

Aus der Klinik für Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Heinrich-  
Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. N. R. Kübler

**UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOKOMPATIBILITÄT OSTEOGEN  
VORDIFFERENZIERTER HUMANER NABELSCHNURSTAMMZELLEN AUF  
VERSCHIEDENEN BIOMATERIALIEN UND ZUM EINFLUSS DER  
BIOMATERIALIEN AUF DEN DIFFERENZIERUNGSPROZESS**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

**Dr. med. Christian Daniel Naujoks**

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent Jörg Handschel

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Günther Giers

*meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Zellen:.....	9
1.2	Matrix:.....	14
1.3	Vaskularisation: .....	17
1.4	Wachstumsfaktoren:.....	20
1.5	Ziel der Arbeit.....	22
2	Material und Methode.....	23
2.1	Materialliste .....	23
2.2	Kultivierung der Zellen und osteogene Vordifferenzierung mit den Biomaterialien .....	29
2.3	Kultivierung der osteogen vordifferenzierten USSCs mit Biomaterialien .....	30
2.4	Herstellung von ICBM.....	30
2.5	Verwendete Biomaterialien.....	32
2.6	CyQuant-Assay zur Bestimmung des Attachments und der Proliferation....	33
2.7	Real time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) .....	34
2.8	Rasterelektronenmikroskopie .....	36
2.9	Statistische Analyse: .....	37
3	Ergebnisse .....	38
3.1	Ergebnisse der CyQuant®-Auswertung.....	38
3.2	Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie .....	42
3.3	Ergebnisse der PCR-Analyse.....	48
4	Diskussion .....	49
5	Zusammenfassung .....	54
6	Literaturverzeichnis .....	56
7	Danksagung .....	65
8	Lebenslauf.....	66

## Abkürzungsverzeichnis

ADPC	Adipose Tissue Derived Progenitor Cells
AP	Alkalische Phosphatase
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BMDPC	Bone Marrow Derived Progenitor Cells
BMP-2	Bone Morphogenic Protein 2
BMP-7	Bone Morphogenic Protein 7
β-TCP	β-Tricalciumphosphat
CD34	Cluster Of Differentiation
DAG	Dexamethason + Ascorbinsäure + β-Glycerophosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECM	Extracellular Matrix
ESC	Embryonale Stammzellen
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HLA	Human Leukocyte Antigene
ICBM	Insoluble Collagenous Bone Matrix
IGF	Insuline Like Growth Factor
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
MPC	Mesenchymale Progenitor Cells
OLC	Osteoblast Like Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDPC	Periost Derived Progenitor Cells
PGA	Polyglycolic Acid Copolymer
PLA	Polylactic Acid Copolymer
USSC	Unrestricted Somatic Stem Cell (Nabelschnurblutstammzellen)

VEGF      Vascular Endothelial Growth Factor  
ZNS      Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

Knochendefekte im Bereich der Kiefer stellen auch heute noch eine große therapeutische Herausforderung dar. Durch den zunehmenden Altersdurchschnitt in der Bevölkerung bekommen die Therapie von periodontalen Knochendefekten und die Therapie von Kieferatrophien (z.B. vor implantatbasierter Rehabilitation des Kauapparates), einen höheren Stellenwert. Allen Krankheitsbildern ist gemein, dass die Wiederherstellung des knöchernen Gesichtsskeletts mit seinen funktionellen und ästhetischen Aspekten für die Lebensqualität der Patienten von großer Bedeutung ist. Die knöcherne Wiederherstellungschirurgie hat in den letzten Jahrzehnten einen Wandel erfahren. In den 80er und 90er Jahren erfolgte die Skelettrekonstruktionen häufig mittels artifiziellen Materialien wie Kalziumphosphate, Keramiken und Polymeren (Binderman et al., 1990). Hierdurch konnte zwar die Skelettform und teilweise auch die Funktion wiederhergestellt werden; jedoch wurden materialspezifische Nachteile in Kauf genommen. Mittlerweile findet zunehmend Berücksichtigung, dass das Skelett einem dynamischen Geschehen unterworfen ist, gekennzeichnet durch einen adaptativen Knochenan- und -abbau. Die Knochenneubildung basiert auf der Fähigkeit des ossären Gewebes dynamische Umbauprozesse in Gang zu setzen, die im optimalen Fall zu einer Restitutio ad integrum, wie beispielsweise bei der Knochenheilung nach einer Fraktur, führen (Rodan, 1992). Auf diesen Erkenntnissen basierend werden auch heute häufig autologe Transplantate zur Knochenregeneration eingesetzt. Diese weisen im Gegensatz zu den artifiziellen alloplastischen Materialien lebende, biologisch aktive Zellen auf, die sowohl an der Einheilung, als auch an der Adaptation an die lokalen mechanischen Anforderungen beteiligt sind. Auf Grund der vielen Vorteile wird bei körpereigenen Knochentransplantaten, auch vom „Gold-Standard“ gesprochen (Pretorius et al., 2005). Neben nicht vaskularisierten, freien Knochentransplantaten werden auch mikrovaskulär anastomosierte Transplantate (hohe mechanische Kompetenz)(Mehta et al., 2004) verwendet, welche bei größeren Defekten, oder in vorgeschädigten Geweben (ersatzschwache Transplantatlager) Vorteile bieten (Smolka et al., 2005). Allerdings besteht neben der Entnahmemorbidity (Nkenke et al., 2001; Nkenke et al., 2004; Sasso et al., 2005) auch die quantitative Limitation des zur Verfügung stehenden Knochenreservoirs als Nachteil.

In den letzten Jahren hat deshalb insbesondere in der Forschung ein Wandel stattgefunden. Dieser zielt zunehmend auf zellbasierte Knochenregenerations- und Rekonstruktionsansätze ab. Dabei unterstützen die vitalen Zellen die Wiederherstellung oder Unterhaltung der Gewebefunktionalität (Langer et al., 1993). Prinzipiell gibt es drei verschiedene Arten von zellbasierten Knochenregenerationsstrategien. Neben der Transplantation von Zellen in einem Gewebeblock (klassisches Knochentransplantat) ist auch die in situ Aktivierung von ortsständigen Zellen (z.B. Distraktionsosteogenese) möglich. Hierbei werden körpereigene Zellen durch verschiedene Stimuli, z.B. Dehnungsreize (Meyer et al., 2005a; b), elektromechanische Reize (Aaron et al., 2004) und Stimulation durch Zytokine, zur Knochenbildung stimuliert (Depprich et al., 2005; Kubler et al., 1998). Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Transplantation von isolierten und/oder extrakorporal kultivierten Zellen, ggf. auch als extrakorporal generiertes Gewebekonstrukt. In diesem Zusammenhang, wurde der Begriff „Tissue Engineering“ geprägt. Beim Tissue Engineering werden lebende Zellen in vitro auf bzw. in einer Matrix kultiviert um ein Zielgewebe zu erhalten, welches dann in denselben Organismus transplantiert werden kann, um spezifische Gewebefunktionen wiederherzustellen. Ging man früher von drei wichtigen biologischen Säulen des „Tissue Engineering“ aus; Zellen (Handschel et al., 2006), Wachstumsfaktoren und Matrix (Biomaterial)(Handschel et al., 2002; Wiesmann et al., 2004), so weiß man heute, dass auch die Vaskularisation eine wichtige Rolle spielt (Abb.1). Im Rahmen des Tissue Engineerings werden verschiedene Arten von Matrices, Wachstumsfaktoren, Vaskularisation und Zellen – singulär oder in verschiedenen Kombinationen - für die Entwicklung von artifiziellem Knochen verwendet. Durch den Wegfall der Entnahmemorbidität und die theoretisch unbegrenzte Verfügbarkeit bietet die extrakorporale Herstellung von Ersatzgeweben deutliche Vorteile gegenüber der Verwendung von autologen Gewebetransplantaten.

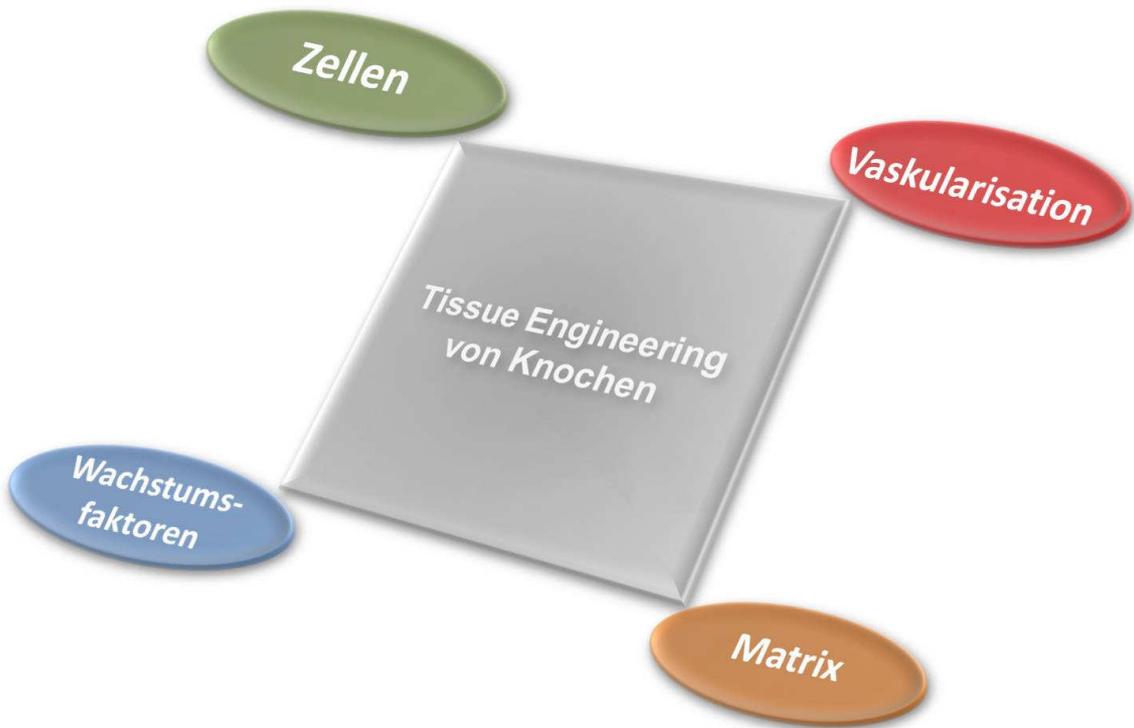


Abb. 1: Die vier Säulen des Tissue Engineerings.

### 1.1 Zellen:

Zellarten die beim „Tissue Engineering“ Verwendung finden, können theoretisch autologen, allogenen oder xenogenen Ursprungs sein. Diese Kategorien können noch entsprechend ihrer Differenzierungskapazität in ausdifferenzierte (z.B. Osteoblasten), multipotente, pluripotente und totipotente Zelllinien unterteilt werden. Im Gegensatz zu totipotenten Zellen, die einen kompletten Organismus generieren können, können sich pluripotente Zelllinien in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren. Ihnen fehlt aber die Kompetenz, einen komplexen Gesamtorganismus zu bilden. Multipotente Zellen hingegen können in verschiedene Zelltypen differenzieren ohne zugleich pluripotent oder totipotent zu sein. Neben dieser Einteilung der Zellen besteht auch die Möglichkeit Zellen in natürliche und genetisch modifizierte Zellen einzuteilen (Tabelle 1, Abb. 2).

Natürlich vorkommende Zellen	Genetisch modifizierte Zellen
<b>Toti- und Pluripotente Zellen</b> Embryonale Stammzellen (ESC) Nabelschnurblutstammzellen (USSC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Osteosarkom Zelllinien</li> <li>- Immortalisierte Zelllinien <ul style="list-style-type: none"> <li>a) spontan transformiert</li> <li>b) nicht transformierte</li> </ul> </li> <li>- klonale Zelllinien</li> </ul>
<b>Multipotente Zellen</b> ADPC BMDPC PDPC Progenitorzellen aus Gefäßwänden Progenitorzellen aus Plazenta	
<b>Unipotente Zellen</b> Präosteoblasten “Lining cells” Osteoblasten Osteocyten	

Tab. 1: Einteilung von Zellen für das Tissue Engineering von Knochen. ADPC = Progenitorzellen aus Fettgewebe, BMDPC = Progenitorzellen aus Knochenmark, PDPC = Progenitorzellen aus Periost

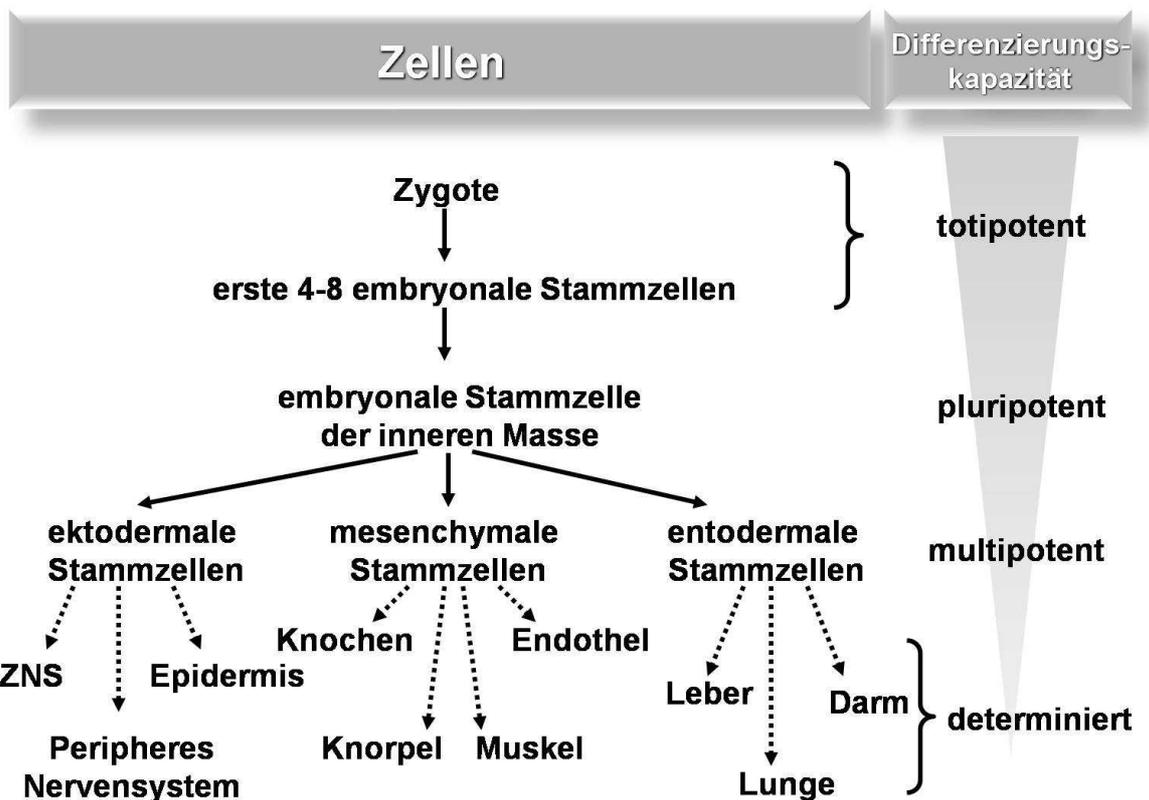


Abb. 2: Die Differenzierungskaskade

Der Vorteil bei der Verwendung von toti-, pluri-, bzw. multipotenten Zelllinien (z.B. pluripotente embryonale Stammzellen (ESC) oder unrestricted somatic stem cells (USSC)) ist, dass eine Differenzierung der Ausgangszellen in knochenbildende Zellen sowie in Zellen, welche wichtige Funktionen bei der Generierung von Geweben übernehmen, wie z.B. Endothelzellen erfolgen kann. Multipotente mesenchymale Progenitorzellen (MPC) stellen eine sehr heterogene Gruppe dar und können aus verschiedenen Geweben (z.B. Knochenmark, Periost, Fett, etc.) (Covas et al., 2005; In 't Anker et al., 2004; Moosmann et al., 2005; Ng et al., 2005; Pittenger et al., 1999; Sakaguchi et al., 2004; Seo et al., 2004; Wulf et al., 2004) gewonnen werden und in unterschiedlichen mesenchymale Zelllinien differenziert werden (Handschel et al., 2006). Stammzellen und Vorläuferzellen entstehen embryonal und scheinen im Gewebe adulter Organismen in geringer Anzahl zu persistieren. Dort tragen sie durch die Differenzierung in Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten wesentlich zur Reparatur von Gewebedefekten bei (Caplan, 1991; Pittenger et al., 1999). Die Reifung dieser Zellen inklusive Proliferation und Differenzierung erfolgt unter dem Einfluss verschiedenster Hormone und Zytokine. Die Differenzierung in einen Osteoblasten ist definitionsgemäß dadurch erreicht,

dass die Zelle Knochenmatrix synthetisiert, welche sekundär mineralisiert wird. Des Weiteren exprimieren Osteoblasten phenotypische Marker wie Alkalische Phosphatase, Kollagen Typ I und Osteokalzin (Aubin et al., 1996). Zur Gewinnung der autologen MPC ist jedoch analog zur Knochentransplantatentnahme eine Entnahme, in diesem Fall durch Aspiration, erforderlich. Da die MPC in Knochenmarksaspiraten eine zahlenmäßig geringe Subpopulation darstellen (nur eine von 100.000 Zellen aus dem Knochenmark ist eine MPC (D'Ippolito et al., 1999; Quarto et al., 1995)), ist die Gewinnung dieser Zellen recht aufwendig. Ein weiterer Nachteil dieser Zellen ist das begrenzte Erneuerungspotential verglichen mit z.B. ESC und USSC (McCulloch et al., 1991). Außerdem besitzen diese Zellen in höherem Lebensalter ein vermindertes Proliferationspotenzial und Differenzierungskapazität (D'Ippolito et al., 1999; McCulloch et al., 1991; Quarto et al., 1995).

