

Entwicklung eines *in vitro*-Modells zur Evaluation der Effekte mechanischer Stimulierung von humanen Osteoblasten in 3D-Biomaterialien und Testung der Biokompatibilität

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Fakultät für Biologie



vorgelegt von

Lukas Volk
geboren in Hilden

an der
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Freiburg im Breisgau, April 2023

Angefertigt am Universitätsklinikum Freiburg,
Department für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde,
Abteilung Orale Biotechnologie

Dekanin der Fakultät für Biologie: Prof. Dr. Sonja-Verena Albers

Promotionsvorsitzender: Prof. Dr. Andreas Hiltbrunner

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Thorsten Steinberg

verantwortlicher Betreuer seitens der Fakultät für Biologie: Prof. Dr. Winfried Römer

Referent: Prof. Dr. Winfried Römer

Koreferentin: Prof. Dr. Anne-Kathrin Classen

Drittprüfer: Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Borner

Datum der mündlichen Prüfung: 06.07.2023

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung.....	1
2. Abstract	3
3. Einleitung.....	4
3.1. Zielsetzung.....	4
3.2. Grundlagen der Knochenbiologie	6
3.2.1. Anatomie der Knochen.....	6
3.2.2. Knochenentstehung und Knochenumbau.....	6
3.2.3. Entstehung und Eigenschaften der Osteoblasten.....	8
3.2.4. Intrazelluläre Signalwege in Osteoblasten.....	8
3.2.5. Osteoblasten und Osteozyten als Mechanosensoren	10
3.2.6. Zell-Matrix-Adhäsion und Fokaladhäsionen.....	11
3.3. Biomaterialien	12
3.3.1. Definition	12
3.3.2. Eignung von Materialien für die Versorgung von großen Knochendefekten	12
3.3.3. Evaluierung der Zytotoxizität von Biomaterialien <i>in vitro</i>	13
3.4. Testsystem für mechanische Stimulation durch Kompression	14
4. Material und Methoden.....	16
4.1. Abkürzungen	16
4.2. Medien.....	17
4.3. Chemikalien und Reagenzien	17
4.4. Zellen, Zellcharakterisierung, Zellkultur	17
4.5. Stimulation von primären, humanen Osteoblasten mittels BMP-2	19
4.6. Art, Beschaffenheit und Herkunft von Biomaterialien	19
4.7. Messung der Materialquellung von alginatbasierten Biomaterialproben	22
4.8. Proliferationsverfolgung durch Impedanzmessung.....	22
4.9. Besiedelung von Materialproben	23
4.10. Beschreibung und Charakterisierung der Kompressionsmaschine.....	23
4.11. Herstellung von Zell-beladenen und Zell-freien Fibringelen	24
4.12. Verifizierung der Zellviabilität in Fibringelen	25
4.13. Messung des Elastizitätsmoduls von Fibringelen in Abhängigkeit von der Fibrinogenkonzentration.....	25
4.14. Messung des Elastizitätsmoduls von Fibringelen in Abhängigkeit von der Kompressionsfrequenz	25
4.15. Mechanische Stimulation von Osteoblasten in Fibringelen durch zyklische Kompression ...	27
4.16. Gelaufschluss und RNA-Extraktion aus Zell-beladenen Fibringelen.....	27
4.17. Array-basierte quantitative RT-PCR (qPCR)	28

4.18. Gefrierschnitte.....	28
4.19. Fluoreszenzfärbungen und Fluoreszenzmikroskopie	29
4.20. Konfokale Laserscanningmikroskopie	30
4.21. Rasterelektronenmikroskopie	30
5. Ergebnisse.....	31
5.1. Präklinische Evaluierung von potentiellen Biomaterialien auf ihre Eignung als Knochenersatzmaterial	31
5.1.1. PVCA- und PHM-Varianten zeigen nach Aufreinigung <i>in vitro</i> Biokompatibilität in Eluatversuchen.....	31
5.1.2. PVCA und PHM sind stark mikroporös	33
5.1.3. PVCA- und PHM-Varianten zeigen <i>in vitro</i> -Biokompatibilität in Besiedelungsversuchen, Supplementierungen vermitteln keinen zusätzlichen Effekt	35
5.1.4. Alginatbasierte Biomaterialien quellen in Zellkulturmedien und Pufferlösungen außer alphaMEM stark auf	44
5.1.5. Alginatbasierte Biomaterialien ermöglichen Besiedelung durch primäre, humane Osteoblasten nur nach Supplementierung mit Gelatine	45
5.1.6. Octenidin- und UV-C-Behandlung von alginatbasierten Biomaterialien ist ungeeignet zur Sterilisierung.....	52
5.1.7. Gamma-Bestrahlung ermöglicht die Sterilisierung und vollständige Besiedelung von makroporösen Alginat-Gelatine-Hydroxylapatitprobekörpern durch primäre, humane Osteoblasten in Langzeitkultur.....	55
5.2. Entwicklung und Charakterisierung eines Modellsystems zur Untersuchung des Einflusses von ‚confined compression‘ auf das Zellverhalten	58
5.2.1. Proliferationsgeschwindigkeit der primären, humanen Osteoblasten ist von Passage und Expansionslinie abhängig	58
5.2.2. Primäre, humane Osteoblasten können nur in DMEM-Mineralisierungsmedium mineralisierte Matrix bilden	59
5.2.3. Entwicklung eines Auswertungsalgorithmus für qPCR-Daten zur relativen Genexpressionsanalyse.....	60
5.2.4. Änderungen der Mediumkomposition gehen mit unspezifischen Änderungen der Genexpressionsmuster und Verringerung der Proliferationsgeschwindigkeit einher 72	
5.2.5. Primäre, humane Osteoblasten exprimieren Adhäsionsproteine in nicht-typischen Lokalisierungen und weisen eine eingeschränkte Adhäsion auf	78
5.2.6. Stimulation von primären Osteoblasten mit BMP-2 resultiert nicht in eindeutigen Genregulationsmustern.....	81
5.2.7. Entwicklung einer Apparatur und Methode zur zyklischen Kompression von Zellen in dreidimensionalen Scaffolds	90
5.2.8. Entwicklung einer Methode zur Herstellung von zell-beladenen Probekörpern für Kompressionsversuche.....	93
5.2.9. Entwicklung einer Methode zur Detektion des Kontakts zwischen Stempel und Proben in der Kompressionsapparatur	94

5.2.10.	Steifigkeit von Fibringelen ist abhängig von der Gelzusammensetzung, nicht aber von der Kompressionsfrequenz	96
5.2.11.	In Fibringele eingebettete Osteoblasten weisen in REM-Aufnahmen eine abgekugelte Zellmorphologie und fehlenden Kontakt zur Fibringelmatrix auf.....	97
5.2.12.	„Confined compression“ von Osteoblasten in Fibringelen führt nicht zu signifikanter Veränderung der Genexpressionsmuster im Kontext Osteogenese	98
6.	Diskussion	100
6.1.	Einflussfaktoren auf die <i>in vitro</i> -Biokompatibilität von PVCA-/PHM- und alginatbasierten Biomaterialien	100
6.1.1.	<i>In vitro</i> -Biokompatibilität von PVCA- und PHM-basierten Materialien	100
6.1.2.	<i>In vitro</i> -Biokompatibilität von alginatgelbasierten Materialien	103
6.1.3.	Porosität von PVCA-/PHM- und alginatgelbasierten Materialien	105
6.1.4.	Sterilisierung von PCVA-/PHM- und alginatbasierten Materialien und Besiedelungseigenschaften in Langzeitbesiedelungsversuchen.....	106
6.1.5.	Quellverhalten von alginatbasierten Materialien	108
6.1.6.	Fazit zur <i>in vitro</i> -Biokompatibilität von PVCA-/PHM- und alginatbasierten Materialien	108
6.2.	Entwicklung einer Methode für die „confined compression“ von Osteoblasten in dreidimensionalen Scaffolds und anschließender Analyse der Genexpressionsmuster.....	110
6.2.1.	Eigenschaften der entwickelten Kompressionsapparatur	111
6.2.2.	Auswertungsmethode für die Genexpressionsanalyse aus qPCR-Daten	114
6.3.	primäre, humane Osteoblasten weisen Defekte in ihrer osteogenen Reaktionsfähigkeit und der Lokalisation von Adhäsionsmolekülen auf.....	116
6.3.1.	Reaktion auf die Stimulation mit BMP-2 und auf Veränderung der Mediumkomposition	117
6.3.2.	Lokalisation von Adhäsionsmolekülen	119
6.4.	Effekte mechanischer Stimulation durch „confined compression“ auf primäre, humane Osteoblasten	120
6.5.	Schlussfolgerungen und Ausblick	123
7.	Abbildungsverzeichnis.....	125
8.	Referenzen	129
9.	Danksagung	139
10.	Anhang	140
10.1.	qPCR-Array Osteogenese	140
10.2.	Auswertungsalgorithmus für paarweisen Vergleich der $\Delta\Delta Cq$ -Werte	142
10.3.	Stimulation mit BMP-2 - Datenbanksuche mit PANTHER	147

1. ZUSAMMENFASSUNG

Große Knochendefekte (englisch ‚critical size defect‘) können ohne Unterstützung nicht vollständig regenerieren und werden klinisch daher in der Regel mit Implantaten aus nicht resorbierbaren Knochenersatzmaterialien versorgt, die dauerhaft im Körper verbleiben. Diese momentan übliche medizinische Versorgung bedarf der Verbesserung in zwei Bereichen: (i) Neuentwickelte, resorbierbare Knochenersatzmaterialien könnten eine vollständige Regeneration des Knochengewebes bei gleichzeitiger Degradation des Knochenimplantats ermöglichen. (ii) Außerdem könnte der Einsatz neuartiger Fertigungstechniken, wie des 3D-Drucks, zu einer verbesserten, patientenspezifischen Passform der Implantate im Sinne der personalisierten Medizin führen. Die dadurch erzielten Verbesserungen im Implantatdesign und in der Integration des Implantats in das Knochengewebe, sowie kürzere OP-Zeiten würden einen signifikanten Mehrwert für die Patienten bedeuten.

Im vorliegenden Projekt werden Knochenersatzmaterialsysteme auf ihre *in vitro*-Biokompatibilität hin untersucht, die in Kooperation mit akademischen und industriellen Partnern entwickelt wurden. Diese Materialsysteme sollen die Herstellung von neuartigen Knochenimplantaten ermöglichen, die beide oben genannten Verbesserungsansätze für die klinische Versorgung von ‚critical size‘-Knochendefekten kombinieren. Die Materialien basieren einerseits auf dem synthetischen Polymer Polyvinylencarbonat (PVCA) und dessen Derivat Polyhydroxymethylen (PHM) mit verschiedenen Supplementierungen und andererseits auf dem natürlichen Polysaccharid Alginate, das ebenfalls in Materialvarianten supplementiert wurde. Die Untersuchung der Materialien mithilfe von primären, humanen Osteoblasten als Zellen des Zielgewebes der geplanten Anwendung hat eine gute *in vitro*-Biokompatibilität der PVCA- und PHM-basierten Materialien auch ohne Supplementierung gezeigt. Die weitere Supplementierung mit Hydroxylapatit hat dabei trotz dessen bekannten, osteogenen Eigenschaften die *in vitro*-Biokompatibilität hier leicht verringert. Über die Demonstration der nicht zytotoxischen Eigenschaften und der Besiedlungsfähigkeit hinaus konnte gezeigt werden, dass primäre, humane Osteoblasten in den dreidimensional strukturierten, 3D-gedruckten Probekörpern aus PHM in der Lage waren, ein gewebeähnliches Gefüge aus Zellen und extrazellulärer Matrix zu bilden. Alginatevarianten mit und ohne Supplementierung von Hydroxylapatit waren dagegen nicht biokompatibel, da sie keine Zelladhäsion erlaubten. Die zusätzliche Supplementierung mit Gelatine konnte jedoch auch hier die *in vitro*-Biokompatibilität herstellen.

Zusätzlich zur *in vitro*-Biokompatibilitätsprüfung der Materialien wurde im Projekt ein Modellsystem zur mechanischen Stimulation von Osteoblasten während der Kultivierung in dreidimensionalen Scaffolds und zur anschließenden Analyse ihrer relativen Genexpression mittels qPCR-Arrays entwickelt und charakterisiert. Die mechanische Belastung von Knochengewebe *in vivo* hat einen großen Einfluss auf osteogene und Regenerationsprozesse. Das System erweitert das methodische Repertoire für die Analyse der Interaktion von Zellen mit 3D-Biomaterialien für die Knochengeweberegeneration und für die Untersuchung ihrer biologischen Grundlagen. Die im System als Modellzellen verwendeten primären, humanen Osteoblasten wurden in Bezug auf ihre Proliferation, Adhäsion und Reaktionsfähigkeit auf osteogene Stimulierung mit BMP-2 charakterisiert. Dabei wurden Defizite in der Zelladhäsion und der osteogenen Stimulierbarkeit festgestellt, die einen teilweisen Verlust der Osteoblasten-typischen Zellfunktionen bedeuten. Für die Durchführung der mechanischen Stimulation der Zellen wurde eine Apparatur entwickelt, die ‚confined compression‘ ermöglicht, also die Kompression bei Verhinderung der seitlichen Ausdehnung der Probekörper. Die mechanische Stimulation der Osteoblasten in Fibringelen als Modellmaterial mit der entwickelten Apparatur hatte überraschenderweise keinen signifikanten Effekt auf ihre Genexpressionsmuster im Kontext Osteogenese. Dies ist vermutlich auf die oben beschriebenen Defekte der Osteoblasten in osteogener Stimulierbarkeit und Adhäsion zurückzuführen.

Insgesamt bilden die Ergebnisse des Projekts ein umfassendes Modellsystem für die Prüfung der *in vitro*-Biokompatibilität neuentwickelter Biomaterialien, sowie für die Untersuchung der Effekte mechanischer Stimulation auf Osteoblasten in 3D-Biomaterialien. Die bisher verwendeten Zellen

bedürfen angesichts ihrer nicht Zellart-typischen Eigenschaften der weiteren Untersuchung oder des Austauschs. Insgesamt stellt das *in vitro*-System einen signifikanten Beitrag für die Verbesserung der klinischen Versorgung von ‚critical size‘-Knochendefekten dar. Es ermöglicht außerdem wichtige Einblicke in die Wechselwirkung zwischen neuen Biomaterialsystemen und den Zellen ihres Zielgewebes im Kontext Knochenregeneration erlauben.

2. ABSTRACT

Critical size defects in bone are not able to fully regenerate without medical intervention and are therefore usually treated with implants made of non-resorbable bone graft materials that remain in the body permanently. There is a clinical need for the improvement of this standard-of-care treatment in two regards: (i) Newly developed, resorbable bone graft materials would enable complete regeneration of critical size defects by being degraded and concomitantly replaced by newly formed bone tissue. (ii) The use of innovative manufacturing techniques like 3D printing would, in addition, improve the patient-specific implant-defect-fit according to the principles of personalized medicine. The corresponding improvements in implant design and tissue integration of the implant, as well as reduced time requirements for surgery would result in significantly increased benefit for patients.

As part of the presented project, two groups of novel bone graft materials were evaluated in terms of their *in vitro* biocompatibility. Both material groups were developed in cooperation with partners in academic research and industry and combine the improvement strategies for bone grafts introduced above. The materials are based on the synthetic polymer polyvinylene carbonate (PVCA) and its derivative polyhydroxymethylene (PHM) with a variety of added supplements, and on the natural polysaccharide alginate with similar supplementations, respectively. Primary, human osteoblasts were used as a model for the target tissue of the materials' intended use as bone grafts. Both PVCA and PHM without supplementation demonstrated high *in vitro* biocompatibility. Surprisingly, the additional supplementation with hydroxyl apatite, which had been described as osteogenic before, lowered PVCA's and PHM's *in vitro* biocompatibility slightly in this project. The results also demonstrated the ability of the osteoblasts to form a tissue-like complex of extracellular matrix and active cells inside of the three-dimensionally structured, 3D printed test specimens of PHM. Alginate-based material variants with and without supplementation with hydroxyl apatite were not biocompatible, as they did not allow cell adhesion. However, the additional supplementation with gelatin was able to achieve *in vitro* biocompatibility for the alginate-based material as well.

In addition to the *in vitro* biocompatibility testing, the presented project also comprises the development and characterization of a model system for the mechanical stimulation of 3D cultures of osteoblasts with biomaterials and the subsequent analysis of their relative gene expression with qPCR arrays. Mechanical loading is known to have a significant impact on osteogenic and regeneration processes in bone *in vivo*. The developed system expands the available set of methods for the analysis of interactions between cells and 3D biomaterials for bone regeneration and its biological mechanisms. The characterization of the model osteoblasts in terms of proliferation, adhesion and reaction to osteogenic stimulation with BMP-2 revealed shortcomings in cell adhesion and osteogenic response demonstrating a partial loss of osteoblast-specific cell characteristics. To enable the compression of cell-laden biomaterial specimens under conditions of 'confined compression', a custom apparatus was developed. 'Confined compression' describes a mode of compression that prevents lateral expansion of the specimen, which allows better analytical resolution of the cellular response compared to unconfined compression without spatial restrictions. Surprisingly, mechanical stimulation of the model osteoblasts in fibrin gels by 'confined compression' had no significant effect on osteogenesis-related gene expression, likely as a result of their aforementioned defects in cell adhesion and osteogenic response capabilities.

In conclusion, the project's presented results form a comprehensive model system for *in vitro* biocompatibility testing of newly developed, 3D printed biomaterials as well as for the analysis of effects of mechanical stimulation of osteoblasts in 3D biomaterials. Because of the demonstrated deficiencies in cell-type specific response, the model osteoblasts used here need further characterization or replacement. Nevertheless, the system presented here is a significant contribution to the ongoing improvement for the treatment of critical size defects with bone grafts. It also allows valuable insights into the interaction of novel biomaterials with cells of their target tissue in implant-assisted bone regeneration.

3. EINLEITUNG

3.1. Zielsetzung

Für die aktuelle chirurgische Versorgung großer Knochendefekte im Sinne einer Osteoplastik werden üblicherweise nicht resorbierbare, metallische Knochenersatzmaterialien wie Titan und Kobalt-Chrom eingesetzt.¹ Diese zeigen eine annehmbare Integration ins umgebende Knochengewebe und können durch ihre hohe Steifigkeit zwar die mechanischen Stütz- oder Schutzfunktionen des zu ersetzenden Knochens gut erfüllen^{2,3}, ihr permanenter Verbleib im Körper bedeutet aber eine unvollständige Regeneration des ersetzten Knochengewebes. Im Sinne einer möglichst vollständigen Heilung wäre es stattdessen zu begrüßen, wenn Knochendefekte versorgt werden könnten, ohne dass dafür Fremdkörper im Körper des Patienten verbleiben müssten.

Resorbierbare Implantatmaterialien, die im Gleichschritt mit der Heilung und Neubildung von nativem Gewebe aufgelöst werden, würden eine vollständige Wiederherstellung des nativen Knochens in Umfang, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften ermöglichen.⁴ Auch die natürliche Reaktionsfähigkeit des Knochens auf Reize wie etwa Belastung, sowie die Versorgung des regenerierten Knochengewebes, als auch des umgebenden Weichgewebes durch Vaskularisierung wäre wiederhergestellt.¹

Die Verwendung von sehr steifen metallischen Implantatmaterialien führt außerdem zu einer Verringerung der mechanischen Belastung des angrenzenden nativen Knochengewebes, dem sogenannten ‚stress shielding‘. Die durch diese Minderbelastung hervorgerufene Atrophie des Knochengewebes führt regelmäßig zur Schwächung der Implantatintegration im Gewebe, bis hin zum Verlust des Implantats.⁵ Permanente Implantate aus Metall können außerdem eine spätere diagnostische radiologische Bildgebung durch ihre Röntgenopazität entscheidend stören. Einige synthetische Materialien wie zum Beispiel Polyetheretherketon (PEEK) können dagegen mechanische Eigenschaften erreichen, die denen von nativem Knochengewebe sehr nahekommen. Das ‚stress shielding‘ ist dadurch deutlich verringert.^{6,7} PEEK ist jedoch biologisch durch seine hydrophobe Eigenschaft inert und wird nicht gut in das umgebende Knochengewebe integriert.⁸ Kunststoffe für die Anwendung als Knochenersatzmaterial, die resorbiert werden können, sind ebenfalls bisher nicht etabliert.

Des Weiteren wäre es wünschenswert, die Notwendigkeit längeren Nachbearbeitens von Implantaten während der Operation zu verringern und die Passform der Implantate zu verbessern. Der Einsatz von maßgeschneiderten, auf Basis von CT-gestützten, dreidimensionalen Modellen hergestellten Implantaten im Sinne der personalisierten Medizin würde dies erreichen. Es ergäben sich daraus verringerte Operationszeiten, und ein damit einhergehendes verringertes Infektionsrisiko, aber auch verringerte Heilungs- und Hospitalisierungszeiten für den Patienten.⁹

Die aktuell übliche Versorgung von Knochendefekten kritischer Größe mit biologisch weitgehend inerten Implantaten bedarf daher der Verbesserung in zwei Aspekten. Auf der Seite der verwendeten Materialien bedeutet der Einsatz von Metallen oder Kunststoffen oft, dass Fremdkörper dauerhaft im Körper verbleiben, die sich in ihren Eigenschaften signifikant vom Knochengewebe unterscheiden, das sie ersetzen. Der Einsatz von Biomaterialien, die im Verlauf des Heilungsprozesses resorbiert und dabei durch patienteneigenes Knochengewebe ersetzt werden, würde hier eine deutliche Verbesserung der Behandlung bedeuten.⁴ Die Verwendung patientenspezifischer, maßgefertigter Implantate würde auf der anderen Seite durch eine genauere Passform der Implantate und einer Verringerung der Operationszeit zu einer besseren Implantatintegration und einem verringertem Risiko für die Patienten führen.

Für beide Verbesserungsansätze gibt es bereits Entwicklungen, etwa den Einsatz von resorbierbaren Knochenersatzmaterialien anstelle von inerten Implantaten^{10,11}, oder der Fertigung patientenspezifischer Implantate aus Kunststoff und Metallen². Wünschenswert wäre es aber, beide Konzepte durch die Entwicklung maßgeschneiderter Implantate mit verbesserter biologischer

Integrations- und Resorptionsfähigkeit zu verbinden. Einen Beitrag zu diesem Ziel soll die hier vorliegende Arbeit leisten.

Zur Verkürzung von Operationszeiten und für eine bessere, patientenspezifische Passform der Implantate bietet sich für die Herstellung neuartiger Implantate die Technik der additiven Fertigung, zum Beispiel der 3D-Druck, an. Mit Varianten dieser Technik können viele verschiedene Materialien schnell und exakt in beinahe beliebige Form gebracht werden.^{5,12,13} Auch eine dezentrale Herstellung von Implantaten könnte so ermöglicht werden, zum Beispiel direkt in der behandelnden Klinik, um kurze Herstellungs- und Transportzeiten zu erreichen.¹⁴

Die Verwendung von neuartigen Materialien für medizinische Anwendungen als Medizinprodukte wie etwa Implantate setzt deren präklinische Prüfung auf Unbedenklichkeit und Eignung für die geplante Therapie voraus. Diese beiden Eigenschaften sind die wesentlichen Aspekte der sogenannten Biokompatibilität (mehr dazu, siehe Kapitel 3.3). Erste Schritte einer solchen Prüfung *in vitro* war der Inhalt des ersten Teilprojekts der vorliegenden Arbeit.

Die dabei untersuchten Materialien sind in Kooperationsprojekten mit Partnern aus der akademischen Forschung und einem potentiellen Verwertungspartner aus der Industrie entstanden. Die zuerst beschriebenen Materialien stammen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rolf Mülhaupt am Freiburger Materialforschungszentrum der Universität Freiburg. Diese Materialien basieren auf dem synthetischen Polymer Polyvinylencarbonat (PVCA) und dessen Derivat Polyhydroxymethylen (PHM). Des Weiteren wurden Materialien untersucht, die durch die Arbeitsgruppe von Dr. Rainer Detsch am Lehrstuhl für Werkstoffwissenschaften der Universität Erlangen-Nürnberg auf der Basis von Alginatgelen entwickelt wurden.

Beide Materialsysteme wurden mit dem Ziel entwickelt, sie mithilfe von additiven Fertigungstechniken (3D-Druck) für die Herstellung von Knochenimplantaten einsetzen zu können und sie mit Resorptionseigenschaften auszustatten, sodass sie nach Implantation bei gleichzeitiger Resorption durch natives Knochengewebe ersetzt werden können.

Das Materialsystem auf Basis von Alginat soll dabei als multifunktionelles, mehrschichtiges Implantat zur Versorgung von Defekten des Schädelknochens zum Einsatz kommen (siehe Abbildung 1). Eine äußere, massiv gedruckte Schicht (HGA, Schicht A) soll biologisch möglichst inert sein und dadurch das Einwachsen von Zellen aus dem Weichgewebe verhindern und das Implantat nach außen hin abschließen. Die darunterliegende Schicht des Implantats (HGB, Schicht B) soll mittels 3D-Druck einen porösen Aufbau erhalten und mit Hydroxylapatit supplementiert sein. Dadurch soll sie mit osteokonduktiven Eigenschaften ausgestattet sein, also das Einwachsen von Zellen des umgebenden Knochengewebes ermöglichen und begünstigen, um so eine Regeneration von nativem Knochen zu erlauben. Nach innen abgeschlossen werden soll das Implantat durch eine weitere Deckschicht (HGC) aus inertem Alginatgel. Auch hier soll dieses Material das Einwandern von Zellen des Weichgewebes verhindern und die Funktion der Dura Mater übernehmen, die das Gehirn als äußerste Hirnhaut umgibt und schützt.

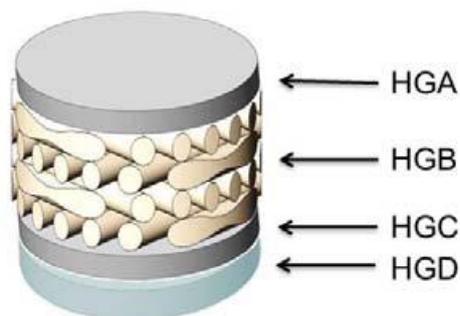


Abbildung 1: mehrschichtiger Aufbau des geplanten Knochenimplantats auf Alginatgelbasis; HGA: äußere inerte Deckschicht, HGB: osteokonduktive Knochenregenerationsschicht, HGC: innerer inerte Deckschicht, HGD: verworfen

Im zweiten Projektabschnitt sollte das Repertoire an *in vitro*-Untersuchungsmethoden um ein System zur Analyse des Einflusses von mechanischer Stimulation auf (Knochengewebs-) Zellen während der Interaktion mit dreidimensionalen Materialien erweitert werden. Mithilfe eines solchen Systems könnten Erkenntnisse über das Regenerationspotential von Implantatmaterialkandidaten gewonnen werden, die über die reine *in vitro* Zytotoxizitätsprüfung hinausgehen. Wünschenswert wären einerseits Versuche zur Analyse des Zellverhaltens nach mechanischer Stimulation in einem dreidimensional strukturierten Material, was die physiologische Belastung und Stimulation von Zellen besser nachbildet als statische Kulturen.¹⁵ Andererseits könnten Versuche, die die Materialeigenschaften während und nach der Interaktion von Zellen mit dem Material messbar machen, Einschätzungen der mechanischen Eignung des Materials erlauben.

3.2. Grundlagen der Knochenbiologie

Zum Verständnis von Regenerationsprozessen im Knochengewebe ist ein Überblick über die Anatomie und Physiologie des Knochens und seiner Zellen nötig. In den folgenden Absätzen sollen die wichtigsten Aspekte in dieser Hinsicht kurz umrissen werden.

3.2.1. Anatomie der Knochen

Von außen nach innen betrachtet bestehen Knochen aus den folgenden vier Strukturen: Die äußerste Schicht, einer dünnen Knochenhaut, dem Periost, das mit seiner hohen Zahl an Stammzellen für Knochenheilung und Dickenwachstum wichtig ist.¹⁶⁻¹⁸ Darunter liegt die Kortikalis, eine kompakte, wenig poröse Schicht aus mineralisiertem Knochengewebe. Das Innere der Knochen ist in der Regel ausgefüllt mit der Spongiosa, die ebenfalls mineralisiert, aber deutlich poröser ist als die Kortikalis. Kortikalis und Spongiosa stehen im Durchschnitt in einem Volumenverhältnis von etwa 80:20.¹⁶ Nach innen abgeschlossen wird der Knochen von einer weiteren Knochenhaut, dem Endosteum. Diese bedeckt alle inneren Oberflächen von Kavitäten im Knochen, etwa von Havers-Kanälen (siehe unten) und ist wie das Periost für Knochenauf- aber auch für Knochenabbau zuständig.¹⁸

Grundlegendes biologisches und strukturelles Element von Kortikalis und Spongiosa sind die Osteons. Diese zylindrischen „Grundbausteine“ des mineralisierten Knochengewebes enthalten ein zentral liegendes Gefäß im sogenannten Havers-Kanal. Ihn umgeben Lamellae, schichtweise aufgebautes Knochengewebe, mit darin eingeschlossenen Osteozyten, einem der für die Knochenfunktion mit am wichtigsten Zelltypen. Die Osteozyten befinden sich in den Lamellae in flüssigkeitsgefüllten Kanälen, die Lacunae und Canaliculi genannt werden.¹⁹

Die Lamellae, und damit auch das gesamte mineralisierte Knochengewebe, erhält seine mechanischen und biologischen Eigenschaften aus dem Zusammenwirken seiner drei grundlegenden Bestandteile: organische Matrix, mineralisches Hydroxylapatit und Knochenzellen. Die organische Matrix besteht dabei zum größten Teil aus Kollagen Typ 1-Fibrillen, außerdem in geringerem Umfang aus weiteren Matrixproteinen, etwa Osteocalcin und Proteoglykanen.¹⁹⁻²¹ Die anorganische Matrix besteht aus mineralischem Hydroxylapatit (,carbonated hydroxyapatite'²²), dessen kristalline Struktur von den umgebenden Kollagen-Fibrillen beeinflusst wird.²³ Einige der weiteren Proteine der organischen Matrix steuern wiederum die Kollagenfibrillenbildung, etwa Decorin¹⁹, oder regulieren die Mineralisierung, wie etwa BSP und Osteopontin.²¹

Kortikalis und Spongiosa unterscheiden sich im Grad der Ordnung und Dichte der Kollagen-Fibrillen und der Mengenverhältnisse von Kollagen und anderen Proteinen und dadurch in der Gesamtstruktur des Gewebes. Unterschiede gibt es auch zwischen verschiedenen Bereichen des Knochens. So ist zum Beispiel die Dichte der Kollagenfibrillen in der Diaphyse (dem Schaft der länglichen Röhrenknochen) am höchsten.^{19,23}

3.2.2. Knochenentstehung und Knochenumbau

In der Embryonalentwicklung werden zwei verschiedene Mechanismen der Knochenentstehung (Ossifikation) beobachtet. Knochen der Extremitäten entstehen durch die sogenannte endochondrale Ossifikation, dabei bildet sich Knochengewebe aus einem Knorpelvorläufer. Die Knochen der Skelettachse (Wirbelsäule, Rippen, Schlüsselbein, Schädel) entstehen durch intramembranöse

Ossifikation. Hier gibt es keinen knorpeligen Vorläufer, Knochen bilden sich direkt aus mesenchymalem Gewebe.

Beiden Mechanismen gemeinsam ist die initiale Kondensation von mesenchymalen Vorläuferzellen. Im Fall der endochondralen Ossifikation exprimieren diese die chondralen beziehungsweise osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktoren SOX9 und RUNX2 und differenzieren zu Chondrozyten. Sie produzieren extrazelluläre Matrix des Knorpelgewebes, unter anderem Kollagen Typ II. Der so gebildete Knorpel wird dabei umhüllt von Perichondrium, einer dünnen Hülle, die ebenfalls Chondrozyten enthält. Chondrozyten im mittleren Teil des Knorpels, der Diaphyse des sich entwickelnden Knochens sind dann die ersten, die weiter ausdifferenzieren zu hypertrophischen Chondrozyten, die an Größe stark zunehmen und nun Kollagen Typ 10 statt Kollagen Typ 2 und außerdem Osteopontin (SPP1) exprimieren. Die so gebildete Matrix mineralisiert nun und ein Teil der hypertrophischen Chondrozyten geht anschließend in die Apoptose. Ein weiterer Teil jedoch differenziert erneut weiter zu Osteoblasten. Auch im Perichondrium entstehen durch Differenzierung von Chondrozyten Osteoblasten. Zusammen mit Osteoklasten und Endothelzellen wandern diese entlang von in den Knorpel integrierten Blutgefäßen in den Knorpel ein. Sie bauen dort die von den hypertrophischen Chondrozyten gebildete Knorpelmatrix ab und ersetzen sie durch Knochengewebe. Dabei entsteht eine Knochenmarkkavität in der Diaphyse des neuen gebildeten Knochens. Die Wachstumsfugen, also die Bereiche in denen neues Knorpelgewebe gebildet und anschließend zu Knochengewebe umgebaut wird, wandern durch fortschreitende Knochenbildung in Richtung der Epiphysen des Knochens.²⁴

Bei der intramembranösen Ossifikation, die für die Bildung von platten Knochen, also etwa dem Schädel verantwortlich ist, differenzieren die kondensierten mesenchymalen Zellen direkt zu Osteoblasten. Sie exprimieren Knochenmatrix, die dann mineralisiert. Dabei werden Osteoblasten eingeschlossen, die daraufhin zu Osteozyten weiter ausdifferenzieren. Ebenfalls in die mineralisierende Matrix eingeschlossen werden Blutgefäße, die daraufhin in der Spongiosa des neuen Knochens das Knochenmark bilden. Mesenchymale Zellen auf der Oberfläche des Knochens bilden das Periosteum, Osteoblasten auf der Innenseite des Knochens bilden weiter Knochengewebe und verdicken dadurch die Kortikalis des Knochens.²⁵

Auch nach der Embryonalentwicklung wird ständig Knochen auf- und abgebaut. Neben den bereits erwähnten Osteozyten sind daran wesentlich zwei weitere für Knochen charakteristische Zelltypen beteiligt: die Osteoklasten und Osteoblasten.

Dem aktuellen Wissensstand zufolge scheinen Osteozyten diejenigen Zellen zu sein, die für die Erkennung von Schäden im Knochengewebe maßgeblich verantwortlich sind. Osteozyten besitzen eine Vielzahl kleinster Zellausläufer, durch welche sie per ‚gap-junctions‘ zu einem weitreichenden Netzwerk untereinander verbunden sind. Tritt eine Beschädigung im Knochen auf, werden diese Verbindungen teilweise zerstört, die betroffenen Osteozyten gehen in die Apoptose. Dies stellt das erste Signal zur Initiierung des Knochenumbauprozesses dar. Es wird im Endosteum aufgenommen, dort bildet sich daraufhin das Knochenumbaukompartiment (‚bone remodeling compartment‘). Durch diese Kompartimentierung wird der Knochenab- und -umbau örtlich auf die beschädigten Bereiche beschränkt. Die Zellen des Knochenumbaukompartiments produzieren Wachstumsfaktoren wie RANKL, die die Bildung von Osteoklasten aus deren Vorläuferzellen befördern.^{26,27}

Osteoklasten sind große, mehrkernige Zellen, die auf die Resorption von Knochen spezialisiert sind. Sie bilden sogenannte Faltensäume, Zellmembranbereiche an der Kontaktfläche mit der Knochenmatrix, an der die Resorption stattfindet. Hier sezernieren Osteoklasten Protonen sowie Proteasen wie Cathepsin K und MMP-9. Dies bildet zwischen Osteoklasten und Knochenmatrix, in den sogenannten Howship'schen Lacunae, ein Milieu, das zum Abbau der mineralischen Matrix durch Ansäuerung sowie der organischen Proteinbestandteile des Knochengewebes auf enzymatischem Weg sehr gut geeignet ist.²⁸

Gleichzeitig mit der Aktivierung von Osteoklasten wird aber auch die Bildung von Osteoblasten durch die Knochenumbaukompartimente des Endosteums angeregt. Diese knochenaufbauenden Zellen bilden neue, unreife Knochenmatrix, das Osteoid, während und nachdem die Osteoklasten ihren

Knochenabbau betreiben. Dadurch wird das vorherige Knochenvolumen wiederhergestellt.²⁶ Herkunft und Funktion der Osteoblasten werden im nächsten Abschnitt näher erläutert.

3.2.3. Entstehung und Eigenschaften der Osteoblasten

Wesentliche Funktion der Osteoblasten ist der Aufbau von Knochengewebe. Sie sind aber auch durch direkten Kontakt und indirekt durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren an der Osteoklastogenese beteiligt, sowie endokrin aktiv.²⁹ Osteoblasten entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen (MSC)³⁰, wobei der genaue Weg ihrer Entwicklung je nach Gewebe und Mechanismus der Knochenentstehung variieren kann.³¹ Der zentrale Transkriptionsfaktor, der über den gesamten Prozess ihrer Differenzierung und darüber hinaus das Verhalten von Osteoblasten bestimmt ist RUNX2^{30,32}. Die Expression dieses Transkriptionsfaktors ist dabei sowohl notwendig als auch ausreichend, um mesenchymale Zellen zu Osteoblasten differenzieren zu lassen.³² Induziert wird die Expression von RUNX2 in mesenchymalen Stammzellen durch den indian hedgehog (ihh)-Signalweg, welcher die Proliferation der Stammzellen anregt und sie auf eine Differenzierung in Richtung Osteoblasten festlegt.^{30,33,34} Im frühen Differenzierungsstadium des unreifen Osteoblasten beginnen diese Zellen dann mit der Expression von Knochen-Matrix-Proteinen wie Kollagen Typ 1, Osteopontin und Osteocalcin sowie weiteren Osteoblasten-typischen Proteinen wie der alkalischen Phosphatase und bilden dadurch noch unreifes Knochengewebe mit nicht vollständig geordneten Kollagenfasern, das sogenannte Osteoid.^{33,35} Im späteren Verlauf der Differenzierung wird RUNX2 herunterreguliert, die Zellen werden zu reifen Osteoblasten und das Knochengewebe reift durch Ordnung der Kollagenfasern.³⁶ Osteoblasten sind auch für die Mineralisierung der Knochenmatrix verantwortlich. Sie exprimieren dafür Kollagen Typ 1, das die Bildung von Hydroxylapatitkristallen steuert²³, alkalische Phosphatase, die unter anderem durch Spaltung von Pyrophosphat dessen Serumkonzentration senkt und die Konzentration von Phosphat erhöht und damit die Mineralisierung begünstigt³⁷, sowie weiteren Proteinen wie BSP, das eine wichtige Rolle bei der initialen Kristallbildung von Hydroxylapatit spielt.³⁸ Im Zuge des letzten Differenzierungsschritts von Osteoblasten reduziert ein Teil dieser Zellen ihre Matrixproduktion und wird in der mineralisierten Matrix eingeschlossen³⁹. Die fortschreitende Mineralisierung und die verringerte Verfügbarkeit von Sauerstoff innerhalb der Matrix sind zwei Faktoren die dabei die weitere Differenzierung dieser Zellen zu Osteozyten anregt.⁴⁰ Diese Zellen machen den größten Teil der Zellen im Knochen aus (~95%)⁴¹ und haben eine wichtige Funktion bei der Detektion mechanischer Reize (siehe Kapitel 3.2.5). Der restliche Teil der Osteoblasten geht in die Apoptose oder verbleibt als Knochensaumzellen auf der Oberfläche des Knochens.^{42,43}

3.2.4. Intrazelluläre Signalwege in Osteoblasten

Das Verhalten von Osteoblasten wird intrazellulär durch eine Reihe von Signalwegen gesteuert, die auch in anderen Zelltypen entscheidende Regelungsfunktionen haben. Die Osteoblasten reagieren damit auf extrazelluläre Reize mit Proliferation, Differenzierung oder einer veränderten Expression Osteoblasten-spezifischer Gene und der damit einhergehenden verstärkten oder verringerten Bildung von Knochengewebe. Zu diesen extrazellulären Reizen gehören Wachstumsfaktoren, Hormone, aber auch mechanische Reize. Untereinander sind die Signalwege vielfältig vernetzt und beeinflussen sich gegenseitig. Gemeinsam ist ihnen allerdings die Ausübung ihrer Effekte durch eine kleine Gruppe von zentral wichtigen Transkriptionsfaktoren, die entscheidend das Zellverhalten von Osteoblasten bestimmen; dazu gehört allen voran RUNX2, aber auch Osterix (OSX) und COX-2. Die wichtigsten dieser Signalwege werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Im TGF- β -Signalweg führt die Bindung von TGF- β an seinen Rezeptor (TGFBR1/TGFBR2) auf der Zellmembran zur intrazellulären Phosphorylierung von Smad2/3. Dieses würde bei Ausbleiben der Phosphorylierung nach Ubiquitinierung von der Zelle abgebaut. Phosphoryliertes Smad2/3 kann dadurch mit seinem Bindungspartner Smad4 interagieren und in den Zellkern translozieren. Zusammen mit weiteren Faktoren aktiviert der Komplex daraufhin die Expression von Zielgenen, die die frühen Differenzierungsprozesse von Osteoblasten und ihre Proliferation anregen, späte Proliferationsprozesse dagegen inhibieren. In einem weiteren TGF- β -abhängigen Signalweg führt dessen Bindung zu seinen Rezeptoren intrazellulär zur Aktivierung der p38 und ERK1/2-MAPK-

Signalkaskaden. Daraufhin wird im Zellkern der zentrale Osteoblastentranskriptionsfaktor RUNX2 durch Phosphorylierung aktiviert, was zum Beispiel die Expression von OSX - ebenfalls ein Transkriptionsfaktor - steigert.⁴⁴

Ein mit dem TGF- β -Signalweg eng verbundener weiterer Signalweg reagiert auf die Bindung von Knochenmorphogenetische Proteine (BMPs) an ihre Rezeptoren. Auch hier wird durch die Phosphorylierung von Smad-Proteinen deren Ubiquitin-abhängiger Abbau verhindert. Dies sind im BMP-Signalweg Smad 1/5/8. Auch diese binden nach Aktivierung an Smad4 und translozieren in den Zellkern. Dort bewirken sie die verstärkte Expression der Transkriptionsfaktoren RUNX2, DLX5 und OSX. Dadurch wird die Differenzierung von Osteoblasten in all ihren Entwicklungsstadien begünstigt. Auch in diesem Signalweg wird neben der Smad-abhängigen Signaltransduktion auch über die Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 die Expression von Osteoblasten-Transkriptionsfaktoren (RUNX2, DLX5, OSX) aktiviert. Osteoblasten-aktivierende Funktion haben zum Beispiel BMP-2 und BMP-4.⁴⁵ Die subkutane Gabe von BMP-2 ist hinreichend, um die Bildung von Knochengewebe *de novo* zu induzieren (sogenannte Osteoinduktion).⁴⁶ Neben einer Vielzahl von intra- und extrazellulären Einflussfaktoren auf diesen Signalweg ist die Inhibierung des BMP-Signalwegs durch die extrazellulären Proteine Noggin und Chordin wichtig. Diese Proteine binden extrazellulär an BMPs und verhindern dadurch ihre Bindung an die zellulären BMP-Rezeptoren. Sie agieren also als Inhibitoren der BMP-Signaltransduktion und daher der Osteoblastendifferenzierung und des Knochenaufbaus.⁴⁴

Auch die Wachstumsfaktoren der FGF-Familie (unter anderen FGF2, FGF4, FGF6, FGF18^{47,48}) beeinflussen das Osteoblastenverhalten. Dabei spielen drei FGF-Rezeptoren (FGFR1-3) eine Rolle. Die Bindung von FGFs an ihre Rezeptoren führt in Osteoblasten über die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege zu erhöhter Proliferation (über die Aktivierung von ERK1/2 und den PI3K-Akt-Signalweg), zu verstärkter Differenzierung (ebenfalls über ERK1/2), und zu erhöhter Expression von RUNX2 (per Aktivierung des Proteinkinase C-Signalwegs).^{44,48,49}

Ebenfalls für die Regulierung des Osteoblastenverhaltens sehr wichtig ist die wnt-Signaltransduktion. Im kanonischen oder β -catenin-abhängigen Signalweg verhindert wnt durch Bindung an seinen Rezeptor Frizzled (FZD) und dessen Korezeptor LRP5 die Phosphorylierung und anschließende Degradation von β -catenin. Diese Phosphorylierung geschieht im inaktiven Zustand des Signalwegs über einen Proteinkomplex aus Axin, GSK3 β und anderen Proteinen. Bindet WNT nun an seinen Rezeptorkomplex wird intrazellulär Dishevelled (DSH) aktiviert, welches durch Phosphorylierung GSK3 β inaktivieren kann. β -catenin wird daraufhin nicht mehr phosphoryliert und in der Folge auch nicht mehr degradiert. β -catenin kann dadurch in den Zellkern translozieren, wo es als Transkriptionskofaktor fungiert.^{50,51} Es steigert dort die Expression von RUNX2⁵², kann aber auch durch Konkurrenz um Bindungsstellen an Transkriptionsfaktoren die Wirkung von SOX-9 verringern, welches mesenchymale Stammzellen in Richtung Chondrozyten differenzieren lässt. Dadurch erleichtert β -Catenin-abhängige Signaltransduktion die Differenzierung in Richtung Osteoblasten.⁵¹

Wnt-Signaltransduktion geschieht auch über von β -Catenin unabhängige Wege. Diese nicht-kanonisch genannten Mechanismen weisen eine große Variation und damit einhergehende Überschneidungen ihrer Interaktionspartner auf. Beispielhaft soll hier der WNT/ Ca^{2+} -Signalweg kurz erwähnt werden: In diesem Signalweg führt die Bindung von wnt an FZD-ROR-Rezeptorkomplexe zu einer Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3)-vermittelten Freisetzung von Ca^{2+} ins Zytosol, dadurch zur Aktivierung von Phospholipase C und Proteinkinase C und schlussendlich zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, CREB und NFAT.⁵³ Dieser Signalweg ist für die Osteoblastogenese und Osteoblastendifferenzierung in mesenchymalen Stromazellen mitverantwortlich.⁵⁴

Welche Bedeutung alle diese Signalwege auch für die Reaktion von Osteoblasten auf mechanische Reize haben, wird im Folgenden beschrieben.

3.2.5. Osteoblasten und Osteozyten als Mechanosensoren

Schon lange ist bekannt, dass Knochen auf mechanische Belastung reagiert und sich durch Auf- oder Abbau von Gewebe an sich verändernde Belastungen anpasst (Wolff'sches Gesetz, 1892).⁵⁵ Knochen wird dort durch Aufbau neuen Gewebes verstärkt, wo die Belastung groß ist, und dort abgebaut, wo mehr Knochengewebe vorhanden ist, als für die auftretenden Belastungen nötig ist⁵⁶. Die mechanische Belastung des Knochens muss dafür in Zellen detektiert und in eine Veränderung des Zellverhaltens umgesetzt werden. *In vivo* sind dafür Osteozyten maßgeblich, aber auch Osteoblasten sind mechanosensitiv. Die Mechanismen, die diese Reaktionsfähigkeit vermitteln, sind in beiden Zelltypen weitgehend gleich.⁵⁷ Alle Zellen sind ständig einer Vielzahl von mechanischen Belastungen und Kräften ausgesetzt. Dazu zählt die Gravitation und Kräfte, die durch Körperbewegungen auf die Zellen wirken, aber auch innere Kräfte, welche die Zellen durch ihr eigenes Zellskelett auf sich und andere Zellen ausüben.⁵⁸ Im Fall der Osteozyten kommen auch Scherkräfte durch Flüssigkeitsströme hinzu, die in den Canaliculi genannten Hohlräumen im mineralisierten Knochengewebe entstehen, in denen die Osteozyten zu finden sind.⁵⁹

Aus der Literatur sind eine Vielzahl von molekularen Effekten mechanischer Stimulation auf Osteoblasten oder damit verwandten Zellen (mesenchymale Vorläuferzellen, unreife/reife Osteoblasten, Osteozyten) bekannt. Alle oben beschriebenen Signaltransduktionswege in Osteoblasten werden durch mechanische Stimulation beeinflusst.⁶⁰

Die eigentlichen Sensoren für mechanische Stimulierung in Osteoblasten scheinen Calcium-Kanäle und Integrine zu sein.^{57,61} Zum Beispiel ist für die Calcium-Kanäle Piezo1 und Polycystin1/2 eine Funktion an mechanosensitiven Prozessen gezeigt worden.⁶²⁻⁶⁴ Polycystin agiert dabei möglicherweise auch im Zusammenspiel mit dem primären Cilium, für das ebenfalls eine Mechanosensitivität in Osteoblasten angenommen wird.⁶⁵

Die frühesten bekannten zellulären Effekte der Stimulierung sind der Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle sowie die Bildung und Sezernierung von Prostaglandin E₂ (PGE₂), Adenosintriphosphat (ATP) und Stickstoffmonoxid (NO).^{40,65,66}

Diese frühen Signalmoleküle wiederum beeinflussen dann nachgelagerte Signaltransduktionskaskaden. So führt etwa mechanische Stimulation durch Flüssigkeitsfluss zu einer Calcium-vermittelten Aktivierung von IP₃, NF- κ B und COX-2.⁶⁷⁻⁶⁹ Calcium-Einstrom in Osteoblasten als Folge von mechanischer Stimulation durch Flüssigkeitsstrom führt außerdem zu einer Phospholipase C-, Ras- und ERK1/2-abhängigen Aktivierung von RUNX2.^{70,71} Durch mechanische ausgelöste Signaltransduktion über Integrine führt durch die Aktivierung von FAK und ERK1/2 ebenfalls zur Erhöhung der RUNX2-Aktivität.^{69,71,72}

Es bestehen also vielfältige Verknüpfungen zwischen mechanischen Einflüssen und den verschiedenen intrazellulären Signalwegen, die wie oben beschrieben die Osteoblastendifferenzierung und knochengewebspezifische Zellaktivierung steuern. Sie stimulieren also ebenfalls in aller Regel oben genannten osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktoren, darunter RUNX2 und COX-2^{57,60}

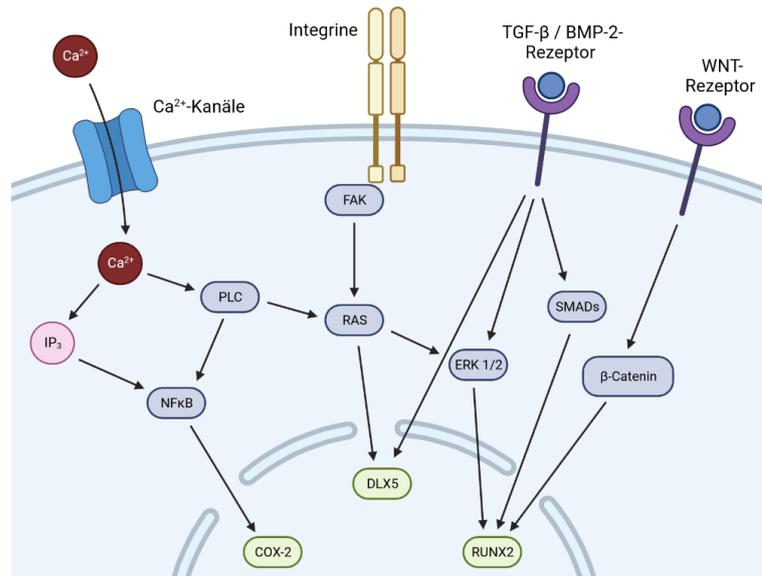


Abbildung 2: Übersicht über mechanorensive Signaltransduktionswege in Osteoblasten; rote Symbole: Second Messenger, blaue Symbole: intrazelluläre Signaltransduktionsproteine, grüne Symbole: aktivierte Transkriptionsfaktoren, Grafik erstellt mit Biorender (biorender.com)

3.2.6. Zell-Matrix-Adhäsion und Fokaladhäsionen

Die Adhäsion von Zellen sowie ihre Integrin-vermittelte Bindung an die sie umgebende extrazelluläre Matrix (ECM) sind grundsätzliche Voraussetzung für normale Zellfunktionen, wie Inhibition und Regulation der Apoptose, Zellzyklus-Kontrolle und Proliferation oder Differenzierung⁷³ und Migration^{74,75}, in allen Entwicklungsstadien von der Embryonalentwicklung an⁷⁶. Dies gilt folgerichtig auch für Osteoblasten, deren Funktion je gerade die Interaktion mit der extrazellulären Matrix ist.^{77,78}

Eine der wichtigsten Strukturen für den Kontakt von Zellen mit ihrer Umgebung sind Proteinkomplexe, die sich in ihrer Bezeichnung (‘focal adhesions’, ‘focal contacts’, ‘fibrillar adhesions’)⁷⁹ und Zusammensetzung leicht unterscheiden können, im Kern aber den Kontakt vom extrazellulären Raum per Integrine zum Actin-Zytoskelett herstellen.^{79–81} Die im Folgenden vereinfacht als Fokaladhäsionen bezeichneten Komplexe von Integrinen und weiteren Bindungspartnern sind also neben ihrer oben beschriebenen Bedeutung für die Mechanosensitivität in Osteoblasten auch für weitere grundlegende zelluläre Funktionen wichtig.

Verschiedene Zelltypen exprimieren dabei unterschiedliche Gruppen von Integrinen. In Osteoblasten sind dies Integrin β1, Integrin β3 und Integrin β5 in Kombination mit verschiedenen Integrin α-Untereinheiten.^{82–84} Die Kombination verschiedener Integrin-Typen vermittelt dabei die Bindungsfähigkeit an unterschiedliche Liganden. So binden zum Beispiel die Integrine β1/α1 und Integrin β1/α2 an Kollagen Typ I und Integrin β3/αV an die knochenspezifischen Matrixproteine BSP und Osteopontin.⁸⁵

Fokaladhäsionen sind große Proteinkomplexe mit einer variablen Zusammensetzung der beteiligten Proteine. Ein zentrales Protein dabei ist die fokale Adhäsionskinase (FAK), die mit einer sehr großen Zahl an Proteinen im Fokaladhäsionskomplex interagiert.⁸⁶ Bei der Bildung von Fokaladhäsionen wird FAK rekrutiert von Paxillin^{87,88} das in sich ausbildenden Adhäsionen („nascent adhesions“, NA) interagiert mit Kindlin.⁸⁹ FAK wird in der Fokaladhäsion durch Phosphorylierung aktiviert⁹⁰ und ermöglicht ihre Reifung.⁹¹ Das Adapterprotein Vinculin verstärkt dabei die Bindung der Proteinkomplexbestandteile und reduziert so ihren fortwährenden Austausch im Komplex. Dadurch werden die Fokaladhäsionen stabilisiert.^{92–94} Vinculin wiederum wird vom weiteren Komplexpartner Talin sowie dem Zytoskelettprotein Actin in einer aktivierten Form stabilisiert und dadurch im Fokaladhäsionskomplex gehalten^{89,94} Talin stabilisiert darüber hinaus auch eine für externe Liganden hochaffine Konformation der an der Fokaladhäsion beteiligten Integrine und trägt auch so zur Reifung der Adhäsionskomplexe bei.⁸⁹

Der Reifungsprozess von Fokaladhäsionen ist abhängig von einer mechanischen Belastung der sich bildenden Adhäsion⁷⁹, dabei übt die Zelle selbst eine Zugkraft auf ihre Umgebung aus, die durch die Fokaladhäsion vermittelt wird⁸⁰. So ist zum Beispiel die Menge an zum Komplex rekrutiertem Vinculin abhängig von der Kraft, die auf die Adhäsion wirkt.⁹⁵

Wie stark Zellen auf ihrem Untergrund oder in der sie umgebenden Matrix adhären ist abhängig von der Fläche der Fokaladhäsionen und ihrer Verteilung.⁹⁶ Die Stärke der einzelnen Fokaladhäsionen ist dabei allerdings nicht direkt korreliert mit ihrer individuellen Größe, hier spielen weitere Faktoren wie etwa die Zellmorphologie eine Rolle.⁸⁰ Fokaladhäsionen haben aber auch selbst eine Funktion als Mechanosensoren für die Zelle (siehe Kapitel 3.2.5).

Paxillin, Vinculin, FAK, sowie Integrine sind also zentrale strukturelle und signaltransduzierende Elemente in Fokaladhäsionen und wurden daher in dieser Arbeit als Markerproteine für intakte und funktionsfähige Fokaladhäsionen in Färbungen ausgewählt.

3.3. Biomaterialien

3.3.1. Definition

Der Begriff ‚Biomaterial‘ ist in der Vergangenheit auf verschiedene Arten und immer wieder neu definiert worden. Zentrale und entscheidende Eigenschaft eines Biomaterials ist jedoch seine Biokompatibilität. Eine frühere und weithin akzeptierte Definition hierfür lautete:

“The ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application.”

„Die Fähigkeit eines Materials, bei einer bestimmten Anwendung eine geeignete Reaktion des Wirtsorganismus‘ hervorzurufen.“⁹⁷

Später ist diese Definition erweitert worden um zusätzliche Anforderungen:

“The ability of a biomaterial to perform its desired function with respect to a medical therapy, without eliciting any undesirable local or systemic effects in the recipient or beneficiary of that therapy, but generating the most appropriate beneficial cellular or tissue response in that specific situation, and optimising the clinically relevant performance of that therapy.”

„Die Fähigkeit eines Biomaterials, seine gewünschte Funktion in Bezug auf eine medizinische Behandlung zu erfüllen, ohne dabei unerwünschte lokale oder systemische Effekte im Empfänger der Behandlung hervorzurufen, dabei aber die für die spezifische Situation am besten geeignete zelluläre oder Gewebsreaktion zu erzielen und die klinische Wirksamkeit der Behandlung zu maximieren.“⁹⁸

Es geht also um die Interaktion von Materialien mit biologischen Systemen, zum Beispiel einem Menschen als Empfänger einer medizinischen Behandlung, bei der ihr Schaden minimal, ihr Nutzen aber möglichst groß sein soll.

3.3.2. Eignung von Materialien für die Versorgung von großen Knochendefekten

Um die Biokompatibilität eines Materials zu beurteilen, muss seine geplante spezifische Anwendung berücksichtigt werden. Die Testung setzt also zielgewebsspezifische Untersuchungen voraus, um einen möglichen vom Material ausgehenden Schaden und seine Eignung für die Anwendung abschätzen zu können. Die Testung erfolgt dabei immer mehrstufig. Sie beginnt mit *in vitro*-Evaluierungen, die - sofern erfolgreich - mit *in vivo*-Studien vervollständigt werden.

Die hier untersuchten Biomaterialkandidaten sind entwickelt worden, um in Implantaten in Knochen zur Behandlung von großen Knochendefekten verwendet zu werden. Überschreiten diese Defekte eine gewisse Größe, so ist eine Heilung ohne weitere Unterstützung nicht möglich.⁹⁹ Im Allgemeinen ist dies bei Defekten ab ca. 1-2 cm Größe oder 50% des Knochenumfangs der Fall, hängt aber auch von der Lokalisation des Defekts, dem Alter des Patienten, dem Zustand des umgebenden Gewebes und weiteren Faktoren ab.¹⁰⁰ Implantate werden bei diesen im Englischen als ‚critical size defect‘ bezeichneten Defekten eingesetzt, um trotzdem eine Heilung zu ermöglichen. Sie müssen dafür in der Lage sein, sich in die Wunde zu integrieren, das Einwachsen von Zellen aus deren Umgebung und die

Neubildung von Knochengewebe zu ermöglichen (Osteokonduktivität) und gleichzeitig die mechanische Funktion des noch fehlenden Knochengewebes zu übernehmen.³

Als autologe Transplantate bezeichnet man Knochengewebe, das dem Patienten an einer anderen Stelle, oft dem Beckenkamm entnommen und an der Stelle des zu behandelnden Defekts eingesetzt wird. Während diese Behandlungsmethode zwar gute Behandlungsergebnisse zeigt, bedeutet die Entnahme von Knochen eine weitere Operationswunde mit dem damit verbundenen Morbiditätsrisiko (etwa durch Infektion). Außerdem ist oft nicht genug Knochengewebe zur Entnahme verfügbar, um den ursprünglichen Defekt behandeln zu können.³⁵ Auch der Einsatz von menschlichem Knochen aus einem zweiten Individuum nach dessen Tod ist möglich („Allograft“). Knappheit an Knochenmaterial besteht hier nicht. Im Vergleich zu autologen Transplantaten ergeben sich allerdings ein erhöhtes Risiko von Infektionen¹⁰¹ und eine geringere Langlebigkeit der Transplantate.^{102,103}

Verschiedene synthetische Materialien sind ebenfalls bereits zur Versorgung von Knochendefekten erprobt worden. Dies sind vor allem Metalle, Keramiken, Polymere und Gläser oder Komposite aus diesen Materialien.^{102,104,105} Für eine möglichst vollständige Wiederherstellung des gesunden Zustands des Knochen ist es beim Einsatz von synthetischen Materialien erstrebenswert, dass das Implantat im Zuge der Heilung resorbiert und durch natives Gewebe ersetzt wird.³⁵ Hierbei ist ein mikro- und makroporöser Aufbau wichtig, der die Vaskularisierung des Implantats und die Diffusion von Nährstoffen ermöglicht.³ Gleichzeitig darf vom Implantat auch keine toxische oder die Heilung hemmende Wirkung ausgehen. Außerdem muss das Material wirksam sterilisiert werden können, um nicht zum Auslöser von Infektionen nach der Implantation zu werden.

Unter den synthetischen Implantatmaterialien spielen Keramiken eine besondere Rolle. Durch ihre hohe Festigkeit können sie die mechanische Funktion von Knochen erfüllen. Aufgrund ihrer Zusammensetzung und chemischen Ähnlichkeit zu mineralisierter Knochenmatrix werden Keramiken auf Calciumphosphat- (Hydroxylapatit, Tricalciumphosphat) oder Calciumsulfatbasis aber auch gut in den umgebenden Knochen integriert (Osteokonduktion).^{35,85,106} Nachteil keramischer Werkstoffe ist ihre Sprödigkeit. Polymere natürlichen oder synthetischen Ursprungs eignen sich ebenfalls als Implantatmaterial, sie sind dabei in der Regel weniger hart als Keramiken oder Metalle, dafür aber weniger spröde⁸⁵. Vor allem biologische Polymere wie etwa Kollagen, Fibrin oder Alginat haben sich dabei als sehr gut biokompatibel erwiesen und sind bioresorbierbar¹⁰⁷. Aber auch synthetische Polymere wie etwa Polylactid oder Polycaprolacton sind mit einigem Erfolg als Implantatmaterial erprobt worden. Auch diese Materialien sind bioresorbierbar.^{107,108}

Kombinationen von Polymeren und Keramik kann zu Kompositmaterialien führen, die die gewünschten Eigenschaften beider Materialklassen erfolgreich verbinden.¹⁰⁹ So können etwa osteokonduktive Materialien (z.B. Hydroxylapatit) mit resorbierbaren, mechanisch flexiblen Polymeren (etwa Kunststoffen oder Hydrogelen) verbunden werden.¹¹⁰ Dies verleiht dem Implantat nicht nur vorteilhafte mechanische Eigenschaften, die Kombination verschiedener Materialien kann auch eine bessere Integration des Implantats in den Knochen ermöglichen, ohne die osteokonduktive Wirkung der Keramik zu verlieren.³⁵

3.3.3. Evaluierung der Zytotoxizität von Biomaterialien *in vitro*

Für Biomaterialien, die in Knochen eingesetzt werden sollen, muss zur adäquaten Beurteilung der *in vitro*-Biokompatibilität ihre Zytotoxizität, ihre mechanischen Eigenschaften, ihr struktureller Aufbau und auch ihre Resorbierbarkeit begutachtet werden.¹¹¹

Im vorliegenden Projekt wurde hauptsächlich die *in vitro*-Zytotoxizität der Materialien untersucht. Diese Prüfung ist ein wesentlicher und grundlegender Schritt bei der Evaluierung von Biomaterialien¹¹² und notwendige Voraussetzung für alle weiteren Untersuchungen des Verhaltens von Zellen bei Interaktion mit dem Material. Darüber hinaus wurden aber auch Versuche durchgeführt, die die Materialeigenschaften in Bezug auf mögliches Einwachsen von Knochenzellen, die Bildung von extrazellulärer Matrix und die Expression knochenspezifischer Markerproteine (Osteokonduktivität) untersuchen.

