekte Beschichtung des Peptids CGRGDS über Poly-L-Lysin. Maßstab: 250 µM.

Das Proliferationsverhalten der JPCs die innerhalb der unterschiedlich beschichteten Scaffolds kultiviert wurden, wurde zusätzlich mithilfe eines metabolischen Assays analysiert. Wie in Abb. 16 deutlich wird, zeigten die Kieferperiostzellen die auf den indirekt gecoateten Konstrukten (PLL+linear) proliferierten die höchsten Extinktionswerte auf. Jedoch konnte ein signifikanter Unterschied nur nach Tag 8 der *in vitro* Kultivierung errechnet werden.

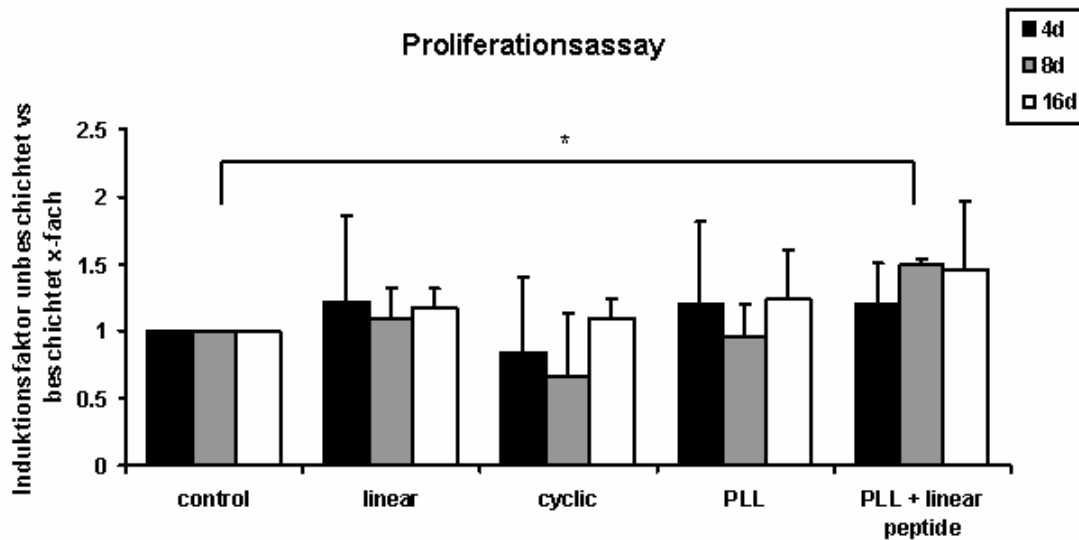


Abb. 16 Metabolischer Proliferationsassay der JPCs nach 16 Tagen in 3D Kultur auf beschichteten OPLA-Trägermatrizen

Schwarz: 4 Tage Kultur, grau: 8 Tage Kultur, weiß: 16 Tage Kultur. p-Wert: 0,021. Unbeschichtete Scaffolds dienten als Referenz.

4.1.4 Analyse der beteiligten Integrine

4.1.4.1 Integrinexpression der JPCs in undifferenziertem, unbeschichtetem Status in der 2D Kultur

Das konstitutive Integrinproteinexpressionsmuster der humanen Kieferperiostzellen wurde in undifferenziertem Zellstatus auf ungecoateten 2D Kulturplatten mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die JPCs zeigten eine konstitutive Proteinexpression von ITGA5, ITGB1 und ITGB3 auf der Zelloberfläche, wohingegen die Proteine ITGAV und ITGA9 nicht detektiert werden konnten. Während alle untersuchten Integrine eine einheitliche Zellpopulation aufzeigten die das jeweilige Protein exprimierte, deutet das Histogramm für ITGB3 an, dass es unter dem heterogenen Periostzellverband eine negative sowie eine positive Subpopulation bezüglich der Expression dieses Integrins gibt (Abb. 17).

4 Ergebnisse

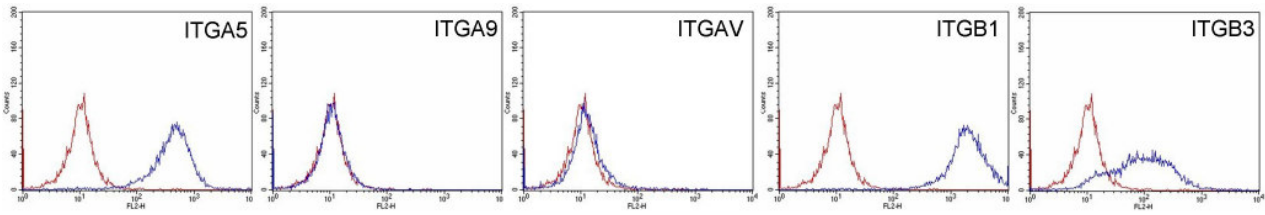


Abb. 17 Durchflusszytometrische Analysen der konstitutiven Integrinexpression in undifferenzierten JPCs in unbeschichteter 2D-Kultur

Die konstitutive extrazelluläre Integrinexpression von ITGA5, ITGA9, ITGAV, ITGB1 und ITGB3 in JPCs nach 5 Tagen 2D-Kultur wurde durchflusszytometrisch analysiert.

4.1.4.2 Integrinexpression der JPCs in undifferenziertem, beschichtetem Status in der 3D Kultur

Nach der Untersuchung der konstitutiven Integrinexpression folgten Proteinexpressionsuntersuchungen in JPC-besiedelten beschichteten 3D Konstrukten mithilfe eines Proteom Profiler Arrays. Diese Methode wurde der Durchflusszytometrie vorgezogen, da aufgrund des 3D Zellwachstums auf der Trägermatrix ein effektives komplettes Ablösen der Zellen nicht möglich war ohne die Zellen dabei zu schädigen. Diese Analysen wurden mit Zellkulturüberständen durchgeführt. Dabei diente die Expression der JPCs, die innerhalb unbeschichteter Matrizen proliferierten, als Referenzkontrolle.

Insgesamt konnten höhere Expressionslevels der analysierten Integrine in den Konstrukten beschichtet mit linearem und PLL + linearem Peptid detektiert werden im Vergleich zu den unbeschichteten Kontrollen, mit Ausnahme des Integrins ITGB1 (Abb. 18).

Interessanterweise wurde in den peptidbeschichteten Konstrukten eine Expression von ITGA9 (Induktionsfaktor beschichteter Konstrukte (PLL+linear) versus unbeschichteter Konstrukte: $2,04 \pm 0,14$; linear: $1,54 \pm 0,35$; PLL: $0,46 \pm 0,18$) und ITGAV (Induktionsfaktor beschichteter Konstrukte (PLL/linear) versus unbeschichteter Konstrukte: $2,19 \pm 0,33$; linear: $1,96 \pm 0,37$; PLL: $0,39 \pm 0,15$) detektiert, im Gegensatz zu den Ergebnissen der Expressionsmuster in der 2D Kultur. Ebenfalls überraschend war das Ergebnis, dass JPCs, die auf beschichteten 3D Konstrukten proliferierten, keine detektierbare Expression von ITGB1 aufwiesen. ITGB3 wurde verstärkt in indirekt beschichteten Konstrukten exprimiert (Induktionsfaktor beschichteter Konstrukte (PLL/linear) versus unbeschichteter Konstrukte: $2,52 \pm 0,61$; linear: $1,76 \pm 0,10$; PLL: $0,35 \pm 0,08$). Das Integrinexpressionmuster der

Kieferperiostzellen kultiviert auf den PLL/linear beschichteten Konstrukten ist nicht auf das Poly-L-Lysin zurückzuführen, da die Integrinexpressionslevels in den JPCs, die nur auf den PLL-beschichteten Konstrukten proliferierten, sehr niedrig waren.

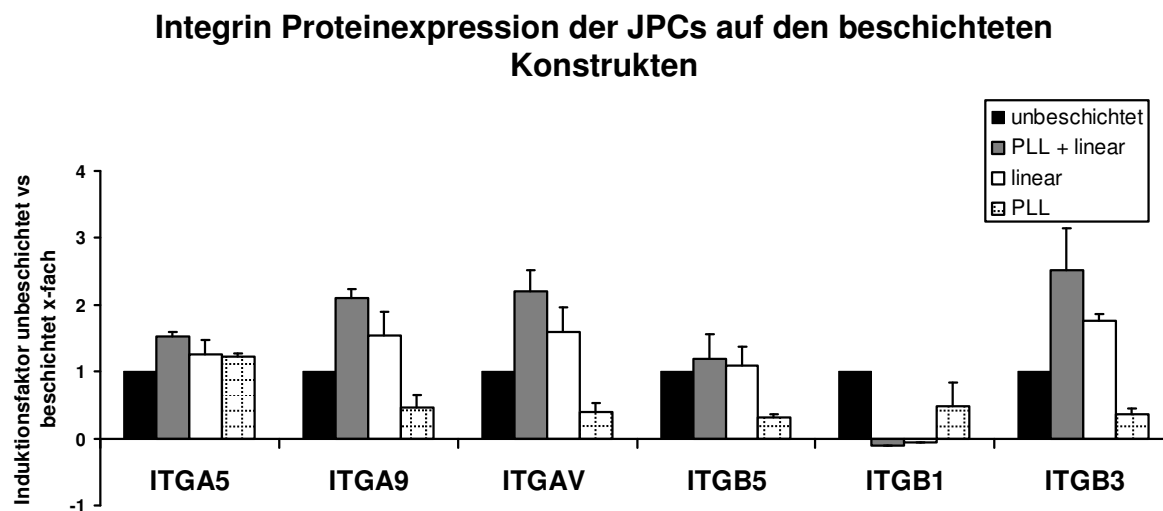


Abb. 18 Analyse der Integrin Proteinexpressionsmuster der JPCs in 3D-Kultur auf beschichteten OPLA-Trägermatrizen nach 16 Tagen Kultur anhand eines Proteom Profilers.

4.1.4.3 Funktionelle Integrinassays

Um genauer definieren zu können aufgrund welcher Integrine die differentiellen Zellantworten auf die RGD-Beschichtungen zurückzuführen sind, wurden funktionelle Integrinassays durchgeführt, bei denen die verschiedenen Integrine durch neutralisierende Antikörper blockiert wurden. Es wurden die Integrine untersucht, die bei den FACS-Analysen in unbeschichtetem Status und dem Proteom Profiler in der 3D Kultur eine Rolle zu spielen schienen. Gleichzeitig wurde hierbei das Adhäsionsverhalten der JPC auf den 3D Konstrukten untersucht (Abb. 19).

Das Adhärenzverhalten der Zellen auf den zyklisch beschichteten Konstrukten zeigte eine sehr schwache Adhäsion auf, wobei auch hier die indirekt beschichteten Matrizen die höchsten Levels aufwiesen.

Unabhängig von den beschichteten Peptiden wurde die Zelladhäsion sehr stark durch die Zugabe von einem neutralisierenden ITGB3-Antikörper reduziert. Eine nur teilweise Blockierung der Adhäsion auf den Konstrukten wurde durch ITGAV und ITGB1 neutralisierenden Antikörper erreicht werden, was andeutet, dass die JPC

4 Ergebnisse

Zelladhäsion und Proliferation auf 3D Trägermatrizen über diese Integrine moduliert wird. Die Blockierung von ITGA9 hatte keine relevanten Effekte auf die Zelladhäsion.

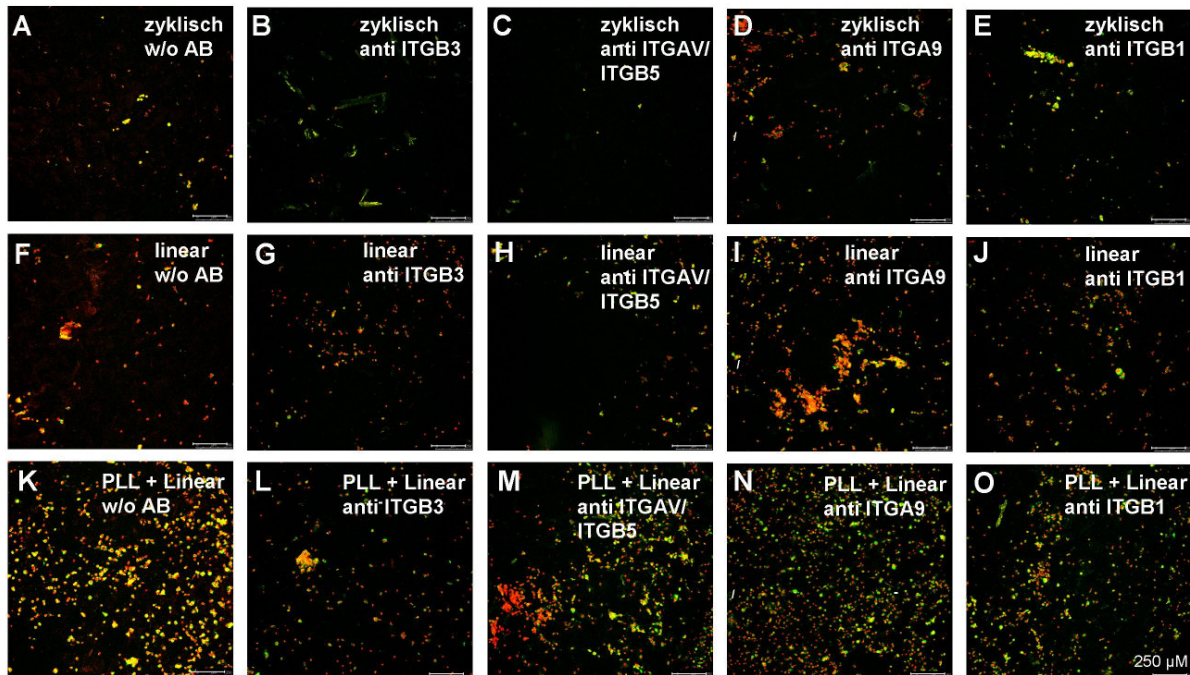


Abb. 19 Funktioneller Assay zur Untersuchung der Zelladhäsion nach Behandlung mit neutralisierenden Integrinantikörpern auf 3D Ebene mit beschichteten OPLA-Konstrukten.

Analyse anhand Fluoreszenzmikroskopie. Grün: Phalloidin / Zytoskelett, rot: Sytox Orange / Zellkernfärbung. A-E: Trägermatrix mit zyklischen Peptiden beschichtet und einer Stunde Behandlung mit den verschiedenen neutralisierenden Antikörpern, F-J: OPLA-Scaffold mit linearem Peptid GRGDS beschichtet, K-O: indirekte Beschichtung des Peptids GRGDS über Poly-L-Lysin. Maßstab: 250 µM.

4.1.5 Genexpressionsanalyse von osteogenen Markern

Die Analyse der Genexpression in JPCs, die auf 3D beschichteten Konstrukten ausgesät wurden, wurde nach 14 Tagen *in vitro* Kultur unter normalen und osteogenen Kulturbedingungen durchgeführt. In den Diagrammen sind die Induktionsfaktoren der Genexpressionen der osteogen differenzierten JPCs (OB) versus der unbehandelten Kontrollen (Ko) dargestellt. Die indirekt beschichteten Konstrukte (PLL+linear) zeigten eine signifikant erhöhte Genexpression der alkalischen Phosphatase (Induktionsfaktor $36,4 \pm 4,5$ p-Werte: PLL+linear versus unbeschichtet; 0,03; PLL+linear versus linear: 0,0008; PLL+linear versus PLL 0,035). Ebenfalls signifikant induziert zeigte sich die Genexpression von Runx-2 in Zellen, die auf indirekt beschichteten Konstrukten osteogen differenziert wurden (Induktionsfaktor: $4,6 \pm 0,4$; p-Werte: PLL+linear versus unbeschichtet: 0,02;

PLL+linear versus linear: 0,03; PLL+linear versus PLL: 0,01). Weiterhin wurde eine signifikante Induktion von Amely in indirekt beschichteten, zellbesiedelten Konstrukten im Vergleich zu unbeschichteten, PLL oder linear beschichteten Konstrukten detektiert (Induktionsfaktor $3,4 \pm 0,4$; p-Werte: PLL+linear versus unbeschichtet: 0,02; PLL+linear versus PLL: 0,01) (Abb. 20). Andere osteogenese-assoziierten Gene die in vorhergehenden Genarrays auf 2D Ebene induziert wurden wie IGF2, LAMA2, TIMP4, OGN und TWIST-1, wurden exprimiert und während der Osteogenese induziert, jedoch zeigten diese keine differentielle Expression zwischen den verschiedenen Beschichtungsvarianten.

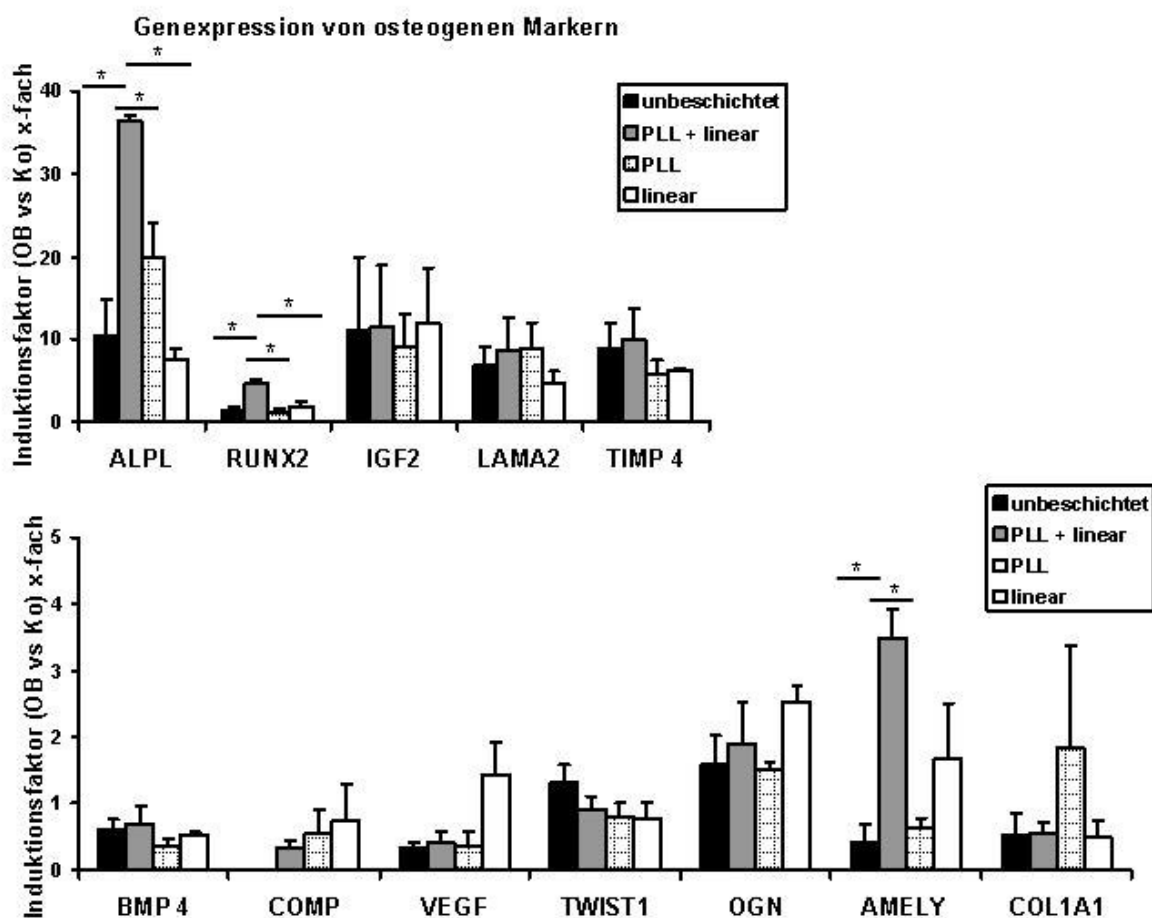


Abb. 20 Genexpressionsanalyse von Osteogenese-assoziierten Genen auf 3D kultivierten und beschichteten Konstrukten.

Die Zellen wurden 16 Tage mit Normalmedium als Kontrolle und Osteoblastendifferenzierungsmedium behandelt. Dargestellt ist der Induktionsfaktor von den OB-behandelten zu den unbehandelten Kontrollen.