Im Gegensatz zu den multipotenten MPC gehören die embryonalen Stammzellen (ESC) zu den pluripotenten Zellen, welche aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden und eine pluripotente embryonale Vorläuferzelle darstellen. Vor über 20 Jahren gelang es erstmals ESC aus der Maus zu isolieren und zu kultivieren (Martin, 1981). Ende der 90er Jahre konnte schließlich auch eine stabile humane ESC-Zelllinie etabliert werden (Thomson et al., 1998). ESC konnten früher nur in Co-Kulturen mit mitotisch inaktiven Fibroblasten, die als sogenannte feeder cells fungierten, kultiviert werden (Bielby et al., 2004; Heng et al., 2004; zur Nieden et al., 2003). Durch Supplementierung mit speziellen Faktoren ist dies heute jedoch nicht mehr notwendig. Unter speziellen Kultivierungsbedingungen können ESC in osteoblastenähnliche Zellen (OLC) differenzieren. Dies wird meistens durch den Zusatz von Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerolphosphat zum Nährmedium erreicht (Bielby et al., 2004; Chaudhry et al., 2004). Aber auch Zytokine wie BMP-2 oder Vitamin D3 können die osteoblastäre Differenzierung fördern (zur Nieden et al., 2003). Anhand von murinen ESCs, die in Anwesenheit von LIF (leukemia inhibitory factor), DAG (Dexamethason, Ascorbinsäuren,  $\beta$ -Glycerolphosphat) oder BMP-2 kultiviert wurden, konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Kultivierung mit DAG im Gegensatz zu BMP-2 eine bessere osteogene Differenzierung zur Folge hat. Dies wurde mittels immunhistologischer Färbungen und real-time PCR Expressionsanalyse osteogener Marker (Kollagen I, Osteokalzin) objektiviert (Handsichel et al., 2008b). Ein Vorteil der ESCs gegenüber

den multipotenten mesenchymalen Progenitorzellen ist ihre Immortalität. Dadurch stellen sie ein unbegrenztes Reservoir zur Osteoblastendifferenzierung dar. In diesem Zusammenhang ist eine der wesentlichen Herausforderungen der heutigen Forschung, die immunogene Abstoßung dieser Zellen durch den immunkompetenten Transplantatempfänger zu vermeiden. Interessanterweise konnte Burt et al. eine MHC-mismatched ESC-Transplantation bei Mäusen ohne den klinischen oder histologischen Nachweis einer graft-versus-host Reaktion durchführen (Burt et al., 2004). Des Weiteren beschrieb Zavazava in einem Übersichtsartikel die Möglichkeit, dass ESC ein Potential zur Induktion einer Immuntoleranz besitzen (Zavazava, 2003). Neben all diesen Vorteilen gibt es auch Bedenken bezüglich der Anwendung der ESC für die Transplantation. So ist beispielsweise eine mögliche maligne Entartung der Zellen denkbar. Trounson beschrieb das vermehrte Auftreten von Teratomen und Teratokarzinomen bei Tieren mit transplantierten undifferenzierten ESC (Trounson, 2002). Viele Autoren haben jedoch keinen Hinweis auf eine tumoröse Entartung finden können (Zhang et al., 2001). Zuletzt bleiben noch rechtliche und ethische Bedenken bei der Verwendung humaner ESC für wissenschaftliche Versuche und für die klinische Anwendung. Die Diskussion bezieht sich letztendlich auf die Frage, ob der Schutz und die Integrität des humanen Embryos oder aber potenzielle Therapieoptionen für Patienten ein höheres Gut darstellen. Verbunden damit ist die Diskussion, ob der absolute Respekt vor dem individuellen menschlichen Leben bereits mit der Konzeption oder erst später beginnt (Cogle et al., 2003; Gilbert, 2004).

Eine mögliche Alternative zur Verwendung humaner ESC stellen die vor wenigen Jahren entdeckten mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut, sog. unrestringated somatic stem cells (USSC) dar (Kogler et al., 2004). Bei diesen Zellen handelt es sich um mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnene pluripotente, mononukleäre Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut. Diese weisen nur ein geringes immunogenes Potenzial auf, so dass die Zellen schon seit längerem bei der Behandlung von Leukämien in der Hämatookologie genutzt werden. Trotz allogener Transplantation nicht HLA-identischer Individuen treten nur selten Abstoßungsreaktionen auf (Benito et al., 2004). Die Zellen besitzen neben einem chondroblastären, hämatopoetischen und neuronalen Differenzierungspotential auch das Potential einer osteoblastären Differenzierung.

Bei der Verwendung autologer determinierter osteoblastärer Zellen kommt es zu keinen immunologischen Reaktionen. Auch rechtlichen und ethischen Einschränkungen bestehen nicht. Zur Geweberegeneration ist allerdings eine ausreichende Anzahl von Zellen nötig, so dass die Kultivierbarkeit der Zellen von entscheidender Bedeutung ist. Inzwischen ist die Kultivierung dieser Zellen, welche unterschiedlichsten Ursprungs sein können, jedoch ohne Verlust des Differenzierungspotentials problemlos möglich (Meyer et al., 2005a). Hierfür wird das Ursprungsgewebe (Knochen, Periost, Knochenmark) explantiert, und die Zellen mittels unterschiedlichen Techniken (mechanische Zersetzung, Enzymdigestion) aus dem Gewebe isoliert (Handschel et al., 2006; Vacanti et al., 1993). Die isolierten Zellen können dann weiter proliferiert und differenziert werden.

## **1.2 Matrix:**

Knochen ist ein spezialisiertes Stützgewebe, der durch die Mineralisation von Osteoid, der nicht kalzifizierten extrazellulären Matrix (ECM), entsteht. Die knöcherne Regeneration wird hauptsächlich durch Osteoblasten vermittelt, welche sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren. Die Osteoblasten sezernieren ECM, welche zu 90% aus Kollagen I besteht (Löffler, 2000). In der Folge werden der ECM Kalzium- und Phosphationen zugeführt und es entstehen Hydroxylapatitkristalle (Geflechtknochen). Neben Kollagen I werden auch Osteopontin, Osteonectin, Osteokalzin sowie Alkalische Phosphatase, die im Verlauf der Knochenbildung gebildet (Aubin et al., 1996; McKee et al., 1996; Termine et al., 1996; Zernik et al., 1990). Im Rahmen der Knochenregeneration bzw. beim Tissue Engineering muss die Matrix bzw. das Trägergerüst (Scaffold) vielen Anforderungen genügen: nicht toxisch, biokompatibel, biologisch abbaubar (unter Bildung nicht toxischer Abbauprodukte), nicht immunogen, einfach chirurgisch fixierbar. Dabei soll die Matrix gleichzeitig die individuelle interne und externe Knochengeometrie nachahmen, die Knochenbildung und das Zellattachement fördern sowie durch lokale Zellen umgebaut (remodelling) werden können (Wiesmann et al., 2004). Ein optimales Trägergerüst, welche alle diese Anforderungen erfüllt, existiert derzeit noch nicht.

Scaffolds können in natürliche und künstliche Materialien unterteilt werden, wobei jede Klasse noch einmal in organische und anorganische Gruppen unterteilt wird: Es werden synthetische-organische (Polylactide, Polyglykoide), synthetisch-

anorganische (Hydroxylapatit, Kalzium-Phosphat-Composite, Glaskeramiken), natürlich-organische (Kollagen, Fibrin, Hyaluronsäure) und natürlich-anorganische Materialien (Korallenhydroxylapatit, anorganischer boviner Knochen) unterschieden. Die Zusammensetzung der Matrixkomponenten bestimmt die Eigenschaften, wie Formsteifigkeit und Bruchfestigkeit des Trägergerüsts (Wiesmann et al., 2004). Die Materialien existieren in verschiedenen Konsistenzen (Gele, spongiöse Konstrukte, hochkomplexe Strukturen mit Poren und Kanälen). Neben dem langsamen Abbau und der Möglichkeit des Ersatzes durch Knochen, ist auch die Imitation der internen und externen Knochenmorphologie entscheidend für die Qualität eines Knochen-Scaffold (Langer et al., 1993). Zu den Parametern zählen u.a. Dreidimensionalität, Materialoberfläche, Porengröße, Kanalausrichtung und Trabekelorientierung (Meyer et al., 2005b).

Die physiko-chemischen Eigenschaften der Trägermaterialien beeinflussen direkt die Zytokompatibilität (Zellattachement und Zellproliferation). Da die Zellproliferation ein direktes Maß der Zytokompatibilität darstellt, wurde die Proliferationsrate mittels CyQUANT<sup>®</sup>-Assay und Elektronenmikroskopie von ESC auf verschiedenen Trägermaterialien untersucht. Die Proliferation war am stärksten auf bovinem ICBM (insoluble collagenous bone matrix) gefolgt von  $\beta$ -Tricalciumphosphat multiporös (Cerasorb M<sup>®</sup>),  $\beta$ -Tricalciumphosphat kleinporig (Cerasorb<sup>®</sup>), Copolymer aus Polylactat und Polyglycolsäure (PLA/PGA ) sowie anorganischem bovinen Knochen (Bio Oss<sup>®</sup>)(Handschel et al., 2008b). Die physiko-chemischen Eigenschaften sind auch von entscheidender Bedeutung bei der Kompatibilität der Zellen mit einem Trägermaterial. ICBM besteht überwiegend aus Kollagen I, so dass die Ergebnisse im Einklang stehen mit verschiedenen Studien die nachwiesen, dass das Zellattachement von Osteoblasten von der Proteinbedeckung der Biomaterialoberfläche abhängt (Dennis et al., 1992; Meyer et al., 1998; Petrovic et al., 2006).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das verwendete Trägermaterial Einfluss auf die Genexpression inkubierter Zellen, beispielsweise der ESC hat(Handschel et al., 2008b). Ein Vergleich von mit und ohne Biomaterial kultivierten ESCs zeigt, dass die auf ICBM kultivierten Zellen den hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34 und Alkalischer Phosphatase signifikant vermindert exprimieren. Auf  $\beta$ -TCP kultivierte Zellen zeigten eine signifikante Abnahme der CD34- und Osteopontinexpression. Es

ist allerdings noch unklar, wie diese Veränderung des Genexpressionsmusters den Differenzierungsprozess der multipotenten Zellen beeinflusst.

Die Mikromassentechnologie ist ein Ansatz um den prozentualen Anteil von artifiziellem Scaffold an knöchernen, *in vitro* gezüchtetem Hybridgewebe zu minimieren. Dabei werden Zellen nach der Proliferation in einer 2-D-Monolayerkultur abgelöst und in spezielle, nicht adhäsive, Kulturkammern überführt. Dort bilden sich innerhalb von drei Tagen sphärische Formationen (Handschel et al., 2007; Meyer et al., 2005a). Es ist bekannt, dass die Verbindung zur ECM, z.B. über Integrine, viele zelluläre Funktionen wie Proliferation, Zelldifferenzierung, Zellmigration oder Apoptose beeinflussen kann (Boudreau et al., 1999). Bei der 3-D-Kulturform im Rahmen der Mikromassenkulturen sezernieren die Zellen die ECM selbst und können in dem gebildeten Konstrukt, frei interagieren, weshalb in den Mikromassenkulturen höhere Proliferationsraten als in den Monolayerkulturen nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus zeigen Mikromassenkulturen mit osteoblastenähnlichen Zellen eine schnellere und ausgeprägtere osteoblastäre Differenzierung als 2-D-Kulturen (Gerber et al., 2001; 2002). Dass eine chondrogene Differenzierung in einer Mikromassenkultur möglich ist, ist bekannt (Naujoks et al., 2008). Erst kürzlich konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Mikromassenkulturen auch mit ESC möglich sind wobei knorpelähnliche Differenzierungen entstehen können (Tanaka et al., 2004). Zwischenzeitlich konnte auch gezeigt werden, dass eine osteogene Differenzierung von ESC in Mikromassen möglich ist (Handschel et al., 2008b). Weiterführende Arbeiten demonstrierten, dass auch eine osteogene Differenzierung von USSC in dreidimensionalen Mikromassenkulturen möglich ist.

Ein für den klinischen Einsatz relevantes Problem ist die ortständige Transplantation von Zellen in einen Organismus. Zellsuspensionen oder Zellgele zeigen aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften die Tendenz sich im Gewebe zu verteilen und weisen nur eine geringe Ortständigkeit am Transplantationsort auf. Ein Vorteil der Mikromassenkultur ist ihre Größe (ca. 1 mm Sphären) und die mechanische Stabilität, so dass eine Zelltransplantation mit Hilfe dieser Sphären eine deutlich höhere Ortstabilität erwarten lässt. Es konnte gezeigt werden, dass ein Auswachsen von osteogen differenzierten Zellen aus den Mikromassen erfolgt, und somit wahrscheinlich eine Knochenbildung von der Mikromasse ausgehend stattfinden kann. Der Transfer von osteogen differenzierten USSC in hoher Konzentration mittels

Mikromassen stellt somit einen möglichen Ansatz für den Zelltransfer von der Kulturschale in den Empfänger dar.

Im weiteren Sinne stellen auch dentale Implantate, die zur Rehabilitation des Kauapparates verwendet werden, ein mögliches Trägergerüst für Zellen und Wachstumsfaktoren dar. Die Oberflächenbeschaffenheit von Zahnimplantaten hat einen direkten Einfluss auf deren Osseointegration. In einer Vergleichsstudie von Titanimplantaten und Zirkonoxidimplantaten konnte immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch demonstriert werden, dass der neuartige Werkstoff Zirkonoxid eine annähernd gleich gute Osseointegration wie konventionelle Titanimplantate zeigt (Depprich et al., 2008c; Depprich et al., 2008d). In vitro war die Zellproliferation auf den Zirkonoxidoberflächen signifikant höher während die Zelladhäsion und das Zellattachment auf den Titanoberflächen signifikant größer waren (Depprich et al., 2008b). Zirkonoxid scheint u.a. auch aufgrund dieser in vivo Untersuchungen ein geeignetes Material für dentale Implantate zu sein.

### **1.3 Vaskularisation:**

Ein limitierender Faktor im Bereich des Tissue Engineerings stellte die Versorgung der gebildeten Gewebekonstrukte mit Nährstoffen und Sauerstoff dar. Analog zu der Situation bei einem transplantierten nativen Knochentransplantat ist insbesondere in der Initialphase ist eine ausreichende Blutversorgung von essentieller Bedeutung. Diese sichert das Überleben, die Integration und schließlich auch die Funktionalität des implantierten, durch Tissue Engineering hergestellten, knöchernen Gewebekonstrukt (Carano et al., 2003; Pelissier et al., 2003). Die Bedeutung von einer adäquaten Durchblutung des gesamten Gewebekonstruktes wird noch einmal durch die Tatsache hervorgehoben, dass die Diffusionsgrenze für Sauerstoff und Nährstoffe nur 100 – 300 µm beträgt (Rouwkema et al., 2008). Die über größere Distanzen auftretenden Diffusionslimitationen führen zu einem Absterben der Zellen und zu azellulären Regionen (Gill et al., 1998; Goldstein et al., 2001). Eine Möglichkeit größere Konstrukte mit einer höheren Zellüberlebensrate herzustellen, stellt die Kultivierung von knöchernen Scaffolds in Bioreaktoren dar (Depprich et al., 2008a; Grayson et al., 2008; Marolt et al., 2006). Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass die erfolgreiche Implantation *in vivo* weiterhin von der Vaskularisierung des Transplantates abhängt. Im Prinzip existieren drei verschiedene Verfahren um ein

Knochentransplantat zu vaskularisieren. Neben der *in-vivo*-Vaskularisation zum Einen und der Anwendung angiogenetischer Wachstumsfaktoren zum Anderen, besteht weiterhin die Möglichkeit der Prävasikularisation des Konstruktes (Frohlich et al., 2008).

Bei der *in-vivo*-Vaskularisation werden die Knochentransplantate in eine stark vaskularisierte Umgebung eingepflanzt und man erhofft sich ein Einsprossen der Gefäße von der Oberfläche der Implantate her. Nachteile dieses Verfahrens sind zum Einen die nicht steuerbare Ausbildung neuer Gefäße im Knochen und zum Anderen die Tatsache, dass bei der Transplantation des Scaffolds in die Zielregion die neu gebildeten Gefäße durch den chirurgischen Zugangsweg beschädigt werden (Frohlich et al., 2008). Eine Möglichkeit das letztere Problem zu umgehen, stellt die sogenannte „intrinsische“ Vaskularisation dar (Kneser et al., 2006; Polykandriotis et al., 2007). Dabei wird ein Gefäß zentral in das Transplantat eingebracht, von dem die Angiogenese ausgehen soll. Dieses zentrale Gefäß wird dann mikrochirurgisch an ein bestehendes Gefäß angeschlossen oder mittels Medium perfundiert. Dies ermöglicht die Ernährung der sich auf der Matrix befindlichen Zellen, welche dann neben der Neubildung von Gefäßen auch Knochematrix bilden können. Dies ist natürlich von der Potenz der angewendeten Zellen abhängig. Da sich totipotente Stammzellen sowohl in osteogene Zellen, als auch endotheliale Zellen differenzieren können, wäre es denkbar mit einer Stammzelle ein vaskularisiertes Knochenkonstrukt zu erhalten (Kawamura et al., 2006). Pelissier und Mitarbeiter konnten zeigen, dass im Vergleich zur alleinigen Anwendung, die Kombination einer vaskulären Komponente mit Osteoprogenitorzellen des Knochenmarks, eine stärkere Neovaskularisation und Osteogenese *in vivo* erzielt (Pelissier et al., 2003).

Eine weitere Möglichkeit das Knochenkonstrukt zu vaskularisieren stellt die Anwendung von angiogenetischen Wachstumsfaktoren dar die eine entscheidende Rolle in der Angiogenese spielen, beispielsweise Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Fibroblast Growth Factor (FGF) (Jain, 2003). Bei diesem Verfahren werden die Wachstumsfaktoren in die Scaffolds auf verschiedene Arten eingearbeitet um dann das Wachstum neuer Gefäße zu Beschleunigen. Durch die verschiedenen Methoden des Einbaus der Wachstumsfaktoren in die Konstrukte kann die Releasekinetik dieser variiert werden (Laschke et al., 2006). Da die Angiogenese nicht nur von einem Wachstumsfaktor abhängt, sondern durch das Zusammenspiel von verschiedenen Wachstumsfaktoren

in spezifischen Dosierungen zu determinierten Zeitpunkten bestimmt wird, ist es notwendig die Releaskinetiken jedes einzelnen Faktors so anzupassen, dass die Voraussetzungen der Angiogenese erfüllt werden. Murphy und Mitarbeiter konnten zeigen, dass verglichen mit einem solitären Biomaterial durch die Kombination eines Scaffolds mit VEGF nicht nur eine stärkere Angiogenese, sondern auch eine gesteigerte Mineralisierung erzielt werden kann (Murphy et al., 2004). Neben der o.g. Kombination aus Wachstumsfaktoren und Biomaterialien ist des Weiteren eine Kombination der Wachstumsfaktoren mit einem Biomaterial und Zellen möglich. Auch die Kombination von angiogenetischen und osteogenen Wachstumsfaktoren ist eine mögliche Alternative. Letztendlich ist jede denkbare Kombination der in Abbildung 1 dargestellten Säulen des Tissue Engineerings möglich um ein Gewebekonstrukt zu gewinnen welches neben der Mineralisation auch eine angemessene Vaskularisation zeigt.

Die *in vitro* Prävaskularisation stellt einen weiteren vielversprechenden Ansatz zur Vaskularisation eines Knochenkonstruktes dar. Hierbei erfolgt eine Co-Kultur von endothelialen und osteogenen Zellen auf einem Biomaterial. Mesenchymale Stammzellen beispielsweise können in endotheliale Zellen differenzieren und haben somit das Potential neue Gefäße in einem Biomaterial auszubilden. Dabei ist zu beachten, dass neben den endothelialen Zellen auch andere Zellarten vorhanden sein müssen, beispielsweise glatte Muskelzellen, um eine funktionelle Vaskularisation mit der Ausbildung von Gefäßen zu ermöglichen. Neben den verwendeten Zellen ist auch das angewendete Biomaterial von entscheidender Bedeutung, da das Biomaterial den Zellen ermöglichen muss ein dreidimensionales Gefäßnetzwerk auszubilden. Verschiedenste Biomaterialien wie poröses Hydroxyapatit oder poröses Calcium-Phosphat findet dabei Verwendung (Unger et al., 2007).

Neben der Tatsache, dass endotheliale Zellen zur Vaskularisierung und damit zur Ernährung des Knochens beitragen, beeinflussen die Zellen auch gegenseitig ihren Differenzierungsprozeß. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Co-Kultur von endothelialen Zellen mit Osteoblasten zum Einen eine verlängerte Lebensdauer der endothelialen Zellen erreicht wird (Unger et al., 2007), und zum Anderen eine beschleunigte Expression des osteogenen Phänotyps der osteoblastären Vorläuferzellen erfolgte (Kaigler et al., 2005; Rouwkema et al., 2006; Villars et al., 2002). Andererseits gibt es auch Berichte mit gegensätzlichen Aussagen, nämlich

das die Co-Kultur von endothelialen Zellen und osteoblastären Zellen zu einer Hemmung der osteoblastären Differenzierung führt (Meury et al., 2006) bzw. die Ausbildung tubulärer Strukturen durch endotheliale Zellen gehemmt wird (Wenger et al., 2004). Unterschiedliche Kultivierungsbedingungen und unterschiedliche Differenzierungsgrade der Zellen könnten mögliche Gründe für die widersprüchlichen Aussagen sein. Dies bedeutet auch, dass auf diesem Gebiet noch weitere Forschung notwendig ist um die Vorgänge genau zu verstehen und um ein funktionsfähiges Modell zu erstellen.