Die *in vitro*-Zytotoxizitätsprüfung von Medizinprodukten, zu denen auch Implantate zählen, ist in ISO10993-5 standardisiert. Dieses Regelwerk gibt eine Teststrategie und eine Reihe von möglichen Testmethoden vor. Demnach soll die Prüfung mittels:

- „Beurteilung der Zellschädigung aufgrund morphologischer Veränderungen;
- Messungen der Zellschädigung;
- Messungen des Zellwachstums;
- Messungen spezifischer Aspekte des Zellstoffwechsels“

erfolgen.¹¹³ Die Untersuchungen sollen mit den Prüfmustern selbst, oder Extrakten davon durchgeführt werden und die Ergebnisse qualitativ nach morphologischen Gesichtspunkten oder quantitativ zum Beispiel durch Messung der Zellproliferation beurteilt werden. Hierbei ist die quantitative Bewertung der qualitativen vorzuziehen.¹¹³

Als Testsystem kommen primäre Zellen oder Zelllinien in Frage. ISO 10993-5 macht dabei keine Vorgaben zur Verwendung von ausschließlich humanen Zellen. Die bessere Eignung menschlicher Zellen für die Evaluierung von Materialien zur späteren Verwendung in menschlichen Patienten liegt jedoch angesichts von gezeigten Unterschieden im Zellverhalten zwischen verschiedenen Spezies auf der Hand^{114–116}. Der Vergleich menschlicher primärer Osteoblasten mit verschiedenen gängigen humanen Osteoblastenzelllinien hat ebenfalls bemerkenswerte Unterschiede gezeigt,¹¹⁷ sodass der Einsatz primärer Zellen sinnvoll erscheint. Andererseits führt die eingeschränkte Proliferationsfähigkeit primärer Zellen und ihre begrenzte Verfügbarkeit dazu, dass in verschiedenen Studien verschiedene Zellisolate zum Einsatz kommen müssen. Die Eigenschaften von Zellen aus verschiedenen Isolaten können sich jedoch signifikant unterscheiden, bei Osteoblasten sind etwa das Geschlecht und Alter der Spender, aber auch die Isolationsmethode Einflussfaktoren für verschiedene Aspekte des Zellverhaltens.¹¹⁷ Primäre Zellen müssen also vor ihrer Verwendung als Testsystem gut charakterisiert werden, auch ISO10993-5 sieht dies vor. In der vorliegenden Arbeit werden primäre, humane, calvariale Osteoblasten verwendet, da diese die *in vivo*-Situation der geplanten Anwendung der Materialien in Implantaten für die Versorgung von Knochendefekten kritischer Größe in der Schädelkalotte am besten nachbilden.

3.4. Testsystem für mechanische Stimulation durch Kompression

Der Einfluss mechanischer Stimulation auf das Zellverhalten von Osteoblasten ist vielfach belegt (siehe Kapitel 3.2.5). Auch bei der Knochenheilung *in vivo* ist die mechanische Belastungssituation an der Stelle der Fraktur ein wichtiger Faktor, der den Mechanismus der Heilung und ihre Geschwindigkeit maßgeblich beeinflusst. Generell scheint eine mäßige mechanische Belastung statt totaler Fixierung die Heilung positiv zu beeinflussen.^{118,119}

Zentrales Ziel eines Teils dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines Testsystems, das geeignet ist, die bei mechanischer Belastung in Osteoblasten ablaufenden zellulären Prozesse *in vitro* zu untersuchen. Das System soll dazu die mechanische Stimulation unter sterilen Zellkulturbedingungen ermöglichen, außerdem soll es den Einsatz von dreidimensionalen Scaffolds zur Kultur der Zellen und die zyklische Kompression der Zellen in diesem Scaffold in Form der sogenannten ‚confined compression‘ (siehe unten) erlauben. Die zelluläre Antwort auf die Stimulation soll anschließend durch Messung der Genexpressionsmuster analysierbar sein.

Einzelne ähnliche Versuchsaufbauten sind in der Literatur bereits beschrieben^{120,121}, häufiger werden allerdings für die mechanische Stimulation von Zellen *in vitro* Systeme eingesetzt, bei denen Zellen im Monolayer durch Dehnung auf elastischen Wachstumsuntergründen stimuliert werden. Der Einsatz von dreidimensionalen Scaffolds ist sicherlich vorzuziehen, da dies die physiologische Umgebung der Osteoblasten besser nachbildet.¹⁵

Der Einsatz von Kompression, hier als sogenannte ‚confined compression‘, statt Dehnung bildet ebenfalls viele *in vivo*-Situationen besser nach als Dehnung. So werden etwa Frakturen während der Heilung in der Regel durch Kompression belastet.¹¹⁹ ‚Confined compression‘, also die Kompression

unter Verhinderung der gleichzeitigen seitlichen Ausdehnung der komprimierten Probe, vereinheitlicht die auf die Zellen wirkende Belastung auf eine einzelne Richtung. Im Gegensatz dazu würde beim Einsatz von ‚unconfined compression‘, also der Kompression bei gleichzeitiger seitlicher Ausdehnung der Probekörper, ein Spektrum von unterschiedlich ausgerichteten Belastungen auf die Zellen wirken, was möglicherweise zu einer Überlagerung verschiedener zellulärer Antworten zur Folge hätte, die analytisch nicht aufzulösen wären.¹²²

Zyklische Belastung der Zellen ist der statischen Kompression im Sinne der Untersuchung von Parametern, die die Regeneration unterstützen ebenfalls vorzuziehen. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führt die statische Belastung von Osteoblasten bzw. Knochen zu inflammatorischen beziehungsweise Knochen abbauenden Reaktionen.^{60,123}

Zu Beginn des Projekts war keine dementsprechende Methode etabliert. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Rolauffs, Leiter des Forschungszentrums für Gewebeersatz, Regeneration und Neogenese (G.E.R.N) an der Universitätsklinik Freiburg, war zwar die Arbeit mit einer Kompressionsmaschine zur mechanischen Stimulation Routine, allerdings in deutlich verschiedenen Anwendungen, in der Regel mit nativen Gewebestücken. Diese vorhandene Expertise war hilfreich. Trotzdem mussten für viele technische und biologische Aspekte der hier angestrebten Anwendung neue Lösungen gefunden werden.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Abkürzungen

alphaMEM	Variante des 'Modified Eagle Medium'
ANOVA	Varianzanalyse
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum
GOI	(in der qPCR) untersuchtes Gen
HA	Hydroxylapatit
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HKG	Referenzgen (in der qPCR)
HPV16	Humanes Papilloma-Virus
KGM	Keratinocytenmedium
MSC	mesenchymale Stammzellen
nGV	gemahlene Nanogelatinevlies
ObGS	Osteoblasten-Wachstumsfaktoren (Mediumsupplement)
ObM	Osteoblastenmedium
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PHM	Polyhydroxymethylen
PPC	Positivkontrolle in der qPCR
PVA	Polyvinylalkohol
PVCA	Polyvinylencarbonat
qPCR	quantitative (reverse Transkriptase-) Polymerasekettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RTC	Reverse-Transkriptase-Kontrolle
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TNFα	Tumornekrosefaktor α
UV-C	ultraviolette Strahlung (λ~280-100 nm)

4.2. Medien

Folgende Medien wurden verwendet:

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Medien

Medium	Zusammensetzung
Osteoblastenmedium (ObM)	Fa. Sciencell (Carlsbad, USA), Art.Nr.: 4601; nach Herstellerangaben: Zugabe von FBS, Osteoblasten-Wachstumsfaktoren (ObGS), Penicillin/Streptomycin (P/S) (alle mitgeliefert)
ObM basal	wie ObM, ohne Zugabe von FCS, ObGS, P/S
ObM -Serum	wie ObM, ohne Zugabe von FCS
ObM -Serum -ObGS	wie ObM, ohne Zugabe von FCS, ObGS
ObM Mineralisierungsmedium	wie ObM, Zugabe von 50µg/ml Na-L-Ascorbat (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 0,01 M β-Glycerol-2-Phosphat (Fa. Merck, Darmstadt), 0,1 µM Dexamethason (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Art.Nr. D4902)
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Fa. Thermo Fisher Scientific (Darmstadt), Art.Nr.: 22320-030; Zugabe von 10% FCS (Fa. Bio&Sell, Feucht) Art.Nr.: FCS.EUA.0500), 2 mM Glutamax (Fa. Thermo Fisher Scientific, Darmstadt), 0,12 mg/ml Kanamycin (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
DMEM Mineralisierungsmedium	wie DMEM, Zugabe von 50µg/ml Na-L-Ascorbat (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 0,01 M β-Glycerol-2-Phosphat (Fa. Merck, Darmstadt), 0,1 µM Dexamethason (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Art.Nr. D4902)
alphaMEM	Fa. Thermo Fisher Scientific (Darmstadt), Art.Nr.: 121561-056; Zugabe von 10% FCS (Fa. Bio&Sell, Feucht) Art.Nr.: FCS.EUA.0500), Penicillin/Streptomycin (1%, Fa. Biochrom, Berlin)
Keratinocytenmedium (KGM)	Fa. Promocell (Heidelberg), Art.Nr.: C-20011; nach Herstellerangaben: Zugabe von Supplement-Mix, CaCl ₂ , zusätzlich: Zugabe von 50 mg/ml Kanamycin (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 10 mg/ml Neomycin (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

4.3. Chemikalien und Reagenzien

BMP-2 (CHO-derived)	Fa. Peprotech (Hamburg), Art.Nr.. 120-02C, Lot.Nr.: #0919595 G1320; stock: 50 µg/ml in 0,1% BSA in PBS, gelagert bei -20°C
Chloroform	Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Art.Nr. 6340.4
DAPI	Fa. Thermo Fisher Scientific (Darmstadt), Art.Nr. D3571
Ethanol	Fa. Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Fibrinogen	Fa. Merck Chemicals (Darmstadt), Art.Nr.: 341576
Fibronectin	Fa. Sigma Aldrich (Taufkirchen), Art.Nr. F0895
HBSS+Ca	Fa. Sigma Aldrich (Taufkirchen), Art.Nr. 55037C
Octenidin	Apotheke des Universitätsklinikums Freiburg
PBS	Fa. Thermo Fischer Scientific (Darmstadt), Art.Nr. 14190-094
Propidiumiodid	Fa. Sigma Aldrich (Taufkirchen), Art.Nr. P4864
SYTO16	Fa. Thermo Fisher Scientific (Darmstadt), Art.Nr. S7578
Thrombin	Fa. Merck Chemicals (Darmstadt), Art.Nr.: 605190
Triton X-100	Fa. Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Trizol	Fa. Sigma Aldrich (Taufkirchen), Art.Nr. T9424
Trypsin/EDTA	Fa. Anprotec (Bruckberg), Art.Nr.: AC-EZ-0020

4.4. Zellen, Zellcharakterisierung, Zellkultur

In allen Teilprojekten der Arbeit kamen humane, primäre, calvariale Osteoblasten zum Einsatz. Diese Zellen sind kommerziell erhältlich (Fa. Sciencell, Carlsbad, USA, Art.Nr. 4600). Bescheinigt werden

den Zellen negative Tests auf HIV-1, HBV, HCV, Mycoplasmen, Bakterien, Hefen und Pilze. Es werden mindestens 10 Populationsverdopplungen garantiert. Die Osteoblasten wurden im vom Hersteller verfügbaren, proprietären Osteoblastenmedium (ObM) kultiviert und bei Erreichen von fast vollständiger Konfluenz passagiert falls nicht anders beschrieben.

Zur vorläufigen Charakterisierung der Osteoblasten wurde ein Mineralisierungsassay mithilfe einer Färbung mit Alizarinrot durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in Passage 6 bis zur Konfluenz in ObM kultiviert und die Medien dann durch DMEM- bzw. ObM-basierte Mineralisierungsmedien (siehe Kapitel 0) ersetzt. Die Zellen wurden darin dann weitere 3 Wochen kultiviert und anschließend mit PBS gewaschen. Nach Fixierung mit eiskaltem Ethanol und Waschen mit Wasser wurden die Zellen mit 40 mM Alizarinrot-Lösung (pH 4,1) (Fa. Roth, Karlsruhe) für 30 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach viermaligem erneuten Waschen mit Wasser kann das Vorhandensein mineralisierter extrazellulärer Matrix an der Intensität der Färbung abgelesen werden.

Außerdem kamen in einigen Versuchen HPV16 E6/E7-immortalisierte, humane Gingivakeratinozyten zum Einsatz. Diese Zellen wurden vor Beginn der vorliegenden Arbeit in Explantatkultur genommen (Ethik-Votum 307/09 der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) und in der Gruppe von Dr. Massimo Tommasino (International Agency for Research on Cancer, Weltgesundheitsorganisation, Lyon, Frankreich) immortalisiert (nach Pear et al., 1993¹²⁴). Die gewebsspezifische Expression von Markerproteinen und der Chromosomenstatus dieser Zellen sind überprüft worden.¹²⁵

Die immortalisierten Gingivakeratinozyten wurden in Keratinozytenmedium (KGM) kultiviert. Das Medium wurde 2- bis 3-mal pro Woche erneuert. Bei Erreichen von Subkonfluenz wurden die Zellen in PBS gewaschen, mit Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,05%/0,02%, Fa. Anprotec, Bruckberg) abgelöst und nach Zentrifugieren in DMEM im jeweiligen Kulturmedium erneut ausgesät.

In Versuchen zur Charakterisierung der Osteoblasten in Monolayern inklusive der Untersuchung des Einflusses der Medienzusammensetzung auf die Osteoblasten, des Effekts von BMP-2 bei Verwendung von ObM, zur Kultur der Zellen in Fibringelen und in Kompressionsversuchen (siehe Kapitel 4.15) wurde ein weitergehend standardisiertes Zellkulturschema als das in den anderen Projektteilen verwendet: Es wurden für alle genannten Versuche primäre, calvariale Osteoblasten einer einzelnen Herstellercharge (#0309) verwendet. Mediumwechsel fanden jeweils 3 Tage nach dem Aussäen der Zellen statt, Ablösen mit Trypsin und erneutes Aussäen nach 5 Tagen. Dieses Schema wurde in allen Passagen beibehalten. Die Zellen wurden in Passage 1 aus bei -150°C gelagerten Aliquots aufgetaut, wie beschrieben kultiviert und in Passage 3 wieder bei -150°C eingefroren und gelagert. Für die genannten Versuche herangezogen wurden ausschließlich Zellen, die in Passage 3 wiederum aufgetaut, kultiviert und dann in Passage 5 verwendet wurden. Eine Abweichung von diesem System gab es nur für die Zellen, die in Versuchen zur mechanischen Stimulation in Gelen verwendet wurden. Diese wurden in Passagen 3 und 4 für 4 statt 5 Tage kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde hier nach jeweils 2 Tagen durchgeführt.

Während der Kultivierung wurde die Zunahme der Zellzahl innerhalb eines Kultivierungsintervalls von Passage zu Passage von 5 Tagen Länge dokumentiert. Die Geschwindigkeit der Proliferation wurde daraus mithilfe eines simplen exponentiellen Modells berechnet.

*Zellzahl nach Kultur = Zellzahl beim Aussäen * Proliferationsgeschwindigkeit^{Anzahl der Tage in Kultur}*

Die Anzahl ausgesäter Zellen wurde konstant gehalten, ebenso wie die vorgegebene Dauer der Kultivierung bis zum Passagieren von 5 Tagen. Die Proliferationsgeschwindigkeit ergibt sich daher einfach aus der Zahl der Zellen nach der Kultivierung und beschreibt sehr vereinfacht die durchschnittliche Zunahme der Zellzahl pro Tag. Die durchschnittliche Proliferationsgeschwindigkeit wurde für die Passagen 2 bis 6 in mindestens 14 bis maximal 66 Replikaten ermittelt ($14 \leq n \leq 66$).

Um den Einfluss der Mediumzusammensetzung auf das Verhalten der verwendeten Osteoblasten zu untersuchen, wurde verschiedenen weiteren Medien(-varianten) erprobt. Neben dem vom Zelllieferanten vorgesehenen Medium ObM wurden die Zellen ObM ohne Serum (ObM -Serum) und ObM ohne Serum und ohne Wachstumsfaktoren (ObM -Serum -ObGS) kultiviert. Dabei wurde die Geschwindigkeit verfolgt, mit der die Zellen Konfluenz erreichen und die Genexpressionsmuster per

qPCR-Arrays gemessen. Dafür wurden die Osteoblasten in Passage 4 oder 5 in ObM ausgesät. Nach 6 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und dabei je nach Versuch das Medium ersetzt mit ObM, ObM -Serum oder ObM -Serum -ObGS. Nach Kultur über Nacht wurden die Zellen mithilfe des RNeasy Kits der Fa. Qiagen (Hilden) lysiert und ihre RNA extrahiert.

Zur Untersuchung der Expressionsmuster von Zelladhäsionsproteinen durch Immunfluoreszenzfärbung wurden primäre Osteoblasten in Passage 5 ausgesät auf Glas- (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) oder Kunststoffdeckgläschen (aus PVC, Electron microscopy sciences, Hatfield, USA). In einigen Versuchen wurden die Glasdeckgläschen zuvor mit Fibronectin beschichtet. Dazu wurden die Deckgläser vor der Besiedelung für 30 min bei Raumtemperatur mit einer 0,0005% Lösung Fibronectin (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) in PBS inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

4.5. Stimulation von primären, humanen Osteoblasten mittels BMP-2

Um die Zelltyp-spezifische Stimulierbarkeit der verwendeten Osteoblasten zu demonstrieren, wurden die Zellen mit BMP-2 im Medium kultiviert und die Expressionsmuster von Genen gemessen, die mit der Osteogenese in Verbindung stehen. Dafür kamen zwei verschiedene Konzentrationen BMP-2 zum Einsatz. Aus der Literatur ergeben sich Konzentrationen von 50 ng/ml und 300 ng/ml, sowie Inkubationszeiten von 2 und 7 Tagen, die geeignet sind, um einen messbaren Effekt auf die Genexpression von Osteoblasten hervorzurufen¹²⁶⁻¹³². Um einen Einfluss des Mediumsupplements FCS auszuschließen, wurde die Stimulierung mit BMP-2 in ObM und ObM -Serum durchgeführt. Die Osteoblasten wurden in beiden Fällen zunächst in Passage 5 mit einer Dichte von 4570/cm² in ObM ausgesät. Den Zellen wurde 6 Stunden Zeit gegeben, um zu adhären; anschließend wurde das Medium ausgetauscht durch ObM beziehungsweise ObM -Serum. Nach Kultur über Nacht wurde erneut das Medium ausgetauscht mit ObM beziehungsweise ObM -Serum, jeweils mit 0 ng/ml, 50 ng/ml oder 300 ng/ml BMP-2. Nach 2 bzw. 7 Tagen wurde jeweils die RNA mithilfe des RNeasy Kits der Fa. Qiagen (Hilden) aus den Zellen extrahiert. Zusätzlich zum Standardprotokoll des Herstellers wurde eventuell vorhandene genomische DNA mithilfe der gDNA-Eliminator-Tubes entfernt. Die RNA wurde in 40 µl Wasser eluiert und Integrität und Konzentration mit dem Mikrofluidik-Gelelektrophoresesystem Experion (Fa. Bio-Rad, Feldkirchen) gemessen. Die Analyse der Genexpressionsmuster per quantitativer RT-PCR (qPCR) wurde durchgeführt wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben. Dabei wurde auch eine statistische Auswertung per Student's T-Test vorgenommen. Der Effekt von BMP-2 wurde in 3 biologischen Replikaten untersucht (n=3).

4.6. Art, Beschaffenheit und Herkunft von Biomaterialien

Untersucht wurden in dieser Arbeit zwei Gruppen von Biomaterialien mit voneinander verschiedenen Grundbestandteilen. Eine Gruppe, entwickelt und hergestellt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rolf Mülhaupt an der Universität Freiburg, basiert auf Polyvinylencarbonat (PVCA). Dieses Material und sein Derivat Polyhydroxymethylen (PHM) sind feste Kunststoffe (chemische Strukturen von PVCA, PHM, siehe Abbildung 3). Die zweite Gruppe Biomaterialien sind alginatgelbasiert und stammen aus der Gruppe von Dr. Rainer Detsch an der Universität Erlangen-Nürnberg.

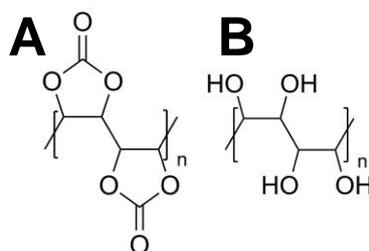


Abbildung 3: chemische Strukturen von A: PVCA, B: PHM

Beide Materialgruppen wurden durch Zugabe von weiteren Materialien und durch ihre Verarbeitung mit 3D-Druckmethoden modifiziert und in ihren (Biomaterial-)Eigenschaften verändert, um eine

möglichst gute Eignung als Knochenersatzmaterial zu erreichen. In Tabelle 2 und Tabelle 3 sind die Materialvarianten aufgelistet, die in der Arbeit zum Einsatz kamen.

Tabelle 2: Varianten der PVCA-basierten Materialien

Grundmaterial	Füllstoff	Verarbeitung
PVCA	ohne	3D-Druck massiv
		kryo-3D-Druck porös
	Aerosil 200	3D-Druck massiv
PHM	Hydroxylapatit	3D-Druck massiv
		kryo-3D-Druck porös
	ohne	3D-Druck massiv
		kryo-3D-Druck porös
	MgO-Nanopartikel	3D-Druck massiv
	nano-Gelatinevlies	3D-Druck massiv
	Hydroxylapatit	3D-Druck massiv
		kryo-3D-Druck porös

Tabelle 3: Varianten der alginatgelbasierten Materialien

Grundmaterial	Füllstoff	Verarbeitung
Alginat	ohne	3D-Druck massiv
		3D-Druck porös
	Hydroxylapatit grob	3D-Druck massiv
		3D-Druck porös
	Hydroxylapatit fein 14%	3D-Druck massiv
		3D-Druck porös
	Hydroxylapatit fein 21%	3D-Druck massiv
		3D-Druck porös
	Hydroxylapatit fein, Gelatine Typ B	3D-Druck massiv
	Hydroxylapatit fein, Gelatine Typ A	3D-Druck porös
		3D-Druck massiv

Alle Materialien auf PVCA- und Alginatgel-Basis wurden durch 3D-Druck-Verfahren verarbeitet. Näheres dazu ist bereits publiziert worden^{133,134}. Zum Einsatz kamen Probekörper mit dreidimensionalen, miteinander verbundenen Poren („makroporös“), und massiv gedruckte Proben ohne definierte dreidimensionale Strukturierung.

Zur Herstellung von Probekörpern aus PVCA und PHM wurde PVCA mithilfe eines Bioplotters als viskose Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) extrudiert und anschließend in Wasser gefällt. PHM-Proben wurden durch anschließende Umsetzung des PVCA zu PHM in basischer Lösung gewonnen. Es wurden zwei Arten von Probekörper hergestellt: Einerseits Proben, die massiv, also ohne beim Drucken intendierte Poren gedruckt wurden. Andererseits Probekörper, die durch Ablegen von Materialsträngen mit einem gewissen Abstand zueinander Poren mit definierbarer Größe erhielten („Makroporen“). Im späteren Verlauf des Projekts wurden die Materialien während des Druckens mithilfe von Trockeneis eingefroren („kryo-3D-Druck“). Formveränderungen, die durch das Fällen in Wasser entstanden, ließen sich dadurch verringern, sodass höhere Auflösungen erreicht werden konnten¹³³. Dadurch war es schlussendlich möglich, Strukturen mit Poren mit einer Größe von ca. 200 µm zu drucken.

Zur Verbesserung der möglichen Auflösung beim Druck von PVCA wurden Füllstoffe zum Grundmaterial hinzugefügt. Diese waren Aerosil 200, Magnesiumoxid-Nanopartikel und Hydroxylapatit, sowie gemahlene Nanogelatinevliese (nGV). Aerosil 200 (Fa. Evonik, Hanau) ist hydrophile pyrogene Kieselsäure mit einer spezifischen Oberfläche von 200 m²/g und wurde mit einer Konzentration von 7 wt% eingesetzt. Es sollte ebenso wie Magnesiumoxid (MgO)-Nanopartikel (Alfa Aesar, Kandel, durchschnittliche Partikelgröße <100 nm, 57 wt%) auf seine Eignung als Thixotropiermittel beim Druck von PVCA untersucht werden. Thixotropiermittel erleichtern den 3D-Druck von sehr kleinen Strukturen durch eine Erhöhung der Viskosität während des Druckvorgangs. Auch für Hydroxylapatit (Fa. abcr, Karlsruhe, durchschnittliche Partikelgröße 5 ± 3 µm, 33 wt%) sollte ein möglicher thixotroper Effekt überprüft werden. Die Herstellung der Gelatinevliese wurde zuvor

beschrieben¹³⁵. Hier wurden Gelatinevliese nach Mahlen in flüssigem Stickstoff mit einer Konzentration von 5% in PVCA- und PHM-Materialvarianten eingesetzt.

Alle PVCA-basierten Materialproben konnten vor der Besiedelung mithilfe von 70% Ethanol desinfiziert werden. Die Proben wurden mindestens über Nacht bei Raumtemperatur in 70% Ethanol inkubiert und dann zweimal für 5 min, einmal über Nacht und anschließend zwei weitere Male für 5 min in PBS gewaschen.

Alginate-Hydrogel-basierte Probekörper wurden ebenfalls durch 3D-Druck hergestellt. Die Hydrogele selbst sind für den Druck durch Extrudieren geeignet. Im Laufe des Forschungsprojekts zur Entwicklung des Materials wurden Verbesserungen im Druckverfahren erzielt, sodass auch hier dreidimensional poröse Strukturen druckbar waren. Alle Arbeiten zur Herstellung der Probekörper auf Alginatebasis wurden in und von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Detsch in Erlangen durchgeführt.

Zum Herstellen der Druckpasten aus Alginate wurde PBS auf 80°C erwärmt und Polyvinylalkohol (PVA) (3% w/v) eingerührt. Anschließend wurde Alginate 176 (PH176, VIVAPHARM® JRS PHARMA GmbH & Co. KG, Rosenberg, 7% w/v) darin gelöst und gerührt. Auch beim Materialsystem Alginate wurden verschiedene Zusätze zur Verbesserung der Materialeigenschaften erprobt. Von vornherein vorgesehen war die Zugabe von Hydroxylapatit (HA) zum Alginategel zur Verbesserung der Zelladhäsion auf dem Material. Das HA wurde hier mit 14% w/v beziehungsweise 21% w/v eingesetzt und vor der Zugabe von Alginate in die PBS-PVA-Mischung eingerührt. Es wurde HA mit zwei verschiedenen Partikelgrößenverteilungen eingesetzt. Das gröbere HA (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen), hatte eine nominelle Partikelgröße von 10/50 µm („grob“). Das feinere HA (Fa. Medical Group, Bèlignieux, Frankreich) eine nominelle Partikelgröße von 5/25 µm („fein“). Abbildung 4 zeigt rasterelektronische Aufnahmen der Partikel. Materialvarianten ohne den Zusatz von Hydroxylapatit wurden im Projekt auch mit „Schicht A“ bezeichnet, Materialien mit Zusatz von Hydroxylapatit als „Schicht B“.

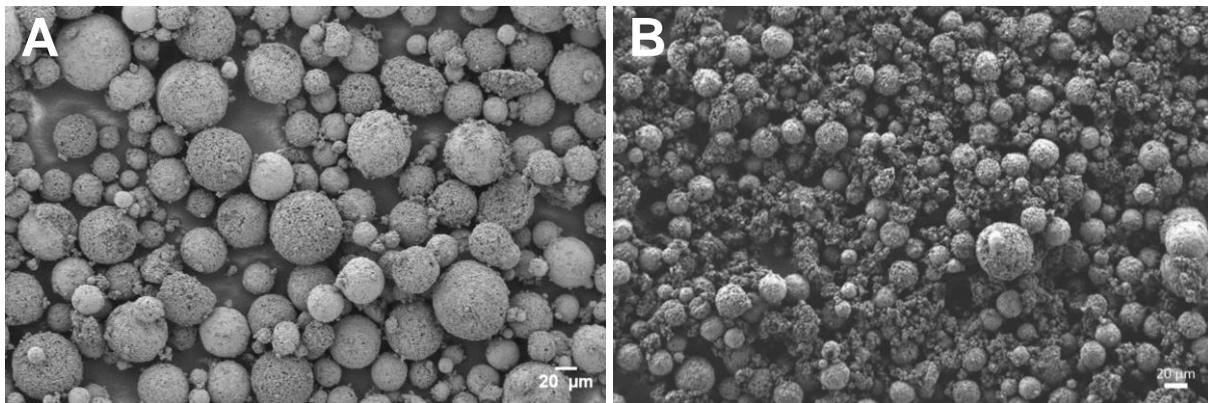


Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Hydroxylapatit-Varianten; links: Partikel mit 10/50 µm („grob“), rechts: Partikel mit 5/25 µm („fein“); Aufnahmen angefertigt von Vera Bednarzig, Universität Erlangen-Nürnberg; Maßstabsbalken: 20 µm

Zusätzlich zur Zugabe von Hydroxylapatit wurde Schicht B auch als Variante mit Gelatine erprobt. Zum Einsatz kam zunächst unter basischen Bedingungen extrahierte Gelatine (Typ B) aus dem Rind (Fa. Merck, Darmstadt, 90 bloom). Da in der kooperierenden Arbeitsgruppe an der Universität Erlangen-Nürnberg ein Protokoll zur Verwendung von Gelatine des Typs A (extrahiert unter sauren Bedingungen) bereits etabliert war¹³⁶, wurde die alginatebasierten Materialien im späteren Verlauf des Projekts auf eine solche Gelatine umgestellt (Rousselot X-pure 10P HBLV, Gent, Belgien). Ein Einfluss auf die biologischen Eigenschaften der Materialien im Sinne der Besiedelung durch humane, primäre Osteoblasten oder ihre *in vitro* Biokompatibilität konnte nicht festgestellt werden (siehe Kapitel 5.1.5). Die Gelatine wurde in beiden Fällen mithilfe von Transglutaminase quervernetzt, um ein Auslösen aus dem Materialgefüge unter Zellkulturbedingungen zu verhindern.

Die alginatebasierten Probekörper wurden unter keimarmen, aber nicht sterilen Bedingungen hergestellt. Die Herstellungsumstände mit vielen Mischvorgängen größerer Materialmengen und die

Verarbeitung im 3D-Drucker erlaubten laut Aussage unserer Projektpartner an der Universität Erlangen-Nürnberg keine Einhaltung aller Maßnahmen zum sterilen Arbeiten. Daher wurden Möglichkeiten zur nachträglichen Sterilisierung erprobt. Eine Desinfizierung der Alginat-basierten Materialien mit Ethanol war wegen ihrer Zusammensetzung und großen Porosität nicht möglich. Daher wurden kurzfristige Versuche (bis 3 Tage Kulturzeit) ohne Sterilisierung durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Einsatz mehrfach in Hank's Balanced Salt Solution (inklusive Calcium) (HBSS+Ca) gewaschen. In der kurzen Kulturzeit reichte das aus, um zusammen mit den im Medium vorhandenen Antibiotika eine Kontamination der Kultur zu verhindern. Für längere Kulturzeiten im weiteren Verlauf der Arbeit war eine Sterilisierung der Proben jedoch notwendig. Hierfür wurden verschiedenen Ansätze evaluiert:

Zunächst wurden die Proben in einer UV-Kammer der Firma Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH (Ettlingen) mit UV-C-Strahlung (Wellenlänge 255 nm) mit einer Dosis von 100 bis 500 mJ/cm² je Seite behandelt. In einem zweiten Ansatz wurden Proben für 2 min in 0,1% Octenidin in HBSS+Ca inkubiert und anschließend dreimal in HBSS+Ca gewaschen. Octenidin wurde erprobt, da es als wenig aggressives Desinfektionsmittel bekannt ist, und daher zum Beispiel auch auf Schleimhäuten und Wunden angewendet werden kann. In einem letzten Ansatz wurden die Probekörper dicht verpackt und bei kommerziellen Anbietern per gamma-Strahlung sterilisiert. Dabei kamen Strahlendosen von 5 bzw. 15 kGy zum Einsatz. Ein möglicher negativer Einfluss der sehr energiereichen gamma-Strahlung auf die Struktur der Proben wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Detsch untersucht und nicht festgestellt.

Grundsätzlich war die Zahl der verfügbaren Probekörper aufgrund der limitierten Herstellungskapazität der kooperierenden Arbeitsgruppen stets stark begrenzt. Einige der hier durchgeführten Versuche konnten daher leider nicht in dem Umfang oder mit der Zahl an Replikatversuchen durchgeführt werden, die gewünscht war.

4.7. Messung der Materialquellung von alginatbasierten Biomaterialproben

Um das Aufquellen von Alginatgelproben bei Inkubation in verschiedenen Puffern beziehungsweise Medien zu quantifizieren, wurden die Proben über den Verlaufszeitraum eines Experiments mehrfach fotografiert und die Durchmesser der Proben computergestützt vermessen. Die Proben wurden über Zeiträume von bis zu 48 h in PBS, HBSS mit 1,26 mM Calcium, DMEM, alphaMEM beziehungsweise Varianten dieser Medien in 12-well-Platten inkubiert. Fotografiert wurden die Proben dann in zeitlichen Abständen mehrfach und senkrecht von oben, um die perspektivische Verzerrung zu minimieren. Die seitlich begrenzenden Wände der 12-well-Platte wurden dabei als Größenreferenz mit fotografiert. Durch Vermessung von Probe und Well in den entstandenen Bildern (in Pixeln) konnte mithilfe des bekannten Durchmessers des Wells der Durchmesser (in mm) jeder Probe berechnet werden. Aus den Durchmessern wurde dann die Oberfläche der (näherungsweise kreisrunden) Proben berechnet und für die Auftragung auf den Ausgangsdurchmesser bei Beginn des jeweiligen Experiments normalisiert.

4.8. Proliferationsverfolgung durch Impedanzmessung

Zur Beurteilung der Biokompatibilität von Biomaterialien wurde die Proliferation und Zelladhäsion von Gingivakeratinozyten und Osteoblasten während der Kultur in Eluaten der Materialien beobachtet. Dafür wurde das iCelligence-System (Fa. Agilent, Santa Clara, USA) verwendet. Dieses Gerät misst in einer speziellen Zellkulturschale die Impedanz zwischen in den Boden der Schale eingelassenen Elektroden. Durch sich darauf anheftende und proliferierende Zellen erhöht sich die Impedanz. Nimmt die Zellzahl ab, oder verringert sich die Adhäsionsstärke der Zellen, sinkt sie. Der Verlauf der gemessenen Impedanz über die Zeit spiegelt das Wachstum und die Gesundheit der kultivierten Zellen wieder. Der Vergleich der Wachstumsverläufe von Zellen in verschiedenen Medien, z.B. unbehandeltes Medium und Materialeluate, erlaubt Aussagen über positive oder negative Effekte ihrer Inhaltsstoffe. Hier wurde das System eingesetzt, um mögliche Effekte der Eluate von Biomaterialkandidaten zu untersuchen.

Um die *in vitro*-Biokompatibilität der Grundmaterialien PVCA und PHM zu überprüfen, wurden Eluate von Probekörpern mit einer Gesamtoberfläche von ca. 3,5 cm² hergestellt. Dazu wurden die Proben nach der Lagerung in Ethanol für mehrere Stunden in PBS gewaschen und das PBS dabei mehrfach erneuert. Anschließend wurden die Proben in jeweils 5 ml KGM für 7 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Parallel wurde KGM ohne Material auf dieselbe Art inkubiert, um im Versuch als Negativkontrolle zu fungieren. Diese Eluate wurden dann anstelle von unbehandeltem und nicht vorinkubiertem Zellkulturmedium für die Kultur von Gingivakeratinozyten im iCelligence-System verwendet. Dazu wurden die Zellen nach dem Trypsinieren in den Eluaten resuspendiert und mit 0,102·10⁶/cm² in die iCelligence-Zellkulturschalen ausgesät und ihre Proliferation verfolgt. Ein Austausch des Mediums/Eluats fand alle 2 oder 3 Tage statt. Verbrauchtes Eluat wurde dabei mit frischem ersetzt.

Ein schneller Anstieg der als ‚Cell Index‘ bezeichneten Impedanz zeigt schnelle Proliferation oder zunehmende Adhäsion der Zellen an. Ist dieser Anstieg im Vergleich zu einer Negativkontrolle mit Medium ohne darin inkubiertem Material langsamer, kann davon ausgegangen werden, dass Bestandteile der Probekörper in die Eluate übergegangen sind und das Wachstum der Zellen behindert haben. Hier wäre nicht von Biokompatibilität der getesteten Materialien auszugehen.

Um ihre Biokompatibilität und eventuelle gewebspezifische Effekte der Materialien noch weitergehend zu untersuchen, wurden für ausgewählte Materialvarianten im späteren Verlauf des Projekts auch der Effekt von Eluaten auf die Proliferation von primären, humanen Osteoblasten untersucht. Hierfür wurden Eluate nach ISO-Norm 10993-5:2012-07 hergestellt¹³⁷. Für die Elution wurden dementsprechend 0,8 ml ObM pro cm² Probenoberfläche verwendet (Probekörper mit Dicke > 1 mm). Die Probekörper wurden gewaschen wie oben beschrieben und dann für 72 h bei 37°C im Medium inkubiert. Die Osteoblasten wurden trypsinisiert und im Eluat oder unbehandeltem Kontrollmedium mit einer Zelldichte von 0,078·10⁶/cm² in iCelligence-Platten ausgesät. Das Wachstum der Zellen wurde für 100 h beobachtet. Es wurden für jede Materialvariante mindestens 3 Eluate hergestellt und ihr Einfluss auf das Zellwachstum gemessen (n≥3). Zur Auswertung wurde der kumulative Zellindex durch Integration des Zellindexes über die Zeit bestimmt. Zum Vergleich des Wachstums von Osteoblasten in Eluaten und unbehandeltem Kontrollmedium wurden die durchschnittlichen kumulativen Zellindizes der Replikate berechnet und mittels Zweistichproben-t-Test für zwei gepaarte Stichproben in der Software Prism 7 (Fa. Graphpad, San Diego, California, USA) verglichen. Zum Vergleich des Zellwachstums zwischen verschiedenen Materialvarianten wurden deren kumulierte Zellindizes normalisiert auf den kumulierten Zellindex ihrer jeweiligen Negativkontrolle (unbehandeltes Medium) und dann mittels einfacher Varianzanalyse (‚one-way ANOVA‘) verglichen. Dabei wurden Normalverteilung und gleiche Varianzen zwischen den verglichenen Gruppen angenommen.

4.9. Besiedelung von Materialproben

Neben der Untersuchung von Materialeluaten wurde die *in vitro*-Biokompatibilität der Materialien auf PVCA-/PHM- und Alginatgel-Basis auch durch direkte Besiedelung mit Osteoblasten untersucht. Dazu wurden massiv und makroporös gedruckte Probekörper mit 1,3·10⁴ Zellen/cm² (PVCA-/PHM-Basis) beziehungsweise 2,6·10⁴ Zellen/cm² (Alginatbasis) besiedelt. Massiv gedruckte Materialproben auf PVCA-/PHM-Basis wurden vor der Besiedelung mit Nassschleifpapier bis 4000 grit plangeschliffen, um eine ebene Besiedelungsoberfläche zu erhalten.

4.10. Beschreibung und Charakterisierung der Kompressionsmaschine

Zur Kompression und Charakterisierung von Fibringelproben mit und ohne Zellen kam im Projekt eine Kompressionsmaschine zum Einsatz, die von der Arbeitsgruppe um Alan J. Grodzinsky am Massachusetts Institute of Technology, Boston entwickelt, gebaut und beschrieben wurde¹³⁸. Die Maschine befindet sich nun im Labor von Prof. Dr. Bernd Rolaußs, Leiter des Forschungszentrums für Gewebeersatz, Regeneration und Neogenese (G.E.R.N) an der Universitätsklinik Freiburg, und wurde für die Durchführung von Versuchen für diese Doktorarbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Maschine besteht im Wesentlichen aus einer Plattform zur Aufnahme von Proben, einem nach oben und unten beweglichen Adapter für die Aufnahme von Stempeln, sowie Kraft- und Positionssensoren zur Verfolgung der Adapterbewegung. Mithilfe einer Software kann diese Bewegung anhand der Daten der Sensoren mit fein einstellbaren Parametern und reproduzierbar durchgeführt und nachverfolgt werden.

Die Plattform erlaubt das Einsetzen von verschiedenen, auf die jeweilige Anwendung zugeschnittenen Apparaturen und Probenaufnahmen. Die hier verwendete ist Apparatur ist in Kapitel 5.2.7 näher beschrieben.

Der Stempeladapter wird über eine Gewindestange von einem Schrittmotor bewegt, und kann dabei eine Kraft von maximal 400 N ausüben. Seine Position entlang der Bewegungsachse wird von einem Differentialtransformator (Linear Variable Differential Transformer) gemessen und an die Steuersoftware weitergegeben. Die momentan auf den Adapter wirkende Kraft entlang der Bewegungsachse wird von einer Kraftdose gemessen (angezeigt als das Gewicht mit der entsprechenden Gewichtskraft) und ist ebenfalls mithilfe der Software auslesbar. Im Verlauf der Versuche hat sich gezeigt, dass gemessenen Kräfte in der Software nicht korrekt angezeigt werden. Daher wurde in einem Vorversuch das Messverhalten der Kraftdose charakterisiert:

Zwei Petrischalen wurden als Flüssigkeitsreservoir auf eine am Adapter angebrachte Plattform gestellt. Die auf den Adapter wirkende Kraft wurde daraufhin kontinuierlich gemessen, während mithilfe einer Pipette in Abständen von je 10 s jeweils 0,994 g destilliertes Wasser in die Petrischalen gegeben wurde. Das Volumen pro Pipettiervorgang wurde vorher mithilfe einer geeichten Feinwaage bestimmt. Nach jeder Zugabe wurde die mittlere gemessene Kraft über einen Zeitraum von 5,5 s bestimmt um Messrauschen durch Mitteln eliminieren zu können. Der Versuch wurde fünfmal wiederholt und die jeweils gemessenen Kraftzuwächse gemittelt. Die Daten (siehe Abbildung 5) zeigen eine mit dem hinzugefügten Gewicht linear zunehmende gemessene Kraft. Die tatsächlich wirkende Kraft kann also aus der in der Steuersoftware angezeigten Kraft mit einem konstanten Faktor errechnet werden, der hier als 5,01 ermittelt wurde.

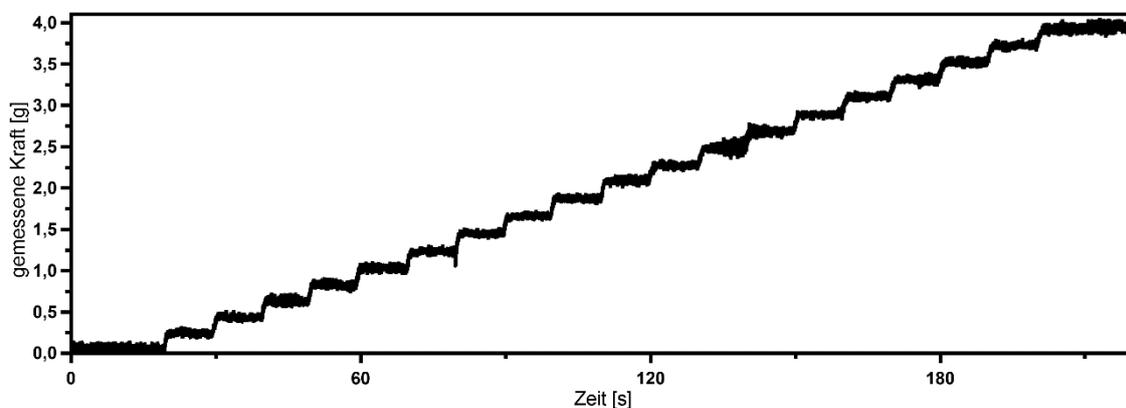


Abbildung 5: Ermittlung der Skalierung der gemessenen Kräfte am Stempeladapter, aufgetragen ist die gemessene Kraft über die Zeit während der Messung

4.11. Herstellung von Zell-beladenen und Zell-freien Fibringelen

Fibringele mit 500 μ l Volumen als 3D-Scaffolds für Kompressionsversuche mit und ohne Osteoblasten wurden hergestellt aus Fibrinogen- und Thrombin-Lösungen (beide aus humanem Plasma). Dafür wurden pro Gel aus 100 mg/ml Fibrinogen-Lösung in PBS eine Verdünnung mit ObM basal in der doppelten der gewünschten Endkonzentration angesetzt und jeweils 250 μ l davon in einer Bohrung der Gießform vorgelegt. Hinzugefügt wurden jeweils weitere 250 μ l einer Kombination aus ObM basal, 1×10^6 Zellen (sofern zutreffend) und 25 U Thrombin (aus 500 U/ml Lösung in PBS). Die Zellen wurden dafür nach dem Trypsinieren in ObM basal resuspendiert. Die Gießform wurde dann für 5 min bei 37°C inkubiert, sodass die Gele aushärteten. Anschließend wurde 25 ml ObM in die Gießform gegeben, sodass alle Gele bedeckt sind und ein Reservoir an Medium in der Gießform entsteht.

Verwendet wurden Gele mit einer Endkonzentration des Fibrinogens von 5, 15, und 50 mg/ml (alle mit 50 U/ml Thrombin).

Um die Gele vor dem Versuch aus der Gießform zu entnehmen, wurde die Klebefolie zum Verschließen der Form zunächst wieder abgezogen. Dann wurde das Gel mit einer Kanüle von der Innenwand der Gießformbohrung gelöst, bis es sich frei in der Gießformbohrung drehen konnte. Mit einem Spatel wurde das Gel nun von der Unterseite der Gießform her aus der Bohrung herausgeschoben und mit dem Spatel in die Kompressionskammer überführt.

Zur Nachverfolgung der Zellviabilität in den Fibringelen wurden Gele in separaten Einzelformen mit gleicher Innengeometrie und Größe und mit gleichen Geleigenschaften (50 mg/ml Fibrinogen) gegossen und in den Gießformen in 6-well-Platten inkubiert.

4.12. Verifizierung der Zellviabilität in Fibringelen

Um zu ermitteln, wie lange Osteoblasten in den Fibringelen überleben können, wurden LIVE/DEAD-Färbungen durchgeführt. Dazu wurden Fibringele aus Einzelformen nach 3, 6, 10 und 18 Tagen Inkubation der Länge nach per Skalpell geteilt und die Zellen an der entstehenden Schnittfläche mit Propidiumiodid (1 µg/ml, Fa. Sigma Aldrich, Taufkirchen) und SYTO16 (5 µM, Fa. Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Medium gefärbt und anschließend mikroskopiert. Alle Zellen in den Aufnahmen wurden manuell gezählt. Mit Propidiumiodid gefärbte Zellen wurden dabei als tot identifiziert, mit SYTO16 gefärbte als lebendig.

4.13. Messung des Elastizitätsmoduls von Fibringelen in Abhängigkeit von der Fibrinogenkonzentration

Der Elastizitätsmodul E der Fibringele wurde in zyklischen Kompressionsversuchen („confined compression“) auch in Abhängigkeit von der Fibrinogenkonzentration gemessen. Dazu wurden jeweils drei Fibringele mit variabler Fibrinogenkonzentration und einer Thrombinkonzentration von 50 U/ml in die Kompressionskammern eingesetzt, um 5% der ursprünglichen Probenhöhe vorkomprimiert und für 20 Zyklen mit einer Kompressionsamplitude von weiteren 10% bei 0,1 Hz komprimiert. Zum Einsatz kamen Gele mit Fibrinkonzentrationen von 5, 15 und 50 mg/ml. Die Aufnahme und Auswertung der Kompressionsdaten erfolgte analog zu den Versuchen zur Frequenzabhängigkeit: Es wurden 100 Messpunkte pro Kompressionszyklus aufgezeichnet, und 25 Zyklen durchgeführt. Auch hier wurde die Steigung der Hysteresekurve im Spannungs-Dehnungs-Diagramm nach Mittelung über die ersten zwei Zyklen im Bereich direkt nach Erreichen der maximalen Kompression ausgewertet. Für jede Konzentration wurden mindestens unabhängige 3 Versuche durchgeführt ($n \geq 3$). Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde eine einfache Varianzanalyse („one-way ANOVA“) durchgeführt. Dabei wurden Normalverteilung und gleiche Varianzen zwischen den verglichenen Gruppen angenommen.

4.14. Messung des Elastizitätsmoduls von Fibringelen in Abhängigkeit von der Kompressionsfrequenz

Der Elastizitätsmodul E („Young's Modulus“) der Fibringele wurde in zyklischen Kompressionsversuchen („confined compression“) gemessen. Dazu wurden jeweils drei Fibringele mit einer Fibrinogenkonzentration von 50 mg/ml und einer Thrombinkonzentration von 50 U/ml in die Kompressionskammern eingesetzt, während der Kontaktfindung (siehe unten) um 5% der ursprünglichen Probenhöhe vorkomprimiert und für 20 Zyklen mit einer Kompressionsamplitude von weiteren 10% komprimiert. Die Kompressionsfrequenz war dabei variabel. Die auftretende Kraft und die Auslenkung des Stempels während der Kompression wurden an 100 Messzeitpunkten pro Zyklus aufgezeichnet (siehe Abbildung 6).

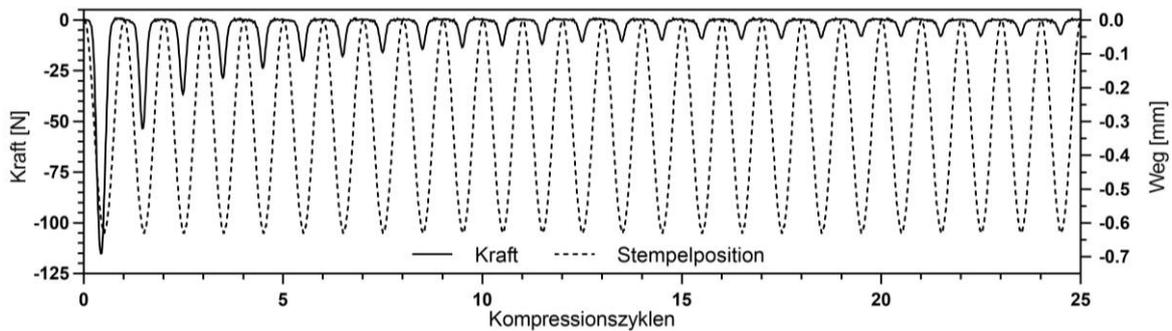


Abbildung 6: Verlauf von gemessener Kraft und gefahrenem Weg des Stempels während der zyklischen Kompression von Fibringelen mit 5 mg/ml Fibrinogen bei 0,1 Hz, 10% Kompression über 25 Zyklen; schwarz: gemessene Kraft [N], schwarz gestrichelt: vom Stempel gefahrener Weg [mm]

Aus den gemessenen Werten für Kraft und Weg wurden zusammen mit der summierten Oberfläche der Gele und Ihrer Ausgangsdicke die Spannung und Dehnung zu jedem Zeitpunkt während der Kompression berechnet. Betrachtet wird die Dehnung ε der Proben:

$$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0}$$

(dabei ist ΔL der Betrag der Höhenänderung der Probekörper durch Kompression und L_0 deren ursprüngliche Höhe)

und die dabei auftretende Spannung σ in den Probekörpern:

$$\sigma = \frac{F}{A}$$

(mit F als der gemessenen Kraft und A der kombinierten Querschnittsfläche der drei Probekörper).

Werden beide Werte als Spannungs-Dehnungs-Diagramm gegeneinander aufgetragen, ergibt sich eine Hysteresekurve, die die Kompression der Proben widerspiegelt (siehe Abbildung 7). Zur Auswertung wurden die Daten der ersten 2 Kompressionszyklen verwendet und gemittelt.

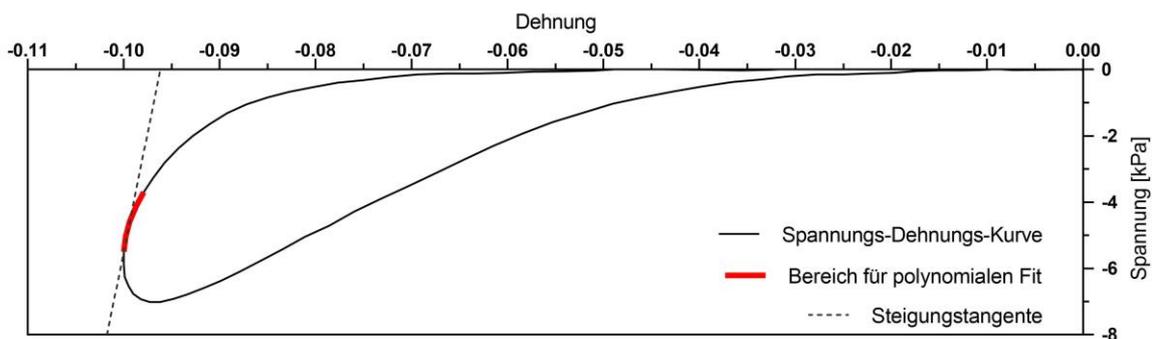


Abbildung 7: Spannungs-Dehnungs-Diagramm der zyklischen Kompression von Fibringelen mit 5 mg/ml Fibrinogen bei 0,1 Hz, 10% Kompression; schwarz: Mittelwerte über die ersten zwei Zyklen, rot: Bereich der Spannungs-Dehnungskurve für die eine polynomiale Näherungsfunktion ermittelt wurde, schwarz gestrichelt: Steigungstangente am Umkehrpunkt der Spannungs-Dehnungskurve mit Steigung aus polynomialer Näherungsfunktion

Der Elastizitäts-Modul (E-Modul; Young's Modul) ergibt sich aus dem Quotienten der Änderung von Spannung und Dehnung direkt nach Erreichen der maximalen Kompression (adaptiert aus Hales et al., 2002¹³⁹):

$$E = \frac{\Delta \sigma}{\Delta \varepsilon}$$

Dies entspricht einer Geraden im Spannungs-Dehnungs-Diagramm, die die Kurve am Punkt der maximalen Kompression tangiert. Da es bei der Auslenkung des Stempels nach oben keinen kontinuierlichen Kontakt mit den Probekörpern gab („lift-off“), konnte der E-Modul nur am unteren Umkehrpunkt der Hysteresekurve bestimmt werden. Um die Steigung an diesem Punkt trotz relativ weniger Messpunkte möglichst genau zu ermitteln, wurde der Verlauf der Messkurve ab diesem Punkt mit einer polynomialen Funktion zweiten Grades mithilfe von Microsoft Excel angenähert und die Steigung dieser Funktion am Punkt maximaler Kompression berechnet. Es wurden die ersten zwei Kompressionszyklen gewählt, da die auftretende Spannung in der Probe mit jedem Kompressionszyklus abnahm (siehe Abbildung 6). Der ermittelte E-Modul beschreibt also die Eigenschaften der Probe direkt zu Beginn der Messung.

Inwiefern die Steifigkeit der Fibringele von der Kompressionsfrequenz abhängig ist, wurde anhand von Kompressionsversuchen mit 0,05 Hz, 0,1 Hz, 0,5 und 1 Hz ermittelt. Höhere Kompressionsfrequenzen führten wegen technischer Limitationen der Kompressionsmaschine zu verringerten Amplituden und konnten deswegen nicht untersucht werden. Für jede Frequenz wurden mindestens 3 unabhängige Versuche ($n \geq 3$) mit jeweils 3 Fibringelprobekörpern durchgeführt. Für jeden Versuch wurden bis dahin nicht komprimierte Proben verwendet. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde eine einfache Varianzanalyse („one-way ANOVA“) durchgeführt. Dabei wurden Normalverteilung und gleiche Varianzen zwischen den verglichenen Gruppen angenommen.

4.15. Mechanische Stimulation von Osteoblasten in Fibringelen durch zyklische Kompression

Zell-beladene Gele wurden wie oben beschrieben hergestellt und in die drei Kompressionskammern der Apparatur eingesetzt. Die Apparatur wurde in den Inkubator eingesetzt und auf 37°C erwärmt, danach wurde wie oben beschrieben Kontakt zwischen Stempel und Proben hergestellt und verifiziert. Die Gele wurden dabei um 5% ihrer bei der Kontaktfindung gemessenen Ausgangshöhe vorkomprimiert. Als Kontrolle wurden drei weitere, gleichartige Gele in jeweils 1 ml ObM für die Dauer des Versuchs im selben Inkubator gelagert.

Die Gele wurden nun zyklisch komprimiert. Es wurde eine Amplitude der Stempelbewegung von 10% der Ausgangshöhe der Gele gewählt. Aus der Literatur ergibt sich eine sinnvolle Kompressionsfrequenz von 1 Hz, für die ein Effekt auf die komprimierten Zellen erwartet werden kann. Aufgrund von technischen Limitationen der Kompressionsmaschine konnte diese Frequenz nicht ganz erreicht werden. Bei Einstellung von 1 Hz Kompressionsfrequenz wurde daher mit tatsächlich 0,85 Hz komprimiert. Die Kompression wurde für 2 h ausgeübt. Nach der Kompression wurden die Gele aufgeschlossen und die RNA der enthaltenen Zellen aufgereinigt wie unten beschrieben. Die Kompression von Zellen in Fibringelen wurde in vier unabhängigen Versuchen durchgeführt ($n=4$).

4.16. Gelaufschluss und RNA-Extraktion aus Zell-beladenen Fibringelen

Zur Extraktion von RNA aus Zellen in Fibringelen wurden die Gele zunächst mit einem Skalpell in 8 Stücke geteilt. Diese Gelstücke wurden dann in Zentrifugenröhrchen mit 500 µl Trizol Reagent (Fa. Sigma Aldrich, Taufkirchen), im Homogenisierungsgerät Precellys (Fa. Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) aufgeschlossen. Die Röhrchen wurden dann 30 s bei 8000 g, 4°C zentrifugiert und alle Flüssigkeit in ein neues Röhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 12000 g, 4°C wurde erneut der Überstand abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1/5 des Volumens an Chloroform (Fa. Carl Roth, Karlsruhe), vortexen und Inkubation bei 4°C für 10 min, wurde erneut für 10 min bei 12000 g, 4°C zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde dann abgenommen und auf Qiashredder-Tubes (Fa. Qiagen, Hilden) des RNeasy-Kits (Qiagen) pipettiert. Anschließend wurde die Aufreinigung der RNA nach Herstellerprotokoll des RNeasy-Kits durchgeführt. Dabei wurden nach Verwendung der Qiashredder-Tubes gDNA-Eliminator-Tubes eingesetzt, um eine mögliche Kontamination durch genomische DNA zu verringern. War mehr als 700 µl wässriger Überstand nach der Phasentrennung entstanden, wurden die Aufreinigungsschritte parallel in mehreren Tubes des Kits durchgeführt. Erst beim Auftragen der Überstände auf die Mini Spin Columns des Kits wurden die Überstände durch

mehrfaches Hinzufügen der Einzelvolumina und wiederholtes Zentrifugieren vereinigt. Die RNA wurde schlussendlich in 40 µl Wasser eluiert und ihre Konzentration photometrisch gemessen (Qiaxpert, Fa. Qiagen). Die Integrität der RNA wurde anschließend noch mit dem Mikrofluidik-Gelelektrophoresesystem Experion (Fa. Bio-Rad, Feldkirchen) verifiziert.

4.17. Array-basierte quantitative RT-PCR (qPCR)

Zur Analyse der Genexpressionsmuster der Osteoblasten in verschiedenen Kultur- und Stimulationsbedingungen wurden qPCR-Arrays der Firma Qiagen (RT2 Profiler PCR Arrays, Art.Nr. 330231 PAHS-026ZD, siehe Anhang, Tabelle 18 für eine vollständige Liste aller mit dem Array getesteter Gene) eingesetzt.

Zunächst wurden jeweils 500 ng der isolierten RNA mit dem RT² First Strand Kit (Fa. Qiagen) nach Herstellerprotokoll zu cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde dann ebenfalls nach Herstellerangaben in qPCR Arrays in einem PCR-Cycler der Fa. Bio-Rad, Feldkirchen (Cfx 96 Touch) analysiert. Dabei kam RT² SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen) zum Einsatz.

Zur Auswertung der gemessenen PCR-Daten wurde ein Python-basierter Auswertungsalgorithmus programmiert. Die Auswertung folgt der $2^{-\Delta\Delta C_q}$ -Methode von Livak und Schmittgen¹⁴⁰ und berücksichtigt die von Qiagen in den Arrays integrierten Kontrollen. Der Algorithmus ist in der Programmiersprache Python programmiert und läuft in Notebook-Umgebungen wie Jupyter-Notebook oder Google Colab. Eingabeformat für die gemessenen qPCR-Daten sind in Microsoft Excel generierte .csv-Dateien. Ausgegeben werden die Ergebnisse ebenfalls als .csv-Datei, die die berechneten Expressionsaktivitäten sowie Unsicherheitsbereiche für selbige zur einfachen Darstellung als Säulendiagramme in Excel oder Statistikprogrammen enthält. Zusätzlich wird eine grafische Darstellung der Expressionsaktivitäten aller in einem Versuch untersuchten Proben und Gene erzeugt. Dieses Clustergram zeigt farblich codiert die Expressionsintensität der untersuchten Gene und zeigt zusätzlich Ähnlichkeiten in den Expressionsmustern zwischen Proben durch deren Anordnung in der Grafik und durch Dendrogramme, die hierarchisch die Ähnlichkeit der Muster von Proben bzw. Genen zeigen. Einzelheiten zu den Datenstrukturen und der Quellcode des Algorithmus werden im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt und besprochen. Die in der Analyse berechneten Expressionsaktivitäten der untersuchten Gene, sowie die dazugehörigen p-Werten der statistischen Auswertung werden als Tabelle ausgegeben.

Einige der so gewonnenen Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche wurden mithilfe der Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) auf ihre eventuelle gemeinsame Zugehörigkeit zu biologischen Prozessen untersucht. Dabei wurden die Standardeinstellungen benutzt (Background: Homo Sapiens, Thresholds: Count 2, EASE 0.1, # of Records: 1000). Von den erhaltenen Übereinstimmungen wurden solche nicht beachtet, die offenbar redundant, zu allgemein für eine konkrete Aussage (etwa „signal“), oder im Kontext der hier verwendeten qPCR-Arrays trivial (etwa „skeletal system development“) waren. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse auch mithilfe des PANTHER Classification System (<http://www.pantherdb.org>) analysiert. Dabei wurden ebenfalls die Standardeinstellungen verwendet (Test Type: Fisher's Exact Test, Correction: Calculate False Discovery Rate). Als „Annotation Set“ wurde das „GO biological process complete“ des GO Consortium ausgewählt. Als „Reference List“ wurde die in der Datenbank vorliegende Liste aller humanen Gene herangezogen. Beide Datenbanken berücksichtigen sowohl die Liste der regulierten Gene als auch Richtung und Betrag ihrer Genexpressionsänderung.