4 Ergebnisse

4.1.6 Analyse des Mineralisierungspotentials der JPCs kultiviert und differenziert in beschichteten Aminoplaten auf 2D Ebene

Nach 21 Tagen Kultivierung von Kieferperiostzellen mit Normal- versus Osteoblastendifferenzierungsmedium wurde das Mineralisierungspotenzial in den 2D beschichteten Immobiliser Platten analysiert. Dafür wurde zuerst eine Alizarinfärbung für die Visualisierung der Kalziumphosphatpräzipitate in den entsprechenden Wells durchgeführt und anschließend wurde der Farbstoff wieder aus den Monolayern herausgelöst (siehe Material/Methoden) und photometrisch quantifiziert. Wie aus Abb. 21 hervorgeht, waren die JPCs in allen Wells in der Lage, Kalziumpräzipitate zu bilden, unabhängig von der Beschichtung. Jedoch konnten deutliche Unterschiede bezüglich der Quantität der gebildeten Präzipitate festgestellt werden. Wie in Abb. 21H zu sehen ist, bildeten die JPCs, die auf indirekt gecoateten Platten (PLL+linear) wuchsen die meisten Kalziumpräzipitate, gefolgt von den Zellen die auf linear beschichteten Platten differenzierten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die indirekt gecoateten Peptide ein optimaleres, osteoinduktives Milieu darstellen, um den Mineralisierungsprozess zu verstärken.

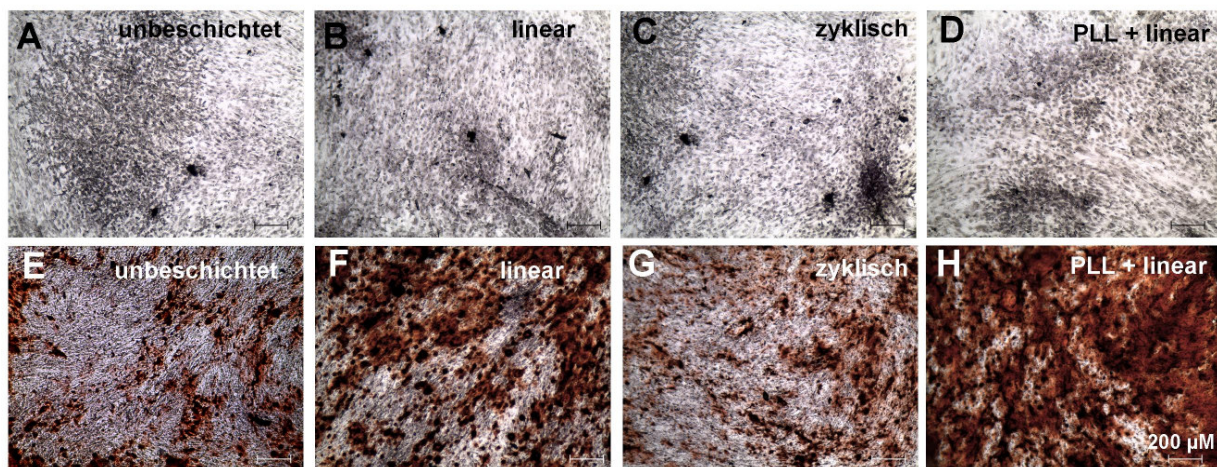


Abb. 21 Alizarinfärbung der 2D beschichteten und mit JPCs bewachsenen Aminoplaten zum Nachweis der Kalziumphosphatpräzipitate.

Kultivierung der JPCs im Normal- und Osteoblastenmedium (25 Tage) auf verschiedenen Peptid-beschichteten Immobiliserplatten. Die obere Reihe zeigt die mit Normalmedium behandelten JPCs und die untere Reihe die dazugehörigen osteogen differenzierten Kieferperiostzellen.

Nachdem die Unterschiede bezüglich des Mineralisierungspotentials der Zellen in den beschichteten Aminoplaten bereits durch mikroskopische Analysen festgestellt wurden, erfolgte die Verifikation durch eine genaue Kalziumquantifizierung (Abb. 22). Auch hier wiesen die indirekt beschichteten Platten deutlich das höchste

Mineralisierungspotential auf. Aufgrund der Heterogenität der Donoren unterschieden sich die Werte bei der Quantifizierung der Präzipitate jedoch so sehr, dass keine Signifikanz erreicht werden konnte, die Tendenz jedoch bei jedem Patienten deutlich sichtbar war. Auf der zweidimensionalen Ebene konnte bei den unbeschichteten Platten ($12,0 \pm 9,8$), sowohl auch bei den linear ($8,0 \pm 6,7$) und zyklisch beschichteten ($14,9 \pm 12,8$) Platten die gleiche Quantität an Präzipitaten detektiert werden, wohingegen der Induktionsfaktor bei den indirekt beschichteten Platten bei $44,7 \pm 30,7$ lag.

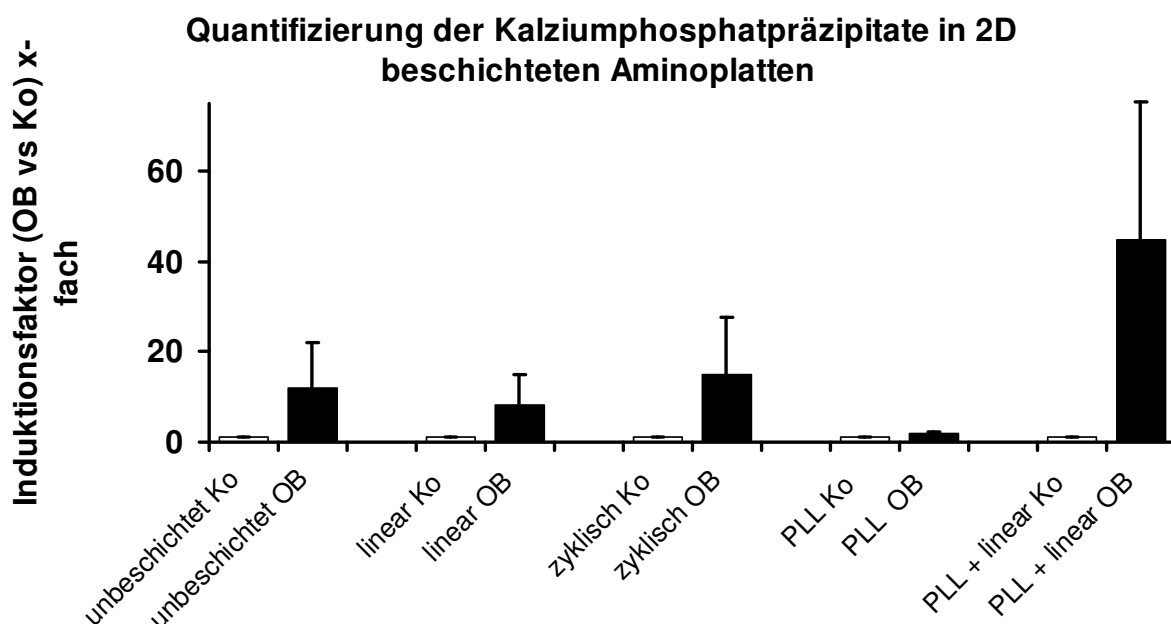


Abb. 22 Photometrische Quantifizierung der Alizarinfärbung aus Abb. 21

Der Alizarinfarbstoff wurde aus den Monolayern herausgelöst und photometrisch quantifiziert. Dargestellt sind die Induktionsfaktoren der OB-behandelten JPCs versus der unbehandelten Kontrollen in unterschiedlich beschichteten Aminoplatten. $n=4$.

4.1.7 Analyse des Mineralisierungspotentials der JPCs kultiviert und differenziert innerhalb beschichteter 3D Konstrukte

4.1.7.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der 3D Konstrukte

Da die unspezifische Bindung des Alizarinfarbstoffes auf 3D Trägermatrizen ein erhebliches Problem darstellte, konnte die Alizarinfärbung zum Nachweis der Kalziumphosphatpräzipitate mit den Peptid-beschichteten Matrizen nicht durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde die Visualisierung durch

4 Ergebnisse

elektronenmikroskopische Aufnahmen als Nachweismethode gewählt. Als Kontrolle wurde die Oberfläche von zellfreien Trägermatrizen analysiert, die relativ glatt erschien (Abb. 23, obere Reihe). Besiedelt mit humanen Kieferperiostzellen wurde eine eine strukturiertere Oberfläche sichtbar, die eine leicht wellige Form aufwies (Abb. 23, mittlere und untere Reihe).

Es wurde deutlich, dass alle mit Osteoblastendifferenzierungsmedium behandelten Konstrukte einen geschlossenen Zellrasen bildeten, der sich homogen über das gesamte Scaffold erstreckte und mehrschichtig war. In den unbehandelten Kontrollkonstrukten konnte bis auf die zyklisch-beschichteten Konstrukte ebenfalls ein homogener Zellrasen auf den Scaffolds visualisiert werden. Jedoch ausschließlich bei den linear und besonders bei den indirekt (PLL+linear) beschichteten Konstrukten wurden von den Zellen abgesonderte Präzipitate auf der Matrixoberfläche sichtbar (einzelne angedeutet durch rote Pfeile). Diese wurden durch eine Elementanalyse genauer bezogen auf ihre Bestandteile untersucht, wie in den vergrößerten Aufnahmen in Abb. 24 gezeigt.

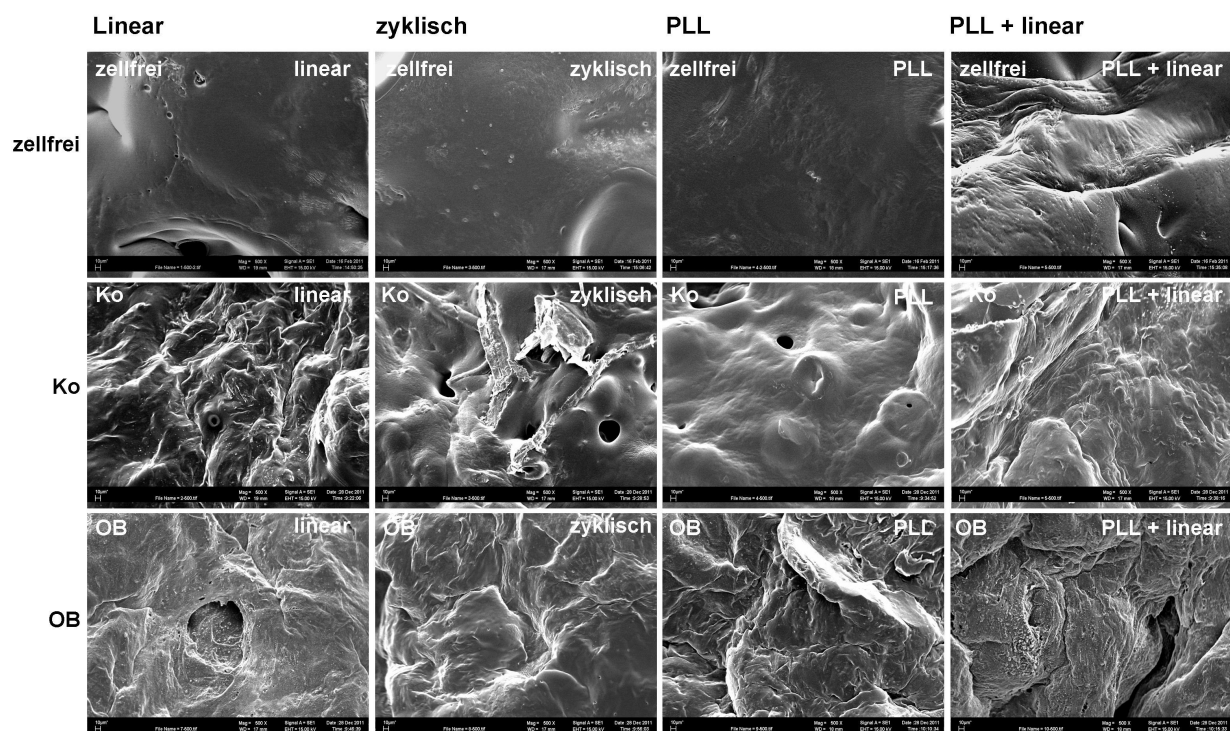


Abb. 23 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen beschichteten und mit humanen Kieferperiostzellen besiedelten OPLA-Konstrukte.

Linear: OPLA-Scaffold mit GRGDS-Peptid beschichtet, zyklisch: RGDfK-Beschichtung, PLL: mit Poly-L-Lysin beschichtet, PLL+linear: indirekte Beschichtung über Poly-L-Lysin als Spacer.

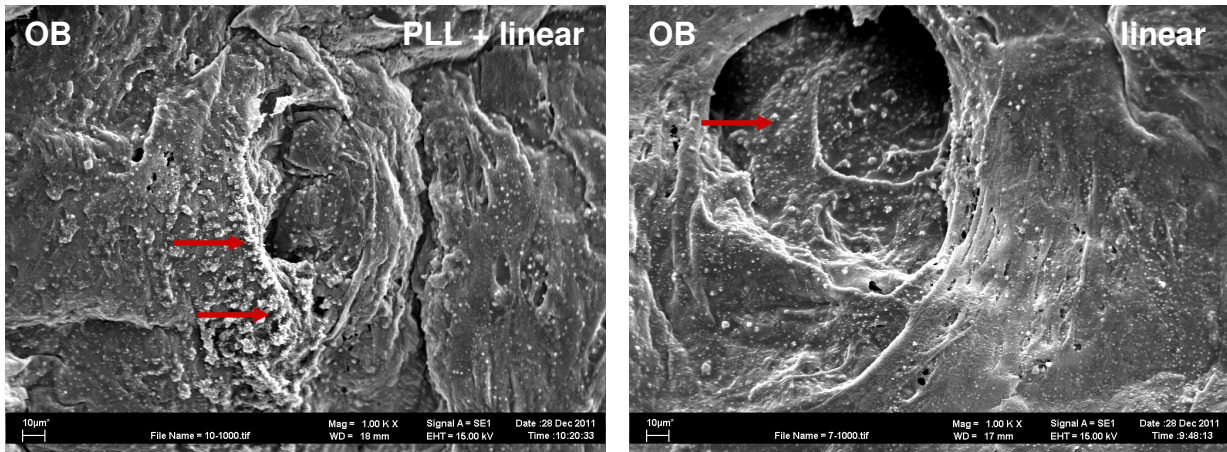


Abb. 24 Vergrößerte Aufnahmen der PLL+linear und linear beschichteten Konstrukte mit vermehrter Präzipitatbildung auf deren Oberfläche.

Lineares und indirekt beschichtetes Konstrukt (PLL+linear), besiedelt mit JPCs nach 16 Tagen Differenzierung mit Osteoblastendifferenzierungsmedium.

4.1.8 Energiedispersive röntgenspektroskopische Analyse (EDX-Spektroskopie) der gebildeten Präzipitate in den beschichteten 3D-Konstrukten

Für die energiedispersiven röntgenspektroskopischen Elementaranalysen der beschichteten und mit JPCs besiedelten Konstrukte wurden diese mit Gold/Palladium besputterten Matrizen nach der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme verwendet. Auf den mit zyklischem Peptid beschichteten und besiedelten Konstrukten waren keine Präzipitate nach 16 Tage *in vitro* Kultivierung sichtbar, daher wurde von diesen Scaffolds keine EDX-Analyse durchgeführt.

Bei den Analysen der Spots wurde deutlich, dass es große Unterschiede in der Zusammensetzung gab. Es wurden Spots detektiert, die hauptsächlich Natrium aufwiesen (Abb. 25A) und kein Kalziumphosphat beinhalteten. Des Weiteren wurden Präzipitate identifiziert, in denen geringe Mengen an Kalziumphosphat nachweisbar waren (Abb. 25B). Und schließlich wurden Präzipitate detektiert, die relativ viel Kalziumphosphat neben Natriumchlorid enthielten (Abb. 25C). Anhand der Anzahl der vorkommenden Präzipitate konnte die Beobachtung gemacht werden, dass diese stärker auf den indirekt beschichteten Konstrukten (PLL+linear) vertreten waren, allerdings konnte keine genaue Quantifizierung der gebildeten Präzipitate durchgeführt werden.

4 Ergebnisse

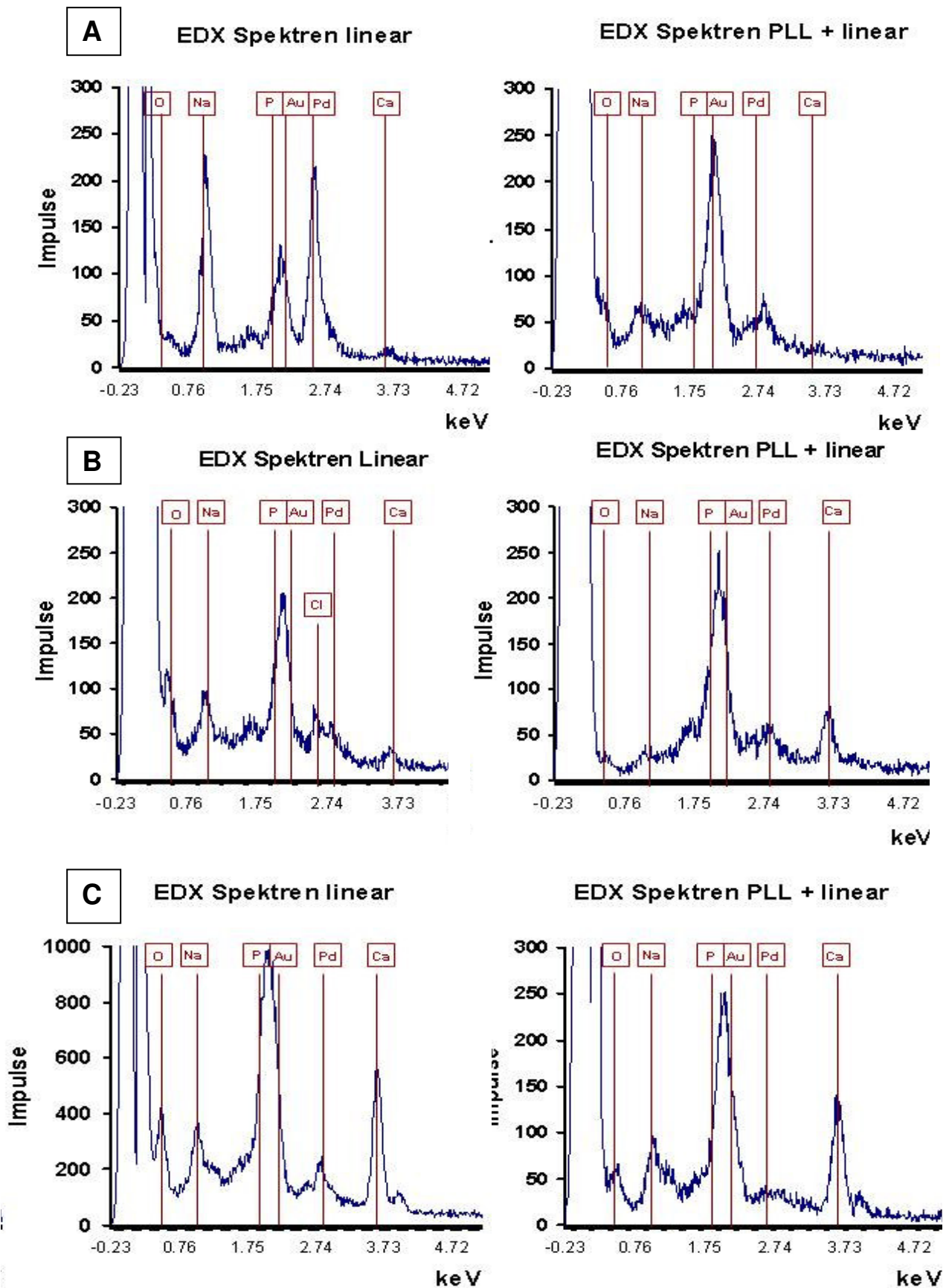


Abb. 25 Energiedispersive Röntgenanalysen (EDX-Spektroskopie)

EDX Analyse der zellbesiedelten 3D, linear und indirekt beschichteten OPLA-Konstrukte (PLL+linear), die über einen Zeitraum von 16 Tagen *in vitro* kultiviert wurden. Es wurden mit Gold/Palladium

besputtete Proben verwendet, die zuvor für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen eingesetzt wurden. A: Spots die kein Kalziumphosphat enthielten, B: Spots die nur wenig Kalziumphosphat enthielten, C: Spots die hohe Levels an Kalziumphosphat aufwiesen.

4.2 Aptamere

4.2.1 Aptamergenerierung durch SELEX

Um ein Aptamer zu generieren das unter physiologischen Bedingungen an sein Target bindet, wurde die SELEX-Prozedur in einem geringfügig mit Magnesiumchlorid modifiziertem Medium als Puffersystem durchgeführt, um die Bindung der DNA an die vitalen Zellen durch eine Veränderung der Ionenkonzentration zu erhöhen.