#### **1.4 Wachstumsfaktoren:**

Neben den Zellen der Matrix und der Vaskularisation sind spezifische Wachstumsfaktoren eine weitere wichtige Säule des Tissue Engineering. Man unterscheidet die biophysikalische Stimulation des Knochenwachstums von der biochemischen Stimulation.

Knochen ist ein lebendiges Gewebe, welches ständigen Umbauvorgängen unterliegt und sich somit ständig an die wechselnden Beanspruchungen anpasst. Es ist bekannt, dass eine verminderte Belastung des Knochens zur Atrophie führt. Diese biophysikalische Beeinflussbarkeit des Knochens, kann man sich im Tissue Engineering zu Nutze machen (Wiesmann et al., 2004). Externe mechanische Kräfte haben direkten Einfluss auf die osteoblastäre Proliferation, die Zellorientierung und die Genaktivität. Brown et al. konnte nachweisen, dass eine zyklische Zugbeanspruchung zu einer Veränderung der Zellorientierung und der Genaktivität führt (Brown et al., 1997). Osteoblasten sind sehr sensitiv auf mechanische Deformationen. Im Falle der Kraftübertragung vom Scaffold auf den Osteoblast führt dies zu einer erhöhten Osteoblastenproliferationsrate (Meyer et al., 1999a; Meyer et al., 1999b) und zur einer Veränderung der Expression knochenspezifischer Proteine wie Alkalische Phosphatase, Osteopontin und Osteokalzin (Meyer et al., 1999a; Meyer et al., 1999b). Der Mechanismus dieser Veränderungen ist noch nicht vollständig geklärt.

Neben der mechanischen Stimulation besteht die Möglichkeit der Stimulation mit piezoelektrischen Potentialen, welche Osteoblasten über elektrische Felder beeinflussen (Hartig et al., 2000). Eine elektrische Langzeitstimulation von

Osteoblasten führt zu einer Veränderung des Genexpressionsmusters und zu einer erhöhten Synthese von extrazellulärer Matrix (Wiesmann et al., 2001).

Eine weitere Möglichkeit die osteogene Differenzierung einzuleiten oder zu fördern ist die biochemische Stimulation durch Zytokine und bioaktive Proteine (Schliephake et al., 2002). Während der Knochenbildung werden viele verschiedenen biologisch aktive Moleküle exprimiert, wovon einige das Potential zur Förderung der Knochenregeneration besitzen (Schliephake et al., 2002; Terheyden et al., 2001). Zu diesen Faktoren zählen u.a. transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), bone morphogenic proteins (BMP), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF) und insulin-like growth factor (IGF). Im Jahre 1988 gelang es die Aminosäuresequenzen und nachfolgend auch die kodierenden Gene mehrerer ostoinduktiver Proteine zu entschlüsseln (Wozney et al., 1988). Aufgrund von Homologien wurden die BMPs der TGF- $\beta$  Superfamilie zugeordnet. Die Proteine dieser Familie sind an der Regulation einer Reihe von zellulären Aktivitäten wie Wachstum, Differenzierung und Synthese extrazellulärer Matrix beteiligt. Zwischenzeitlich wurden 15 BMP-Isoformen identifiziert, wobei nach derzeitigem Wissensstand die BMPs-2,-4 und -7 durch die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten, eine wichtige Rolle bei der Knochenheilung bzw. -bildung übernehmen (Schmitt et al., 1999). Durch die genetische Modifikation dieser Wachstumsfaktoren versucht man die Faktoren dahingehend zu modifizieren, dass sie eine optimale Förderung der Knochenbildung bedingen. Beispielsweise kann das Bindungsverhalten der BMPs an Komponenten der ECM gezielt beeinflusst werden (Kubler et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Steigerung der Heparinbindungsfähigkeit von BMP-2 zu einer gesteigerten osteoinduktiven Wirkung führt. So zeigten im Tierversuch BMP-Varianten mit einer erhöhten Heparinbindungsfähigkeit (durch Einfügung zusätzlicher Triplets basischer Reste am N-terminalen Ende) eine deutlich bessere Knochenbildung als das natürliche BMP-2. Die gesteigerte Osteoinduktivität der modifizierten BMPs wurde durch die verstärkte Bindung an die ECM und damit reduzierten Abdiffusion der Moleküle erklärt (Depprich et al., 2005). Ein ähnlicher Effekt wurde auch für andere Wachstumsfaktoren wie FGF-2 nachgewiesen (Richard et al., 1995).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Das Tissue Engineering stellt einen alternativen Therapieansatz zur Versorgung knöcherner Defekte dar. Neben der Auswahl geeigneter Ausgangsgewebe bzw. Zelllinien ist die Entwicklung geeigneter Trägermaterialien, welche biokompatibel, biologisch abbaubar sind und gleichzeitig die biophysikalischen und biochemischen Anforderungen erfüllen, von entscheidender Bedeutung. Wachstumsfaktoren können sowohl die Zelldifferenzierung als auch die Zellproliferation stark beeinflussen. Des Weiteren ist die Vaskularisation der Gewebekonstrukte von entscheidender Bedeutung, da dadurch die Größe der Konstrukte ausgeweitet werden kann und ein sicherer Transfer in Zielregionen (mikrovaskuläre Anastomosen) ermöglicht wird. Auch wenn noch längst nicht alle Probleme und Fragen gelöst sind, eröffnet die in vitro Züchtung von Knochengewebe vielversprechende Perspektive für den Knochenersatz in der Zukunft.

USSCs stellen eine viel versprechende Zellart im Rahmen des osteogenen Tissue Engineerings dar und besitzen deutliche Vorzüge verglichen mit anderen pluri- und totipotenten Stammzellen. Ziel dieser Studie ist daher, die Eignung dieser Zellen für das osteogene Tissue Engineering durch die Kombination mit einem Biomaterial zu analysieren.

Im Einzelnen sollen dabei folgende Fragen geklärt werden:

1. Welche gängigen Biomaterialien (Matrix) zeigen eine hohe Biokompatibilität mit osteogen vordifferenzierten USSCs?
2. Beeinflusst das Biomaterial den osteogenen Differenzierungsprozeß von USSCs?

## 2 Material und Methode

### 2.1 Materialliste

#### *Zellen:*

Für die Versuche wurden humane Nabelschnurstammzellen (Unrestricted Somatic Stem Cells, USSC) verwendet. Die Zellen wurden vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch Frau Professor G. Kögler, Leiterin der José Carreras Stammzellbank, zur Verfügung gestellt.

#### *Biomaterialien:*

Boviner ICBM (insoluble collagenous bone matrix)

Die Herstellung erfolgte im eigenen Labor aus Rinder-Femurknochen.

Anorganischer boviner Knochen, Bio-Oss<sup>®</sup>

(Fa. Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz)

β-Trikalziumphosphat kleinporig, Cerasorb<sup>®</sup>

(Fa. Curasan, Kleinostheim, Deutschland)

β-Trikalziumphosphat multiporös, Cerasorb M<sup>®</sup>

(Fa. Curasan, Kleinostheim, Deutschland)

equines Kollagen, KOLLAGEN-resorb<sup>®</sup>

(Resorba Wundversorgung GmbH & Co KG, Nürnberg, Deutschland)

#### *Zellkulturmedien und Chemikalien*

Ethanol 99,5%, 96%

Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

Formaldehydlösung 4% (gepuffert, pH 6,9)

Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

Chloroform ACS-Grade

Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

Methanol-Lösung

Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%

Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

Salzsäure 0,5 M (HCl)

Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

4M Guanidin-HCl/50 mM Tris-HCl (pH 7,0)

Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

50 mM Tris-HCl (pH 7,0)/0,15 M NaCl

Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

Basismedium zur USSC-Kultivierung:

350ml Dulbecco's modified eagle medium

Fa. Lonza, Verviers (B)

50ml Fetal Bovine Serum (FKS)

Fa. Biochrom AG, Berlin (D)

5ml L-Glutamin (200mM)

Fa. Biochrom AG, Berlin (D)

5ml Penicillin/Streptomycin (10000U/10000µg/ml)

Fa. Biochrom AG, Berlin (D)

## Herstellung von DAG

Ascorbinsäure

Fa. Sigma, Taufkirchen (D)

Dexamethason

Fa. Sigma, Taufkirchen (D)

$\beta$ -Glycerolphosphat

Fa. Sigma, Taufkirchen (D)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) 1X

Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7,4) 10X

Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

Trypsin-EDTA (0,25%), flüssig

Fa. Gibco, Karlsruhe, (D)

## *Enzymassay:*

CyQuant Cell Proliferation Assay Kit<sup>®</sup>

Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

## *real time PCR*

Primer für die real time RT-PCR:

GAPDH

Sequenz:

mgapd5      5' - CAA TGA ATA CGG CTA CAG CAA C-3'

mgapd3      5' - AGG GAG ATG CTC AGT GTT GG-3'

Fa. MWG-Biotech AG, Ebersberg (D)

## Alkalische Phosphatase

Sequenz:

malp5 5'- AAG GCT TCT TCT TGC TGG TG-3'

malp3 5'- GCC TTA CCC TCA TGA TGT CC-3'

Fa. MWG-Biotech AG, Ebersberg (D)

## Osteonectin

Sequenz:

mostne5 5'- CTT TGG CAT CAA GGA GCA G-3'

mostne3 5'- TCA GAG GGA GAG AGT TCA GGA-3'

Fa. MWG-Biotech AG, Ebersberg (D)

## Kollagen I

Sequenz:

mprocol5 5'- AAG GGG TCT TCC TGG TGA AT-3'

mprocol3 5'- GGG GTA CCA CGT TCT CCT C-3'

Fa. MWG-Biotech AG, Ebersberg (D)

## RNeasy Mini Kit<sup>®</sup>

Fa. Quiagen, Hilden (D)

## SuperScript<sup>®</sup> II Reverse Transcriptase

Fa. Invitrogen, Karlsruhe (D)

## Oligoid dT-Primers<sup>®</sup>

Fa. Peqlab, Erlangen (D)

## QuantiTect SYBR Green PCR Kit

Fa. Quiagen, Hilden (D)

## *Rasterelektronenmikroskopie*

Glutaraldehyd 2,5 %

Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7,4) 10X

Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

Aceton, getrocknet

Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

## *Geräte, Laborhilfsmittel und weiter Materialien*

iCycler Thermal Cycler Base

Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)

Rasterelektronenmikroskop REM S 3000

Fa. Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Krefeld (D)

Cressington Sputter 108Auto

Cressington Scientific Instruments Ltd., Watford (UK)

BAL-Tec Dryer CPD-030

Fa. BAL-TEC GmbH, Schalksmühle (D)

Dampfstrahlgerät D-S100

Fa. Harnisch & Rieth GmbH & Co KG, Winterbach (D)

6, 48 und 96 Well Cell Culture Cluster, costar

Fa. Corning Incorporated, New York (USA)

T25 Kulturflaschen, costar

Fa. Corning Incorporated, New York (USA)

Autoklav: D-65

Fa. Systec GmbH, Wetzlar (D)

Gefrierschränke

Fa. Liebherr, Ochsenhausen (D)

Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)

Heracell 240 CO2 Inkubator

Fa. Kendro Laboratory Products, Langenselbold (D)

Kühlschränke

Fa. Liebherr, Ochsenhausen (D)

Kulturschalen

Fa. Vitaris, Baar (Schweiz)

Low Temperature Freezer Vials, 1,2 ml

Fa. VWR International bvba, Leuven (B)

MBT PAP-PEN,

Fa. Micro-Bio-Tec-Brand, Gießen (D)

Mikroliterpipette Research

Fa. Eppendorf, Wesseling-Erzdorf (D)

Millipore-Anlage Direct-Q UV3

Fa. Millipore, Billerica (Massachusetts, USA)

Messzylinder, B, blau graduiert 100: 1ml

Fa. Hirschmann, Eberstadt (D)

Messzylinder, B, blau graduiert 500: 5 ml

Fa. Hirschmann, Eberstadt (D)

Multifuge

Fa. Kendro Laboratory Products, Langenselbold (D)

Pinzette

Fa. Hammacher, Solingen (D)

Pipettenspitzen TipOne (0,1 – 10; 1-100; 101-1000 µl)

Starlab GmbH, Ahrensburg (D)

Sterile Zentrifugen- und Probenröhrchen, 50 ml

Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)

Stoppuhr

Fa. neoLab®, Heidelberg (D)

Zentrifuge, Multifuge 1 S-R

Fa. Hereaus, Osterode (D)

## **2.2 Kultivierung der Zellen und osteogene Vordifferenzierung**

Für den Versuch zur Knochengewinnung in vivo wurden humane Nabelschnurstammzellen (USSC) verwendet. Die humanen Nabelschnurstammzellen wurden vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch Frau Professor G. Kögler, Leiterin der José Carreras Stammzellbank, zur Verfügung gestellt. Gewonnen werden die Zellen ausschließlich mit Einverständnis der Mutter. Gewinnung und Kultivierung erfolgen standardisiert nach einem bereits von der Arbeitsgruppe publizierten Protokolls (Kogler et al, 2004). Im Prinzip erfolgt eine Ficoll (Biochrom) Gradientenzentrifugation um die mononukleären Zellen zu isolieren. Anschließend erfolgt die Aussaat von  $5 - 7 \times 10^6$  Zellen mit DMEM-Medium (Cambrex) in T25 Kulturflaschen (costar) unter dem Zusatz von 30% fetalem Kälber Serum (FCS), Dexamethason ( $10^{-7}$  M; Sigma-Aldrich), Penicillin (10U/ml; Grünenthal), Streptomycin (100 mg/ml; Hefa-pharm) und Ultraglutamin (2mM; Cambrex). Während der folgenden Zellexpansion wurde das Dexamethason aus dem Medium

weggelassen. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einer befeuchteten Atmosphäre bei 37° C in 5% CO<sub>2</sub>. Bei einer Konfluenz von 80% erfolgte eine Aufspaltung der Zellen nachdem sie mittels 0.25% Trypsins (Lonza) abgelöst wurden. Es erfolgte eine erneute Aussaat der Zellen in einem Verhältnis von 1:3. Nach der Proliferation der Zellen erfolgte die osteogene Vordifferenzierung der Zellen durch den Zusatz von 0.1 µM Dexamethason, 50 µM Ascorbinsäure und 10 mM β-Glycerolphosphat (DAG, alle von Sigma) zum normalen Kulturmedium gemäß bereits veröffentlichten Protokollen anderer Autoren (Bielby et al., 2004; Buttery et al., 2001; Chaudhry et al., 2004; Depprich et al., 2008d).

### **2.3 Kultivierung der osteogen vordifferenzierten USSCs auf den Biomaterialien**

Nach einer dreitägigen osteogenen Vordifferenzierung der USSCs mit DAG wurden 200.000 Zellen suspendiert in 300µl Medium auf jeden Biomaterialprobenkörper aufgebracht und unter den o.g. Bedingungen ohne den Zusatz von DAG für 24 Stunden in 48-Well-Platten kultiviert. Vor der Besiedelung mit den Zellen erfolgte eine 24stündige Einlage der Biomaterialprobenkörper in das Medium. Um die Oberfläche der Probenkörper der verschiedenen Biomaterialien zu standardisieren wurden genormte Probenkörper von 1 cm Durchmesser und 0,5 cm Dicke verwendet. Nach 24 Stunden wurden die Probenkörper in 6-Well-Platten überführt um den Einfluss nicht an die Probenkörper gebundene Zellen zu minimieren. Um das Zellattachement zu untersuchen wurde die Hälfte der Probenkörper zu diesem Versuchszeitpunkt (Tag 1) mittels CyQuant® -assay analysiert. Die zweite Hälfte der Probenträger wurde unter den oben genannten Kultivierungsbedingungen ohne DAG-Zusatz für weitere sieben Tage kultiviert. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte jeden zweiten Tag. Am Tag sieben erfolgte dann eine CyQuant®-Analyse der restlichen Probenkörper um die Proliferation der Zellen auf dem Biomaterial bestimmen zu können.

### **2.4 Herstellung von ICBM**

Die Herstellung erfolgte im eigenen Labor aus Rinder-Femurknochen und Rinder-Tibiaknochen gemäß einem bereits etablierten Protokoll (Depprich et al., 2005;

Wurzler et al., 2004). Zur Herstellung der ICBM-Probenkörper wurden zunächst 1 cm dicke Scheiben aus den spongiösen Anteilen von mindestens 24 Stunden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Rinderknochen herausgesägt und diese anschließend mit der Bandsäge zu 0,5 cm dicken Spongiosascheiben halbiert. Dabei wurden in erster Linie die knienahen Anteile der Fibula und der Tibia verwendet. Nach Entfernung von Muskelansätzen, Periost und Kompakta wurde das Knochenmark mittels eines Dampfstrahlers (D-S 100, Fa. Harnisch & Rieth GmbH & Co KG, Winterbach, Deutschland) und Druckluft entfettet. Es folgten drei weitere Entfettungsschritte mittels einer Chloroform-Methanol-Lösung (Verhältnis 3:1, Merck) für jeweils 24 Stunden unter kontinuierlicher Durchmischung der Lösung. Nach erfolgter Entfettung erfolgte ein 30 minütiger Waschvorgang in destilliertem Wasser und anschließend die Bleichung der Probenkörper mit 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Merck) sowie ein erneuter Waschvorgang in destilliertem Wasser für 15 Minuten. Zur Demineralisierung der Probenkörper wurden sie nun dreimal in 0,5 M Salzsäure (HCl, Merck) für jeweils 90 Minuten unter ständiger Durchmischung der Lösung gewaschen. Danach wurden mit einem Trepanbohrer (1 cm Innendurchmesser) Probenkörper herausgebohrt. Somit hatten die gewonnenen Probenkörper einen Durchmesser von 1 cm und eine Höhe von 0,5 cm (Abb. 3).