4.18. Gefrierschnitte

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden Fibringele in flüssigem Stickstoff in Einbettmedium (Fa. Leica Biosystems, Wetzlar) eingefroren. An einem Kryotom (Fa. Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) wurden dann Dünnschnitte von 10 µm Dicke hergestellt und auf Histobond-Objektträger (Fa. Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen) aufgezogen. Die Schnitte wurden dann bei 4°C gelagert.

Nach Trocknung über Nacht bei 4°C wurden die Schnitte in PBS gewaschen, für 20 min bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehydlösung (Fa. Roth, Karlsruhe) in PBS fixiert und anschließend erneut in PBS gewaschen.

4.19. Fluoreszenzfärbungen und Fluoreszenzmikroskopie

Zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung (Immunzytochemie) von Gefrierschnitten von Fibringelen oder Zellen als Monolayer auf Deckgläsern wurden diese dreimal in PBS gewaschen, für 20 min bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehydlösung (Fa. Roth, Karlsruhe) in PBS fixiert und anschließend erneut mit PBS gewaschen. Nach der Fixierung wurden Schnitte oder Zellen zum Blockieren für 30 min in 5% Rinderserumalbumin (BSA, Fa. Merck, Darmstadt), 0,1% Triton X-100 (Fa. Sigma Aldrich, Taufkirchen) in PBS (Blockierlösung) inkubiert und dann erneut mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in 5% BSA in PBS über Nacht bei 4°C. Folgende Antikörper und Konzentrationen wurden verwendet (Tabelle 4).

Tabelle 4: verwendete Primärantikörper

Zielprotein	Ursprungsspezies	Hersteller und Artikelnummer	eingesetzte Verdünnung
Vinculin	Maus	Fa. Abcam, Art.Nr. ab18058	1:200
Paxillin	Kaninchen	Fa. Abcam, Art.Nr. ab32115	1:200
fokale Adhäsionskinase (FAK)	Kaninchen	Fa. Abcam, Art.Nr. ab76496	1:100
Integrin β 1	Kaninchen	Fa. Abcam, Art.Nr. ab179471	1:100
Integrin β 3	Maus	Fa. Abcam, Art.Nr. ab7167	1:50
Osteocalcin (BGLAP)	Maus	Fa. Santa Cruz, Art.Nr. sc-376726	1:100
Osteopontin (SPP1)	Maus	Fa. Abcam, Art.Nr. ab69498	1:200
RUNX2	Kaninchen	Fa. Abcam, Art.Nr. ab192256	1:500

Die Schnitte beziehungsweise Zellen wurden dann wiederum in PBS gewaschen und anschließend mit dem oder den Sekundärantikörper(n), und/oder mit 1,47 μ M Phalloidin-Alexa Fluor 488 (Fa. Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für Färbungen von Fibringelschnitten kam Phalloidin als Konjugat mit iFluor 594 (Fa. Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:1000 zum Einsatz. Folgende Sekundärantikörper und Konzentrationen wurden verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 5: verwendete Sekundärantikörper

Zielspezies	Antikörpermarkierung	Hersteller und Artikelnummer	eingesetzte Verdünnung
Maus	Alexa Fluor 594	Fa. Life Technologies, Art.Nr. A11020	1:200
Maus	Alexa Fluor 488	Fa. Life Technologies, Art.Nr. A11029	1:200
Kaninchen	Alexa Fluor 594	Fa. Life Technologies, Art.Nr. A11012	1:200
Kaninchen	Alexa Fluor 488	Fa. Life Technologies, Art.Nr. A11008	1:200

Abschließend wurden die Schnitte beziehungsweise Zellen erneut in PBS gewaschen, für 10 min mit 300 mM 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Fa. Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) bei Raumtemperatur inkubiert und erneut in PBS und Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden dann mit Deckgläschen versiegelt (Eindeckelmedium, Fluoromount-G, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) und mindestens über Nacht bei 4°C zum Trocknen gelagert. Zellen auf Deckgläschen wurden mit demselben Eindeckelmedium auf Objektträger aufgebracht.

Zur Analyse der Färbungen von Gefrierschnitten, sowie Zellen im Monolayer kam ein Epifluoreszenzmikroskop der Fa. Keyence (Neu-Isenburg) zum Einsatz.

Zellen auf Oberflächen von Biomaterialproben wurden nach einem ähnlichen Protokoll gefärbt: Zur Lebendzellefärbung wurden die Proben vor der Färbung nicht fixiert, sondern stattdessen direkt in PBS gewaschen und inklusive Blockierung, Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern bzw. Phalloidin, sowie anschließender Inkubation mit DAPI gefärbt wie für Gefrierschnitte oben beschrieben. Färbungen von lebenden Zellen auf Biomaterialoberflächen wurden am Life Imaging Center der Universität Freiburg an einem konfokalen Laserscanningmikroskop analysiert (siehe unten).

4.20. Konfokale Laserscanningmikroskopie

Zur Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen von Zellen auf dreidimensional gekrümmten Oberflächen von Biomaterialien kam ein konfokales Laserscanningmikroskop (LSM 880, Fa. Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen) des Life Imaging Centers der Universität Freiburg zum Einsatz. Die Auflösung in x-, y-Richtung wurde dabei mithilfe der Zeiss-Software ZEN auf die für das Objektiv optimalen Werte eingestellt. Um die Zellen auch auf den in z-Richtung gekrümmten Oberflächen abbilden zu können, wurden z-Stapel aufgenommen. Der Abstand der Fokusebenen zwischen jeweils zwei Aufnahmen der z-Stapel wurde auf die Größe der Pinhole-Öffnung abgestimmt, die wiederum von den verwendeten Fluoreszenzwellenlängen abhängt. Um die Aufnahmegeschwindigkeit der zum Teil großen Anzahl von Aufnahmen zu beschleunigen, aber trotzdem dasselbe Gesamtvolumen der Probe abzudecken, wurde gegebenenfalls der Abstand zwischen Aufnahmen eines z-Stapels vergrößert.

4.21. Rasterelektronenmikroskopie

Zur Aufbereitung von Zell-beladenen oder Zell-freien Fibringelproben für die Analyse im Rasterelektronenmikroskop wurden die Gele zunächst mit einem Skalpell in mehrere Stücke geteilt, sodass bestimmte Bereiche des inneren Volumens als Schnittfläche freigelegt wurden. Die Gelstücke wurden dann bei 4°C in 4% PFA über Nacht fixiert. Die Gelstücke wurden anschließend in PBS gewaschen und dann mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, jeweils 30 min, 80% über Nacht, 90%, 100%, jeweils 1 h, 100% über Nacht) entwässert. Die Stücke wurden dann in einer Kritisch-Punkt-Trocknungsmaschine (CPD 030, Fa. BAL-TEC, Schalksmühle) getrocknet und direkt anschließend mit Gold beschichtet („gesputtert“). Dabei kam eine Maschine der Firma Jeol (Freising) und mit einem Kammerdruck von 45 mbar, einer Stromstärke von 20 mA und einer Sputterzeit von 60 s zum Einsatz. Proben von PVCA und PHM wurden analog behandelt.

Für die Aufnahme von elektronenmikroskopischen Bildern kam ein JSM-IT100 Rasterelektronenmikroskop der Firma Jeol (Freising) zum Einsatz.

5. ERGEBNISSE

5.1. Präklinische Evaluierung von potentiellen Biomaterialien auf ihre Eignung als Knochenersatzmaterial

5.1.1. PVCA- und PHM-Varianten zeigen nach Aufreinigung *in vitro* Biokompatibilität in Eluatversuchen

Zu Beginn der Entwicklung der PVCA-basierten Biomaterialien wurde die Proliferation von immortalisierten humanen Gingivakeratinozyten bei Kultivierung in Materialeluaten von Polyvinylencarbonat (PVCA) und Polyhydroxymethylen (PHM) durch Impedanzmessung (‘iCelligence’) im Vergleich zu unbehandeltem Zellkulturmedium zur initialen Evaluierung der *in vitro*-Biokompatibilität begutachtet (Abbildung 8). Eluate enthalten die löslichen, und potentiell zytotoxischen Bestandteile der untersuchten Ausgangsmaterialien und werden durch Inkubation von Materialproben in Zellkulturmedium hergestellt (siehe Kapitel 4.8). Die Eluate von PVCA und PHM erlaubten dabei eine Proliferation der Zellen, sie war allerdings deutlich langsamer als in unbehandeltem Medium. Diese Ergebnisse legen nahe, dass in den Materialproben Verunreinigungen durch Lösemittel aus der Herstellung zurückgeblieben waren. Diese Vermutung wurde durch eine Analyse der zurückgebliebenen Lösungsmittel im Material mittels NMR (‘nuclear magnetic resonance spectroscopy’) durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mülhaupt bestätigt (Daten hier nicht gezeigt). Die Reinheit der Materialien wurde daraufhin und für alle folgenden Proben durch die wiederholte Extraktion mit Ethanol (Soxhlet-Extraktion) verbessert.

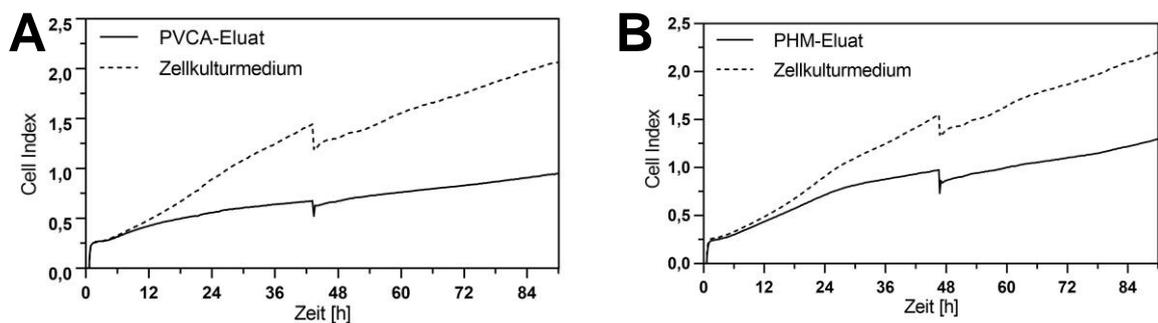


Abbildung 8: Kultivierung von Gingivakeratinozyten in A: PVCA-Eluat, B: PHM-Eluat

Von Soxhlet-aufgereinigten Proben wurden dann ebenfalls Eluate in Zellkulturmedium hergestellt und Gingivakeratinozyten darin kultiviert (Abbildung 9). Zu beobachten war ein nun nur noch sehr geringer Unterschied in der Zunahme des Zellindexes im Vergleich zur Negativkontrolle mit unbehandeltem Medium, besonders im Falle des PHM-Eluats.

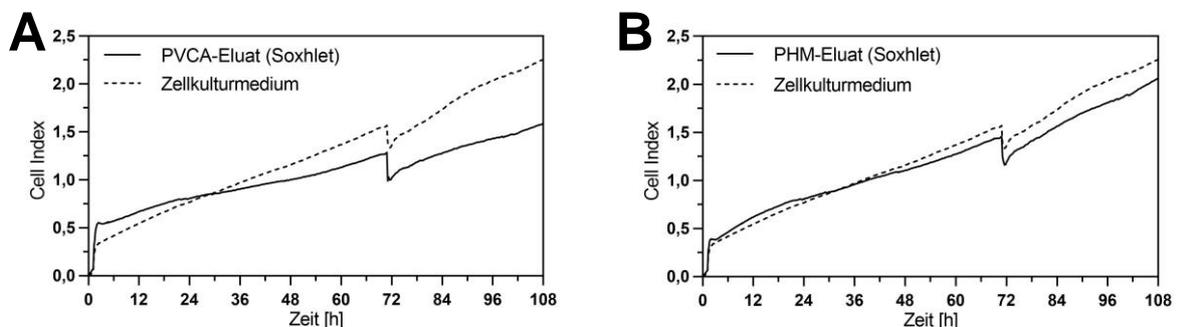


Abbildung 9: Kultivierung von Gingivakeratinozyten in A: PVCA-Eluat nach Soxhlet-Aufreinigung, B: PHM-Eluat nach Soxhlet-Aufreinigung

Auf der Basis dieser vorläufigen, aber positiven Ergebnisse wurde die Material- und 3D-Druckmethodenentwicklung in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mülhaupt fortgesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeiten wurde der Einsatz von Additiven erwogen, die das Drucken kleinerer Strukturen ermöglichen (sogenannte Thixotropiemittel zur Erhöhung der Viskosität der Drucklösung während des 3D-Drucks). Von Materialvarianten mit diesen Zusätzen wurden Eluate hergestellt und deren Effekt auf das Wachstum von Gingivakeratinozyten untersucht.

Die Zugabe von Hydroxylapatit zu PHM führte bei der Testung von entsprechenden Eluaten zu einem gesteigerten Wachstum der Gingivakeratinozyten (Abbildung 10A). Die Verwendung von Hydroxylapatit als Additiv wurde daher in weiteren Versuchen auch in der direkten Besiedelung von Materialproben weiter untersucht.

Die Zugabe von Magnesiumoxid (MgO)-Nanopartikeln zu PHM verhinderte dagegen die Proliferation der Gingivakeratinozyten in einem Eluat des Materials vollständig (Abbildung 10B), genauso die Zugabe von Aerosil 200 zu PVCA (Abbildung 10C). Beide Stoffe wurden daher als Additive verworfen.

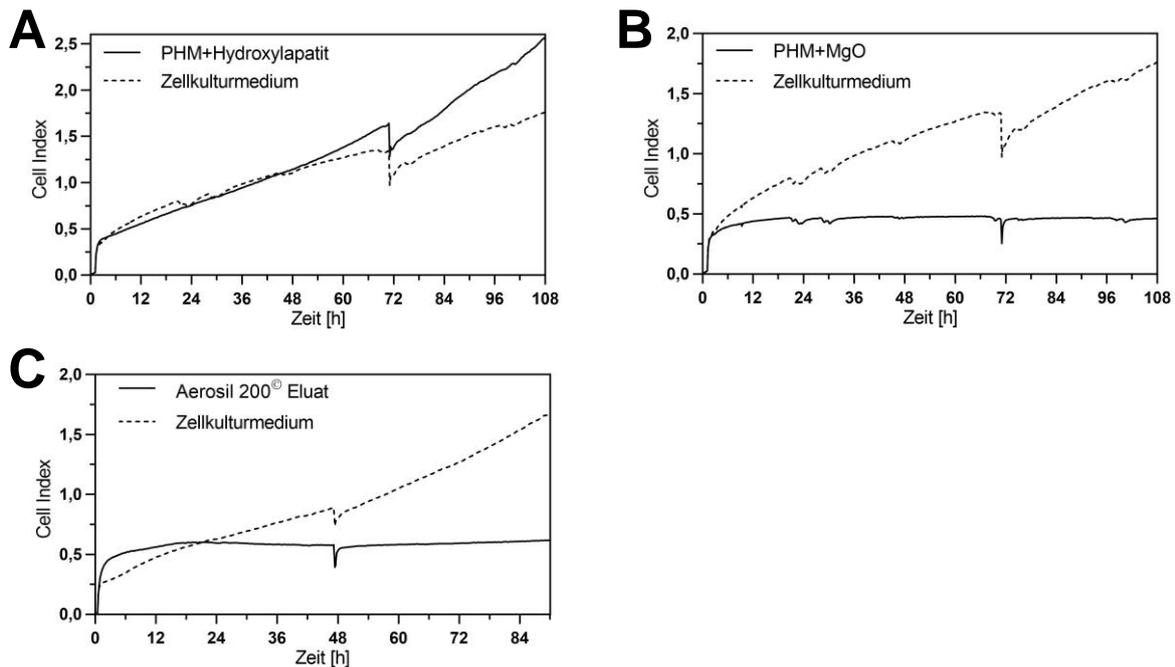


Abbildung 10: Kultivierung von Gingivakeratinozyten in Eluaten von PHM mit A: Hydroxylapatit, B: MgO-Nanopartikeln, von PVCA mit C: Aerosil 200

Des Weiteren wurde in flüssigen Stickstoff zermahlene Gelatinevlies (nGV) als Additiv erwogen und auf seine möglichen Effekte im Sinne der *in vitro* Biokompatibilität hin untersucht. Die Zugabe einer für die weitere Untersuchung geeigneten Menge Medium zu einer Probe des Vlieses war allerdings nicht möglich, da das Vlies so saugfähig war, dass die gesamte Flüssigkeit absorbiert wurde und daher später nicht mehr entnommen werden konnte. Der Einfluss von nGV auf das Zellverhalten wurde daher nur in direkten Besiedelungsversuchen beobachtet (siehe Kapitel 5.1.3).

Die *in vitro* Biokompatibilität von ausgewählten Materialvarianten von PVCA und PHM wurde anschließend auch mit primären, humanen Osteoblasten in weiteren Versuchen untersucht. Diese Zellen des Zielgewebes der geplanten Anwendung der evaluierten Materialien in Knochenimplantaten erlauben weitere Erkenntnisse über die mögliche Eignung der Materialien zur Unterstützung der Geweberegeneration. Dazu wurde die Proliferation der Zellen in Eluaten von PVCA und PHM, PVCA und PHM nach kryo-Druck, sowie PVCA und PHM mit Hydroxylapatit mittels Impedanzmessung über einen Zeitraum von 100 h beobachtet. Die hierfür verwendeten Eluate wurden nach den Vorgaben in ISO10993-5 hergestellt (siehe Kapitel 4.8). Die Zellen waren in diesem Versuch in allen getesteten Eluaten in der Lage, zu proliferieren (siehe Abbildung 11). Bei Kultivierung in Eluaten von PHM und PHM nach kryo-Druck (PHM kryo) gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Proliferation zur Negativkontrolle mit unbehandeltem Kontrollmedium. Alle PVCA-Eluate (PVCA, PVCA nach kryo-Druck [PVCA kryo], PVCA mit Hydroxylapatit [PVCA+HA]) wiesen dagegen eine statistisch signifikant langsamere Proliferation der darin kultivierten Zellen im Vergleich

zum Kontrollmedium auf. Das kryo-3D-Druckverfahren hatte weder bei PVCA- noch bei PHM-Eluaten einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation im Vergleich zum Standard-3D-Druck. Die Zugabe von Hydroxylapatit zu den Materialien führte bei PVCA, aber auch bei PHM (PHM+HA) zu einem statistisch signifikant langsamerem Wachstum der Osteoblasten im Vergleich zu PVCA beziehungsweise PHM ohne Hydroxylapatit.

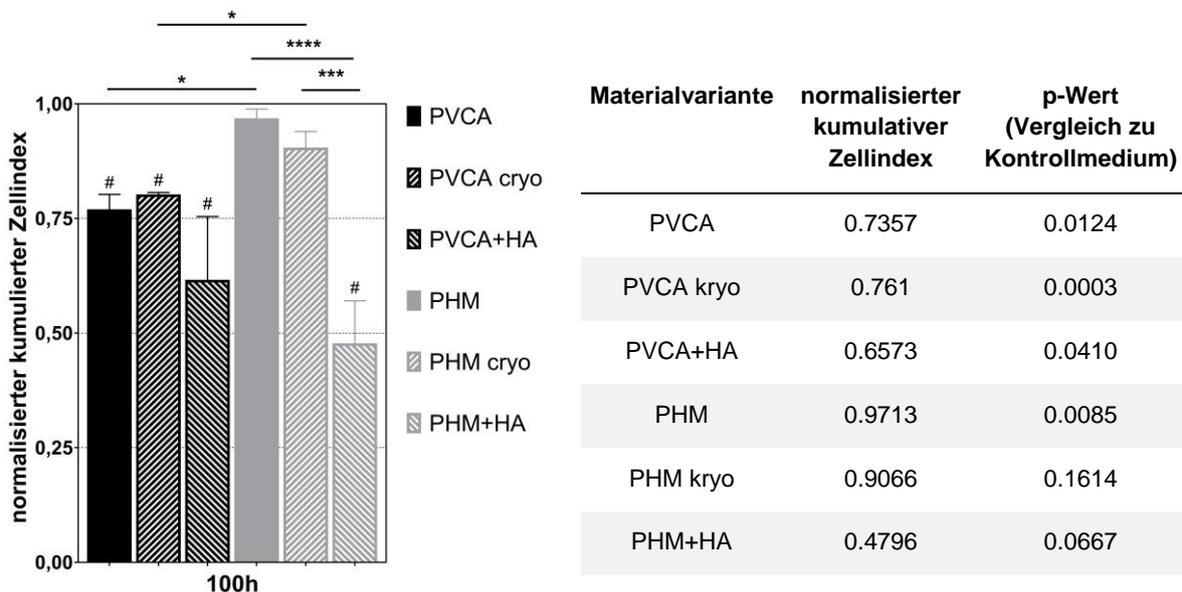


Abbildung 11: Ergebnis der statistischen Auswertung der iCelligence-Versuche zum Einfluss von Materialeluaten auf die Proliferation von primären, humanen Osteoblasten; angegeben ist der jeweilige kumulative Zellindex nach 100 h Inkubation normalisiert auf den Zellindex in unbehandeltem Kontrollmedium; $n \geq 3$; #: statistisch signifikant unterschiedliche Proliferation im Vergleich zum Vergleichsmedium ($p < 0,05$); statistisch signifikant unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeiten im Vergleich zwischen ausgewählten Materialvarianten mit Balken eingetragen (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,005$, ****: $p < 0,0001$); publiziert in Stolz et al., 2021¹³³

5.1.2. PVCA und PHM sind stark mikroporös

Zur Untersuchung der inneren Struktur der PVCA- und PHM-Probekörper wurden REM-Aufnahmen angefertigt. Die Proben wurden angeschliffen, um ihr Inneres freizulegen und es rasterelektronenmikroskopisch untersuchen zu können. Abbildung 12 zeigt PVCA-Proben in verschiedenen Vergrößerungen (30-fach bis 1000-fach). Zu sehen ist ein massives Material (Abbildung 12 D) mit einigen Poren im Größenbereich von einigen Dutzend Mikrometern (Abbildung 12 B). Die Poren waren weniger häufig im Randbereich der Proben, also knapp unter der Probenoberfläche zu finden (Abbildung 12 A).

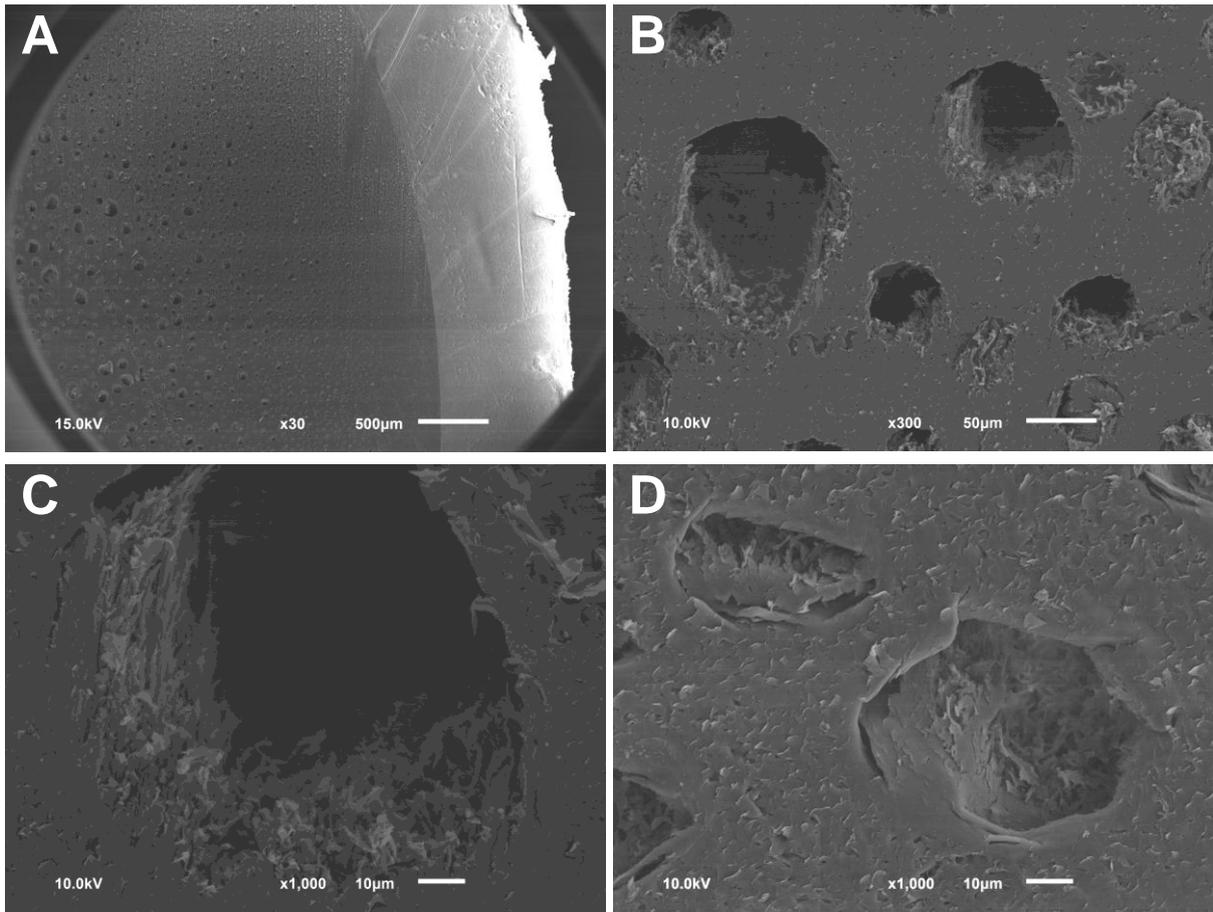


Abbildung 12: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von PVCA-Proben nach Anschleifen;
 Maßstabsbalken: A: 500 µm, B: 50 µm, C, D: 10 µm

REM-Aufnahmen von PHM-Proben zeigen ein deutlich anderes Bild. Während PVCA größere Poren von bis zu 100 µm Durchmesser in ansonsten massivem Material aufwies, hatten die PHM-Proben in ihrem gesamten Volumen zusätzliche Poren von ca. 1-2 µm Durchmesser (Abbildung 13 C). Größere Poren wie bei PVCA im Bereich von einigen Dutzend Mikrometern waren ebenfalls zu finden, es waren aber deutlich mehr, mit sehr viel geringerem Abstand zueinander (Abbildung 13 B). Die Poren bildeten hier im Vergleich zu ihrem Durchmesser lange Röhren, die senkrecht zur Oberfläche der Probe in das Material hineinreichen (Abbildung 13 C, D). Nach Einschätzung unserer Projektpartner in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mühlhaupt gehen diese beobachteten Poren auf physikalische Lösungsmittelaustauschprozesse zurück, die durch die Fällung der Probekörper in Wasser nach dem 3D-Druck ausgelöst werden (siehe Kapitel 6.1).^{134,141}

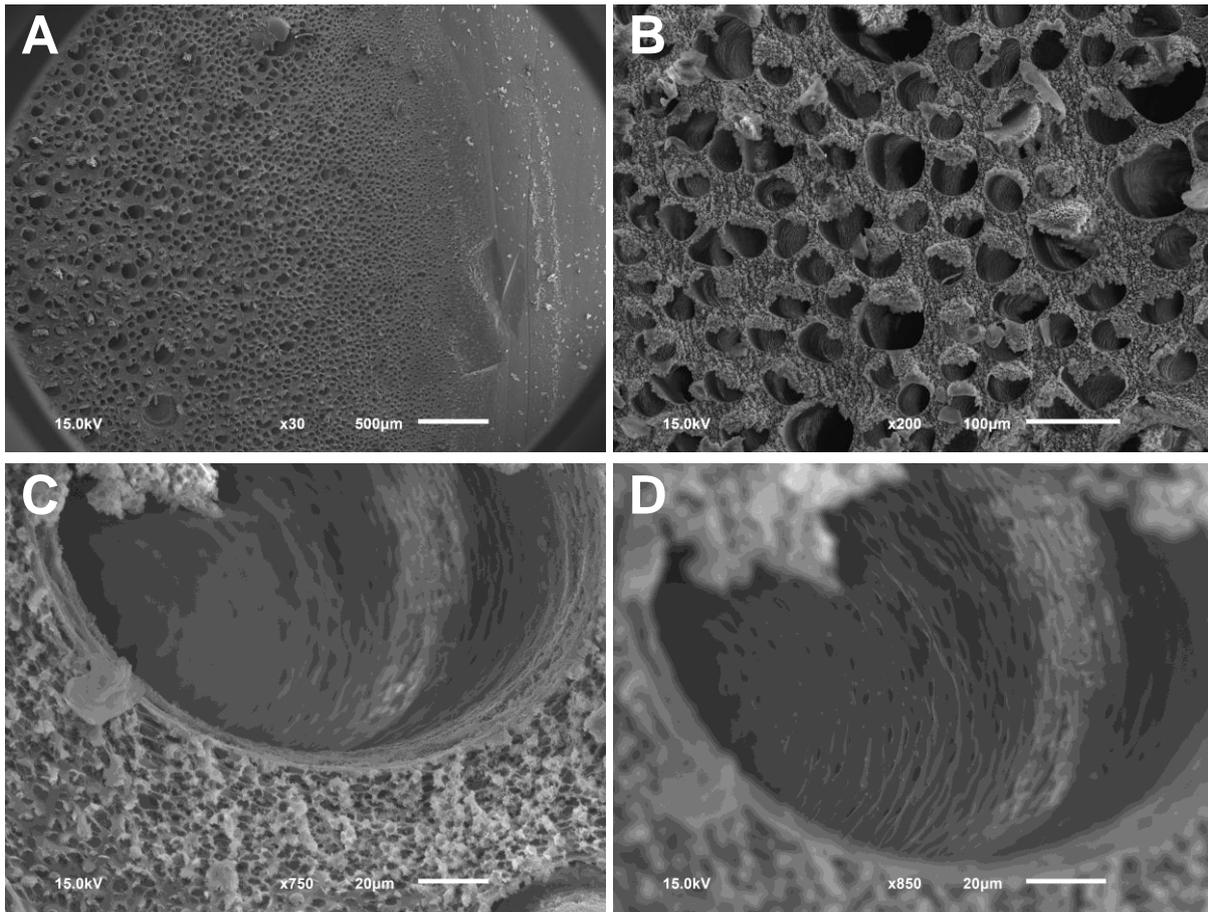


Abbildung 13: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von PHM-Proben nach Anschleifen in verschiedenen Vergrößerungen; C, D: gleicher Bildausschnitt mit unterschiedlicher Fokussierung; Maßstabsbalken: A: 500 µm, B: 100 µm, C, D: 20 µm

5.1.3. PVCA- und PHM-Varianten zeigen *in vitro*-Biokompatibilität in Besiedelungsversuchen, Supplementierungen vermitteln keinen zusätzlichen Effekt

Neben der Untersuchung von Eluaten wurde die *in vitro*-Biokompatibilität von PVCA- und PHM-basierten Materialien auch mittels Besiedelung ihrer Oberflächen mit primären, humanen Osteoblasten untersucht. Die Fähigkeit der Zellen, dabei auf den Materialoberflächen zu adhären und sich auszubreiten, als grundlegende Voraussetzung für alle weiteren Zellfunktionen, wurde dabei mikroskopisch untersucht und als Indikator der *in vitro*-Biokompatibilität begutachtet. Die Besiedelung von PVCA-Oberflächen (Abbildung 14 A, B) zeigte dabei, dass die Osteoblasten zwar auf dem Material vorhanden waren, aber eine runde Zellmorphologie aufwiesen, also auf der Oberfläche nicht adhären konnten. Durch den Umstieg auf das kryo-3D-Druckverfahren wurde die Besiedelung von PVCA-Proben aus herkömmlichem 3D-Druck nicht wiederholt. Spätere Proben aus PVCA zeigten bessere Eignung für die Besiedelung mit Osteoblasten (siehe unten).

Auf PHM-Oberflächen (Abbildung 14 C, D) wiesen die Zellen eine sehr ausgebreitete Morphologie auf und bildeten lange Zellausläufer. Im Vergleich zu den PVCA-Probekörpern waren hier außerdem bei gleicher ausgesäter Zellzahl deutlich mehr Zellen zu finden. Die Osteoblasten waren also in der Lage, auf PHM zu adhären und zu proliferieren.

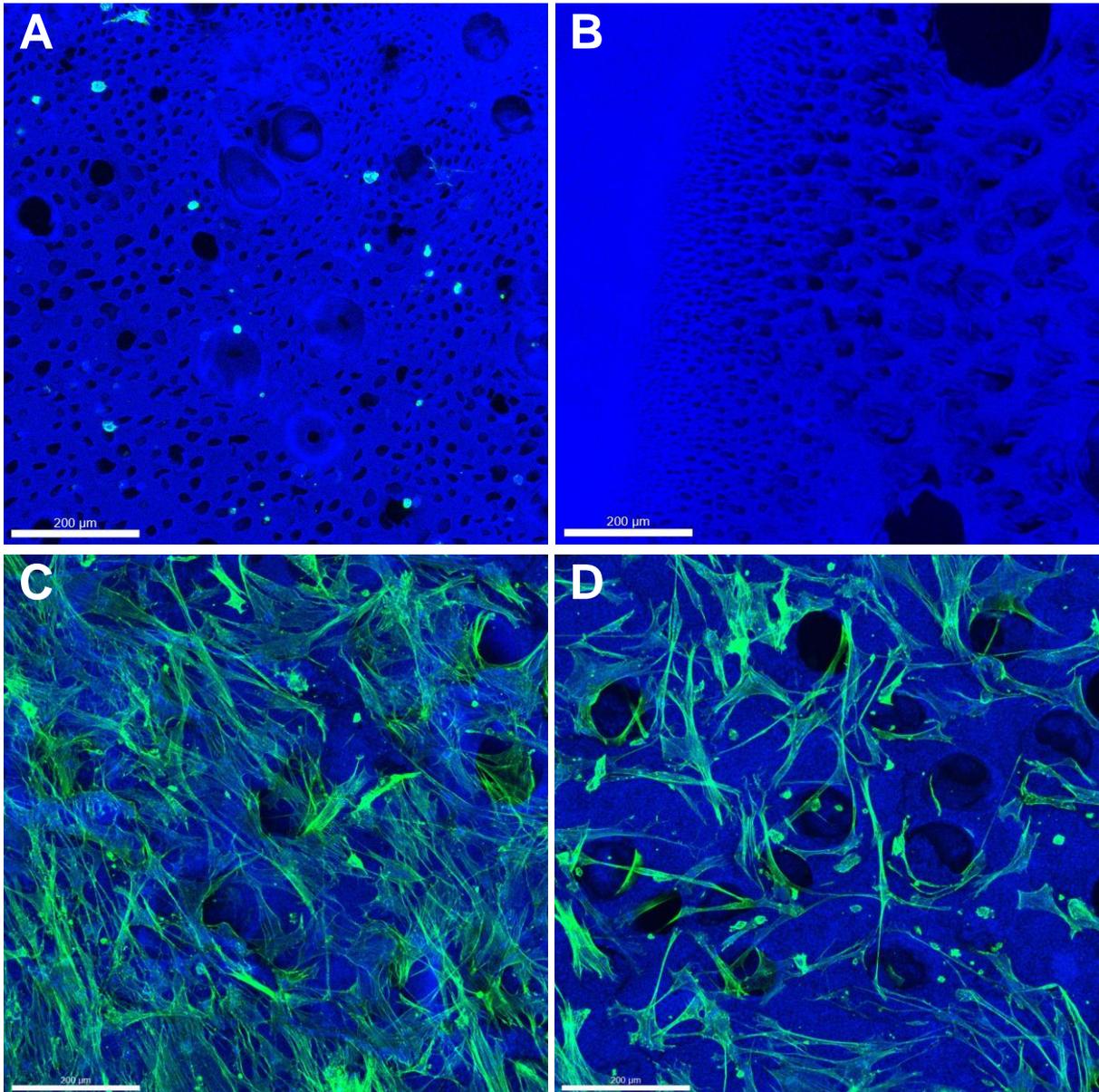


Abbildung 14: Besiedelung von PVCA- (A, B) und PHM-Oberflächen (C, D) mit primären, humanen Osteoblasten, 72 h nach Aussäen; zu erkennen ist auch die starke Porosität der Materialien; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 200 µm

Auch der Effekt von supplementiertem Hydroxylapatit (HA) wurde in der direkten Besiedelung untersucht. Sowohl bei PVCA (Abbildung 15 A, B), als auch bei PHM (Abbildung 15 C, D) lagen die Zellen in der großen Mehrzahl mit stark abgekugelter Zellmorphologie vor. Die Supplementierung von HA führte also angesichts der stark verschlechterten Adhäsion der Zellen auf den Materialoberflächen zu einer deutlichen Verschlechterung der *in vitro*-Biokompatibilität im direkten Besiedelungsversuch.

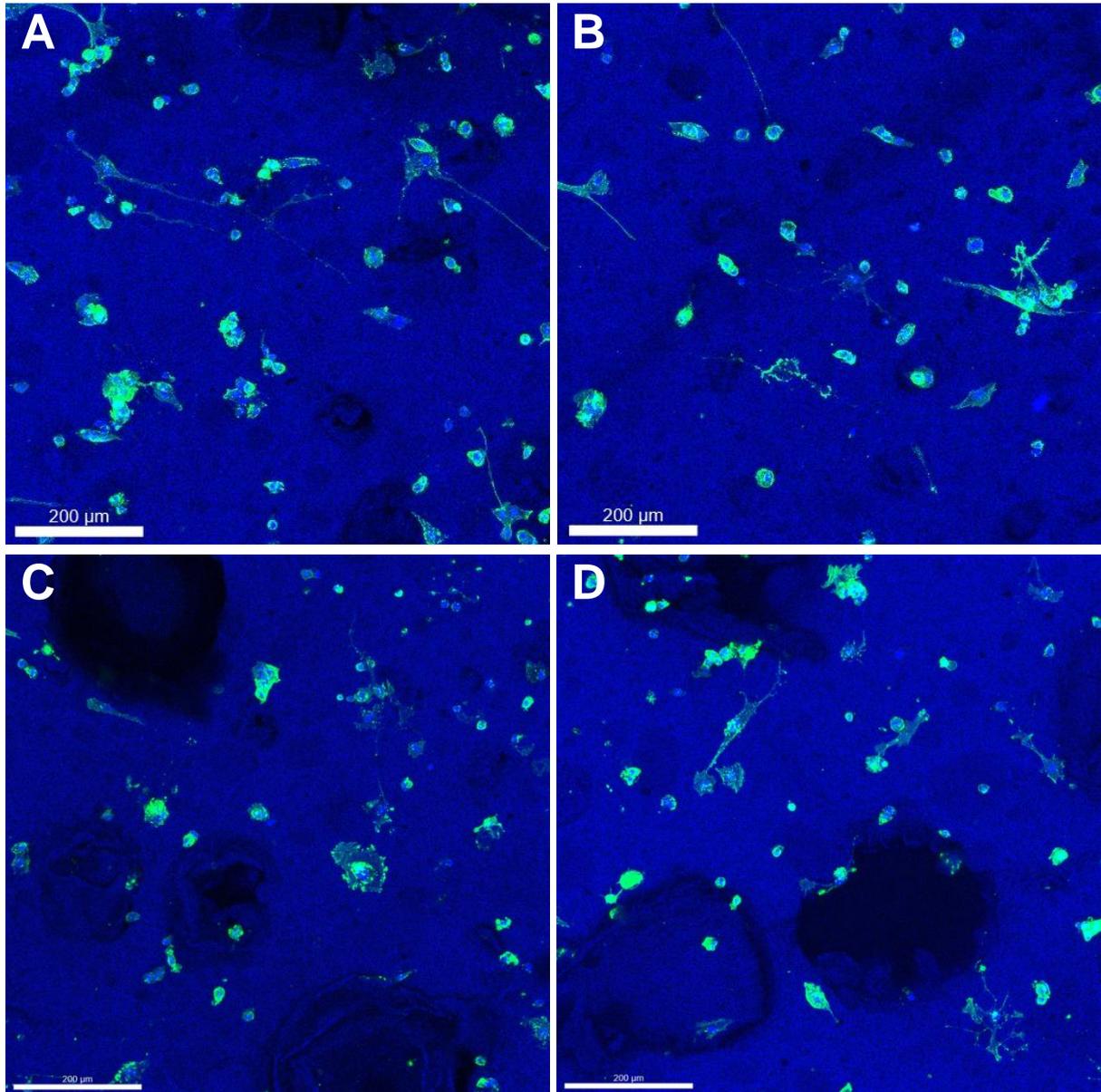


Abbildung 15: Besiedelung von PVCA- (A, B) und PHM-Oberflächen (C, D) mit 56% Hydroxylapatitzusatz mit primären, humanen Osteoblasten, 72 h nach Aussäen; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 200 μm

Im Verlauf des Projekts wurde die Technik des kryo-3D-Drucks zur Verbesserung der räumlichen Auflösung beim Drucken erprobt. Zunächst wurden massive, also nicht makroporös gedruckte Proben besiedelt. Wie Abbildung 16 zeigt, hatte der Wechsel der Druckmethode keinen negativen Einfluss auf die Fähigkeit der Osteoblasten, auf den Materialien zu adhären. Sowohl auf PVCA (Abbildung 16 A, B) als auch auf PHM (Abbildung 16 C, D) weisen die Zellen eine ausgedehnte Morphologie mit langen Zellausläufern auf, was eine gute, permanente Adhäsion der Zellen auf dem Untergrund demonstriert. Dies steht in gewissem Widerspruch zu den Ergebnissen des Besiedelungsversuchs mit herkömmlich 3D-gedrucktem PVCA, bei dem die ausgesäten Osteoblasten keine physiologische Zellmorphologie aufwiesen. Da das Projekt jedoch schnell voranschritt und dadurch keine weiteren PVCA-Proben aus herkömmlichem 3D-Druck verfügbar waren, wurden die Besiedelungseigenschaften dieser Materialvariante zugunsten der weiteren Materialentwicklung nicht weiter untersucht.

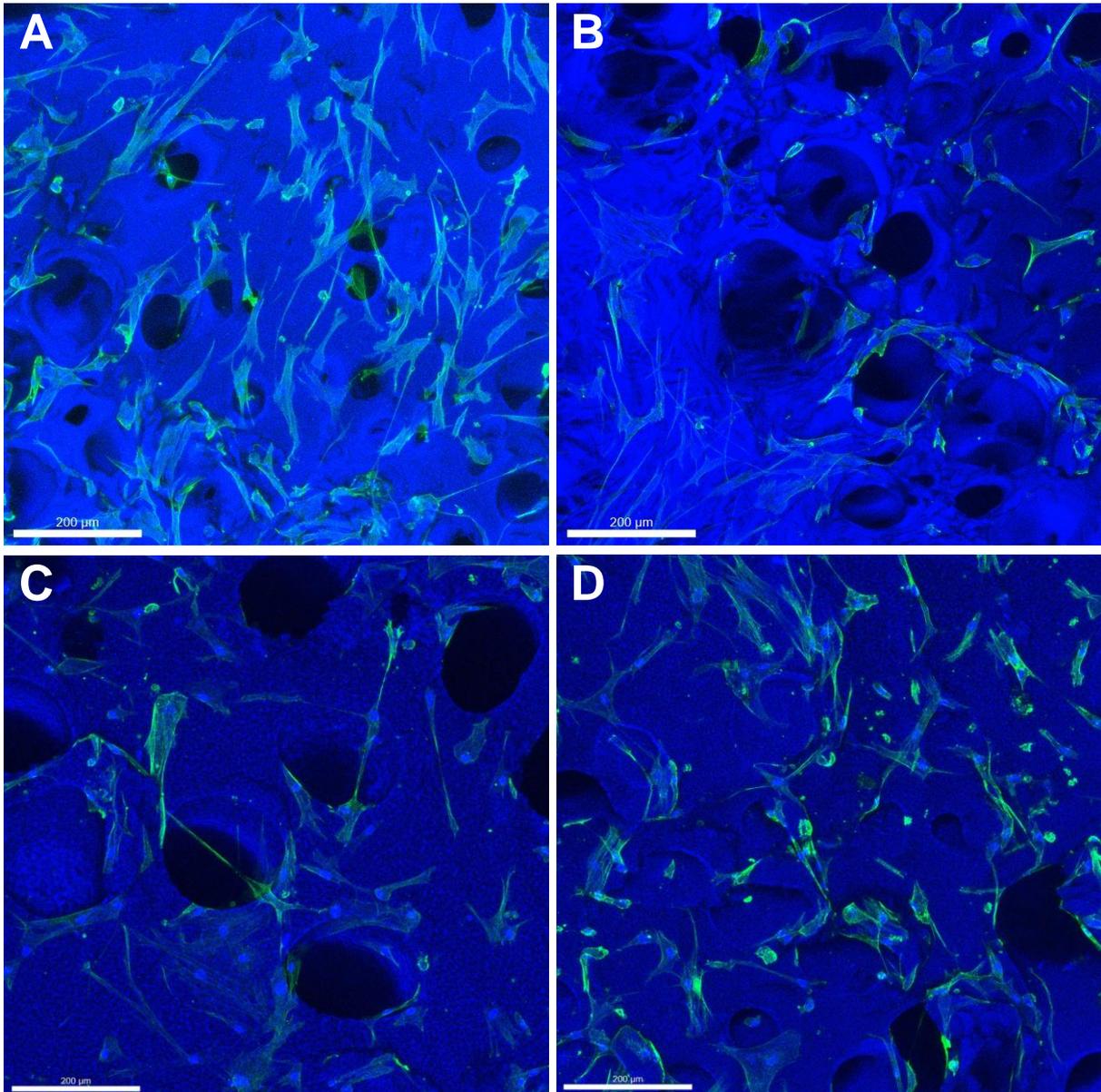


Abbildung 16: Besiedelung von PVCA- (A, B) und PHM-Oberflächen (C, D) nach kryo-Druck mit primären, humanen Osteoblasten, 72 h nach Aussäen; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 200 µm

Neben massiv gedruckten Proben wurden auch solche besiedelt, die beim Druck durch das Ablegen von Materialsträngen mit definiertem Abstand zueinander mit Poren ausgestattet wurden. Diese Zwischenräume („Makroporen“) waren interkonnektierend, also untereinander verbunden. Die nominelle Größe dieser Poren wurde definiert als Abstand der Materialstränge zueinander und kann variiert werden. Durch Ungenauigkeiten im Druckprozess wichen die Poren in ihrer Größe teilweise erheblich von der nominellen Größe ab.

Die Besiedelungsversuche haben gezeigt, dass die Osteoblasten sowohl auf Proben mit nomineller Porengröße von 200 µm (Abbildung 17 A, B), als auch auf solchen mit nomineller Porengröße von 500 µm (Abbildung 17 C, D) gut wachsen konnten. Ein Unterschied in der Zellmorphologie zu massiv gedruckten Proben war nicht zu beobachten. Bei Proben mit der größeren Porengröße waren durch die Zwischenräume der zuoberst liegenden Materialstränge auch Zellen zu erkennen, die auf der Oberfläche der darunterliegenden Stränge adhärten, ein erster Hinweis auf die Besiedelung des Inneren der makroporösen Proben.

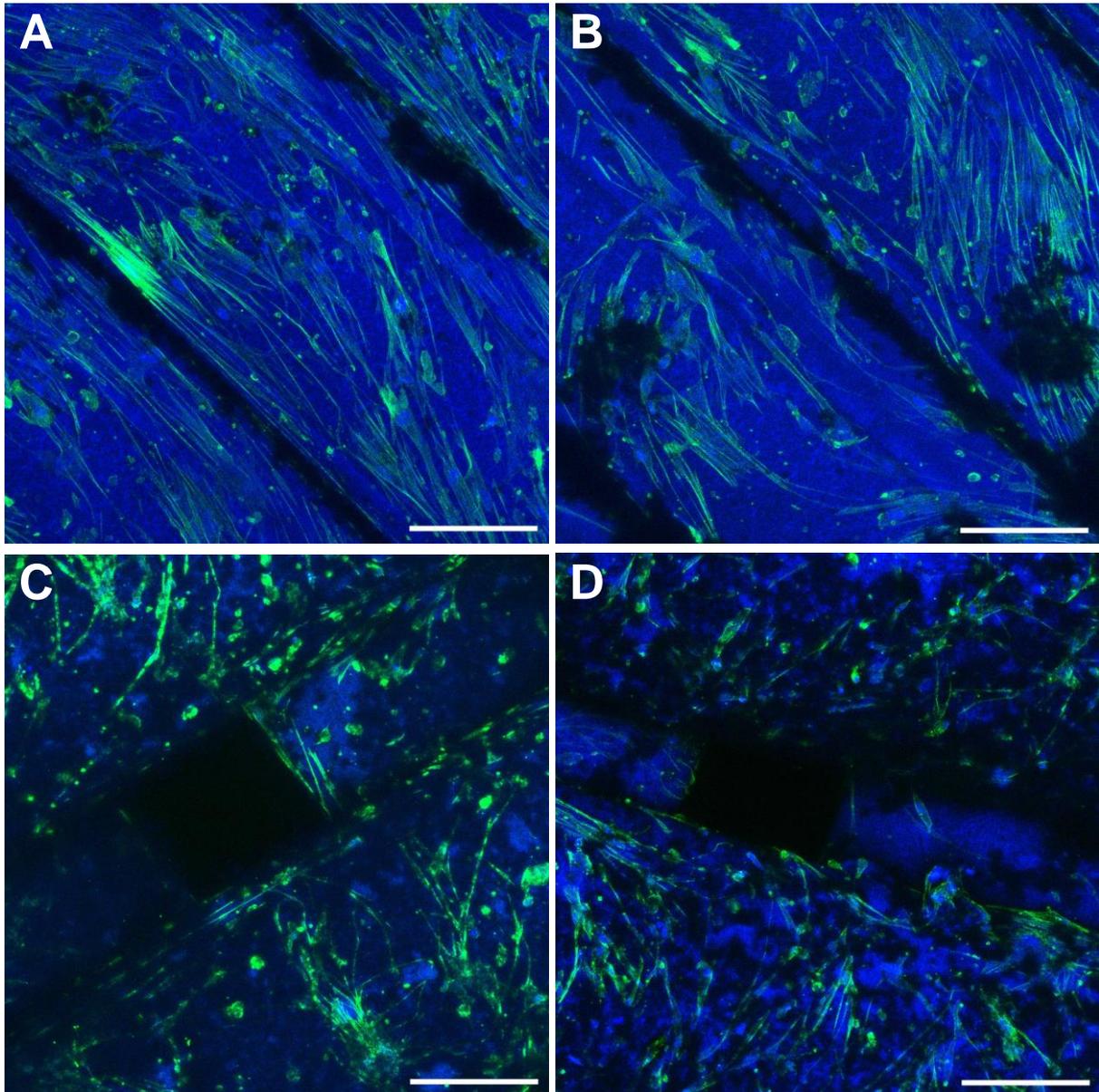


Abbildung 17: Besiedelung von PVCA-Gittern (A, B: 200 µm, C, D: 500 µm nominelle Porengröße) mit primären, humanen Osteoblasten, 2 Wochen nach Aussäen; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 200 µm

Auch PHM-Proben mit Makroporen zeigten eine gute Besiedelbarkeit mit primären Osteoblasten ohne Unterschied zu massiven Proben und ohne erkennbaren Unterschied durch unterschiedlich große Poren (Abbildung 18). Auch hier konnten Zellen in tieferen Schichten der Proben nachgewiesen werden.

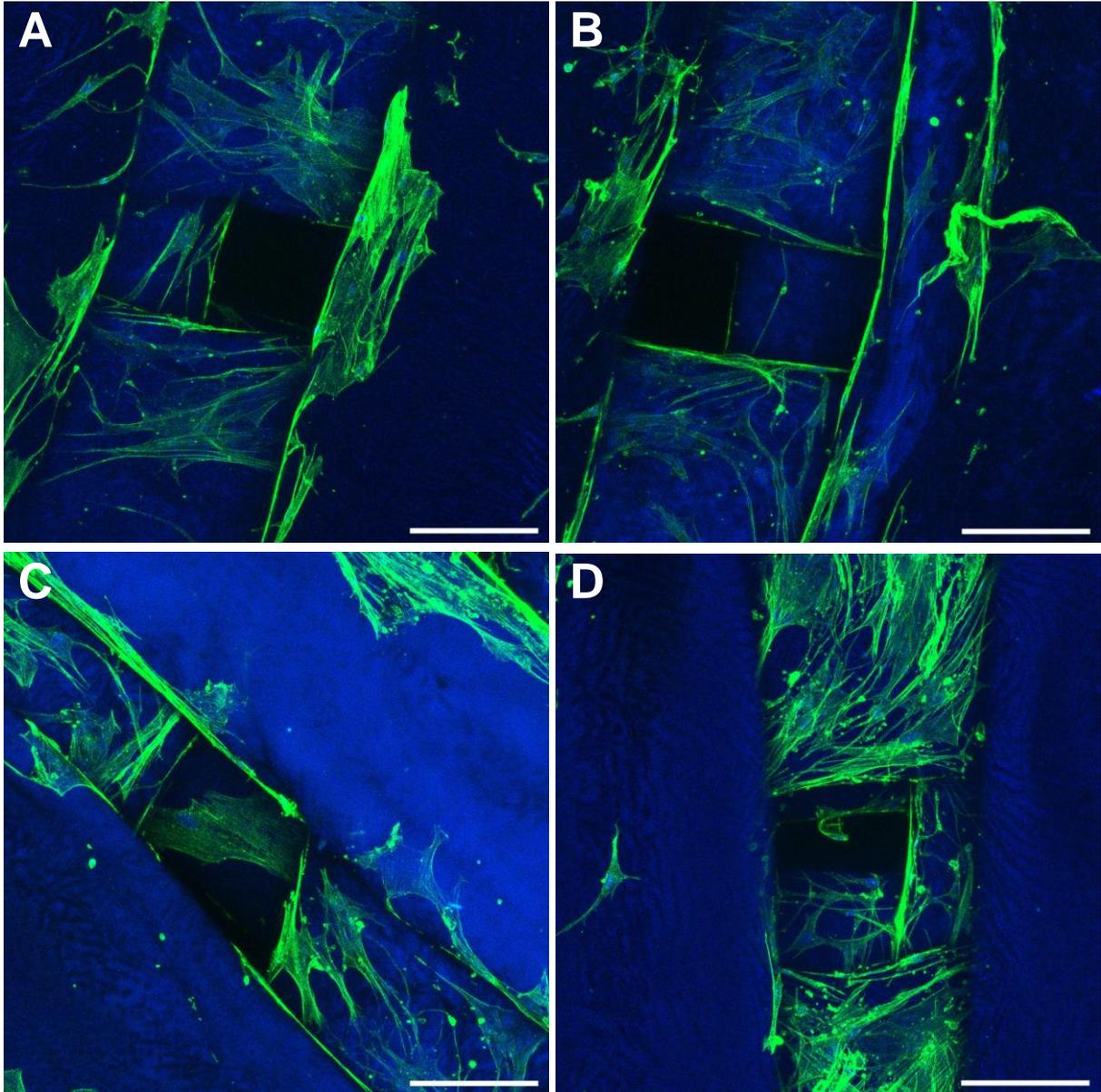


Abbildung 18: Besiedelung von PHM-Gittern (A, B: 200 µm, C, D: 500 µm nominelle Porengröße) mit primären, humanen Osteoblasten, 2 Wochen nach Aussäen; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 200 µm

Wie oben bereits erwähnt, sollte auch in flüssigem Stickstoff zerkleinertes Gelatinevlies auf seine Eignung als Thixotropiemittel für den 3D-Druck erprobt werden. Es wurde daher auch der Effekt dieses Additivs auf die Besiedelungseigenschaften von PVCA und PHM untersucht. Weder für PVCA (Abbildung 19), noch für PHM (Abbildung 20) wurde ein positiver oder negativer Einfluss der Gelatinevliesfragmente auf die Zelladhäsion beobachtet.

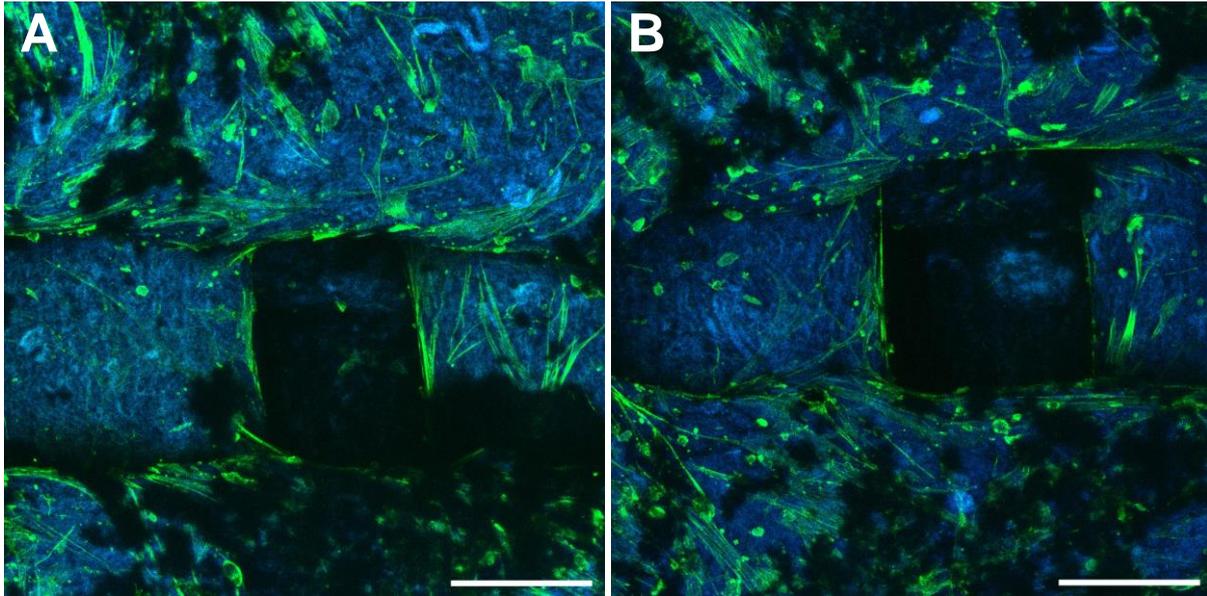


Abbildung 19: Besiedelung von PVCA-Gittern (500 μm nominelle Porengröße) mit 5% Gelatinevlieszusatz mit primären, humanen Osteoblasten, 2 Wochen nach Aussäen; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 μm

In einem einzelnen Versuch wurde auch untersucht, wie primäre Osteoblasten sich in einer Langzeitkultivierung auf beziehungsweise in einem makroporösen PHM-Probekörper verhalten. Sie wurden dafür für 8 Wochen auf den Materialproben kultiviert. Von den Probekörpern wurden danach Gefrierschnitte angefertigt und Osteopontin, ein Protein der extrazellulären Matrix, sowie der Osteoblastenmarker RUNX2 angefärbt (Abbildung 21). Das ebenfalls osteoblastenspezifische Protein Osteopontin, sowie RUNX2 waren über die gesamte Ausdehnung des Schnitts in der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung nachweisbar. Es hatte sich ein Gefüge aus aktiven Osteoblasten und gewebsspezifischer extrazellulärer Matrix gebildet, das nicht nur die inneren Oberflächen des Materials bedeckte, sondern auch die inneren Hohlräume der Probekörper vollständig ausfüllte. Dies legt nahe, dass die Osteoblasten in makroporösen Proben aus PHM ihre Zelltyp-spezifischen Eigenschaften beibehalten haben und ihre physiologische Funktion der für die Knochengeweberegeneration nötigen Produktion extrazellulärer Matrix erfüllen konnten.