In der ersten SELEX-Runde wurden die Zellen mit einer Startbibliothek die ca 10^{15} verschiedene einzelsträngige Oligonukleotidsequenzen mit einer Länge von 80 bp enthielt, inkubiert. Die ungebundenen Sequenzen wurden durch Waschen eliminiert und die gebundenen per PCR amplifiziert. Nach der Strangtrennung durch einen Lambdaexonukleaseverdau wurden 5 μg DNA für die nächste SELEX-Runde verwendet. Anfangs wurde nicht nach jeder einzelnen Runde ein durchflusszytometrischer Bindungsassay durchgeführt, sondern anhand der Gele evaluiert, ob der Übergang in die nächste Runde sinnvoll erschien. Ab der dritten SELEX-Runde konnte eine Aptamer-Anreicherung von 3,65 % erzielt werden, die in Runde 8 weiter auf 6,15 % anstieg (Abb. 27). Als Isotypenkontrolle diente die Startbibliothek, abzüglich derer sich die Prozentzahlen der Bindungsaffinität errechneten.

Je nach Verunreinigungsgrad der amplifizierten DNA der anhand der Gele festgestellt wurde, wurde die gewünschte 80 bp große Bande aus dem Gel ausgeschnitten und daraus die DNA eluiert (Schritt in Abb. 27 angedeutet durch roten Pfeil). In den ersten Runden war eine negative Gegenselektion durch die nur sehr geringfügige Aptamer-Bindung überflüssig und kontraproduktiv, weswegen diese erst ab Runde 8 mit der Zelllinie BICR (humane Plattenepithelkarzinomzelllinie) durchgeführt wurde (Schritt in Abb. 27 angedeutet durch hellroten Blitz). Die Bindungsaffinität stieg nicht exponentiell nach jeder durchgeführten Selexrunde wie theoretisch erhofft an, jedoch konnte ein kontinuierlicher Anstieg im Laufe der SELEX-Runden beobachtet werden. Nach jeder neu beginnenden negativen

4 Ergebnisse

Gegenselektion wurde eine geringere Bindungseffizienz detektiert (siehe Runde 8 – Gegenselektion mit BICR, Runde 16 – Gegenselektion mit humanen PBMC). Die Bindungseffizienz erreichte in Runde 14 ihr Maximum von 12,63% und fiel jedoch nach den negativen Gegenselektionen in Runde 16 und 17 deutlich ab. Um die JPC Spezifität zu bewahren, wurden für die weitere Klonierung die Sequenzen der Runde 17 mit der geringeren Bindungsaffinität verwendet.

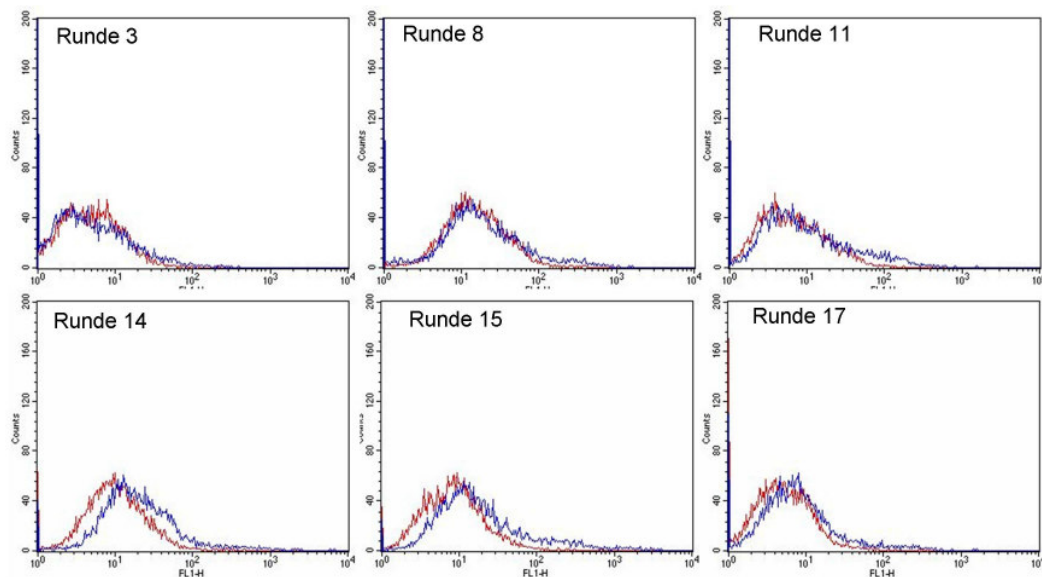


Abb. 26 Durchflusszytometrische Analysen der generierten Aptamere nach den verschiedenen SELEX-Runden.

Nach verschiedenen SELEX-Runden wurden durchflusszytometrische Bindungsassays mit dem Zeldonor gegen den der Aptamerpool generiert wurde, durchgeführt und die Prozentzahl an positiven Counts ermittelt.

SELEX-Runde	Bindung in %
3	3.65
→ 5	5.03
8	⚡ 6.15
→ 9	⚡ 4.45
10	⚡ 8.91
→ 11	⚡ 9.89
12	⚡ 11.65
→ 14	12.63
15	⚡ 11.83
16	⚡ 6.14
17	10.36

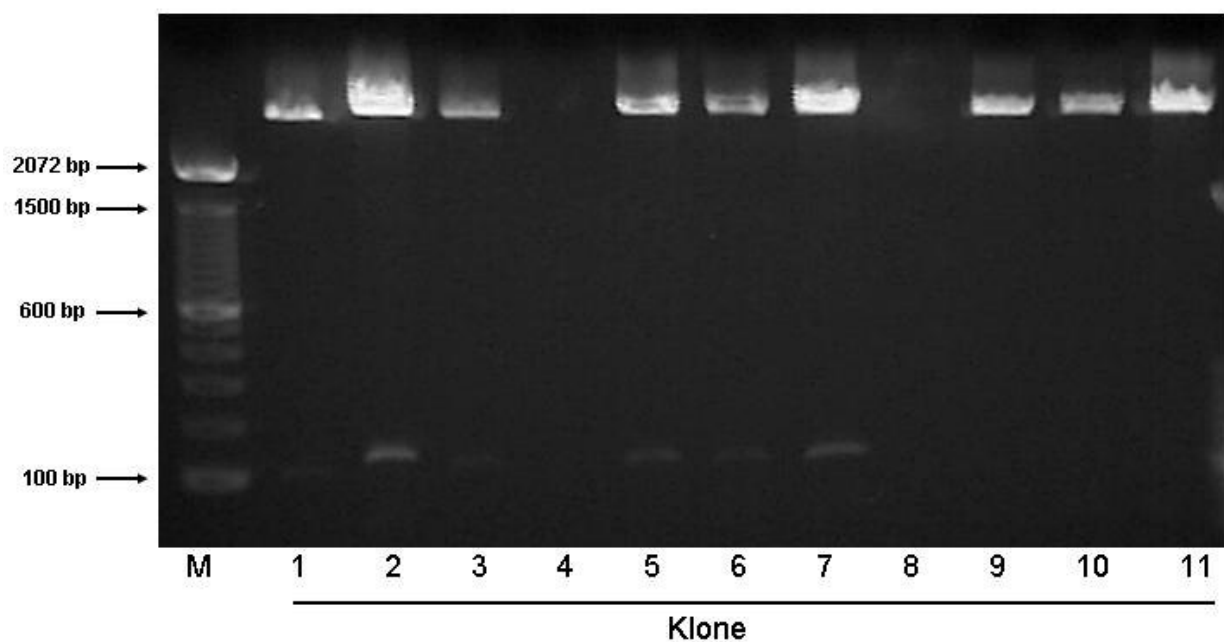
→ Gelelution
 ⚡ Negative Gegenselektion mit BICR (humane Plattenepithelkarzinomzelllinie)
 ⚡ Negative Gegenselektion mit PBMC

Abb. 27 Übersicht über die verschiedenen SELEX-Runden.

Einzelschritte der Prozessierungsvarianten (Gelelution und negative Gegenselektion) sind angezeigt.

4.2.2 Klonierung

Die mittels SELEX generierten Aptamere wurden in E.coli hineinkloniert, anschließend wurden 100 positive Klone gepickt und näher analysiert. Mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoR1* wurde ein enzymatischer Verdau der verwendeten Plasmide an den Ligationstellen der Insertion durchgeführt. Aus diesem Verdau resultierten eine 80 bp Bande, die das Aptamer repräsentiert und eine zweite Vektorbande, die eine Länge von etwa 3 kb aufwies. Insgesamt wurden 24 positive Klone identifiziert, die zur Sequenzierung eingeschickt wurden. In Abb. 28 sind exemplarisch 11 aus dem Verdau resultierenden DNA-Fragmente dargestellt, die sowohl positive (1, 2, 3, 5, 6, 7) als auch negative (4, 8, 9, 10, 11) Klone aufzeigen.

**Abb. 28 EcoR1 Restriktionsverdau der pDrive Plasmid-DNA aus den isolierten Klonen**

11 der 100 gepickten Klone sind hier exemplarisch dargestellt. Sowohl positive (die sowohl die Vektor- als auch die Insertbande aufweisen) als auch negative (die weder die 80 bp Aptamerbande noch die 3 kb Vektorbande aufweisen) konnten identifiziert werden.

4 Ergebnisse

4.2.3 Sequenzfamilien

Die Sequenzierung der 24 isolierten Klone wurde von der Firma *4baselab* (Reutlingen) durchgeführt. Mithilfe des Programms *ClustalW2* wurde ein multiples Alignment erstellt, wie in Abb. 29 dargestellt. Dabei stellte sich heraus, dass alle Sequenzen die gleiche flankierende Primersequenz am 3' und 5' Ende aufwiesen, während die mittlere Sequenz (zwischen bp 23 und 67) Unterschiede aufzeigten.

Die jeweiligen Basen sind in 4 verschiedenen Farben dargestellt (orange: Guanin, blau: Adenin, grün: Thymin). Kommen diese in erhöhter Häufigkeit in den 23 verschiedenen Sequenzen vor, so wurden diese von der Software eingefärbt. Die Primersequenz stimmt bei allen Sequenzen mit der Ausnahme von Klon 45 überein. Die relative Häufigkeit der Basen an der jeweiligen Position wurde unter den Sequenzen mit dem schwarzen Balken dargestellt. Dabei wurde deutlich, dass die Übereinstimmung unter den verschiedenen Klonen an Position 25, 31-33, 38-40, 44-45 und 49-51 am höchsten war.

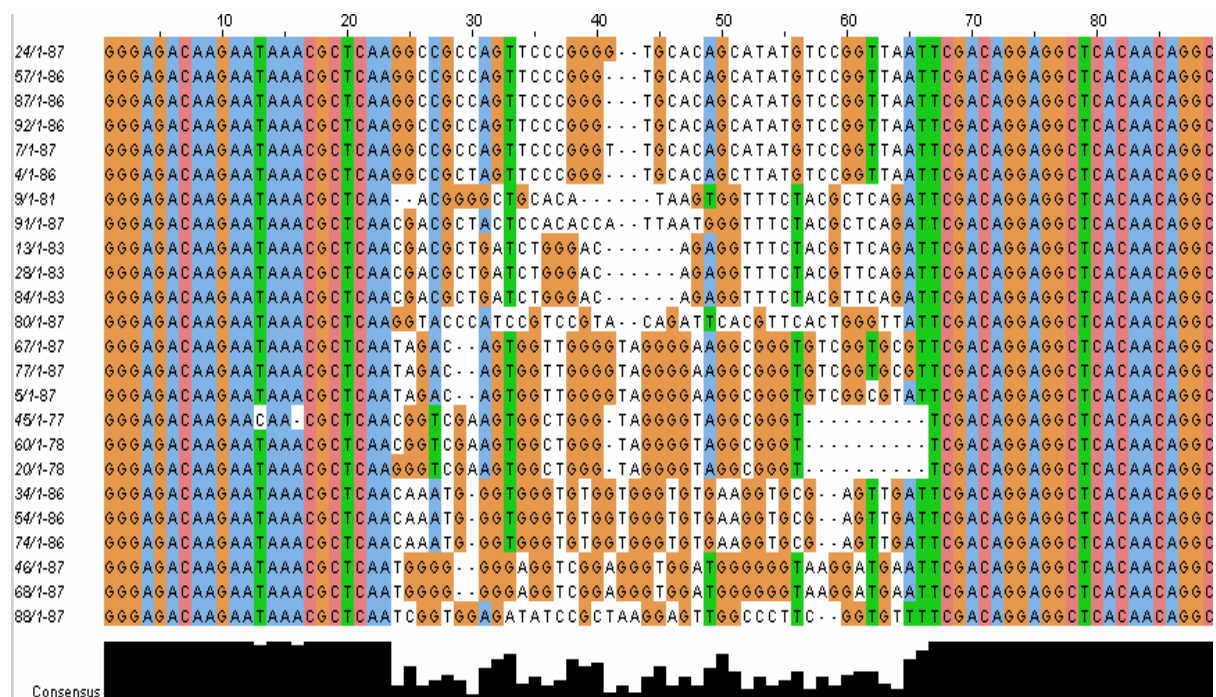


Abb. 29 Multiples Alignment der Sequenzen der 24 positiven Klone mithilfe der Software *ClustalW2*

Orange: Guanin, blau: Adenin, grün: Thymin, rosa: Cytosin, schwarz: relative Basenhäufigkeit

Aus den vorliegenden Sequenzen wurde ein Sequenzfamilienbaum erstellt, der aufzeigte, dass die 24 positiven Klone anhand ihrer Verwandtschaftsverhältnisse in 5 Sequenzfamilien (in Abb. 30 durch die roten Kästen dargestellt) unterteilt werden

konnten. Klon 80 und 88 wiesen stark von diesen Sequenzfamilien abweichende Sequenzen auf (Abb. 30).

Die in Abb. 30 an fünfter Stelle angezeigte Sequenzfamilie enthielt Klon 34, 54 und 74 und wurde nach der RNA-Faltungsanalyse als Sequenzfamilie 4 eingeordnet. Dabei handelt es sich um drei Klone, die jeweils die exakt gleiche Insertsequenz aufwiesen.

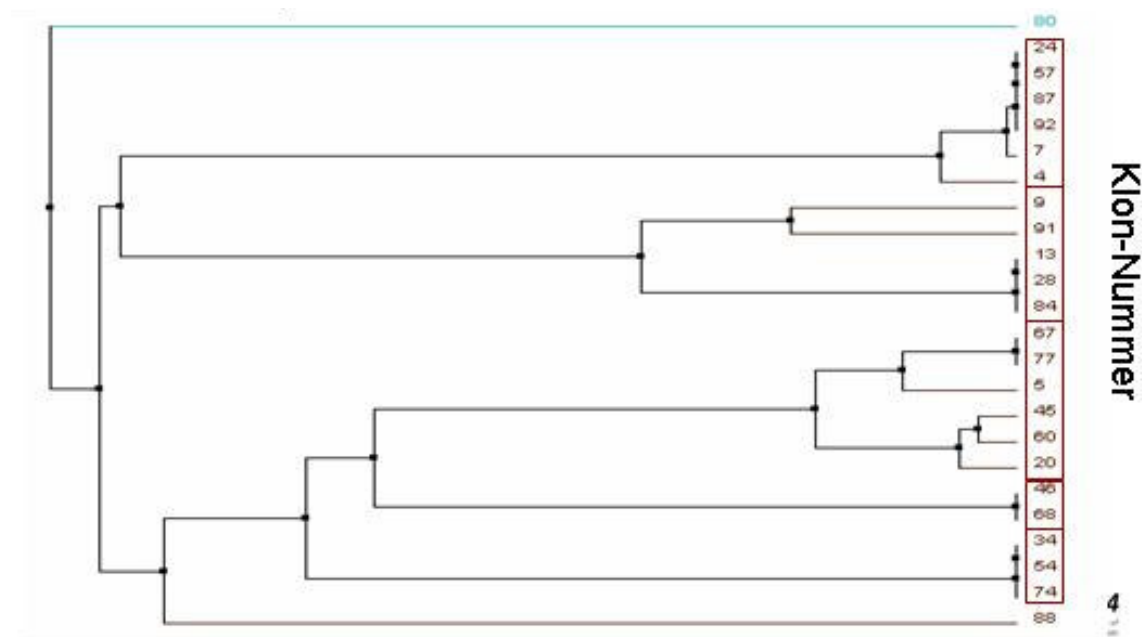


Abb. 30 Sequenzfamilienbaum der 24 generierten Aptamere

Anhand der Verwandtschaftsverhältnisse identifizierter Sequenzen ließen sich die 24 generierten Aptamere in 5 Sequenzfamilien einteilen. Aptamer 80 und 88 wiesen von den 5 Sequenzfamilien stark abweichende Sequenzen auf.

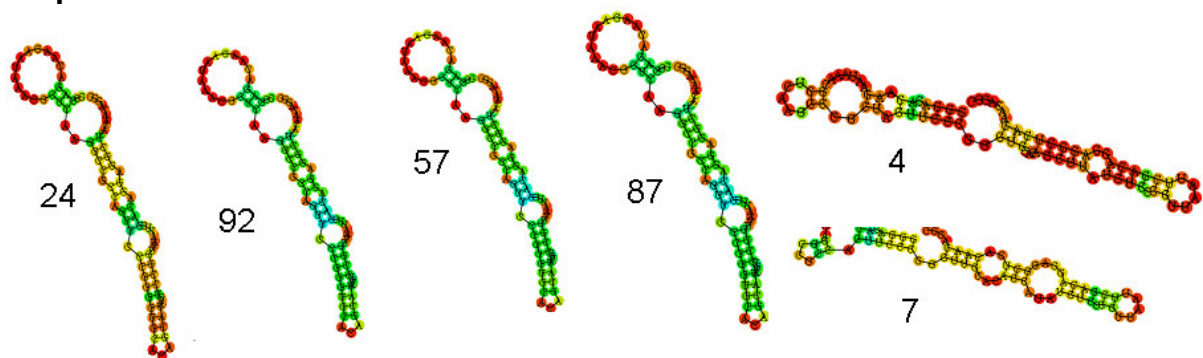
4.2.4 Faltungsmuster der sequenzierten Aptamere

Da Aptamere mittels ihrer dreidimensionalen Sekundärstruktur und nicht mittels ihrer Komplementarität an ihr Target binden, war die Faltung der einzelnen Sequenzen von erheblichem Interesse. Die Faltungsmuster wurden anhand des Software-Programms *RNAfold* ermittelt, wobei diese Berechnung ohne das Target zu kennen relativ ungenau ist. Da die physiologischen Bedingungen in denen Oligonukleotidsequenzen, Proteine, Peptide o.ä vorliegen, eine wichtige Rolle bei der Faltung spielen, ist die Berechnung durch die Software nur die am wahrscheinlichsten auftretende Faltung. Eine genauere Aussage darüber kann erst getroffen werden, wenn das Target des Aptamers identifiziert ist und weitere

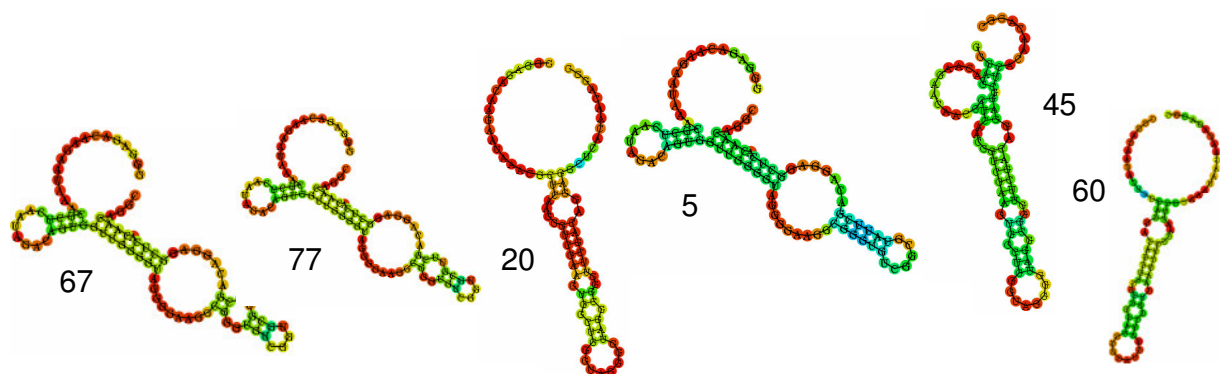
4 Ergebnisse

Parameter mit aufwändigeren Programmen festgelegt werden können. Da jedoch der Fehler bei allen Sequenzen der gleiche war, wurde die Faltungsanalyse in diesem etwas ungenaueren Rahmen durchgeführt. Hierbei wurde ersichtlich, dass die einzelnen Sequenzfamilien auch eine ähnliche Faltungsstruktur aufwiesen (Abb. 31). Dieses bestätigte die Sequenzfamilienanalyse mithilfe der *ClustalW2*-Software. Während Sequenzfamilie 1 eine eher haarnadelförmige Strukturen mit kleineren Loops aufwies, zeigten sich bei der Sequenzfamilie 2 größere Loops (mit Ausnahme von Klon 45) und bei drei Sequenzen eine sehr ähnliche Struktur (Klon 5, 67, 77). Innerhalb der Sequenzfamilie 3 verhielt es sich ähnlich - Klon 13, 28, 84 hatten eine ähnliche haarnadelartige Struktur, wohingegen Klon 9 und 91 völlig andere Muster aufzeigten. Da es sich bei Sequenzfamilie 4 um exakt die gleichen Sequenzen handelte, waren die Berechnungen für die Faltung identisch. Sequenzfamilie 5 (Klon 46, 68) zeigte ebenfalls das gleiche Faltungsmuster, obwohl die Sequenzen nicht identisch sind und die von jeglicher Familie unabhängigen Aptamere wiesen wie vermutet, ein abweichendes Muster auf.