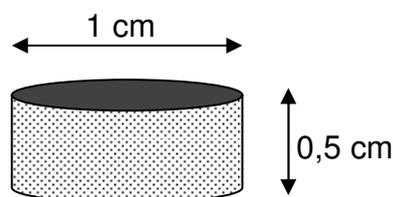


Abb. 3: Schemazeichnung eines Probenkörpers

Es folgte eine Inkubation der Probenkörper in 4 M Guanidin-HCl/50 mM Tris-HCl (pH 7,0) (Merck) für 16 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  zur Inaktivierung osteoinduktiver Matrixproteine. Anschließend erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt in 50 mM Tris-HCl (pH 7,0) /0,15 M NaCl (Merck) für 4 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$ , gefolgt von einer erneuten Waschung der Probenkörper in destilliertem Wasser für 30 Minuten. Abschließend wurden die Probenkörper erneut für mindestens 24 Stunden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend lyophilisiert für 24 Stunden bei  $-4^{\circ}\text{C}$  und 0,05 mbar. Die fertigen Probenkörper wurden im Kühlschrank bei  $-4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

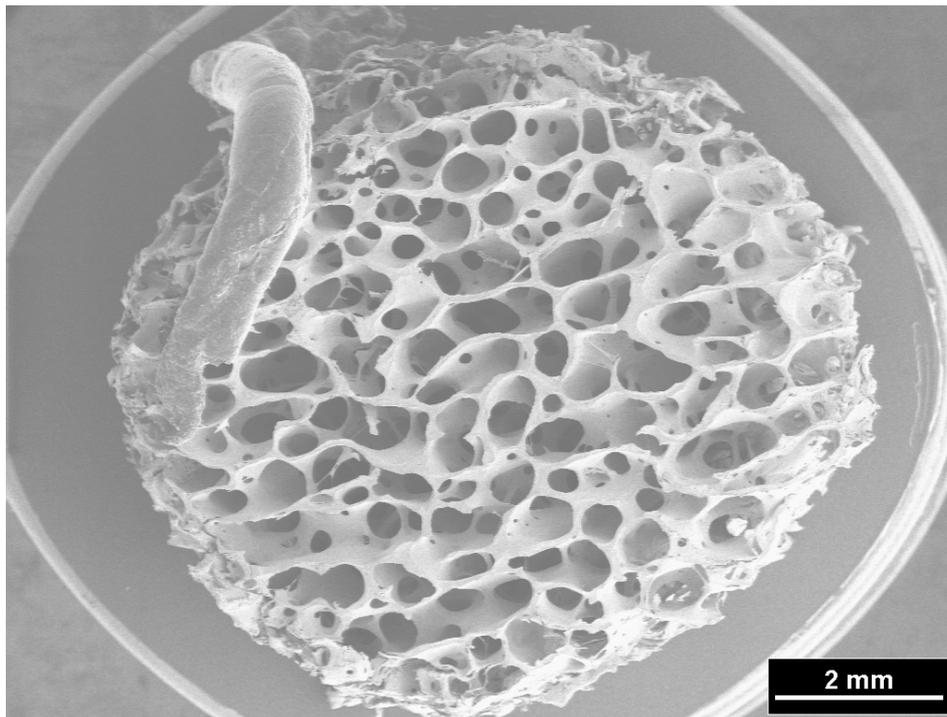


Abb. 4: REM-Aufnahme eines ICBM-Probenkörpers. Es sind deutlich die großen, interkonnektierenden Poren sichtbar. Links oben ist der für die Mikroskopie technisch notwendige Graphit-Kontakt zu erkennen.

## 2.5 Verwendete Biomaterialien

Folgende Biomaterialien wurden auf ihre Biokompatibilität zu humanen USSCs getestet:

- Boviner ICBM (insoluble collagenous bone matrix)
- Anorganischer boviner Knochen, Bio-Oss<sup>®</sup>  
(Fa. Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz)
- $\beta$ -Trikalziumphosphat kleinporig, Cerasorb<sup>®</sup>  
(Fa. Curasan, Kleinostheim, Deutschland)
- $\beta$ -Trikalziumphosphat multiporös, Cerasorb M<sup>®</sup>  
(Fa. Curasan, Kleinostheim, Deutschland)
- equines Kollagen, KOLLAGEN-resorb<sup>®</sup>  
(Resorba Wundversorgung GmbH & Co KG, Nürnberg, Deutschland)

Bei Bio-Oss<sup>®</sup> handelt es sich um ein häufig in der Klinik eingesetztes xenogenes Knochenersatzmaterial das kommerziell bei der Firma Geistlich Biomaterials, Schweiz erwerblich ist. Hierbei handelt es sich um ein spongiöses Hydroxylapatit bovinen Ursprungs, welchem durch thermische und chemische Behandlung sämtliche organische Bestandteile entzogen wurden. Bei diesem Vorgehen bleibt die ursprüngliche Mineralstruktur erhalten. Das Biomaterial zeigt eine variable Porengröße von mehreren hundert  $\mu\text{m}$  und besitzt eine ähnliche Makro- und Mikrostruktur wie die humane Spongiosa mit einer spezifischen Oberfläche von ca.  $80 \text{ m}^2/\text{g}$  (Weibrich et al., 2000). Im Rahmen der Knochenregeneration wird es als osteokonduktiv eingestuft (Schlegel et al., 2003). Zur Anwendung kamen die 100g Blöckchen, welche auf die normierte Größe von  $1 \times 0,5 \text{ cm}$  zugeschnitten wurden. Für den Versuch wurden die Bio Oss<sup>®</sup> Blöcke vor dem Aufbringen der Zellen für 24 Stunden in NaCl gewässert.

Bei Cerasorb<sup>®</sup> und Cerasorb M<sup>®</sup> handelt es sich um vollständig resorbierbare Präparate aus phasenreinem ( $\geq 99\%$ )  $\beta$ -Trikalziumphosphat unterschiedlicher Porosität. Dabei hat Cerasorb M<sup>®</sup> interkonnektierende Poren und gilt als multiporös mit unterschiedlichen Porengrößen von  $5 - 500\mu\text{m}$ . Die Gesamtporosität beträgt nach Angaben des Herstellers 65%. Im Rahmen der Knochenregeneration werden beide Präparate als osteokonduktiv angesehen.

KOLLAGEN-resorb<sup>®</sup> hat eine schwammartige Struktur und besteht aus Kollagen equiner Herkunft. Durch einen speziellen Herstellungsprozeß wird das Präparat durch den Hersteller derart aufgereinigt, dass es eine hohe Biokompatibilität und nur geringe Antigenität aufweist. Dabei enthält  $1 \text{ cm}^2$  KOLLAGEN-resorb<sup>®</sup> ca.  $2,8 \text{ mg}$  equine, native Kollagenfibrillen. Im Rahmen der Knochenregeneration wird es als osteokonduktiv bezeichnet. Zur Normierung der Oberfläche wurden unter sterilen Bedingungen Probenkörper von  $1 \text{ cm}$  Durchmesser und einer Höhe von  $0,5 \text{ cm}$  aus  $7 \times 3 \text{ cm}$  großen Körpern gefertigt.

## **2.6 CyQuant-Assay zur Bestimmung des Attachments und der Proliferation**

Um das Attachment und die Proliferation der Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien zu analysieren wurde ein CyQuant<sup>®</sup>-assay am Tag 1 und Tag 7 gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (CyQuant Cell Proliferation Assay Kit<sup>®</sup>, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Dabei spiegelten die Ergebnisse an Tag

eins das Zellattachment und die Ergebnisse des Tag 7 die Proliferation der Zellen auf den Biomaterialien wieder. Der CyQuant<sup>®</sup>-assay ist eine hoch sensitive, fluoreszenzbasierte Analyse zur Ermittlung der Zellzahl. Das Prinzip beruht auf einer Messung der Gesamt-DNA mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes (CyQuant GR dye) mit hoher Affinität zu zellulärer DNA nach erfolgter Zelllyse. Zunächst erfolgte das Ansetzen des Reagenzien gemäß den Angaben des Herstellers, bestehend aus einer Mischung des mit destilliertem Wasser 20-fach verdünnten Lysepuffers (Cell Lysis Buffer Stock Solution) und dem darin 400-fach verdünnten Fluoreszenzfarbstoff (CyQuant GR Working Solution). Das Prinzip dieser Lösung besteht in der Lyse der Zellen und somit Freisetzung der DNA durch den Lysepuffer. Nun kann der Fluoreszenzfarbstoff an die Nukleinsäuren binden und einen Farbstoff-DNA-Komplex bilden. Dieser Komplex emittiert Licht der Wellenlänge 480 - 520 nm (Emissionsmaxima). Mit einem Fluorometer erfolgt die quantitative Detektion der Lichtemission. Gemäß Jones et al. korreliert der gemessene Wert linear mit der Zellzahl in einem Bereich von 50 – 50.000 Zellen (Jones et al., 2001). Unter den o.g. Bedingungen lagen die in dieser Studie ermittelten Zellzahlen in diesem Intervall.

## **2.7 Real time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

Um den Einfluss der Biomaterialien auf das osteogene Genexpressionsmuster zu analysieren wurde eine quantitative real time Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Da das Hauptaugenmerk dieser Studie auf die osteogene Differenzierung der Zellen gelegt wurde, wurden Gene mit einer Schlüsselfunktion in der osteogenen Differenzierung analysiert. Neben der Alkalische Phosphatase (AP) wurden Kollagen I und Osteonectin untersucht. Die ausgewählten Primer entstammen der Gendatenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information). Die Sequenzen sind in der Materialliste aufgelistet. Entsprechende Sonden wurden aus der Universal ProbeLibrary (Fa. Roche) ausgewählt. Die Versuche wurden dreimal wiederholt und die Ergebnisse als Mittelwerte dargestellt. Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit<sup>®</sup> (Quiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Herstellung der cDNA erfolgte unter Einsatz von 800 ng RNA (Matrize) mittels SuperScript<sup>®</sup> II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und Oligoid dT-Primers<sup>®</sup> (Peqlab, Erlangen, Deutschland).

Für die Quantitative RT-PCR wurden alle Reagenzien zu einem Mastermix vereinigt. Pro Reaktionsansatz bestand dieser aus 6,4 µl DNase/RNase freies Wasser 0,3 µl Primer ‚forward‘ und 0,3 µl Primer ‚reverse‘, 0,5 µl Sonde und 12,5 µl Master Mix (Reaktionspuffer, dNTPs (inklusive dUTP), HotGoldStar DNA Polymerase, MgCl<sub>2</sub>, Uracil-N-Glycosylase, Stabilisatoren); Gesamtvolumen 20 µl. Für jeden Reaktionsansatz wurde jeweils ein Well einer 96 Well Platte mit 20 µl Mastermix gefüllt, anschließend 5 µl cDNA (1:10 in DNase/RNase freiem Wasser verdünnt) hinzugegeben und die Wells wurden dicht verschlossen. Somit wurde die Amplifizierung mit insgesamt 1µL cDNA (Verdünnung 1:10) und des spezifischen Primern durchgeführt. Sämtliche Pipetierschritte erfolgten auf Eis um die Aktivität der Polymerase zu hemmen. Die quantitative RT-PCR erfolgte mit dem iCycler Thermal Cycler Base (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Tabelle 2 gibt das gewählte Temperatur-Zeit-Profil wieder.

Zyklen Nr.	Anzahl Zyklen	der Steps innerhalb der Zyklen	Temperatur	Dauer
1	1	Step 1:	50 °C	10 min
2	1	Step 1:	95 °C	10 min
3	35	Step 1:	95 °C	20 sec
		Step 2:	60 °C	45 sec
4	1	Step 1:	4 °C	HOLD

Tabelle 2: Temperatur-Zeit-Profile der RT-PCR

Der Anstieg der Reaktionsprodukte während der PCR wurde durch eine Messung der Fluoreszenzzunahme überwacht. Die Fluoreszenzzunahme ist durch die zunehmende Bindung des SYBR<sup>®</sup> Green Farbstoffes (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland) an die amplifizierte doppelsträngige DNA bedingt.

Die Genexpressionswerte der untersuchten Gene wurden gegen GAPDH normiert und die Werte von Tag 7 wurden mit den Werten der Ausgangskultur (Tag 0, ohne

Biomaterial) verglichen. Diese Ausgangskultur wurde unter den gleichen Bedingungen drei Tage osteogen vordifferenziert, hatte danach jedoch keinen Kontakt zu einem Biomaterial.

Um präparationsbedingte Fehler zu minimieren, wurde ein durch Pfaffl und Mitarbeiter publiziertes Rechenmodell zur Analyse einer RT-PCR angewendet (Pfaffl, 2001). Um diese Modell anzuwenden ist es notwendig ein Housekeeping-Referenzgen auszuwählen, beispielsweise GAPDH, um die relativen Expressionslevel der Gene errechnen zu können. Die Unterschiede wurden statistisch mittels der  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  Methode analysiert. Diese Methode stellte einen praktischen Weg zur Analyse der relativen Änderungen der Genexpression in der quantitativen real-time PCR dar. Bei dieser Methode erfolgt die Normierung der Expression eines Zielgenes mit der Expression eines konstant exprimierten Genes (housekeeping gene), in diesem Fall GAPDH:

$$(\Delta Ct_{\text{Zielgen}} = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Haushaltsgen}})$$

Das  $\Delta Ct_{\text{Zielgen}}$  wird dann mit der normierten Expression eine Kontrollgruppe verglichen.

Die vollständige Formel zur Berechnung der relativen Änderungen der Genexpression stellt sich somit folgendermaßen dar:

$$2^{-\Delta \Delta Ct} = (Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Haushaltsgen}})_{\text{Probe}} - (Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Haushaltsgen}})_{\text{Kontrolle}}$$

## 2.8 Rasterelektronenmikroskopie

Zur morphologischen Analyse wurden Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop nach sieben Tagen Kultivierung angefertigt. Zu diesem Zweck erfolgte eine Fixierung der Probenkörper mit 2,5 %igem Glutaraldehyd in 0,1 M PBS (pH = 7,3). Anschließend wurden die Probenkörper dreimal in 0,1 M PBS gewaschen und folgend ein einer ansteigenden Azetonreihe dehydriert. Begonnen wurde mit 50%igem Aceton ansteigend zu 100%igem Aceton in 10% Schritten. Im Anschluss erfolgte die Kritische-Punkt-Trocknung der Proben mit CO<sub>2</sub>-basierten BAL-Tec Dryer CPD-030) gemäß dem Protokoll des Herstellers. Eine Besputterung der Probenkörper erfolgte mit Gold mittels Cressington Sputter 108Auto, Cressington Scientific Instruments Ltd., Watford, Großbritannien. Anschließend erfolgte die

Aufnahme der REM-Bilder mit dem REM S 3000 (Hitachi) mit einer angelegten Beschleunigungsspannung von 15kV.

### **2.9 Statistische Analyse:**

Alle statistischen Analysen wurden mittels SPSS-Software (Version 17.0) durchgeführt. Die statistische Auswertung der CyQuant®-Untersuchung um den Einfluss der Biomaterialien auf das Attachment und die Proliferation der Zellen zu analysieren, erfolgte mittels einer ANOVA. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf 5% festgelegt. Wie bereits unter 2.7 erwähnt, erfolgte die Analyse der Änderungen der relativen Expressionen der Gene mittels der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der CyQuant®-Auswertung

Um die Biokompatibilität humaner USSCs mit den verschiedenen Biomaterialien zu untersuchen erfolgte die Messung der Zellzahl an Tag eins und Tag sieben des Experimentes. Dabei spiegelt die Messung der Zellzahl an Tag eins das Attachment der USSCs auf dem Biomaterial und die Messung am Tag sieben die Proliferation der Zellen auf dem Biomaterial wieder. Das Attachment und die Proliferation von Zellen auf einem Biomaterial können als Maß für deren Biokompatibilität auf diesem Material angenommen werden.

ICBM und Cerasorb M® zeigten die höchste Zellzahl an Tag eins gleichbedeutend mit der Tatsache, dass die USSCs auf diesen Biomaterialien ein signifikant besseres Attachment als auf den anderen Biomaterialien zeigten (Abb. 5 und 6). Ein Vergleich des Attachements zwischen Cerasorb M® und ICBM zeigte keinen signifikanten Unterschied.

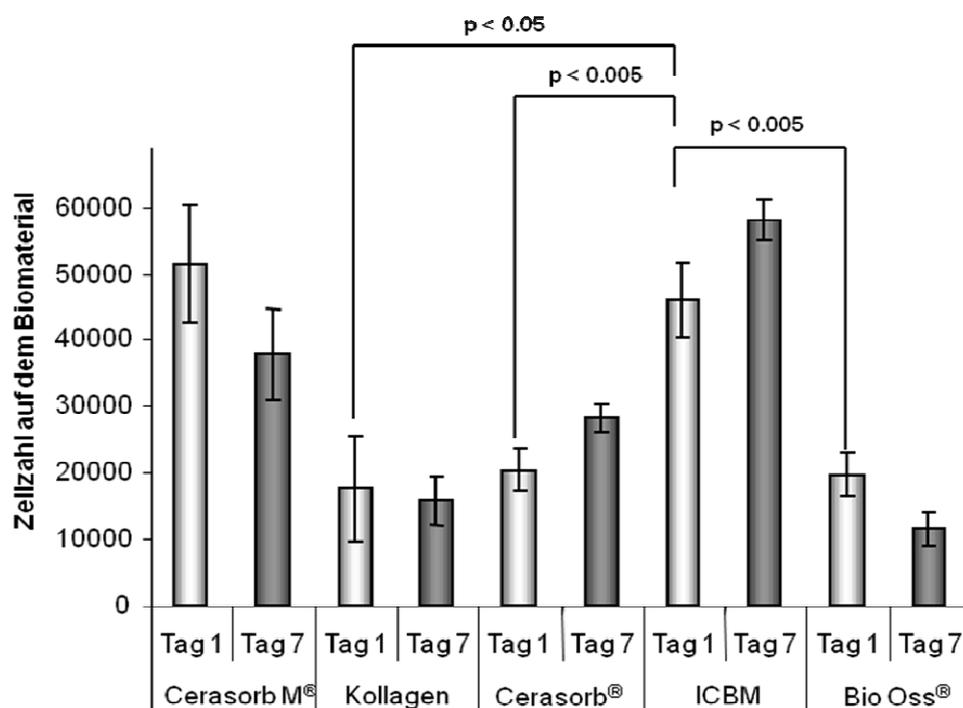


Abb. 5: Vergleich des Zellattachments auf den verschiedenen Biomaterialien mittels CyQuant® am Tag eins. Dargestellt sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und das Signifikanzniveau. Die USSCs zeigen ein signifikant besseres Attachment auf ICBM verglichen mit Kollagen, Cerasorb® und Bio Oss®.

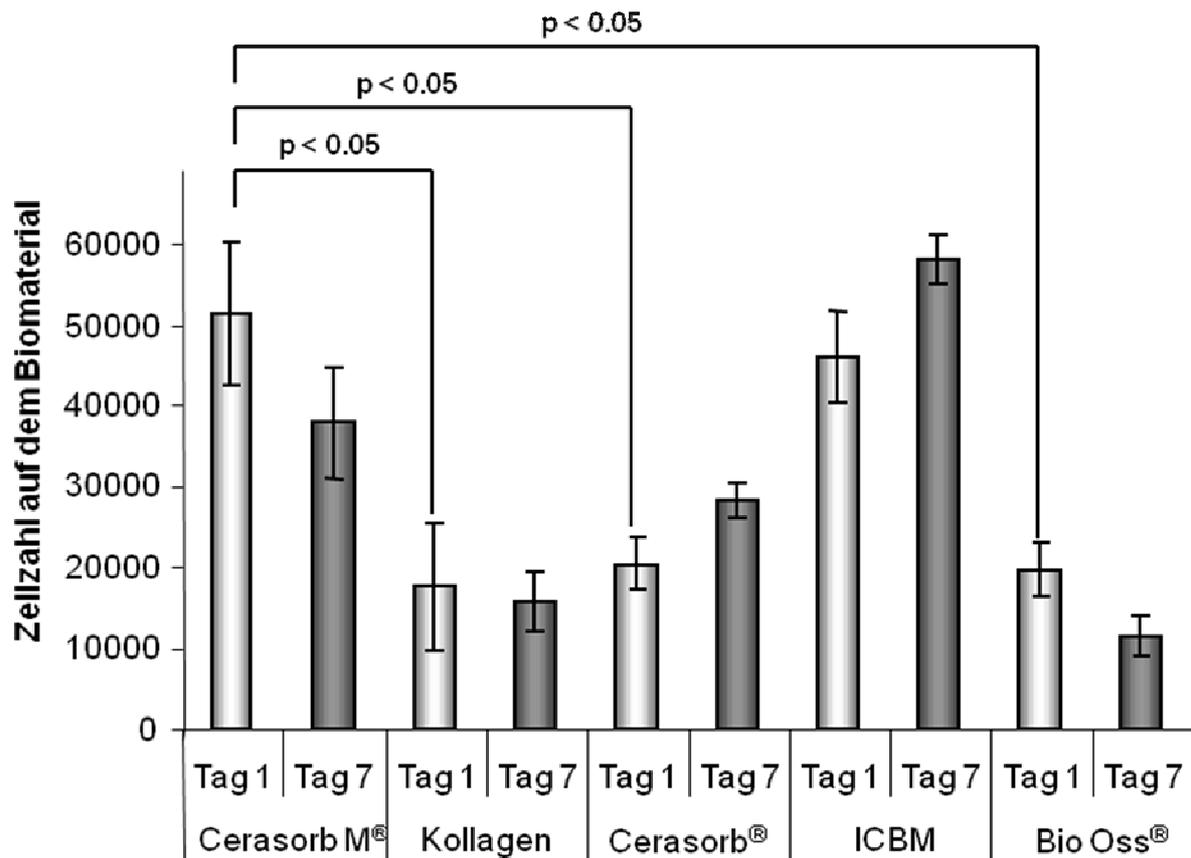


Abb. 6: Vergleich des Zellattachments auf den verschiedenen Biomaterialien mittels CyQuant® am Tag eins. Dargestellt sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und das Signifikanzniveau. Die USSCs zeigen ein signifikant besseres Attachment auf Cerasorb M® verglichen mit Kollagen, Cerasorb® und Bio Oss®.