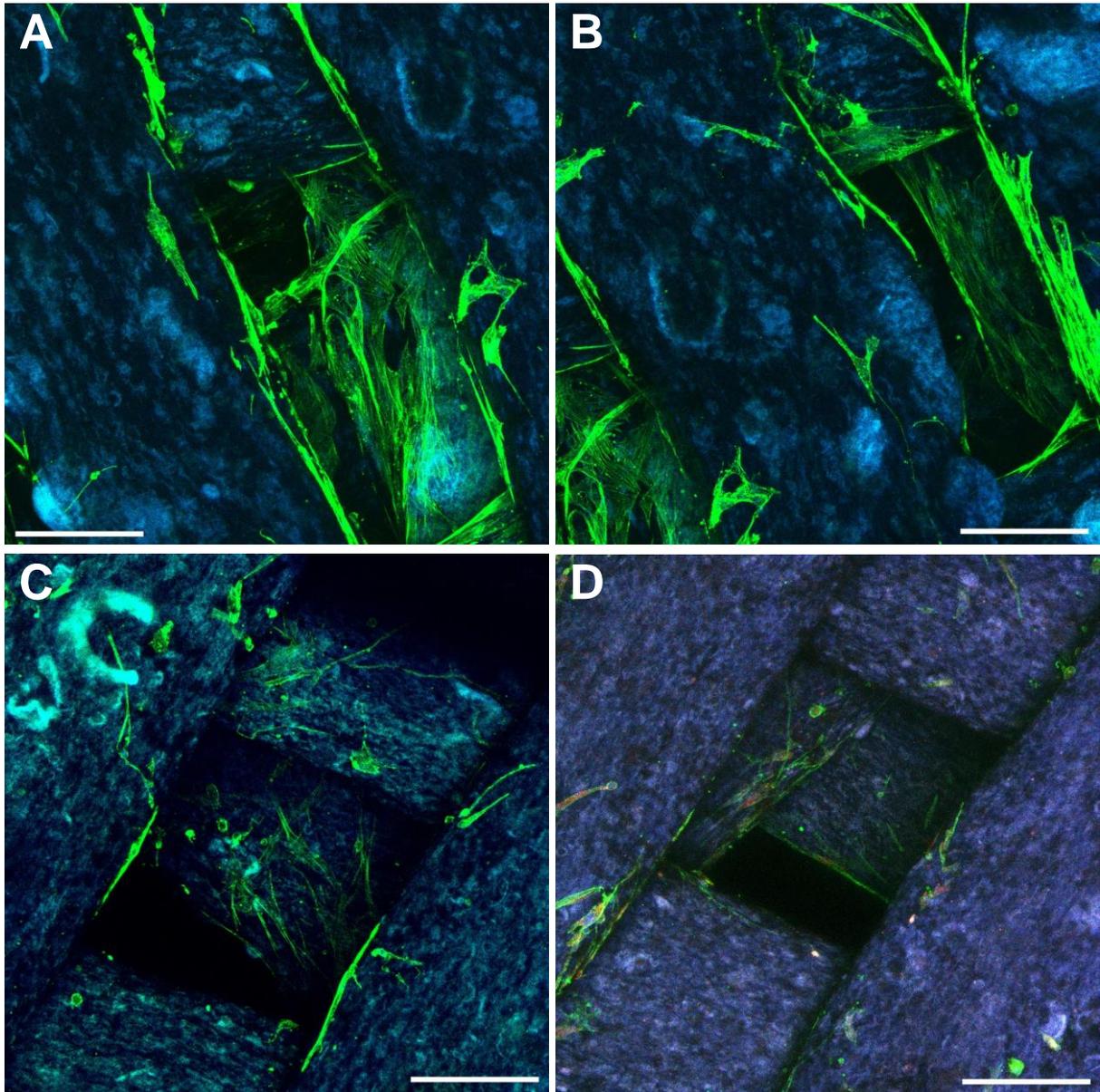


Abbildung 20: Besiedelung von PHM-Gittern (A, B: 200 µm, C, D: 500 µm nominelle Porengröße) mit 5% Gelatinevlieszusatz mit primären, humanen Osteoblasten, 2 Wochen nach Aussäen; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 µm

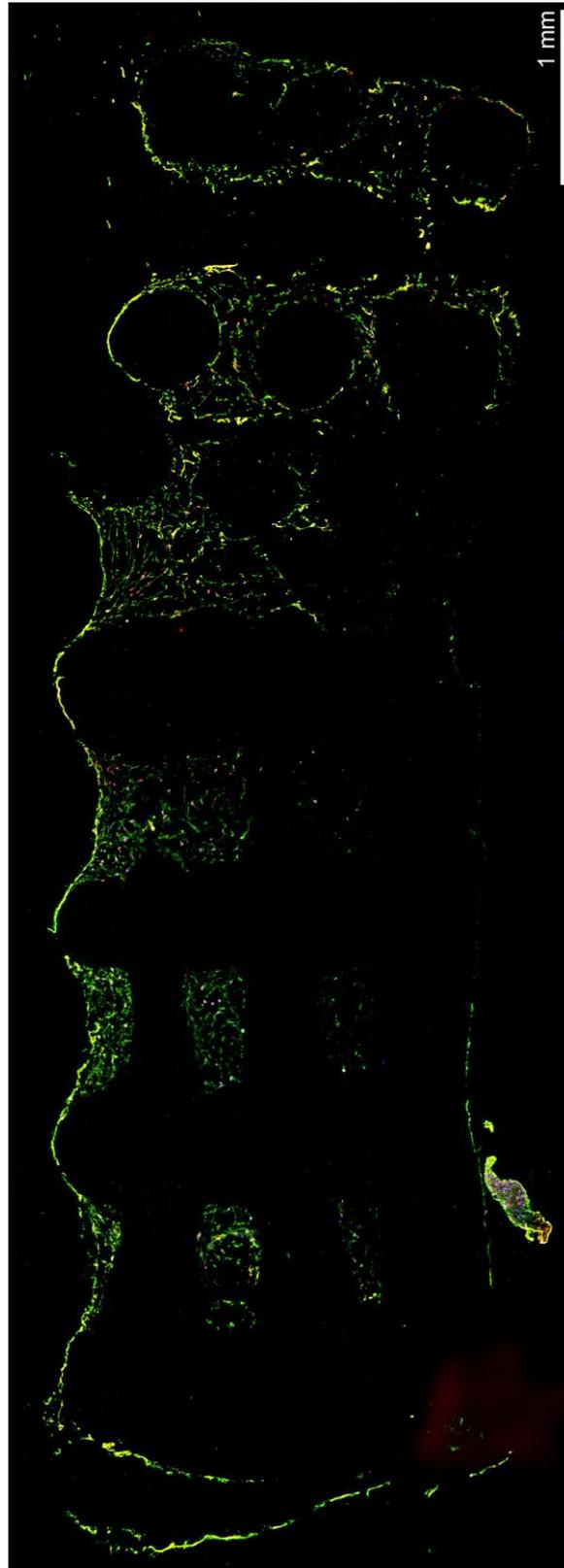


Abbildung 21: Gefrierschnitt eines PHM-Probekörpers nach Langzeitbesiedelung mit primären Osteoblasten (8 Wochen); Immunfluoreszenzfärbung von grün: Osteopontin, rot: RUNX2; aus Einzelbildern zusammengesetztes Panoramabild; zu erkennen ist die Besiedelung aller Hohlräume des Probekörpers zwischen den hier schwarz erscheinenden Materialsträngen; während der Besiedelung nach oben zeigende Probenfläche hier links; Maßstabsbalken: 1 mm

5.1.4. Alginatebasierte Biomaterialien quellen in Zellkulturmedien und Pufferlösungen außer alphaMEM stark auf

Für die Verwendung in Knochenimplantaten sind möglichst gleichbleibende Dimensionen des Materials notwendige Grundvoraussetzung. Es wurde daher hier das Quellverhalten der in Entwicklung befindlichen alginatebasierten Materialien in verschiedenen (Zellkultur-) Medien untersucht. Abbildung 22 zeigt die Vergrößerung der Oberfläche von Proben von Schicht A (zell-inerte Trennschicht), normalisiert auf ihre Ausgangsgröße, während der Inkubation in PBS, HBSS mit Calcium und DMEM. Zu beobachten war die deutliche und schnelle Zunahme der Probengröße innerhalb von 6 h nach Beginn der Inkubation auf knapp das doppelte der Ausgangsgröße. Proben in PBS zerfielen innerhalb der ersten 6 h soweit, dass eine weitere Vermessung nicht mehr möglich war. Proben in HBSS mit Calcium und DMEM nahmen nach 6 h nicht mehr in relevantem Ausmaß an Größe zu. Bei allen Versuchen zur Quellung von Alginategelmateriale standen nur kleine Anzahlen von Probekörpern zur Verfügung. Daher konnte hier keine Wiederholung von Versuchen oder eine statistische Analyse stattfinden. Die gefundenen Trends entsprachen sich zwischen den verschiedenen Versuchen jedoch soweit, dass eine Auswertung der Ergebnisse trotzdem sinnvoll erscheint.

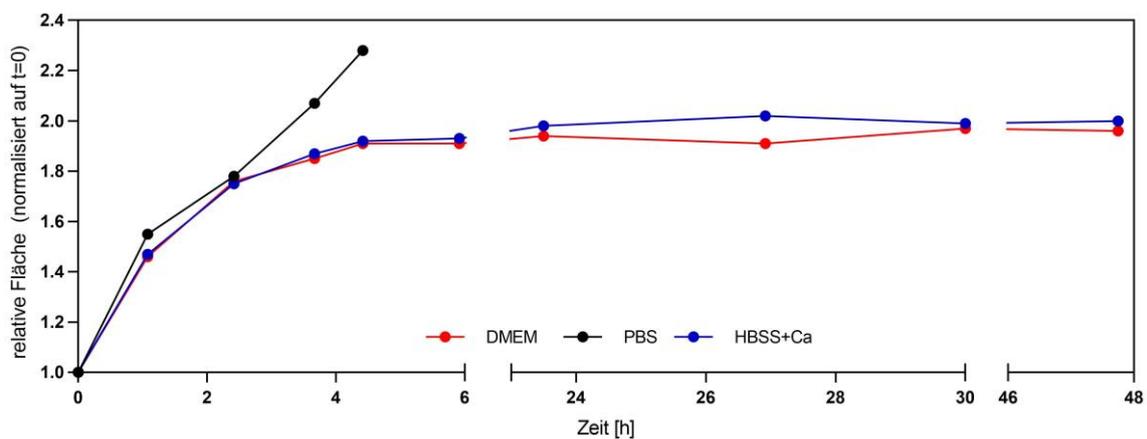


Abbildung 22: Veränderung der Oberfläche von Proben von Schicht A während der Inkubation in verschiedenen Medien; rot: DMEM, schwarz: PBS, blau: HBSS mit Calcium (1,26 mM)

Proben der Schicht B nahmen ebenfalls in den ersten 6 h nach Start der Inkubation in PBS, HBSS mit Calcium und DMEM deutlich an Größe zu (Abbildung 23). Hier waren es in HBSS mit Calcium und DMEM ca. 40% Vergrößerung. In PBS wuchs die Probenoberfläche um ca. 80% in den ersten 24 h nach Inkubationsbeginn.

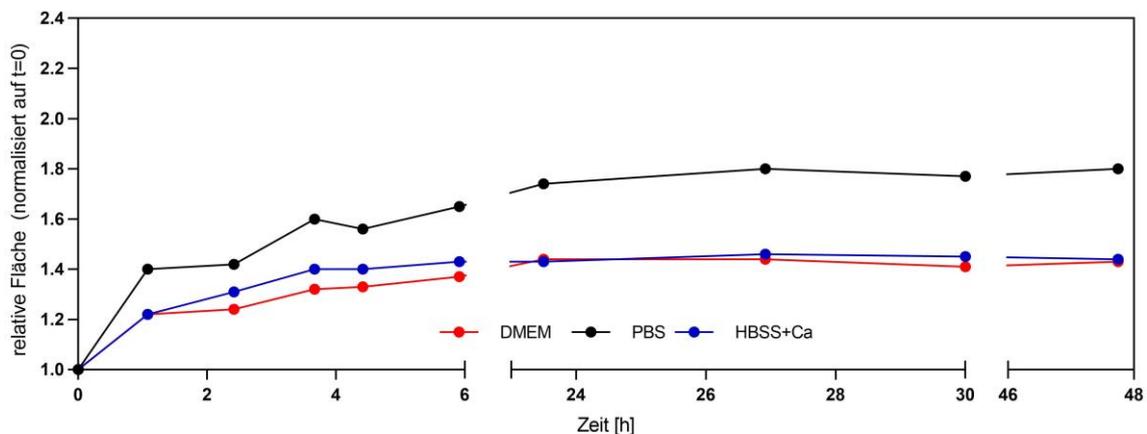


Abbildung 23: Veränderung der Oberfläche von Proben von Schicht B während der Inkubation in verschiedenen Medien; rot: DMEM, schwarz: PBS, blau: HBSS mit Calcium (1,26 mM)

Um auszuschließen, dass einzelne Bestandteile von DMEM für die Quellung verantwortlich sind, wurden Varianten des Mediums hergestellt, denen keiner oder jeweils nur einer der Mediumzusätze FCS, Kanamycin und Glutamax zugefügt wurden. Im Vergleich zu den ebenfalls wieder getesteten DMEM mit allen Zusätzen und HBSS mit Calcium ergab sich bis ca. 48 h nach Versuchsbeginn kein relevanter Unterschied (Abbildung 24).

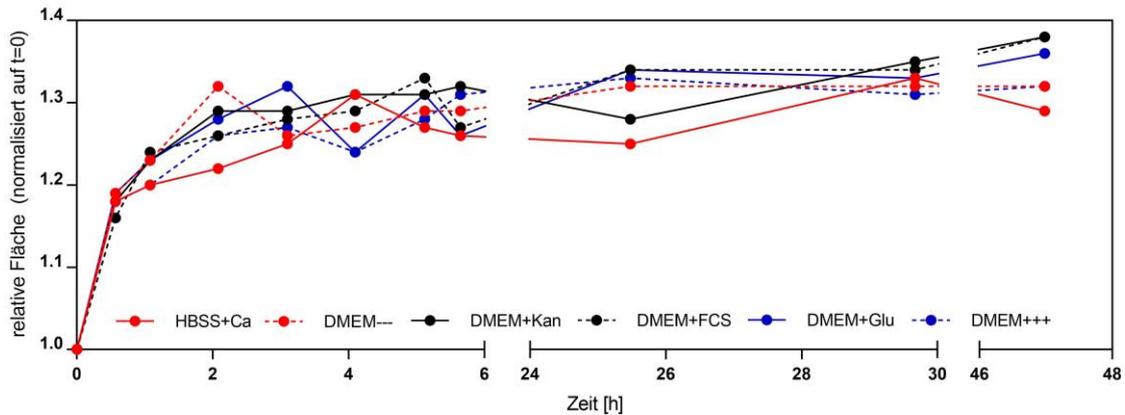


Abbildung 24: Veränderung der Oberfläche von Proben von Schicht B während der Inkubation in verschiedenen Medien; rot, durchgehende Linie: HBSS mit Calcium (1,26 mM), rot, gestrichelte Linie: DMEM ohne Zusätze, schwarz, durchgehende Linie: DMEM mit Kanamycin, schwarz, gestrichelte Linie: DMEM mit FCS, blau, durchgehende Linie: DMEM mit Glutamax, blau, gestrichelte Linie: DMEM mit Kanamycin, FCS, Glutamax (vollständiges Medium)

Nach einem Hinweis aus der Kooperationsarbeitsgruppe an der Universität Erlangen wurde auch für alphaMEM der Einfluss auf das Quellverhalten untersucht. Dort waren Besiedelungsversuche dieser Probekörper in alphaMEM durchgeführt und dabei keine übermäßige Quellung beobachtet worden. Für die hier durchgeführten Versuche kam alphaMEM mit Glutamax, sowie alphaMEM mit Glutamax und FCS beziehungsweise mit Glutamax und Penicillin/Streptomycin zum Einsatz. In all diesen Medienvarianten konnte innerhalb von 24 h keine Quellung der Proben mehr beobachtet werden (Abbildung 25).

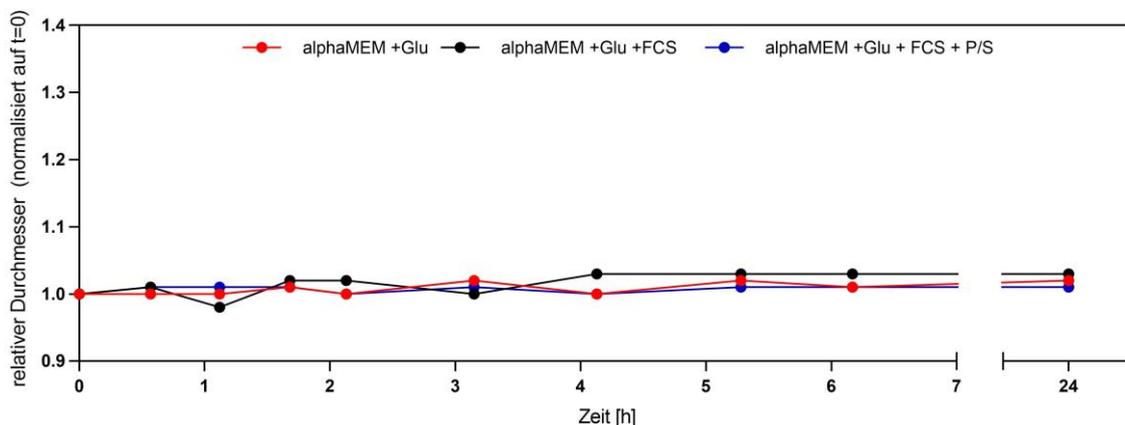


Abbildung 25: Veränderung des Durchmessers von Proben von Schicht B während der Inkubation in verschiedenen Varianten von alphaMEM; rot: alphaMEM mit Glutamax, schwarz: alphaMEM mit Glutamax, FCS, blau: alphaMEM mit Glutamax, FCS, Penicillin/Streptomycin

5.1.5. Alginatebasierte Biomaterialien ermöglichen Besiedelung durch primäre, humane Osteoblasten nur nach Supplementierung mit Gelatine

Anders als die Materialvarianten auf Basis von PVCA und PHM wurden die Materialien auf Alginategelbasis nicht mithilfe von Eluaten, sondern ausschließlich in Direktbesiedelungsversuchen auf ihre *in vitro*-Biokompatibilität hin untersucht. Die grundlegende Vorgehensweise war dabei in der Regel gleich: Primäre, humane Osteoblasten als Zellen des Zielgewebes der angestrebten klinischen

Anwendung der Materialien wurden auf Materialproben ausgesät und nach Inkubation und Fluoreszenzfärbung mittels konfokaler Laserscanmikroskopie dokumentiert.

Zunächst wurden Proben aus nicht supplementiertem Alginatgel (Schicht A) untersucht. Da Alginat für humane Zellen bekanntermaßen inert ist, wurde hier keine Zelladhäsion und Besiedelung der Proben erwartet. Dieses bestätigte sich bei lichtmikroskopischer Beobachtung von besiedelten Proben, daher wurde auf eine weitere Analyse mittels Fluoreszenzfärbung verzichtet (Daten nicht gezeigt).

Ausführlicher untersucht wurden Proben aus Alginatgel mit Supplementierung von Hydroxylapatit (Schicht B, osteokonduktive Schicht). Zunächst wurden massiv gedruckte Probekörper aus Alginatgel mit Hydroxylapatit ohne weitere Supplemente untersucht. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung zeigte, dass zwar Zellen auf den Probenoberflächen vorhanden waren, diese aber nicht die physiologische, ausgestreckte Zellmorphologie mit langen Zellausläufern aufwiesen (Abbildung 26). Vielmehr zeigten die Zellen eine kugelförmige Morphologie oder bildeten Zellaggregate. Klare Zeichen dafür, dass Zellen auf der gesamten Oberfläche des Materials adhären konnten, waren nicht zu erkennen. Einige Zellen hatten allerdings offenbar direktem Kontakt zu Hydroxylapatitpartikeln im Material. Die Vermutung lag nahe, dass die Zellen an diesen Partikeln, sofern sie an der Oberfläche der Proben zugänglich waren, mindestens eingeschränkt adhären konnten.

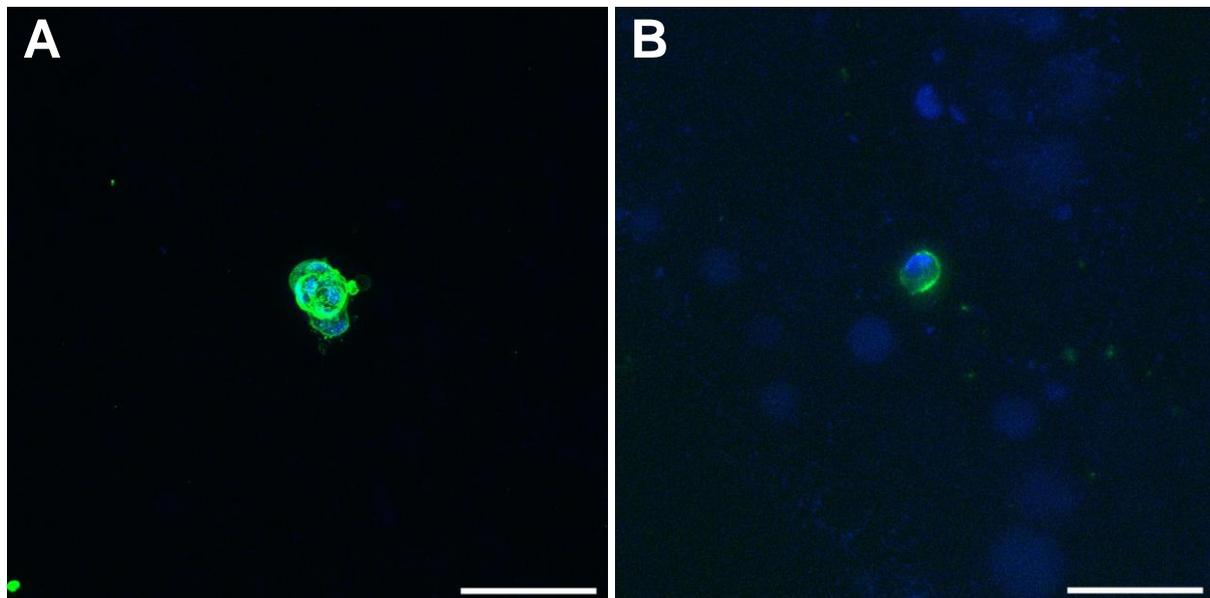


Abbildung 26: Besiedelung von Alginatgelen mit 14% Hydroxylapatit (grob) mit primären, humanen Osteoblasten, 48 h nach Aussäen, A: massiv gedruckt, B: porös gedruckt; blau: DNA, Eigenfluoreszenz des Hydroxylapatits, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 μ m

Um zu eruieren, ob die Adhäsion an Hydroxylapatit zur vollständigen Besiedelung der Materialien ausreichen könnte, wurden anschließend Materialproben untersucht, die mit Hydroxylapatit mit kleinerer Partikelgröße hergestellt worden waren. Hier wurden massiv und makroporös gedruckte Proben untersucht, die die vorher verwendete oder eine höhere Konzentration (21%) von Hydroxylapatit enthielten. Auch hier waren jedoch ausschließlich Zellen zu finden, die nicht die physiologische, ausgestreckte Zellmorphologie aufwiesen (Abbildung 27). Die Adhäsion der Osteoblasten an kleineren Hydroxylapatitpartikeln schien nicht stärker zu sein als an solche mit größerem Durchmesser.

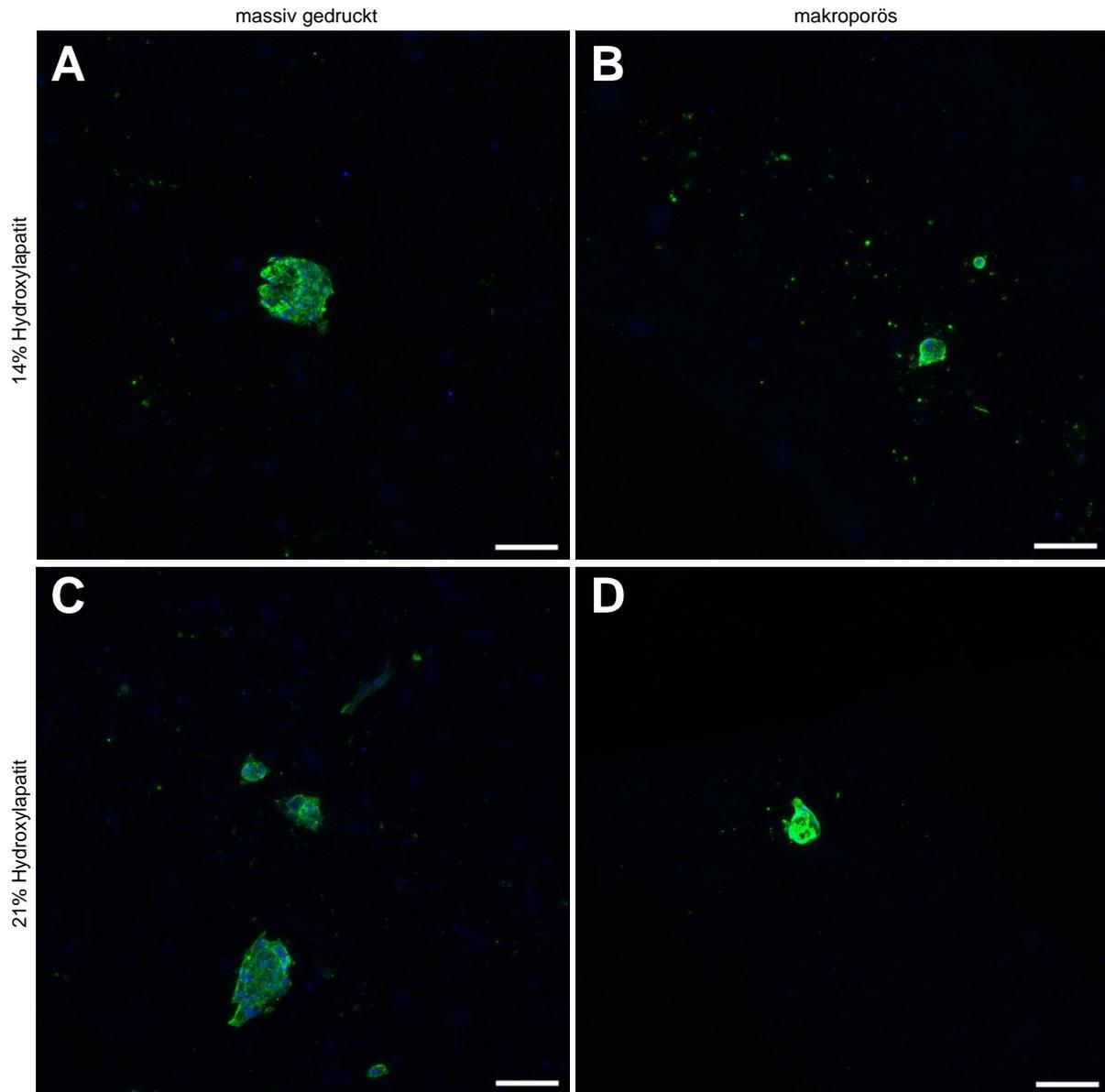


Abbildung 27: Besiedelung von Alginategelen mit feinem Hydroxylapatit mit primären, humanen Osteoblasten, 72 h nach Aussäen, A, C: massiv gedruckt, B, D: Gitter; A, B: 14% Hydroxylapatitgehalt, C,D: 21% Hydroxylapatitgehalt; blau: DNA, Eigenfluoreszenz des Hydroxylapatits, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 μm

Erst die Zugabe von Gelatine zum Alginategel („blend“) führte zu Materialproben, die von primären Osteoblasten großflächig besiedelt werden konnten (Abbildung 28). Schon eine Zugabe von 0,5% Gelatine (Typ B), reichte aus, um die Zellen in die Lage zu versetzen, die Oberflächen der Proben dicht zu besiedeln (Abbildung 28 A). Eine Erhöhung des Gelatinegehalts auf 1% brachte keine signifikante Veränderung mit sich (Abbildung 28 C). Allerdings blieben einige Bereiche der Proben noch unbesiedelt (Abbildung 28 B, D). Die Ursachen blieben unklar, es ist jedoch denkbar, dass inhomogene Materialeigenschaften, wie etwa eine ungleichmäßige Verteilung des Gelatineanteils dafür verantwortlich waren (siehe Kapitel 6.1.2.2). Später untersuchte Proben gleicher Materialzusammensetzung wurden vollständig besiedelt (siehe unten).

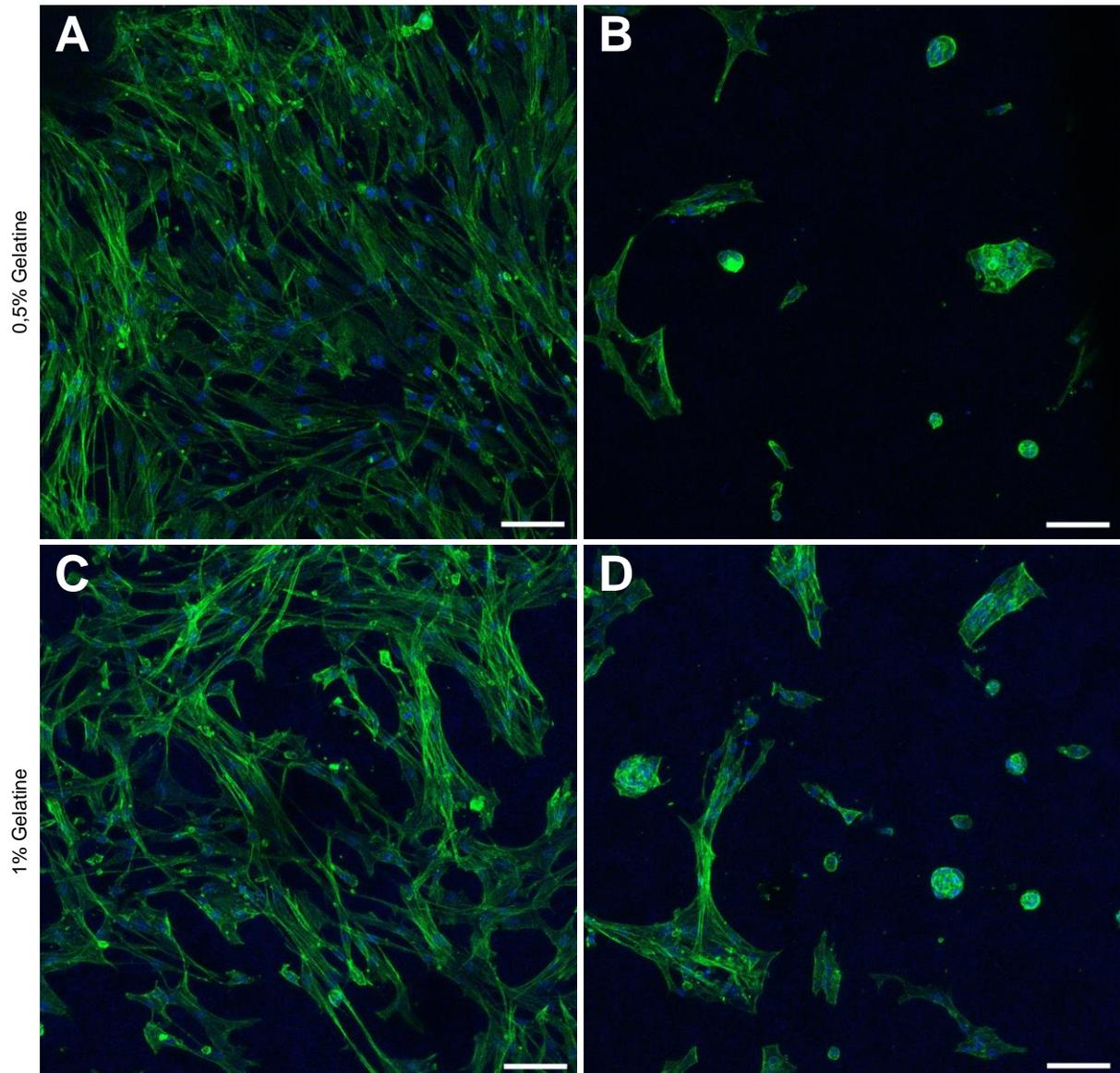


Abbildung 28: Besiedelung von Hydrogelen aus Alginat-Gelatine-Blend (Typ B) mit Hydroxylapatit (fein) mit primären, humanen Osteoblasten, 48 h nach Aussäen, A, B: 0,5% Gelatinegehalt, C, D: 1% Gelatinegehalt; blau: DNA, Eigenfluoreszenz des Hydroxylapatits, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 μm

Ein Wechsel von Gelatine Typ B zu Typ A brachte keine Veränderungen im Besiedelungsverhalten der Zellen mit sich. Auch hier wurden Probenoberflächen aus Material mit 0,5 bis 1,5% Gelatine großflächig von primären Osteoblasten besiedelt (Abbildung 29). Ein Unterschied im Besiedelungsergebnis zwischen Proben mit unterschiedlichen Gelatinegehalten war nicht erkennbar.

Die Zugabe von Gelatine hat sich bei der Herstellung von Alginatgelmaterialien damit allerdings als notwendig und sehr effektiv erwiesen, ihre *in vitro*-Biokompatibilität im Sinne ihrer Eignung für die Besiedelung durch Osteoblasten zu erreichen.

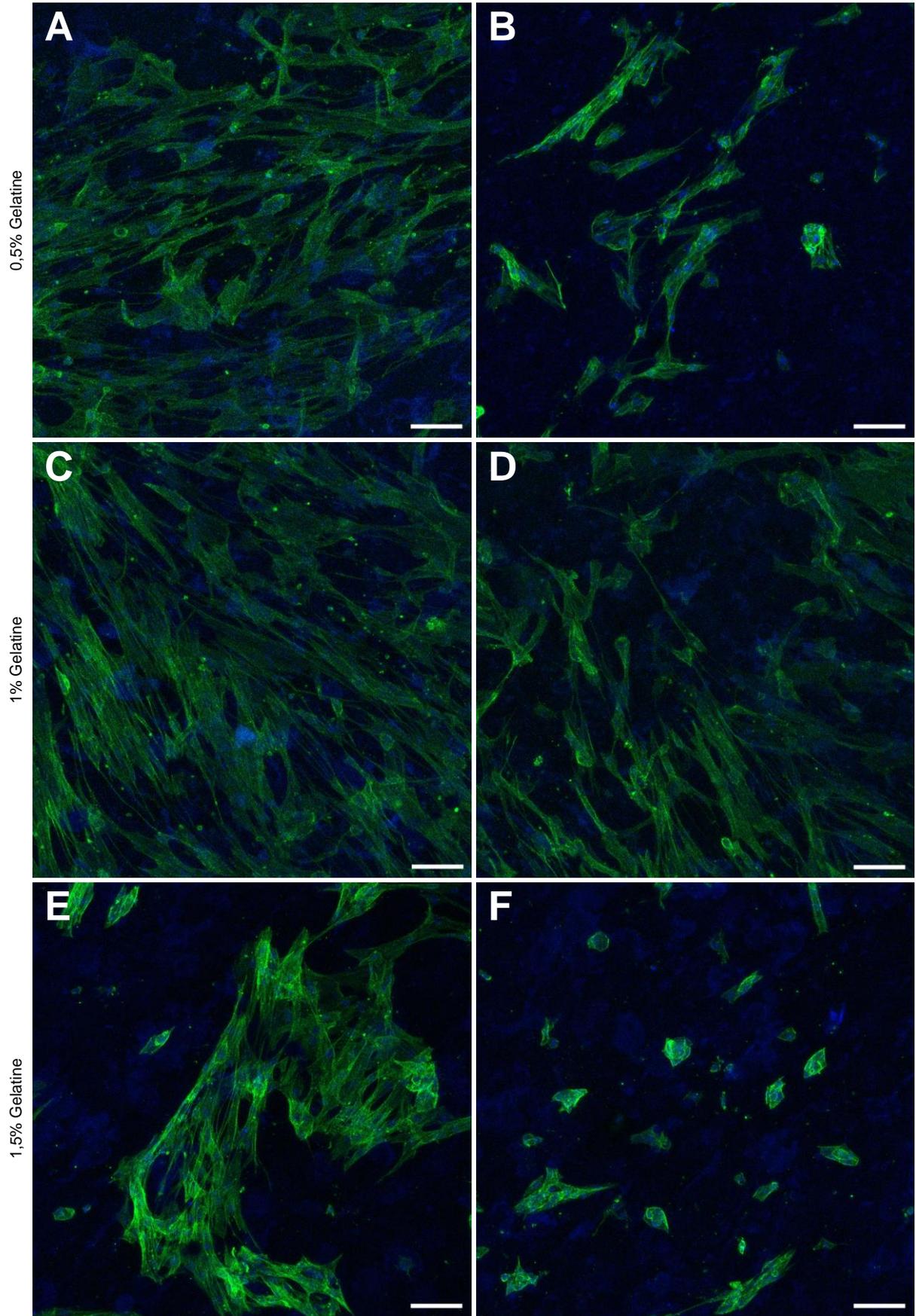


Abbildung 29: Besiedelung von Hydrogelen aus Alginat-Gelatine-blend (Typ A) mit Hydroxylapatit (fein) mit primären, humanen Osteoblasten, 7 Tage nach Aussäen; A, B: 0,5% Gelatinegehalt, C, D: 1% Gelatinegehalt, E, F: 1,5% Gelatinegehalt; blau: DNA, Eigenfluoreszenz des Hydroxylapatits, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 µm

Ausgehend von diesem positiven Ergebnis wurden dann auch makroporös gedruckte Probekörper hergestellt und besiedelt. Auch hier war nach einer Inkubation eine gute Besiedelung der Oberflächen der Materialstränge fluoreszenzmikroskopisch zu erkennen (Abbildung 30). Je nach Belichtungsbedingungen waren dabei auch die Materialstränge selbst aufgrund der Autofluoreszenz des Hydroxylapatits sichtbar (Abbildung 30 A). Hydroxylapatit fluoresziert offenbar selbst (daher Autofluoreszenz) und ist mit Licht der gleichen Wellenlänge wie DAPI anregbar. Soweit im Mikroskop sichtbar, waren Oberflächen in allen Tiefenebenen der Proben besiedelt, die Zellen konnten also auch in tieferen Ebenen der Proben adhäreren und durch Diffusion des Mediums mit Nährstoffen versorgt werden.

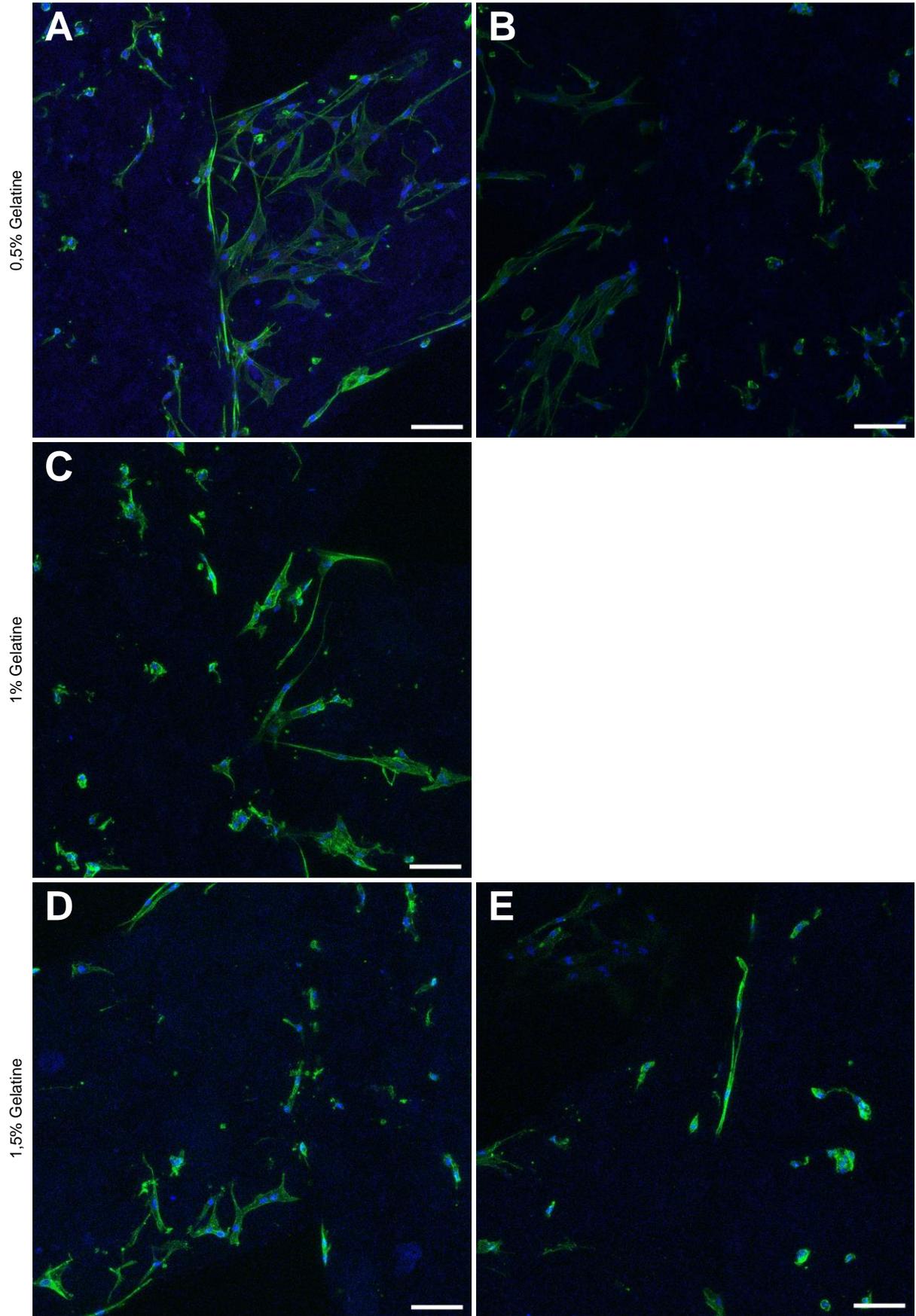


Abbildung 30: Besiedelung von makroporös gedruckten Hydrogelen aus Alginat-Gelatine-blend (Typ A) mit Hydroxylapatit (fein) mit primären, humanen Osteoblasten, 2 Tage nach Aussäen; A, B: 0,5% Gelatinegehalt, C: 1% Gelatinegehalt, D, E: 1,5% Gelatinegehalt; blau: DNA, Eigenfluoreszenz des Hydroxylapatits, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 µm

5.1.6. Octenidin- und UV-C-Behandlung von alginatbasierten Biomaterialien ist ungeeignet zur Sterilisierung

Um die *in vitro*-Biokompatibilität der Materialien auch im Sinne der Bildung von extrazellulärer Matrix durch darauf kultivierte Zellen und deren Differenzierung untersuchen zu können, waren Langzeitbesiedelungsversuche nötig, die wiederum die Sterilität der Materialproben voraussetzen. Erste Versuche mit den unter keimarmen, aber nicht sterilen Bedingungen hergestellten Probekörpern zeigten, dass Inkubationszeiten von mehr als einer Woche nicht kontaminationsfrei möglich waren. Es bildete sich ein trüber Niederschlag im Medium, der wohl aus Bakterienzellen und aus Bruchstücken der Materialproben bestand, die sich vermutlich aufgrund der enzymatischen Aktivität der kontaminierenden Bakterien schnell zersetzten (Daten nicht gezeigt).

In einem ersten Ansatz zur Verbesserung der Sterilität der Probekörper wurden diese daher mit dem wenig aggressiven und für den klinischen Einsatz zugelassenen Desinfektionsmittel Octenidin behandelt und anschließend mit primären Osteoblasten besiedelt. Anders als bei unbehandelten Proben hatten diese Zellen anschließend eine abgekugelte Zellmorphologie und adhärten nicht auf den Materialien, waren also offenbar abgestorben (Daten nicht gezeigt). Vermutlich verantwortlich waren dafür Rückstände des Octenidins in dem sehr porösen Material, die offenbar auch durch mehrfaches Waschen der Probekörper nicht beseitigt werden konnten.

Eine Bestrahlung der Proben von zwei Seiten mit UV-C (500 mJ/cm², Wellenlänge 255 nm) in einem weiteren Ansatz zur Sterilisierung der Probekörper führte im Besiedelungsversuch nicht zu offensichtlichen negativen Effekten auf die Zellen: auch UV-C-bestrahlte Proben wurden zunächst großflächig von den Osteoblasten besiedelt (Abbildung 31).

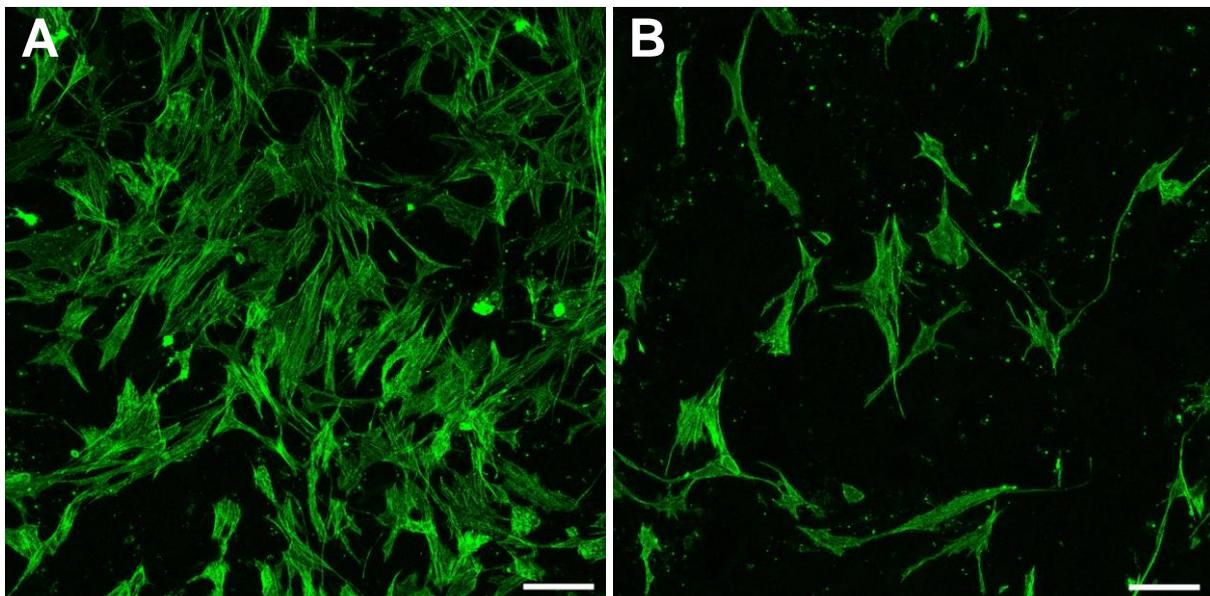


Abbildung 31: Besiedelung von UV-sterilisierten (500 mJ/cm²) Hydrogelen aus Alginat-Gelatine-blend (Typ A) mit Hydroxylapatit (fein) mit primären, humanen Osteoblasten, 7 Tage nach Aussäen; grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 µm

Die Langlebigkeit der Proben in Bezug auf eine mögliche Bakterien-induzierten Degradation und Mediumtrübung war im Vergleich zu unbehandelten Proben leicht verbessert, nach ca. 1,5 Wochen war aber auch hier eine beginnende Verschlechterung des Probenzustands zu erkennen. Nach 3 Wochen hatte die mechanische Stabilität der Proben soweit abgenommen, dass sie beim Umgang mit den Probekörpern während der Routine-Zellkulturarbeiten Zerfallserscheinungen aufwiesen (Abbildung 35). Die mechanische Stabilität der Proben hatte also deutlich abgenommen.

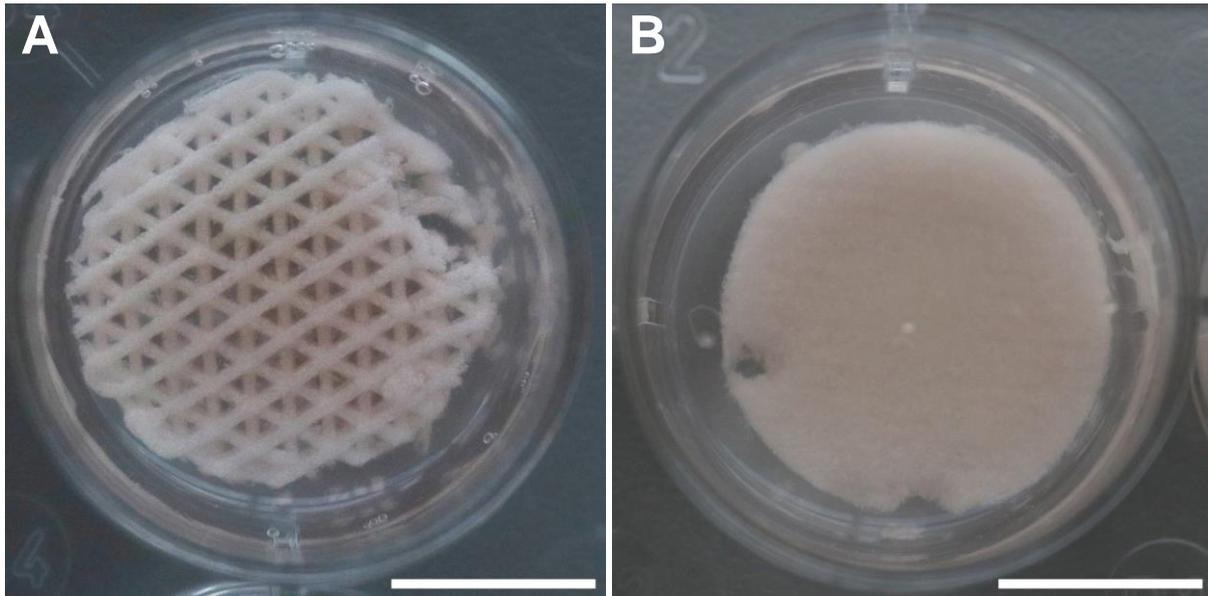


Abbildung 32: Zersetzungsercheinungen von UV-C-bestrahlten (250 mJ/cm²) und mit primären Osteoblasten besiedelten Proben von makroporös (A) und massiv (B) gedrucktem Alginatgel mit Hydroxylapatit (fein) und Gelatine (Schicht B) nach 3 Wochen Inkubation; Maßstabsbalken: 10 mm

Die Proben wurden eingefroren und Gefrierschnitte angefertigt. Anschließend wurden Osteopontin, Osteocalcin und RUNX2 immunzytochemisch angefärbt. Es konnte keine spezifische Färbung für diese Markerproteine für Osteoblasten-Extrazellulärmatrix und Osteoblastendifferenzierung gefunden werden (Abbildung 33, Abbildung 34). Lediglich einige Oberflächen innerhalb der Probe zeigten eine schwache DAPI-Fluoreszenz, was auf Zellfragmente hinweist, die noch DNA enthielten. Offenbar waren die Proben zunächst von Zellen besiedelt worden. Die schwache DAPI-Fluoreszenz und der fehlende Nachweis spezifischer Osteoblastenmarker legt jedoch nahe, dass die Zellen im Laufe der Inkubation, und möglicherweise durch den negativen Einfluss einer verbliebenen bakteriellen Kontamination der Proben, in Apoptose gegangen sind.

Durch die langen Belichtungszeiten, die nötig waren, um die schwache vorhandene Fluoreszenz zu dokumentieren, werden die Hydroxylapatitpartikel im Material aufgrund ihrer Autofluoreszenz in den Aufnahmen abgebildet. Gut zu erkennen ist dadurch die makroporöse Struktur der Probekörper.

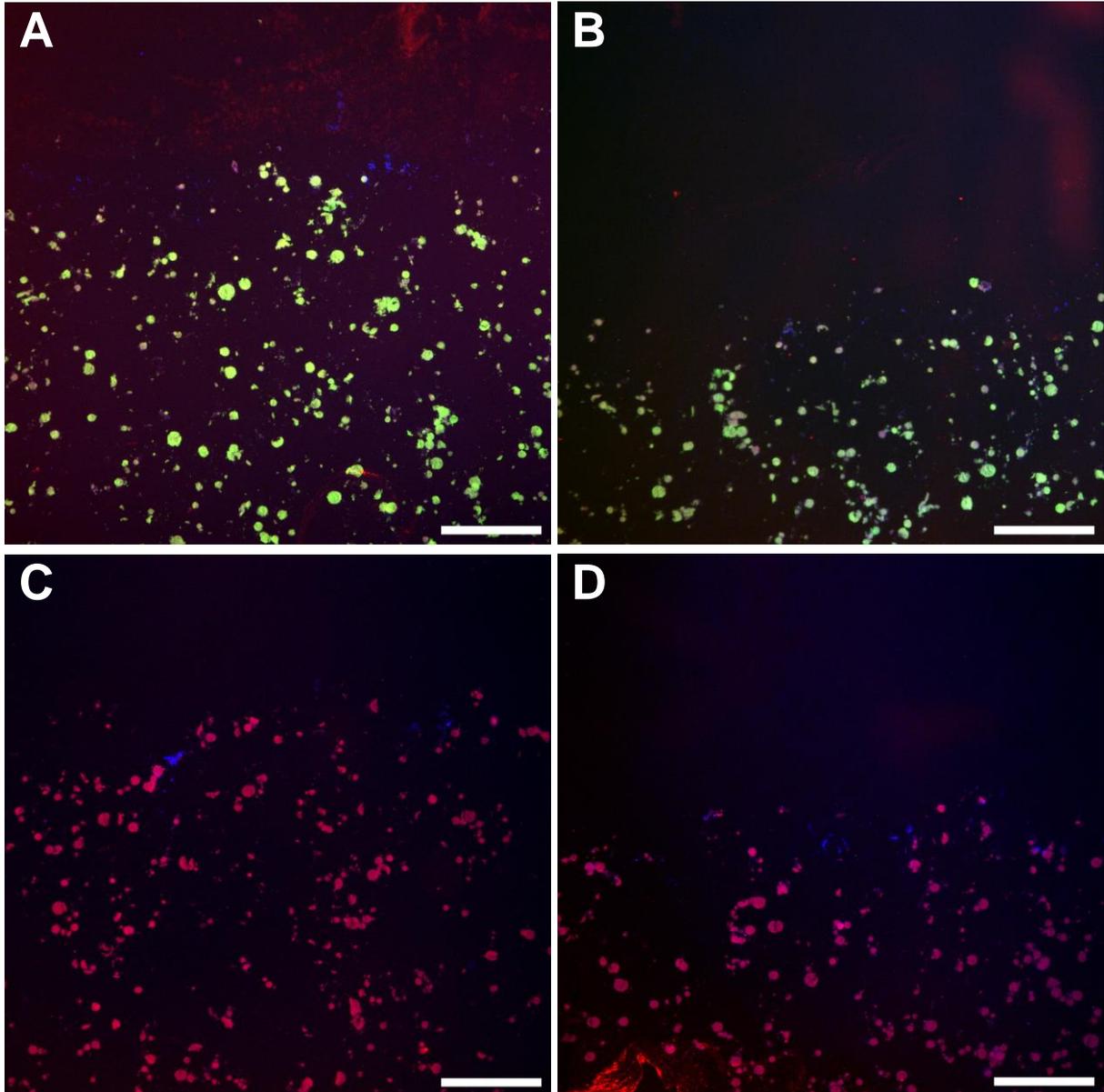


Abbildung 33: Immunzytochemisch gefärbte Gefrierschnitte von massiv gedruckten Alginategelproben mit Hydroxylapatit (fein) und Gelatine (Schicht B) nach UV-C-Bestrahlung, 3 Wochen nach Aussäen; blau: DAPI, A, B: grün: Osteopontin, rot: RUNX2; C, D: rot: Osteocalcin; sehr lange Belichtungszeiten von 1,5 s (rot, blau), beziehungsweise 0,4 s (grün); Maßstabsbalken: 500 μm

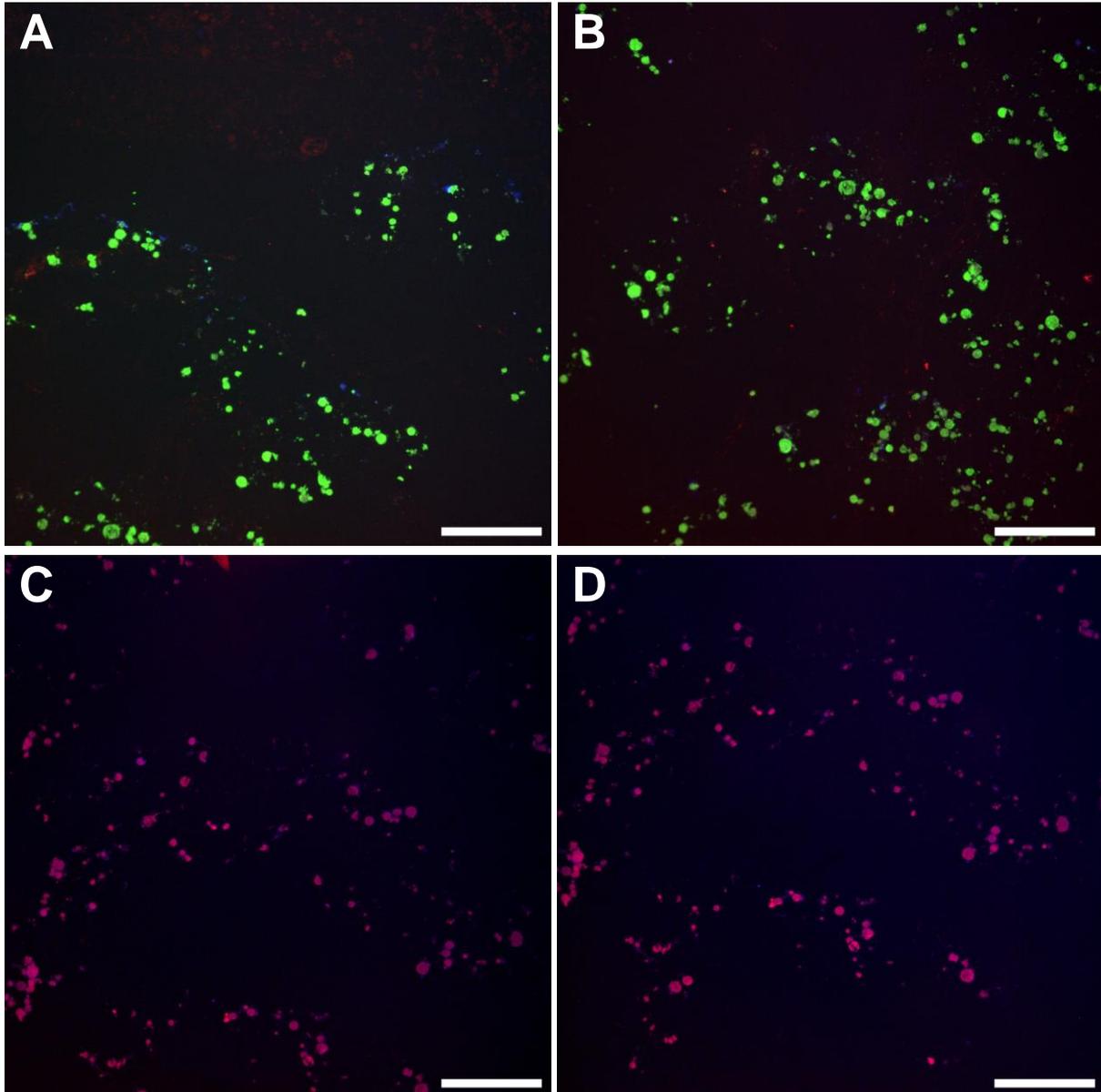


Abbildung 34: Immunzytochemisch gefärbte Gefrierschnitte von makroporös gedruckten Alginategelproben mit Hydroxylapatit (fein) und Gelatine (Schicht B) nach UV-C-Bestrahlung, 3 Wochen nach Aussäen; blau: DAPI, A, B: grün: Osteopontin, rot: RUNX2; C, D: rot: Osteocalcin; sehr lange Belichtungszeiten von 1,5 s (rot, blau), beziehungsweise 0,5 s (grün); Maßstabsbalken: 500 µm

5.1.7. Gamma-Bestrahlung ermöglicht die Sterilisierung und vollständige Besiedelung von makroporösen Alginate-Gelatine-Hydroxylapatitprobekörpern durch primäre, humane Osteoblasten in Langzeitkultur

Da auch durch die Bestrahlung mit UV-C angesichts der Probendegradation und der Mediumtrübung die bakterielle Kontamination noch nicht wirksam beseitigt werden konnte, wurden neue Materialproben durch einen kommerziellen Dienstleister gamma-sterilisiert. Bei der Gamma-Bestrahlung werden die Probenkörper in kontrollierter Weise ionisierenden Gammastrahlen ausgesetzt, um die Abtötung von Viren, Bakterien und anderen Krankheitserregern, zu erreichen. In anschließenden Besiedelungsversuchen sollte geklärt werden, ob diese Sterilisierungsmethode auch hier effektiv ist, ob sie die Materialeigenschaften im Sinne der Biokompatibilität verändert und ob nun längere Besiedelungszeiten möglich sind. Proben wurden nach der Besiedelung bis zu 48 Tage inkubiert. Das Ausbleiben einer Kontamination zeigte an, dass die gamma-Bestrahlung die Proben wirksam sterilisiert hatte. Die anschließende Auswertung per konfokaler Mikroskopie nach Immunfluoreszenzfärbung zeigte vollständig besiedelte Materialoberflächen der makroporös

gedruckten Proben (Abbildung 35). Vereinzelt waren auch Zellen zu sehen, die die Poren des Materials zwischen zwei Strängen teilweise überspannt hatten (Abbildung 35 B). Der größere Teil des inneren Porenvolumens war aber nicht mit Zellen ausgefüllt.

Ein negativer Effekt der hochenergetischen Gamma-Strahlung auf die rheologischen und mechanischen Eigenschaften der Materialien, etwa durch teilweise Zerstörung der Alginatepolymere, wurde durch die kooperierende Arbeitsgruppe an der Universität Erlangen-Nürnberg untersucht und ausgeschlossen.

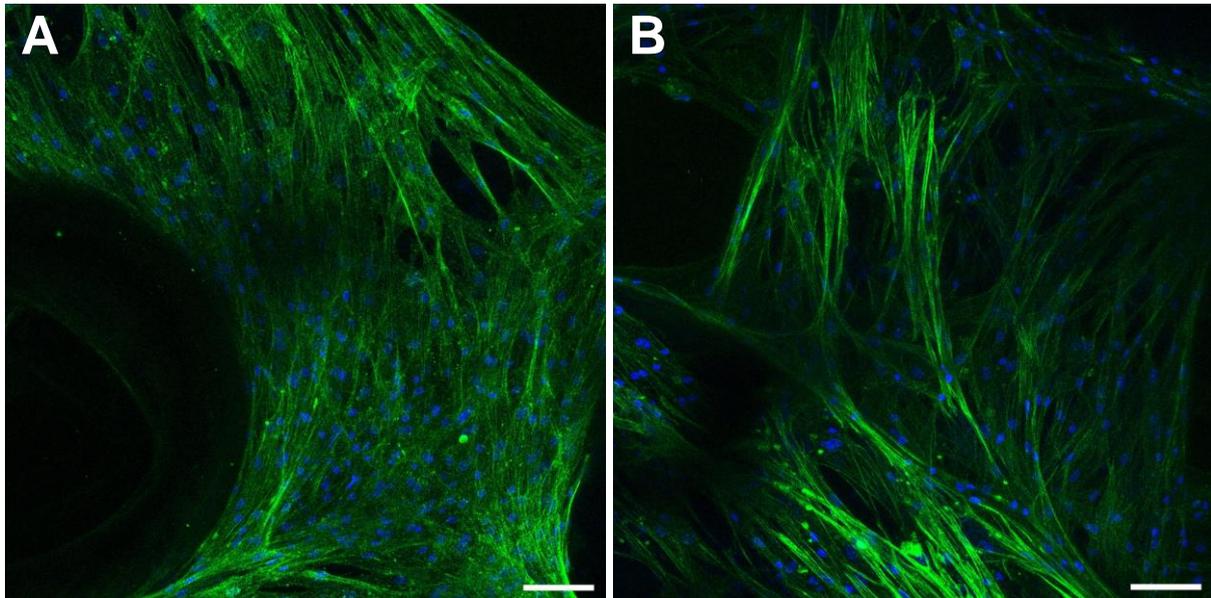


Abbildung 35: Besiedelung von gamma-sterilisierten (15 kGy) makroporös gedruckten Hydrogelen aus Alginate-Gelatine-blend (Typ A) mit Hydroxylapatit (fein) mit primären, humanen Osteoblasten, 48 Tage nach Aussäen; blau: DNA, Eigenfluoreszenz des Hydroxylapatits, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 μ m

Ein ähnliches Ergebnis zeigten immunzytochemisch gefärbte Gefrierschnitte von besiedelten makroporösen Proben nach 65 Tagen in Kultur. Auch hier war die fast vollständige Besiedelung aller innerer Oberflächen der Proben fluoreszenzmikroskopisch zu erkennen, unabhängig von ihrer räumlichen Lage und Orientierung (Abbildung 36 A, C). Auch zu erkennen war, dass die Osteoblasten dort einzelne Zwischenräume zwischen Materialsträngen ausfüllen konnten, wo die Stränge nahe aneinander lagen, also kein großer Spalt überbrückt werden musste (Abbildung 36 B, D).