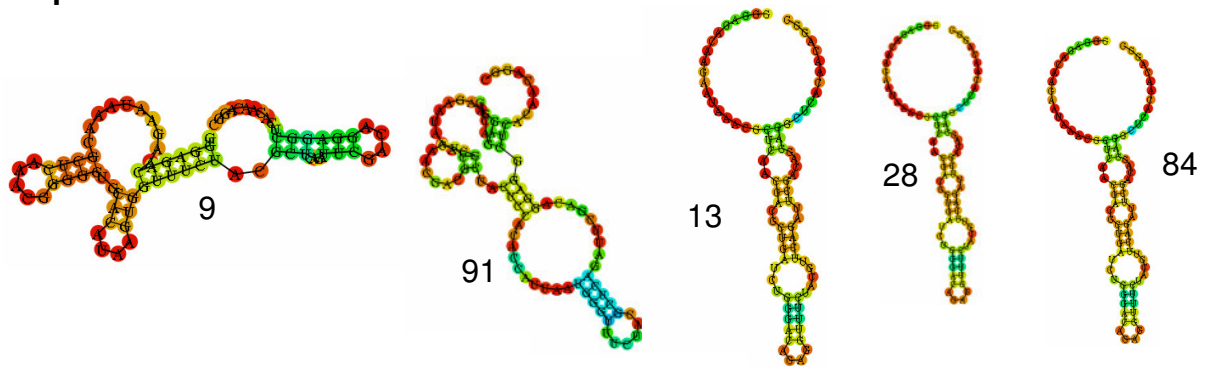
Sequenzfamilie 1



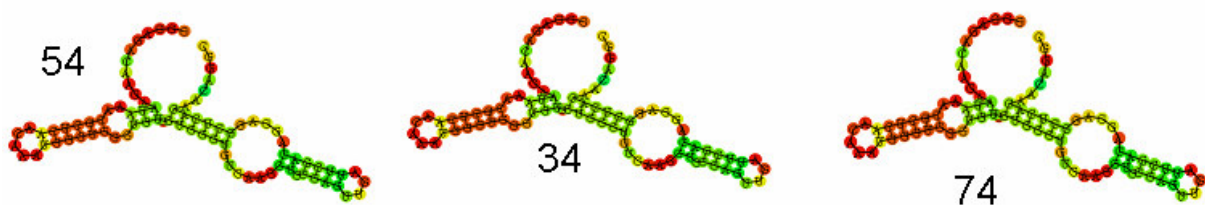
Sequenzfamilie 2



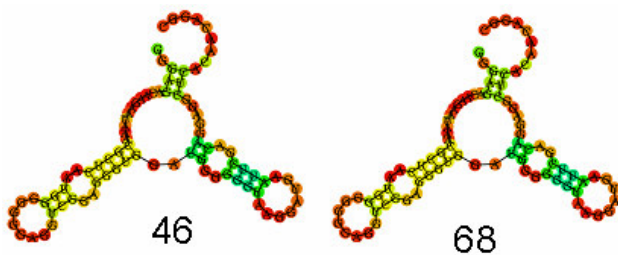
Sequenzfamilie 3



Sequenzfamilie 4



Sequenzfamilie 5



unabhängige Aptamere

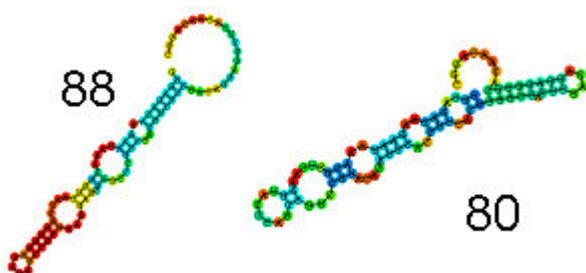


Abb. 31 Sequenzfamilien der 24 generierten Aptamere und deren Faltungsmuster, ermittelt mithilfe des Software-Programms *RNA-Fold*.

23 der sequenzierten Aptamere wurden für weitere FACS-Analysen mit FITC gelabelt synthetisiert und mit undifferenzierten humanen Kieferperiozyten inkubiert. Die Bindungsaffinitäten der einzelnen Aptamere wurden dann durchflusszytometrisch abzüglich der Startbibliothek ermittelt (Abb. 32). Hierbei wurde deutlich, dass unter allen sequenzierten Aptameren und den daraus resultierenden Sequenzfamilien die

4 Ergebnisse

Sequenzfamilie 4 mit den drei identischen Klonen die höchste Bindungsaffinität zu den JPCs aufwies (donorabhängig zwischen 29 und 32% Bindung). Da dieses sich somit von den anderen generierten und analysierten Aptameren abhob wurde dieses mit der Klonnummer 74 (Aptamer 74) für alle weiteren Untersuchungen verwendet. Sequenzfamilie 5 weist im Gegensatz zu den anderen beschriebenen Sequenzfamilien ebenfalls eine höhere Bindungsaffinität zu den JPCs auf (Klon 46: 15,14%, Klon 68: 8,57%), jedoch besteht ein deutlicher Unterschied zu der Bindungsaffinität des Klons 74 (32,2%).

Klonnummer	% positiver Counts	Sequenzfamilie
24	0,69	1
92	0	
57	1,37	
87	0	
4	2,68	
7	3,15	
67	0,93	2
77	6,64	
5	2,7	
45	0,99	
60	2,71	
9	0	3
91	0,23	
13	0,27	
28	0	
24	0,69	
34	29,31	4
54	30,17	
74	32,2	
46	15,14	5
68	8,57	
80	0	Unabhängig
88	0	unabhängig

Abb. 32 Prozentzahl positiver Counts der verschiedenen Aptamere in Bezug auf ihre Sequenzfamilien.

4.2.4.1 Bindungsassays des Aptamers 74 an adipogen-, chondrogen und osteogen andifferenzierte JPCs

Durch die Selexprozedur sollen Aptamere generiert werden, die möglichst an osteogene Progenitorzellen aus dem Gesamtzellverbund des Periosts binden, um damit einen neuen osteogenen Marker zu identifizieren und um die osteogenen

Progenitoren für eine Trägermatrixbesiedlung aus dem Gesamtzellverband selektieren zu können.

Um zu untersuchen, ob das generierte Aptamer vermehrt an osteogen vorinduzierte Zellen binden kann, wurden Bindungsassays mit Zellen durchgeführt, die über 5 Tage osteogen andifferenziert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden. Hierbei wurde ersichtlich, dass die Zellen die mit Kontrollmedium behandelt wurden eine deutlich geringere bis keine Bindungsaffinität aufwiesen (0-10 % positive Counts), wohingegen die osteogen vorinduzierten Zellen je nach Patient eine deutlich höhere Bindung (donorabhängig zwischen 8% und 35%) zum Aptamer 74 zeigten. Wurden die Zellen hingegen adipogen oder chondrogen andifferenziert, konnte lediglich eine geringere Nettobindung (abzüglich der Isotypenkontrolle) von 0-3 % je nach Donorgewebe erzielt werden.

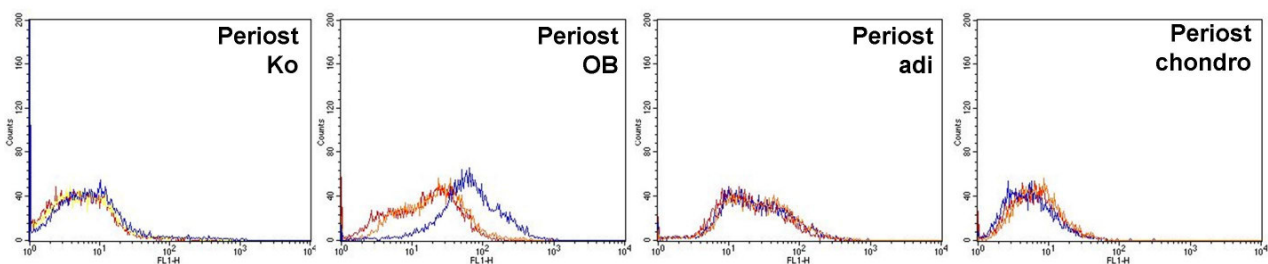


Abb. 33 Durchflusszytometrische Bindungsanalysen des Aptamer 74 an humane Kieferperiostzellen nach 5-tägiger osteogener, adipogener und chondrogener Andifferenzierung

Rot: ungelabelte Kontrolle JPCs, gelb: Isotypenkontrolle gelabelte JPCs (Startbibliothek), blau: Aptamer 74 gelabelte JPCs.

4.2.4.2 Bindungsassay des Aptamer 74 an JPCs verschiedener Patienten

Die Aptamergenerierung bzw. die gesamte Selex-Prozedur wurde zunächst nur mit den Zellen eines Patienten durchgeführt. Da das Aptamer jedoch patientenunabhängig an ein noch unbekanntes Kieferperiostzelltarget binden soll, wurde die Bindungsaffinität des Aptamers 74 an die Kieferperiostzellen verschiedener Patienten getestet. Dabei wurde festgestellt, dass die Bindungsaffinität bei den verschiedenen Donoren stark variierte (Abb. 34). Dies war unabhängig davon, ob es sich dabei um kalzifizierende (Zellen, die sich *in vitro* osteogen differenzieren lassen) oder nicht-kalzifizierende (Zellen, die sich *in vitro* nicht osteogen differenzieren lassen) Patientenzellen handelte. Demnach zeigte sich

4 Ergebnisse

keine Tendenz, dass das Aptamer 74 bevorzugt an die JPCs kalzifizierender bzw. an nicht-kalzifizierender Donoren bindet.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei dem gebundenen Target zwar um ein Osteogenese-assoziiertes Antigen handelt, das jedoch nicht direkt das Mineralisierungspotential der JPC- Zellen beeinflusst, da es ebenso an *in vitro* nicht-kalzifizierende JPCs verschiedener Patienten binden kann.

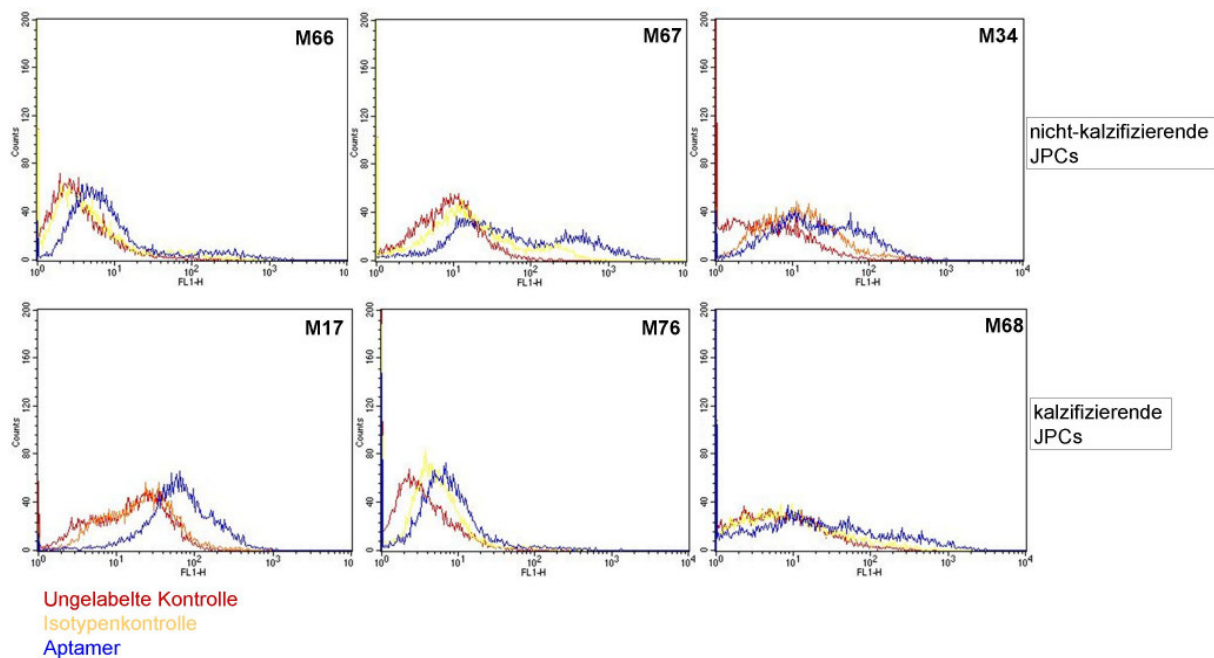


Abb. 34 Durchflusszytometrische Bindungsanalysen des Aptamers 74 an Zellen verschiedener Donoren.

Nicht kalzifizierende Patienten: Patienten, die *in vitro* nicht das Potential aufweisen, Kalziumpräzipitate zu bilden; kalzifizierende Patienten: Donoren, die dazu befähigt waren, *in vitro* zu mineralisieren.

Rot: ungelabelte Kontroll JPCs, gelb: Isotypenkontrolle gelabelte JPCs (Startbibliothek), blau: Aptamer 74 gelabelte JPCs.

4.2.4.3 Bindungsassays des Aptamers 74 an verschiedene MSC-Typen

Im folgendem wurde getestet, ob das Aptamer 74 sich als Marker für Stammzellen eignet. Dafür wurde die Bindungsaffinität an mehrere Stammzelltypen wie Plazenta, Knochenmark und Periost untersucht. Als Kontrolle für ausdifferenzierte Zellen die nicht in der Lage sind osteogen zu differenzieren, wurden Prostata-Fibroblasten verwendet. Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden wiederum unbehandelte Zellen im Vergleich zu osteogen vorinduzierten Zellen analysiert. Das durchflusszytometrische Histogramm der Knochenmarkstammzellen zeigte ein ähnliches Muster wie das der humanen Kieferperiostzellen. Die unbehandelten

Zellen zeigten eine nur sehr schwache Bindungsaffinität (0-2 %), wohingegen die osteogen vorinduzierten Zellen einen deutlichen Shift aufwiesen (10-25 %), was jedoch stark donorenabhängig war.

Humane mesenchymale Plazentastammzellen der maternalen Fraktion wiesen ebenfalls eine donorenabhängige Bindung zwischen 8 und 14% auf. Auch hier deutete sich erneut bei den unbehandelten Zellen keine Bindungsaffinität an, sondern nur bei osteogen vorinduzierten Plazentastammzellen. Fibroblasten zeigten weder im Normalmedium noch im osteogenen Differenzierungsmedium eine Bindung.

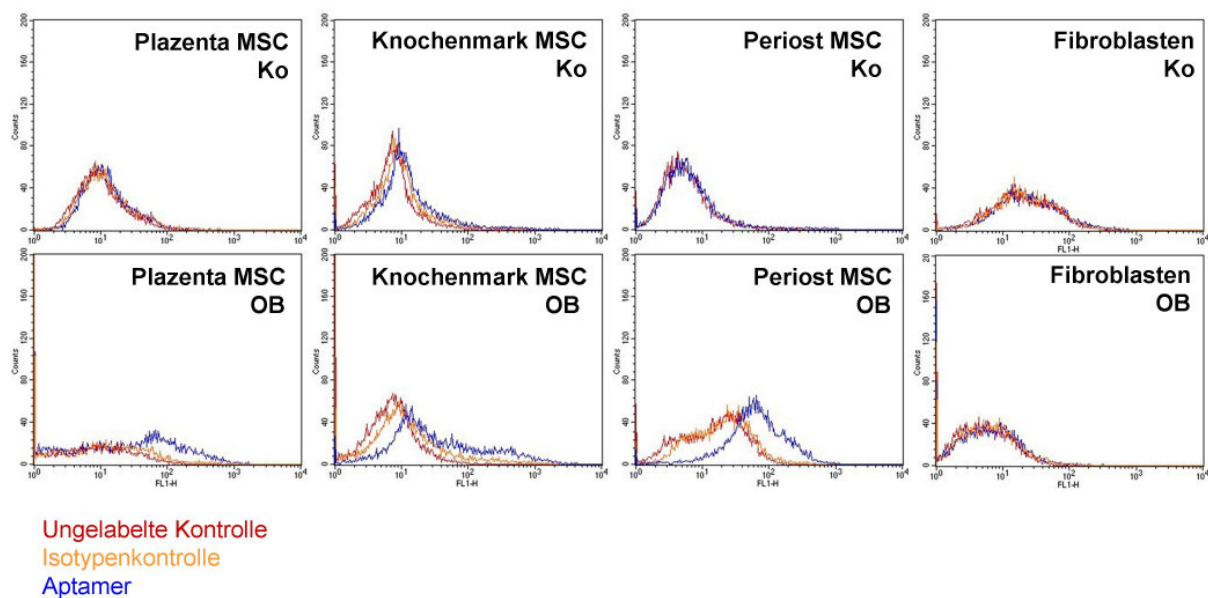


Abb. 35 Durchflusszytometrische Analysen des Aptamers 74 an verschiedene humane mesenchymale Stammzelltypen und Fibroblasten im differenzierten und undifferenzierten Zellstatus.

Rot: ungelabelte Kontroll JPCs, gelb: Isotypenkontrolle gelabelte Zellen (Startbibliothek), blau: Aptamer 74 gelabelte Zellen

4.2.4.4 Bindungsassays des Aptamers 74 an verschiedene Zelltypen

Zur Verifizierung des Ergebnisses, dass das Aptamer 74 an humane MSCs und nicht an andere Zelltypen bindet, wurde die Bindungsaffinität an verschiedene Zelllinien und Primärzellen getestet (Abb. 36 und Abb. 37).

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits beschrieben, wiesen humane Prostata-Fibroblasten keine Bindungsaffinität zum Aptamer 74 auf, die Bindungsaffinität betrug je nach Patient 0 - 1,5% (n=3).

4 Ergebnisse

Des Weiteren wurden verschiedene Zelltypen und Zelllinien getestet:

- EaHy (humane Endothelzelllinie),
- SK-MES (humane Lungenzellkarzinomzelllinie),
- A594 (humane Lungenzellkarzinomzelllinie),
- MG 63 (humane Osteoblastenzelllinie)
- Cal 72 (humane Osteoblastenzelllinie)
- BICR (humane Plattenepithelkarzinomzelllinie)
- Humane, primäre Endothelzellen,
- Humane, primäre Endothelzellen aus der Nabelschnur
- PBMC (mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut).

Hierbei wurde ersichtlich, dass das Aptamer an keinen der getesteten Zelllinien eine Bindungsaffinität aufzeigt. Die Bindungsaffinitäten bewegten sich zwischen 0 und 0,8%. Die negative Gegenselektion bei der Selexprozedur wurde mit der humanen Plattenepithelkarzinomzelllinie BICR und mit den humanen PBMCs durchgeführt, daher war zu erwarten, dass zumindest an diese Zelltypen keine starke Affinität nachzuweisen ist.