Die USSCs zeigten eine signifikant bessere Proliferation von Tag eins zu Tag sieben auf ICBM ( $p < 0.05$ ) und Cerasorb® ( $p < 0.05$ ). Sämtliche anderen Biomaterialien zeigten einen Abfall der Zellzahl über die Dauer des Experimentes, allerdings erreichte dieser Abfall der Zellzahl nur bei Bio Oss® ein statistisches Signifikanzniveau ( $p < 0.05$ ) (Abb. 7).

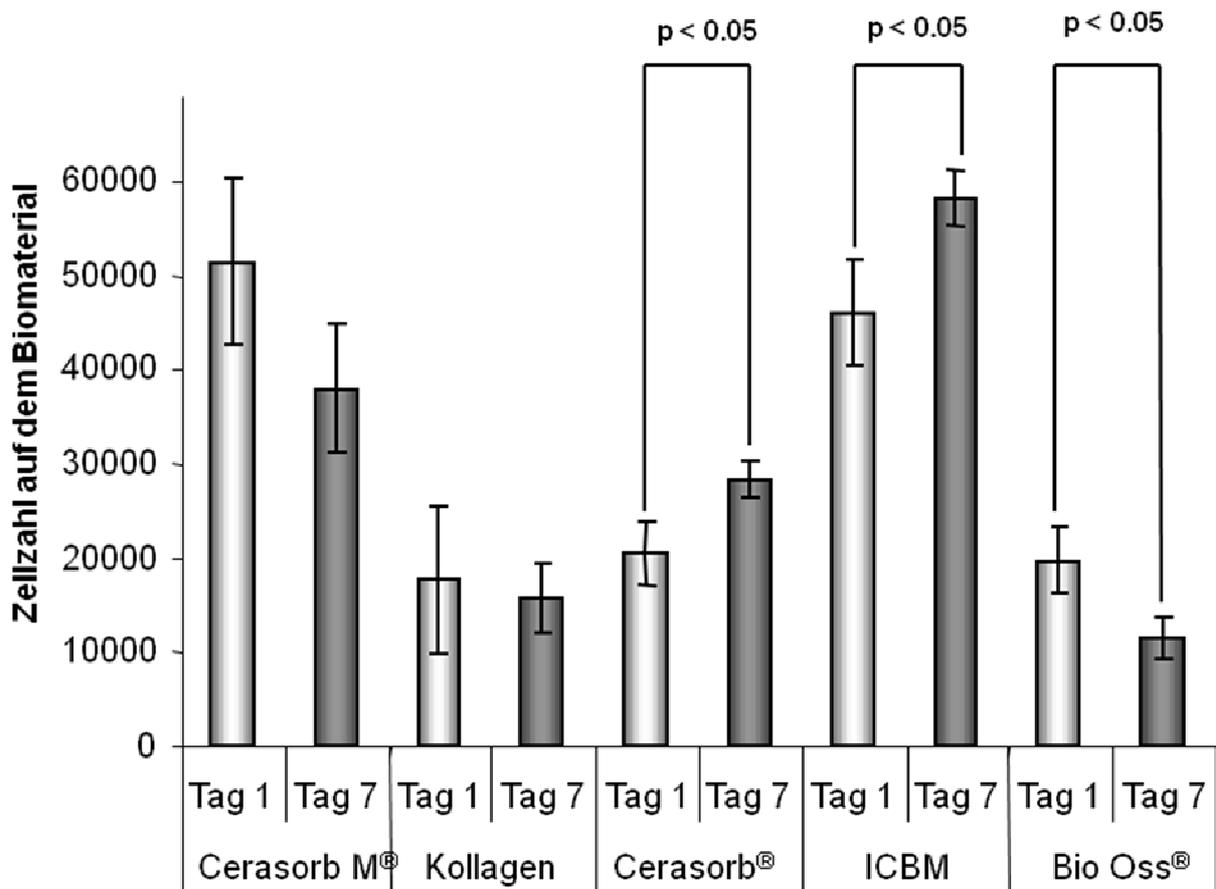


Abb. 7: Vergleich der Zellproliferation auf den verschiedenen Biomaterialien mittels CyQuant<sup>®</sup> von Tag eins zu Tag sieben. Dargestellt sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und das Signifikanzniveau. Die USSCs zeigen eine signifikant bessere Proliferation auf Cerasorb<sup>®</sup> und ICBM verglichen mit Kollagen, Cerasorb M<sup>®</sup> und Bio Oss<sup>®</sup>. Bio Oss<sup>®</sup> zeigt als einziges Biomaterial einen signifikanten Abfall der Zellzahl über den Versuchszeitraum.

Ein Vergleich der absoluten Zellzahl auf den Biomaterialien an Tag sieben zeigte, dass auf ICBM signifikant höhere Zellzahl vorlag als auf allen anderen Biomaterialien (Abb. 8). In der Tabelle 3 sind die errechneten Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen zusammengefasst.

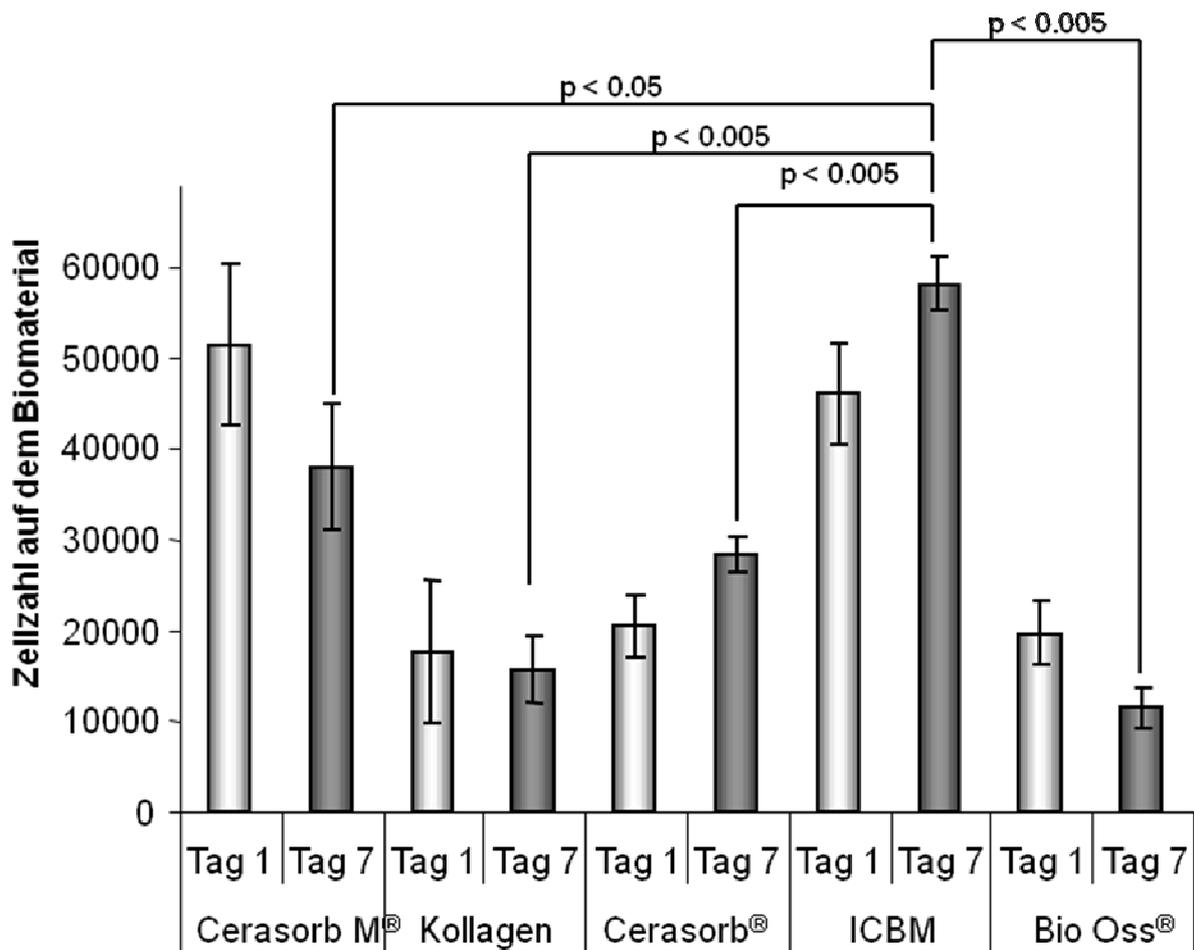


Abb 8: Vergleich der absoluten Zellzahl auf den verschiedenen Biomaterialien mittels CyQuant<sup>®</sup> am Tag sieben. Dargestellt sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und das Signifikanzniveau. Die absolute Zellzahl ist am Tag sieben auf ICBM signifikant höher als auf allen verglichenen Biomaterialien.

	Cerasorb M <sup>®</sup>		Kollagen		Cerasorb <sup>®</sup>		ICBM		Bio Oss <sup>®</sup>	
	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7
<b>Mittelwert</b>	54015	37964	17584	15681	20486	28300	45910	58095	19753	11494
<b>Standardabweichung</b>	10447	6861	7834	3624	3304	2066	5628	2973	3440	2347

Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichungen der durch die CyQuant<sup>®</sup>-Analyse bestimmten Zellzahlen nach Tag eins und sieben.

### **3.2 Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie**

Die Untersuchung der Zellbesiedelung der Biomaterialien und die Analyse der Veränderungen der Zellmorphologie erfolgten durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen am Tag sieben. Insbesondere dem Einfluss des Biomaterials auf den Differenzierungsprozeß der USSCs und damit auf deren Zellmorphologie wurde hier Beachtung geschenkt.

Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder bestätigten die Ergebnisse der CyQuant<sup>®</sup>- Untersuchung. Während auf Bio OSs<sup>®</sup> keine Zellen nachweisbar waren, wurde auf sämtlichen anderen getesteten Biomaterialien eine dichte Zellschicht beobachtet (Abb. 9-18). Dabei zeigten die Zellen einen direkten Kontakt zu den Biomaterialien. Ein Einwachsen der Zellen in die Poren des Biomaterials konnte nur bei ICBM nachgewiesen werden (Abb. 14). Es hatte den Anschein, dass die Porengröße von beiden  $\beta$ -Trikalziumphosphatmaterialien zu klein für ein Einwachsen der Zellen war (Abb. 9-12).

Die Analyse der Zellmorphologie zeigte insbesondere bei den Zellen auf Cerasorb<sup>®</sup>, Cerasorb M<sup>®</sup> und Kollagen, dass sie morphologisch nicht mehr undifferenzierten USSCs glichen, sondern eher der Morphologie mesenchymaler Zellen ähnelten. Die Zellen zeigten ein kuboides, abgeflachtes Erscheinungsbild und hatten eine enges Attachment untereinander, vergleichbar mit einer epithelialen Zellschicht. Die Zellen auf ICBM zeigten ebenfalls ein dichtes Zellattachment untereinander und ähnelten morphologisch eher dem Phänotyp von Osteoblasten.

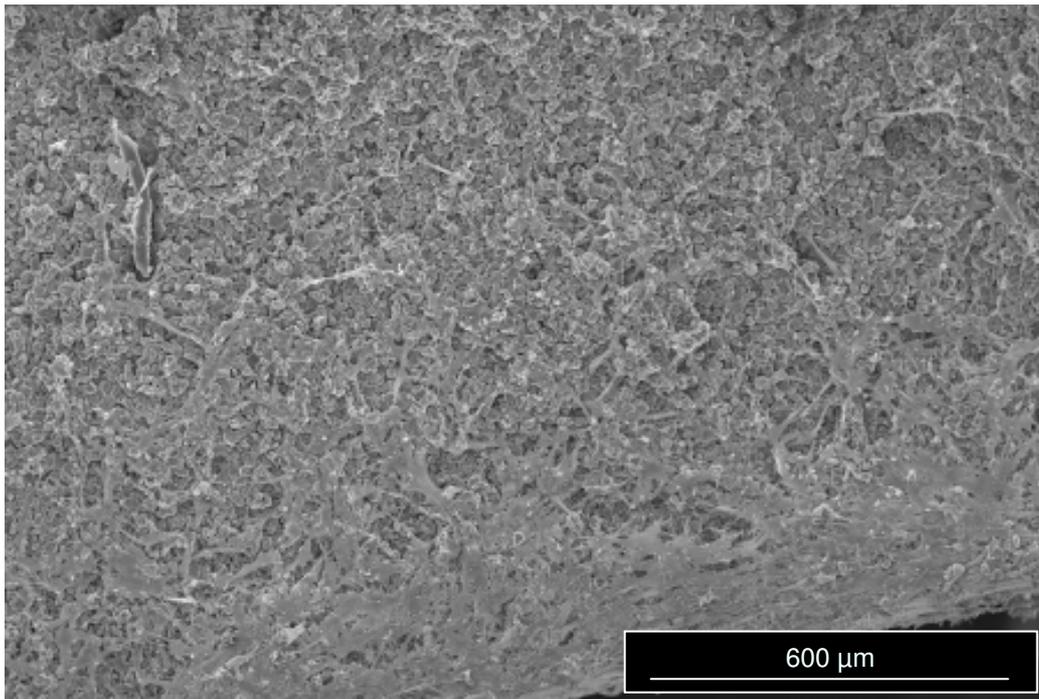


Abb. 9: Cerasorb® nach sieben Tagen Kultivierung. Einige Bereiche der Oberfläche sind mit Zellen bedeckt.

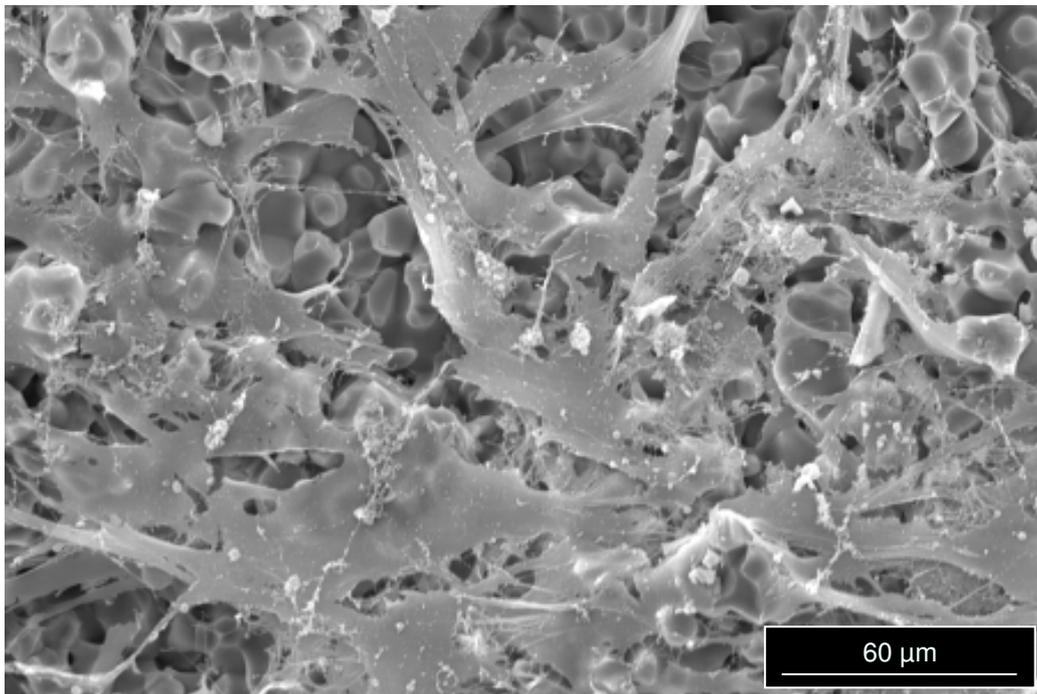


Abb. 10: Cerasorb® nach sieben Tagen Kultivierung. Ausschnittsvergrößerung der mit Zellen bedeckten Oberfläche. Man sieht dem Material direkt aufliegende Zellen, die aber nicht in dieses hineinwachsen.

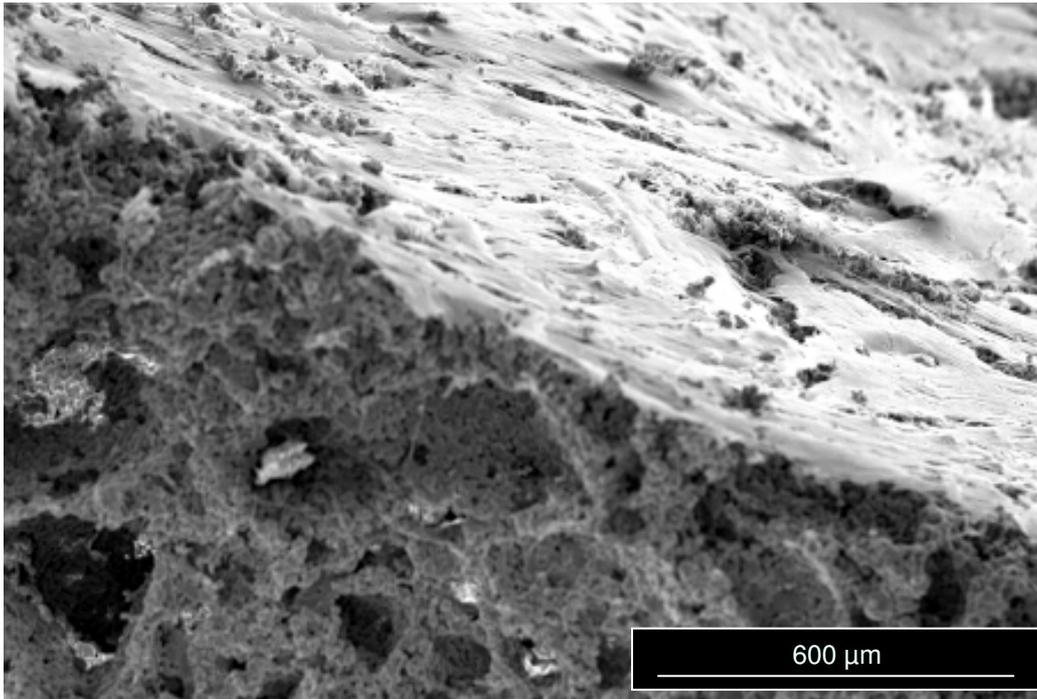


Abb. 11: Cerasorb M<sup>®</sup> nach sieben Tagen Kultivierung. Die Oberfläche ist dicht mit Zellen bedeckt. Ein Einwachsen der Zellen kann nicht nachgewiesen werden.