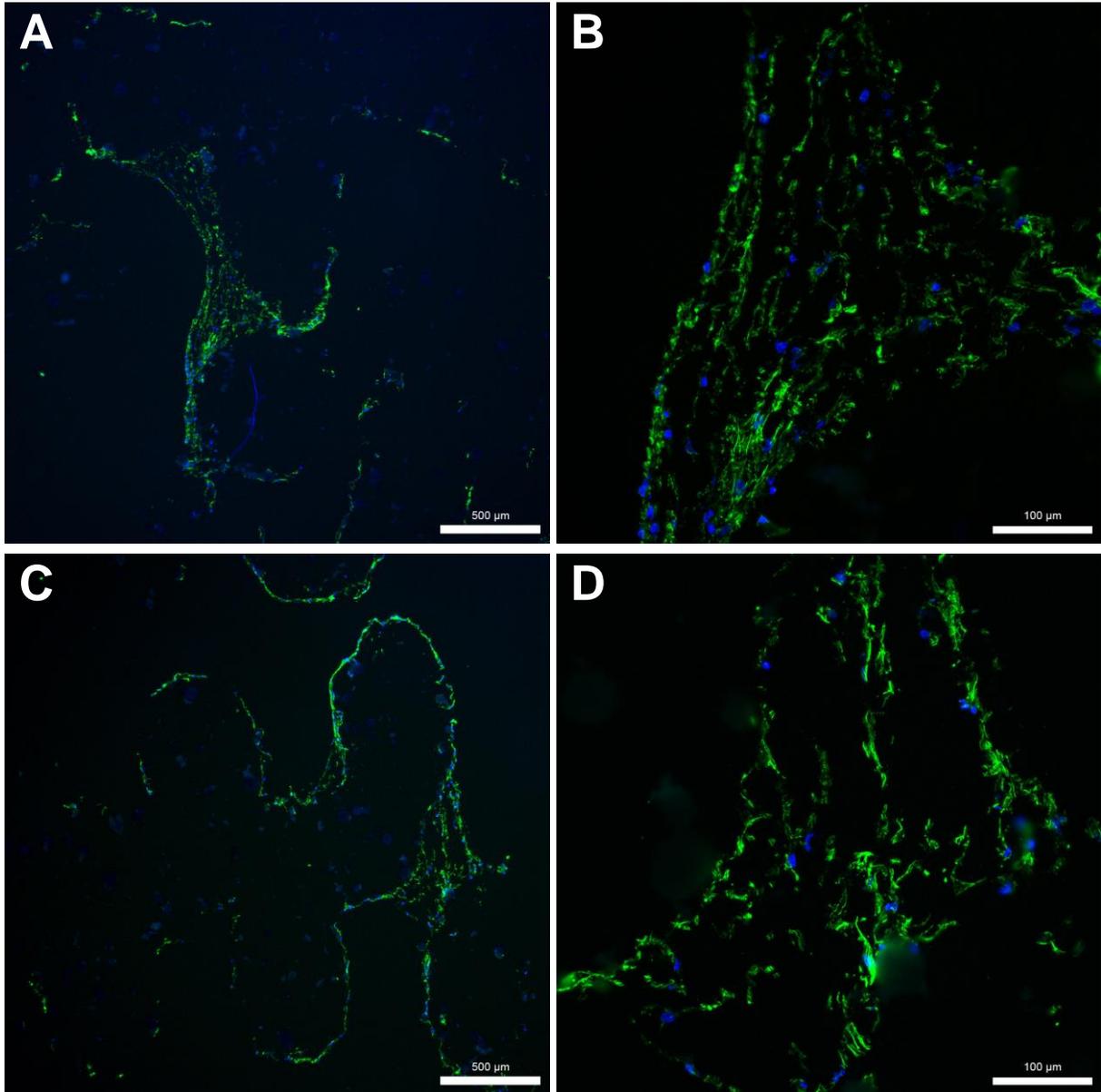


Abbildung 36: Immunzytochemisch gefärbte Gefrierschnitte von gamma-sterilisierten (15 kGy) makroporös gedruckten Hydrogelen aus Alginat-Gelatine-blend (Typ A) mit Hydroxylapatit (fein) nach Besiedelung mit primären, humanen Osteoblasten, 65 Tage nach Aussäen; links jeweils 4-fache, rechts 20-fache Vergrößerung des selbenausschnitts; blau: DNA, grün: Actin; Maßstabsbalken: A, C: 500 μm , B, D: 100 μm

5.2. Entwicklung und Charakterisierung eines Modellsystems zur Untersuchung des Einflusses von ‚confined compression‘ auf das Zellverhalten

Zur Erweiterung des Repertoires an Methoden zur präklinischen Evaluierung von potentiellen Biomaterialien im Hinblick auf ihren Effekt bei der mechanischen Stimulierung von Zellen im Material wurde ein System entwickelt, das die Untersuchung des Effekts mechanischer Stimulation von Zellen, hier primären, humanen Osteoblasten, während der Kultur in einem dreidimensionalen Material erlaubt. Dazu wurden die verwendeten Osteoblasten zunächst umfassend im Hinblick auf ihre Proliferationsaktivität, ihre Genexpression im Kontext Osteogenese, ihre Ausstattung mit Adhäsionsmolekülen und ihre Reaktionsfähigkeit auf biochemische osteogene Differenzierungsreize hin charakterisiert. Des Weiteren wurde hier eine Apparatur entwickelt und hergestellt, welche die ‚confined compression‘ erlaubt, also die Kompression von zell-beladenen Materialproben unter Verhinderung der gleichzeitigen seitlichen Ausdehnung der komprimierten Probe. Für die Verwendung der Apparatur waren einige Versuchsmethoden nötig, die ebenfalls entwickelt wurden und hier beschrieben sind. Das für die Charakterisierung des Systems verwendete Modellmaterial Fibrin hinsichtlich seiner Eigenschaften im entwickelten Versuchsaufbau rheologisch untersucht und schlussendlich die Reaktion der primären, humanen Osteoblasten auf ‚confined compression‘ analysiert. Die verschiedenen Aspekte der Systementwicklung werden im Folgenden besprochen.

5.2.1. Proliferationsgeschwindigkeit der primären, humanen Osteoblasten ist von Passage und Expansionslinie abhängig

Zur Verringerung der Variabilität des Zellverhaltens der primären, humanen Osteoblasten in den Versuchen zur Charakterisierung des Modellsystems wurde ein stark standardisiertes Verfahren zur Kultivierung der Zellen etabliert.

Nachdem zu Beginn des Projekts festgestellt wurde, dass die primären, humanen Osteoblasten auch nach Kulturzeiten von 11 Tagen in DMEM keine Konfluenz erreichten (Daten nicht gezeigt), wurde zu ihrer Routine-Zellkultur ausschließlich das vom Hersteller für ihre Kultur empfohlene ObM eingesetzt. Es wurde beobachtet, um welchen Betrag die Zellzahl durch die Kultivierung vom Aussäen in Zellkulturflaschen bis zum Trypsinieren zunahm. Daraus wurde für jede Passage separat eine durchschnittliche relative Zellzahlzunahme pro Tag berechnet (Abbildung 37). Die Zellen wurden zu Beginn des Projekts bis Passage 6 kultiviert und ihre Proliferationsgeschwindigkeit verfolgt. Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden jedoch nur Zellen in Passage 5 verwendet und daher bis zu dieser Passage expandiert.

Da nicht mit einer Expansion genug Zellen in Passage 3 bereitgestellt werden konnten, um alle Versuche durchzuführen wurden dazu mehrfach Zellen in Passage 1 in Kultur genommen, bis Passage 3 expandiert und erneut eingefroren. Die so gelagerten Zellen unterschieden sich nach dem erneuten Auftauen bei der Kultivierung bis Passage 5 in ihrer Proliferationsgeschwindigkeit und werden in Abbildung 37 daher separat gezeigt, es wurden Zellen aus drei Expansionsvorgängen von Passage 1 zu Passage 3 näher untersucht.

Alle Versuche zur Charakterisierung der Osteoblasten in Hinblick auf Medieeinfluss, BMP-2-Stimulation, Expression von Proteinen der Fokalkontakte wurden mit Zellen aus einem Expansionsvorgang durchgeführt (Abbildung 37 in hellgrau). Für Versuche zur mechanischen Stimulation von Osteoblasten mussten Zellen aus einer neuen Expansion benutzt werden (Abbildung 37 in dunkelgrau).

Zu beobachten war, dass die Proliferationsgeschwindigkeit mit zunehmender Passagenzahl tendenziell abnimmt. Zellen in Passage 1 nahmen durchschnittlich um mehr als 50% pro Tag in Ihrer Zahl zu. Bei Zellen in Passage 6 lag dieser Wert der Zellzahlzunahme pro Tag bei nur noch etwa 20%. Die verschiedenen Expansionslinien, die in Passagen 3 und 4 separat untersucht wurden, zeigen innerhalb einer Passage Unterschiede von bis zu 28 Prozentpunkten in ihrer täglichen

Zellzahlzunahme, obwohl die Zellen aus der gleichen Ursprungszellkultur stammen und unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden.

Aufgrund der unterschiedlichen Proliferationsgeschwindigkeiten unterschieden sich die Zellen auch in der Zeit, die sie vom Aussäen zur Konfluenz benötigten. Diese Kulturzeit bis zum Trypsinieren wurde zur Verringerung der Systemvariabilität jedoch soweit standardisiert wie möglich. Zur Expansion der Zellen von Passage 1 zu 3 wurde eine konstante Kulturzeit von 5 Tagen gewählt, ebenso für die Kultur der Zellen bis Passage 5 in den Versuchen zur Zellcharakterisierung. Die Zellen in Versuchen zur Stimulation im Gel wurden von Passage 3 bis 5 mit einer konstanten Inkubationszeit von 4 Tagen kultiviert.

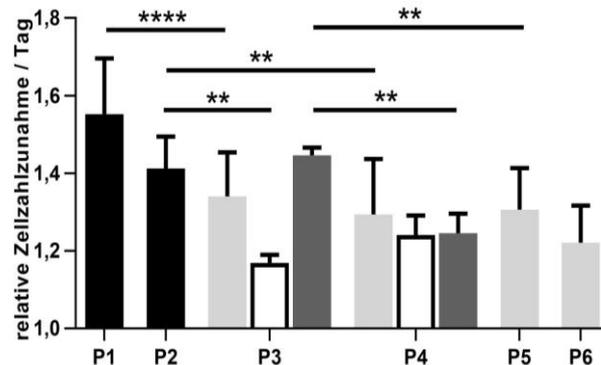


Abbildung 37: Proliferationsgeschwindigkeiten der primären, humanen Osteoblasten in verschiedenen Zellkulturpassagen (P1 bis P6), ab P3: hellgrau: Zellen für Versuche zur Zellcharakterisierung, dunkelgrau: Zellen für Versuche zur mechanischen Stimulation, weiß: weitere aus Passage 1 expandierte, in P3 aufgetaute Zellen; statistisch signifikant unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeiten mit Balken eingetragen für ausgewählte Passagenpaare; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ****: $p < 0,0001$; $3 < n < 67$

5.2.2. Primäre, humane Osteoblasten können nur in DMEM-Mineralisierungsmedium mineralisierte Matrix bilden

Wesentliches physiologisches Merkmal von Osteoblasten ist die Fähigkeit, mineralisierte extrazelluläre Matrix zu bilden. Daher wurde diese Eigenschaft bei den hier verwendeten primären, humanen Osteoblasten mithilfe einer Färbung von mineralisierter Matrix durch Alizarinrot überprüft.

Wie in Abbildung 38 anhand der roten Färbung erkennbar, waren die Osteoblasten in der Lage, während einer 3-wöchiger Kultivierung in DMEM-Mineralisierungsmedium stark mineralisierte Matrix zu bilden (Abbildung 38 D). Die Kultivierung für nur 7 Tage in diesem Medium (Abbildung 38 B), oder die Kultivierung in DMEM ohne Mineralisierungszusätze reichten für eine Mineralisierung nicht aus (Abbildung 38 A, C).

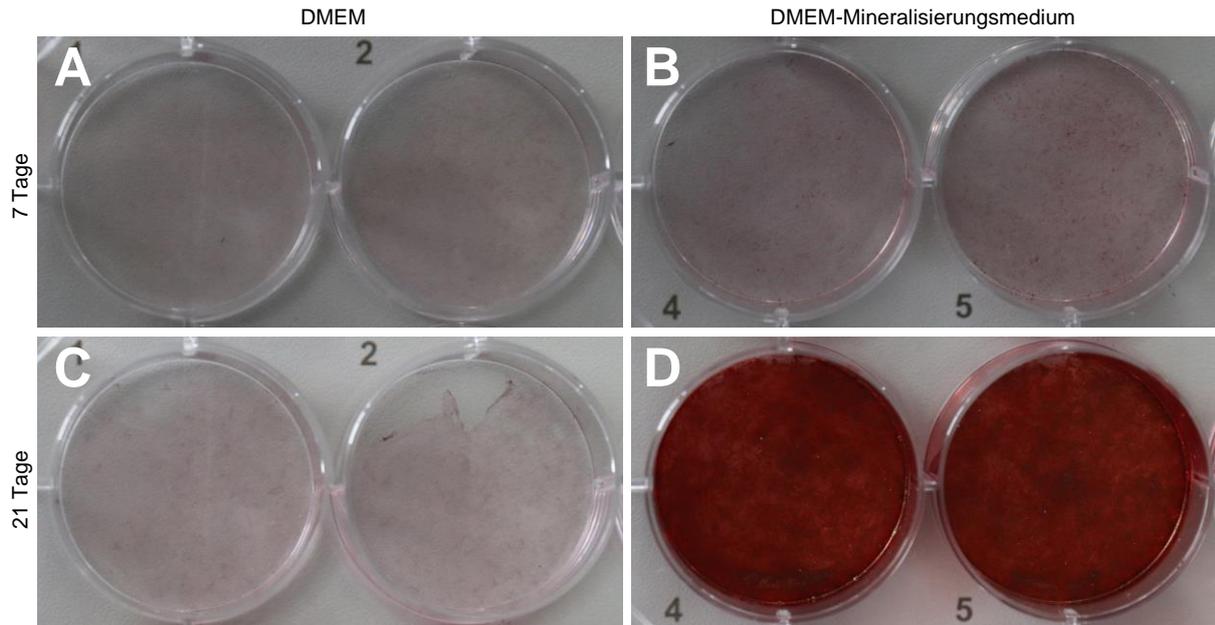


Abbildung 38: Alizarin-Rot-Färbung von primären, humanen Osteoblasten nach Kultivierung in DMEM beziehungsweise DMEM-Mineralisierungsmedium; A: 7 Tage Kultivierung, DMEM; B: 7 Tage Kultivierung, DMEM-Mineralisierungsmedium; C: 21 Tage Kultivierung, DMEM; D: 21 Tage Kultivierung, DMEM-Mineralisierungsmedium

Zellen, die in ObM kultiviert wurden (Abbildung 39), haben unter keinen der getesteten Kulturbedingungen, auch nicht bei Zugabe von Mineralisierungszusätzen und 21 Tagen Kulturzeit (Abbildung 39 D) mineralisierte Matrix gebildet.

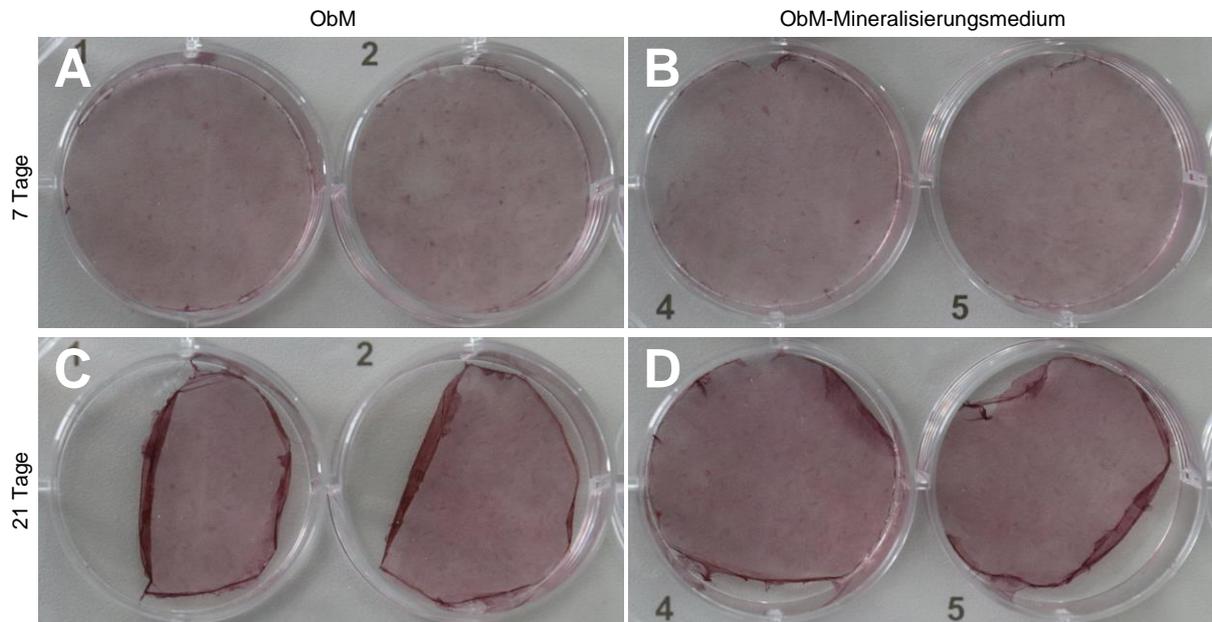


Abbildung 39: Alizarin-Rot-Färbung von primären, humanen Osteoblasten nach Kultivierung in ObM beziehungsweise ObM-Mineralisierungsmedium; A: 7 Tage Kultivierung, ObM; B: 7 Tage Kultivierung, ObM -Mineralisierungsmedium; C: 21 Tage Kultivierung, ObM; D: 21 Tage Kultivierung, ObM -Mineralisierungsmedium

5.2.3. Entwicklung eines Auswertungsalgorithmus für qPCR-Daten zur relativen Genexpressionsanalyse

Zur Charakterisierung der Genexpressionsaktivität der im Projekt verwendeten primären, humanen Osteoblasten wurden in verschiedenen Teilprojekten qPCR-Array-Versuche durchgeführt. Zur Auswertung der dabei erhaltenen Daten wurde ein Auswertungsalgorithmus entwickelt, der auf der

$2^{-\Delta\Delta Cq}$ -Methode von Livak und Schmittgen¹⁴⁰ basiert und automatisch die Daten aus allen gemessenen biologischen Replikaten aller getesteten Versuchsbedingungen eines Versuchs zusammenfasst. Im Folgenden wird die grundsätzliche Struktur und Funktionsweise des Quellcodes besprochen. Gezeigt wird der Quellcode, wie er in der Programmierumgebung Google Colab benutzt werden kann. Alle Codebestandteile, denen ein Rautezeichen (#) vorgestellt ist und die grün gedruckt sind, werden bei der Ausführung des Programms ignoriert und dienen lediglich als Kommentar zum besseren Verständnis des Programmcodes.

Daten werden im entwickelten Algorithmus intern in ‚Pandas Dataframes‘ abgespeichert. Dieser Variablentyp erlaubt das Arbeiten mit tabellarisch angelegten Daten und deren Adressierung über Zeilen- und Spaltennamen anstelle von lediglich Indizes (wie etwa bei den in Python oft verwendeten Arrays oder Listen).

Zeilen 1 bis 18 im Programmcode dienen dem Import von frei verfügbaren Programmbefehlen und dem Bereitstellen von Daten. Benötigt werden die Elemente Pandas, Dash_Bio, Numpy, IPython, Math, Scipy und google.colab. Zeile 8 stellt Daten aus dem Online-Speicher Google Drive in Colab zu Verfügung.

Zeilen 20 bis 27 definiert mathematische Funktionen, die später referenziert werden können und so nur ein einziges Mal niedergeschrieben werden müssen.

Der Algorithmus importiert anschließend die Rohdaten (Zeile 32). Die Wahl der Datei und damit die Auswahl der zu analysierenden Daten muss durch manuelle Änderung des Dateinamens im Quellcode erfolgen. In Zeile 40 werden dann die Namen der verschiedenen Versuchsbedingungen (hier als „Testgroups“ bezeichnet) ausgelesen und als Variable abgespeichert.

Zeilen 48 bis 72 dienen der Qualitätskontrolle der eingelesenen Daten. Dabei dient das Handbuch der verwendeten qPCR-Arrays der Fa. Qiagen als Grundlage. Zunächst wird geprüft, ob die Cq-Werte für die integrierte Kontrolle auf genomische DNA entweder „NaN“ lauten (entspricht nicht nachweisbarer DNA-Menge) oder zumindest größer als 35 sind. Das Ergebnis dieser Prüfung wird als Text ausgegeben (Zeilen 51 bis 56). Mit dieser Überprüfung soll verifiziert werden, dass genomische DNA in allen vermessenen RNA-Extrakten entweder nicht nachweisbar (NaN), oder ihre Menge so gering war, dass sie lediglich einen vernachlässigbaren Einfluss auf die weitere Auswertung hat (Cq > 35).

Anschließend wird geprüft, ob die Cq-Werte der positiven PCR-Kontrolle (PPC) für alle Proben um mindestens 5 größer ist als die der jeweiligen „Reverse Transcription Control“ (RTC) (Zeile 68). Auch hier erfolgt die Ausgabe des Prüfergebnisses (Zeilen 69 bis 72). Dies stellt eine ausreichende Effizienz des Transkriptionsprozesses der RNA zu cDNA sicher.

Die Auswahl eines oder mehrerer der auf den Arrays gemessenen Referenz- oder Haushaltsgenen (HKG) für die Auswertung des Versuchs soll anhand ihrer Varianz über alle gemessenen Proben erfolgen. Als Referenzgene geeignet sind solche Gene, die in ihrer Expression möglichst nicht von den im vorliegenden Versuch getesteten Einflüssen auf das Zellverhalten beeinflusst sind, also für alle Proben und Kontrollen möglichst gleiche Cq-Werte in der qPCR aufweisen. Um das Referenzgen im jeweils vorliegenden Versuch zu ermitteln, dass diesen Ansprüchen am besten gerecht wird, ermittelt der Algorithmus zunächst den mittleren Cq-Wert für jedes der fünf potentiellen Referenzgene über allen Proben (Zeilen 78 bis 81). Anschließend wird die Abweichung im Cq-Wert für jedes potentielle Referenzgen für alle Proben (Zeile 85) sowie die der maximale Unterschied in den Cq-Werten zwischen höchster und niedrigster Expressionsaktivität für jedes potentielle Referenzgen berechnet (Zeilen 88 bis 89). Laut Handbuch der Qiagen-qPCR-Arrays sollen jene Gene als Referenzgene herangezogen werden, deren Expressionsaktivitäten sich zwischen allen Proben nur um weniger als 1 cycle unterscheiden. Ob eine so geringe Abweichung für eins oder mehrere der potentiellen Referenzgene im jeweils ausgewerteten Versuch vorliegt, wird im Algorithmus in Zeile 96 geprüft. Ist dies der Fall, werden die Gene, die diese Voraussetzung erfüllen mit der Bandbreite ihrer Expressionsaktivitäten (Differenz im Cq-Wert von höchster zu niedrigster Expression) in einer Variable („HKG“) abgespeichert (Zeile 97) und ihre Namen in einer Textausgabe angegeben (Zeilen 100 bis

101). Sollten keine potentiellen Referenzgene eine Cq-Bandbreite von kleiner als 1 haben, wird stattdessen dasjenige Gen als Referenzgen ausgewählt, das die geringste Bandbreite aufweist (Zeile 103). Auch hier wird anschließend die Auswahl des Gens per Text ausgegeben (Zeilen 106 bis 107).

Als nächstes prüft der Algorithmus, ob die ermittelten Cq-Werte eines bestimmten Gens für alle Proben einer Versuchsbedingung, also alle biologischen Replikate eines Versuchs, einen einstellbaren Maximalwert (Zeile 113) nicht überschreiten. Dies dient dazu, sehr hohe Cq-Werte, die auch von der Amplifikation unspezifischer PCR-Produkte stammen könnten, aus der weiteren Analyse auszuschließen. Der Algorithmus iteriert daher über jede Zeile der eingelesenen Rohdaten (Cq-Werte) (Zeile 116) und prüft ob innerhalb dieser Zeile alle Cq-Werte die zu einer der vorher ausgelesenen Testgruppen gehören (Zeile 117) den Schwellwert nicht überschreiten (Zeile 124). Das Ergebnis dieser Prüfung wird als Boolesche Variable (wahr / falsch) in einer neuen Datenframe-Variable abgespeichert. Da in der Rohdatentabelle die Cq-Werte in Zeilen nach Gen sortiert sind, wird in dieser Prüfung also für jedes Gen und getrennt für jede Testgruppe des jeweiligen Versuchs überprüft, ob alle Replikate eine gewisse Mindestgenexpression zeigen. In den später folgenden Schritten der Auswertung werden jene Proben von der Auswertung ausgeschlossen, die nicht in allen Replikaten für das jeweils ausgewertete Gen den Cq-Grenzwert unterschritten haben.

Anschließend beginnt die quantitative Auswertung der qPCR-Daten. Es wird zunächst für jedes Gen und für jede Testgruppe der mittlere Cq-Wert aus den Cq-Werten der vermessenen Versuchsreplikate berechnet (Zeilen 131 bis 139). Dann wird von jedem dieser gemittelten Cq-Werte der gemittelte Cq-Wert der vorher ausgewählten Referenzgene abgezogen (ΔCq). Diese Werte geben die Expressionsaktivität aller untersuchten Gene in Relation zu den ausgewählten Referenzgenen innerhalb einer Testgruppe an.

Um verschiedene Testgruppen, also verschiedene Versuchsbedingungen miteinander zu vergleichen, muss im Algorithmus als nächstes eine Vergleichsgruppe - also in der Regel die Negativkontrolle des Versuchs - und die aktuell auszuwertende Testgruppe - eine der getesteten Versuchsbedingungen - ausgewählt werden. Dies geschieht manuell in Zeilen 172 bis 175. „ContrSample“ ist dabei die Variable welche die Vergleichsgruppe (Negativkontrolle) festlegt, „Sample“ gibt die auszuwertende Versuchsbedingung an. Es wird nun für jedes Gen die jeweilige Differenz der ΔCq -Werte zwischen Vergleichsgruppe und auszuwertender Testgruppe berechnet ($\Delta \Delta Cq$ -Werte) (Zeilen 178 bis 182).

Für die statistische Auswertung der qPCR-Ergebnisse ist es notwendig, die Standardabweichungen der berechneten ΔCq -Werte ($\sigma_{\Delta Cq}$) zu ermitteln. Da diese aber aus mehreren Variablen berechnet werden (hier aus den gemittelten Cq-Werten von untersuchtem Gen und den gemittelten Cq-Werten des/der Referenzgen(e)), die alle mit Varianz behaftet sind, ist eine Fehlerfortpflanzung nötig.

Zunächst wird für jedes Gen innerhalb jeder Testgruppe die Standardabweichung der Cq-Werte der Replikate berechnet (Zeilen 188 bis 193).

Die Standardabweichung des gemittelten Cq-Werts (σ_{Cq}) aller verwendeter Referenzgene wird der Einfachheit halber näherungsweise berechnet. Dazu wird für jedes dieser Referenzgene die Summe gebildet aus dem mittleren Cq-Wert aller Replikate einer Versuchsbedingung ($\overline{Cq_{HKG}}$) und der dazugehörigen Standardabweichung ($\sigma_{Cq, HKG}$) (Zeilen 196 und 197):

$$Cq_{HKG, max} = \overline{Cq_{HKG}} + \sigma_{Cq, HKG}$$

Anschließend wird aus diesen Summen für jede Testgruppe der Mittelwert gebildet ($\overline{Cq_{HKG, max}}$) (Zeilen 214 und 215) und der Mittelwert der Cq-Werte der Referenzgene ($\overline{Cq_{HKG}}$) abgezogen (Zeilen 231 und 232):

$$\sigma_{Cq, HKG} = \overline{Cq_{HKG, max}} - \overline{Cq_{HKG}}$$

Es ergibt sich ein näherungsweise berechneter Wert für die Standardabweichung des mittleren Cq-Werts aller ausgewählten Referenzgene ($\sigma_{Cq, HKG}$).

Aus den so berechneten Standardabweichungen von Referenzgen(en) ($\sigma_{Cq,HKG}$) und den untersuchten Genen (GOI) ($\sigma_{Cq,GOI}$) kann durch Fehlerfortpflanzung die kombinierte Standardabweichung der ΔCq -Werte ($\sigma_{\Delta Cq,GOI}$) errechnet werden. Dabei gilt folgende Formel:

$$\sigma_{\Delta Cq} = \sqrt{\sigma_{Cq,GOI}^2 + \sigma_{Cq,HKG}^2}$$

Die Berechnung ist implementiert in Zeilen 247 bis 255. Analog dazu wird die kombinierte Standardabweichung der $\Delta\Delta Cq$ -Werte ($\sigma_{\Delta\Delta Cq}$) berechnet in Zeilen 269 bis 274. Hier werden die Standardabweichungen der ΔCq -Werte von Vergleichsgruppe und Testgruppe für die Berechnung verwendet:

$$\sigma_{\Delta\Delta Cq} = \sqrt{\sigma_{\Delta Cq,Testgruppe}^2 + \sigma_{\Delta Cq,Vergleichsgruppe}^2}$$

Um die grafische Auftragung der berechneten Daten zu erleichtern, werden anschließend für jedes untersuchte Gen die Werte für $\Delta\Delta Cq$ +/- ihrer Standardabweichung berechnet. Diese dienen später dazu, die unteren und oberen Grenzen der Fehlerbalken in den erstellten Säulendiagrammen festzulegen (Zeilen 284 bis 290)

Außerdem wird die statistische Signifikanz der Unterschiede der ΔCq -Werte zwischen Vergleichs- und Testgruppe per Student's T-Test berechnet (Zeilen 303 bis 306). Dazu kommt die entsprechende Funktion der frei verfügbaren und im Quelltext veröffentlichten Funktionsbibliothek SciPy (<https://scipy.org/>) zum Einsatz. Mit ihrer Hilfe wird aus dem ΔCq -Wert der ausgewählten Versuchsbedingung („Sample“) und der dazugehörigen Standardabweichung, sowie dem ΔCq -Wert der ausgewählten Vergleichsgruppe („ContrSample“) und der dazugehörigen Standardabweichung berechnet. Die Anzahl der Replikate wird automatisch berechnet und angegeben. Es werden gleiche Varianzen für beide Gruppen angenommen (Zeilen 299 bis 302).

Im letzten Schritt der quantitativen Auswertung wird aus den berechneten $\Delta\Delta Cq$ -Werten die Stärke der Genregulation berechnet (Zeile 308). Es gilt:

$$Regulation = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

Für die grafische Auftragung wird diese Berechnung auch mit der Summe und der Differenz aus $\Delta\Delta Cq$ -Wert und dafür berechneter Standardabweichung berechnet. Die resultierenden Werte beschreiben die untere und die obere Grenze der eingezeichneten Fehlerbalken.

Im Folgenden werden in verschiedenen weiteren Programmbausteinen unterschiedliche Kombinationen der berechneten Daten exportiert.

Baustein Export 1 speichert die Regulationslevels inklusive der Werte zum Einzeichnen der Fehlerbalken in einer .csv-Datei ab und startet ihren Download.

Baustein Export 2 kombiniert zunächst die Regulationsstärke aller Gene mit den per T-Test für diese berechneten p-Werte (Zeilen 8 bis 11). Anschließend wird für jedes der Gene geprüft, ob der p-Wert kleiner ist als das gewählte Signifikanzniveau von $p=0,05$ (Zeilen 12 und 13). Alle Werte für Gene, bei denen dieses Niveau überschritten wird, werden entfernt. Die verbliebenen Werte für Regulationsstärke und p-Wert werden dann in einer .csv-Datei abgelegt und heruntergeladen.

Der Programmbaustein Clustergram führt automatisiert eine weitere Auswertung der zuvor berechneten Expressionsaktivitäten durch. Mithilfe der Funktionsbibliothek dash_bio (<https://dash.plotly.com/dash-bio>) wird mit allen ΔCq -Werten (ausgenommen Referenzgene) automatisiert ein hierarchisches Clustering durchgeführt und die ΔCq -Werte anhand dieses Clusterings geordnet und farbcodiert in einem sogenannten Clustergram aufgetragen. Das hierarchische Clustering wird dabei sowohl für die gemessenen Gene, als auch für alle untersuchten Versuchsbedingungen durchgeführt, sodass Muster ähnlicher Genexpression zwischen verschiedenen Genen erkannt werden können, als auch Versuchsbedingungen, die ähnliche Effekte auf die Genexpressionsaktivitäten haben. Für das Clustering werden die euklidische Distanzmetrik und ‚average-linkage‘ verwendet. Eine Übersicht über mögliche Distanzmetriken und ‚linkages‘ und

die Gründe für diese Auswahl gibt der Diskussionsteil dieser Arbeit an (siehe Kapitel 6.2.2). Das für die Farbcodierung verwendete Farbskala wird automatisch an die übergebenen Daten angepasst und weist dem größten vorhandenen ΔC_q -Wert (also der geringsten Expressionsaktivität) die Farbe Blau, dem kleinsten (höchste Expressionsaktivität) die Farbe Rot zu (Zeilen 35 bis 37).

5.2.3.1. Quantitative Auswertung

```
1 !pip install dash_bio
2
3 import pandas as pd
4 import dash_bio
5 import numpy as np
6 from google.colab import files
7 from google.colab import drive
8 drive.mount('/content/drive')
9
10 from IPython import get_ipython
11 get_ipython().magic('reset -sf')
12
13 import pandas as pd
14 import dash_bio
15 import numpy as np
16 import matplotlib.pyplot as plt
17 import math
18 import scipy
19
20 #Funktion für 2^-x
21 def exp2(exponent):
22     #a=np.array(iterable)
23     return 2**(-exponent)
24
25 #Funktion für teilen durch
26 def div(dividend, divisor):
27     return dividend/divisor
28
29 #=====
30 #importiere Daten aus csv
31 #=====
32 Cq=pd.read_csv('/content/drive/MyDrive/qPCRAuswertung/220707_LV376-
33 433_Cq.csv', header=[0,1], index_col=0).astype('float64') #.astype nöti
34 g, da Werte als object(Text) gespeichert, weil die Zeile Test Group Tex
35 t enthalten hat
36
37 #=====
38 #Extrahiere Testgruppen
39 #=====
40 TestGroups=set(Cq.columns.levels[0].tolist()) #set() reduziert Liste au
41 f einzigartige Einträge
42 print(f'Folgende {len(TestGroups)} Testgruppen wurden gefunden: {TestGr
43 oups}')
44
45 #=====
46 #Prüfe ob alle GDC = NaN oder >35
47 #=====
48 GDCisna=Cq.loc['GDC'].isna()
49 GDCis35=Cq.loc['GDC']>35
50
51 GDCpass=(GDCisna+GDCis35).all() #.all() Return whether all elements are
52 True, potentially over an axis.
53 if GDCpass:
54     print('GDC ist ok (<35) für alle Proben.')
55 else:
56     print('GDC ist nicht ok (>35).')
57
58 #=====
```

```

59 #Prüfe PPC
60 #=====
61 RTC=Cq.drop(Cq.head(90).index)
62 RTC=RTC.drop(Cq.tail(3).index)
63 # RTC=RTC.apply(geo_mean, axis=0)
64 RTC=RTC.apply(np.mean, axis=0)
65
66 PPC=Cq.drop(Cq.head(93).index).apply(np.mean, axis=0)
67
68 PPCgreaterRTC=((RTC-PPC)<5).all()
69 if PPCgreaterRTC:
70     print('RTC-PPC ist ok (<5) für alle Proben.')
71 else:
72     print('RTC-PPC ist nicht ok (>=5) für mindestens eine Probe.')
73
74 #=====
75 #Auswahl des HKG
76 #=====
77 #berechne Mittelwerte für alle HKG
78 CqHKG=Cq.drop(Cq.head(84).index).drop(Cq.tail(7).index)
79 # CqHKGaverage=CqHKG.apply(geo_mean, axis=1) #Mittelwert per geometric
80 mean
81 CqHKGaverage=CqHKG.apply(np.mean, axis=1) #Mittelwert per arithmetic me
82 an
83
84 #print(CqHKGaverage)
85 CqHKGvariances=CqHKG.sub(CqHKGaverage, axis=0) #Abweichungen der Cqs de
86 r HKGs vom Mittelwert über alle HKGs
87 #print(CqHKGvariances)
88 CqHKGvarrange=(CqHKGvariances.max(axis=1)-
89 CqHKGvariances.min(axis=1)).to_frame('range') #berechne Abstand von max
90 zu min und verwandle in dataframe mit column name 'range'
91 # print(CqHKGvarrange)
92 # print((CqHKGvarrange<1).any().all())
93
94 #prüfe, ob Varianz für min. 1 HKG <1; HKG enthält Genname und Varianz d
95 er ausgewählten HKGs
96 if (CqHKGvarrange<1).any().all(): #.all() um zu reinem bool umzuformen
97     HKG=CqHKGvarrange[CqHKGvarrange.range<1] #übernehme nur rows, in dene
98 n range<1
99     #print(HKG)
100     print(f'Folgende HKG(s) werden verwendet (Varianz<1): {HKG.index.toli
101 st()}'')
102 else:
103     HKG=CqHKGvarrange[CqHKGvarrange.range==CqHKGvarrange.range.min()] #er
104 middle HKG mit geringster Varianz, schreibe dessen Zeile in CqHKGvarran
105 ge in HKG
106     print(f'Varianz für keines der HKG <1, benutze HKG mit kleinster Abwe
107 ichung: {HKG.index.tolist()}')
108     # print(HKG)
109
110 #=====
111 #Cq < cutoff?
112 #=====
113 cutoff=35 #hier Cutoff-Wert festlegen
114 # cutoff=float(input('Cq cutoff eingeben (z.B. 35):'))
115 Cqcuttoff=pd.DataFrame(columns=TestGroups, index=Cq.index).drop(Cq.tail(
116 7).index)
117 for row in Cqcuttoff.itertuples(index=True):
118     for TestGroup in TestGroups:

```

```

119     # print(f'row: {row}')
120     # print(f'TestGroup: {TestGroup}')
121     # print(f'Cq35 row, testgroup: {row[0]}, {TestGroup}')
122     # print((Cq.loc[row[0],TestGroup]<35).all()) #prüft, ob alle Werte
123 <35; NaN ergibt False, daher mit abgedeckt
124     Cqcutoff.loc[row[0],TestGroup]=(Cq.loc[row[0],TestGroup]<cutoff).al
125 l() #schreibe ...<cutoff.all() in row[0] und TestGroup entsprechende Ze
126 lle in Cqcutoff
127
128 #=====
129 #average Cq
130 #=====
131 Cqmean=pd.DataFrame(columns=TestGroups, index=Cq.index).drop(Cq.tail(7)
132 .index)
133 for row in Cqmean.itertuples(index=True):
134     for TestGroup in TestGroups:
135         # print(f'Testgroup: {TestGroup}')
136         if Cqcutoff.loc[row[0],TestGroup]:
137             # Cqmean.loc[row[0],TestGroup]=geo_mean(Cq.loc[row[0],TestGroup])
138             #Cq mean per geometric mean, nicht benutzen
139             Cqmean.loc[row[0],TestGroup]=np.mean(Cq.loc[row[0],TestGroup]) #
140 Cq mean per arithmetic mean, dieses ist richtig
141             # print(Cqmean)
142
143 #=====
144 #delta Cq
145 #=====
146 Cqdelta=pd.DataFrame(columns=TestGroups, index=Cq.index).astype(float).
147 drop(Cq.tail(7).index)
148 for row in Cqdelta.itertuples(index=True):
149     for TestGroup in TestGroups:
150         # print(f'Cqmean: {Cqmean.loc[row[0],TestGroup]}')
151         # print(Cqmean.loc[list(HKG.index),TestGroup])
152         # Cqdelta.loc[row[0],TestGroup]=Cqmean.loc[row[0],TestGroup]-
153 geo_mean(Cqmean.loc[list(HKG.index),TestGroup]) #bildet Mittelwert (geo
154 metric) der Cq-
155 Werte der in HKG aufgeführten Gene
156
157         Cqdelta.loc[row[0],TestGroup]=Cqmean.loc[row[0],TestGroup]-
158 np.mean(Cqmean.loc[list(HKG.index),TestGroup]) #bildet Mittelwert (arit
159 hmetic) der Cq-
160 Werte der in HKG aufgeführten Gene
161
162         #print(Cqdelta)
163
164 #=====
165 #delta delta Cq
166 #=====
167 ContrSample=['ObM-
168 Serum Ong/ml BMP2 d2'] #hier festlegen, welches Sample als Kontrolle d
169 ienen soll
170 Sample=['ObM-
171 Serum Ong/ml BMP2 d7'] #hier festlegen, welches Sample analysiert werde
172 n soll
173 # Cqdeltadelta=Cqdelta[Sample]
174 Cqdeltadelta=pd.DataFrame(columns=[Sample[0]], index=Cq.index).astype(f
175 loat).drop(Cq.tail(7).index)
176 Cqdeltadelta[Sample[0]]=Cqdelta[Sample[0]].subtract(Cqdelta[ContrSample
177 [0]], axis=0)
178 Cqdeltadelta=Cqdeltadelta.drop(list(HKG.index))

```

```

179 # print(Cqdelta)
180
181 #=====
182 #Standardabweichung der Cq-Werte
183 #=====
184 CqStDev=pd.DataFrame(columns=TestGroups, index=Cq.index).astype(float).
185 drop(Cq.tail(7).index)
186 for row in CqStDev.itertuples(index=True):
187     for TestGroup in TestGroups:
188         if Cqcutoff.loc[row[0],TestGroup]:
189             CqStDev.loc[row[0],TestGroup]=Cq.loc[row[0],TestGroup].std() #be
190 rechnet Standardabweichung der Cq-Werte pro Gen pro Testgruppe
191 # print(CqStDev)
192
193 #=====
194 #Cq mean + jew. Standardabweichung
195 #=====
196 Cq_plus_StDev=pd.DataFrame(columns=TestGroups, index=Cq.index).astype(f
197 loat).drop(Cq.tail(7).index)
198 for row in Cq_plus_StDev.itertuples(index=True):
199     for TestGroup in TestGroups:
200         # print(f'Cqmean: {Cqmean.loc[row[0],TestGroup]}')
201         # print(f'StDev: {CqStDev.loc[row[0],TestGroup]}')
202         Cq_plus_StDev.loc[row[0],TestGroup]=Cqmean.loc[row[0],TestGroup]+Cq
203 StDev.loc[row[0],TestGroup]
204
205
206 #=====
207 #Standardabweichung der HKG-Cq-Werte
208 #=====
209 #berechnet StAbw. des gemeinsamen Cq-
210 Werts aller HKG näherungsweise: Mittelwert aller Cq+StAbw. aller HKG -
211 Mittelwert aller Cq
212 CqHKG_plus_StDev=pd.DataFrame(columns=TestGroups, index=['HKGs'])
213 for TestGroup in TestGroups:
214     CqHKG_plus_StDev.loc['HKGs',TestGroup]=np.mean(Cq_plus_StDev.loc[list
215 (HKG.index),TestGroup]) #bildet Mittelwert (arithmetic) der Cq-
216 Werte+StDev aller HKGs
217 # print(f'Cq_plus Stdev: {Cq_plus_StDev.loc[list(HKG.index),TestGroup
218 ]}')
219 # CqHKG_plus_StDev.loc[row[0],TestGroup]=geo_mean(Cq_plus_StDev.loc[l
220 ist(HKG.index),TestGroup]) #bildet Mittelwert (geometric) der Cq-
221 Werte+StDev aller HKGs
222
223 CqHKGStDev=pd.DataFrame(columns=TestGroups, index=['CqHKGStDev'])
224 for TestGroup in TestGroups:
225     # print(f'cqhkg+stdev {CqHKG_plus_StDev[TestGroup].iloc[0]}')
226     # print(f'geo mean hkg{geo_mean(Cqmean.loc[list(HKG.index),TestGroup]
227 )}')
228     # CqHKGStDev[TestGroup]=CqHKG_plus_StDev[TestGroup].iloc[0]-
229 geo_mean(Cqmean.loc[list(HKG.index),TestGroup]) #zieht Mittelwert (geom
230 etric) der Cq-Werte aller HKGs von mittl. Cq+StDev ab
231     CqHKGStDev[TestGroup]=CqHKG_plus_StDev[TestGroup].iloc[0]-
232 np.mean(Cqmean.loc[list(HKG.index),TestGroup]) #zieht Mittelwert (arith
233 metic) der Cq-Werte aller HKGs von mittl. Cq+StDev ab
234
235 # print(CqHKGStDev)
236
237 #=====
238 #Standardabweichung der deltaCq-Werte

```

```

239 #=====
240 # Fehlerfortpflanzung der StAbw. der Cq-
241 Werte von GOI und HKG: Fehler(deltaCq)=(Fehler(CqGOI)^2+Fehler(CqHKG)^2
242 )^1/2
243 CqdeltaStDev=pd.DataFrame(columns=TestGroups, index=Cq.index).astype(fl
244 oat).drop(Cq.tail(7).index)
245 for row in CqdeltaStDev.itertuples(index=True):
246     for TestGroup in TestGroups:
247         # print(f'Cqmean: {Cqmean.loc[row[0],TestGroup]}')
248         # print(Cqmean.loc[list(HKG.index),TestGroup])
249         CqdeltaStDev.loc[row[0],TestGroup]=math.sqrt(CqStDev.loc[row[0],Tes
250 tGroup]**2+CqHKGStDev.iloc[0][TestGroup]**2)
251 # print(CqdeltaStDev)
252
253
254
255 #=====
256 #Standardabweichung der deltadeltaCq-Werte
257 #=====
258 # Fehlerfortpflanzung der StAbw. der deltaCq-
259 Werte von Probe und Kontrolle: Fehler(deltadeltaCq)=(Fehler(deltaCqProb
260 e)^2+Fehler(deltaCqKontrolle)^2)^1/2
261 # CqdeltadeltaStDev=Cqdelta[Sample]
262 CqdeltadeltaStDev=pd.DataFrame(columns=[Sample[0]], index=Cq.index).ast
263 ype(float).drop(Cq.tail(7).index).drop(list(HKG.index))
264 # print(CqdeltadeltaStDev)
265 for row in CqdeltadeltaStDev.itertuples(index=True):
266     # print(f'CqdeltaStDev Sample: {CqdeltaStDev.loc[row[0],Sample][0]}')
267     # print(f'CqdeltadeltaStDev: {math.sqrt(CqdeltaStDev.loc[row[0],Sampl
268 e[0]**2+CqdeltaStDev.loc[row[0],ContrSample[0]**2)}')
269     CqdeltadeltaStDev.loc[row[0],Sample]=math.sqrt(CqdeltaStDev.loc[row[0
270 ],Sample[0]**2+CqdeltaStDev.loc[row[0],ContrSample[0]**2)
271 # print(f'CqdeltadeltaStDev: {CqdeltadeltaStDev}')
272
273
274 #=====
275 #deltadeltaCq +/- StDev
276 #=====
277 #fasst Werte für deltadeltaCq mit Bereich deltadeltaCq +/- StAbw. in ei
278 ner Tabelle zusammen
279 # Cqdeltadelta_plus_StDev=Cqdeltadelta
280 Cqdeltadelta_plus_StDev=pd.DataFrame(columns=[Sample[0]], index=Cq.inde
281 x).astype(float).drop(Cq.tail(7).index).drop(list(HKG.index))
282 Cqdeltadelta_plus_StDev[Sample[0]]=Cqdeltadelta[Sample[0]]
283 Cqdeltadelta_plus_StDev['- StDev']=Cqdeltadelta[Sample[0]]-
284 CqdeltadeltaStDev[Sample[0]]
285 Cqdeltadelta_plus_StDev['+ StDev']=Cqdeltadelta[Sample[0]]+Cqdeltadelta
286 StDev[Sample[0]]
287 # print(Cqdeltadelta_plus_StDev)
288
289
290
291 #=====
292 #T-Test
293 #=====
294 #p-
295 values anhand von P4 ObM vs. P5 ObM und ACVR1 und COL15A1 in Graphpad m
296 anuell überprüft. Stimmt.
297 pvalues=pd.DataFrame(index=Cq.index).astype(float).drop(Cq.tail(7).inde
298 x)

```

```

299 pvalues[Sample]=scipy.stats.ttest_ind_from_stats(np.array(Cqdelta[Sample]
300 e)), np.array(CqdeltaStDev[Sample]), len(Cq[Sample].columns), np.array(
301 Cqdelta[ContrSample]), np.array(CqdeltaStDev[ContrSample]), len(Cq[Contr
302 rSample].columns), equal_var=True)[1]
303 # print(pvalues)
304
305 #=====
306 #Regulation
307 #=====
308 Reg=Cqdelta_delta_plus_StDev.apply(lambda x: exp2(x)) #berechnet fold-
309 regulation als deltadelta-Cq-Werten (und aus deltadeltaCq +/- StAbw.)
310 # print(Reg)
311 #Notiz: fold regulation aus expression data: -1/x

```

5.2.3.2. Export 1

```

1 #=====
2 #Export Regulation to csv, download
3 #=====
4
5 from google.colab import files
6 from datetime import date
7
8 FilenameReg=str(date.today().strftime("%y%m%d")+ '_' +Sample[0].replace(
9 '/', ''))+ ' vs. ' +ContrSample[0].replace('/', '')+'.csv' # Datei wird bena
10 nnt "Sample vs. Kontrolle" nach Zuordnung oben
11
12 Reg.to_csv(FilenameReg, sep=',')
13 files.download(FilenameReg)

```

5.2.3.3. Export 2

```

1 #=====
2 #Export signifikante Regulation + p-values to csv, download
3 #=====
4 from google.colab import files
5 from datetime import date
6
7 SignificantReg=pd.DataFrame(index=Cq.index).astype(float).drop(Cq.tail(
8 7).index)
9 SignificantReg[Sample]=Reg[Sample]
10 SignificantReg[str('p-value '+Sample[0])]=pvalues[Sample]
11 SignificantReg=SignificantReg.drop(SignificantReg[SignificantReg['p-
12 value '+Sample[0]]>0.05].index).dropna()
13
14 FilenameSigReg=str(date.today().strftime("%y%m%d")+ '_' +Sample[0].replac
15 e('/', ''))+ ' vs. ' +ContrSample[0].replace('/', '')+'_signifikant.csv' #
16 Datei wird benannt "Sample vs. Kontrolle" nach Zuordnung oben
17
18 SignificantReg.to_csv(FilenameSigReg, sep=',')
19 files.download(FilenameSigReg)

```

5.2.3.4. Clustergram

```

1 #=====
2 #Clustergram
3 #=====
4 ExprLevels=-1*Cqdelta.dropna() #trägt deltaCq-
5 Werte in clustergram, invertiert, damit kleine deltaCq = hohe Expressio
6 n in rot dargestellt werden
7 # ExprLevels=Cqdelta.dropna().apply(lambda x: exp2(x)) #plottet 2^-
8 deltaCq in Clustergram; nicht verwenden, da Unterschiede in wenig expri
9 mierten Genen kaum erkennbar sind
10
11 #Umrechnung in z-score:

```

```

12 # ExprLevels_=pd.DataFrame(index=ExprLevels.index).astype(float).drop(E
13 xprLevels.tail(7).index)
14 # for column in ExprLevels.columns: #z-
15 score: median pro sample abziehen, teilen durch Standardabweichung pro
16 Sample
17 # ExprLevels_[column]=(ExprLevels[column]-
18 np.median(ExprLevels[column]))/np.std(ExprLevels[column])
19
20 dash_bio.Clustergram(
21     data=ExprLevels,
22     cluster='all',
23     column_labels=list(ExprLevels.columns.values),
24     row_labels=list(ExprLevels.index),
25     center_values=False, #True: zentriert alle Werte um den Mittelwert
26 aller Werte
27     row_dist='euclidean',
28     col_dist='euclidean',
29     standardize='none',
30     link_method='average',
31     optimal_leaf_order=True,
32     height=1000,
33     width=600,
34     tick_font={'size': 9},
35     display_ratio=[0.5, 0.1],
36     color_map= [[0.0, '#DA2A0B'], [(-
37 min(ExprLevels.min())/ (max(ExprLevels.max()) -
38 min(ExprLevels.min()))), '#FFFFFF'], [1.0, '#0613C6']]
39     #rot-weiß-blau

```

Für die Auswertung der qPCR-Daten des Versuchs zur mechanischen Stimulation von primären, humanen Osteoblasten in Fibringelen durch ‚confined compression‘ (siehe Kapitel 5.2.12) wurde eine abgewandelte Auswertung durchgeführt. Hier wird nach dem Einlesen der Daten die Qualitätskontrolle durchgeführt wie oben beschrieben. Für die quantitative Auswertung werden als ΔCq -Werte dagegen zunächst die Differenz aus Cq-Wert jedes Gens und Cq-Wert der Referenzgene für jedes Replikate des Versuchs einzeln berechnet. Nun werden, erneut einzeln für jedes Versuchsreplikate, $\Delta\Delta Cq$ -Werte als Differenzen der ΔCq -Werte von Kontrollgruppe und Versuchsgruppe berechnet. Erst danach werden die $\Delta\Delta Cq$ -Werte gemittelt und zur Regulationsstärke umgerechnet wie oben beschrieben. Es wird aber abweichend von der vorher beschriebenen Variante die Standardabweichung der gemittelten $\Delta\Delta Cq$ -Werte direkt aus den $\Delta\Delta Cq$ -Werten der Replikate berechnet, nicht über eine Fehlerfortpflanzung.

Mit dieser Berechnungsmethode wird ein paarweiser Vergleich der Expressionsaktivitäten zwischen Kontrollgruppe und Versuchsgruppe für jedes Replikate des Versuchs möglich. Da die untersuchten Zellen in der Kontrollgruppe (unkomprimierte Gele) und der Versuchsgruppe (komprimierte Gele) vor der Kompression keine unterschiedlichen Bedingungen erfahren - beide Gruppen von Gelen stammen aus derselben Gießform und werden erst kurz vor dem Versuch umgesetzt - ist es sinnvoll, zunächst die Unterschiede in der Expressionsaktivität zwischen Zellen der nicht komprimierten Kontrollgele und der Zellen in komprimierten Gelen zu betrachten und erst anschließend über alle Versuchsreplikate zu mitteln. Mögliche Unterschiede in der Expressionsaktivität zwischen den Replikaten, die sich eventuell aus der vorherigen Behandlung der Zellen ergeben und daher nicht komprimierte und komprimierte Zellen in gleichem Maße betreffen, können so eliminiert werden und schlagen sich dadurch nicht in einer größeren Standardabweichung der $\Delta\Delta Cq$ -Werte nieder. Der Betrag der $\Delta\Delta Cq$ -Werte, also auch der Regulationsstärke, ändert sich dagegen im Vergleich zur vorher beschriebenen Auswertungsvariante nicht. Es wird in der hier beschriebenen Methode der Auswertung dementsprechend auch ein gepaarter T-Test durchgeführt. Der Quellcode für die Variante mit gepaarter Auswertung ist vollständig im Anhang dieser Arbeit zu finden.

5.2.4. Änderungen der Mediumkomposition gehen mit unspezifischen Änderungen der Genexpressionsmuster und Verringerung der Proliferationsgeschwindigkeit einher

Zur Identifizierung von geeigneten Zellkulturbedingungen für die Kultur von primären, humanen Osteoblasten vor und während der geplanten Kompressionsversuche wurden die Expressionsmuster der Zellen nach Kultur in zwei Passagen und in verschiedenen Medien mithilfe von qPCR-Arrays mit Genen aus dem Kontext Osteogenese untersucht. Abbildung 40 zeigt die dabei gemessenen Genexpressionsaktivitäten in einer Übersicht. Tabelle 6 bis Tabelle 8 geben die signifikant regulierten Gene in den getesteten Kulturbedingungen an.

Beim Vergleich der Passagen 4 und 5 war fast kein signifikanter Unterschied in den Genexpressionsmustern der Zellen zu beobachten (Abbildung 40C, Tabelle 7). Lediglich das Gen für Kollagen Typ 15 $\alpha 1$ (*COL15A1*) war signifikant, wenn auch schwach hochreguliert (1,92-fach). Die hier verwendeten Osteoblasten verhalten sich im Kontext Osteogenese also offenbar in den getesteten Passagen sehr ähnlich, es ergibt sich aus diesen Versuchen keine Notwendigkeit eine der beiden Passagen für weitere Versuche auszuschließen. Zusammen mit den Erkenntnissen aus der Verfolgung der Zellproliferation wurde daher entschieden, für alle Versuche zur Zellcharakterisierung und mechanischer Zellstimulierung Zellen in Passage 5 zu verwenden, da hier aus der limitierten Zahl an Ausgangszellen durch einen weiteren Expansionsschritt mehr Zellen für Versuche gewonnen werden konnten.

Der Vergleich der Expressionsmuster der Osteoblasten bei Kultivierung in verschiedenen Mediumvariationen zeigt größere Unterschiede. Zellen in Passage 4 reagierten auf das Fehlen von Serum im Medium (ObM -Serum) mit Hochregulation einer Reihe von Genen auf den Osteogenese-qPCR-Arrays (Tabelle 6). Wurden zusätzlich auch die Wachstumsfaktoren dem Medium nicht hinzugefügt (ObM -Serum -ObGS), wurden einige der gleichen Gene ebenfalls aktiviert (*CDH11*, *COL14A1*, *COL3A1*, *CTSK*), einige weitere herunterreguliert. Die Übereinstimmungen in den Genregulationsänderungen zwischen diesen beiden Kulturbedingungen erscheinen aber zu klein, um von einem eindeutigen Muster auszugehen.

Mit den Listen der signifikant regulierten Genen wurde eine Datenbanksuche in DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) durchgeführt. Bei dieser Suche wird analysiert, ob die eingegebenen Gene gemeinsame Verbindungen zu bestimmten biologischen Prozessen haben („functional annotation“). Die Datenbank enthält formalisierte Informationen zur Funktion von Genen und der funktionalen und regulatorischen Verknüpfungen zwischen ihnen (siehe Kapitel 4.17).¹⁴²

Für Zellen in Passage 4 nach Kultur in ObM -Serum ergab die Datenbanksuche jedoch keine spezifischen und damit relevanten Treffer. Lediglich grob definierte Gebiete wie „collagen“, „skeletal system development“ oder „cell-cell-adhesion“ wurden ausgegeben. Keine dieser Zuordnungen enthielt mehr als 4 der eingegebenen Gene, sie erscheinen daher alle wenig aussagekräftig.

Für die Regulationsmuster von Zellen (P4) in ObM -Serum -ObGS ergab die Datenbanksuche einige scheinbar verwandte Treffer. „wound healing“ (*COL3A1*, *FGF1*, *FGF2*, *TGFB3*, *TGFBR2*), „mitogen“ (*FGF1*, *FGF2*, *TGFB3*, *VEGFB*), „secreted“ (*CTSK*, *COL3A1*, *COL14A1*, *FGF1*, *FGF2*, *TGFB3*, *TGFBR2*, *VEGFB*), „positive regulation of angiogenesis“ (*FGF1*, *FGF2*, *TGFBR2*, *VEGFB*) mit den jeweils angegebenen damit verbundenen Genen. Drei dieser vier biologischen Prozesse weisen eine gewisse Ähnlichkeit auf, da Wundheilung in der Regel mit Zellteilung („mitogen“) und Angiogenese einhergeht. Lediglich „secreted“ ist mit diesem Bereich nicht auf den ersten Blick verbunden. Gleichzeitig weisen die drei Bereiche aber eine große Überschneidung der für sie annotierten Gene auf. Ihr gleichzeitiges Auftreten geht also vielleicht eher auf eine Ähnlichkeit der ausgegebenen Prozesse zurück, als auf eine besondere Betonung dieser Prozesse im hier beschriebenen Versuch.

Zellen in Passage 5 nach Kultur in ObM -Serum ergaben in der Datenbanksuche lediglich Treffer mit drei oder weniger verknüpften Genen: „extracellular matrix organization“ (*SOX9*, *COL5A1*, *COL15A1*), „negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter“, bzw. „negative regulation of gene expression“ (*SMAD5*, *SOX9*, *IGF2*, *VEGFA*), „negative regulation of apoptotic process“ und „positive regulation of cell proliferation“ (*SMAD5*, *SOX9*, *VEGFA*). Aufgrund der kurzen Liste von

signifikant regulierten Genen ist dieses Ergebnis nicht überraschend, eine Bewertung ist daher aber schwierig.

Da in Zellen in Passage 5 nach Kultur in ObM -Serum -ObGS lediglich drei Gene signifikant reguliert waren, ergab eine Datenbanksuche mit DAVID hier keine relevanten Ergebnisse.

Der Vergleich der regulierten Gene in Zellen derselben Passage mit verschiedenen Mediumvariationen zeigt keine großen Übereinstimmungen. In Passage 4 waren in ObM Serum und ObM -Serum -ObGS nur *CDH11*, *COL14A1*, *COL3A1* und *CTSK* gleichartig reguliert, eine Datenbanksuche mit dieser Liste ergab keine Hinweise auf eine gemeinsame Beteiligung an konkreten biologischen Prozessen. Der entsprechende Vergleich in Passage 5, sowie der Vergleich im selben Medium zwischen den verschiedenen Passagen ergab keine Übereinstimmung bei mehr als einem Gen und lässt daher keine weitere Analyse zu.