Zelltyp	% positiver Counts
SK-MES	0,2
A594	0,25
BICR	0,73
EAHy	0,5
MG 63	0,1
Cal 72	0,5
Humane primäre Endothelzellen aus der Nabelschnur	0,3
Humane primäre Endothelzellen	0,1
Humane primäre Prostata-Fibroblasten	0,7
Humane PBMC	0,8

Abb. 36 Übersicht der durchflusszytometrischen Analysen über die Bindungsaffinitäten des Aptamers 74 an verschiedene Zelltypen

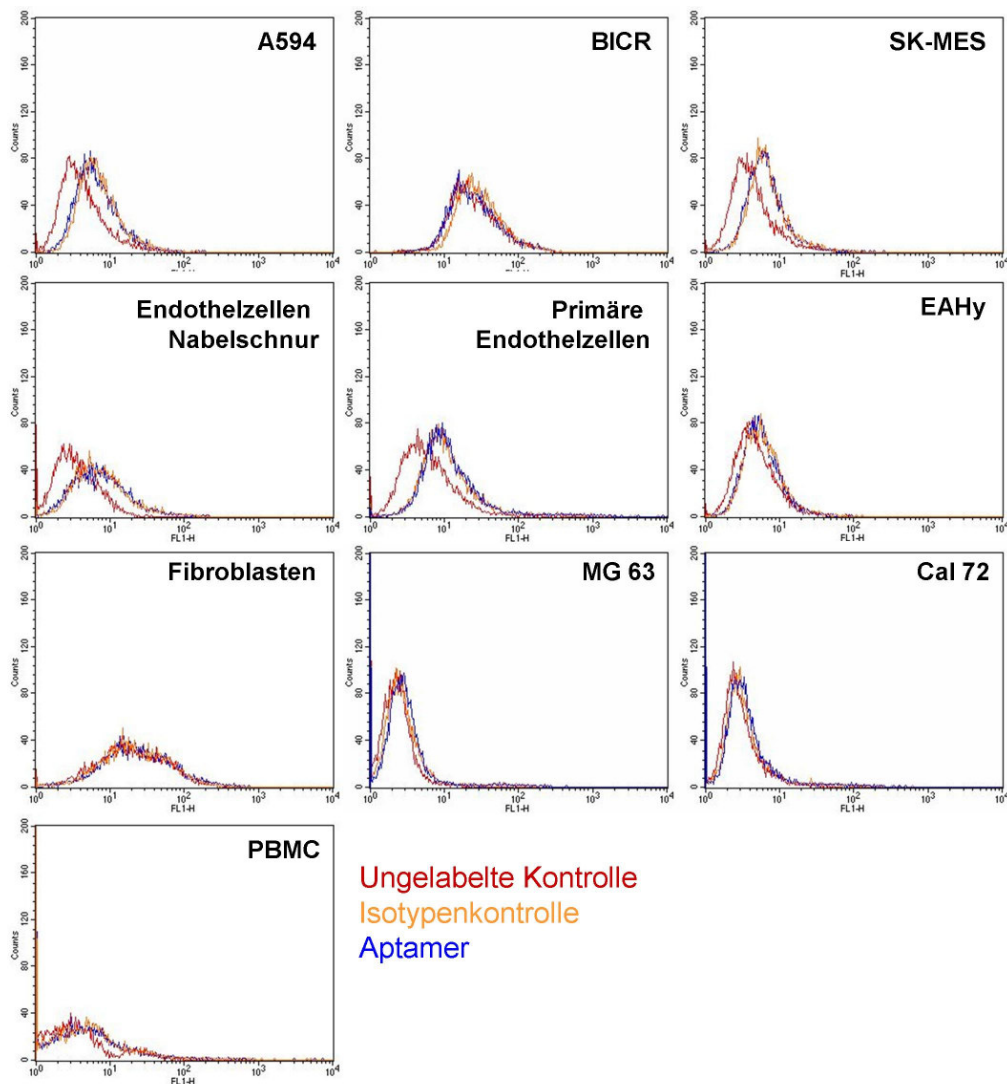


Abb. 37 Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen über die Bindungsaffinitäten des Aptamers 74 an verschiedene Zelltypen

4.2.5 Live Monitoring der JPC Proliferation auf oligonukleotidbeschichteten versus unbeschichteten *E-Plates*

Im Folgenden wurde die JPC Zellproliferation in Abhängigkeit des Aptamers 74 über einen Zeitraum von 42 Std. auf unbeschichteten-, Bibliothek- und Aptamerbeschichteten *E-Plates* mithilfe des *xCelligence* Gerätes ermittelt. Bereits nach 3 h wurden Unterschiede bezüglich des Adhäsionsverhaltens der JPCs deutlich. Die JPC Adhäsions- bzw. Proliferationskurven verliefen bei allen drei analysierten Patienten in unbeschichteten Platten deutlich unter den Kurven der Aptamer- bzw. Bibliothekbeschichteten Platten (Abb. 38 A, B, C). Die Unterschiede im Kurvenverlauf zwischen der Aptamer- und Bibliothekbeschichtung waren sichtbar, jedoch nicht so

4 Ergebnisse

gravierend wie die Unterschiede zu den unbeschichteten Kontrollen. Diese Tendenz blieb selbst über einen Zeitraum von 13 Tagen (Abb. 38D) gleich – die JPCs der drei analysierten Patienten proliferierten in den beschichteten Platten schneller als in den unbeschichteten Kontroll-*E-Plates*.

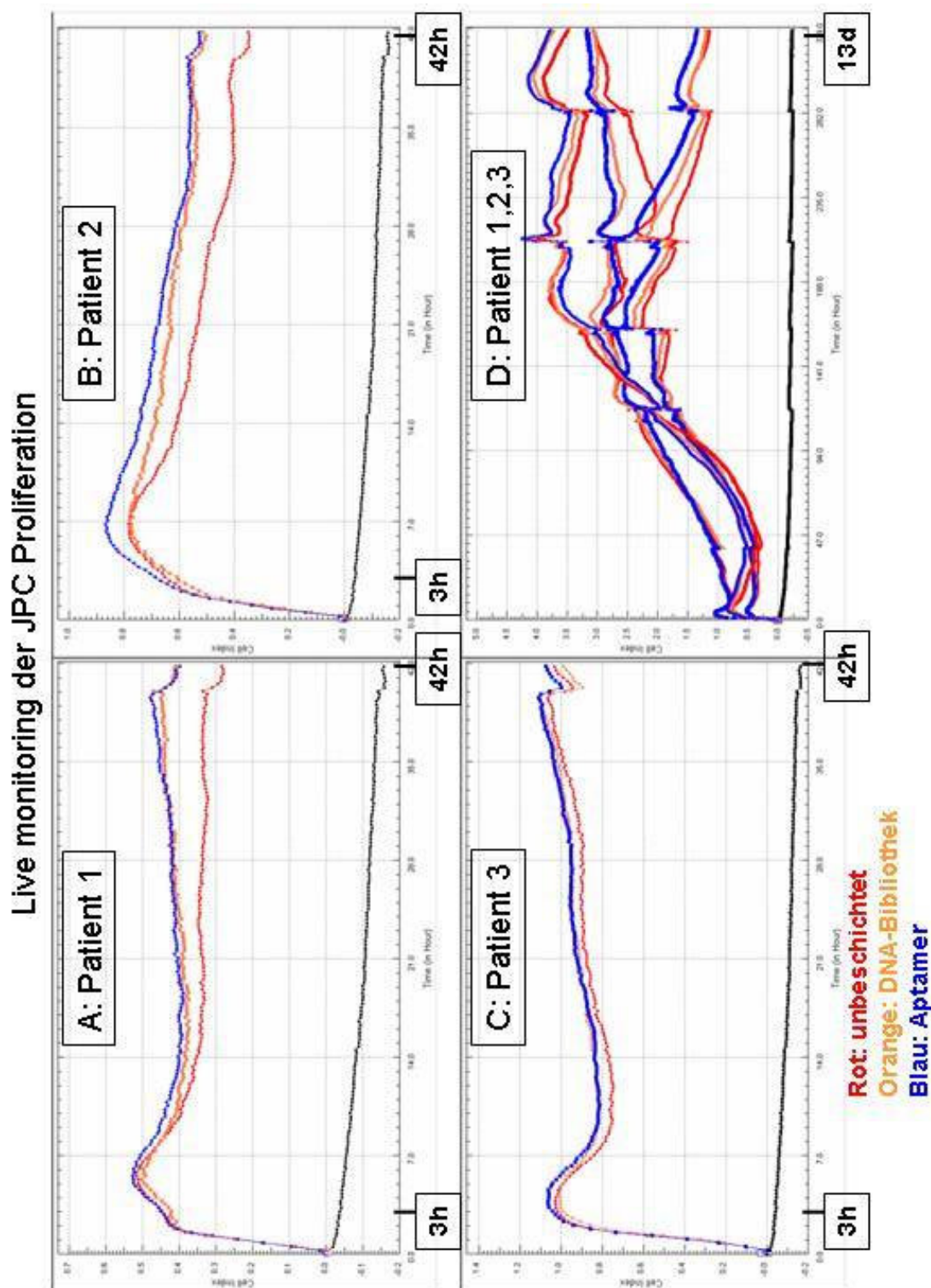


Abb. 38 Live Monitoring der JPC Proliferation auf beschichteten und unbeschichteten E-Plates
 Die *E-Plates* wurden mit DNA-Bibliothek und Aptamer beschichtet und das Proliferationsverhalten der JPCs im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle ermittelt. A, B, C zeigen das Adhäsionsverhalten drei verschiedener Patienten in den ersten 48 Stunden, D zeigt die Proliferationskurven aller Patienten über 13 Tage. Rot: unbeschichtete Kontrolle, orange: DNA-Bibliothek, blau: Aptamer 74.

4 Ergebnisse

4.2.6 Untersuchungen der Aptamer 74-sortierten Zellfraktionen

Um Unterschiede zwischen der Aptamer 74-positiven und der Aptamer 74-negativen Fraktion herauszufinden, wurden die Zellen von drei Patienten mittels Durchflusszytometrie separiert.

Da die Vitalität der Zellen nach der Zellsortierung durch den Färbeprozess bzw. durch die während des Sortiervorgangs einwirkenden Scherkräfte relativ schlecht ist, wurde ein Live Monitoring der Proliferation der Aptamer 74 sortierten Zellfraktionen mithilfe des *xCelligence* Geräts (Roche) über einen Zeitraum von 4 Wochen durchgeführt (Abb. 39). Die negative Fraktion zeigte bereits nach 5 Tagen einen leichten Wachstumsanstieg, wohingegen die positive Fraktion bei allen drei getesteten Patienten 10 Tage brauchte bis eine deutliche Proliferation sichtbar war. Das Wachstumsverhalten beider Fraktionen näherte sich allerdings nach 30 Tagen einander an.

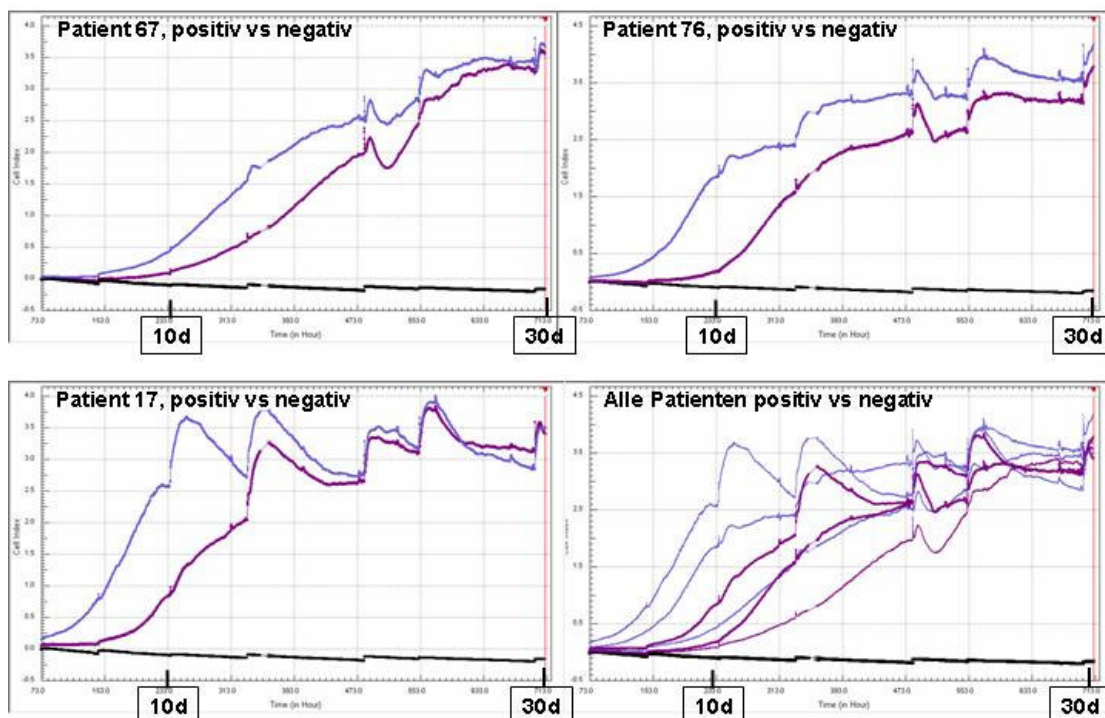


Abb. 39 Live Monitoring der Proliferation der Aptamer 74-positiven versus der Aptamer 74-negativen JPC Fraktionen über einen Zeitraum von 4 Wochen.

Lila: Aptamer 74-negative Fraktion, magenta: Aptamer 74-positive Fraktion, schwarz: Mediumkontrolle

Für die Analyse des Mineralisierungspotentials wurden nur stark Aptamer-positive Zellen gegatet und für die Zellsortierung verwendet, weswegen die Zellausbeuten

sehr gering waren. Jedoch konnten sowohl von der positiven als auch von der negativen Fraktion eines kalzifizierenden Patienten ausreichend Zellen in 6-Well Platten für die Alizarinfärbung ausgesät werden (Abb. 40A). Bezüglich der Quantität der gebildeten Kalziumphosphatpräzipitate konnten nach einem Differenzierungszeitraum von 30 Tagen keine Unterschiede festgestellt werden. Sowohl die Aptamer 74-positive als auch die Aptamer 74-negative Zellfraktion zeigte deutlich sichtbare Präzipitate. Nach der Quantifizierung der Kalziumphosphatpräzipitate ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Fraktionen (Abb. 40B). Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, dass das Aptamer an ein Target bindet, das das Kalzifizierungspotential der JPCs nicht beeinflusst.

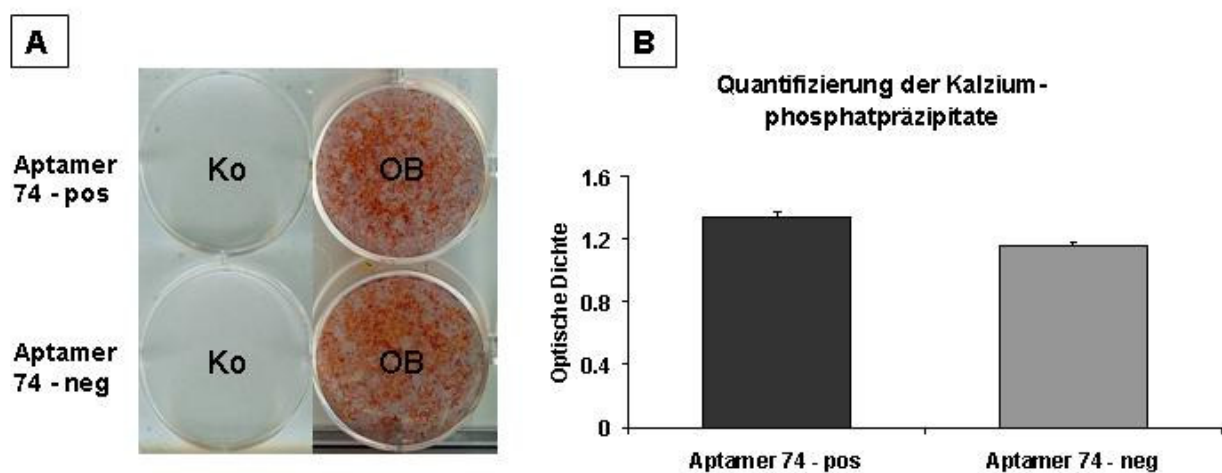


Abb. 40 Alizarinfärbung zum Nachweis der Kalziumphosphatpräzipitate in Aptamer 74-sortierten positiven und negativen Fraktionen nach 30 Tagen osteogener Differenzierung

A: Repräsentative Alizarinfärbung der Aptamer 74-sortierten und differenzierten Zellen (Ko-unbehandelt, OB – osteogene Differenzierung)

B: Quantifizierung der gebildeten Kalziumphosphatpräzipitate in den Aptamer 74-sortierten Zellen

Des Weiteren wurde die Genexpression einiger Osteogenese-assoziierten Gene wie AP, Koll 1 alpha, Runx-2, IGF2, Lama2, BMP4, BMP6, Comp und Twist analysiert (Abb. 41). Die Genexpression der Aptamer 74-negativen Fraktion wurde als Kontrolle auf eins gesetzt und die Genexpression der Aptamer 74-positiven Fraktion als Induktionsfaktor zu dieser ausgedrückt. Die Expression von Kollagen 1 alpha 1 ($2,05 \pm 1,0$) sowie von Runx-2 ($2,34 \pm 1,69$) zeigte eine leichte Induktion beim Vergleich der positiven im Vergleich zur negativen Fraktion, die jedoch nicht signifikant war. Bei AP, IGF2, Lama2, BMP4, BMP6, Comp und Twist wurden keine relevanten

4 Ergebnisse

Induktionen detektiert, die Aptamer 74-positive Fraktion als auch die Aptamer 74-negative Fraktion deuteten relativ ähnliche Genexpressionsmuster an.

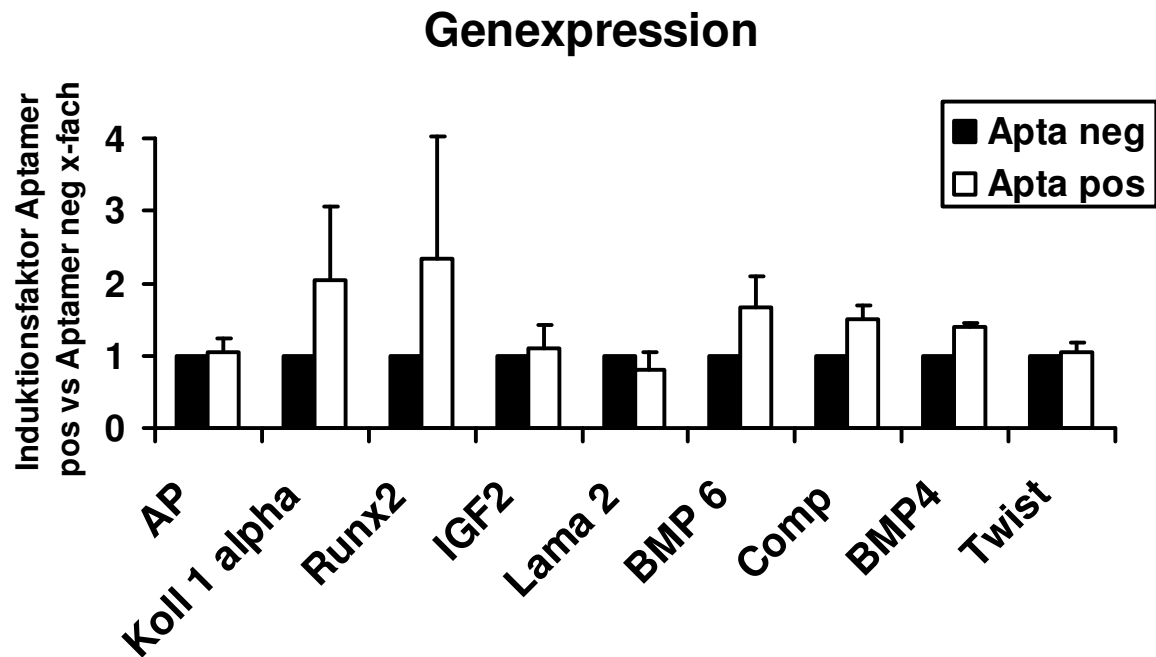


Abb. 41 Genexpression der Aptamer 74-positiven versus den Aptamer 74-negativen Zellen
Dargestellt wurde der Induktionsfaktor der positiven versus der negativen Zellfraktion.

5 Diskussion

5.1 Beschichtung der OPLA Trägermatrizen mit RGD Peptiden

In der vorliegenden Studie wurden Polylaktid-Trägermatrizen, die sich in früheren Studien als adäquates Trägermaterial für humane Kieferperiostzellen erwiesen haben [67], mit RGD Peptiden biofunktionalisiert. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die hierbei entwickelte Immobilisierungsmethode für die RGD Peptide über einen Poly-L-Lysin-Platzhalter (PLL-Spacer) die Adhäsion, Proliferation und osteogene Differenzierung der humanen Kieferperiostzellen stimulierte und sich dadurch als osteoinduktives Verfahren erwies.

RGD Peptide können im allgemeinen für viele verschiedene Applikationen verwendet werden, wie z. B. Tumortargeting [68], Inhibierung von Prozessen wie Apoptose, Angiogenese und Tumorbildung [69], Imaging für diagnostische Zwecke und der Verstärkung von dirigierter Medikamentenüberlieferung *in situ* [70].