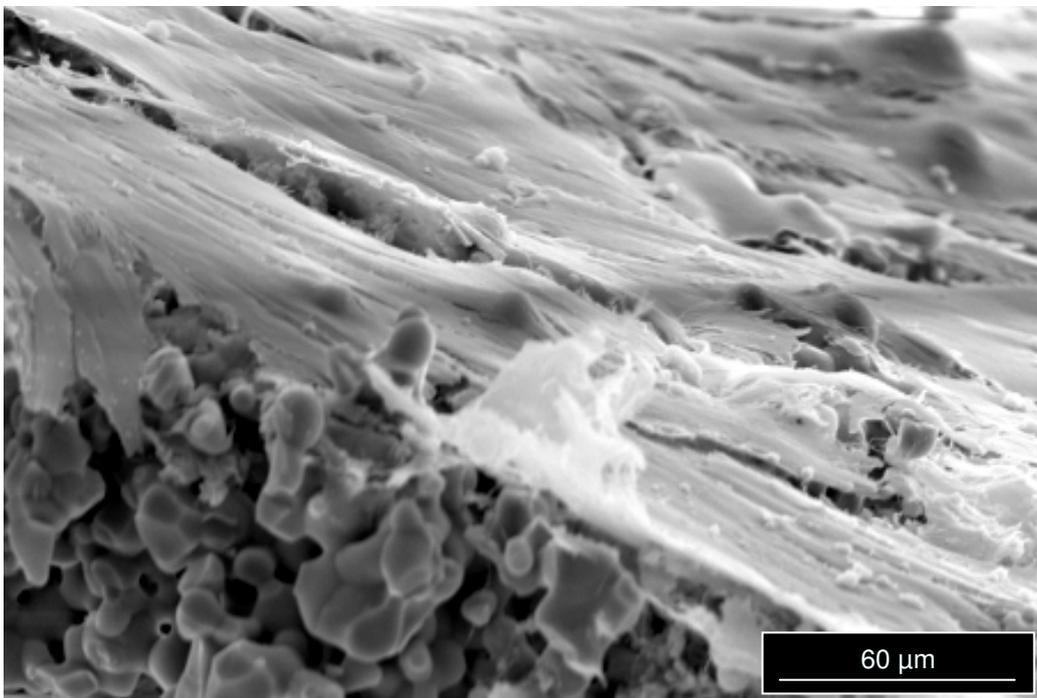


Abb. 12: Cerasorb M<sup>®</sup> nach sieben Tagen Kultivierung in höherer Vergrößerung. Die Oberfläche dicht mit Zellen besiedelt, ein Einwachsen der Zellen ins Material kann nicht nachgewiesen werden.

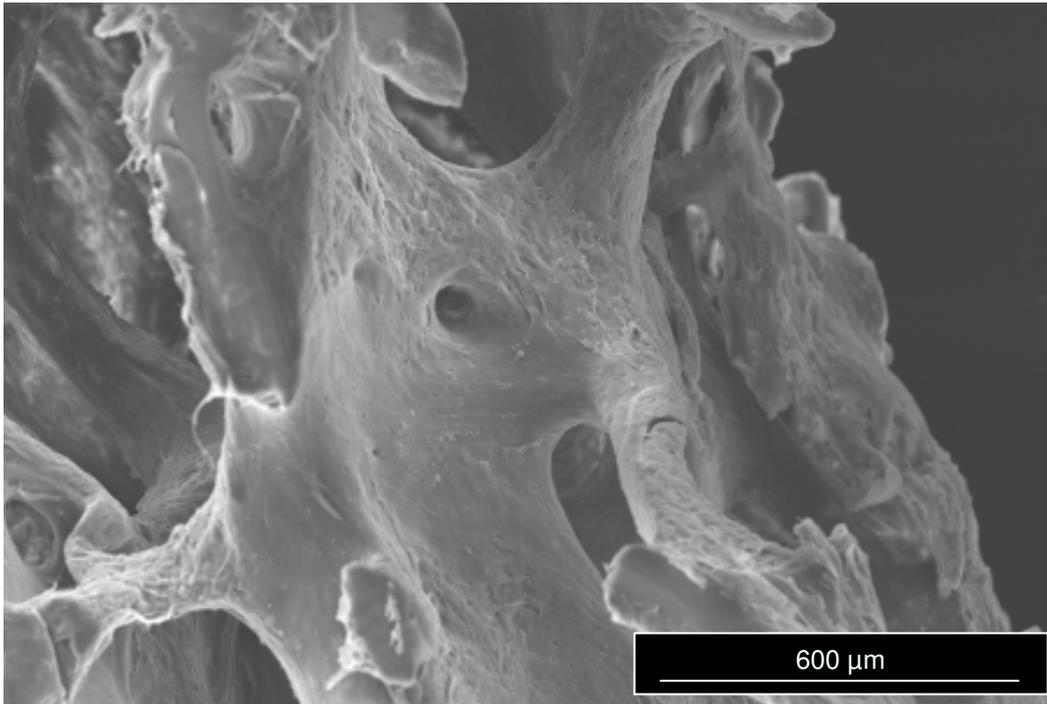


Abb. 13: ICBM nach sieben Tagen Kultivierung. Die Oberfläche ist dicht mit Zellen bedeckt. Gut erkennbar sind die großen Poren des Materials.

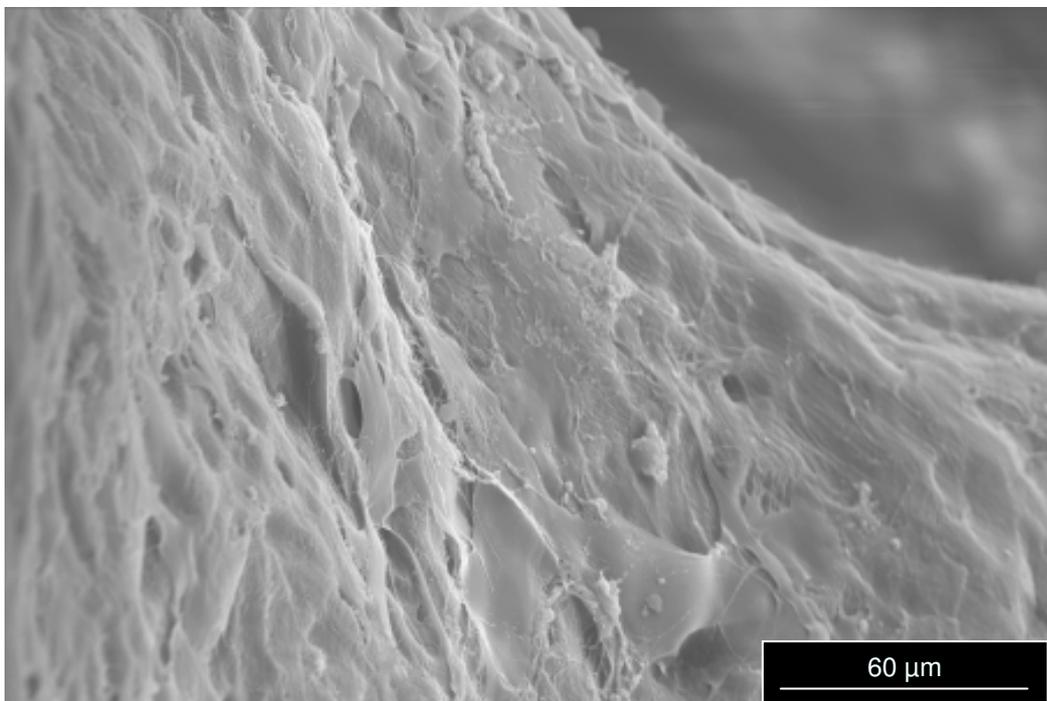


Abb. 14: ICBM nach sieben Tagen Kultivierung in höherer Vergrößerung. Die Oberfläche dicht mit Zellen besiedelt die dem Material direkt aufliegen und untereinander in Kontakt stehen.

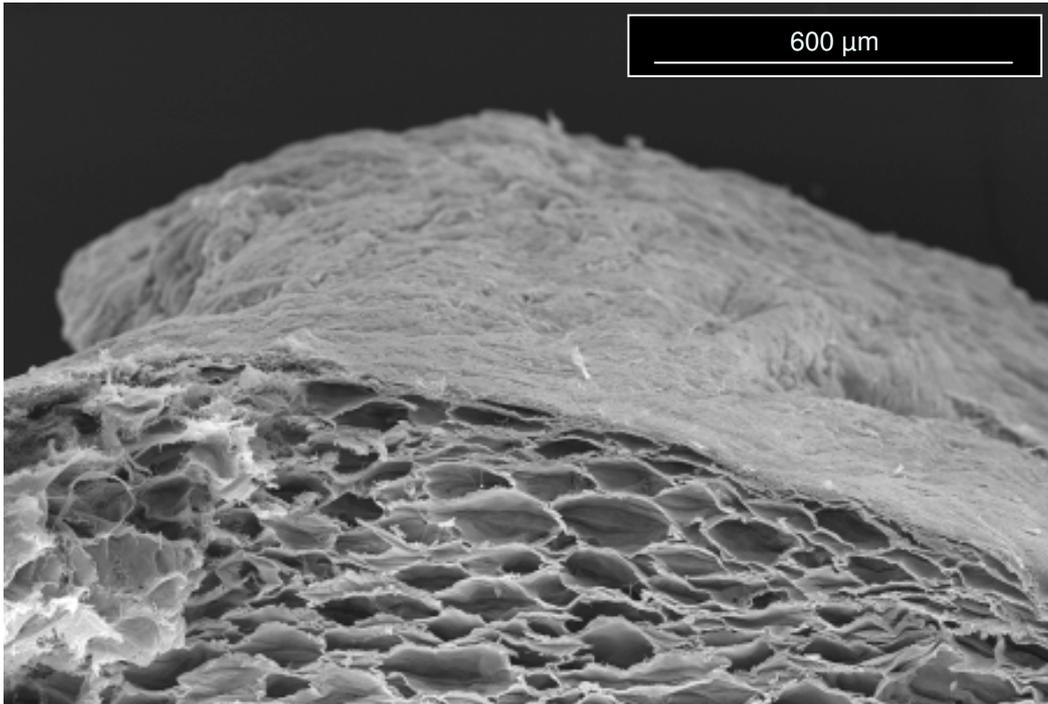


Abb. 15: Kollagen nach sieben Tagen Kultivierung. Die Oberfläche ist dicht mit Zellen bedeckt. Gut erkennbar sind die großen Poren des Materials.

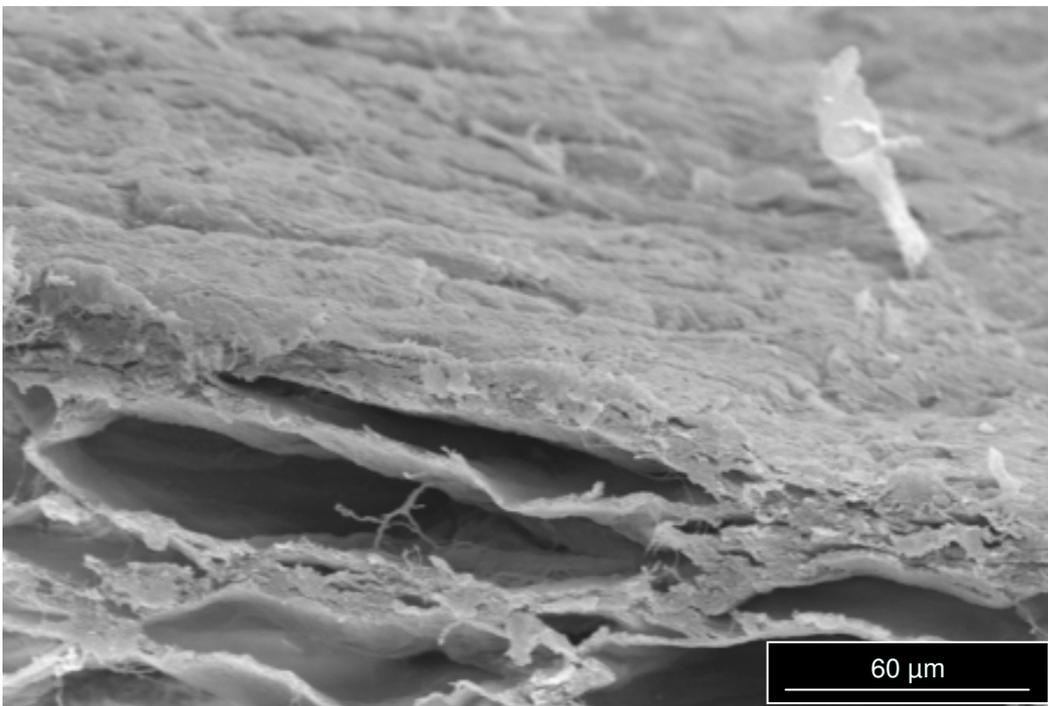


Abb. 16: Kollagen nach sieben Tagen Kultivierung in höherer Vergrößerung. Die Oberfläche dicht mit Zellen besiedelt die dem Material direkt aufliegen und untereinander in Kontakt stehen. Trotz der großen Poren wachsen die Zellen nicht in das Material ein.

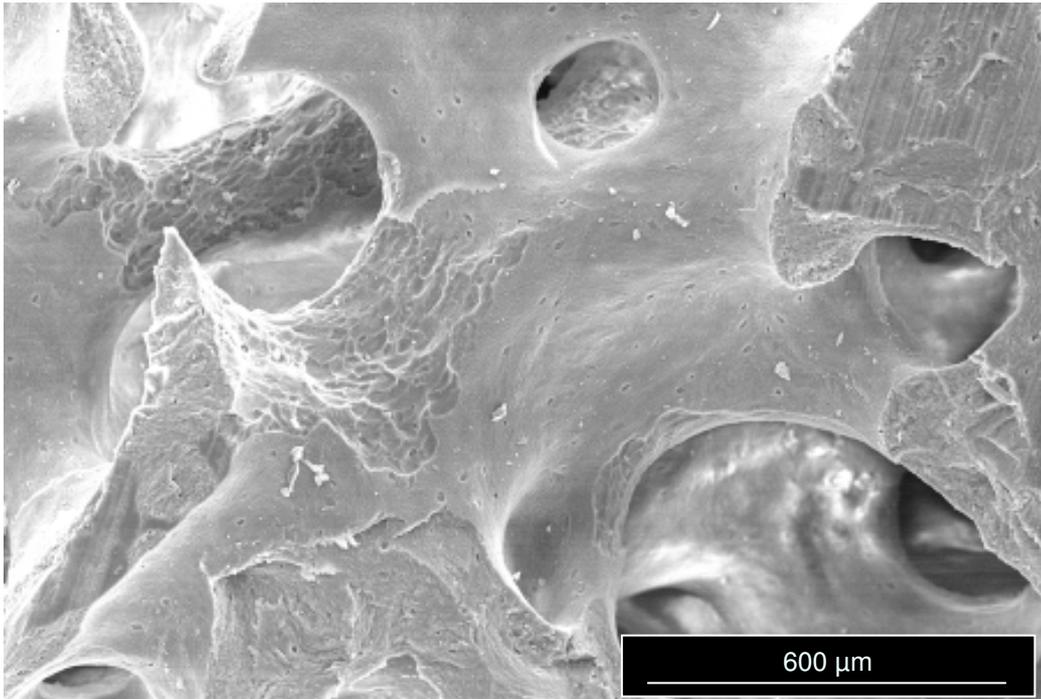


Abb. 17: Bio Oss<sup>®</sup> nach sieben Tagen Kultivierung. Es sind keine Zellen auf der Oberfläche zu erkennen.

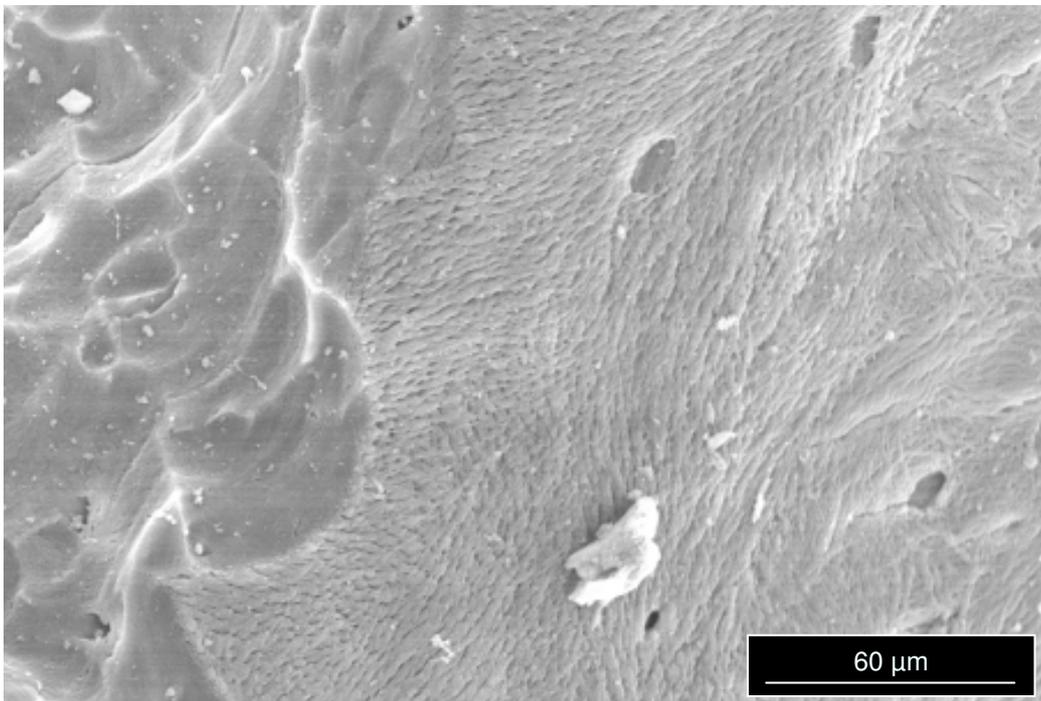


Abb. 18: Bio Oss<sup>®</sup> nach sieben Tagen Kultivierung in höherer Vergrößerung. Auch bei dieser Vergrößerung sind keine Zellen auf der Oberfläche erkennbar.

### 3.3 Ergebnisse der PCR-Analyse

Die Untersuchung des Einfluss des Biomaterials auf die osteogene Differenzierung der USSCs erfolgte mittels einer Analyse des Genexpressionsmusters mit einer quantitativen real-time PCR. Diese Analyse ergab sehr variable Ergebnisse. Die Genexpression der analysierten osteogenen Markergene (Alkalische Phosphatase, Kollagen I und Osteonectin) variierte auf jedem der untersuchten Biomaterialien, so dass jedes Biomaterial sein eigenes, spezifisches Genexpressionmuster erzeugte. Auch das Genexpressionsmuster der beiden  $\beta$ -TPC-Materialien war unterschiedlich (Abb. 19). Verglichen mit den Genexpressionsleveln der anderen Materialien exprimierten die Zellen Kollagen I und Osteonectin am höchsten auf Cerasorb M<sup>®</sup> und Kollagen (Abb. 19). Analog zu den Ergebnissen der CyQuant<sup>®</sup>-Analyse und den REM-Bildern wurde bei Bio Oss nicht genügend Material gefunden um cDNA zu generieren und eine real time PCR durchzuführen.