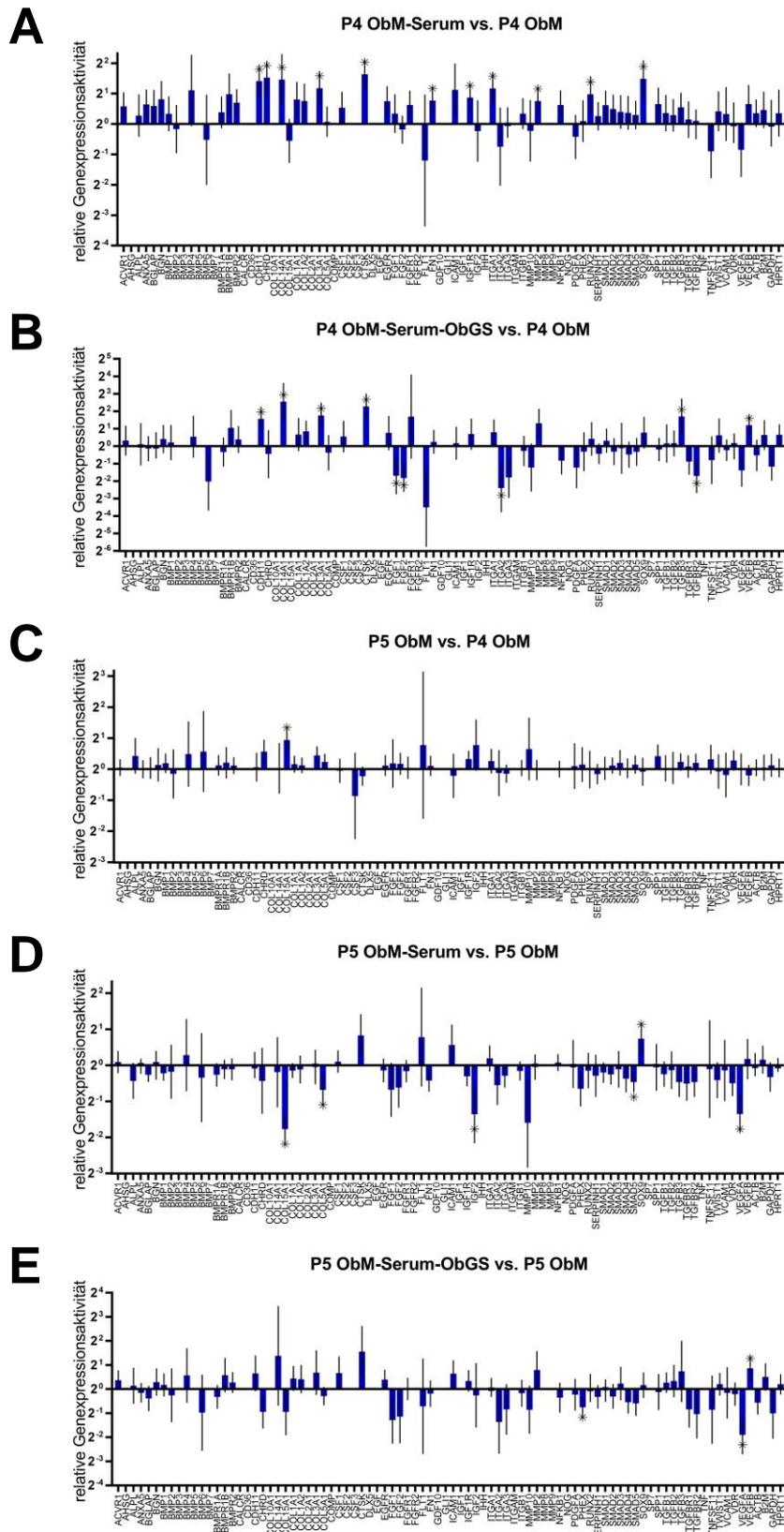


Abbildung 40: Übersicht über die relativen Genexpressionsaktivitäten von primären, humanen Osteoblasten in A,B: Passage 4, C, D, E: Passage 5 nach Kultur in A, D: ObM -Serum, B, E: ObM -Serum -ObGS, C: ObM im Vergleich zur Kultur A, B, D, E: der entsprechenden Passage in ObM, C: von Passage 4; *: statistisch signifikante Genexpressionsänderung, $p < 0,05$; $n=3$

Tabelle 6: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **Passage 4** nach Kultur in links: ObM -Serum, rechts: ObM -Serum -ObGS, im Vergleich zu P4 in ObM

P4 ObM -Serum			P4 ObM -Serum -ObGS		
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	Gen	Expressionsaktivität	p-Wert
<i>CDH11</i>	2.66	0.0103	<i>CDH11</i>	2.96	0.0177
<i>CHRD</i>	2.88	0.0088	<i>COL14A1</i>	5.83	0.0150
<i>COL14A1</i>	2.76	0.0401	<i>COL3A1</i>	3.39	0.0144
<i>COL3A1</i>	2.27	0.0219	<i>CTSK</i>	4.83	0.0058
<i>CTSK</i>	3.11	0.0043	<i>FGF1</i>	0.31	0.0495
<i>FN1</i>	1.71	0.0445	<i>FGF2</i>	0.28	0.0166
<i>IGF1R</i>	1.83	0.0290	<i>ITGA2</i>	0.19	0.0403
<i>ITGA1</i>	2.26	0.0187	<i>TGFB3</i>	3.26	0.0459
<i>MMP2</i>	1.69	0.0470	<i>TGFBR2</i>	0.31	0.0390
<i>RUNX2</i>	1.97	0.0457	<i>VEGFB</i>	2.29	0.0278
<i>SOX9</i>	2.81	0.0132			

Tabelle 7: Übersicht über das statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierte Gen im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in P5 nach Kultur in ObM, im Vergleich zu P4 in ObM

P5 ObM		
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert
<i>COL15A1</i>	1.92	0.0152

Tabelle 8: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **Passage 5** nach Kultur in links: ObM-Serum, rechts: ObM -Serum -ObGS, im Vergleich zu P5 in ObM

P5 ObM -Serum			P5 ObM -Serum -ObGS		
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	Gen	Expressionsaktivität	p-Wert
<i>COL15A1</i>	0.29	0.0012	<i>PHEX</i>	0.59	0.0453
<i>COL5A1</i>	0.62	0.0490	<i>VEGFA</i>	0.27	0.0146
<i>IGF2</i>	0.39	0.0435	<i>VEGFB</i>	1.82	0.0477
<i>SMAD5</i>	0.72	0.0427			
<i>SOX9</i>	1.67	0.0477			
<i>VEGFA</i>	0.39	0.0103			

Eine weitere Methode zur Identifikation von Mustern in mehrdimensionalen Genexpressionsdaten ist das hierarchische Clustering. Hierbei werden die vermessenen Gene nach Ähnlichkeit ihrer Genexpressionsänderungen sortiert. Ändert sich die die Expression von zwei Genen in der Summe der verschiedenen Versuchsbedingungen ähnlich, werden die beiden Gene zusammen in ein Cluster einsortiert. Die entstehenden Cluster werden untereinander erneut verglichen und entsprechend hierarchisch eingeordnet. Dabei werden sowohl ähnlich exprimierte Gene, als auch Versuchsbedingungen mit ähnlichen Effekten auf die Genexpressionsmuster geclustert. Dendrogramme zeigen die Verhältnisse zwischen den Clustern in Baumform an. Das Ergebnis eines solchen Clusterings mit den Genexpressionsdaten der Zellen in P4 und P5 in ObM / ObM -Serum / ObM -Serum -ObGS ist in Abbildung 41 dargestellt.

Zu erkennen ist, dass zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen keine klaren Gemeinsamkeiten in der Veränderung der Genexpressionsaktivitäten der einzelnen Gene zu erkennen sind. Schwankungen in der Expression scheinen zufällig zu sein. Die getesteten Versuchsbedingungen könnten zum Beispiel umso größere Änderungen in den Genexpressionsmustern vermuten lassen, je mehr sich die getesteten Medienbedingungen ähneln. Das dies nicht zu beobachten ist, wird bestätigt durch das Ergebnis des Clusterings der Versuchsbedingungen. Im Clustering werden zwar die Proben in vollständigem Medium (P4 ObM und P5 ObM) als am ähnlichsten erkannt, alle weiteren Medienbedingungen oder Unterschiede in der Passage sind im folgenden Clustering aber scheinbar zufällig angeordnet. Ein Zusammenhang

zwischen Medienbedingungen und Passage auf der einen und den Genexpressionsmustern auf der anderen Seite ist nicht erkennbar.

Beim Vergleich der Expressionsmuster zwischen den verschiedenen Genen zeigt sich ein ähnliches Bild. Zwar gibt es deutliche Unterschiede in der Expressionsaktivität ($-2.52 < \Delta Cq < 13.58$), es ist allerdings keine Gruppe von Genen zu erkennen, die unter bestimmten Kulturbedingungen gemeinsam und verschieden vom Rest der gemessenen Gene reguliert wäre. Das Clustering der Gene untereinander scheint vielmehr die durchschnittliche Expression über alle Versuchsbedingungen nachzuvollziehen.

Klassische Osteoblasten-Differenzierungsmarker wie Osteopontin (SPP1), Osteocalcin (BGLAP) oder RUNX2 sind im Clustergram unabhängig vom verwendeten Medium klar als sehr schwach exprimiert zu erkennen (dunkelblaue Färbung), was angesichts der (angenommenen) Identität der kultivierten Zellen als Osteoblasten überrascht. Gene mit Bezug zur extrazellulären Matrix scheinen unter den signifikant regulierten Genen in diesem Versuch leicht überrepräsentiert zu sein (siehe Abbildung 41 und Tabelle 6 bis Tabelle 8). Es ist aber davon abgesehen kein offensichtliches Muster zu beobachten. Insbesondere sind offenbar auch keine Prozesse vom Fehlen von Serum und/oder Wachstumsfaktoren im Medium beeinflusst, die die Expression von osteoblastenspezifischen Biomarkern oder die Osteoblastendifferenzierung betreffen.

Für die weiteren Versuche wurde mit dem vollständigen Osteoblastenmedium (ObM) weitergearbeitet. Bei Kultur in Medium ohne Serum und umso mehr in Medium ohne Serum und Wachstumsfaktoren war eine sehr stark verringerte Proliferationsgeschwindigkeit zu verzeichnen. Während Zellen in ObM nach 4 bis 5 Tagen Konfluenz erreicht hatten, waren Zellen in ObM -Serum und ObM -Serum -ObGS auch bis zu 15 Tage nach Aussäen noch nicht konfluent. Dies steht in einem gewissen Widerspruch zu der oben gefundenen Zuordnung der regulierten Gene zu proliferativen Prozessen, der sich ohne weitere Untersuchungen nicht aufklären lässt. Es wäre allerdings aufgrund dieser verringerten Vermehrungsgeschwindigkeit nicht möglich gewesen, bei Verwendung von nicht vollständigem Medium in annehmbaren Zeiträumen ausreichend viele Zellen für die folgenden Versuche zu gewinnen.

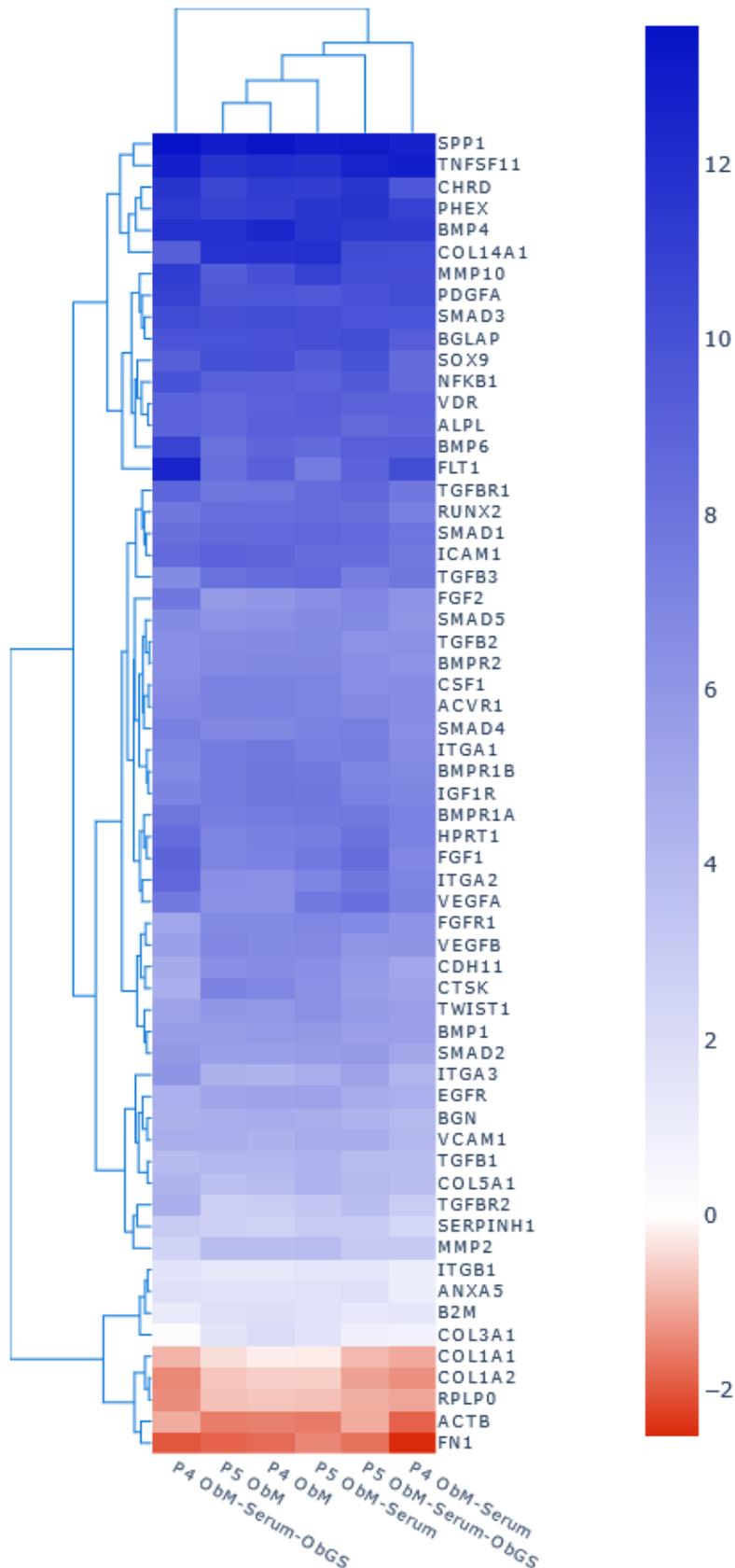


Abbildung 41: Clustergram der Genexpressionsmuster von primären Osteoblasten in verschiedenen Passagen (P4, P5) in verschiedenen Mediumvariationen (ohne Serum, ohne Serum und ohne ObGS); farbcodiert aufgetragen sind die Genexpressionsaktivitäten aller im qPCR gemessenen Gene als ΔCq -Werte (Cq-Wert des jeweiligen Gens minus Cq-Wert des Referenzgens), blau zeigt geringere Expression an, rot stärkere Expression als das Referenzgen; hierarchisches Clustering mit ‚average-linkage‘, euklidische Distanzmetrik

5.2.5. Primäre, humane Osteoblasten exprimieren Adhäsionsproteine in nicht-typischen Lokalisierungen und weisen eine eingeschränkte Adhäsion auf

Neben der Fähigkeit zu mineralisieren, sind für eine physiologische Osteoblastenfunktion, insbesondere für die Mechanotransduktion, auch ein voll ausgebildetes und funktionsfähiges Zytoskelett sowie Zell-Matrix-Kontakte essentiell. Daher wurden die hier verwendeten primären, humanen Osteoblasten auch in dieser Hinsicht charakterisiert.

Dafür sollten das Zytoskelett mittels Phalloidin, sowie die für den Zell-Matrix-Kontakt zuständigen Fokaladhäsionen mittels Immunfluoreszenzfärbung verschiedener Fokaladhäsionsproteine sichtbar gemacht werden. Angefärbt wurden Paxillin, Vinculin und die fokale Adhäsionskinase (FAK), sowie die Ankerproteine Integrin $\beta 1$ und Integrin $\beta 3$. Alle diese Proteine sind in der Regel an Fokaladhäsionen lokalisiert und haben dort ihre Funktion. Bei den hier gefärbten primären humanen Osteoblasten war für alle diese Proteine zwar eine spezifische Färbung zu beobachten (Abbildung 42 links), die Lokalisation in Fokaladhäsionen war allerdings nur für Paxillin und Vinculin zu verzeichnen (Abbildung 42 A, Abbildung 43). Auch diese sichtbare Lokalisation war für Paxillin und - noch stärker ausgeprägt - für Vinculin nur in einem Teil der Zellen zu sehen. In den restlichen Zellen war auch für diese Proteine eine diffuse Verteilung im gesamten Zytosol zu sehen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Osteoblasten möglicherweise keine vollständig ausgeprägten und intakten Fokaladhäsionen bildeten, obwohl sie die hier analysierten Fokaladhäsionsproteine exprimieren.

Darüber hinaus gab es auch innerhalb eines Präparats deutliche Unterschiede darin, inwieweit die Zellen nach der Färbung noch vollständig intakt waren. Während einige Zellen die normale, ausgebreitete Zellmorphologie aufwiesen (Abbildung 42 links), hatte ein etwa gleich großer Anteil stark verzerrte Morphologien mit scheinbar kollabierten Zellausläufern und Zellkörpern (Abbildung 42 rechts). Da diese Beobachtung selbst bei vorsichtigster Behandlung der Präparate und in jeder Färbung mit den hier verwendeten primären, humanen Osteoblasten, aber nicht bei Färbung anderer Zellen gemacht wurde (Daten nicht gezeigt), ist nicht von einem reinen Artefakt durch falsche Probenbehandlung auszugehen. Die trotzdem vorhandene Färbung aller der hier untersuchten Proteine, sowie von Actin und DNA weist daraufhin, dass die Zellen bis zum Zeitpunkt der Fixierung wohl noch intakt und aktiv waren.

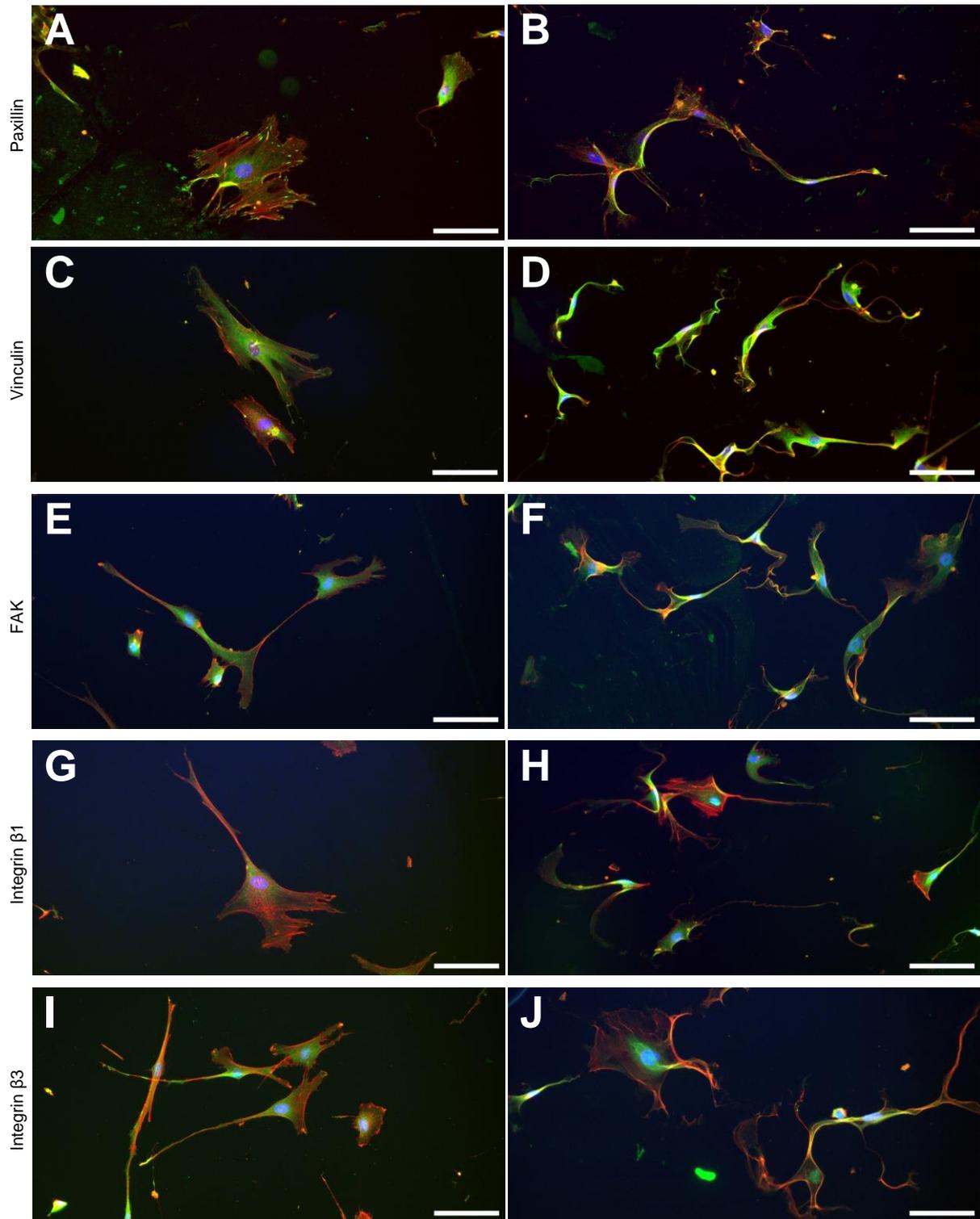


Abbildung 42: primäre, humane Osteoblasten auf Glasoberflächen; Färbung von Zytoskelett und Fokaladhäsionsproteinen; blau: DNA, rot: Actin, grün: A, B: Paxillin; C, D: Vinculin; E, F: fokale Adhäsionskinase (FAK); G, H: Integrin β 1; I, J: Integrin β 3; Maßstabsbalken: 100 μ m

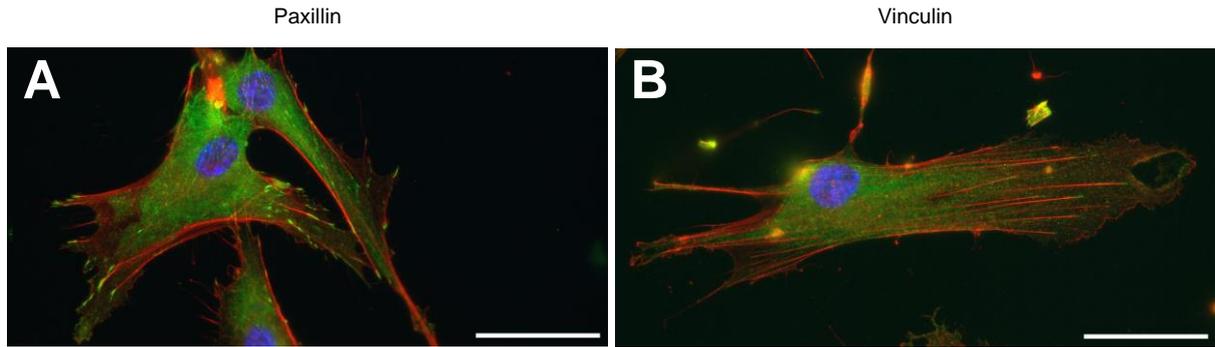


Abbildung 43: primäre, humane Osteoblasten auf Glasoberflächen; Färbung von Zytoskelett und Fokaladhäsionsproteinen; blau: DNA, rot: Actin; A: grün: Paxillin; B: grün: Vinculin
Maßstabsbalken: 50 µm

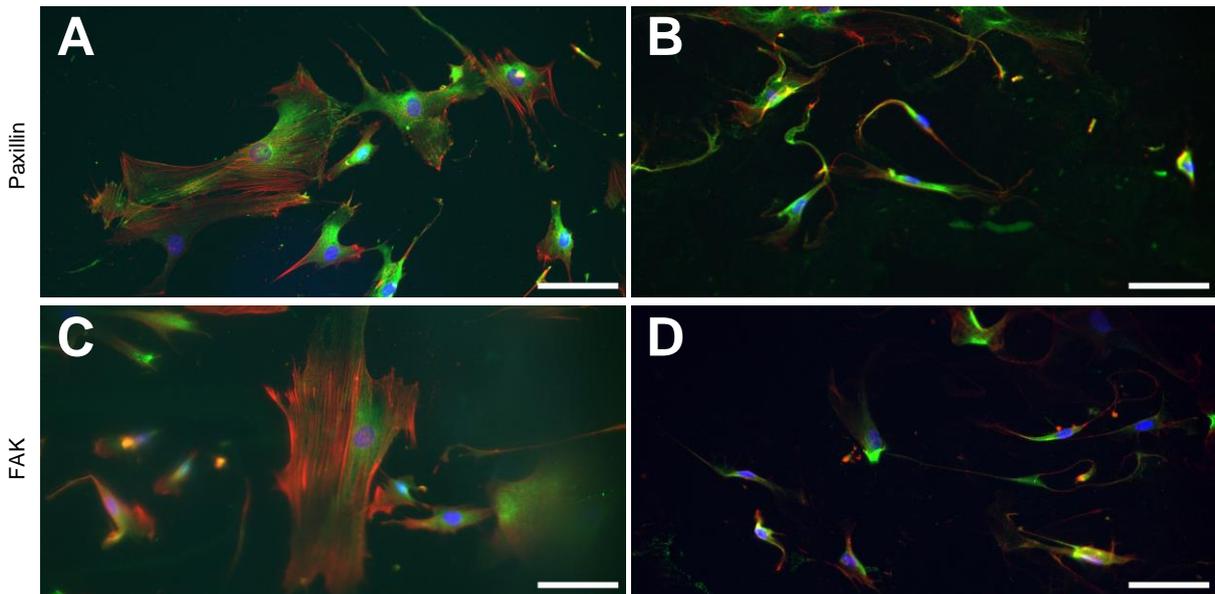


Abbildung 44: primäre, humane Osteoblasten auf Fibronectin-beschichteten Glasoberflächen; Färbung von Zytoskelett und Fokaladhäsionsproteinen; blau: DNA, rot: Actin, grün: A, B: Paxillin; C, D: fokale Adhäsionskinase (FAK); Maßstabsbalken: 100 µm

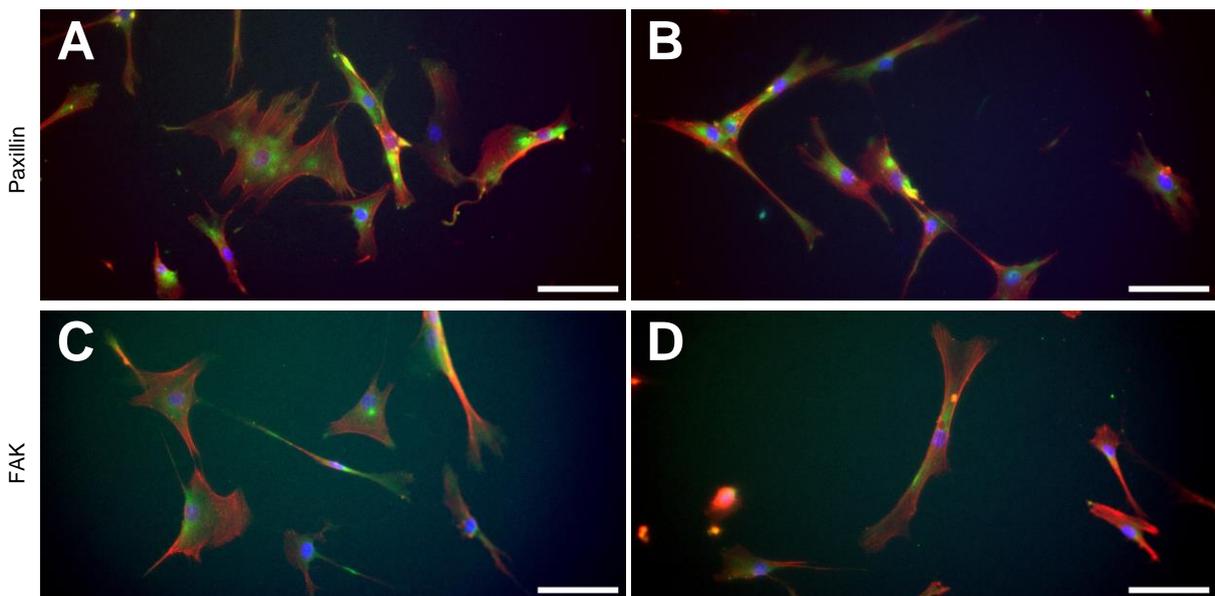


Abbildung 45: primäre, humane Osteoblasten auf Kunststoffoberflächen; Färbung von Zytoskelett und Fokaladhäsionsproteinen; blau: DNA, rot: Actin, grün: A, B: Paxillin; C, D: fokale Adhäsionskinase (FAK); Maßstabsbalken: 100 µm

Um zu untersuchen, ob die Osteoblasten auf anderen Oberflächen besser adhären können und dort vielleicht in größerem Ausmaß intakte Fokaladhäsionen ausbilden, wurden die Zellen auch auf Kunststoff (Polyvinylchlorid) sowie Fibronectin-beschichteten Oberflächen ausgesät und ebenfalls immunzytochemisch gefärbt.

Die Beschichtung von Glasoberflächen resultierte weder in einem signifikanten Unterschied in der Ausbildung von Fokaladhäsionen der Osteoblasten, noch in einer Veränderung ihrer Adhäsion auf der Oberfläche. Es waren weiterhin nur einige Zellen zu beobachten, die eine klare Lokalisation von Paxillin in Fokaladhäsionen aufwiesen, für die fokale Adhäsionskinase war das weiterhin nicht der Fall (Abbildung 44 A, C), auch wenn alle Zellen diese Proteine exprimierten. Gleichzeitig war aber weiterhin auch die Adhäsion der Zellen nicht stärker ausgeprägt, als auf nicht beschichteten Glasoberflächen, da auch bei Fibronectin-Beschichtung weiterhin viele Zellen während der Färbung beschädigt wurden (Abbildung 44 B, D).

Bei der Kultivierung von Osteoblasten auf Kunststoffoberflächen war zwar die Expression von Paxillin und fokaler Adhäsionskinase zu verzeichnen, allerdings konnte hier für keines dieser Proteine eine klare Lokalisation in Fokaladhäsionen beobachtet werden. Vielmehr wurden hier beide Proteine in allen beobachteten Zellen diffus im gesamten Zytosol gefunden (Abbildung 45). Auch die Kultivierung auf Kunststoffoberflächen hatte also keinen verbessernden Effekt auf die Ausbildung vollständiger und intakter Fokaladhäsionen in den hier verwendeten Osteoblasten.

5.2.6. Stimulation von primären Osteoblasten mit BMP-2 resultiert nicht in eindeutigen Genregulationsmustern

Die im Projekt verwendeten primären, humanen Osteoblasten wurden mit BMP-2 stimuliert, um zu untersuchen, inwiefern sie grundsätzlich ihre zellulären Funktionen im Kontext Osteogenese und Knochengeweberegeneration in Reaktion auf externe Reize aktivieren können. Abbildung 46 und Abbildung 47 zeigen als Übersicht die Expressionsaktivitäten von Osteogenese genen der Osteoblasten nach Stimulierung mit 50 beziehungsweise 300 ng/ml BMP-2 für 2 beziehungsweise 7 Tage in ObM beziehungsweise ObM -Serum. Die je nach Versuchsbedingung statistisch signifikant regulierten Gene sind in den folgenden Tabellen aufgelistet (Tabelle 9 bis Tabelle 16).

Auch mit diesen Listen wurde eine Datenbanksuche in DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) und zusätzlich im PANTHER Classification System durchgeführt, um Muster in den Genexpressionsdaten zu finden und Zuordnungen zu bekannten biologischen Prozessen herzustellen („functional annotation“). Die vier in der Datenbank abgelegten biologischen Prozessen mit den jeweils besten Übereinstimmungen zu den gemessenen Genexpressionsmustern wurden in Tabelle 9 bis Tabelle 16 eingefügt. Mit x markiert sind die Gene, die mit dem jeweiligen biologischen Prozess verbunden sind.

Die Analyse der Genexpressionsmuster mit DAVID ergab in fast allen Versuchen mit Stimulation in **ObM** die Beeinflussung von Prozessen mit Bedeutung für die extrazelluläre Matrix, Integrin(-bindung) und Kollagen(-bindung) oder Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion. In einigen Fällen wurden Verbindungen zu Zellproliferation beziehungsweise Mitogenen gefunden. Datenbanktreffer zur Stimulierung von BMP-Signalwegen wurden nur in einem Fall gefunden.

Bei Stimulation in **ObM -Serum** mit geringer BMP-2-Konzentration (50 ng/ml) war eine Zuordnung zu biologischen Prozessen nicht möglich oder kaum aussagekräftig, da hier nur sehr wenige Gene statistisch signifikant in ihrer Expression verändert waren. In den Versuchen, in denen eine höhere Konzentration BMP-2 (300 ng/ml) zum Einsatz kam, waren erneut biologische Prozesse mit Bezug zu extrazellulärer Matrix beziehungsweise dem extrazellulären Raum überdurchschnittlich häufig in den Zuordnungen in der Datenbank vertreten. Außerdem wurden Verbindungen zu den TGF β - und BMP-Signalwegen aufgezeigt (ObM -Serum 300 ng/ml, 2 Tage, „TGF-beta signaling pathways“, „positive regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation“, „BMP signaling pathway“).

Lediglich in einem Versuch (300 ng/ml, 7 Tage, ObM -Serum) ergab der Datenbankvergleich biologische Prozesse mit direktem Bezug zu Knochenmineralisierung. Bemerkenswert ist, dass hier

ebenfalls ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang mit der zellulären Reaktion auf mechanische Stimulierung als Ergebnis ausgegeben wurde, die im Versuch ja gar nicht vorlag.

Die Genexpressionsdaten des BMP-2-Versuchs wurden zum Vergleich auch in eine zweite Datenbank zur ‚functional annotation‘ eingegeben. Dieser PANTHER genannten Datenbank liegt eine andere Datenbasis zugrunde. Grundsätzlich verwiesen die in dieser Suche gefundenen Hinweise mit sehr viel weniger Verknüpfungen auf die in der Datenbank abgelegten Prozesse. Die Zuordnung erschien daher weniger spezifisch. Die funktionelle Bandbreite der in der PANTHER Datenbank gefundenen biologischen Prozesse ist im Vergleich zu denen aus DAVID deutlich breiter. Zwar fanden sich ähnliche Prozesse, die sich auf den Kontakt der Zellen zum extrazellulären Raum beziehen („membrane to membrane docking“, „collagen biosynthetic process“), es wurden aber auch einige grundsätzlich andere Prozesse angegeben, wie etwa „positive regulation of vascular endothelial cell proliferation“, die auf den ersten Blick keine Verbindung mit der BMP-2 Stimulierung von Osteoblasten haben. Einige Treffer für die Versuche mit geringerer BMP-2-Konzentration spiegelten aber auch den zu erwartenden Effekt der Stimulierung, der Aktivierung von osteogenetischen Prozessen wider („intramembranous ossification“, „ossification“). Alle Ergebnisse der Datenbanksuche mit PANTHER finden sich im Anhang (Tabelle 19 ff.).

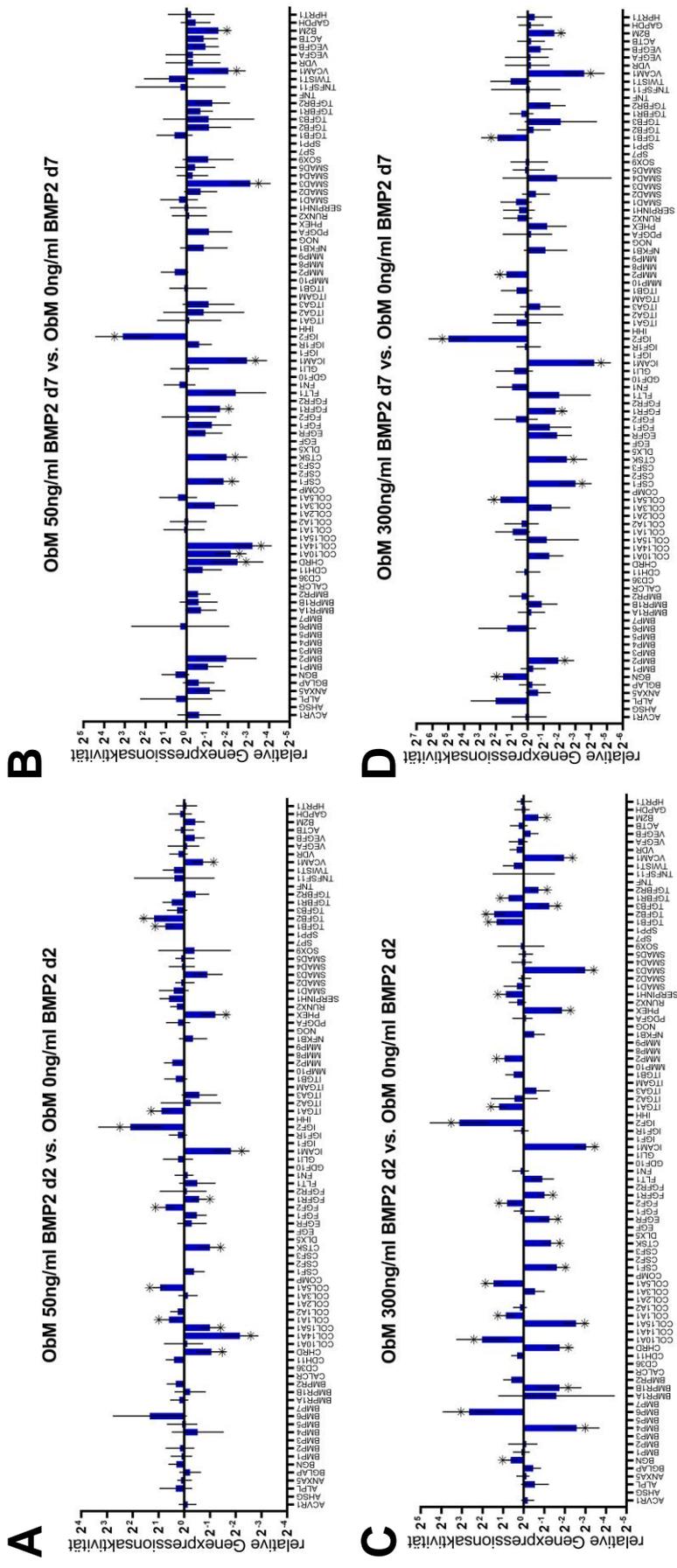


Abbildung 46: Übersicht über die relativen Genexpressionsaktivitäten von primären, humanen Osteoblasten bei Kultur in ObM mit A, B: 50 ng/ml BMP-2, C, D: 300 ng/ml BMP-2 nach A, C: 2 Tagen, B, D: 7 Tagen in Kultur; *: statistisch signifikante Genexpressionsänderung, p<0,05; n=3

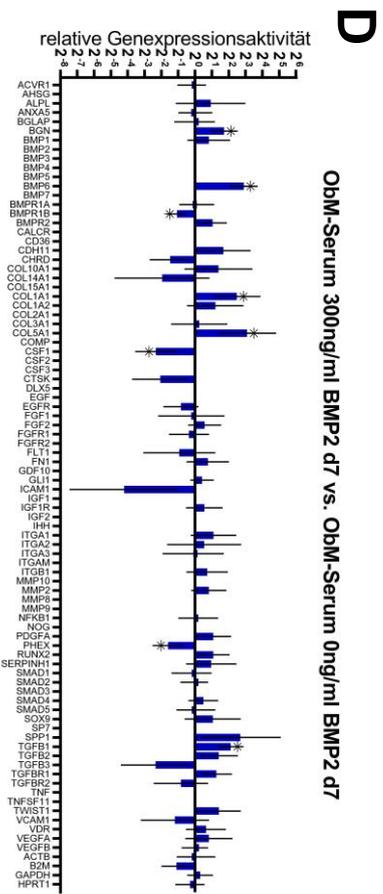
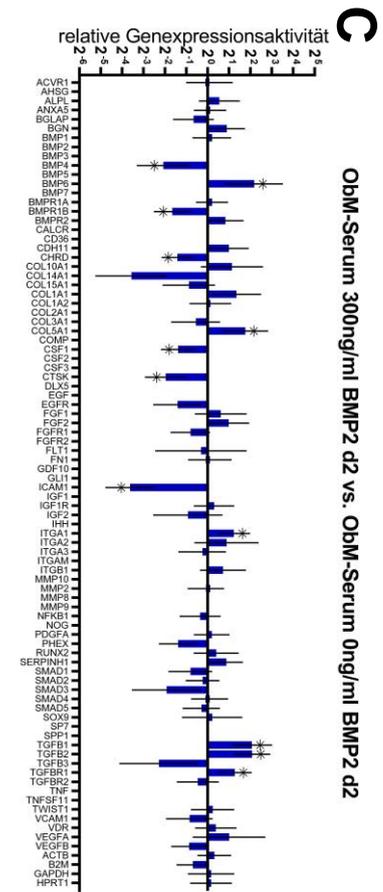
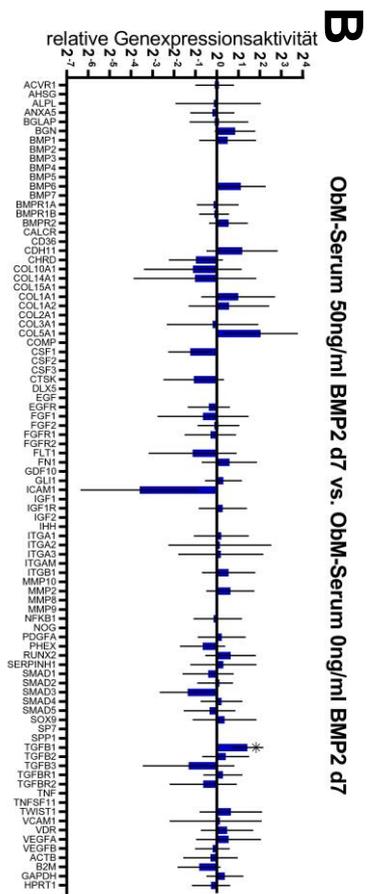
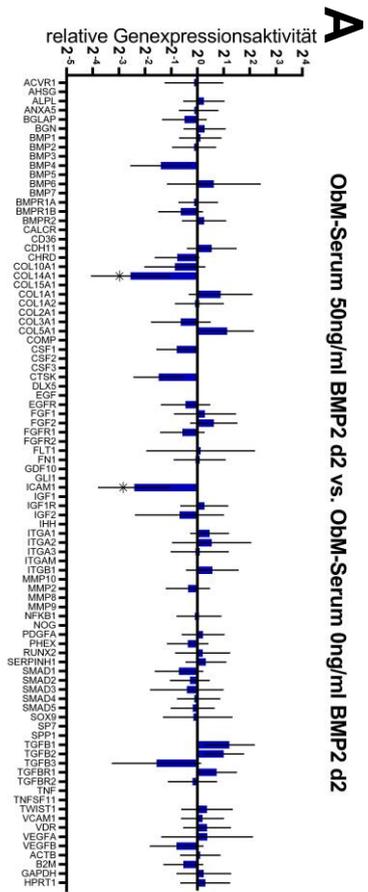


Abbildung 47: Übersicht über die relativen Genexpressionsaktivitäten von primären, humanen Osteoblasten bei Kultur in ObM ohne Serum mit A, B: 50 ng/ml BMP-2, C, D: 300 ng/ml BMP-2 nach A, C: 2 Tagen, B, D: 7 Tagen in Kultur; *, statistisch signifikante Genexpressionsänderung, $p < 0,05$, $n=3$

Tabelle 9: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM** mit **50 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **2 Tage** mit Zuordnung zu den 4 ‚functional annotations‘ der DAVID-Datenbank mit bester Übereinstimmung

50 ng/ml BMP-2, 2 Tage			functional annotation DAVID			
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	extracellular space	extracellular matrix	integrin binding	mitogen
<i>CHRD</i>	0.48	0.0330	x			
<i>COL14A1</i>	0.22	0.0065	x	x		
<i>COL15A1</i>	0.50	0.0098	x	x		
<i>COL1A1</i>	1.51	0.0443	x	x		
<i>COL5A1</i>	1.92	0.0062	x	x	x	
<i>CTSK</i>	0.50	0.0171	x			
<i>FGF2</i>	1.65	0.0162	x		x	x
<i>FGFR1</i>	0.67	0.0313				
<i>ICAM1</i>	0.28	0.0114	x		x	
<i>IGF2</i>	4.30	0.0435	x			x
<i>ITGA1</i>	1.85	0.0150			x	
<i>PHEX</i>	0.43	0.0193				
<i>TGFB1</i>	1.67	0.0182	x	x		x
<i>TGFB2</i>	2.26	0.0232	x	x		x
<i>VCAM1</i>	0.60	0.0366	x		x	

Tabelle 10: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM** mit **50 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **7 Tage** mit Zuordnung zu den 4 ‚functional annotations‘ der DAVID-Datenbank mit bester Übereinstimmung

50 ng/ml BMP-2, 7 Tage			functional annotation DAVID			
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	extracellular space	ER lumen	collagen binding	response to TNF α
<i>CHRD</i>	0.18	0.0266	x			
<i>COL10A1</i>	0.23	0.0085	x	x		
<i>COL14A1</i>	0.11	0.0040	x	x	x	
<i>CSF1</i>	0.29	0.0155	x	x		
<i>CTSK</i>	0.26	0.0293	x		x	x
<i>FGFR1</i>	0.32	0.0136				
<i>ICAM1</i>	0.13	0.0064	x			x
<i>IGF2</i>	8.59	0.0161	x			
<i>SMAD3</i>	0.12	0.0058			x	
<i>VCAM1</i>	0.25	0.0147	x			x
<i>B2M</i>	0.34	0.0120	x	x		

Tabelle 11: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM** mit **300 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **2 Tage** mit Zuordnung zu den 4 ‚functional annotations‘ der DAVID-Datenbank mit bester Übereinstimmung

300 ng/ml BMP-2, 2 Tage			functional annotation DAVID			
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	extracellular space	positive regulation of EMT	wound healing	TGF β pathway
<i>BGN</i>	1.55	0.0441	x			
<i>BMP4</i>	0.17	0.0162	x	x		x
<i>BMP6</i>	6.31	0.0238	x			x
<i>BMPR1B</i>	0.30	0.0474				x
<i>CHRD</i>	0.30	0.0113	x			x
<i>COL10A1</i>	4.07	0.0495	x			
<i>COL15A1</i>	0.17	0.0019	x			
<i>COL1A1</i>	1.83	0.0220	x	x	x	
<i>COL5A1</i>	2.76	0.0058				
<i>CSF1</i>	0.33	0.0064	x			
<i>CTSK</i>	0.40	0.0047	x			
<i>EGFR</i>	0.42	0.0142	x		x	
<i>FGF2</i>	1.75	0.0472	x		x	
<i>FGFR1</i>	0.50	0.0043				
<i>ICAM1</i>	0.12	0.0009	x			
<i>IGF2</i>	8.75	0.0201	x			
<i>ITGA1</i>	2.30	0.0051				
<i>MMP2</i>	1.90	0.0070	x			
<i>PHEX</i>	0.28	0.0021				
<i>SERPINH1</i>	1.83	0.0108	x			
<i>SMAD3</i>	0.13	0.0005		x	x	x
<i>TGFB1</i>	2.50	0.0045	x	x	x	x
<i>TGFB2</i>	2.71	0.0102	x	x	x	x
<i>TGFB3</i>	0.42	0.0179	x	x	x	x
<i>TGFBR1</i>	1.68	0.0315		x	x	x
<i>TGFBR2</i>	0.61	0.0489		x	x	x
<i>VCAM1</i>	0.26	0.0020	x			
<i>B2M</i>	0.61	0.0269	x			

Tabelle 12: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM** mit **300 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **7 Tage** mit Zuordnung zu den 4 ‚functional annotations‘ der DAVID-Datenbank mit bester Übereinstimmung

300 ng/ml BMP-2, 7 Tage			functional annotation DAVID			
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	extracellular space	integrin binding	positive regulation of cell proliferation	positive regulation of cell migration
<i>BGN</i>	2.94	0.0250	x			
<i>BMP2</i>	0.26	0.0287	x		x	x
<i>COL5A1</i>	3.31	0.0214	x	x		
<i>CSF1</i>	0.12	0.0066	x		x	x
<i>CTSK</i>	0.18	0.0283	x			
<i>EGFR</i>	0.28	0.0263	x	x	x	x
<i>FGFR1</i>	0.30	0.0156			x	
<i>ICAM1</i>	0.05	0.0022	x	x		
<i>IGF2</i>	31.85	0.0024	x	x	x	
<i>MMP2</i>	2.54	0.0398	x			x
<i>TGFB1</i>	3.73	0.0338	x		x	x
<i>VCAM1</i>	0.08	0.0085		x		
<i>B2M</i>	0.31	0.0167	x			

Tabelle 13: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM -Serum mit 50 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM-Serum mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **2 Tage** mit Zuordnung zu den 4 ‚functional annotations‘ der DAVID-Datenbank mit bester Übereinstimmung

50 ng/ml BMP-2, 2 Tage			functional annotation DAVID		
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	cell-cell adhesion	Cell adhesion	extracellular space
<i>COL14A1</i>	0.17	0.0428	x	x	x
<i>ICAM1</i>	0.19	0.0390	x	x	x

Tabelle 14: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM -Serum mit 50 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM -Serum mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **7 Tage**, keine Zuordnung zu ‚functional annotations‘ in der DAVID-Datenbank

50 ng/ml BMP-2, 7 Tage		
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert
<i>TGFB1</i>	2.67585511	0.0302

Tabelle 15: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM -Serum mit 300 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM -Serum mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **2 Tage** mit Zuordnung zu den 4 ‚functional annotations‘ der DAVID-Datenbank mit bester Übereinstimmung

300 ng/ml BMP-2, 2 Tage			functional annotation DAVID			
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	TGF- β signaling pathways	positive regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	extracellular space	BMP signaling pathway
<i>BMP4</i>	0.24	0.0432	x	x	x	x
<i>BMP6</i>	4.53	0.0491	x	x	x	x
<i>BMPR1B</i>	0.32	0.0284	x			x
<i>CHRD</i>	0.38	0.0290	x		x	
<i>COL14A1</i>	0.08	0.0213			x	
<i>COL5A1</i>	3.39	0.0462			x	
<i>CSF1</i>	0.38	0.0396			x	
<i>CTSK</i>	0.26	0.0240			x	
<i>ICAM1</i>	0.08	0.0055			x	
<i>ITGA1</i>	2.34	0.0493				
<i>TGFB1</i>	4.19	0.0203	x	x	x	x
<i>TGFB2</i>	4.24	0.0136	x	x	x	x
<i>TGFBR1</i>	2.42	0.0493	x	x		

Tabelle 16: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM -Serum mit 300 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM -Serum mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **7 Tage** mit Zuordnung zu den 4 ‚functional annotations‘ der DAVID-Datenbank mit bester Übereinstimmung

300 ng/ml BMP-2, 7 Tage			functional annotation DAVID			
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	extracellular matrix	positive regulation of bone mineralization	inflammatory response	cellular response to mechanical stimulus
<i>BGN</i>	3.31	0.0212	x			
<i>BMP6</i>	7.46	0.0036		x	x	x
<i>BMPR1B</i>	0.47	0.0399		x	x	x
<i>COL1A1</i>	5.58	0.0382	x			
<i>COL5A1</i>	8.55	0.0358	x			
<i>CSF1</i>	0.20	0.0306			x	
<i>PHEX</i>	0.33	0.0380				
<i>TGFB1</i>	4.36	0.0084	x	x	x	x
<i>BGN</i>	3.31	0.0212				

Auch mit diesen Expressionsdaten wurde ein hierarchisches Clustering durchgeführt. Im resultierenden Clustergram (Abbildung 48) ist beim Vergleich der verschiedenen Stimulationsbedingungen (Zeitpunkte / BMP-2-Konzentrationen) kein eklatanter Unterschied zu erkennen. Die bestehenden Unterschiede scheinen eher zufällig zu sein. Einander ähnliche Versuchsbedingungen (zum Beispiel ObM d7 50 ng/ml BMP-2 und ObM d7 300 ng/ml) werden zwar zum Teil jeweils paarweise in gemeinsame Cluster eingeordnet, wie anhand der ähnlichen Stimuli auf die Zellen zu erwarten gewesen wäre, insgesamt erscheint aber auch die Zuordnung der Cluster eher zufällig zu sein. In den Genexpressionsaktivitäten der tatsächlich zugeordneten Cluster sind keine distinkten Unterschiede oder Muster zu erkennen.

Auch mithilfe der gefundenen Datenbanktreffer lässt sich aufgrund ihrer großen funktionalen Bandbreite in diesem Versuch kein eindeutiges Muster in den Effekten der BMP-2-Stimulation erkennen. Obwohl einige mögliche Effekte der Stimulierung bei mehreren Versuchsbedingungen in der Datenbank gefunden wurden und trotz einzelner Paarungen ähnlicher Versuchsbedingungen im hierarchischen Clustering waren keine klaren Expressionsmuster und auch kein konzentrations- oder zeitabhängiger Effekt in diesem Versuch zu beobachten.

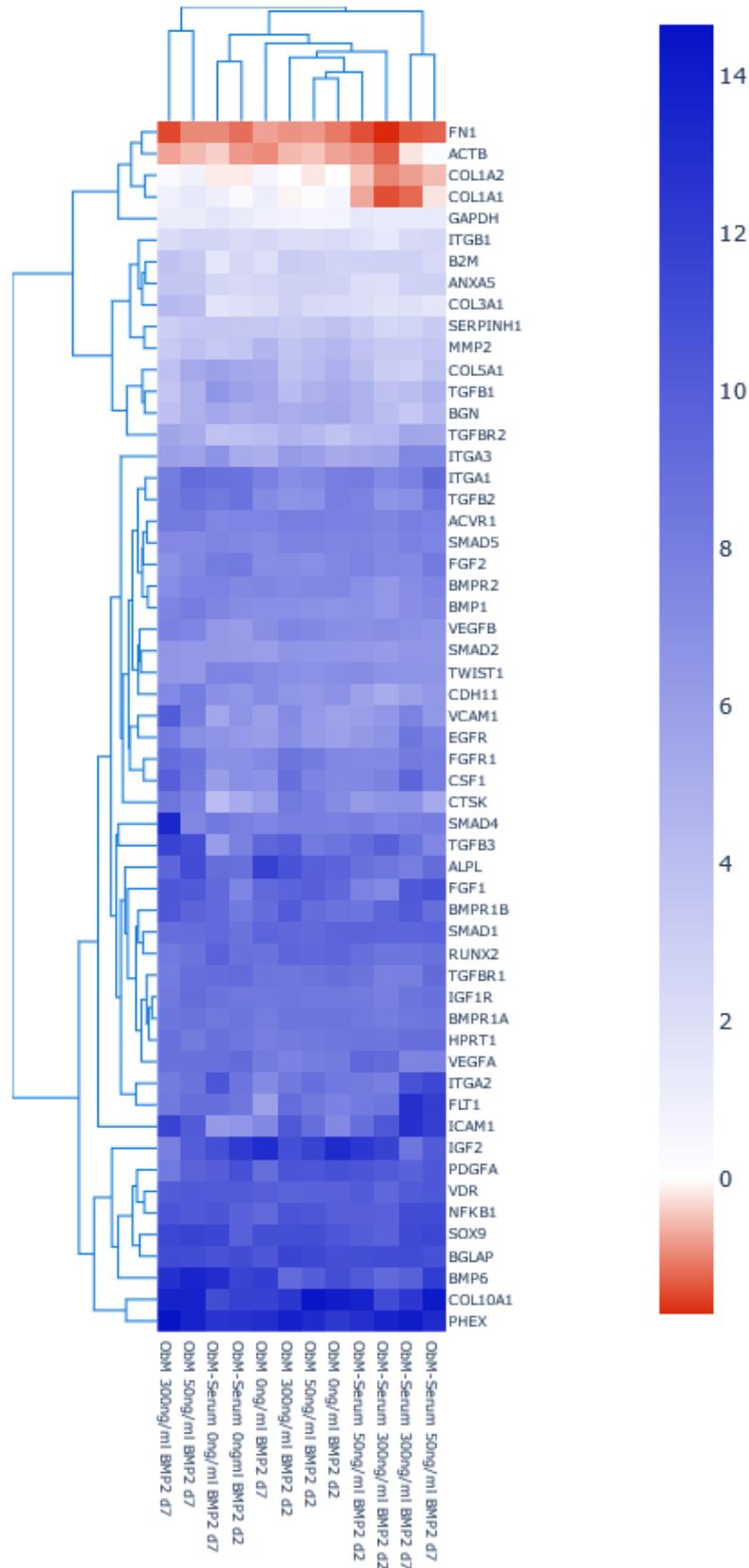


Abbildung 48: Clustergram der Expressionsmuster von primären Osteoblasten nach Stimulierung mit BMP-2 (0 / 50 / 300 ng/ml) für 2 / 7 Tage; farbcodiert aufgetragen sind die Genexpressionsaktivitäten aller im qPCR gemessenen Gene als ΔCq -Werte (Cq-Wert des jeweiligen Gens minus Cq-Wert des Referenzgens), blau zeigt geringere Expression an, rot stärkere Expression als das Referenzgen; hierarchisches Clustering mit ‚average-linkage‘, euklidische Distanzmetrik

5.2.7. Entwicklung einer Apparatur und Methode zur zyklischen Kompression von Zellen in dreidimensionalen Scaffolds

Um die zyklische ‚confined compression‘ von Osteoblasten in einem dreidimensionalen Scaffold oder einer Biomaterialprobe, also eine Kompression ohne seitliche Ausdehnung des Probekörpers zu ermöglichen, waren eine Reihe von Anforderungen zu erfüllen:

Da zunächst keine Biomaterialien zur Verfügung standen, die für Kompressionsversuche geeignet waren, musste ein geeignetes Modellmaterial für die Scaffolds ausgewählt werden. Da mit den im Projekt untersuchten Alginatmaterialien auch Hydrogel-basierte Materialproben perspektivisch für die Kompression eingesetzt werden sollten, fiel die Wahl daher auf einfach verfügbare andere Hydrogele, zunächst auf Kollagen Typ I. Die in frühen Versuchen in diesem Projekt hergestellten Gele waren allerdings mechanisch so instabil, dass der Transfer von Gießform zu Kompressionsapparatur nicht ohne Beschädigung der Proben möglich war (Daten nicht gezeigt). Daher wurde stattdessen Fibrin als Modellmaterial ausgewählt. Dieses ermöglicht deutlich festere Probekörper und erlaubt durch Änderung der Konzentration des Bestandteils Fibrinogen die Anpassung seiner rheologischen Eigenschaften (siehe Kapitel 5.2.10). Fibrin ist als biokompatibles Material und als Scaffold für Zellkulturanwendungen erprobt (siehe Kapitel 6.2.1).

Des Weiteren musste die maximal mögliche Größe eines zu komprimierenden Probekörpers bestimmt werden. Diese hängt maßgeblich ab von der maximalen Kraft, die bei der Kompression ausgeübt werden kann, der gewünschten Kompressionsamplitude und der Steifigkeit des zu komprimierenden Materials. Die Kompressionsamplitude wurde auf maximal 10% festgelegt. Für die auszuübende Kraft wurde zum Zeitpunkt des Designs der Kompressionskammer nach Hinweisen von Prof. Dr. Rolauffs ein oberes Limit der Kompressionsmaschine von 50 N angenommen. Damit bleiben Probengröße und erwartete Probensteifigkeit als Faktoren übrig, für die eine sinnvolle Balance gefunden werden musste. Auch die Anzahl von Zellen, die bei einer gegebenen Zelldichte in einer Probe kultiviert werden kann, hängt natürlich von der Probengröße ab und muss hier berücksichtigt werden. Tabelle 17 zeigt beispielhaft die maximal möglichen Materialsteifigkeiten in MPa (rechts), bei denen Probekörper mit verschiedenen Größen (links) bei der maximal möglichen Kompressionskraft von 50 N beziehungsweise 400 N noch zu 10% komprimiert werden können.

Tabelle 17: Übersicht über die maximal möglichen Materialsteifigkeiten (E-Moduln) abhängig von der Probengröße und der maximal auszuübenden Kraft durch die Kompressionsmaschine bei 10% Kompression

Probengröße		maximale Kraft	maximaler E-Modul
Durchmesser	Fläche		
0,5 cm	0,2 cm ²	50 N	25,46 MPa
		400 N	203,72 MPa
0,8 cm	0,5 cm²	50 N	10 MPa
		400 N	80 MPa
1 cm	0,8 cm ²	50 N	6,37 MPa
		400 N	50,93 MPa
2 cm	3,14 cm ²	50 N	1,59 MPa
		400 N	12,73 MPa
5 cm	19,63 cm ²	50 N	0,25 MPa
		400 N	2,04 MPa

Ein Probendurchmesser von 0,8 cm ergibt demnach eine maximal mögliche Materialsteifigkeit von 10 MPa beziehungsweise 80 MPa bei gleichzeitig gut zu handhabenden Probekörpern. Eine Probenhöhe von 1 cm bei diesem Durchmesser ergibt ein Volumen von 0,5 ml, was eine ausreichend hohe Zellzahl für die spätere Auswertung durch RNA-Extraktion und qPCR ermöglicht, wenn eine Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml gewählt wird, wie in diesem Projekt. Auch die Extraktion von ausreichenden Mengen Protein aus dieser Zahl von Zellen für Proteinanalysen (etwa Western Blot) erscheint möglich und realistisch.

Die Kompressionskammer wurde daher für Probenkörper mit diesen Maßen, 0,8 cm Durchmesser bei 1 cm Höhe entworfen. Um bei kleineren Materialsteifigkeiten mehrere Probenkörper gleichzeitig komprimieren zu können, wurde die Apparatur mit drei Kompressionskammern versehen. Die maximal mögliche Steifigkeit verringert sich dabei auf ein Drittel. Die etwas kleinere Ausführung der Kammern durch die Werkstatt mit einem Innendurchmesser von 0,78 cm hatte für das Einsetzen der Probekörper allerdings keine Auswirkungen, da die Gelproben durch ihre Flexibilität trotzdem ohne größeren Kraftaufwand in die Kompressionskammern geschoben werden konnten.

Die Kompressionsapparatur muss außerdem die seitliche Ausdehnung der komprimierten Probekörper verhindern, aber trotzdem ihre Volumenänderung durch die Kompression zulassen. Zu diesem Zweck wurde der Einsatz von porösen Glasfritten (Fa. Robu-Glas, Por. 0 entspricht Porengröße 160-250 μm , 2 mm Dicke) für den Abschluss der Kompressionskammern nach unten vorgesehen, die mechanisch stabil und für feste oder gelartige Proben undurchlässig sind, Flüssigkeiten aber passieren lassen können. Dadurch ist ein Flüssigkeitsaustritt aus der Kammer während der Kompression möglich.

Um der Apparatur die nötige mechanische Widerstandsfähigkeit auch größeren Kompressionskräften gegenüber zu verleihen, wurde Edelstahl für ihre Herstellung ausgewählt. Auch die Sterilisierung durch Autoklavieren ist so einfach möglich.

Eine solche Kompressionsapparatur existierte zunächst nicht und wurde im Verlauf des Projekts entwickelt. Die resultierende Apparatur (siehe Abbildung 49) beinhaltet drei separate Kammern zur Kompression von Proben mit einem von oben eingeführten Stempel. Die Kompressionskammern der bestehen aus Zylindern mit einem Innendurchmesser von 7,8 mm. Diese undurchlässige seitliche Begrenzung der Kammern ermöglicht eine ‚confined compression‘, also eine Kompression ohne seitliche Ausdehnung der Probe. Die untere Öffnung der Kompressionskammern besitzt einen um ~ 2 mm geringeren Innendurchmesser, sodass die einzusetzenden Glasfritten auf dem entstehenden Vorsprung abgelegt werden können. Die Kompressionskammern öffnen sich nach unten zu Kanälen, die einen Flüssigkeitsfluss zu einem aufrecht stehenden Rohr ermöglichen. Dieses dient als Ausgleichsgefäß, sodass die aus den komprimierten Proben entweichende Flüssigkeit abfließen und keinen Gegendruck aufbauen kann.

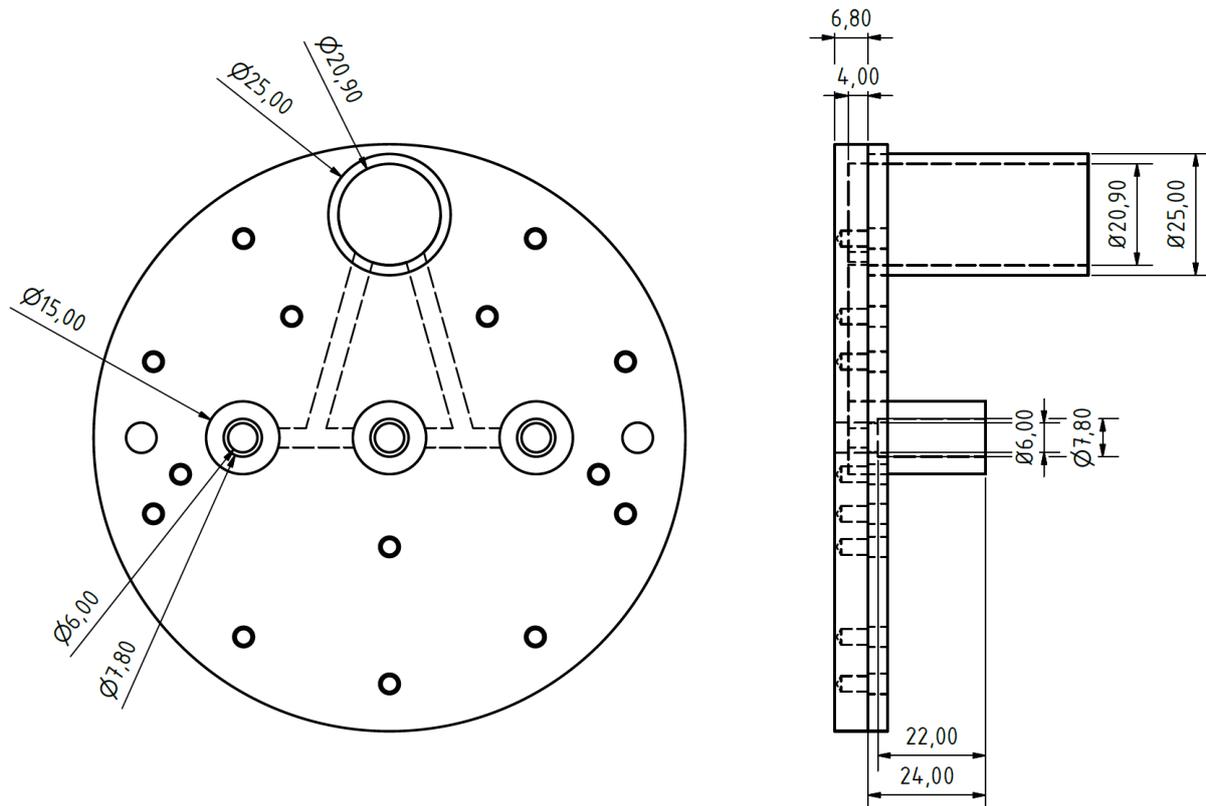


Abbildung 49: Konstruktionszeichnung der Kompressionsapparatur; links: Aufsicht, rechts: Seitenansicht (untere Fläche der Apparatur hier nach links zeigend); Maße in Millimeter

Um die Kompressionsapparatur reinigen und um die Glasfritten und Proben einfacher in die Kammern einsetzen zu können, ist die Apparatur aus zwei Teilen gefertigt. Der obere besteht aus den Kompressionskammern und dem Ausgleichsrohr, der untere beinhaltet eine Bodenplatte mit darin eingelassenen Verbindungskanälen. Die beiden Teile werden zusammengeschraubt. Eine Silikondichtung zwischen den beiden Teilen verhindert das Austreten von Flüssigkeit. Alle Teile sind autoklavierbar.