Pierschbacher et al. publizierten nach der Entdeckung der RGD-Domäne, dass die flankierenden Sequenzen für die Konformation der Peptide verantwortlich sind und daher ihre Spezifität festlegen [71]. Sie sind sogar dazu in der Lage, die RGD-abhängige Aktivität aufzuheben. Darüber hinaus ist publiziert worden, dass die Zellproliferationsraten 100fach geringer sind, wenn die RGD-Domäne aus dem ganzen Fibronectinprotein herausgenommen wird [30].

In der vorliegenden Studie wurde das lineare Peptid GRGDS, welches eine Bindungsdomäne des Fibronectin Proteins darstellt, und das zyklische Peptid RGDfK verwendet, da beide Peptide in Zusammenhang mit einer Verstärkung der Osteogenese in der Literatur beschrieben worden sind [37], [72]. Zusätzlich war ein sehr interessanter Aspekt, ob die über den PLL Spacer immobilisierte Peptidmenge die Zelladhäsion, Proliferation und osteogene Differenzierung beeinflusst [73].

Die Aminosäureanalyse zeigte, dass durchschnittlich 45 nm Peptid (zyklisch, PLL und PLL + linear) pro Trägermatrix immobilisiert werden konnte, was 60 nmol/cm² entsprechen. Eine maximale Menge an Peptid von 87±8 nmol/Scaffold (116 nmol/cm²) konnte nur mit dem Peptid GRGDS erreicht werden. In der Literatur wurde postuliert, dass 10 fmol/cm² in zweidimensionaler Kultivierung der Zellen ausreichen, um die Zelladhäsion zu verstärken [74], daher ist mit 60 nmol ein 6 x 10⁶ facher Überschuss an der minimalen, benötigten Peptidmenge gegeben, der sich positiv auf

5 Diskussion

die Zelladhäsion-, Proliferation und Differenzierung herausstellte. Für Tissue Engineering-Zwecke wurde üblicherweise eine 100 μ M Peptidlösung für Immobilisierungsverfahren verwendet [30,66]. Da die besten Ergebnisse bezüglich Proliferation, Adhäsion und osteogener Differenzierung mit den PLL+linear beschichteten Konstrukten erzielt wurden obwohl diese nicht die höchste Immobilisierungseffizienz gezeigt hatten, wurde daraus geschlossen, dass ein Spacer für ungestörte RGD-Zell-Interaktion benötigt wird, wie er durch Hern et al. an Vorhautfibroblasten ebenfalls eingesetzt wurde [73]. Im Gegensatz zu den 2D Adhäsions- und Proliferationsassays zeigten die mit zyklischem Peptid beschichteten Konstrukte in 3D Kultur nur eine sehr schwache Adhäsion (Abb. 13) und Proliferation (Abb. 15). Diese Resultate weichen von bereits publizierten Studien mit Osteoblasten und humanen embryonalen Stammzellen [41], [75], [76] ab. Wir nehmen an, dass die initial schwache Adhäsionskapazität der JPCs kultiviert auf Trägermatrizen, die mit zyklischem Peptid beschichtet wurden, eine Folge der mangelnden ITGAV Expression und einer nur partiellen Expression von ITGB3 in undifferenzierten 2D kultivierten JPCs ist (Abb. 17). In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die Zelladhäsion an zyklischen RGD Peptide ITGAV/ITGB3 abhängig ist. Kantlehner et al. zeigten, dass Osteoblasten diese Integrine exprimierten und dadurch in der Lage waren, an zyklische RGD Peptid-beschichteten Oberflächen zu binden, was erhöhte Adhäsions- und Proliferationsraten zur Folge hatte [72]. Im Gegensatz dazu war die M21L Melanomzelllinie, die diese Integrine nicht exprimierten, nicht in der Lage, auf zyklisch RGD beschichteten Oberflächen zu adhären [77]. Schaffner et al. postulierten, dass die Bindungskapazität eines Zelltyps an eine RGD Sequenz von den Integrinen, die von dieser Zelle exprimiert werden, abhängig ist. Unsere Daten bestätigen diese Ergebnisse, da wir zeigen konnten, dass eine nur sehr schwache Zelladhäsion auf den zyklisch-beschichteten Konstrukten sichtbar war, wenn ein ITGAV/ITGB5 neutralisierender Antikörper verwendet wurde. Jedoch erklärt diese Hypothese nicht, warum die JPCs an die linear beschichteten Trägermatrizen adhären konnten, die auch partiell von diesen Integrinen abhängig sind. Vermutlich spielten andere Faktoren im dreidimensionalen Milieu wie z. B. die Porösität, die Oberflächenrauigkeit und Konsistenz der Matrix eine Rolle [78]. Da wir keine Vorteile für die Adhäsion und Proliferation der JPC in Bezug auf die zyklischen Peptide detektieren konnten, wurden diese in weiteren Analysen nicht miteinbezogen. Bisher wurden Proliferationsuntersuchungen auf unbeschichteten

bzw. beschichteten Konstrukten oder Kulturplatten allerdings lediglich als Endpunkt-Messungen durchgeführt, die durch Echtzeit-Beobachtungen (Live-monitoring) ergänzt werden sollen, wie es mit den beschichteten Aptamerplatten durchgeführt wurde.

In undifferenziertem, 2D kultivierten Zustand konnten wir eine Proteinexpression von ITGA5, ITGA9, ITGB1, ITGB3 detektieren, nicht jedoch ITGAV und ITGA9. Auf 3D beschichteten Konstrukten zeigten die JPCs eine zum Teil davon abweichende Expression. Alle analysierten Integrine (ITGA5, ITGAV, ITGA9, ITGB3, ITGB5) wurden mit Ausnahme von ITGB1 von den JPCs in 3D-Kultur exprimiert (Abb. 18). Weiterhin konnte eine unterschiedliche Integrinexpression in Abhängigkeit der Matrixbeschichtung detektiert werden, was darauf hindeutet, dass die Adhäsion je nach Substrat ein verändertes Integrinexpressionsmuster der JPCs hervorruft. Durch die Verwendung von neutralisierenden Antikörpern konnten wir demonstrieren, dass die Zelladhäsion hauptsächlich über ITGB3 und teilweise über ITGAV/ITGB5 vermittelt wird, wohingegen die Blockierung von ITGA9 keinen Effekt auf die adhärenzte Zellzahl zeigte. Dieses Erkenntnis war unabhängig vom beschichteten Peptid, wie in Abb. 19 deutlich wurde (zyklisch, PLL + linear und linear).

Maheshwari et al. publizierten, dass Ligandenclustering der RGD Peptide die Zelladhäsion, die Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionspunkten verstärkt [79], [80]. Wir nehmen an, dass das Beschichten über PLL als Spacer die Clusterformation der RGD Peptide auf dem Trägermaterial oder den Polystyrenplatten verstärkt, was zu einer verbesserten Adhäsion, Proliferation und Differenzierung im Vergleich zu den direkt beschichteten Trägermatrizen führte.

Der Vorgang der Knochenformation ist ein sehr komplexer Prozess, der viele verschiedene Schlüsselfaktoren und Signaltransduktionswege miteinbezieht und eine während der Osteogenese sich dauernd ändernde Gen- und Proteinexpression einschließt, die noch weitgehend ungeklärt ist [15]. Entlang dieser Signalwege spielen die alkalische Phosphatase [17] und der Transkriptionsfaktor Runx-2 [18] eine Schlüsselrolle. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit Gene untersucht, die mit der JPC-Osteogenese durch früher durchgeführte Genarrays in Verbindung gebracht wurden. Eines davon ist der Insulin-like growth factor 2 (IGF2), der als Regulator der anabolen Aktivität des Parathyroidhormons beschrieben wird [19] und gleichzeitig ein Aktivator der Zellproliferation und der osteogenen Differenzierung von

5 Diskussion

mesenchymalen Stammzellen ist [20]. Das Gen Amelogenin (Amely) ist bisher im Kontext der Zahnschmelzbildung bekannt, jedoch konnte nun in *in vitro* Studien nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von Amely in Knochenmarkstammzellen gesteigerte Levels an BMP6, BMP2, und VEGFC zur Folge hat und deutet an, dass Amely eine wichtige Schlüsselrolle in der Osteogenese von Stammzellen spielt [81]. Die durchgeführten Genexpressionsanalysen zeigten eine signifikant induzierte AP, Runx-2 und AMELY Expression in indirekt beschichteten Konstrukten. Die weiteren analysierten Gene wie IGF2, COMP, TIMP-4, TWIST1 und COL1A1 zeigten zwar eine Induktion während der JPC-Osteogenese, jedoch wurden diese nicht differentiell in den verschiedenen JPC-besiedelten und beschichteten Konstrukten exprimiert.

Das Mineralisierungspotential der JPCs wurde sowohl auf 2D-Ebene mittels Alizarinfärbung, als auch auf 3D-Ebene, jedoch nur semi-quantitativ, durch Rasterelektronenmikroskopie nachgewiesen. Bei diesen Untersuchungen wurde ersichtlich, dass die höchste Anzahl an Präzipitaten auf indirekt beschichteten Matrizen von den Zellen gebildet wurde. Der Nachweis, dass es sich bei den sichtbaren Knötchen auf der Trägermatrix- und Zellrasenoberfläche um Kalziumphosphatpräzipitate handelte, erfolgte für die 3D-Kultivierung durch energiedispersive Röntgenspektroskopieanalysen. Bei einigen Präzipitaten konnte kein Kalziumphosphat identifiziert werden. Dies kann daran liegen, dass die Untersuchung an Tag 16 der JPC-Osteogenese stattgefunden hat und die eigentliche Mineralisierungsphase erst später beginnt.

Zusammengefasst wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit erstmals der Nachweis für ein mit RGD Peptiden biofunktionalisiertes, osteoinduktives Konstrukt für humane Kieferperiostzellen erbracht. Dafür stellte die indirekte Immobilisierung von linearen RGD Peptiden über einen Poly-L-Lysinspacer ein geeignetes Verfahren für die Oberflächenbeschichtung dar, um die Zelladhäsion, Proliferation und osteogene Differenzierung der JPCs zu verstärken. Weitere Studien werden die *in vivo* Relevanz der entwickelten 3D Konstrukte zeigen müssen.

5.2 Aptamergenerierung gegen humane Kieferperiostzellen

Das Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit bestand darin, ein Fängermolekül gegen humane Kieferperiostzellen zu generieren, das an die osteogene Progenitorsubpopulation aus dem heterogenen Gesamtzellverband bindet. Dieses soll in weiteren Studien auf Trägermatrizen für Anwendungen im Bereich des Knochen-Tissue Engineerings aufgebracht werden, um *in vitro* oder *in vivo* die Vorläuferzellen zu rekrutieren. Eine weitere mögliche Anwendung für das Aptamer ist auch die Depletierung der Gewebsfibroblasten, falls sich das Aptamer als Fibroblasten-spezifisch erweist. Weiterhin stellte sich die Frage, ob das Aptamer als mesenchymaler Stammzellmarker identifiziert werden kann.

Aptamere stellen große Hoffnungsträger bei der Behandlung von akuten und chronischen Krankheiten dar [82]. Sie wurden bereits in verschiedenen Disziplinen wie z.B. der Diagnostik [83], der Therapie [84], als Aufreinigungsmolekül [85] und zur Targetvalidierung [86] mit Erfolg eingesetzt. Von der FDA ist bisher ein Aptamer für die klinische Anwendung zugelassen – Pegaptanib – das ein Inhibitor der okularen Neovaskularisierung darstellt und in der Augenheilkunde bei der altersabhängigen Makula-Degeneration angewendet wird [87, 88]. In der bisher noch sehr jungen Disziplin des Tissue Engineerings ist über den Einsatz von Aptameren noch wenig bekannt und publiziert [82]. Der bisherige Fokus lag bei dem Einsatz für diagnostische und therapeutische Zwecke, vor allem im Bereich des Tumortargetings.

In der Arbeitsgruppe Wendel et al. wurde ein Fänger-Aptamer generiert um MSCs aus dem porcinen Knochenmark zu isolieren [58]. Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde auch ein Aptamer gegen humane Osteosarkomzellen identifiziert, das die Adhäsion der Zellen sowohl auf Polystyrenplatten als auch auf Titan-Implantaten verstärkte [89],[90]. Außerdem wurde ein Aptamer gegen porcine endotheliale Progenitorzellen generiert, mit dem Polymere beschichtet wurden [55].

Weitere Forschungsansätze schliessen die direkte Medikamentenüberlieferung in die Zielzelle *in vivo* mithilfe eines Zell-spezifischen Aptamers, das an Nanopartikeln oder synthetisch-hergestellten Materialien gekoppelt ist, ein. Über die Degradierungskinetik der Matrizen kann das Therapeutikum langsam freigesetzt werden [91]. Ganz aktuell wurde z.B. mit Doxorubicin beladene und Aptamer-beschichtete Silica-Nanopartikel entwickelt, die an CCRF-CEM Zellen (Zelllinie,

5 Diskussion

generiert aus einem Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie) binden und dort das Chemotherapeutikum überliefern [92]. Dies ist nur beispielhaft für viele weitere Ansätze mit verschiedenen Biomaterialien und Aptameren [93].

Aktuell ist ein Aptamer-gekoppelter Stent gegen das $\alpha V\beta 3$ Integrin zum Patent angemeldet, das für eine verbesserte Endothelzelladhäsion an das Implantat sorgen soll. Diese Oberflächenbeschichtung (*Topcoat*) kann auch für andere synthetische Materialien wie z. B. Polylaktide, Polyglycolide usw. verwendet werden (EP000002338537A2, Einreichung vom 29.6.2011) und ist somit nicht nur beschränkt auf den kardiologischen Bereich, sondern wird dadurch in mehreren Bereichen des Tissue Engineerings einsetzbar sein. Dies ist ein interessanter Ansatz, da hiermit ebenfalls Polylaktidmatrizen beschichtet werden können und das $\alpha V\beta 3$ Integrin die Zelladhäsion-, Proliferation und Differenzierung verstärken kann, genau wie die Beschichtung mit RGD Peptiden, deren Signaltransduktion ebenfalls über dieses Integrin läuft. Es ist zwar nicht spezifisch für die humanen Kieferperiostzellen oder MSCs allgemein, kann jedoch die oben genannten Parameter triggern und somit eine adäquate Oberflächenbeschichtung für unsere Anwendung darstellen.

In der vorliegenden Studie wurde aus einem Startbibliothekpool von ca. 10^{15} verschiedenen Nukleotidsequenzen ein Aptamer gefunden, das mit einer höheren Affinität an die humanen Kieferperiostzellen binden konnte. Es wurden 23 Aptamere sequenziert und aus diesem Pool konnte ein Aptamer identifiziert werden, das mit einer Affinität von bis zu 35% an die undifferenzierten JPCs binden konnte. Die anderen Klone, die anhand von Sequenzanalysen in Sequenzfamilien eingeordnet wurden, zeigten nur sehr geringe Affinitäten an die humanen Kieferperiostzellen, wie im Ergebnisteil bereits beschrieben (Kap. 4.2.3.). Das generierte Aptamer 74 wurde aufgrund der höchsten Bindungsaffinität für alle weiteren Analysen verwendet. Die Selexprozedur erfolgte mit den Zellen eines einzigen Patients, weswegen zunächst die Affinität des Aptamers gegen Zellen verschiedener Patienten getestet wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Bindungsaffinität donorabhängig war und die Bindungsaffinitäten zwischen 5 - 32 % betragen.

Um die Proliferation der JPCs in Abhängigkeit der Aptamerbeschichtung zu ermitteln, wurde das Aptamer 74 auf *E-Plates* immobilisiert und das Proliferationsverhalten durch Live-monitoring beobachtet. Im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolle zeigten die Zellen aus den beschichteten Wells eine deutlich stärkere Proliferation. Jedoch proliferierten die Zellen auch auf einer DNA-Bibliotheksbeschichtung schneller als in den unbeschichteten Wells. Diese Beobachtung kann mit einer unspezifischen Interaktion der Zellen mit der immobilisierten DNA und den auf dem Boden der *E-Plates* verlaufenden Goldelektroden erklärt werden.

In weiteren Untersuchungen wurden die JPCs fünf Tage in die osteogene, chondrogene und adipogene Richtung andifferenziert und die Bindungsaffinität des Aptamer 74 an diese Zellen ermittelt – diese durchliefen somit nur die frühe Phase der Osteo-, Chondro- und Adipogenese. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass die Affinität an osteogen andifferenzierte Zellen deutlich höher war als im undifferenzierten, chondrogen- und adipogen-andifferenzierten Zustand.

Das Aptamer 74 band an JPCs unabhängig davon, ob die Zellen des jeweiligen Patients *in vitro* dazu in der Lage waren, Kalziumphosphatpräzipitate zu bilden oder nicht. Dies war ein erstes Indiz dafür, dass das Aptamer 74 an ein Target bindet, das nicht unbedingt für das Mineralisierungspotential der Zellen verantwortlich ist.

Um den Aspekt zu klären, welche Prozesse und Targets bei der Frage bezüglich der *in vitro*- Mineralisierung beteiligt sind, wurden einige Studien durchgeführt. In den Studien aus unserem Labor wurde festgestellt, dass es bei den humanen Kieferperiostzellen Donoren gibt, die ein Mineralisierungspotential *in vitro* aufwiesen, und andere, die *in vitro* nicht in der Lage waren zu kalzifizieren. Was jedoch die Zellen der einen Patientengruppe dazu bewegte, *in vitro* kalzifizieren zu können, blieb zunächst ungeklärt. Eine Charakterisierung der Zellen durch die allgemeingültigen Stammzellmarker nach Dominici et al. [5] wurde durchgeführt und es konnte festgestellt werden, dass alle Zellen unabhängig davon, ob sie *in vitro* kalzifizieren konnten oder nicht, die Minimalkriterien der mesenchymalen Stammzellen erfüllten. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass bei der Aufreinigung der Zellen in der Primärkultur lediglich Fibroblasten isoliert wurden und die Zellen aus diesem Grund kein Kalzifizierungspotential aufzeigten. Im Rahmen dieser Arbeiten konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen der Expression von W8B2 (TNAP), LNGFR und dem *in vitro* osteogenen Differenzierungspotentials

5 Diskussion

nachgewiesen werden [94, 95]. Da nach einer Zellsortierung mit W8B2 eine vermehrte Absonderung von Kalziumphosphatpräzipitaten bei osteogenen Stimuli im Vergleich zu der negativen Fraktion beobachtet werden konnte, ist dieses Protein als Target des Aptamer 74 auszuschließen. Bei der Sortierung der Zellen mit dem Aptamer 74 konnten keine Unterschiede bezüglich des Mineralisierungspotentials zwischen der positiven und der negativen Fraktion beobachtet werden.

Die Tatsache dass das Aptamer 74 vermehrt an osteogen adifferenzierte JPCs binden konnte erschien zunächst im Widerspruch dazu, dass unser Aptamer 74 sowohl an kalzifizierende als auch nicht-kalzifizierende Patientenzellen gleichermaßen binden konnte. Eine Erklärung hierfür ist, dass diese Zellen nur osteogen andifferenziert wurden, und die kalzifizierenden als auch die nicht-kalzifizierenden Zellen der Patienten in der Frühphase der Osteogenese eine ähnliche Gen- als auch Proteinexpression aufwiesen. Daraus schließen wir, dass das Aptamer an frühe Osteogenesefaktoren bindet, die nicht zwangsläufig während der späten Mineralisierungsphase noch präsent sind, wie z. B. die Proteine Osteocalcin und Osteopontin [15].