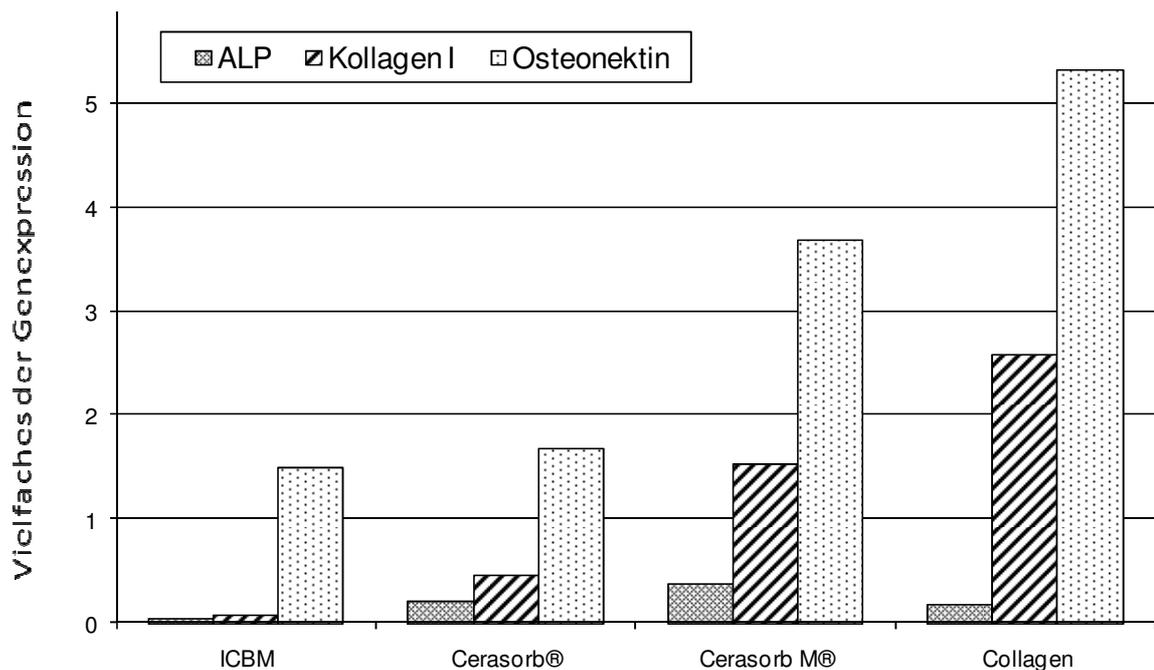


Abb. 19: Genexpressionsanalyse der Biomaterialien. Dargestellt sind die Vielfachen der Genexpressionslevel einer USSCs-Kultur ohne Kontakt zu einem Biomaterial. Auf Bio Oss<sup>®</sup> war nicht genügend Material um eine Genexpressionsanalyse durchführen zu können.

## 4 Diskussion

Neben den Wachstumsfaktoren und der Vaskularisation stellen die verwendeten Biomaterialien (Matrix) mit ihren materialspezifischen Eigenschaften sowie die verwendete Zellart die vier wichtigsten Säulen des osteogenen Tissue Engineerings dar. Humane Nabelschnurstammzellen stellen eine vielversprechende Zellart für das osteogene Tissue Engineering dar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beachtliche Unterschiede bezüglich der Biokompatibilität von USSCs auf unterschiedlichen Biomaterialien bestehen und das außerdem das Biomaterial offensichtlich das osteogene Genexpressionsprofil der USSCs beeinflusst.

Die Biokompatibilität der USSCs auf den unterschiedlichen Biomaterialien wurde über eine Bestimmung der Anzahl der sich auf dem Biomaterial befindlichen Zellen am Tag eins und sieben ermittelt. Die Bestimmung dieser Zellzahlen erfolgte mittels eines fluoreszenzbasierten Enzymassay (CyQuant®). Verglichen mit anderen Assays zur Zellzahlbestimmung die ATP detektieren ist ein Vorteil des CyQUANT®-Assays, dass eine Messung der intrazellulären Nukleinsäuremenge im Vergleich zur ATP-Konzentration eine geringere Fehleranfälligkeit aufweist. Dies führt zu einer hohen Korrelation zwischen gemessener Konzentration und Zellzahl im CyQuant®-Assay (Jones et al., 1991).

Die Ergebnisse der CyQuant® Untersuchung zeigen eindrucksvoll, dass nach sieben Tagen die höchste Zellzahl auf den ICBM-Trägern gefunden wurde. Die Unterschiede zu den anderen Biomaterialien erreichten dabei eine hohe statistische Signifikanz (Abb. 8).

Betrachtet man das Attachment der Zellen auf den Biomaterialien mittels einer Analyse der auf den Biomaterialien befindlichen Zellen durch einen CyQuant® assay an Tag eins, so zeigt sich, dass die USSCs das beste Attachment auf ICBM und Cerasorb M® zeigen. Diese Unterschiede des Attachments der USSCs erreichten eine hohe statistische Signifikanz (Abb. 5 & 6). Interessanter Weise jedoch kam es jedoch nur auf ICBM und Cerasorb® zu einer Proliferation der Zellen, nicht jedoch auf Cerasorb M®. Dies kann man aus dem Vergleich der mittels CyQuant® bestimmten Proliferationsraten auf den verschiedenen Biomaterialien von Tag 1 zu Tag 7 schließen (Abb. 7). Auch diese Unterschiede erreichten ein hohes statistisches Signifikanzniveau. Nimmt man nun die oben genannten Ergebnisse zusammen, so kann man schließen, dass die USSCs nicht nur das beste Attachment auf den ICBM-

Trägern zeigen, sondern auch die beste Proliferation auf den ICBM-Trägern gezeigt haben.

Darüber hinaus bestätigen die Rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung die Ergebnisse der CyQuant<sup>®</sup>-Analyse. Auch die Rasterelektronenmikroskopischen Bilder der Biomaterialien zeigten einen dichten Zellrasen auf ICBM, Cerasorb<sup>®</sup> und Cerasorb M<sup>®</sup>. Auf Bio Oss<sup>®</sup> dagegen waren keine Zellen nachweisbar. Auch andere Autoren konnten eine Korrelation zwischen den Ergebnissen eines Proliferationsassays und den Ergebnissen der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung nachweisen (Bandyopadhyay-Ghosh et al., 2006).

Durch die Rasterelektronenmikroskopie war es weiterhin möglich Aussagen über die Veränderungen der Zellmorphologie zu machen. Es zeigte sich, dass die USSCs ihre charakteristische sphäroidale Form am Tag sieben verloren hatten und eine eher kuboide Form zeigten. Des Weiteren bestanden insbesondere auf Kollagen, Cerasorb<sup>®</sup>, Cerasorb M<sup>®</sup> und ICBM Kontakte zwischen den Zellen, und auch zwischen den Zellen und den Biomaterialien. Zusammengefasst kann man sagen, dass das morphologische Zellbild osteoblastären Zellen ähnelt. Man darf allerdings nicht außer Acht lassen, dass das erhobene Genexpressionsmuster nicht dem von osteoblastären Zellen gleicht und die Zellmorphologie auch auf mesenchymale (Stamm-)Zellen hindeuten könnte. Die oben genannten Resultate stehen im Einklang mit einer Arbeit über die Biokompatibilität muriner Embryonaler Stammzellen (ESC) auf verschiedenen Biomaterialien unserer Arbeitsgruppe (Handschel et al., 2008a). Auch in dieser Studie zeigten die ESCs die beste Biokompatibilität auf den ICBM-Probenkörpern und zeigten die gleichen morphologischen Veränderungen. Des Weiteren konnte auch in dieser Studie eine Beeinflussung des osteogenen Genexpressionsmusters von ESCs durch die Biomaterialien nachgewiesen werden. Die Biokompatibilität von Biomaterialien wird durch multiple Faktoren beeinflusst. Neben der dreidimensionalen Topographie spielen auch die physiko-chemischen Eigenschaften der Biomaterialien eine entscheidende Rolle (Meyer et al., 2004). Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine Beeinflussung von Osteoblasten durch die Topographie der Biomaterialoberfläche nachweisen (Dalby et al., 2000; Dennis et al., 1992; Goshima et al., 1991). In Abhängigkeit von der Struktur der Oberfläche passen die Zellen ihre Orientierung, Migration und auch die Attachmentkinetik an die Umgebung an (Chehroudi et al., 1997; den Braber et al., 1995; Wojciak-Stothard et al., 1995). Neben weiteren Faktoren beeinflusst maßgeblich die Porosität des

Materials, insbesondere die Porengröße, die Struktur der Oberfläche und damit die Biokompatibilität des Materials. O'Brien und Mitarbeiter haben in einer Studie mit osteoblastären Mauszellen den Einfluss der Porengröße, und damit der Oberflächenstruktur, auf das Zellattachment untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass eine Porengröße von ca. 100 µm Durchmesser eine Oberflächenstruktur ergibt die im Vergleich mit anderen Porengrößen den Zellen das beste Attachment ermöglichte (O'Brien et al., 2005). Betrachtet man nun die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Biomaterialien, so weist ICBM die größten Makroporen der untersuchten Materialien auf. Des Weiteren handelt es sich bei ICBM um interkonnektierende Poren, wodurch möglicherweise die Bildung von Knochengewebe unterstützt wird. Einen positiven Einfluss auf die Vaskularisierung und die Knochenbildung solcher Probenkörper mit interkonnektierenden Poren konnte auch die Arbeitsgruppe von Mahmood nachweisen (Mahmood et al., 2001). Es scheint naheliegend, dass ICBM als ein natürliches, aus bovinem Knochen hergestelltes Produkt eine höhere Biokompatibilität aufweist als die verglichenen Biomaterialien. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den beiden Produkten von Cerasorb<sup>®</sup> und dem Kollagenschwamm um synthetisch hergestellte Konstrukte, die versuchen die biologischen Eigenschaften eines idealen Biomaterials nachzuahmen. Des Weiteren könnte der oben beschriebene Einfluss der Porengröße auf die Biokompatibilität eines Biomaterials eine mögliche Erklärung für die Unterschiede im Proliferationsverhalten der USSCs auf Cerasorb<sup>®</sup> und Cerasorb M<sup>®</sup> sein. Da beide Materialien aus  $\beta$ -TCP bestehen, können die Unterschiede nur durch die Oberflächenstruktur der Materialien bedingt sein. Die multiporöse Oberfläche von Cerasorb M<sup>®</sup> scheint weniger proliferationsfördernd zu sein als die kleinporige Oberfläche von Cerasorb<sup>®</sup>. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls einen Einfluss der Porosität und der Oberflächenstruktur auf die Biokompatibilität der beiden untersuchten  $\beta$ -TCP-Produkte nachweisen konnten. Kasten und Mitarbeiter beispielsweise konnten ebenfalls eine geringere Proliferation von osteogen differenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen *in vitro* und *in vivo* auf Cerasorb M<sup>®</sup> verglichen mit Cerasorb<sup>®</sup> nachweisen (Kasten et al., 2008).

Neben der Oberflächenstruktur haben auch die physikochemischen Eigenschaften des Biomaterials einen Einfluss auf das Verhalten der Zellen. Es ist bekannt, dass das Attachment von Osteoblasten an Biomaterialien unter anderem von der Präsenz

bestimmter Adhäsionsproteine abhängt. Diese Adhäsionsproteine sind der essentielle Beginn einer Kaskade die in einer sicheren Verankerung der Zellen auf dem Biomaterial endet. Die Adhäsion der Zellen auf dem Biomaterial ist eine Grundvoraussetzung für die Proliferation der Zellen auf dem Biomaterial und somit auch für die Generierung von Knochen. Verschiedene Studien über die Attachmentkinetik und die Proliferationsraten von Zellen auf verschiedenen Biomaterialien konnten zeigen, dass insbesondere das Attachment der ersten Stunden von dem Vorhandensein spezifischer Adhäsionsproteine abhängt (Dennis et al., 1992; Meyer et al., 1998). Diese Autoren beschreiben in ihren Studien, dass Biomaterialien mit einem hohen Kollagenanteil die beste Attachmentkinetik für mesenchymale Stammzellen zeigen. Im Einklang mit diesen Studien zeigte in der vorliegenden Arbeit das hauptsächlich aus Kollagen I bestehende ICBM die besten Ergebnisse für das Attachment und die Proliferation der Zellen (Abb. 5 & 7). Somit scheint die Tatsache das ICBM hauptsächlich aus Kollagen I besteht, eine mögliche Erklärung für die in unserer Studie nachgewiesenen beste Biokompatibilität der USSCs auf ICBM zu sein. Andererseits erklärt dies auch die schlechten Ergebnisse von Bio Oss<sup>®</sup> bezüglich des Zellattachments und der Proliferation in unserer Studie. Da es sich bei Bio Oss<sup>®</sup> um ein spongiöses Hydroxylapatit bovinen Ursprungs handelt, dem durch thermische und chemische Behandlung sämtliche organische Bestandteile entzogen worden sind, kann möglicherweise kein Attachment zwischen den Zellen und dem Biomaterial stattfinden, da keine Adhäsionsproteine vorhanden sind. Turhani et al. konnte beispielsweise zeigen, dass das Attachment humaner Osteoblasten auf Bio Oss<sup>®</sup> schlechter ist als auf mit dem Peptid P15 beschichtetem Hydroxylapatit (Turhani et al., 2005). Des Weiteren korrelieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen von Petrovic et. al., die eine signifikant höhere Proliferation und höheres Attachment von Zellen auf Biomaterialien mit einem großen Kollagenanteil nachweisen konnte verglichen mit Materialien mit nur einem geringen oder gar keinem Kollagenanteil (Petrovic et al., 2006). Interessanter Weise konnten wir Unterschiede der Biokompatibilität zwischen ICBM und dem untersuchten Kollagenschwamm (KOLLAGEN-resorb<sup>®</sup>) nachweisen, obwohl beide Biomaterialien aus einem hohen Kollagenanteil bestehen. Eine mögliche Erklärung für diese, auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse, könnte die unterschiedliche Oberflächenstruktur der beiden Biomaterialien sein. Wie bereits oben beschrieben, haben die Porosität und die Porengröße einen direkten Einfluss

auf die Biokompatibilität der Probenkörper. KOLLAGEN-resorb<sup>®</sup> weist verglichen mit ICBM deutlich kleinere Poren auf was ein Einwachsen der Zellen möglicher Weise verhindert und somit die Biokompatibilität des Materials herabsetzt.

Eine weitere Hypothese für die gute Biokompatibilität des ICBMs in der vorliegenden Studie könnte die Anwesenheit von den Herstellungsprozeß unbeschadet überstandener Wachstumsfaktoren sein. Da es sich bei ICBM um ein natürliches Produkt aus bovinem Knochen handelt, könnten osteogene Wachstumsfaktoren den Herstellungsprozess überdauern und dann das Wachstum oder die osteogene Differenzierung der Zellen stimulieren. Insbesondere die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) spielen eine wichtige Rolle in der osteogenen Differenzierung von Zellen und dem Attachment bzw. der Proliferation der Zellen (Kubler et al., 2000).

Die Untersuchung der Genexpressionsmuster brachte sehr variable Ergebnisse. Trotz gleicher Behandlung der Zellen zeigten die USSCs unterschiedliche Genexpressionsmuster auf den verschiedenen Biomaterialien. Dies bedeutet, dass die Biomaterialien das Genexpressionsmuster und somit den Differenzierungsprozeß zu beeinflussen scheinen. Die genauen Gründe für diese Beeinflussung des Genexpressionsmuster und deren Auswirkungen sind nicht bekannt. Dennoch stehen die Ergebnisse im Einklang mit den Ergebnissen unserer Vorarbeiten mit ESCs. Auch bei den ESCs zeigten die Zellen trotz gleicher Behandlung ein unterschiedliches Genexpressionsmuster auf den verschiedenen Biomaterialien (Handschel et al., 2008a). Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Biomaterialien den Differenzierungsprozess der Zellen beeinflussen.

## 5 Zusammenfassung

Die im Rahmen des osteogenen Tissue Engineering angewendeten, zellbasierten Knochenregenerationstechniken stellen ein biologisch orientiertes Verfahren zur Rehabilitation von Patienten mit Knochendefekten dar. Eine erfolgversprechende Zellart für diese zellbasierten Rekonstruktionsansätze stellen die humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (unrestricted somatic stem cells, USSC) dar. Ein entscheidender Vorteil neben ihrer Pluripotenz und somit der möglichen osteogenen Differenzierung ist, dass sie nur geringes immunogenes Potential aufweisen.

Um die Form des Knochens nachzuahmen, einen Zelltransfer zu ermöglichen und den Zellen eine Leitschiene zu geben, ist die Kombination des zellbasierten Ansatzes mit einem Biomaterial sinnvoll. Durch die Zusammensetzung des Biomaterials werden nicht nur die physikalischen Eigenschaften des Trägermaterials bestimmt, sondern auch dessen Biokompatibilität. Des Weiteren ist bekannt, dass die Biomaterialien Einfluss auf den Differenzierungsprozess der Zellen haben.

Ziel dieser Studie war es, die Biokompatibilität von verschiedenen Biomaterialien (Cerasorb<sup>®</sup>, Cerasorb M<sup>®</sup>, Bio Oss<sup>®</sup>, KOLLAGEN-resorb<sup>®</sup> und ICBM) mit osteogen vordifferenzierten USSCs zu untersuchen. Des Weiteren sollte der Einfluss der Biomaterialien auf den Differenzierungsprozess der Zellen untersucht werden. Dazu erfolgte die osteogene Vordifferenzierung von humanen USSCs durch den Zusatz von DAG zum Nährmedium. Anschließend erfolgte die Aussaat der USSCs auf den verschiedenen Biomaterialien und deren Kultivierung für 7 Tage. Als Maß für die Biokompatibilität wurden das Zellattachement und die Proliferation der Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien an Tag eins und sieben mittels CyQuant<sup>®</sup>-assay bestimmt. Des Weiteren erfolgte eine morphologische Analyse der Zellen mittels Rasterelektronenmikroskopie. Um den Einfluss der Biomaterialien auf das osteogene Genexpressionsmuster zu analysieren wurde eine quantitative real time Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Hierbei wurden Gene mit einer Schlüsselfunktion in der osteogenen Differenzierung analysiert (alkalische Phosphatase, Kollagen I und Osteonektin).

Die CyQuant<sup>®</sup>-Analysen zeigten, dass die Zellen auf ICBM und Cerasorb M<sup>®</sup> das signifikant beste Attachment aufwiesen. Zu einer signifikanten Proliferation der Zellen kam es nur auf ICBM und Cerasorb<sup>®</sup>, wohingegen auf sämtlichen anderen

Materialien ein Abfall der Zellzahl über den Versuchszeitraum zu verzeichnen war. Neben der Bestätigung der Ergebnisse des CyQuant<sup>®</sup>-assays konnten die Rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen weiterhin eine Veränderung der Zellmorphologie auf den Biomaterialien nachweisen. Insbesondere auf ICBM und den  $\beta$ -Trikalziumphosphatmaterialien zeigten die Zellen einen eher mesenchymalen oder osteoblastären Phänotyp. Die Zellen wiesen eine Änderung der Morphologie der Zellen mit der PCR-Analyse konnte gezeigt werden, dass das Biomaterial einen Einfluß auf das osteogene Genexpressionmuster und somit den Differenzierungsprozeß der Zellen hat.