Der Stempel, der von oben in die Kompressionskammern reicht und die Bewegung der Kompressionsmaschine als Kompression auf die Proben in der Apparatur weitergibt, ist aus Polysulfon gefertigt. Er besitzt 3 Zinken mit einem Durchmesser von jeweils 6,9 mm, die über eine Grundplatte miteinander verbunden und mit einer Aufnahme für den Bolzen versehen sind, der an der Kompressionsmaschine für die Montage von anwendungsspezifischen Werkzeugen oder Stempeln vorgesehen ist. Seitliche Bohrungen für drei Schrauben ermöglichen die Fixierung des Stempels auf dem Bolzen. Auch der Stempel ist autoklavierbar.

Die anfangs erprobte Verwendung eines Stempels mit Zinken mit 7,9 mm Durchmesser stellte sich als ungeeignet heraus, da die Ausrichtung des Stempels relativ zur Kompressionsapparatur nicht ausreichend genau eingestellt werden konnte. Dadurch verkantete sich der Stempel in den Kompressionskammern. Wegen der dadurch sehr großen auftretenden Widerstandskräfte konnte der Kontakt zu den Probekörpern oder ihre Kompression nicht detektiert werden. Es wurde also der Durchmesser der Stempelzinken auf 6,9 mm reduziert. Diese Zinken decken aber trotzdem noch 76,27% der Probekörperoberfläche ab ($37,39 \text{ mm}^2 : 49,02 \text{ mm}^2$) und sorgen somit für eine nahezu homogene Kompression der gesamten Probekörper.

Für die Herstellung von hydrogelbasierten Probekörpern für die Kompression von Osteoblasten in dreidimensionalen Scaffolds wurden verschiedene Methoden erprobt (siehe Kapitel 5.2.8). Die für die dabei am besten geeignete Methode entwickelte Gießform wird im Folgenden näher beschrieben. Die Gießform aus Polysulfon (siehe Abbildung 50) besitzt jeweils 7 Bohrungen mit einem Durchmesser von 8,2 mm und 14,5 mm Länge. Nach unten sind diese Bohrungen frei, nach oben öffnen sie sich zu

einem seitlich begrenzten Flüssigkeitsreservoir. Die runde Gießform hat einen Außendurchmesser von 89,3 mm, der das Aufsetzen von Deckeln handelsüblicher 90 mm-Petrischalen auf der Oberseite und damit die Verwendung der Form für sterile Inkubation erlaubt.

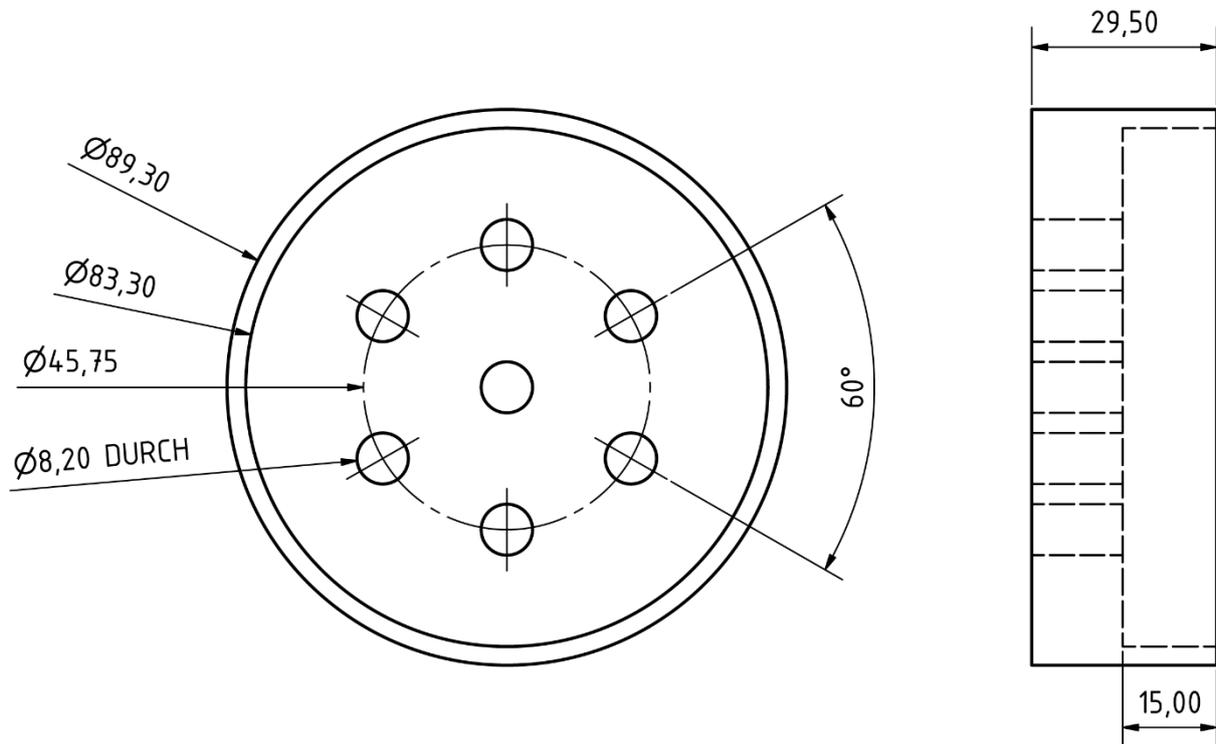


Abbildung 50: Konstruktionszeichnung der Gießform; links: Aufsicht, rechts: Seitenansicht (untere Fläche der Apparatur hier nach links zeigend); Maße in Millimeter

Vor dem Gießen von Gelen wurde die Form dampfsterilisiert. Stücke von Klebefolie (gedacht zum Schließen von PCR-Platten; Fa. Bio-Rad) wurden in 70% Ethanol sterilisiert und von unten über die Bohrungen der Form geklebt, um diese abzudichten. Die Gele wurden nun gegossen (siehe Kapitel 5.2.8). (Eine Besiedelung der Kleboberfläche der Folie mit primären Osteoblasten ergab keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum. Daten nicht gezeigt.)

Die Kompressionskammer, sowie Stempel und Gießformen wurden von Waldemar Schimpf in den wissenschaftlichen Werkstätten des Neurozentrums am Uniklinikum Freiburg hergestellt.

5.2.8. Entwicklung einer Methode zur Herstellung von zell-beladenen Probekörpern für Kompressionsversuche

Für die Herstellung von Probekörpern aus Kollagen- oder Fibringel wurden verschiedene Methoden erprobt. Grundsätzliches Prinzip war immer die Mischung einer Zellsuspension mit einem zu diesem Zeitpunkt noch flüssigen Gelmaterial. Diese Zell-Gel-Suspension wurde dann in eine Gießform gegeben, um dort zu gelieren. Zunächst wurde versucht, die Gele durch in die Form gelegte Folien nach dem Gelieren aus der nach unten geschlossenen Form herauszulösen. Aufgrund der kleinen Probengröße, des zu wenig stabilen Kollagen-Materials und der zu labilen Folie stellte sich diese Methode nicht als durchführbar heraus. Stattdessen wurde eine neue Gießform entworfen, deren einzelne Vertiefungen nach unten offen waren und vor dem Gießen mit Folie verschlossen wurden. Nach Gelieren der Proben konnte die Folie abgezogen werden, sodass die Proben auch von unten zugänglich wurden und aus der Form herausgeschoben werden konnten. In Besiedelungsversuchen der Klebeseite der Folie, die eigentlich für den Verschluss von PCR-Multiwellplatten gedacht ist zeigte sich kein negativer Effekt auf Osteoblasten, auch bei direktem Kontakt (Daten nicht gezeigt). Bei der Anwendung als Gießformverschluss besteht ein solcher darüber hinaus nur zu einem sehr kleinen Teil der Zellen im Gel.

Die Viabilität der Zellen im Gel im zeitlichen Verlauf der Inkubation nach ihrer Herstellung wurde mithilfe von LIVE/DEAD-Färbungen verfolgt. Zu beobachten war eine abnehmende Überlebensrate

der Zellen im Gel mit steigender Inkubationszeit bis auf unter 50% nach 10 und 18 Tagen Inkubation (Abbildung 51). Für die hier verwendete Inkubationszeit der Gelproben vor Durchführung von Kompressionsversuchen über Nacht kann mit mindestens etwa 80% eine ausreichend hohe Zellviabilität angenommen werden.

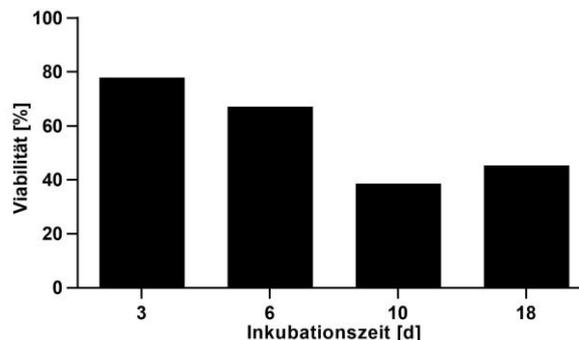


Abbildung 51: Zellviabilität von Osteoblasten in Fibringelen im zeitlichen Verlauf nach Herstellung der Gele

Nach erfolgter Kompression von zell-beladenen Fibringelen sollte die differentielle Genexpression der Zellen per qPCR nach Extraktion der RNA untersucht werden. Für den dafür nötigen Aufschluss der Gele wurde zunächst der Einsatz von Proteinase K erprobt. Da der enzymatische Verdau der Gele aber mehrere Stunden dauerte (Daten nicht gezeigt) und die Veränderung der Genexpression aufgrund der fehlenden Stimulation in diesem Zeitraum möglicherweise schon wieder abgeklungen sein könnte, wurde dieser Ansatz verworfen. Stattdessen wurde eine Methode zur mechanischen Auflösung der Gele mit anschließender RNA-Extraktion adaptiert. Die Kombination von Zellaufschluss durch Trizol-Chloroform vor der Aufreinigung der RNA mithilfe eines Silikasäulen-basierten Kits war in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rolauffs bereits etabliert und wurde hier an die Fibringelproben angepasst. Durch Zerteilen der Gele mit einem Skalpell, einfrieren der Probenstücke in Trizol und anschließendem mechanischem Aufschluss ließ sich eine mehr als ausreichende RNA-Menge für die folgenden Analysen gewinnen. Die so gewonnene RNA zeigte anhand der Ergebnisse aus der Mikrofluidik-Gelelektrophorese eine sehr gute Integrität.

5.2.9. Entwicklung einer Methode zur Detektion des Kontakts zwischen Stempel und Proben in der Kompressionsapparatur

Die Durchführung von exakten Kompressionen von Probekörpern setzt eine exakte Messung ihrer Größe und der Position ihrer oberen Fläche voraus, die in Kontakt mit dem Kompressionsstempel steht. Da die Kompressionskammer nicht durchsichtig ist, kann der Kontakt des Stempels mit den eingesetzten Gelen vor Beginn eines Kompressionsversuchs nicht durch Sichtkontrolle detektiert werden. Stattdessen muss die Detektion des Kontakts zwischen Stempel und Proben durch Messung der Gegenkraft erfolgen, den die Gele bei beginnender Kompression auf den Stempel ausüben. Fibringele mit unterschiedlichen Konzentrationen an Fibrinogen haben dabei unterschiedliche mechanische Eigenschaften und bewirken daher unterschiedlich große Kräfte. Die einfache Definition eines Gegenkraft-Schwellwerts zur Detektion des Kontakts war daher nicht möglich. Stattdessen wurde eine anpassungsfähige und automatisierte Methode für diese Detektion entwickelt.

Zunächst wurde der Stempel unter manueller Steuerung mit 40 $\mu\text{m/s}$ an die Proben herangefahren. Die Gegenkraft wurde dabei von der Steuersoftware mehrfach pro Sekunde gemessen und angezeigt (als dem der Kraft entsprechenden Gewicht, also mit der Einheit Gramm). Sie schwankte systembedingt im Bereich von ca. $\pm 0,03$ g. Stieg dabei die Kraft für mehrere Messpunkte auf mehr als 0,1 g, wurde das Anfahren gestoppt und ein kurzes Programm aus softwaregesteuerter zyklischer Kompression auf die Proben ausgeübt. Hier wurde eine Frequenz von 0,1 Hz und eine Kompressionsamplitude von 10% gewählt (5 Zyklen). Die jeweilige Position des Stempels nach manuellem Anfahren und damit die vermeintliche Position der Oberfläche der Proben kann in der Software abgelesen und zur Einstellung der Amplitude verwendet werden. Ergab diese zyklische Kompression eine klar an den Daten abzulesende, und dem Kompressionsverlauf folgende

Gegenkraftveränderung, wurde der angenommene Kontakt zwischen Probe und Stempel mithilfe einer linearen Kompression verifiziert. Dazu wurde die Probe in 30 s um 5% komprimiert. Der Stempel fuhr anschließend nicht wieder auf seine vorige Ausgangsposition zurück. Die dabei aufgenommenen Daten (Abbildung 52) wurden nun statistisch ausgewertet, um die Grundlage für eine objektive Entscheidung über den Kontakt zu erhalten.

Grundsätzliches Problem dabei war, dass ein immer vorhandenes Rauschen in der Kraftmessung von einem durch die Kompression der Probe entstehenden „tatsächlichen“ Signal, also einer Gegenkraftzunahme sicher unterschieden werden musste. Es musste also verhindert werden, dass Rauschen im Signal fälschlicherweise für eine Gegenkraft durch die Probe gehalten und damit ein Kontakt zwischen Probe und Stempel angenommen wurde.

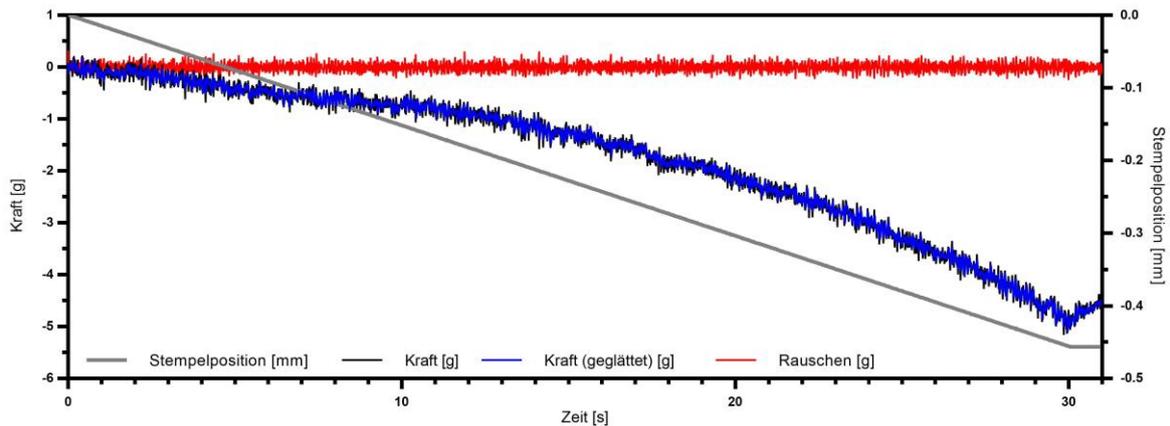


Abbildung 52: Ermittlung des Rauschanteils der gemessenen Kraft bei der Kontaktfindung (hier: bestehender Kontakt; S/R = -60,32); aufgetragen ist die Stempelposition (grau), sowie die gemessene Kraft (schwarz), der gleitende Durchschnitt der gemessenen Kraft (Fenstergröße 3) (blau) und der Rauschanteil des gemessenen Kraftsignals als Differenz aus gemessener Kraft und gleitendem Durchschnitt (rot)

Das Grundrauschen wurde ermittelt, indem an jedem Datenpunkt der gleitende Durchschnitt mit einer Fenstergröße von 3 ermittelt (Abbildung 52 in blau) und vom jeweiligen Datenpunkt abgezogen wurde. Diese Differenz aus geglätteter Kurve und gemessenen Ausgangsdaten entspricht dem Rauschanteil des Gesamtsignals (Abbildung 52 in rot):

$$\text{Rauschen} = \text{gemessene Kraft an Datenpunkt } i \\ - \text{gleitender Durchschnitt der Kraft an Datenpunkt } i$$

Die Stärke dieses Rauschens kann einfach über seine Standardabweichung beschrieben werden. Zur Entscheidung über das Zustandekommen von Kontakt zwischen Probe und Stempel wird nun die am Ende (Sekunde 29 bis 30) der linearen Kompression gemessene mittlere Gegenkraft verglichen mit der Stärke (Standardabweichung) des Rauschens. Der Quotient aus diesen beiden Werten beschreibt das Signal-Rausch-Verhältnis (S/R) mit nur einer Zahl und ist daher einfach zwischen verschiedenen Versuchen vergleichbar.

$$S/R = \frac{\text{Kraft}_{29s-30s}}{\text{Standardabweichung des Rauschens}}$$

Die Entscheidung, ob Kontakt besteht, kann anhand dieses Signal-Rausch-Verhältnisses auf der Basis von gewonnener Erfahrung mit Kontaktfindungsversuchen getroffen werden. In Versuchsreihen dazu hat sich gezeigt, dass die Stärke des Rauschens nicht im gleichen Maß von der Konzentration des eingesetzten Fibringels beeinflusst war wie die Stärke des tatsächlichen Kraftsignals und daher je nach Konzentration andere S/R den Kontakt anzeigen. Je größer die Fibrinogenkonzentration, desto größer stellte sich auch das S/R heraus, bei dem Kontakt angenommen werden konnte. Für Gele mit 5 mg/ml Fibrinogen wurde ein S/R von 3, bei 15 mg/ml ein S/R von 10 und bei 50 mg/ml ein S/R von 30 als Grenzwert verwendet, ab welchem Kontakt angenommen wurde (alle Gele:

Thrombinkonzentration 50 U/ml). Diese Werte ergaben sich aus Versuchen mit mindestens 3 Replikaten pro Konzentration ($n \geq 3$).

Die hier beschriebene Methode zur Kontaktfindung wurde vor jedem der folgenden Versuche mit Gelkompression durchgeführt. Die zur Kontaktfindung nötige statische Vorkompression um 5% diente in den später durchgeführten zyklischen Kompressionsversuchen dazu, das Ablösen des Stempels bei Entspannung der Probe („lift-off“) zu verringern und einen schlüssigen, stabilen Kontakt zu Beginn der Kompression sicherzustellen.

5.2.10. Steifigkeit von Fibringelen ist abhängig von der Gelzusammensetzung, nicht aber von der Kompressionsfrequenz

Fibrin wurde hier als kommerziell erhältliches, biokompatibles und relativ einfach in dreidimensionale Form zu bringendes Modellmaterial für die Kultivierung und mechanische Stimulierung von Osteoblasten ausgewählt. Sein schnelles Gelieren nach der Mischung von Fibrinogen und Thrombin ermöglicht die gleichmäßige Verteilung der Zellen in den Probekörpern ohne dass die Zellen zu stark sedimentieren. Zur Charakterisierung des Materials im Kontext der mechanischen Stimulierung sind die mechanischen Eigenschaften des Materials von großer Relevanz. Es wurde daher untersucht, welchen Einfluss die Konzentration des Fibrinogens im Fibringel auf den E-Modul hat. Der E-Modul ist ein Materialkennwert, der bei linear-elastischem Verhalten den proportionalen Zusammenhang zwischen Spannung und Dehnung bei der Verformung eines Körpers beschreibt und wird hier als Maß für die Steifigkeit des Gels herangezogen. Außerdem wurde in Hinblick auf den möglichen Einsatz verschiedener Kompressionsparameter auch der Einfluss der Kompressionsfrequenz auf den E-Modul gemessen.

Es zeigte sich eine klare Abhängigkeit der Gelsteifigkeit von der Konzentration des Fibrinogens (Abbildung 53A). Gele mit einer Fibrinogenkonzentration von 5 mg/ml hatten ein E-Modul von $1,84 \pm 0,88$ MPa, Gele mit 50 mg/ml Fibrinogen waren mit $35,44 \pm 18,65$ MPa deutlich steifer. Die E-Moduln von Gelen mit 5 mg/ml und 15 mg/ml ($2,84 \pm 2,16$ MPa) waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Im Vergleich zu den Gelen mit 50 mg/ml waren sie beide aber signifikant weniger steif.

Der E-Modul der Fibringele war nicht so eindeutig abhängig von der Kompressionsfrequenz bei der er gemessen wird, wie von der Fibrinogenkonzentration im Gel. Der höchste E-Modul wurde bei 0,05 Hz gemessen ($70,72 \pm 10,77$ MPa) (Abbildung 53B). Bei der Messung bei 0,5 Hz ergab sich ein davon statistisch nicht signifikant verschiedener E-Modul von $55,86 \pm 9,34$ MPa. Bei 0,1 Hz und 1 Hz wurden E-Moduln von $35,44 \pm 18,65$ MPa beziehungsweise $31,54 \pm 14,84$ gemessen. Für beide war ein statistisch signifikanter Unterschied zum gemessenen E-Modul bei 0,05 Hz festzustellen.

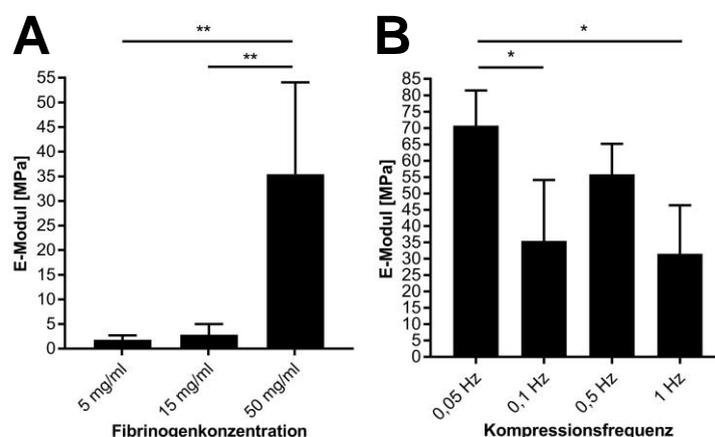


Abbildung 53: gemessene E-Moduln der Fibringele in Abhängigkeit von Fibrinogenkonzentration (A) und Kompressionsfrequenz (B); statistisch signifikante Unterschiede im E-Modul mit Balken eingetragen; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, $n = 4$

5.2.11. In Fibringele eingebettete Osteoblasten weisen in REM-Aufnahmen eine abgekugelte Zellmorphologie und fehlenden Kontakt zur Fibringelmatrix auf

Für die Ausübung ihrer Zellfunktionen und die Übertragung mechanischer Stimulation auf die Zellen ist ihre Einbettung in die Matrix von dreidimensionalen Scaffolds entscheidend wichtig. Daher wurden mit Osteoblasten beladene Fibringele, wie sie auch für die mechanische Stimulation durch Kompression verwendet wurden, nach Vorkultivierung über Nacht rasterelektronenmikroskopisch (REM) analysiert. An allen Schnittflächen der geteilten Fibringele sind runde Strukturen mit Größen im Bereich von etwa 10 µm zu erkennen (Abbildung 54 A, B). Aufgrund ihrer Größe und Zahl scheint es sich hierbei um die im Gel eingebetteten primären, humanen Osteoblasten zu handeln. Die Zellen liegen im Fibringel einzeln vor und sind gleichmäßig durch das gesamte Gelvolumen verteilt. Auffällig ist jedoch ihre runde Morphologie. Während Osteoblasten auf zweidimensionalen Zellkulturoberflächen mithilfe ihres Zytoskeletts lange Zellausläufer bilden und in ihrer längsten Ausdehnung dutzende Mikrometer messen können, wiesen die Osteoblasten im Fibringel keinerlei Anzeichen davon aus, Ausläufer auszubilden, oder ihre Morphologie anderweitig aktiv zu beeinflussen. Besonders bei stärkerer Vergrößerung (Abbildung 54 C, D; C zeigt Ausschnitt aus A in stärkerer Vergrößerung) war außerdem zu beobachten, dass zwischen Zellen und umgebender Fibringelmatrix ein deutlicher Zwischenraum bestand. Es liegt nahe, dass dieser Spalt ein Artefakt der Trocknung der Proben während der Vorbereitung der Proben für die rasterelektronenmikroskopische Analyse war, bei der sich die Zellen möglicherweise stärker zusammengezogen haben als das umgebende Gelmaterial. Soweit zu erkennen, blieb der Kontakt zwischen Zelle und Fibringel kaum bestehen. Außerdem blieben die Zellen trotz ihrer Kontraktion vollständig intakt. Dies lässt vermuten, dass der Kontakt zwischen Zellen und Gel von vornherein nicht stark ausgeprägt war. Hätte die Zelle etwa durch Fokaladhäsionen und den darin enthaltenen Integrine eine starke Verbindung mit der Gelmatrix aufgebaut, wäre zu erwarten gewesen, dass der Kontakt auch nach der Probenaufbereitung großflächiger bestehen bleibt. Die REM-Aufnahmen liefern also einen weiteren Hinweis auf eine eventuell nicht gut ausgeprägte Fähigkeit der verwendeten primären, humanen Osteoblasten, Zell-Matrix-Kontakte auszubilden.

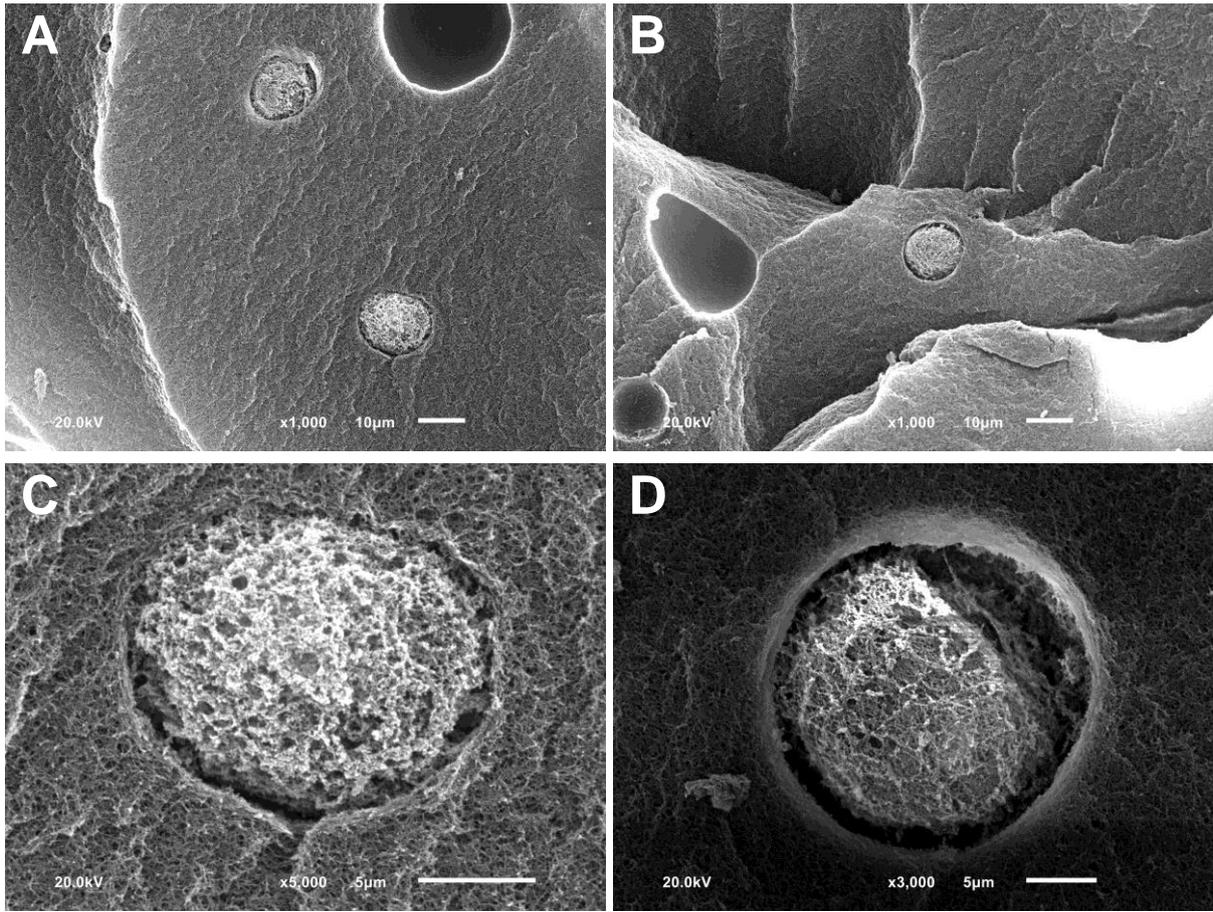


Abbildung 54: rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Osteoblasten-beladenen Fibringelen; Maßstabsbalken: A, B: 10 µm, C, D: 5 µm

5.2.12. ‚Confined compression‘ von Osteoblasten in Fibringelen führt nicht zu signifikanter Veränderung der Genexpressionsmuster im Kontext Osteogenese

Primäre, humane Osteoblasten wurden in Fibringele eingebracht und nach Vorkultivierung über Nacht für 2 Stunden zyklisch komprimiert (‚confined compression‘). Nach Isolation der RNA wurden die relativen Genexpressionsmuster der Zellen mithilfe von qPCR-Arrays analysiert, die mit Primern für Gene mit Relevanz für die Osteogenese bestückt waren.

Abbildung 55 zeigt die gemessenen relativen Genexpressionsaktivitäten im Vergleich zu unkomprimierten Kontrollzellen. Zu sehen ist, dass keines der getesteten Gene nach Kompression statistisch signifikant differenziell exprimiert wurde. Die größten beobachteten Beträge der Genexpressionsänderungen waren mit 1,44-facher Aktivierung (VEGFA) und 0,68-facher Inhibition (FGF2) außerdem sehr klein und sind damit in dieser Studie nicht auswertungsrelevant.

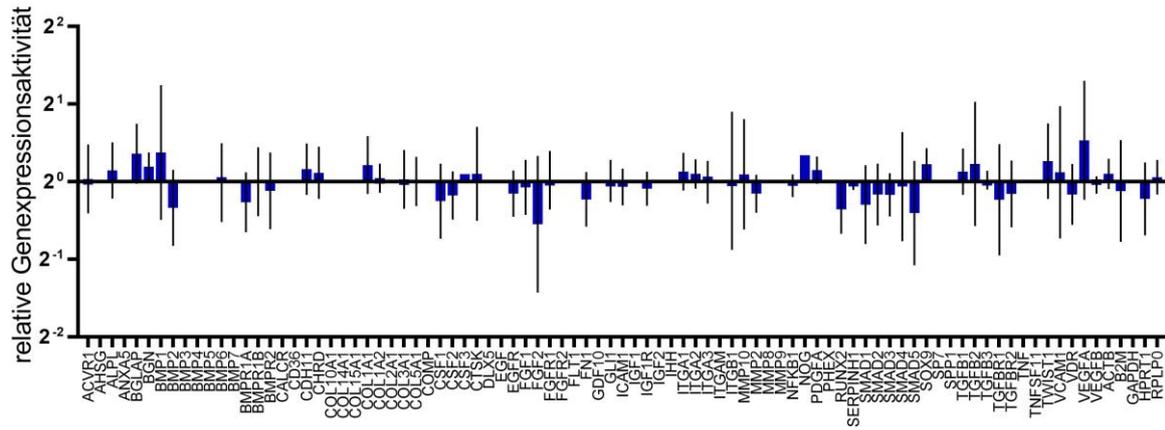


Abbildung 55: Übersicht über die relative Genexpressionsaktivität von primären, humanen Osteoblasten in Fibringelen mit 50 mg/ml Fibrinogen nach 2 h zyklischer Kompression, 1 Hz im Kontext Osteogenese im Vergleich zu unkomprimierten Zellen; keine statistisch signifikanten Änderungen in der Expressionsaktivität (paarweiser Vergleich); n=4

6. DISKUSSION

Die Ergebnisse des vorliegenden Projekts tragen zu neuen Erkenntnissen in drei verschiedenen, übergeordneten Bereichen bei: Einerseits wurde die Biokompatibilität von neu entwickelten Biomaterialien *in vitro* geprüft. Des Weiteren wurde ein Testsystem entwickelt, das die mechanische Stimulation von Zellen in dreidimensionalen Biomaterialien und die Analyse der Zellantwort darauf erlaubt. Damit werden die Analysemöglichkeiten für die präklinische Evaluierung potentieller Biomaterialien deutlich erweitert. Darüber hinaus haben die Versuche aber auch Erkenntnisse geliefert über die Eigenschaften der als Modellsystem verwendeten primären, humanen, calvarialen Osteoblasten. Sie unterscheiden sich signifikant von anderen Osteoblasten, was im Projektverlauf Zweifel an ihrer zellulären Identität aufkommen ließ.

6.1. Einflussfaktoren auf die *in vitro*-Biokompatibilität von PVCA-/PHM- und alginatbasierten Biomaterialien

Die in diesem Projekt durchgeführten Versuche konnten zeigen, dass es möglich ist, sowohl PVCA-/PHM-basierte, als auch alginatbasierte *in vitro*-biokompatible Materialien herzustellen, die es darauf kultivierten Osteoblasten erlauben, wichtige Zellfunktionen im Sinne der Geweberegeneration auszuüben. Die Ergebnisse dieses Projekts haben aber auch einige Faktoren aufgezeigt, die die *in vitro*-Biokompatibilität der Materialien verringerten. Während nach früheren Definitionen Materialien auch dann als biokompatibel betrachtet wurden, wenn sie zwar keine akute Abstoßungs- und inflammatorische Reaktion hervorrufen, aber durch eine Fremdkörperreaktion eingekapselt werden, verlangen neuere Definitionen eine engere Interaktion zwischen biologischen Geweben und Material.^{97,98} Die Zellen des umgebenden Gewebes sollen demnach durch das Material in die Lage versetzt werden, die Geweberegeneration zu vermitteln, etwa durch Vaskularisierung, Einwachsen von Zellen und Gewebeneubildung.^{98,143} Die identifizierten Einflussfaktoren auf die *in vitro*-Biokompatibilität von PVCA-/PHM- und alginatgelbasierten Materialien sollen im Folgenden besprochen werden.

6.1.1. *In vitro*-Biokompatibilität von PVCA- und PHM-basierten Materialien

Probekörper aus PVCA und PHM ohne Supplementierung zeigten in diesem Projekt gute Besiedelungseigenschaften für humane, primäre Osteoblasten als Zielzellen der geplanten klinischen Anwendung als Knochenersatzmaterialien. Es konnte für eines dieser Materialien (PHM) gezeigt werden, dass die Zellen darauf auch über lange Kulturzeiten adhären, proliferieren und migrieren und in den Probekörpern Proteine der extrazellulären Matrix exprimieren sowie gewebeähnliche Strukturen bilden.

Dass die in den PVCA-/PHM-basierten Materialien initial verbliebenen Rückstände organischer Lösungsmittel die Proliferation von *in vitro* kultivierten Zellen hemmen, ist wenig überraschend. Die Messung der Proliferationshemmung über das „read-out“ der Impedanz (siehe Kapitel 5.1.1) in diesem Projekt konnte aber eine Anpassung des Herstellungsprozesses eine deutliche Reduktion der Lösungsmittelrückstände und damit eine deutliche Verbesserung der Biokompatibilität herbeiführen.

Die Evaluation der *in vitro*-Biokompatibilität von Materialien durch die Messung ihrer Zytotoxizität, ihrer Besiedelungseigenschaften und Analyse der Fähigkeit der darauf kultivierten Zellen, zelltypspezifische Markermoleküle zu exprimieren, wie in diesem Projekt durchgeführt, ist übliche Praxis.^{144,145} Auch die Verwendung von Eluaten für die Messung der Zytotoxizität ist verbreitet^{145,146} und, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben, in ISO10993 standardisiert.¹³⁷

Über die Biokompatibilität von PVCA und PHM ist in der Literatur bisher nur sehr wenig berichtet worden. In einer Studie von Ueda-Yukoshi und Matsuda waren Endothelzellen sehr gut dazu in der Lage, auf PVCA-beschichteten Glasoberflächen zu adhären und zu proliferieren, während ihnen dies auf PHM-beschichtetem Glas nicht möglich war.¹⁴⁷ Die Beschichtung verschiedener Polymere mit PHM führte in einer weiteren Studie zu einem verringerten Einfluss des entstehenden Komposits auf verschiedene Aspekte der Blutgerinnung, also zu einer verbesserten Biokompatibilität von PHM im

Vergleich zu den unbehandelten Polymeren.¹⁴⁸ Angesichts der sehr eingeschränkten Literaturberichte ist eine Einordnung der in diesem Projekt gemachten Beobachtung allerdings schwierig. Zwar scheinen die von Ueda-Yukoshi und Matsuda berichteten Ergebnisse den hier gemachten zu widersprechen. Die Versuchsaufbauten und Probeneigenschaften waren jedoch mit dünnen PVCA-/PHM-Beschichtungen bei Ueda-Yukoshi und Matsuda und 3D-gedruckten Probekörpern mit deutlich höheren Materialstärken im vorliegenden Projekt sehr unterschiedlich. Hier gälte es nun also zu klären, welche Unterschiede in den Materialeigenschaften tatsächlich zu den unterschiedlichen Besiedelungseigenschaften geführt haben könnten. Auch ist es möglich, dass die unterschiedlichen verwendeten Zelltypen (Endothelzellen und Osteoblasten) unterschiedlich auf die Materialien reagieren und daher zu den unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen haben.¹⁴⁹

6.1.1.1. Supplementierung von PVCA und PHM

Auch die Untersuchung des Effekts verschiedener Supplemente in PVCA-/PHM-basierten Materialien hatte entscheidenden Einfluss auf die weitere Materialentwicklung. Pyrogene Kieselsäure (Aerosil 200) und Magnesiumoxid (MgO)-Nanopartikel sollten als Thixotropiemittel die Viskosität der Lösung während des Druckvorgangs erhöhen und so das 3D-Drucken sehr kleiner Strukturen erleichtern.

Pyrogene Kieselsäure ist als Thixotropiemittel für den 3D-Druck bereits beschrieben worden. In Konzentrationen eingesetzt, die der hier verwendeten (7%wt) in etwa entsprechen, konnte pyrogene Kieselsäure dabei die Viskosität von 3D-Drucktinten konzentrationsabhängig erhöhen.^{150,151} Für MgO-Nanopartikel konnten unsere Projektpartner in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mülhaupt ebenfalls eine signifikante, konzentrationsabhängige Viskositätssteigerung zeigen. Hierbei war die in den untersuchten Biomaterialvarianten verwendete Konzentration von 57%wt die höchste, die aufgrund der hohen Viskosität noch druckbar war.¹⁵²

Die hier durchgeführten Versuche haben für beide Stoffe eine sehr deutliche Reduktion der Zellproliferation gezeigt. Für pyrogene Kieselsäure ist ein zytotoxischer Effekt bereits gezeigt worden. Konzentrationen ab 11,25 µg/ml im Zellkulturmedium haben dabei bei Makrophagen aus der Ratte zu einer verringerten Zellmembranstabilität, verringerter Mitochondrienfunktion und zur Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen geführt.¹⁵³ In Versuchen mit immortalisierten humanen Endothelzellen reichte eine Konzentration von 120 µg/ml aus, um die Viabilität und metabolische Aktivität der Zellen signifikant zu verringern.¹⁵⁴ In den hier durchgeführten Versuchen wurde pyrogene Kieselsäure zwar nicht direkt ins Zellkulturmedium gegeben. Allerdings wurde sie in den untersuchten Materialproben in einer im Vergleich zur zitierten Literatur um 580-, beziehungsweise 6000-fach höheren Konzentration eingesetzt. Da sie ein Dispersionsbildner ist, muss angenommen werden, dass ein relevanter Anteil der in den Proben enthaltenen pyrogenen Kieselsäure während der Herstellung der Eluate aus den Materialproben herausgelöst wird und so im Eluat verbleibt. Dadurch kann sie auf die mit dem Eluat kultivierten Zellen einwirken und eine verringerte Proliferation hervorrufen.

Magnesiumoxid (MgO)-Nanopartikel, wie sie hier ebenfalls als Thixotropiemittel evaluiert wurden, sind aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ schon zuvor für den Einsatz in Biomaterialien erprobt worden.^{158,159} Die antimikrobielle Wirkung von MgO-Nanopartikeln geht unter anderem die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) zurück¹⁵⁵⁻¹⁵⁷, die auch auf Säugerzellen zytotoxisch wirken.¹⁶⁰ Neben dem Effekt von durch MgO gebildete ROS ist die zytotoxische Wirkung von MgO aber auch auf eine pH-Veränderung zurückzuführen. Magnesiumoxid-Nanopartikel bilden in wässrigem Milieu Magnesiumhydroxid¹⁵⁷ und erhöhen dadurch den pH-Wert wässriger Medien.¹⁶¹ Die Zugabe von 50 mM MgO-Nanopartikel führte bei Zugabe zu gepuffertem Zellkulturmedium einer Studie zu einer pH-Wert-Erhöhung auf 8,83.¹⁶²

Die in der Literatur beschriebenen, für den Knochenersatz entwickelten Biomaterialien enthielten daher maximal 4% MgO-Nanopartikel oder wurden zusätzlich durch spezielle Herstellungsbedingungen auf minimale zytotoxische Eigenschaften hin optimiert.^{158,159} MgO-Nanopartikel-Konzentrationen von 200 µg/ml sind laut einer Studie für Zellen der HeLa- (Zervixkarzinom), SNU-16- (Magenkarzinom) und AGS- (Magen-Adenokarzinom) Zelllinien bereits zytotoxisch.¹⁶³ In einer weiteren Studie reichte eine Konzentration von 15 µg/ml bereits aus, um die Viabilität von MCF-7(Mammakarzinom)-Zellen auf die Hälfte zu reduzieren.¹⁶⁴

Die in den hier evaluierten Materialvarianten eingesetzte Konzentration an MgO-Nanopartikeln lag mit 57%wt deutlich höher als sie in der Literatur erfolgreich für nicht zytotoxische Biomaterialien eingesetzt worden sind.^{158,159} Obwohl der pH-Wert der hier hergestellten Eluate nicht gemessen wurde, muss angesichts des sehr hohen MgO-Gehalts der Proben damit gerechnet werden, dass während der Inkubation der Probekörper im Medium eine relevante Menge MgO in Magnesiumhydroxid übergegangen ist, die damit verbundene Freisetzung von Hydroxidionen die Pufferkapazität des Mediums überschritten hat und das MgO somit für zytotoxische pH-Werte im Eluat gesorgt hat.

Sowohl für MgO-Nanopartikel als auch für pyrogene Kieselsäure ist nicht davon auszugehen, dass die Toxizität *in vivo* in den hier evaluierten Konzentrationen weniger problematisch ist als *in vitro* gezeigt. Beide Supplemente eignen sich also voraussichtlich nicht als Thixotropiemittel für die Herstellung von Knochenersatzmaterialien unter den hier evaluierten Bedingungen.

Der Einsatz von in flüssigem Stickstoff zerkleinertem Gelatinevlies hatte zwar keine negativen Auswirkungen auf das Zellverhalten im Besiedelungsversuch mit PVCA und PHM, konnte deren Besiedelung mit Osteoblasten aber auch nicht verbessern. Die verwendeten Gelatinevliese sind sehr gut biokompatibel¹⁶⁵, ein negativer Einfluss war hier also nicht zu erwarten. Da die mit Gelatinevlies supplementierten Materialien aber auch ohne diese Supplementation bereits vollständig besiedelt werden konnten, war in den hier durchgeführten Versuchen keine weitere Verbesserung zu beobachten. Die Verwendung von zerkleinertem Gelatinevlies als Supplement zu PVCA und PHM wurde daher hier nicht weiterverfolgt.

Die Supplementierung von PVCA-/PHM-basierten Materialien mit Hydroxylapatit (HA) führte in diesem Projekt sowohl bei der Untersuchung von entsprechenden Eluaten, als auch in Direktbesiedelungsversuchen überraschenderweise zu einer schlechteren *in vitro*-Biokompatibilität. HA wird im Allgemeinen als sehr gut geeignet für den Einsatz als Knochenersatzmaterial betrachtet und kommt in seiner Zusammensetzung dem mineralischen Anteil des Knochengewebes sehr nahe.⁸⁵ Es wird daher vielfältig für die Herstellung von Knochenersatzmaterialien klinisch eingesetzt¹⁶⁶; alleine und als Bestandteil von Kompositmaterialien, zum Beispiel mit einer Polymerkomponente.^{167,168} Vor diesem Hintergrund war ein negativer Einfluss des HA auf die *in vitro*-Biokompatibilität der PCA-/PHM-basierten Materialien hier nicht zu erwarten. Es wurde hier allerdings eine moderate Verringerung der Osteoblastenproliferation bei Kultivierung in Eluaten von HA-PVCA und HA-PHM-Kompositen beobachtet (siehe Abbildung 11). Zur Herstellung der Eluate wurden Materialproben für drei Tage in Zellkulturmedium inkubiert. Es ist vorstellbar, dass die HA-Partikel im Material durch ihre große Porosität, spezifische Oberfläche (laut Literatur für natives HA $2 \text{ m}^2/\text{g}$ ⁸⁵) und die hydrophile Oberfläche des Materials¹⁶⁹ einen Teil der im Medium enthaltenen Wachstumsfaktoren adsorbieren und dem Medium so entziehen. Die proliferationsfördernde Wirkung der Supplemente wäre so verringert. Außerdem ist nicht vollständig auszuschließen, dass im porösen Material trotz intensiven Waschens nach der Sterilisierung in Ethanol Reste des Lösungsmittels zurückgeblieben sind. Da Ethanol schon in sehr kleinen Konzentrationen proliferationshemmend (1 mmol/l ¹⁷⁰) oder gar zytotoxisch (1% ¹⁷¹) wirkt, würden dafür kleinste Mengen zurückbleibendes Ethanol ausreichen. Die Verwendung einer anderen Sterilisierungsmethode, etwa der gamma-Bestrahlung, könnte hier einen möglichen negativen Effekt von Ethanol auf die *in vitro*-Biokompatibilität ausschließen.

Auch in den direkten Besiedelungsversuchen von PVCA-/PHM-Materialien zeigten die Varianten mit HA eine schlechtere *in vitro*-Biokompatibilität als solche ohne Supplementierung. Auch hier ist ein negativer Einfluss durch Rückstände an Ethanol aus der Sterilisierung in den HA-Partikeln grundsätzlich denkbar. Zusätzlich könnte es sein, dass die Partikel die Oberflächenmikrostruktur der Probekörper beeinflusst. Der Einfluss der Oberflächenstruktur von Biomaterialien auf das Zellverhalten von Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen ist bereits gezeigt worden.¹⁷²⁻¹⁷⁵ Durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Materialkomponenten HA (hart, spröde, einzelne Partikel) und PVCA beziehungsweise PHM (kontinuierliches, weniger hartes Polymermaterial) könnte es sein, dass die Supplementierung mit HA etwa die Oberflächenrauheit der Probekörper vergrößert und damit die Adhäsion und Proliferation der Osteoblasten beeinträchtigt.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ Eine Analyse der

Oberflächenstruktur von PVCA-/PHM-Probekörper mit und ohne HA könnte hier ein tieferes Verständnis des Einflusses von HA auf die *in vitro*-Biokompatibilität erlauben.

6.1.1.2. Kryo-Druck von PVCA/PHM

Die Technik des kryo-3D-Drucks hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Biokompatibilität von PVCA-/PHM-basierten Materialien *in vitro*. Da hier die chemische Zusammensetzung der Materialien oder die verwendeten Lösungsmittel nicht verändert wurden, war eine Veränderung der Biokompatibilität auch nicht zu erwarten. Der kryo-3D-Druck ist damit aus biologischer Sicht eine sehr vielversprechende Methode, feine dreidimensional gedruckte Strukturen herzustellen, ohne Thixotropiermittel einsetzen zu müssen, die zum Beispiel aufgrund von zytotoxischen Eigenschaften die Biokompatibilität der Materialien potentiell beeinträchtigen können.

6.1.1.3. Langzeitbesiedelung von makroporösen PHM-Probekörpern

Bemerkenswert war das Ergebnis der Langzeitbesiedelung von makroporösen PHM-Probekörpern mit primären, humanen Osteoblasten. Die im immunzytochemisch gefärbten Gefrierschnitt sichtbare, vollständige Ausfüllung der inneren Hohlräume der Probe mit Zellen und extrazellulärer Matrix, angezeigt durch Osteopontin, einem osteoblastenspezifischen Protein der extrazellulären Matrix, zeigte eine dreidimensionale Selbstorganisation der Zellen an, die über eine Besiedelung der inneren Oberflächen der Probekörper hinausging. Die Zellen konnten offenbar durch die Expression von Matrixproteinen Zelladhäsionspunkte schaffen, die sie in die Lage versetzten, die Abstände zwischen sich kreuzenden Materialsträngen immer weiter zu überbrücken, bis die Poren schlussendlich komplett ausgefüllt waren. Die eigenständige Bildung von dreidimensionaler Matrix durch Osteoblasten in Kultur ist bereits beschrieben worden^{179,180}. Hier wäre es sicherlich interessant, in weiteren Versuchen die Zusammensetzung der gebildeten Matrix zu untersuchen. Angesichts der Zusammensetzung nativer Knochenmatrix wäre zu erwarten, dass Kollagen Typ 1 einen großen Teil der exprimierten Proteine ausmacht.¹⁹⁻²¹ Dies gälte es zu verifizieren, zum Beispiel über immunzytochemische Färbungen an Gefrierschnitten, wie für Osteopontin hier schon gezeigt. Aber auch andere weniger häufige Matrixproteine wie BGLAP und BSP sind in der gebildeten Matrix zu vermuten.^{20,21,38} Ebenfalls interessant wäre eine zweistufige Kultivierung von Zellen und Material zunächst in dem hier verwendeten Kulturmedium ObM bis zur Ausbildung des Gefüges aus Zellen und Matrix und anschließender Kultur in Mineralisierungsmedium auf Basis von DMEM. Die Zellcharakterisierung für dieses Projekt hatte gezeigt, dass die verwendeten Osteoblasten in diesem Medium mineralisierte Matrix bilden. Ein solcher Versuch könnte zeigen, inwieweit sie auch die hier beobachtete, dreidimensional strukturierte Matrix mineralisieren können. Versuche dieser Art könnten einerseits das Zellverhalten der primären humanen Osteoblasten charakterisieren, andererseits aber auch Aufschlüsse über die Interaktion von zwischen Osteoblasten und PHM-Material *in vitro* geben und so bessere Vorhersagen über die Materialeignung als Knochenersatzmaterial ermöglichen.

6.1.2. *In vitro*-Biokompatibilität von alginatgelbasierten Materialien

Alginat, das als Hydrogel die Basis des zweiten, hier untersuchten Materialsystems bildet, wird bereits vielfältig als Biomaterialien verwendet und kommt zum Beispiel als Wundauflage¹⁸¹ oder als Trägermaterial für die Verabreichung von Pharmazeutika¹⁸² zum Einsatz. Das Material verhält sich bei Einbringen in den Körper weitgehend inert, ruft keine Fremdkörperreaktion hervor und führt nicht zu Entzündungen.¹⁸² Alginat wird daher nach der in der Einleitung erwähnten früheren Definition als biokompatibel angesehen. Alginat bietet Säugerzellen jedoch keine Möglichkeit der Adhäsion. Es bietet keine spezifischen Strukturen für die Bindung zellulärer Ankerproteine wie etwa Integrinen, darüber hinaus sorgt die negative Ladung der Alginatpolymere für eine sehr schwach ausgeprägte Adsorption von Proteinen auf dem Gel, die dann wiederum als Adhäsionsvermittler für Zellen dienen könnten.¹⁸³ Ist also eine der Heilung förderliche Interaktion eines Biomaterials mit Zellen oder Gewebe im Sinne der neueren Definition von Biokompatibilität gewünscht, ist unmodifiziertes Alginat weniger geeignet. Alginathydrogele werden nach Implantation zwar resorbiert, Alginatpolymere werden allerdings im Körper nicht enzymatisch degradiert.¹⁸⁴ Alginatpolymere bis zu einem Molekulargewicht von 48 kDa werden stattdessen unmodifiziert über den Urin ausgeschieden, Polymere mit größerer Kettenlänge verblieben im Tierversuch aber im Körper.¹⁸⁵

6.1.2.1. Supplementierung von alginatgelbasierten Materialien mit Hydroxylapatit

Die im vorliegenden Projekt gewonnenen Daten stimmen mit den aus der Literatur bekannten Eigenschaften von Alginathydrogelen überein. Hydrogele aus nicht supplementiertem Alginat erwiesen sich auch hier als ungeeignet, um Zellen *in vitro* Adhäsionsmöglichkeiten zu bieten. Bei Zugabe von Hydroxylapatitpartikeln war nur eine marginale Verbesserung der Adhäsionsfähigkeit der primären, humanen Osteoblasten zu erkennen, die sich auf die freiliegenden Hydroxylapatitoberflächen beschränkte. Eine flächige Besiedelung der Proben als grundlegende Voraussetzung von Biokompatibilität wurde nicht erreicht.

In der Literatur sind einige Beispiele dafür zu finden, dass Alginat-Hydroxylapatit-Materialien ohne weitere Supplementierung das Wachstum von Zellen *in vitro* erlaubt haben. So haben etwa mehrere Arbeitsgruppen über die Adhäsion von Osteoblasten oder ähnlichen Zellen auf Alginat-Hydroxylapatit-Scaffolds unterschiedlicher Beschaffenheit berichtet.^{186–188} Die Zellen zeigten dabei Proliferation über Zeiträume von einigen Wochen, waren metabolisch aktiv und adhärten auf den Materialoberflächen. Sie zeigten dabei aber in der Regel nicht die auf zweidimensionalen Gewebekulturplastik-Oberflächen und den hier getesteten biokompatiblen Oberflächen zu beobachtende ausgestreckte Zellmorphologie mit Zellausläufern.¹⁸⁷ Des Weiteren wird in der Literatur auch für Alginat-Kollagen-Materialien über eine Verbesserung der Zellaktivität bei Supplementierung von Hydroxylapatit berichtet. Sowohl die Proliferationsaktivität von mesenchymalen Stammzellen als Osteoblastenvorläuferzellen, als auch Ihre Expression osteoblastenspezifischer Markergene (SPP1, BGLAP, RUNX2, ALP) waren in einer Studie im Vergleich zur Kultivierung auf Alginat-Kollagen-Materialien ohne Hydroxylapatit signifikant erhöht.¹⁸⁹ Ähnliche Effekte sind für Komposite aus Alginat, Hydroxylapatit und Kollagen auch *in vivo* bereits gezeigt worden.¹⁹⁰

In vielen Fällen ist in den früheren Berichten eine deutlich kleinere Größe der im Material befindlichen Hydroxylapatitpartikel zu erkennen, verglichen mit denjenigen, die im vorliegenden Projekt verwendet wurden. Ein Material enthielt Partikel mit weniger als 500 nm Durchmesser¹⁸⁶, eine weitere Veröffentlichung gibt Partikelgrößen von unter 3 µm an.¹⁸⁷ Der Anteil des Hydroxylapatit am Gesamtmaterial war darüber hinaus zum Teil deutlich höher.^{186,187} Die in den erwähnten Veröffentlichungen verwendeten Materialien enthielten außer Hydroxylapatit keine weiteren Bestandteile zur Vermittlung der Adhäsion. Trotzdem waren sie deutlich besser in der Lage, die darauf kultivierten Zellen in Adhäsion und Wachstum zu unterstützen, als die hier evaluierten Alginatmaterialien ohne Gelatine. Möglicherweise liegt das an einer unterschiedlichen Zugänglichkeit von Hydroxylapatitoberflächen für die Zellen im Material. Wird einem Material Hydroxylapatit bei gleichem Mengenverhältnis in Form kleinerer Partikel zugegeben, so ist die Gesamtoberfläche aller Partikel größer. Auch werden die Partikel bei gleichmäßiger Verteilung im Kompositmaterial kleinere Abstände zueinander haben, sodass Zellen über die gesamte Zell-Material-Kontaktfläche verteilt geeignete Adhäsionspunkte in Form von Hydroxylapatitoberflächen finden. Werden zu große Partikel eingesetzt, entstehen für Zellen gegebenenfalls unüberwindliche Abstände zwischen diesen, was die vollständige Besiedelung der gesamten Oberfläche verhindert. Die Größe der in diesem Projekt verwendeten Hydroxylapatitpartikel betrug mindestens 5 / 25 µm und lag damit deutlich höher als die des in der Literatur verwendeten Hydroxylapatits (siehe oben, vergleiche Kapitel 4.6). Da Zellen auf Oberflächen von Alginat-Hydroxylapatit-Kompositen in dieser Arbeit nur in kleinen Aggregationen an Hydroxylapatitpartikeln gefunden wurden, ist davon auszugehen, dass sie dort wirksam adhärten konnten. Eine weitere Verringerung der Partikelgröße oder eine Erhöhung des Anteils des Hydroxylapatits am Gesamtmaterial hätte hier vielleicht auch ohne die Zugabe von Kollagen eine Verbesserung der Adhäsionsfähigkeit bewirkt. Beides hat allerdings potentiell auch negative Auswirkungen auf die Eigenschaften des Materials für den 3D-Druck, die daher zu überprüfen wären. Darüber hinaus war zum Zeitpunkt der Materialbeschaffung kein anderes Hydroxylapatitmaterial mit kleinerer Partikelgröße in ‚medical grade‘-Qualität verfügbar, das sich damit also für die Entwicklung anwendungsnaher Materialvarianten geeignet hätte.

6.1.2.2. Supplementierung von alginatbasierten Materialien mit Gelatine

Wie eingangs beschrieben verfügt Alginat nicht über Bindungsstellen, die Zellen das Adhärenz erlauben. Das Einbringen von spezifischen Bindungsstellen für die Adhäsion von Zellen kann die Besiedelungseigenschaften von Alginat-Kompositmaterialien allerdings entscheidend verbessern. So führt etwa die Derivatisierung von Alginat mit Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Peptiden (RGD) zu einer deutlich verbesserten Zelladhäsion im Vergleich zu unverändertem Alginat.¹⁸³ Auch Kompositmaterialien aus Alginat und Gelatine erlauben mehr Interaktion zwischen Hydrogel und Zellen.^{191,192}

Die im vorliegenden Projekt gewonnenen Ergebnissen stimmen mit diesen früheren Erkenntnissen überein. Auf Alginat-Hydroxylapatit-Gelatine-Materialien waren auch hier die verwendeten primären, humanen Osteoblasten gut dazu in der Lage, zu adhären und zu proliferieren. Bei einzelnen Proben von Alginat-Hydroxylapatit-Gelatine-Materialien trat dabei allerdings eine ungleichmäßige Besiedelung der Oberflächen auf. Einige Bereiche waren konfluent mit Zellen bewachsen, andere wiesen nur vereinzelt Zellen auf. Es erscheint nicht unwahrscheinlich, dass hierfür eine ungleichmäßige Verteilung des Gelatine-Anteils im Gesamtmaterial ursächlich ist. Trotz sorgfältiger Durchmischung der Bestandteile kann durch Sedimentation vor dem 3D-Druck oder durch Trennung der Bestandteile während der Extrusion des Materials während des Drucks eine teilweise Entmischung stattfinden. Infolgedessen könnten Bereiche der Probekörper entstehen, die weniger Gelatine enthalten, als für eine effektive Adhäsion der Osteoblasten auf ihrer Oberfläche nötig wäre. Eine nähere Untersuchung des Phänomens etwa durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit Antikörpern gegen Kollagen als Hauptbestandteil von Gelatine erscheint möglich. Weitere Probekörper derselben Materialzusammensetzung im Projekt wiesen allerdings gleichmäßige Besiedelungseigenschaften auf, die *in vitro*-Biokompatibilität dieses Komposits ist daher grundsätzlich gegeben.

Der Wechsel von Gelatine Typ B zu Typ A ging nicht mit einer merklichen Veränderung der Besiedelungseigenschaften der Alginatmaterialien einher. Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der beiden Gelatine-Varianten. Während Siimon et al. zwar Unterschiede in der Proteinexpression von Fibroblasten bei Kultur auf elektrogesponnenen Gelatine-Scaffolds beobachteten, zeigten die Fibroblasten keine Unterschiede in ihrer Proliferationsaktivität.¹⁹³ Die rheologischen Eigenschaften von Gelatine Typ A und B unterschieden sich zwar in einer weiteren Studie, die Gelier- und Schmelzeigenschaften waren allerdings gleich.¹⁹⁴ Es ist allerdings nicht davon auszugehen, dass der Wechsel des Gelatinetyps von B nach A in der für die hier untersuchten Alginat-Gelatine-Komposite verwendeten geringen Konzentration (1%) einen signifikante Einfluss auf die Eigenschaften der Materialien hatte.

Die Supplementierung mit Gelatine konnte die *in vitro*-Biokompatibilität der alginatgelbasierten Materialien zwar entscheidend verbessern, war jedoch für den an der kommerziellen Verwertung interessierten Projektpartner, einem Hersteller von Knochenimplantaten, mit Unsicherheiten und Risiken behaftet. Die Zulassung von Medizinprodukten wie Implantaten gestaltet sich nach Aussage eines Vertreters dieses Projektpartners deutlich weniger aufwändig, solange ausschließlich synthetische oder pflanzliche Bestandteile im Produkt verwendet werden. Alginat-Hydroxylapatit-Materialien, wie sie hier zunächst evaluiert wurden, erfüllen diese Eigenschaften. Die Inklusion tierischer Produkte, wie Gelatine hingegen vergrößert die Hürden zur Zulassung dagegen erheblich. Durch das größere Infektionspotential, das von tierischen Produkten im Vergleich zu pflanzlichen oder synthetischen Inhaltsstoffen ausgeht, wird eine sehr viel umfangreichere Risikoprüfung und eine aufwändigere Kontrolle der entsprechenden Inhaltsstoffe nötig. Dies zieht entsprechend höhere Kosten nach sich. Die weiterentwickelten alginatbasierten Materialien mit Gelatinesupplementierung waren trotz ihrer verbesserten *in vitro*-Biokompatibilität für den potentiellen kommerziellen Verwertungspartner daher deutlich weniger attraktiv als die Ausgangsmaterialien ohne Gelatine.