Anhand durchflusszytometrischer Zell-Sortierungen wurde das *in vitro* Mineralisierungspotential der Aptamer 74-positiven und -negativen Zellpopulation direkt untersucht, wobei hier deutlich wurde, dass die beiden Fraktionen keine signifikanten Unterschiede in der Quantität der synthetisierten Kalziumphosphatpräzipitate aufwiesen. Auch auf Genebene wurden einige osteogene Differenzierungsmarker wie AP, Runx-2, TWIST, Coll1a1 und diverse weitere Osteogenese-assoziierten Markergene in beiden Fraktionen direkt nach der Sortierung analysiert, doch auch hier konnte außer einer Tendenz keine signifikanten Unterschiede der Aptamer-positiven versus der negativen Fraktion festgestellt werden. Dieses Ergebnis unterstreicht ebenfalls, dass es sich dabei nicht um ein Target handelte, das im direkten Zusammenhang mit der *in vitro* Mineralisierung der JPCs stand, sondern es sich um ein Frühphase-Osteogenesemarker handeln muss. Im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurde das Proliferationsverhalten der Zellen nach der durchflusszytometrischen Sortierung mit dem Aptamer 74. Hierbei sollte ermittelt werden, ob beide Fraktionen ähnliche Proliferationsraten zeigten und der Grund für die quantitativ gleiche Kalziumphosphatpräzipitatenmenge keine Proliferationsunterschiede darstellte. Bereits in vorherigen Studien in unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass nach magnetischer Sortierung der JPCs

mithilfe eines spezifischen Antikörpers, die positive Fraktion stets ein langsames Wachstum aufwies (Olbrich et al., Manuskript in Arbeit). Die Untersuchungen ergaben, dass die Aptamer 74-positive Fraktion anfangs eine verzögerte Proliferation aufwies, jedoch die Plateauphase von beiden Fraktionen zur etwa gleichen Zeit erreicht wurde. Aufgrund der Tatsache, dass die gleiche Zelldichte an einem relativ späten Zeitpunkt von beiden Fraktionen erreicht wurde, konnte ein Einfluss der unterschiedlichen Proliferation auf das Mineralisierungspotential nicht ganz ausgeschlossen werden. Die Osteogenese läuft nach einem genau festgelegten Plan ab und beinhaltet drei Phasen: erst tritt eine starke Proliferation der sich differenzierenden Progenitorzellen ein, dann folgt die Phase der extensiven Matrixsynthese, gefolgt von der späten Phase der Mineralisierung. Wenn jedoch die erste Proliferationsphase bereits verlangsamt ist, ist es anzunehmen, dass die Mineralisation ebenfalls verzögert abläuft. Daher kann man von einer Ungenauigkeit der Quantifizierung der Präzipitate ausgehen, da aufgrund der verzögerten Proliferation der Mineralisierungsprozesse der Aptamer 74-positiven Fraktion ebenfalls verzögert sein kann.

Ein sehr interessanter Aspekt war die Frage nach dem Target des Aptamer 74, das vermehrt an osteogen andifferenzierte Zellen binden konnte. Hierfür wurden einige Studien durchgeführt um das Target zu identifizieren. Für diese Identifikation wurde das Aptamer 74 an Streptavidin-beschichtete Dynabeads gekoppelt und zunächst mit dem kompletten Zelllysate der osteogen andifferenzierten JPCs inkubiert, um die Bindung an das Targetprotein zu ermöglichen. Nach dem Ablösen des an die Dynabeads gebundenen Proteins wurde dieses auf ein SDS-Gel aufgetragen und die aufgetrennten Proteine anhand einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Es wurden jene Banden ausgeschnitten, die nicht bei den mitgelaufenen Kontrollen auftauchten und zur massenspektrometrischen Analyse eingeschickt. Die möglichen Targets, die massenspektrometrisch ermittelt wurden, wurden anhand Westernblotting, Fluoreszenzmikroskopie und durchflusszytometrischen Bindungsassays mit dem Aptamer und parallel mit dem Antikörper gegen das eventuelle Targetprotein getestet. Die ersten möglichen Targetproteine haben sich jedoch nach genauerer Untersuchung als nicht richtig herausgestellt. Bei allen angewendeten Methoden konnte keine Kolo-kalisation des möglichen Targetproteins und Aptamers festgestellt werden. Darüber hinaus konnte beim Vergleich der Aptamer 74-positiven und der

5 Diskussion

Aptamer 74 negativen Fraktion keine höhere Genexpression des Targets beobachtet werden.

Der für Anwendungen im Bereich Tissue Engineering interessanteste Bindungslokus für das Aptamer ist die Zellmembran. Bislang ist jedoch noch unbekannt, ob das Aptamer 74 in die Zellen hineintransportiert wird, wie bei anderen Aptameren im Bereich der Medikamentendirektionierung über die Oligonukleotide beschrieben ist [96]. Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen eine Analyse der Zellkompartimentierung durchgeführt, bei der zunächst die membranösen, zytosolischen, nukleären und zytoskelettalen Proteine voneinander getrennt wurden, um herauszufinden in welcher Fraktion das Aptamer nach Inkubation im vitalen Zellzustand an verschiedenen Zeitpunkten zu finden ist, was uns jedoch nicht gelungen ist. Diese Proben wurden außerdem anhand eines Silbergels aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Es konnten erneut ca. 100 verschiedene Proteine identifiziert werden, allerdings ergaben die bisherigen Analysen noch keine hinreichenden Ergebnisse, um bezüglich des Targets eine Aussage treffen zu können. Die Targetidentifizierung im Allgemeinen erwies sich als sehr schwierig, denn der Proteinnachweis durch Westernblotting ist bisher mit Aptameren bis auf die Immobilisierung an Quantum Dots zur Proteindetektion noch nicht etabliert [97] und die massenspektrometrisch ermittelte Liste der potentiellen Kandidaten zu groß, um alle in der Bande identifizierten Proteine mit dem Aptamer zu ko-lokalisieren. Bei den meisten publizierten Aptameren gegen lebende Zellen ist bisher kein genaues Target bekannt, sondern es kann nur postuliert werden, dass sie an eine bestimmte Zelllinie binden, während diese an andere Zelltypen nicht binden [98-100]. Bei der Protein-SELEX hingegen kann das genaue Target festgelegt werden, da das Aptamer direkt gegen das synthetisierte Protein generiert wurde. Eine Möglichkeit wie bei der Zell-SELEX die Aptamer-Bindung an bestimmte, gewünschte Proteine geringfügig gesteuert werden kann, ist die Überexpression eines bestimmten Proteins, Rezeptors o.ä. in den Zellen, gegen die die Selexprozedur durchgeführt wird [101, 102]. Die negative Gegenselektion erfolgt dann mit den Zellen die das Protein nicht überexprimiert haben. Da wir jedoch mit Primärzellen arbeiteten, die zum einen sehr schwer zu transfizieren war, und wir einen neuen, unbekanntem Marker generieren wollten, haben wir von dieser Vorgehensweise abgesehen.

Bisher gibt es noch keine zuverlässigen Stammzellmarker, die MSCs ganz genau definieren können. Von Dominici et al. wurden im Jahre 2006 die Minimalkriterien definiert, die mittlerweile nicht ganz unumstritten sind [5]. Es wurden z.B. zwei Subpopulationen MSCA1⁺CD56⁺ und MSCA1⁺CD56⁻ unter den MSCs gefunden die diese Kriterien erfüllten, die jeweils ein unterschiedliches Differenzierungspotential aufwiesen [65, 103]. Hierbei stellte sich heraus, dass sich die MSCA1⁺CD56⁺ (MSCA1: mesenchymal stem cell antigen 1, CD56: NCAM) Fraktion besser chondrogen differenzieren ließ, wohingegen MSCA1⁺CD56⁻ im Gegensatz dazu adipogen differenziert werden konnte. Weiterhin herrscht allgemein Uneinigkeit in Bezug über die genaue Stammzelldefinition. Es wird sogar postuliert, dass Perizyten (gefäßstabilisierende Zellen, die auch als multipotent bezeichnet werden) die *ex vivo* MSCs darstellen [104, 105]. Daher bestand der Wunsch, das Aptamer bei Eignung als allgemeinen mesenchymalen Stammzellmarker eines bisher noch unbekanntes Targets einzusetzen. Zunächst testeten wir, ob das Target des Aptamers 74 auf anderen mesenchymalen Stammzelltypen zu finden war, indem wir die Bindungsaffinität des Moleküls an Knochenmark-, Plazenta- und Perioststammzellen ermittelten. Hierbei wurden ähnliche Expressionsmuster erkennbar - die undifferenzierten Kontrollen zeigten kaum positive Zellcounts, wohingegen bei den osteogen vordifferenzierten donorabhängig die Anzahl an positiv markierten Zellen ähnlich wie bei den periostalen Zellen war. Dies lässt die Annahme zu, dass die getesteten mesenchymalen Stammzellen verschiedener Herkunft das Target exprimieren.

Um die Spezifität des Aptamers 74 zu testen bzw. um auszuschließen, dass dieses Target von sämtlichen anderen Zelltypen ebenfalls exprimiert wird, wurden sämtliche Zelltypen wie z.B. primäre Endothelzellen, Osteoblasten, Plattenepithelkarzinom-, Lungenkarzinom- und Endothelzelllinien auf ihre Bindungsaffinität zu dem Aptamer 74 analysiert. In allen untersuchten Zelltypen konnte keinerlei Bindungsaffinität nachgewiesen werden.

Die Kieferperiostzellpopulation stellt eine sehr heterogene Zellpopulation dar, die zu einem erheblich hohen Anteil Gewebsfibroblasten enthält. Weiterhin sind Endothel-, Muskel- und Fettzellen in der gemischten Zellpopulation vertreten. Um sicherzustellen, dass das Aptamer nicht an diese in diesem Falle „kontaminierenden“ Gewebstypen bindet, wurden humane Prostatafibroblasten und primäre

5 Diskussion

Endothelzellen ebenfalls durchflusszytometrisch auf ihre Bindungsaffinität an das Aptamer 74 getestet. Sie wiesen jedoch sowohl in undifferenziertem- als auch im osteogen vorinduziertem Zustand (Prostatafibroblasten) keine positiven Counts auf. Die Gegenselektion erfolgte mit der humanen Plattenepithelkarzinomzelllinie BICR und mit primären PBMCs, die während den Spezifitätsbindungsassays ebenfalls getestet wurden. Das Aptamer 74 zeigte keine Bindungsaffinität zu den PBMCs, was allerdings nahe lag, denn jene Aptamere die eine Bindung an diese Zelltypen aufwiesen, wurden durch die negative Selektion während der SELEX-Prozedur eliminiert.

Da das Aptamer an osteogen vorinduzierte Zellen vermehrt binden konnte, wurde die Bindungsaffinität zu den Osteosarkomzelllinien Cal 72 und MG 63 ebenfalls analysiert. Hierbei konnte jedoch keine Bindung detektiert werden, was zunächst einen Widerspruch darstellte. Jedoch kann die Expression von Primärzellen nicht mit dem Oberflächenexpressionsmuster von Tumorzellen verglichen werden [106] und somit ist es wahrscheinlich, dass diese das Target des Aptamers 74 im Gegensatz zu den osteogen andifferenzierten Primärzellen nicht tragen. Wie oben erwähnt handelt es sich wahrscheinlich um ein Target, das während der frühen Osteogenese induziert wird und das die entdifferenzierten Osteosarkomzelllinien bereits nicht mehr exprimieren.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Aptamere im Allgemeinen vielversprechende Horizonte im Bereich Tissue Engineering eröffnen und neue Einsatzmöglichkeiten bieten.

In der vorliegenden Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, ein Aptamer zu generieren, das vermehrt an osteogen vorinduzierte Kieferperiostzellen binden kann, das jedoch nicht zwingend im unmittelbaren Zusammenhang mit der Mineralisierungskapazität dieser Zellen steht. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Aptamer an MSCs verschiedener Herkunft bindet, jedoch bleiben das genaue Target und der genaue Phänotyp der Aptamer 74-positiven Population noch unklar. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen notwendig, um genauere Aussagen über das identifizierte Aptamer 74 treffen zu können. Darüber hinaus soll das Aptamer 74 weiteren Studien auf eine Trägermatrix aufgebracht werden, um die Bindungsaffinität an die Kieferperiostzellen auf dreidimensionaler Ebene zu untersuchen. Da Zellen in der 2D-Kultur ein unterschiedliches Expressionsmuster als in der 3D-Kultur

aufweisen, bleibt die Frage der Aptamerspezifität in der 3D-Kultur noch offen. Ausserdem sollen weitere Studien den Einfluss auf Adhäsion-, Proliferation und Differenzierung der 3D-kultivierten Zellen aufklären. Dazu ist die Etablierung einer geeigneten Immobilisierungsvariante mit verschiedenen Crosslinkern und optimalen Aptamerkonzentrationen unumgänglich.

Auch in Bezug auf die Anwendung als allgemeiner Stammzelmarker sind Untersuchungen mit weiteren MSCs verschiedener Herkunftsquellen wie z.B. Fett, Nabelschnur, Haut und Muskelgewebe notwendig, um einen besseren Überblick über die Spezifität der Bindungsaffinität zu bekommen bzw. um genauere Angaben über die Aptamer 74-positive Fraktion treffen zu können.

5.3 Herstellung von biofunktionalisierten Implantaten mit den angewendeten Methoden

In der vorliegenden Studie wurden zwei verschiedene Ansätze zur Optimierung von Implantateigenschaften durchgeführt.

Ein Ansatz bestand darin, für biofunktionalisierte Implantate erstmals ein kieferperiostzellspezifisches DNA-Aptamer zu generieren, was die für JPCs bzw. MSCs spezifische Immobilisierungsvariante darstellte. Es konnte zum ersten Mal ein Aptamer gegen JPCs generiert und darüber hinaus gezeigt werden, dass das identifizierte Aptamer 74 bevorzugt an osteogen andifferenzierte Vorläuferzellen verschiedener Herkunft bindet. Jedoch wurde das vom Aptamer gebundene Molekül nicht direkt mit dem Mineralisierungspotenzial der Zellen assoziiert, sondern es handelte sich um ein Target, das in der frühen Osteogenese eine Rolle spielt. Weiterhin konnte eine erhöhte JPC Proliferationsrate durch die Aptamer-Beschichtung in der 2D Kultur erreicht werden. Die Generierung von spezifischen Aptameren ist eine vielversprechende Methode, die im Bereich der regenerativen Medizin sehr viel Potential aufweist und sich zur Oberflächenbeschichtung von Trägermaterialien eignet. Ob diese Methode mit dem hier generierten Aptamer 74 jedoch im direkten Vergleich mehr Vorteile in den analysierten Parametern wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung bringt als die im ersten Teil entwickelten mit RGD Peptiden biofunktionalisierten Implantate, ist jedoch fragwürdig.

Der Ansatz über die Beschichtung der OPLA-Matrizen mit RGD Peptiden stellte eine für unseren Zelltyp unspezifische Beschichtung dar. RGD Peptide sind allgemein

5 Diskussion

Liganden von Integrinen, die in allen Zelltypen vorhanden sind und dort die verschiedensten zellulären Vorgänge steuern. Es zeigte sich jedoch in allen hier durchgeführten Analysen, dass das Protokoll der indirekt beschichteten Variante der RGD Peptide über Poly-L-Lysin als Spacer sich als sehr geeignete Methode der Implantatbiofunktionalisierung für die humanen Kieferperiostzellen erwies, die Parameter wie Adhäsion-, Proliferation und osteogene Differenzierung signifikant verstärkte. In der *in vitro* Kultur zeigten diese biofunktionalisierten Implantate sich als äußerst geeignet für die Anwendung im Tissue Engineering. Gleichzeitig handelt es sich um eine kostengünstige und einfach realisierbare Methode der Oberflächenbeschichtung. Daher zeigen sie ein großes Potential, nach einer Analyse im *in vivo* Modell in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie klinische Anwendung zu finden.

6 Zusammenfassung

Gezielter Kieferknochenaufbau (Kieferknochenaugmentation) findet bei Lippen-, Kiefer- und Gaumenspalten, nach Tumorresektionen, Kieferatrophien und Knochenzysten seine Anwendung. Der Goldstandard ist bisher immer noch die Verwendung von autologem Knochenmaterial, was jedoch zwangsläufig zu Schwierigkeiten an der Entnahmestelle (Donormorbidität) bezüglich der Menge des entnommenen Materials, des Infektionsrisikos und der Schwächung des Knochens an dieser Stelle führt. Dieses Problem soll durch Tissue Engineering-Ansätze, die einerseits die Verwendung von autologen Stammzellen und andererseits von geeigneten Trägermatrizen beinhalten, umgangen werden. Ziel dieser Studie war es, ein biofunktionalisiertes Implantat, besiedelt mit humanen Kieferperiostzellen (JPCs) zu generieren, das die Adhäsions-, Proliferations- und Differenzierungskapazität der JPCs verstärkt. Dies sollte anhand zwei verschiedener Verfahren realisiert werden. Die erste Variante beinhaltete die Funktionalisierung von Polylaktid-Trägermatrizen mit verschiedenen RGD Peptiden (Peptide zusammengesetzt aus drei Aminosäuren: Arginin-Glycin-Asparaginsäure, abgekürzt mit RGD) anhand verschiedener Beschichtungsvarianten. Die erzielten Ergebnisse zeigten, dass die Beschichtung mit zyklischen Peptiden auf 3D Ebene ein schwaches Adhäsions- und Proliferationsverhalten der JPCs zur Folge hatte, im Gegensatz zu den dicht besiedelten, indirekt beschichteten Konstrukten mit Poly-L-Lysin als Platzhalter (Spacer) für die Zellen. Durch Genexpressionsanalysen sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen und Elementanalysen konnte ebenfalls belegt werden, dass die osteogene Differenzierbarkeit der JPCs innerhalb der indirekt beschichteten Polylaktid-Matrizen am stärksten ausgeprägt war. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit entwickelte RGD Biofunktionalisierungsmethode sich optimal für die Verstärkung der Zellparameter wie Adhäsion und Proliferation der JPCs eignete.

Ein zweiter Ansatz zur Oberflächenbeschichtungen von Tissue Engineering-Konstrukten war die Generierung eines Oligonukleotids (Aptamer), das hochaffin an humane Kieferperiostzellen binden und eine Progenitor-Subpopulation aus dem Gesamtzellverband anreichern konnte. Über einen *in vitro* Selektionsprozess (SELEX) wurde aus einem Startpool von ca. 10^{15} 80 bp langen Oligonukleotidsequenzen erstmals ein Aptamer generiert, das vermehrt an osteogen-

6 Zusammenfassung

nicht jedoch an adipogen- und chondrogen andifferenzierte Zellen binden konnte, und auch nur mit geringerer Affinität an nicht induzierte JPCs bzw. andere getestete Zelltypen. Die Bindungsaffinität war donorabhängig und hing nicht vom *in vitro* Kalzifizierungspotential der Patienten ab. Allerdings konnte belegt werden, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark und der Plazenta im osteogen andifferenzierten Zustand ebenso an das Aptamer binden konnten. Bei der Untersuchung des Mineralisierungspotentials der Aptamer-positiven im Vergleich zur Aptamer-negativen Fraktion konnten keine signifikanten Unterschiede der beiden Fraktionen festgestellt werden.

Der Biofunktionalisierungsansatz anhand der Aptamere stellte eine völlig neuartige Methode im Tissue Engineering Bereich dar und zeigt Potential zur Weiterentwicklung. Nach den bisher durchgeführten Analysen scheint das Aptamer 74 bisher noch keine besonderen Vorteile gegenüber der Methode der RGD-Peptidbeschichtung zu haben. Als Schlussfolgerung dieser Studien kann festgehalten werden, dass die indirekte RGD-Beschichtung über Poly-L-Lysin eine für das Knochen Tissue Engineering äußerst geeignete Methode darstellt. Im nächsten Schritt der *in vivo* Analyse muss dieses Verfahren seine klinische Relevanz unter Beweis stellen.

7 Summary

The applications of jaw bone augmentations are cleft lip and palates, bone cysts, bone defects after tumor resections and bone atrophies and the regeneration strategies in these regions gain more and more importance nowadays. The gold standard still remains the use of autologous bone, which automatically leads to considerable donor morbidities at the donor site. Using tissue engineering, a lot of efforts were done to overcome these problems by analyzing different scaffolding materials, cell sources and enhancing factors (growth factors, angiogenesis factors).

The aim of this study was to generate a biofunctionalized implant, which is able to enhance JPC adhesion, proliferation and differentiation into osteogenic tissue. This was realized by two different approaches. For the first approach, constructs were coated with different RGD peptides and different coating variants. We obtained poor adhesion and proliferation rates of cells growing on cyclic peptide coated scaffolds. Best results for cell adhesion and proliferation were achieved by indirect coating via PLL. Gene expression analyses, electron microscopy and EDX spectroscopy revealed, that cells growing within indirect coated constructs were able to mineralize *in vitro* and showed the highest level of mineralization. The obtained results indicated that this method for surface coating of biomaterials is a suitable way for biofunctionalizing scaffolds to enhance jaw periosteal cells adhesion and proliferation.

The second approach for surface coating of tissue engineering constructs was to generate a specific oligonucleotide for human jaw periosteal cells that can bind and enrich the osteogenic progenitor cells out of the heterogeneous cell population. By an *in vitro* selection process (SELEX), an aptamer was generated out of a starting library of about 10^{15} different 80 bp oligonucleotide sequences that can bind to early osteogenic differentiated, but not to adipogenic or chondrogenic differentiated and only weakly to undifferentiated JPCs and also not to any other tested cell types. The amount of positive labelled cells evaluated by flow cytometry was shown to be donor dependent and independent of the patients' *in vitro* mineralizing potential. However, testing the binding affinity to other mesenchymal stem cells derived from bone marrow and placenta showed a similar pattern as detected in osteogenic differentiated periosteal cells. In order to evaluate the mineralizing capacity of the

7 Summary

aptamer 74-positive in comparison to the negative fraction, the JPCs were sorted and we could not find any significant differences between those two fractions.