Die Ergebnisse zeigen, dass ICBM gefolgt von Cerasorb<sup>®</sup> geeignete Biomaterialien für das knöchernen Tissue Engineering mit humanen Nabelschur Stammzellen (USSCs) darstellen. Die Anwendung von ICBM und osteogen differenzierten humanen USSCs könnten neue Möglichkeiten in der Therapie von periodontalen Knochendefekten, traumatisch bedingten Knochenverlust, Zahnverlust und Kieferatrophien bieten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aaron RK, Boyan BD, Ciombor DM, Schwartz Z, Simon BJ (2004). Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res* (419):30-37.
- Aubin JE, Liu F (1996). The osteoblast lineage. In: Principles of Bone Biology. J Bilezikian, L Raisz and G Rodan editors. San Diego: Academic Press, pp. 51-67.
- Bandyopadhyay-Ghosh S, Reaney IM, Brook IM, Hurrell-Gillingham K, Johnson A, Hatton PV (2006). In vitro biocompatibility of fluorcanasite glass-ceramics for bone tissue repair. *J Biomed Mater Res A*.80(1):175-183
- Benito AI, Diaz MA, Gonzalez-Vicent M, Sevilla J, Madero L (2004). Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical results. *Bone Marrow Transplant* 33(7):675-690.
- Bielby RC, Boccaccini AR, Polak JM, Buttery LD (2004). In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng* 10(9-10):1518-1525.
- Binderman I, Fin N (1990). Bone substitutesorganic, inorganic, and polymeric: Cell material interactions. In: CRC Handbook of Bioactive Ceramics. T Yamamuro, L Hench and J Wilson editors. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 45-51.
- Boudreau NJ, Jones PL (1999). Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* 339 Pt 3:481-488.
- Brown AL, Shepherd D, Buckenham TM (1997). Per oral balloon sialoplasty: results in the treatment of salivary duct stenosis. *Cardiovasc Intervent Radiol* 20(5):337-342.
- Burt RK, Verda L, Kim DA, Oyama Y, Luo K, Link C (2004). Embryonic stem cells as an alternate marrow donor source: engraftment without graft-versus-host disease. *J Exp Med* 199(7):895-904.
- Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, Episkopou V, Polak JM (2001). Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* 7(1):89-99.
- Caplan AI (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9(5):641-650.
- Carano RA, Filvaroff EH (2003). Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8(21):980-989.
- Chaudhry GR, Yao D, Smith A, Hussain A (2004). Osteogenic Cells Derived From Embryonic Stem Cells Produced Bone Nodules in Three-Dimensional Scaffolds. *J Biomed Biotechnol* 2004(4):203-210.
- Chehroudi B, McDonnell D, Brunette DM (1997). The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. *J Biomed Mater Res* 34(3):279-290.

Cogle CR, Guthrie SM, Sanders RC, Allen WL, Scott EW, Petersen BE (2003). An overview of stem cell research and regulatory issues. *Mayo Clin Proc* 78(8):993-1003.

Covas DT, Piccinato CE, Orellana MD, Siufi JL, Silva WA, Jr., Proto-Siqueira R, Rizzatti EG, Neder L, Silva AR, Rocha V, Zago MA (2005). Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. *Exp Cell Res Oct(1); 309(2): 340-344*.

D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 14(7):1115-1122.

Dalby MJ, Di Silvio L, Davies GW, Bonfield W (2000). Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 11(12):805-810.

den Braber ET, de Ruijter JE, Smits HT, Ginsel LA, von Recum AF, Jansen JA (1995). Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth. *J Biomed Mater Res* 29(4):511-518.

Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI (1992). Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant* 1(1):23-32.

Depprich R, Handschel J, Sebald W, Kubler NR, Wurzler KK (2005). [Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein (BMP) mutants.]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9:363-368.

Depprich R, Handschel J, Wiesmann HP, Jasche-Meyer J, Meyer U (2008a). Use of bioreactors in maxillofacial tissue engineering. *Br J Oral Maxillofac Surg* 46(5):349-354.

Depprich R, Ommerborn M, Zipprich H, Naujoks C, Handschel J, Wiesmann HP, Kubler NR, Meyer U (2008b). Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces. *Head Face Med* 4:29.

Depprich R, Zipprich H, Ommerborn M, Mahn E, Lammers L, Handschel J, Naujoks C, Wiesmann HP, Kubler NR, Meyer U (2008c). Osseointegration of zirconia implants: an SEM observation of the bone-implant interface. *Head Face Med* 4:25.

Depprich R, Zipprich H, Ommerborn M, Naujoks C, Wiesmann HP, Kiattavorncharoen S, Lauer HC, Meyer U, Kubler NR, Handschel J (2008d). Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: an in vivo study. *Head Face Med* 4:30.

Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobnic M, Vunjak-Novakovic G (2008). Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther* 3(4):254-264.

Gerber I, ap Gwynn I (2001). Influence of cell isolation, cell culture density, and cell nutrition on differentiation of rat calvarial osteoblast-like cells in vitro. *Eur Cell Mater* 2:10-20.

Gerber I, ap Gwynn I (2002). Differentiation of rat osteoblast-like cells in monolayer and micromass cultures. *Eur Cell Mater* 3:19-30.

Gilbert DM (2004). The future of human embryonic stem cell research: addressing ethical conflict with responsible scientific research. *Med Sci Monit* 10(5):RA99-103.

Gill DR, Ireland DC, Hurley JV, Morrison WA (1998). The prefabrication of a bone graft in a rat model. *J Hand Surg Am* 23(2):312-321.

Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC, Mikos AG (2001). Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* 22(11):1279-1288.

Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1991). The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Relat Res* 262:298-311.

Grayson WL, Bhumiratana S, Cannizzaro C, Chao PH, Lennon DP, Caplan AI, Vunjak-Novakovic G (2008). Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone. *Tissue Eng Part A* 14(11):1809-1820.

Handschel J, Wiesmann HP, Stratmann U, Kleinheinz J, Meyer U, Joos U (2002). TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials* 23(7):1689-1695.

Handschel J, Wiesmann HP, Depprich R, Kubler NR, Meyer U (2006). Cell-based bone reconstruction therapies--cell sources. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21(6):890-898.

Handschel J, Berr K, Depprich R, Naujoks C, Kubler NR, Meyer U, Ommerborn M, Lammers L (2008a). Compatibility of Embryonic Stem Cells with Biomaterials. *J Biomater Appl* May;23(6):549-60.

Handschel J, Berr K, Depprich RA, Kubler NR, Naujoks C, Wiesmann HP, Ommerborn MA, Meyer U (2008b). Induction of osteogenic markers in differentially treated cultures of embryonic stem cells. *Head Face Med* 4:10.

Handschel JG, Depprich RA, Kubler NR, Wiesmann HP, Ommerborn M, Meyer U (2007). Prospects of micromass culture technology in tissue engineering. *Head Face Med* 3:4.

Hartig M, Joos U, Wiesmann HP (2000). Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro. *Eur Biophys J* 29(7):499-506.

Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B (2004). Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner Res* 19(9):1379-1394.

In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 22(7):1338-1345.

Jain RK (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9(6):685-693.

Jones DB, Nolte H, Scholubbers JG, Turner E, Veltel D (1991). Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* 12(2):101-110.

Jones LJ, Gray M, Yue ST, Haugland RP, Singer VL (2001). Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay. *J Immunol Methods* 254(1-2):85-98.

Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, Horger K, Huang YC, Mooney DJ (2005). Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J* 19(6):665-667.

Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, Luginbuhl R, Bohner M, Richter W (2008). Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater* 4(6):1904-1915.

Kawamura K, Yajima H, Ohgushi H, Tomita Y, Kobata Y, Shigematsu K, Takakura Y (2006). Experimental study of vascularized tissue-engineered bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 117(5):1471-1479.

Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE (2006). Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 10(1):7-19.

Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200(2):123-135.

Kubler NR, Reuther JF, Faller G, Kirchner T, Ruppert R, Sebald W (1998). Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27(4):305-309.

Kubler NR, Wurzler KK, Reuther JF, Sieber E, Kirchner T, Sebald W (2000). [Effect of different factors on the bone forming properties of recombinant BMPs]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 Suppl 2:465-469.

Langer R, Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science* 260(5110):920-926.

Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rucker M, Junker D, Haufel JM, Carvalho C, Heberer M, Germann G, Vollmar B, Menger MD (2006). Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 12(8):2093-2104.

Löffler G (2000). Basiswissen Biochemie. 4. Auflage ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.

Mahmood J, Takita H, Ojima Y, Kobayashi M, Kohgo T, Kuboki Y (2001). Geometric effect of matrix upon cell differentiation: BMP-induced osteogenesis using a new bioglass with a feasible structure. *J Biochem (Tokyo)* 129(1):163-171.

Marolt D, Augst A, Freed LE, Vepari C, Fajardo R, Patel N, Gray M, Farley M, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G (2006). Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. *Biomaterials* 27(36):6138-6149.

Martin GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12):7634-7638.

McCulloch CA, Strugurescu M, Hughes F, Melcher AH, Aubin JE (1991). Osteogenic progenitor cells in rat bone marrow stromal populations exhibit self-renewal in culture. *Blood* 77(9):1906-1911.

McKee MD, Nanci A (1996). Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. *Connect Tissue Res* 35(1-4):197-205.

Mehta RP, Deschler DG (2004). Mandibular reconstruction in 2004: an analysis of different techniques. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 12(4):288-293.

Meury T, Verrier S, Alini M (2006). Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts in vitro by interfering with osterix expression. *J Cell Biochem* 98(4):992-1006.

Meyer U, Meyer T, Jones DB (1998). Attachment kinetics, proliferation rates and vinculin assembly of bovine osteoblasts cultured on different pre-coated artificial substrates. *J Mater Sci Mater Med* 9(6):301-307.

Meyer U, Meyer T, Wiesmann HP, Stratmann U, Kruse-Losler B, Maas H, Joos U (1999a). The effect of magnitude and frequency of interfragmentary strain on the tissue response to distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 57(11):1331-1339; discussion 1340-1331.

Meyer U, Wiesmann HP, Kruse-Losler B, Handschel J, Stratmann U, Joos U (1999b). Strain-related bone remodeling in distraction osteogenesis of the mandible. *Plast Reconstr Surg* 103(3):800-807.

Meyer U, Joos U, Wiesmann HP (2004). Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part III. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(7):635-641.

Meyer U, Wiesmann HP (2005a). Bone and cartilage tissue engineering. Heidelberg, Berlin, Tokyo, New York: Springer.

Meyer U, Wiesmann HP (2005b). Tissue engineering: a challenge of today's medicine. *Head Face Med* 1:2.

Moosmann S, Hutter J, Moser C, Krombach F, Huss R (2005). Milieu-adopted in vitro and in vivo differentiation of mesenchymal tissues derived from different adult human CD34-negative progenitor cell clones. *Cells Tissues Organs* 179(3):91-101.

Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ (2004). Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. *J Dent Res* 83(3):204-210.

Naujoks C, R. D, J. H (2008). Aktueller Stand des osteogenen Tissue Engineerings. *Zahnärztliche Mitteilungen* 98(19):2688 - 2695.

Ng AM, Saim AB, Tan KK, Tan GH, Mokhtar SA, Rose IM, Othman F, Idrus RB (2005). Comparison of bioengineered human bone construct from four sources of osteogenic cells. *J Orthop Sci* 10(2):192-199.

Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Troger M, Kloss F, Neukam FW (2001). Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 12(5):495-502.

Nkenke E, Weisbach V, Winckler E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Neukam FW (2004). Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(2):157-163.

O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ (2005). The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 26(4):433-441.

Pelissier P, Villars F, Mathoulin-Pelissier S, Bareille R, Lafage-Proust MH, Vilamitjana-Amedee J (2003). Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a madreporic ceramic in rats. *Plast Reconstr Surg* 111(6):1932-1941.

Petrovic L, Schlegel AK, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J (2006). Different substitute biomaterials as potential scaffolds in tissue engineering. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21(2):225-231.

Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143-147.

Polykandriotis E, Arkudas A, Horch RE, Sturzl M, Kneser U (2007). Autonomously vascularized cellular constructs in tissue engineering: opening a new perspective for biomedical science. *J Cell Mol Med* 11(1):6-20.

Pretorius JA, Melsen B, Nel JC, Germishuys PJ (2005). A histomorphometric evaluation of factors influencing the healing of bony defects surrounding implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20(3):387-398.

Quarto R, Thomas D, Liang CT (1995). Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif Tissue Int* 56(2):123-129.

Richard C, Baro J, Bello-Fernandez C, Hermida G, Calavia J, Olalla I, Alsar MJ, Loyola I, Cuadrado MA, Iriando A, et al. (1995). Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) administration after autologous bone marrow transplantation for acute myeloblastic leukemia enhances activated killer cell function and may diminish leukemic relapse. *Bone Marrow Transplant* 15(5):721-726.

Rodan GA (1992). Introduction to bone biology. *Bone* 13 Suppl 1(S3-6).

Rouwkema J, de Boer J, Van Blitterswijk CA (2006). Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng* 12(9):2685-2693.

Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA (2008). Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 26(8):434-441.

Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Ichinose S, Shinomiya K, Muneta T (2004). Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates. *Blood* 104(9):2728-2735.

Sasso RC, LeHuec JC, Shaffrey C (2005). Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment. *J Spinal Disord Tech* 18 Suppl(S77-81).

Schlegel KA, Fichtner G, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J (2003). Histologic findings in sinus augmentation with autogenous bone chips versus a bovine bone substitute. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18(1):53-58.

Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Rossler S, Sewing A, Meyer J, Hoogestraat D (2002). Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest. An experimental pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 13(3):312-319.

Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO (1999). Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res* 17(2):269-278.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364(9429):149-155.

Smolka W, Iizuka T (2005). Surgical reconstruction of maxilla and midface: clinical outcome and factors relating to postoperative complications. *J Craniomaxillofac Surg* 33(1):1-7.

Tanaka H, Murphy CL, Murphy C, Kimura M, Kawai S, Polak JM (2004). Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells: effects of culture conditions and dexamethasone. *J Cell Biochem* 93(3):454-462.

Terheyden H, Knak C, Jepsen S, Palmie S, Rueger DR (2001). Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30(5):373-379.

Terminé J, Robey P (1996). Bone matrix proteins and the mineralization process. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. M Favus editor. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 24-28.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145-1147.

Trounson A (2002). Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types. *Reprod Biomed Online* 4 Suppl 1:58-63.

Turhani D, Weissenbock M, Watzinger E, Yerit K, Cvikl B, Ewers R, Thurnher D (2005). In vitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *Int J Oral Maxillofac Surg* 34(5):543-550.

Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, Bulnheim U, Rychly J, Kirkpatrick CJ (2007). Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 28(27):3965-3976.

Vacanti CA, Kim W, Upton J, Vacanti MP, Mooney D, Schloo B, Vacanti JP (1993). Tissue-engineered growth of bone and cartilage. *Transplant Proc* 25(1 Pt 2):1019-1021.

Villars F, Guillotin B, Amedee T, Dutoya S, Bordenave L, Bareille R, Amedee J (2002). Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(4):C775-785.

Weibrich G, Trettin R, Gnoth SH, Gotz H, Duschner H, Wagner W (2000). [Determining the size of the specific surface of bone substitutes with gas adsorption]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4(3):148-152.

Wenger A, Stahl A, Weber H, Finkenzeller G, Augustin HG, Stark GB, Kneser U (2004). Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 10(9-10):1536-1547.

Wiesmann H, Hartig M, Stratmann U, Meyer U, Joos U (2001). Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1538(1):28-37.

Wiesmann HP, Joos U, Meyer U (2004). Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(6):523-530.

Wojciak-Stothard B, Curtis AS, Monaghan W, McGrath M, Sommer I, Wilkinson CD (1995). Role of the cytoskeleton in the reaction of fibroblasts to multiple grooved substrata. *Cell Motil Cytoskeleton* 31(2):147-158.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242(4885):1528-1534.

Wulf GG, Viereck V, Hemmerlein B, Haase D, Vehmeyer K, Pukrop T, Glass B, Emons G, Trumper L (2004). Mesengenic progenitor cells derived from human placenta. *Tissue Eng* 10(7-8):1136-1147.

Wurzler KK, Emmert J, Eichelsbacher F, Kubler NR, Sebald W, Reuther JF (2004). [Evaluation of the osteoinductive potential of genetically modified BMP-2 variants]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8(2):83-92.

Zavazava N (2003). Embryonic stem cells and potency to induce transplantation tolerance. *Expert Opin Biol Ther* 3(1):5-13.

Zernik J, Twarog K, Upholt WB (1990). Regulation of alkaline phosphatase and alpha 2(I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. *Differentiation* 44(3):207-215.

Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19(12):1129-1133.

zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ (2003). In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 71(1):18-27.

## 7 Danksagung

Mein Dank gilt allen die mir bei der Erstellung der Arbeit geholfen haben. In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Privatdozent Dr. Dr. Jörg Handschel bedanken, für seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung und Förderung. Insbesondere für seine stetige Diskussionsbereitschaft bei Fragen und Problemen.

Des Weiteren möchte ich Herrn Universitätsprofessor Dr. Dr. Norbert Kübler für meine klinische Ausbildung, den wissenschaftlichen Freiraum und die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten, Geräte und Materialien danken.

Für die tatkräftige Unterstützung im Labor und den nicht zu unterschätzenden Ratschlägen möchte ich mich ganz besonders bei Frau Dr. rer. nat. Karin Berr, MSc. Fabian Langenbach und Frau Julia Hartmann (MTA) bedanken. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Gesine Kögler für die Bereitstellung der USSCs bedanken.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Dr. Ulrich Meyer und Frau PD Dr. Dr. Rita Depprich danke ich für die Bereitschaft zu kritischen wissenschaftlichen Diskussionen.

Zu guter letzt danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Frau Kerstin und meiner Tochter Nora für die Unterstützung und den Rückhalt während dieser Arbeit sowie für die zeitlichen Freiräume.

## 8 Lebenslauf

Vorname: Christian Daniel  
Name: Naujoks  
Geburtsdatum: 25. April 1976  
Geburtsort: Frechen  
Familienstand: verheiratet, eine Tochter

Adresse: Von-Bodelschwingh-Weg 67b  
50374 Erftstadt

### Schulbildung

1982 – 1986 Janusz-Korczak Grundschule Erftstadt Erp  
1986 – 1992 Städtische Realschule Erftstadt Lechenich  
1992 – 1995 Städtisches Gymnasium Erftstadt Lechenich

### Grundwehrdienst

1995 – 1996 Sanitäter im Jagdbombergeschwader 31 „Boelcke“, Kerpen

### Studium

1996 - 2002 Studium der Medizin, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn  
2002 - 2005 Studium der Zahnmedizin, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

### Klinische Ausbildung

08/1998 Famulatur, Chirurgische Abteilung des Kreiskrankenhaus Euskirchen.  
08/1999 Famulatur, Anästhesiologische Abteilung des St. Elisabeth Krankenhaus in Köln.  
03/2000 Famulatur, Schwerpunkt Pneumologie/ Allergologie/ Mukoviszidose, Universitätskinderklinik Bonn  
08/2000 Famulatur, Allgemeinmedizinische Praxis Erpenbach/ Molitor, Erftstadt.

- 2002 - 2005 Aushilfstätigkeit im chirurgischen und orthopädischen Dienst,  
Kreiskrankenhaus Mechernich
- 2002 – 2005 Dozententätigkeit für Anatomie und Physiologie an der  
Operations-Technische-Assistenten-Schule des St.  
Marienhospital Bonn.
- seit 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Kiefer- und  
Plastische Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf mit  
der Zielsetzung der Facharztausbildung in der Mund-, Kiefer- und  
Gesichtschirurgie.

### **Promotion:**

- 01/2006 Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Hohen Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-  
Wilhelms-Universität Bonn zu dem Thema **„Einfluß der  
Zytokinsynthese von peripheren Blutzellen und  
Tumornekrosefaktor-alpha-Promotorpolymorphismen auf  
den klinischen Verlauf bei Mukoviszidose“**, Doktorvater  
Universitätsprofessor Dr. Stefan Zielen, Universitätskinderklinik,  
Adenaueralle 119, 53113 Bonn.

### **Wissenschaftliche Auszeichnung**

- 2003 'Travel stipend' zur North American Cystic Fibrosis Conference