The biofunctionalization through aptamers is a novel approach in tissue engineering applications and shows a high potential to further development. After the studies done so far, the aptamer 74 does not seem to have any special advantages towards the RGD coating method.

Summarizing these results, we can postulate that the indirect coating of linear RGD peptides via a PLL spacer represents a suitable method for surface coating in bone tissue engineering. In the next steps, these constructs have to prove their clinical relevance in an *in vivo* model.

8 Literaturverzeichnis

1. Dixon, M.J., et al., *Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(3): p. 167-78.
2. Raghoobar, G.M., et al., *Autogenous femoral head as grafting material for mandibular augmentation*. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2009. **38**(12): p. 1320-1323.
3. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
4. Fink, T. and V. Zachar, *Adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Methods Mol Biol, 2011. **698**: p. 243-51.
5. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
6. Barnes, M.J., *Function of ascorbic acid in collagen metabolism*. Ann N Y Acad Sci, 1975. **258**: p. 264-77.
7. Jorgensen, N.R., et al., *Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts*. Steroids, 2004. **69**(4): p. 219-26.
8. Seong, J.M., et al., *Stem cells in bone tissue engineering*. Biomed Mater, 2010. **5**(6): p. 062001.
9. De Bari, C., et al., *Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(4): p. 1209-21.
10. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
11. Miura, K., et al., *Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(8): p. 743-5.
12. Yamanaka, S., et al., *Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors*. Science, 2008. **322**(5903): p. 949-953.
13. Jaquiere, C., et al., *In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone-forming capacity of human isogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells*. Ann Surg, 2005. **242**(6): p. 859-67, discussion 867-8.
14. Agata, H., et al., *Effective bone engineering with periosteum-derived cells*. J Dent Res, 2007. **86**(1): p. 79-83.
15. Pagani, F., C.M. Francucci, and L. Moro, *Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives*. J Endocrinol Invest, 2005. **28**(10 Suppl): p. 8-13.
16. Teitelbaum, S.L., M.M. Tondravi, and F.P. Ross, *Osteoclasts, macrophages, and the molecular mechanisms of bone resorption*. J Leukoc Biol, 1997. **61**(4): p. 381-8.
17. Orimo, H., *The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease*. J Nippon Med Sch, 2010. **77**(1): p. 4-12.
18. Deng, Z.L., et al., *Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development*. Frontiers in Bioscience, 2008. **13**: p. 2001-21.
19. Bikle, D.D., et al., *Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone*. Journal of Bone and Mineral Research, 2002. **17**(9): p. 1570-1578.

8 Literaturverzeichnis

20. Hamidouche, Z., et al., *Crosstalks between integrin alpha 5 and IGF2/IGFBP2 signalling trigger human bone marrow-derived mesenchymal stromal osteogenic differentiation*. *Bmc Cell Biology*, 2010. **11**: p. -.
21. Rodan, G.A. and M. Noda, *Gene expression in osteoblastic cells*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 1991. **1**(2): p. 85-98.
22. Habibovic, P., et al., *Osteoinduction by biomaterials--physicochemical and structural influences*. *J Biomed Mater Res A*, 2006. **77**(4): p. 747-62.
23. Thomson, R.C., et al., *Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1995. **7**(1): p. 23-38.
24. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. *Biomaterials*, 2000. **21**(24): p. 2529-43.
25. Burg, K.J., S. Porter, and J.F. Kellam, *Biomaterial developments for bone tissue engineering*. *Biomaterials*, 2000. **21**(23): p. 2347-59.
26. Glowacki, J. and S. Mizuno, *Collagen scaffolds for tissue engineering*. *Biopolymers*, 2008. **89**(5): p. 338-44.
27. Freed, L.E., et al., *Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering*. *Bio-Technology*, 1994. **12**(7): p. 689-693.
28. Vacanti, C.A. and J. Upton, *Tissue-Engineered Morphogenesis of Cartilage and Bone by Means of Cell Transplantation Using Synthetic Biodegradable Polymer Matrices*. *Clinics in Plastic Surgery*, 1994. **21**(3): p. 445-462.
29. Kim, I.S., et al., *Core-shell type polymeric nanoparticles composed of poly(L-lactic acid) and poly(N-isopropylacrylamide)*. *Int J Pharm*, 2000. **211**(1-2): p. 1-8.
30. Hersel, U., C. Dahmen, and H. Kessler, *RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond*. *Biomaterials*, 2003. **24**(24): p. 4385-415.
31. Bosman, F.T. and I. Stamenkovic, *Functional structure and composition of the extracellular matrix*. *J Pathol*, 2003. **200**(4): p. 423-8.
32. Humphries, M.J., et al., *Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins*. *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt 5): p. 822-5.
33. van der Flier, A. and A. Sonnenberg, *Function and interactions of integrins*. *Cell Tissue Res*, 2001. **305**(3): p. 285-98.
34. Barczyk, M., S. Carracedo, and D. Gullberg, *Integrins*. *Cell Tissue Res*, 2010. **339**(1): p. 269-80.
35. LeBaron, R.G. and K.A. Athanasiou, *Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials*. *Tissue Eng*, 2000. **6**(2): p. 85-103.
36. Quirk, R.A., et al., *Poly(L-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid)*. *Biomaterials*, 2001. **22**(8): p. 865-872.
37. Yang, X.B., et al., *Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification*. *Bone*, 2001. **29**(6): p. 523-31.
38. Cook, A.D., et al., *Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial*. *J Biomed Mater Res*, 1997. **35**(4): p. 513-23.
39. Breuers, W., et al., *Immobilization of a Fibronectin Fragment at the Surface of a Polyetherurethane Film*. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 1991. **2**(2): p. 106-109.
40. Kugo, K., et al., *Fibroblast attachment to Arg-Gly-Asp peptide-immobilized poly(gamma-methyl L-glutamate)*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1994. **5**(4): p. 325-37.

41. Kantlehner, M., et al., *Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation*. *Chembiochem*, 2000. **1**(2): p. 107-14.
42. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro Selection of Rna Molecules That Bind Specific Ligands*. *Nature*, 1990. **346**(6287): p. 818-822.
43. Tuerk, C. and L. Gold, *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. *Science*, 1990. **249**(4968): p. 505-10.
44. Paul, A., et al., *Aptamers influence the hemostatic system by activating the intrinsic coagulation pathway in an in vitro Chandler-Loop model*. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2010. **16**(2): p. 161-9.
45. Hicke, B.J., et al., *Tumor targeting by an aptamer*. *J Nucl Med*, 2006. **47**(4): p. 668-78.
46. Bagalkot, V., et al., *An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006. **45**(48): p. 8149-52.
47. Farokhzad, O.C., J.M. Karp, and R. Langer, *Nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer targeting*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006. **3**(3): p. 311-24.
48. McNamara, J.O., 2nd, et al., *Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras*. *Nat Biotechnol*, 2006. **24**(8): p. 1005-15.
49. Mi, J., et al., *Targeted inhibition of alphavbeta3 integrin with an RNA aptamer impairs endothelial cell growth and survival*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **338**(2): p. 956-63.
50. Bock, L.C., et al., *Selection of Single-Stranded-DNA Molecules That Bind and Inhibit Human Thrombin*. *Nature*, 1992. **355**(6360): p. 564-566.
51. Levy-Nissenbaum, E., et al., *Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery*. *Trends Biotechnol*, 2008. **26**(8): p. 442-9.
52. Que-Gewirth, N.S. and B.A. Sullenger, *Gene therapy progress and prospects: RNA aptamers*. *Gene Ther*, 2007. **14**(4): p. 283-91.
53. Wendel, H.P., et al., *Upgrading SELEX Technology by Using Lambda Exonuclease Digestion for Single-Stranded DNA Generation*. *Molecules*, 2010. **15**(1): p. 1-11.
54. Zhang, Y., et al., *Aptamers selected by cell-SELEX for application in cancer studies*. *Bioanalysis*, 2010. **2**(5): p. 907-18.
55. Hoffmann, J., et al., *Immobilized DNA aptamers used as potent attractors for porcine endothelial precursor cells*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008. **84A**(3): p. 614-621.
56. Tan, W.H., et al., *Aptamer-conjugated nanoparticles for the collection and detection of multiple cancer cells*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(8): p. 3075-3082.
57. Tan, W.H., et al., *Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(32): p. 11838-11843.
58. Guo, K.T., et al., *A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers*. *Stem Cells*, 2006. **24**(10): p. 2220-31.
59. Hoffmann, J., et al., *Immobilized DNA aptamers used as potent attractors for endothelial precursor cells under flow conditions*. *Tissue Engineering*, 2007. **13**(4): p. 917-918.

8 Literaturverzeichnis

60. Shamah, S.M., J.M. Healy, and S.T. Cload, *Complex target SELEX*. Acc Chem Res, 2008. **41**(1): p. 130-8.
61. Cerchia, L., et al., *Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase*. Plos Biology, 2005. **3**(4): p. e123.
62. Sun, W., L. Du, and M. Li, *Advances and perspectives in cell-specific aptamers*. Curr Pharm Des, 2011. **17**(1): p. 80-91.
63. Cerchia, L., et al., *Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase*. PLoS Biol, 2005. **3**(4): p. e123.
64. Guo, K.T., et al., *CELL-SELEX: Novel perspectives of aptamer-based therapeutics*. Int J Mol Sci, 2008. **9**(4): p. 668-78.
65. Buhring, H.J., et al., *Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1176**: p. 124-34.
66. Alvarez-Barreto, J.F., et al., *Preparation of a functionally flexible, three-dimensional, biomimetic poly(L-lactic acid) scaffold with improved cell adhesion*. Tissue Eng, 2007. **13**(6): p. 1205-17.
67. Alexander, D., et al., *Analysis of OPLA scaffolds for bone engineering constructs using human jaw periosteal cells*. J Mater Sci Mater Med, 2008. **19**(3): p. 965-74.
68. Thumshirn, G., et al., *Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: Solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation*. Chemistry-a European Journal, 2003. **9**(12): p. 2717-2725.
69. Westlin, W.F., *Integrins as targets of angiogenesis inhibition*. Cancer Journal, 2001. **7**: p. S139-S143.
70. Pike, D.B. and H. Ghandehari, *HPMA copolymer-cyclic RGD conjugates for tumor targeting*. Adv Drug Deliv Rev, 2010. **62**(2): p. 167-83.
71. Pierschbacher, M.D. and E. Ruoslahti, *Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule*. Nature, 1984. **309**(5963): p. 30-3.
72. Kantlehner, M., et al., *Selective RGD-mediated adhesion of osteoblasts at surfaces of implants*. Angewandte Chemie-International Edition, 1999. **38**(4): p. 560-562.
73. Hern, D.L. and J.A. Hubbell, *Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing*. J Biomed Mater Res, 1998. **39**(2): p. 266-76.
74. Massia, S.P. and J.A. Hubbell, *Covalent surface immobilization of Arg-Gly-Asp- and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates*. Anal Biochem, 1990. **187**(2): p. 292-301.
75. Kolhar, P., et al., *Synthetic surfaces for human embryonic stem cell culture*. J Biotechnol, 2010. **146**(3): p. 143-6.
76. Lieb, E., et al., *Mediating specific cell adhesion to low-adhesive diblock copolymers by instant modification with cyclic RGD peptides*. Biomaterials, 2005. **26**(15): p. 2333-41.
77. Schaffner, P. and M.M. Dard, *Structure and function of RGD peptides involved in bone biology*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003. **60**(1): p. 119-32.
78. Carletti, E., A. Motta, and C. Migliaresi, *Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture*. Methods Mol Biol, 2011. **695**: p. 17-39.
79. Maheshwari, G., et al., *Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 10): p. 1677-86.
80. Irvine, D.J., et al., *Simulations of cell-surface integrin binding to nanoscale-clustered adhesion ligands*. Biophysical Journal, 2002. **82**(1 Pt 1): p. 120-32.

81. Jingchao, H., et al., *Human amelogenin up-regulates osteogenic gene expression in human bone marrow stroma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **408**(3): p. 437-41.
82. Guo, K.T., et al., *Aptamer-based strategies for stem cell research*. Mini Rev Med Chem, 2007. **7**(7): p. 701-5.
83. Chen, H.W., et al., *Molecular recognition of small-cell lung cancer cells using aptamers*. ChemMedChem, 2008. **3**(6): p. 991-1001.
84. Chapman, J.A. and C. Beckey, *Pegaptanib: a novel approach to ocular neovascularization*. Ann Pharmacother, 2006. **40**(7-8): p. 1322-6.
85. Zhao, Q., X.F. Li, and X.C. Le, *Aptamer-modified monolithic capillary chromatography for protein separation and detection*. Anal Chem, 2008. **80**(10): p. 3915-20.
86. Blank, M. and M. Blind, *Aptamers as tools for target validation*. Current Opinion in Chemical Biology, 2005. **9**(4): p. 336-342.
87. Apte, R.S., et al., *Pegaptanib 1-year systemic safety results from a safety-pharmacokinetic trial in patients with neovascular age-related macular degeneration*. Ophthalmology, 2007. **114**(9): p. 1702-12.
88. Vavvas, D. and D.J. D'Amico, *Pegaptanib (Macugen): treating neovascular age-related macular degeneration and current role in clinical practice*. Ophthalmol Clin North Am, 2006. **19**(3): p. 353-60.
89. Guo, K., et al., *Aptamer-based capture molecules as a novel coating strategy to promote cell adhesion*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(3): p. 731-6.
90. Guo, K.T., et al., *The effect of electrochemical functionalization of Ti-alloy surfaces by aptamer-based capture molecules on cell adhesion*. Biomaterials, 2007. **28**(3): p. 468-74.
91. Chen, T., et al., *Aptamer-conjugated nanomaterials for bioanalysis and biotechnology applications*. Nanoscale, 2011. **3**(2): p. 546-56.
92. He, X., et al., *One-pot synthesis of sustained-released doxorubicin silica nanoparticles for aptamer targeted delivery to tumor cells*. Nanoscale, 2011. **3**(7): p. 2936-42.
93. Zhou, J. and J.J. Rossi, *Cell-specific aptamer-mediated targeted drug delivery*. Oligonucleotides, 2011. **21**(1): p. 1-10.
94. Alexander, D., et al., *MSCA-1/TNAP selection of human jaw periosteal cells improves their mineralization capacity*. Cell Physiol Biochem, 2010. **26**(6): p. 1073-80.
95. Alexander, D., et al., *LNGFR induction during osteogenesis of human jaw periosteum-derived cells*. Cell Physiol Biochem, 2009. **24**(3-4): p. 283-90.
96. Thiel, K.W. and P.H. Giangrande, *Intracellular delivery of RNA-based therapeutics using aptamers*. Ther Deliv, 2010. **1**(6): p. 849-861.
97. Hah, S.S., et al., *An alternative to Western blot analysis using RNA aptamer-functionalized quantum dots*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010. **20**(11): p. 3322-3325.
98. Cerchia, L., et al., *Differential SELEX in human glioma cell lines*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7971.
99. Wendel, H.P., et al., *Immobilized DNA aptamers used as potent attractors for porcine endothelial precursor cells*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008. **84A**(3): p. 614-621.
100. Tan, W.H., et al., *Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers*. Leukemia, 2009. **23**(2): p. 235-244.
101. Cerchia, L., et al., *Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase*. Plos Biology, 2005. **3**(4): p. 697-704.

8 Literaturverzeichnis

102. Duan, W., et al., *RNA aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule*. *Cancer Science*, 2011. **102**(5): p. 991-998.
103. Buhring, H.J., et al., *Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1*. *Haematologica-the Hematology Journal*, 2009. **94**(2): p. 173-184.
104. Meirelles Lda, S. and N.B. Nardi, *Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells*. *Front Biosci*, 2009. **14**: p. 4281-98.
105. Augello, A., T.B. Kurth, and C. De Bari, *Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches*. *Eur Cell Mater*, 2010. **20**: p. 121-33.
106. Rochet, N., et al., *CAL72: a human osteosarcoma cell line with unique effects on hematopoietic cells*. *European Journal of Haematology*, 2003. **70**(1): p. 43-52.

9 Danksagung

- Herrn Prof. Dr. Rammensee danke ich ganz herzlich für die Finanzierung und Unterstützung während meiner Dissertation, dass ich in seinem Graduiertenkolleg mitwirken durfte und dafür, dass er sich bereit erklärt hat, Zweitgutachter meiner Dissertation zu sein.
- Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater und Erstgutachter Prof. Dr. Konrad Kohler danken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und der mir über das Graduiertenkolleg 794 die Finanzierung der Doktorarbeit ermöglichte, mir dadurch ein Netzwerk eröffnete, in dem ich sehr viel Know-how bezogen auf meine Projekte im Rahmen der Disseration und auch bezogen auf meine Soft Skills erlernen durfte.
- Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dr. Siegmair Reinert der mir die Möglichkeit und Mittel zur Verfügung stellte, meine Disseration im Labor der Klinik- und Poliklinik der Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie durchzuführen, der mir sämtliche Horizonte eröffnete und mir vieles ermöglichte.
- Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Dorothea Alexander-Friedrich, die den Grundstein für meine beiden Projekte legte, mir die Möglichkeit gab unter Ihrer Anleitung in diesem Labor meine Disseration durchzuführen und mir in jeder auch noch so aussichtslosen Situation und zu jeder Tages- und Nachtzeit voll und ganz zur Seite stand und mich in jeglicher Hinsicht unterstützte.
- Herrn PD. Dr. Wendel danke ich für das Know-how und die Beratung und stets sehr wertvolle Denkanstöße in meinem Aptamerprojekt und dafür, dass ich zu jeder Zeit die Geräte der THG-Chirurgie für meine Projekte nutzen durfte.
- Mein ganz besonderer Dank gilt Jan Niederländer, der geduldigst mit mir das Aptamer-Projekt bearbeitet hat, der mir ebenfalls zu jeder Zeit und in jeglichen Höhen und Tiefen beistand, stets bei allen auftretenden Fragen und Problemen ein hochkompetenter Diskussionspartner war und ist.
- Der AG Kalbacher (PD. Dr. Hubert Kalbacher, Andreas Maurer) danke ich ganz herzlich für die biochemische Unterstützung und dem Know-how Austausch und für die synthetisierten Peptide.

9 Danksagung

- Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Christian Klein bedanken, der in vielen Arbeitsstunden in der Dunkelkammer mit mir gemeinsam fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht hat und mir bei jedem EDV-technischen Notfall sofort zur Seite stand und mich softwaretechnisch stets auf den neuesten Stand brachte.
- Ganz herzlichst möchte ich meiner Kollegin Melanie Rieger danken, die im Laboralltag stets für mich da war, mich in jeglicher Hinsicht unterstützte und entlastete.
- Meinem Mitdoktoranden Markus Olbrich danke ich für die sehr kooperative Zusammenarbeit während meiner Dissertation.
- Heidi Munz danke ich dafür, dass ich sie mich stets mit Zellmaterial versorgte und ihr histologisches Know-how mit mir teilte.
- Ebenfalls ganz herzlich möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Aicher (Prof. Dr. Wilhelm Aicher, Tanja Abruzzese, Christine Ulrich, Dr. Tino Felka,) dafür bedanken, dass sie mich stets mit humanem Zellmaterial versorgt haben, welches unserer AG nur sehr schwer zugänglich ist und auch sonst immer da waren wenn der Schuh drückte. Ganz besonders hervorheben möchte ich dabei Tanja Abruzzese, die mich zusätzlich auch privat zu jeder Zeit unterstützte und immer für mich da ist.
- Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe Klein (Prof. Dr. Gerd Klein, Tatjana Kaiser, Dr. Yvonne Schüler, Dr. Nicole Staudt, Dr. Paulina Rymkiewicz, Carolin Steinl) für anregende Gespräche, die Bereitstellung von Antikörpern und Zelllinien.
- Ich möchte mich in diesem Zuge ebenfalls bei dem Koordinator des GK 794, Prof. Dr. Jürgen Frank für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit während meiner GK-Sprecherzeit bedanken.
- Bedanken möchte ich mich auch bei der AG Bühring (PD. Dr. Hans-Jörg Bühring und Sabrina Grimm) dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, durchflusszytometrisches Zell-Sorting durchführen zu können.
- Für die EDV-technische Umsetzung und Formatierung meiner Dissertation möchte ich mich bei meinem lieben Freund Christoph Diefenthal bedanken, der mir in der Endphase tatkräftig zur Seite stand.
- Und zuletzt möchte ich mich bei den Allerwichtigsten bedanken - meiner Familie, vor allem meiner lieben Mama und meinem lieben Bruder Cyrus, die

immer an mich glaubten und zu jeder Zeit und in jeder Lebenssituation für mich da waren.