6.1.3. Porosität von PVCA-/PHM- und alginatgelbasierten Materialien

Neben der Zusammensetzung eines Materials ist auch seine Mikro- und Makrostruktur maßgeblich für seine Eignung als Biomaterial für die Regeneration von Knochengewebe. Besonderen Stellenwert haben dabei das Vorhandensein von Poren im Material und deren Größe. Es hat sich gezeigt, dass

Poren essentiell wichtig sind, um das Einwachsen von Knochengewebe in biokompatible Materialien *in vivo* zu ermöglichen.¹⁹⁵ Frühere Untersuchungen konnten die Frage nach der am besten geeigneten Porengröße für optimales Einwachsen von Zellen in Materialproben oder die Regeneration von Knochengewebe *in vivo* nicht eindeutig beantworten¹⁹⁶, aber zumindest gut eingrenzen. Demnach konnten verschiedene Materialien mit Porengrößen von 100-150 µm, 150-220 µm, 200 µm und 400-600 µm die Heilung von Knochendefekten *in vivo* unterstützen¹⁹⁶. In weiteren Untersuchungen waren Porengrößen im Bereich von 300-600 µm am besten geeignet, um die Regeneration mineralisierten Knochengewebes zu erlauben, während kleinere Poren fibrotisches oder nicht mineralisiertes Gewebe begünstigten.¹⁹⁷ Hervorzuheben ist auch die Bedeutung von Poren für die Vaskularisierung, die *in vivo* essentiell für die langfristige Versorgung von neu gebildetem Gewebe in Implantaten und erst ab Porengrößen von 300-400 µm zuverlässig möglich ist.^{198,199} Zusätzlich zum Vorhandensein von Poren im Größenbereich von einigen hundert Mikrometern ist aber auch die Oberflächenstruktur von Materialien wichtig. Ist diese zu glatt, verhindert das die ausreichende Freisetzung und Konzentrierung für die Osteoinduktion nötigen Calcium- und Phosphationen aus Hydroxylapatitimplantaten.^{200,201}

Die hier getesteten Materialproben waren vor diesem Hintergrund mit Poren im Bereich von einigen hundert Mikrometern Größe ausgestattet. Die Technik des 3D-Drucks, besonders als kryo-3D-Druck, also des Einfrierens des gerade gedruckten Materials, ist hervorragend geeignet, um gezielt verschiedene Porengrößen und Porengeometrien zu erzielen. Die in den Materialproben durch den 3D-Druck erzeugten Lumen mit Durchmessern von 200 µm und mehr haben sich in den Besiedelungsversuchen als durchlässig für Osteoblasten erwiesen. Auch in unter solchen Porenöffnungen liegenden Schichten der Materialien auf PVCA- beziehungsweise PHM-Basis, als auch solchen aus Alginatgelen mit Hydroxylapatit waren Zellen zu finden. Die Materialproben von PVCA und PHM wiesen jedoch auch bei massiv gedruckten Proben Poren unterschiedlicher Größe bis circa 200 µm auf. Diese waren wohl die Folge von komplexen Lösungsmittelaustauschprozessen während des Fällens der in Lösung in DMSO gedruckten Probekörper in Wasser.^{134,141} Auf diesen Proben ausgesäte Zellen haben diese Poren mit bis zu circa 200 µm zum Teil überspannt, sind aber nicht in sie eingewandert (siehe Abbildung 14 und Abbildung 16). Proben aus PVCA und PHM mit 3D-gedruckten Poren verschiedener Größe wurden bei einigen Materialvarianten auf ihre Besiedelungseigenschaften untersucht und verglichen, es ergaben sich aber keine Unterschiede. Weitere Versuche mit längeren Kulturzeiten könnten hier eventuell Unterschiede zutage fördern. Diese hier erzielten Ergebnisse stimmen insgesamt gut mit den in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen über den Einfluss von Poren verschiedener Größe auf das Zellverhalten überein.

6.1.4. Sterilisierung von PCVA-/PHM- und alginatbasierten Materialien und Besiedelungseigenschaften in Langzeitbesiedelungsversuchen

Zur *in vitro*-Evaluierung der Eignung eines Materials im Hinblick auf die *in vivo*-Regeneration von funktionalem, mineralisiertem Knochengewebe nach Implantation ist die langfristige Beobachtung nach Besiedelung essentiell. Noch mehr als schon bei kurzen Kulturzeiten ist dafür natürlich die Sterilität der Proben nötig. Während deren Sicherstellung bei Proben auf PVCA- und PHM-Basis durch Ethanolbehandlung kein Problem darstellte, war die Sterilisierung von alginatbasierten Proben schwieriger. Eine Desinfektion dieser Proben mit chemischen Methoden war aufgrund der Porosität und damit einhergehender Rückstände der Desinfektionsmittel (Ethanol, Octenidin) nicht möglich. Das Autoklavieren war aufgrund der Materialeigenschaften ebenfalls zur Sterilisierung nicht geeignet. Die stattdessen erprobte Desinfektion mit UV-Strahlung ergab zwar eine etwas verbesserte Inkubationseignung für längere Kultur. Der Zerfall der Proben erst nach einigen Wochen Kultur und die auf den Proben gefundenen Zellüberreste legen nahe, dass die Keimbelastung zu Beginn noch recht niedrig gewesen sein könnte. Die poröse Struktur des Materials und die begrenzte Fähigkeit von UV-Strahlung, Materie zu durchdringen könnte dazu geführt haben, dass Keime im Innern der Probe überlebt und sich von dort aus vermehrt und verbreitet haben.^{202,203} Die fortschreitende Degradation des Alginatgelmateriale, möglicherweise auch durch die Aktivität von Mikroorganismen, dürfte dann die Adhäsion der kultivierten Osteoblasten auf dem Material entscheidend gestört haben. Dadurch wäre eine Proliferation der Osteoblasten oder ihre zellspezifische Aktivität im Sinne der Knochenregeneration und der Bildung von extrazellulärer Matrix nicht mehr möglich.

Erst die Behandlung der Proben mit gamma-Strahlung hat den nötigen Sterilisierungserfolg gebracht. Gamma-Strahlung mit Dosen im Bereich der hier verwendeten 5 bis 15 kGy können bei Alginat zu einer teilweisen Degradation führen²⁰⁴, daher geht mit dieser Art der Sterilisierung die Gefahr einher, die Materialeigenschaften zu verändern. Um solche möglichen Veränderungen auszuschließen, wurden einige der gamma-bestrahlten Proben durch die Projektpartner an der Universität Erlangen-Nürnberg rheologisch untersucht. Dabei wurde keine signifikante Veränderung festgestellt. Erwartungsgemäß konnte die gamma-Bestrahlung aber die Sterilität der Proben sicherstellen. Auch bei einer langen Inkubationszeit von 48 Tagen trat keine Kontamination der Proben auf. Die Proben eigneten sich außerdem weiterhin für die Besiedelung durch primäre, humane Osteoblasten. Die Besiedelung der gesamten, auch der inneren Oberfläche der makroporös 3D-gedruckten Proben zeigt, dass die Osteoblasten in der Lage waren, auf den Oberflächen zu adhären, dort zu proliferieren und durch Migration auch die Bereiche der Proben zu erreichen, an die sie nicht einfach durch Sedimentation aus dem Medium hätten gelangen konnten.

Die lange Kulturzeit setzt eine gute Versorgung der Zellen durch Nährstoffe und einen effektiven Abtransport von Abfallstoffen über das Medium voraus. Die Struktur und Größe der 3D-gedruckten, untereinander verbundenen (interkonnektierenden) Poren der alginatbasierten Probekörper konnten dies offenbar sicherstellen. Anders als bei den PVCA- beziehungsweise PHM-basierten Probekörpern war in den alginatbasierten Materialien im Langzeitbesiedelungsversuch keine vollständige Ausfüllung der freien Räume im Inneren der Probekörper durch die kultivierten Zellen und von ihnen gebildete extrazelluläre Matrix zu beobachten.

Die Ergebnisse der Langzeitbesiedelung nach gamma-Sterilisierung konnten leider nicht durch Replikatversuche an weiteren Probekörpern verifiziert werden. Da die entsprechenden Proben erst am Ende des Forschungsprojekts verfügbar waren, dieses nicht verlängert werden konnte und auch die Doktorandin, die die Proben hergestellt hatte, nicht mehr in der Partnerarbeitsgruppe beschäftigt war, konnte nur ein Satz Proben durch uns untersucht werden.

Ebenfalls nicht eruiert werden konnten die Gründe für die nicht vollständige Ausfüllung der alginatbasierten Proben mit Zellen und extrazellulärer Matrix. Wir hatten zu diesem Zweck schon vor der Herstellung von Probekörpern für die Langzeitbesiedelung angeregt, den Einfluss verschiedener Porengrößen auf das Zellverhalten zu untersuchen. Die Bereitstellung entsprechender Proben war unserer Partnerarbeitsgruppe allerdings leider aus oben genannten Gründen nicht möglich. Vorläufige Versuche mit PVCA- beziehungsweise PHM-basierten, makroporösen Proben mit unterschiedlichen Porengrößen hatten erste Hinweise darauf ergeben, dass auch bei den hier verwendeten humanen, primären Osteoblasten die Porengröße ein Faktor für ihre Fähigkeit sein könnte, Poren im Material komplett auszufüllen (Daten nicht gezeigt). Dass die Porengröße ein entscheidender Faktor für die Regeneration von Knochengewebe *in vivo* ist, ist aus der Literatur bereits bekannt (siehe oben). Die Herstellung von Proben mit verschiedenen Porengrößen wurde durch unsere Partnerarbeitsgruppe mit dem Alginatmaterial bereits erfolgreich erprobt (persönliche Kommunikation). Die Untersuchung von Probekörpern mit Porengrößen zwischen 200 und 800 µm wäre hier sicher sinnvoll gewesen.

Im Sinne einer späteren medizinischen Anwendung von alginatbasierten Knochenersatzmaterialien erscheint die Sterilisierung durch gamma-Strahlung als geeignet. Durch ihre hervorragende Durchdringungsfähigkeit nicht-metallischer Materialien ist gamma-Strahlung für Implantate mit komplexeren Formen ohne metallische Komponente sehr gut geeignet.²⁰⁵ Gerade für patientenangepasste 3D-gedruckte Implantate, wie sie hier geplant sind, ist mit komplexen Formen zu rechnen. Das Ausbleiben negativer Effekte von gamma-Strahlung auf die rheologischen Eigenschaften der alginatgelbasierten Materialien ist vorläufig bereits gezeigt worden, vor einem kommerziellen Einsatz wäre dies mit weiteren Studien zu untermauern. Auch ein Einfluss auf die Resorptionseigenschaften der Materialien wäre angesichts der Eigenschaft von gamma-Strahlung, Polymere degradieren zu können, nicht überraschend und müsste vor ihrer Anwendung überprüft werden. Für die PVCA- und PHM-basierten Materialien ist bisher keine Sterilisierungsmethode erprobt worden, die auch für eine medizinische Anwendung der Materialien geeignet wäre. Sterilisierung mit Gamma-Strahlung erscheint möglich, auch hier wäre aber zu klären, inwieweit dadurch die chemischen, biologischen und Resorptionseigenschaften der Materialien verändert werden. Während das Autoklavieren für PVCA

aufgrund seiner ausreichend hohen Temperaturbeständigkeit (Glastemperatur über 190°C¹³⁴) möglicherweise in Frage kommt, ist nicht damit zu rechnen, dass PHM autoklavierbar ist. Da Wasser als Weichmacher für PHM besonders bei erhöhten Temperaturen bekannt ist¹³⁴, müssen Formveränderungen des Materials durch den zum Autoklavieren verwendeten Wasserdampf befürchtet werden. Eine weitere, verbreitete Methode zur Sterilisierung von Medizinprodukten ist die Begasung mit Ethylenoxid²⁰⁵. Da dieses toxische Gas aber vor seiner Verwendung vollständig aus dem Implantat eliminiert sein muss, erscheint seine Verwendung für ein hochporöses Implantat als möglicherweise nicht effizient. Insgesamt erscheint die Sterilisierung per gamma-Strahlung vorerst als am aussichtsreichsten, die tatsächliche Eignung muss aber durch Versuche demonstriert werden.

6.1.5. Quellverhalten von alginatbasierten Materialien

Neben den biologischen Eigenschaften ist für die Eignung von Materialien als Knochenersatzmaterial ihre auch Formstabilität essentiell wichtig. Verändert sich ihre Größe etwa nach der Implantation, könnten durch Lösen der Verbindung zwischen Implantat und umgebenden Gewebe neue Defekte entstehen, oder eine Formänderung zu funktionalen oder kosmetischen Veränderung führen. Daher wurde das Quellverhalten der alginatgelbasierten Probekörper in verschiedenen Medien untersucht. Die in DMEM, PBS und HBSS beobachtete Quellung von 25% bis 100% (im Falle von Schicht A, also Alginatgelen ohne Hydroxylapatit, in PBS) war dabei deutlich größer als für den klinischen Einsatz akzeptabel. Größenveränderungen von wenigen Prozent wären nicht schädlich, eine kleine Größenzunahme im Sinne eines möglichst dichten Verschlusses der Kontaktregionen zwischen Gewebe und Implantat sogar hilfreich. Die Addition von Hydroxylapatit zum Alginatgel konnte offensichtlich die Quellung des Materials etwas herabsetzen. Dies ist nicht überraschend, da für das Hydroxylapatit selbst keine Quellung erwartet werden kann. Dagegen ist das poröse Gelmaterial Alginat zur Aufnahme von Wasser aus dem Medium fähig und quillt dadurch an. Es lag zunächst nahe, als Mechanismus für diese Wasseraufnahme die Osmose anzunehmen. Die verwendeten Alginatgele waren mithilfe von Calciumionen quervernetzt (Inkubation in 0,1 M CaCl₂)²⁰⁶, die getesteten Medien enthielten Calciumionen in Konzentrationen zwischen 0 mM (PBS) und 1,8 mM (DMEM). Es bestand also ein Konzentrationsgradient zwischen Gelmaterial und dem umgebenden Medium, der zum Einstrom von Wasser ins Gel und damit zur Quellung hätte führen können. Da aber auch alphaMEM Calciumionen in einer Konzentration von 1,8 mM enthält, aber nicht zur Quellung der Gele führte, scheint dieser Mechanismus nicht ursächlich für die Quellung zu sein. Aus dem Vergleich der herstellerseitig angegebenen Inhaltsstoffe der evaluierten Medien ergab sich auch kein Anhaltspunkt, dass andere Ionen durch Osmose die Quellung verursacht haben könnten. Warum die Alginatgele in allen getesteten Medien außer alphaMEM aufquollen konnte schlussendlich nicht geklärt werden. Die ungeklärten Ursachen warfen aber grundsätzlich die Frage auf, welche *in vitro*-Bedingungen am besten geeignet sind, um die chemische und biologische Umgebung von Implantaten *in vivo* nachzustellen. Besonders in Bezug auf Implantatmaterialien für den Knochenersatz gibt es dazu bereits einige Bestrebungen, die allerdings vorrangig auf die Integration der Materialien in den umgebenden Knochen abzielen und dafür die Abscheidung von Calcium-Phosphat auf dem Material beleuchten sollen. Hierbei wurden verschiedene Zellkulturmedien, Blut oder Blutprodukte und ‚simulated body fluid‘ verwendet.^{207–209} Letzteres ist eine Lösung anorganischer Salze in Konzentrationen, die denen im Blutplasma entsprechen.²⁰⁷ Keines dieser Medien kann jedoch alle Aspekte der Implantatsituation *in vivo* vollständig nachbilden. Da hier zumindest in alphaMEM keine zu starke Quellung mehr festgestellt werden konnte und die Ursachen für die Quellung unklar blieben, wäre wohl ein Tierversuch in einem möglichen späteren Verlauf der Materialevaluation der am besten geeignete Weg um neben anderen Aspekten der Eignung als Implantatmaterial auch die Formstabilität der Materialien zu überprüfen.

6.1.6. Fazit zur *in vitro*-Biokompatibilität von PVCA-/PHM- und alginatbasierten Materialien

Die hier gewonnenen Ergebnisse konnten eine insgesamt gute *in vitro*-Biokompatibilität sowohl für PVCA-/PHM-basierte, als auch für alginatbasierte Materialvarianten zeigen. Während PVCA und PHM auch ohne weitere Supplementierung die Kultur von Zellen, bis hin zur Bildung eines langlebigen Gefüges aus Zellen und neu gebildeter extrazellulärer Matrix erlaubten, war beim

Alginate-Materialsystem die Zugabe von Gelatine nötig, um die Probekörper in die Lage zu versetzen, die Kultur von Zellen zu ermöglichen. Durch die sehr flexible Verarbeitungsmöglichkeit der Materialsysteme über den (kryo-) 3D-Druck erscheinen sie aber beide als vielversprechende Kandidaten für die weitergehende Evaluierung Ihrer Eignung für die Entwicklung klinisch einsetzbarer Implantate.

Die eingeschränkte Verfügbarkeit von Probekörpern verhinderte im Projektverlauf die Verifizierung einiger Ergebnisse durch Replikationsversuche. Besonders die erneute langfristige Besiedelung dreidimensionaler makroporöser Probekörper wäre hier besonders wünschenswert und aufschlussreich im Sinne einer Weiterentwicklung der Materialien. Dabei könnte die gebildete extrazelluläre Matrix näher charakterisiert und auf ihre Ähnlichkeit zu nativem Gewebe untersucht werden. Auch der Einfluss der geometrischen Eigenschaften der Probekörper, wie Porengröße und -form, Materialstrangdurchmesser oder Probengesamtdicke auf das Zellverhalten sollte in Folgeversuchen untersucht werden, um die Herstellung optimal geeigneter Implantate zu ermöglichen.

Die für die Resorption *in vivo* nötige Biodegradation von PVCA- und PHM-basierten Materialien konnte in diesem Projekt leider nicht mehr untersucht werden, da die Materialentwicklung bis zum hier beschriebenen Stand länger dauerte, als vorhergesehen. Schon bei der Projektkonzeption waren allerdings unter den Projektpartnern Strategien formuliert und diskutiert worden, mit denen die Materialien biodegradierbar gestaltet werden könnten.

Die Degradation von Polymer-Biomaterialien *in vivo* setzt maßgeblich den Abbau der Hauptkette des Polymers (engl. ‚backbone‘) voraus.^{210,211} Während der Abbau von Polymeren auf Basis biologischer Monomere, wie etwa Proteinen (Fibrin, Kollagen), oft durch die Aktivität von Enzymen geschieht, sind für viele synthetische Polymere keine enzymatischen Abbauege bekannt.^{210,212} Diese werden *in vivo* daher hauptsächlich per Hydrolyse abgebaut.²¹⁰ Dies ist zum Beispiel bei den häufig als Biomaterial verwendeten Polymeren Polylactid (PLA), Polycaprolacton (PCL) und Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) der Fall.^{211,213} Um per Hydrolyse degradierbar zu sein, muss das betreffende synthetische Polymer in seiner Hauptkette entsprechend angreifbare chemische Gruppen besitzen oder damit ausgestattet werden.²¹¹ Unterschiedliche chemische Gruppen können hier zu unterschiedlich hohen Degradationsgeschwindigkeiten führen.²¹¹ Ortho-Ester und Anhydride sind dabei am reaktivsten, aber auch Ester und Amide sind durch Hydrolyse spaltbar.²¹¹ Neben den chemischen Eigenschaften des Polymers hat auch der pH-Wert des umgebenden Mediums einen großen Einfluss auf dessen Degradationsgeschwindigkeit eines Materials.²¹⁴ Da Wasser für den hydrolytischen Abbau nötig ist, hat die Geschwindigkeit, mit der dieses in ein Material eindringen kann ebenfalls einen Effekt auf die Degradationsgeschwindigkeit. Sie ist maßgeblich von der Porosität und Porengröße, des Materials sowie seiner 3D-Struktur abhängig.^{210,213}

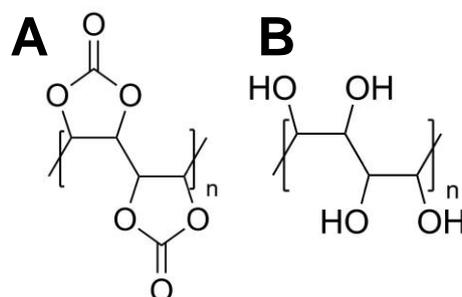


Abbildung 56: chemische Strukturen von A: PVCA, B: PHM

PVCA und PHM enthalten in ihrem Ausgangszustand keine durch Hydrolyse spaltbaren Bindungen in ihrer Polymerhauptkette (siehe Abbildung 56). Auch ein Enzym, das PVCA oder PHM degradieren könnte, ist nicht bekannt. Daher wurde vorgeschlagen, das zur Synthese von PVCA eingesetzte Vinylencarbonat mit weiteren Monomeren zu kombinieren, um das entstehende Copolymer mit funktionellen Gruppen auszustatten, die die Hydrolyse erlauben. An diesen „Sollbruchstellen“ könnte das Polymer dann *in vivo* degradiert werden. Der Einsatz verschiedener funktioneller Gruppen, wie etwa Ester, Amide oder Anhydride (siehe oben) ist denkbar, außerdem ließe sich deren Häufigkeit im Polymer variieren. Zusätzlich kann durch die Verarbeitung des Materials durch 3D-Druck die 3D-

Struktur eines Probekörpers oder Implantats und ihre Makroporosität sehr einfach eingestellt werden. Die Degradationsgeschwindigkeit des Materials wäre so auf mehreren Ebenen flexibel beeinflussbar.

Ein entsprechendes Implantat könnte dadurch im Gleichschritt mit dem Heilungsprozess abgebaut werden. Dies ist für die graduelle Lastabtragung auf das neu gebildete Knochengewebe und zur Verhinderung der Entstehung von Hohlräumen im Implantat während des Heilungsprozesses wichtig.²¹⁵ Für bestimmte Knochenregenerationsprozesse ist außerdem gezeigt worden, dass die Degradationsgeschwindigkeit des verwendeten Knochenersatzmaterials die Heilungsgeschwindigkeit maßgeblich bestimmt.²¹⁶ Über die Steuerung der Resorptionsgeschwindigkeit lässt sich der Regenerationsprozess also positiv beeinflussen. Materialweiterentwicklungen in diese Richtung, etwa durch die Herstellung von hydrolysierbaren Copolymeren, konnten jedoch vor Ende der Projektlaufzeit nicht mehr durchgeführt werden. Auch in diesem Bereich wären sicherlich umfangreichere weitere Versuche zur biologischen Evaluation nötig, bevor eine endgültige Bewertung der Materialeignung als Knochenersatzmaterial möglich ist.

Für beide untersuchten Materialsysteme (alginatgelbasiert und PVCA-/PHM-basiert) muss des Weiteren geklärt werden, ob die erreichbaren mechanischen Eigenschaften den Anforderungen an Knochenersatzmaterialien genügen. Je nach Anwendungsort im Körper erfüllt der Knochen eine wichtige mechanische Stütz- und Schutzfunktion, die ein Implantat übernehmen muss, bis es idealerweise resorbiert und durch nativen Knochen ersetzt worden ist. Alle alginatgelbasierten Materialien, die hier untersucht wurden, können diese Funktionen alleine nicht adäquat erfüllen, da sie dem Augenschein nach deutlich zu weich sind, um zu erwartende Kräfte etwa bei Stößen, oder auch durch die Belastung von Knochen durch das Körpergewicht standzuhalten. Daher wurde für die Versorgung von Defekten der Schädelkalotte hier vorläufig noch die Verwendung eines zusätzlichen Titangitters durch den Verwertungspartner vorgesehen, das zur mechanischen Stabilisierung des Gesamtimplantats dienen soll. Die Materialien auf PVCA-/PHM-Basis haben dagegen eine deutlich höhere mechanische Stabilität. Ihr E-Modul wurde von den Projektpartnern in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mülhaupt bestimmt und liegt für PVCA bei 540 ± 40 MPa und für PHM bei $1,1 \pm 0,3$ GPa.¹³⁴ Die E-Moduln von PHM und PVCA liegen damit zwar noch etwas unter dem für natives Knochengewebe in der Literatur beschriebenen Wertebereich von circa 10 bis 27 GPa.^{217–221} Besonders PHM ist aber in seiner Steifigkeit nicht weit von denen von Polyetheretherketon (PEEK, circa 4 GPa^{222,223}) und Polylactid (PLA, 3,8 GPa²²⁴) entfernt, das bereits als Knochenersatzmaterial verwendet wird.^{6,7} Dies lässt eine Verwendung von PVCA und PHM als Knochenersatzmaterial möglich erscheinen. Der bekannte Effekt von Wasser als Weichmacher für PHM wäre hier allerdings mit besonderer Beachtung zu untersuchen.¹³³ In diesem Zusammenhang ebenfalls bemerkenswert ist, dass PVCA sich schon unter mild basischen Bedingungen in Zeiträumen von unter 5 Tagen bei Raumtemperatur oder darüber in signifikantem Ausmaß zu PHM umsetzen kann.²²⁵ Diese Bedingungen sind nach Implantation *in vivo* leicht vorstellbar. Mit einer graduellen Umwandlung von PVCA-Implantaten wäre also zu rechnen.

Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften und der flexiblen Formgebungsmöglichkeiten durch den 3D-Druck erscheinen beide Materialsysteme insgesamt als vielversprechende Kandidaten für Knochenersatzmaterialien und sollten in diese Richtung weiterentwickelt und evaluiert werden.

6.2. Entwicklung einer Methode für die ‚confined compression‘ von Osteoblasten in dreidimensionalen Scaffolds und anschließender Analyse der Genexpressionsmuster

Zentrales Ziel des zweiten Teilprojekts dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur mechanischen Stimulation von Zellen *in vitro* durch Kompression in dreidimensionalen Scaffolds. Dabei sollten Zellen und Scaffold durch ‚confined compression‘ stimuliert werden, also komprimiert werden, während die gleichzeitige seitliche Ausdehnung der Probekörper verhindert wird. Dadurch erfolgt die Verformung ausschließlich in Kompressionsrichtung. Die dabei notwendigerweise auftretende Verringerung des Probekörpervolumens geschieht über das Ausströmen von enthaltener Flüssigkeit. Die auf die Zellen wirkende Belastung wird durch die ‚confined compression‘ auf eine

einzelne Richtung beschränkt, was eine gezieltere Auswertung des biologischen Effekts ermöglicht.¹²² Die Kompression sollte unter Bedingungen stattfinden, die denen in regulärer Zellkultur entsprechen. Dazu muss die Methode in der in einem Zellkulturinkubator befindlichen Kompressionsmaschine und in Zellkulturmedium durchführbar sein.

Die Auswertung der Effekte der Kompression sollten durch die Messung der Genexpressionsmuster der Zellen ohne und nach Kompression analysiert werden. Auch eine Begutachtung der Proben in Gefrierschnitten nach Stimulation sollte ermöglicht werden. Dazu müssen die Probekörper nach Kompression einfach und ohne deren Zerstörung aus der Apparatur herausnehmbar sein. Außerdem müssen die Probekörper dazu geeignet sein, nach der Kompression schnell aufgelöst zu werden, um die Isolation der mRNA der enthaltenen Zellen zu erlauben. Zudem muss es möglich sein, ausreichend viele Zellen in den Probekörpern zu kultivieren, um genug mRNA für die spätere Analyse gewinnen zu können.

Gleichzeitig soll die Methode ermöglichen, Materialien für die Kompression zu benutzen, die in ihrer Steifigkeit möglichst nahe an jene von nativem Knochengewebe herankommen. Durch die begrenzte Kraft, die durch die Kompressionsmaschine ausgeübt werden kann, ergibt sich daher ein oberes Limit für die Größe der Probekörper. Alle diese Ziele wurden mit der entwickelten Apparatur und Methode erreicht.

6.2.1. Eigenschaften der entwickelten Kompressionsapparatur

Für dieses Projekt konnte eine Apparatur entwickelt werden, die erfolgreich für die ‚confined compression‘ von zell-beladenen und zellfreien Biomaterialproben in der vorhandenen Kompressionsmaschine eingesetzt wurde.

Die grundlegende Idee für das Design der Apparatur hat sich dabei bewährt. In den Kompressionskammern können mehrere Biomaterialproben gleichzeitig angeordnet und komprimiert werden. Die Ausführung des Entwurfs in Edelstahl anstelle von anderen Materialien, wie etwa Kunststoffen, hat sich als richtig erwiesen, die Apparatur ist dadurch sehr langlebig und auch die Reinigung und das Sterilisieren durch Autoklavieren ist einfach möglich. Durch die hohe Steifigkeit des gewählten Kammermaterials können Biomaterialien mit sehr hohem E-Modul ohne Verformung der Kammern komprimiert werden. Auch die verwendeten Glasfritten haben sich zum Verschließen der Kammern nach unten bewährt. Sie sind sehr durchlässig für Flüssigkeiten, aber gleichzeitig mechanisch so stabil, dass sie große Kompressionskräfte erlauben. Beschädigungen der Gelproben durch die Fritten, etwa aufgrund ihrer rauen Oberfläche, wurden nicht beobachtet. Auch die Glasfritten lassen sich leicht reinigen und autoklavieren.

Im Gegensatz zu anderen, zuvor beschriebenen Versuchsaufbauten zur Kompression von Zellen in dreidimensionalen Scaffolds erlaubt die hier entwickelte die Verwendung großer Probekörper, die Verwendung steifer Materialien und eine direkte Kompression mit großer Flexibilität in der Wahl der Kompressionsparameter. Zuvor beschriebene Versuchsaufbauten konnten jeweils einige dieser Eigenschaften, nicht aber alle gleichzeitig kombinieren: Im häufig verwendeten Flexcell-System²²⁶ ist zwar neben der Dehnung von Zellen auf flexiblen Zellkultursubstraten auch die Kompression von zell-beladenen Scaffolds möglich, die maximal anwendbare Kraft dazu ist jedoch konstruktionsbedingt stark begrenzt. Die Kompression sehr steifer Materialien ist so kaum möglich. ‚Confined compression‘ kann ebenfalls nicht ohne weitere Modifikation des Systems durchgeführt werden. Versuchsaufbauten mit dem Flexcell-System ähnelnden Prinzipien zur Dehnung oder Stauchung von Zellkultursubstraten sind ebenfalls beschrieben worden, erlauben aber keine Stimulation von Zellen in dreidimensionalen Scaffolds.²²⁷ Die Verwendung von Stempeln und der Belastung der Probekörper durch Gewichte wurde ebenfalls durchgeführt, erlaubt aber keine zyklische Kompression.^{228,229} Weitere Systeme verwenden hydrostatische Kompression, etwa durch Pumpen. Im Vergleich zur Vermittlung der Kompression über das Scaffold stellt dies eine grundsätzlich andere Art der Zell-Stimulierung dar, auch wenn sie unter Verwendung von Scaffolds möglich ist.²³⁰ Die Stimulationsapparaturen der Firma Bose / TA Instruments („Biodynamic Test Instrument“) erlauben zwar Kompression, sind aber in ihrer maximalen Kompressionskraft beschränkt und benötigen zur ‚confined compression‘ eine maßgeschneiderte Modifikation.^{231,232} Weitere Apparaturen zur zyklischen ‚unconfined compression‘

sind ebenfalls bekannt.²³³ Darüber hinaus sind aber auch vereinzelt Systeme beschrieben worden, die ähnliche Kompressionsbedingungen ermöglichen, wie das hier entwickelte. Dumas et al. berichteten von einer Apparatur, die zwar ‚confined compression‘ erlaubt, dies allerdings nur bei sehr kleinen Probekörpern und Kompressionsamplituden.²³⁴

Die hier entwickelte Kompressionsapparatur erlaubt in Verbindung mit der vorhandenen Kompressionsmaschine die zyklische ‚confined compression‘ von dreidimensionalen Probekörpern. Dadurch wird der Einsatz dreidimensionaler Zellkulturbedingungen, welche im Vergleich zu zweidimensionaler Zellkultur eine deutlich verbesserte Nachbildung physiologischer Prozesse verspricht²³⁵, während der Kompression möglich. Es können bis zu drei Probekörper bei Stimulationsfrequenzen bis ca. 2 Hz gleichzeitig komprimiert werden. Die genaue Maximalfrequenz ist abhängig von der gewählten Amplitude. Amplituden bis über 50% sind im beschriebenen Versuchsaufbau mit Fibringelen möglich. Die Verwendung von steiferen Materialien reduziert aufgrund der höheren nötigen Kraft die mögliche Amplitude. Die Probekörpergröße erlaubt die Extraktion von mehr als ausreichenden Mengen RNA bei der Verwendung von Osteoblasten.

Einige Aspekte der hier entwickelten Kammer könnten allerdings auch noch verbessert werden. Kleinere mögliche Änderung betreffen zum Beispiel eine zu kleine Dichtfläche im Bereich des Ausgleichsgefäßes oder gelegentlich auftretende Probleme beim Befüllen der Apparatur, bei dem sich Luftblasen in den Verbindungskanälen bildeten und gleichmäßiges Strömen des Mediums behinderten. Sicher die größte Herausforderung war aber die fehlende Möglichkeit, die laufende Kompression durch Sicht zu kontrollieren. Zur kontrollierten und reproduzierbaren Kompression von Probekörpern ist eine genaue Kontrolle der Stempelposition und des Kontakts zur Probeoberfläche unverzichtbar. Da diese nicht durch Sicht möglich war und die dabei auftretenden Kräfte zu klein waren, um sie durch Messung direkt erkennen zu können, musste hierfür ein Messalgorithmus entwickelt werden. Eine durchsichtige Kompressionsapparatur oder ein entsprechendes Sichtfenster hätte dies sicher stark vereinfacht. Die Herstellung einer solchen durchsichtigen Kammer wäre allerdings aufgrund der weiteren Anforderungen (ausreichende Steifigkeit des Materials, Dichtigkeit gegenüber Flüssigkeiten, Autoklavierbarkeit, Verhinderung von interferierenden biologischen Effekten, zum Beispiel durch Lösungsmittel aus Klebstoffen, möglichst einfache Herstellung der Apparatur) sicher nicht trivial gewesen und wurde hier aus Zeitgründen nicht verfolgt. Die entwickelte Methodik zur Detektion des Kontakts zwischen Kompressionsstempel und Probekörper hat sich schlussendlich als zuverlässig erwiesen und eine Weiterentwicklung der Kammer als nicht unbedingt notwendig erscheinen lassen.

Während der Kompressionsapparentwicklung waren einige Hindernisse zu überwinden. Der Durchmesser des die Kompression ausübenden Stempels war zu Beginn zu groß gewählt. Beabsichtigt war eine möglichst große Abdeckung der oberen Oberfläche der komprimierten Materialproben, um eine gleichmäßige Kompression zu erreichen. Da der Stempel in der Kompressionsmaschine aber nicht sehr genau räumlich ausgerichtet werden kann, verkantete er sich während des Kompressionsvorgangs in den Kompressionskammern und führte zu sehr großen auftretenden Lasten in der Kompressionsmaschine, die nicht den an den Materialproben wirkenden Kompressionskräften entsprachen. Eine kontrollierte Kompression wurde dadurch verhindert und erst durch eine deutliche Verringerung des Stempeldurchmessers ermöglicht.

Ebenfalls herausfordernd war, dass die zu entwickelnde Kompressionsmethode die zyklische Kompression von primären, humanen Osteoblasten auch in den evaluierten Biomaterialkandidaten auf PVCA/PHM-Basis und Alginatbasis ermöglichen sollte, diese zu Beginn der Methodenentwicklung aber noch nicht zur Verfügung standen. Daher musste ein geeignetes Ersatzmaterial gefunden werden. Hydrogele boten sich an, da sie gut zu verarbeiten sind, in vielen Fällen biokompatibel sind und mit den alginatbasierten Materialien Hydrogele auch zu den später zu komprimierenden Materialien zählten. Eine gute Übertragbarkeit von Erkenntnissen und Methoden konnte daher angenommen werden.

Die ursprüngliche Wahl von Kollagen als Scaffoldmaterial erwies sich jedoch problematisch, da die hergestellten Probekörper aufgrund ihrer unzureichenden mechanischen Stabilität nicht ohne

Beschädigung aus ihrer Gießform entnommen und in die Kompressionsapparatur eingesetzt werden konnten. Die Erprobung verschiedener Techniken zum Herauslösen der gegossenen Gele aus ihrer Form führte schließlich zu einer verbesserten Gießform, die sich zur Entnahme der Proben nach unten hin öffnen lässt und zum Wechsel auf Fibrin als Probekörpermaterial, das sich durch eine deutlich verbesserte Stabilität auszeichnet. Damit konnten die Fibrinprobekörper in aller Regel ohne Beschädigungen und ohne größeren Aufwand aus der Gießform entnommen und in die Kompressionsapparatur eingesetzt werden. Fibrin ist darüber hinaus kommerziell gut verfügbar, einfach zu verarbeiten und durch die Variation seiner Ausgangsmaterialien Fibrinogen und Thrombin einfach in seinen rheologischen Eigenschaften zu beeinflussen. Der mechanische Aufschluss nach Durchführung der Kompression mithilfe von keramischen Kügelchen war ebenfalls einfach und schnell mit den Fibringelen möglich.

Während sich Fibrin zwar wegen seiner größeren Steifigkeit als deutlich besser geeignet erwies als die vorher verwendeten Kollagengele, zeigte sich bei der zyklischen Kompression eine unerwünschte, nicht vollständig elastische Verformung. Die Gele folgten nach der initialen Vorkompression und der anschließenden zyklischen Kompression nicht vollständig der Stempelbewegung. Der Stempel hob sich offenbar bei seiner Aufwärtsbewegung in zunehmendem Maße von der Probenoberfläche ab (sogenanntes ‚Lift-off‘). Ein vollständig elastisch verformbares Material würde sich unter diesen Umständen bei jeder Stempelbewegung soweit wieder ausdehnen, dass der Kontakt zwischen Materialoberfläche und Stempel bestehen bleibt. Die maximal auftretenden Kräfte während der zyklischen Kompression ließen daher immer weiter nach. Die maximale Amplitude der Kompression von Gel und Zellen veränderte sich dadurch nicht, allerdings erfuhren die Zellen ein kleineres Spektrum an Kompressionsamplituden im Verlauf des Versuchs, da sich die Gele mit fortschreitender Versuchsdauer immer weniger entspannten. Für die Messung der rheologischen Eigenschaften der Fibringele ergab sich daraus die Herausforderung, dass die scheinbare Gelsteifigkeit von Kompressionsvorgang zu Kompressionsvorgang abnahm. Um Erkenntnisse über die Ausgangseigenschaften des Materials zu erhalten, wurden daher für die Bestimmung der Gelsteifigkeiten nur die Spannungs-Dehnungs-Kurven der ersten zwei Kompressionszyklen verwendet. Dies bedeutete aufgrund der verringerten Zahl an Messpunkten eine verringerte Messgenauigkeit, die durch die Wiederholung der Messung jedoch ausgeglichen werden konnte.

Aus biologischer Sicht erscheint Fibrin als ein gut geeignetes Modellmaterial für die Untersuchung von Regenerationsprozessen. Die Interaktion des Körpers mit dem Implantat bei der Versorgung von Knochendefekten besteht im ersten Schritt aus der Bildung eines Blutgerinnsels.²³⁶ Dieses besteht zu einem wesentlichen Teil aus Fibrin.²³⁶ Die Zellen des umgebenden Knochengewebes interagieren daher bei der Regeneration *in vivo* nicht nur mit dem Material selbst, sondern auch mit Fibrin und anderen, auf dem Knochenersatzmaterial adsorbierten Proteinen.²³⁶ Fibrin stellt dabei die Form der extrazellulären Matrix dar, an der die Osteoblasten *in vivo* zuerst adhären, bevor sie ihre eigene, gewebsspezifische Matrix bilden. Als Scaffold für *in vitro*-Anwendungen und Tissue Engineering ist Fibrin außerdem bereits vielfach erprobt und beschrieben worden.^{237–242} Auch im spezifischen Kontext der Knochenregeneration ist Fibrin alleine²⁴³, oder in Kombination mit β -Tricalciumphosphat beziehungsweise mit Hydroxylapatit und Gelatine als Scaffold verwendet worden.^{244,245} Oh et al. konnten zeigen, dass die Steifigkeit von hydrogelbasierten Scaffolds Einfluss auf die Differenzierung von mesenchymalen Zellen haben kann. Bei der Verwendung von Scaffolds aus PVA mit HA mit variabler Steifigkeit induzierten Gele mit einem E-Modul von 20 kPa die Differenzierung von MSCs zu neuronalen Zellen, Gele mit einem E-Modul von 80 kPa dagegen die zu Chondrozyten. Noch steifere Hydrogele, hier mit 190 kPa, induzierten eine osteogene Differenzierung der MSCs.²⁴⁶ Vergleichsweise steife Zellsubstrate scheinen also die osteogene Differenzierung zu begünstigen, auch wenn sie mit E-Moduln im kPa-Bereich noch deutlich von den für native Knochenmatrix gemessenen Steifigkeiten von 0,31 bis 30 GPa entfernt sind.^{247,248} Es ist davon auszugehen, dass die hier verwendeten Fibringele mit einer Fibrinogenkonzentration von 50 mg/ml und einem gemessenen E-Modul von 35 MPa die osteogene Differenzierung von Osteoblasten nicht beeinträchtigen. Fibringele erscheinen insgesamt als adäquate Modelle für die Regenerationssituation im Knochengewebe nach der Implantation von Knochenersatzmaterialien.

Die Genexpressionsanalyse nach Stimulation der primären, humanen Osteoblasten mit verschiedenen Medienbedingungen, BMP-2 und durch Kompression wurde im vorliegenden Projekt mit kommerziell erhältlichen qPCR-Arrays der Firma Qiagen durchgeführt. Diese Arrays erlauben die schnelle Analyse der Genexpressionsaktivitäten von 84 Genen durch einen einzelnen Versuch und dadurch die Analyse einer signifikant größeren Zahl von Genen als bei manueller Durchführung von qPCR-Versuchen möglich wäre.

Eine Analyse der relativen Genexpression wäre auch möglich gewesen durch die Verwendung von DNA-Microarrays.²⁴⁹ Hierbei werden DNA-Oligonucleotide auf einem Träger, oft Glas, fixiert. Die zu analysierende Population von DNA, zum Beispiel aus mRNA transkribierte cDNA, wird dann hinzugegeben, hybridisiert an komplementäre, fixierte DNA und kann anschließend fluorezenzoptisch quantifiziert werden. Mithilfe dieser Methode ist die gleichzeitige Vermessung einer im Vergleich zu qPCR-Arrays noch einmal deutlich erhöhten Zahl an Genen möglich. Kommerziell erhältlich sind Microarrays mit mehr als 200.000 Oligonucleotiden (Fa. Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt). Damit ist die gleichzeitige Analyse des gesamten Transkriptoms in einem einzelnen Versuch möglich.²⁵⁰ Ebenfalls möglich ist die transkriptomweite Analyse der Genexpression mithilfe der RNASeq-Methode. Hier wird die Population an isolierten mRNAs sequenziert und quantifiziert. Dadurch ist auch die Detektion von bisher nicht identifizierten und annotierten Transkripten möglich.²⁵⁰ Beiden Methoden gemein ist die große Menge an gewonnenen Daten, was sehr umfangreiche Analysen möglich macht. Dies geht aber mit hohen Anforderungen an die maschinelle Ausstattung und Methodik, sowie vergleichsweise hohen Kosten einher.²⁵⁰

qPCR-Arrays dagegen können mit qPCR-Geräten durchgeführt werden und benötigen keine weitere Ausstattung. Sie sind daher ökonomischer durchzuführen und bedürfen einer geringeren initialen Investition in Material und Know-How. Die deutlich kleinere Menge an gewonnenen Daten sorgt für eine einfache und daher schnelle Auswertung, da weniger aufwändige statistischen Modelle und Musterfindungsalgorithmen benötigt werden. Bei Versuchsansätzen, in denen ein bestimmter biologischer Prozess von vornherein als Untersuchungsgegenstand festgelegt ist, so wie im vorliegenden Projekt, oder falls ein bestimmter erwarteter Effekt verifiziert werden soll, erscheint es ausreichend, nur Gene aus diesem Kontext zu untersuchen. Sollen Erkenntnisse aus einem explorativen Versuch später nachverfolgt werden, etwa nach Definition einer spezifischeren Fragestellung, ist es bei der initialen Verwendung von qPCR-Arrays leichter, die Genexpressionsdaten einzelner Gene durch qPCR-Versuche zu verifizieren. Die gemessenen Daten können dabei aufgrund der Verwendung derselben Messmethode direkt mit denen aus qPCR-Arrays verglichen werden. Sollen dabei die Effekte einer Vielzahl von weiteren Versuchsbedingungen auf eine kleine Zahl von Genen untersucht werden, ist dies ebenfalls durch eine überschaubare Anzahl an qPCR-Versuchen möglich, während die Verwendung von Microarrays ungeeignet wäre. Daher scheint die Wahl eine qPCR-basierten Methode für das vorliegende Projekt richtig, auch vor dem Hintergrund der starken Fokussierung auf die Methodenentwicklung für die Kompression von Zellen in dreidimensionalen Scaffolds.

6.2.2. Auswertungsmethode für die Genexpressionsanalyse aus qPCR-Daten

Die für die Auswertung der Genexpressionsdaten aus den qPCR-Daten vorgesehene Software des Herstellers Qiagen funktionierte leider nicht zuverlässig. Die Verwendung einer schon vorhandenen qPCR-Software eines anderen Herstellers war aufgrund besonderer Anforderungen der Arrays ebenfalls nicht einfach möglich. Daher wurde hier ein Auswertungsalgorithmus auf Basis der Programmiersprache Python entwickelt. Durch die Verwendung eines verbreiteten Ein- und Ausgabe-Dateiformats (.csv) und der ebenfalls häufig verwendeten Programmierumgebung Google Colab / Jupyter Notebook ist der Algorithmus leicht auf andere Geräte und Betriebssysteme übertragbar.

Die Auswertung folgt der für die Analyse von Genexpressionsmustern via qPCR veröffentlichten Methode von Livak und Schmittgen¹⁴⁰ und gibt Genexpressionsänderungen in Vielfachen der Expressionsaktivität einer Kontrollprobe aus. Zusätzlich werden die von Qiagen für die qPCR-Arrays vorgegebenen Qualitäts- und internen Kontrollen automatisch berücksichtigt. Der Algorithmus erfüllt also effizient und umfassend die Anforderungen an die Auswertung der verwendeten qPCR-Arrays.

Für die Interpretation der gewonnenen Daten wird durch den Algorithmus ein hierarchisches Clustering durchgeführt. Diese Funktion beruht auf Algorithmen, die als Bibliothek frei verfügbar sind und hier in den Programcode importiert wurden.

Das hierarchische Clustering ist eine gut geeignete Methode, um multidimensionale Daten, wie etwa Genexpressionsdaten mit einer Vielzahl an analysierten Genen, zu ordnen.^{251,252} Hierbei wird für alle Datenpunkte, hier die experimentellen Konditionen innerhalb eines Versuchs, die Ähnlichkeit ihrer Genexpressionsmuster berechnet. Dabei können verschiedene Methoden für die Berechnung zum Einsatz kommen, die je nach Eigenschaften des Datensatzes und biologischem Kontext alle angemessen sein können.^{251,252} Wichtige Konzepte dabei sind die Distanzmetrik und die sogenannten ‚linkages‘. Für das Clustering wird die Ähnlichkeit der Datenausprägung aller Dimensionen eines Datensatzes (hier die Expressionsaktivitäten aller gemessenen Gene) miteinander verglichen. Für diesen Vergleich können verschiedene mathematische Berechnungsmethoden verwendet werden, die Distanzmetriken genannt werden.^{251,252} Sie unterscheiden sich darin, wie die Unterschiede in der Datenausprägung in den einzelnen Dimensionen des Datensatzes miteinander zu einem eindimensionalen Wert kombiniert werden. Dieser Wert gibt die Ähnlichkeit, oder genauer Unähnlichkeit, der Datenpunkte zueinander als ‚Distanz‘ zwischen ihnen an. Übliche Distanzmetriken sind etwa die ‚Manhattan‘-Metrik, bei der die Distanzen zwischen den Datenpunkten über alle Dimensionen addiert werden oder die euklidische Distanzmetrik, bei welcher der kürzeste Abstand zwischen zwei Datenpunkten berechnet wird. Sobald im hierarchischen Clustering Datenpunkte zu Clustern zusammengefasst wurden, ist es außerdem nötig zu definieren, wie sie anschließend bei der Berechnung des Abstands zwischen Gruppen behandelt werden sollen (sogenannte ‚linkages‘). Häufig wird dazu der Mittelwert aller im Cluster vorhandenen Datenpunkte berechnet und für den Vergleich herangezogen (‚average linkage‘). Es ist aber auch möglich, den kürzest möglichen Abstand zwischen Datenpunkten aus zwei Clustern als Distanz zwischen diesen Clustern zu definieren (‚single linkage‘). Andererseits kann auch der größtmögliche Abstand zwischen Datenpunkten aus zwei Clustern als Abstand der Cluster betrachtet werden (‚complete linkage‘). Weitere Definitionen und Berechnungsmethoden für Distanz und ‚linkages‘ sind beschrieben.²⁵³ Welche der Methoden am besten geeignet ist, hängt vom Datensatz ab und lässt sich nicht allgemeingültig definieren, sondern muss anhand der vorliegenden Daten entschieden werden.²⁵²

Für die Auswertung der hier gewonnenen Daten wurden verschiedene Distanzmetriken, als auch verschiedene ‚linkages‘ erprobt. In allen Versuchen wurde dazu das Ergebnis des Clusterings verglichen mit der erwarteten Einordnung der gemessenen Proben. So wurden zum Beispiel ähnliche Genexpressionsmuster bei ähnlichen eingesetzten BMP-2-Konzentrationen bei der Stimulation von primären, humanen Osteoblasten mit BMP-2 erwartet. Es wurde aber auch geprüft, ob je nach Wahl der Distanzmetrik und des ‚linkage‘ Muster in den Daten zu erkennen waren. Anhand dieser Beobachtungen und der in der Literatur beschriebenen guten Eignung der euklidischen Distanzmetrik für Genexpressionsdaten²⁵² wurde diese Variante für alle hier durchgeführten Versuche verwendet. Die zum Teil in der Literatur beschriebenen komplexeren Metriken wie etwa ‚Rank-Magnitude‘ konnten hier nicht erprobt werden, da sie in der verwendeten Funktionsbibliothek zum Clustering (siehe oben) nicht enthalten war. Für das ‚linkage‘ wurde aus denselben Gründen das ‚average-linkage‘ ausgewählt. Auch hier legten Datenanalyse und Literatur diese Wahl nahe.²⁵²

Neben dem hierarchischen Clustering sind weitere Methoden der Klassifizierung von Proben in zusammenhängende Gruppen gebräuchlich, so etwa die Technik der ‚k-means‘.²⁵⁴ Während das hierarchische Clustering keine *a priori*-Festlegung auf eine bestimmte Anzahl von Gruppen verlangt, in die die vorhandenen Datenpunkte geordnet werden sollen, muss beim ‚k-means‘-Verfahren eine Anzahl vorgegeben werden. Dies kann zum Beispiel aufgrund des biologischen Kontexts eines Versuchs geschehen. Die Komplexität der Daten kann so verringert werden, um eine einfachere Auswertung zu ermöglichen. Andererseits ermöglicht die ergebnisoffene Analyse per hierarchischem Clustering eine unvoreingenommene Beurteilung der Muster in einem Datensatz. Bei einigen der hier durchgeführten Experimente gab es zwar Gründe, von vornherein eine Einschränkung der Zahl der Cluster vorzunehmen, so etwa die Vorgabe auf ein Cluster pro verwendeter BMP-2-Konzentration bei der Stimulation der primären, humanen Osteoblasten oder die Anzahl der verschiedenen verwendeten Mediumzusammensetzungen. Die Analyse der Daten hat jedoch ergeben, dass die Einordnung nach

Ähnlichkeit der Genexpressionsmuster im Datensatz tatsächlich nicht immer diesen angenommenen Einteilungen folgte. Daher erschien eine neutrale Einordnung ohne eine vorige Annahme bei der Beschreibung der Ergebnisse sinnvoller. Für die Identifikation von Gruppen von Genen, die unter den verschiedenen Versuchsbedingungen ähnliche Expressionsmuster aufweisen, war eine solche Einschränkung des Clusterings ohnehin nicht angezeigt, da hier ja gerade bis dahin unbekannte Zusammenhänge aufgedeckt werden sollten. Daher wurde das hierarchische Clustering anstelle von ‚k-means‘ verwendet.

Die mit den Genexpressionsdaten außerdem durchgeführte Suche in den Datenbanken DAVID und PANTHER diente der Identifikation von Regulationsmustern durch sogenannte ‚functional annotation‘. Bei dieser Suche wird eine eingegebene Liste von Genen mit durch die Versuchsbedingungen veränderter Expression verglichen mit den in der Datenbank abgelegten Listen von Genen mit bekannter, gemeinsamer Beteiligung an definierten biologischen Prozessen. Sind in der eingegebenen Liste mehr Gene eines bestimmten Prozesses vertreten, als durch reinen Zufall zu erwarten wäre, kann ein Effekt der Versuchsbedingungen auf die Regulation dieses Prozesses angenommen werden. DAVID fasst formalisierte Informationen zu Genen, Proteinen, ihren Funktionen und biologischen Prozessen, sowie ihren Verknüpfungen untereinander aus einer Vielzahl von Datenbanken zusammen und macht sie gemeinsam durchsuchbar.^{142,255} Zu den so zusammengefassten Datenbanken gehören neben anderen Entrez, UniProt und Gene Ontology.¹⁴² Die in diesen Datenbanken enthaltenen Daten stammen aus manuell eingetragenen Experimentaldaten, aber auch aus maschinell inferierten Informationen, zum Beispiel aufgrund von Sequenzähnlichkeiten.²⁵⁶ Die Datenbank PANTHER basiert vorrangig auf phylogenetischen Verwandtschaften zwischen Proteinen, die in der Datenbank funktional annotiert sind. Sie ist erweitert worden um die Informationen über die Gene, welche die eingetragenen Proteine codieren und weitere Daten zu ihrer Expression und Regulation.²⁵⁷

DAVID und PANTHER können in explorativen Versuchen verwendet werden, um in großen Datenmengen mit hoher Komplexität Muster und ihre mögliche Bedeutung erkennen zu können.²⁵⁵ Sie sind ursprünglich für die Verwendung mit Daten aus Microarray-Versuchen konzipiert, bei denen die Genexpression genomweit gemessen werden kann.²⁵⁸ qPCR-Arrays sind dagegen in ihrer Größe begrenzt und können nicht all jene Gene in ihrer Expressionsaktivität vermessen, die mit den in den Datenbanken abgelegten biologischen Prozessen verknüpft sind. Die Identifikation von durch die Versuchsbedingungen beeinflussten biologischen Prozessen bei der ‚functional annotation‘ ist dadurch in ihrer Genauigkeit etwas verringert. Hinzu kommt, dass die Auswahl von Genen die im qPCR-Array vertreten sind, eine funktionsbezogene Vorauswahl darstellt. Während eine genomweite Messung aller Genexpressionsaktivitäten Erkenntnisse zu allen bekannten biologischen Prozessen ermöglicht und so auch unerwartete Effekte der Versuchsbedingungen erkennbar macht, ist mit der Verwendung von funktional festgelegte qPCR-Arrays nur eine Aussage über den jeweiligen biologischen Prozess möglich. Auch die Identifikation von Genen, für die eine Beteiligung an einem bestimmten Prozess bis dahin nicht bekannt war, kann durch die genomweite Messung möglich werden. Trotzdem ist mit den verwendeten Datenbanken eine übergeordnete Betrachtung aller gemessenen Genexpressionsdaten gemeinsam möglich, die ohne diese Hilfsmittel kaum sinnvoll darstellbar gewesen wäre.

6.3. primäre, humane Osteoblasten weisen Defekte in ihrer osteogenen Reaktionsfähigkeit und der Lokalisation von Adhäsionsmolekülen auf

Mit der oben beschriebenen Kompressionsmethode sollten im späteren Projektverlauf primäre, humane Osteoblasten stimuliert werden. Um die Zelltyp-spezifischen Eigenschaften dieser Zellen im Sinne der Osteogenese im Vorfeld zu charakterisieren, wurden sie mit BMP-2 behandelt und ihre Reaktion durch Veränderung ihrer Genexpressionsmuster im Kontext Osteogenese analysiert. Außerdem wurde der Effekt verschiedener Mediumbedingungen auf die Expressionsaktivitäten und auf die Proliferation der Zellen untersucht. In beiden Fällen wurden kaum eindeutigen Effekte beobachtet. Zwar verringerte sich die Proliferationsgeschwindigkeit der Osteoblasten in nicht vollständig supplementierten Zellkulturmedien. Bei der Genexpression von Osteogenese-bezogenen

Genen waren jedoch weder durch die Stimulation mit BMP-2, noch durch die veränderten Mediumbedingungen eindeutige Muster erkennbar. Außerdem zeigte die immunzytochemische Untersuchung der Adhäsionsmoleküle, dass eine Reihe dieser Proteine zwar offenbar von den primären, humanen Osteoblasten exprimiert wurden, sie aber nicht ihre physiologische Lokalisierung aufwiesen. Diese Ergebnisse zeigen Defizite in der Reaktionsfähigkeit der Osteoblasten auf mechanische und biochemische osteogene Reize und in der Ausstattung mit intakten Fokaladhäsionen der Zellen auf.

6.3.1. Reaktion auf die Stimulation mit BMP-2 und auf Veränderung der Mediumkomposition

BMP-2 ist ein potenter Aktivator von Osteoblasten *in vitro* und der ektopischen (also außerhalb von Knochengewebe stattfindenden) Bildung von Knochengewebe *in vivo* (sogenannte Osteoinduktion).²⁵⁹ Die Stimulation von Osteoblasten mit BMP-2 *in vitro* ist in der Literatur vielfach beschrieben. In Konzentrationen von 20-300 ng/ml erhöht BMP-2 demnach die Transkriptionsaktivität von RUNX2 und BGLAP in Osteoblasten und erhöht die Enzymaktivität von alkalischer Phosphatase (ALP) in Zelllysaten bei Inkubation über Zeiträume von 2 bis 7 Tagen.^{126-132,260,261} Für die hier durchgeführte Zellcharakterisierung wurden Konzentrationen und Inkubationszeiten aus diesen Berichten übernommen. Die erwartete erhöhte Transkriptionsaktivität von RUNX2 und BGLAP konnte jedoch nicht beobachtet werden. Auch andere Gene, die an der Osteogenese, beziehungsweise osteogenen Differenzierung von Osteoblasten beteiligt sind, wurden nicht in eindeutigen Mustern verstärkt exprimiert.

Die fehlende Reaktionsfähigkeit der primären, humanen Osteoblasten auf osteogene Reize bedeutet einen Verlust dieser osteoblastenspezifischen Zellfunktionen, also effektiv eine Dedifferenzierung. Dedifferenzierungsprozesse sind für verschiedene mesenchymale Zellentitäten bereits beschrieben worden. So verloren etwa Chondrozyten, die wie Osteoblasten durch Differenzierung aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen (MSC) entstehen, ihren spezifischen Phänotyp durch Kultivierung in 2D-Kultur für etwa einen Monat²⁶². Eine Redifferenzierung solcher Zellen durch biochemische Faktoren im Medium ist möglich.²⁶³ Vaskuläre glatte Muskelzellen verringern ihren Differenzierungsgrad als Reaktion auf mechanische Belastung, was sie in die Lage versetzt, zu proliferieren, zu migrieren und zur Regeneration von Verletzungen extrazelluläre Matrix zu produzieren. Diese Dedifferenzierung wird ausgelöst durch den BMP-Antagonisten BMP Endothelial Regulator (BMPER). Hierbei führt eine erhöhte BMPER-Aktivität und die sich daraus ergebende verringerte BMP-Aktivität zu einer verstärkten Dedifferenzierung in glatten Muskelzellen.²⁶⁴ Dies steht in einem gewissen Widerspruch zum Effekt von BMPs in Knochengewebe, wo es im Allgemeinen differenzierungsfördernd wirkt.²⁵⁹ Reife Osteoblasten im Zebrafisch sind ebenfalls in der Lage als Antwort auf Verletzungen zu dedifferenzieren, die Expression von Markern später Differenzierungsstadien zurückzufahren und Eigenschaften von Osteoblasten-Vorläuferzellen zu entwickeln.²⁶⁵

Die Dedifferenzierung von humanen Osteoblasten ist offenbar unter anderem reguliert durch extrazelluläre, biochemische Faktoren. Es wurde gezeigt, dass humane mesenchymale Stammzellen, die durch Differenzierungsfaktoren im Zellkulturmedium (Ascorbinsäure, β -Glycerolphosphat, Dexamethason; „Mineralisierungsmedium“) zur Differenzierung zu Osteoblasten angeregt wurden, nach Wegfall dieser Faktoren im Medium partiell dedifferenzieren, die Eigenschaften differenzierter Osteoblasten also teilweise wieder verloren. Diese Dedifferenzierung der Zellen war nicht vollständig, da der Osteoblastenmarker RUNX2 weiterhin stark exprimiert wurde und die dedifferenzierten Zellen deutlich stärker auf erneute Inkubation in Differenzierungsmedium reagierten, als vorher nicht differenzierte MSCs.²⁶⁶ Es ist außerdem gezeigt worden, dass TNF α die Differenzierung von humanen Osteoblastenvorläuferzellen zu Osteoblasten durch Mineralisierungsmedium verhindern kann, falls es dem Medium in den ersten 2 bis 7 Tagen der Kultur im Mineralisierungsmedium zugesetzt wird.²⁶⁷ Auch die durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ausgelöste Signaltransduktion scheint bei der Dedifferenzierung von humanen Osteoblasten eine Rolle zu spielen. In einer Studie wurden humane Osteoblasten-ähnliche Zellen durch Mineralisierungsmedium zur Differenzierung zu Osteoblasten angeregt. Wurden diese Zellen anschließend durch exogene Überexpression mit dem

funktionell aktivem EGF-Rezeptor (EGFR) ausgestattet, verloren die Zellen ihre Osteoblastendifferenzierung und zeigten Eigenschaften von Osteoblastenvorläuferzellen.²⁶⁸

Es ist außerdem berichtet worden, dass biomechanische Einflüsse, konkret der Wechsel von zweidimensionaler ‚Monolayer‘-Kultur von humanen Osteoblasten zu dreidimensionaler Kultur in Scaffolds, die Zellen zur Differenzierung zu Osteozyten anregen können. Der Wechsel zurück zu einer zweidimensionalen Kultur führte dann entsprechend zu einer Dedifferenzierung der Osteozyten zurück zu einem weniger stark ausdifferenzierten Osteoblastenphänotyp.²⁶⁹

Die in diesem Projekt beobachteten Defizite der osteogenen Reaktionsfähigkeit der charakterisierten primären, humanen Osteoblasten können als Dedifferenzierung interpretiert werden. Während die osteogene Reaktion von differenzierten Osteoblasten auf BMP-2 vielfach beschrieben wurde (siehe oben), reagieren ihre Vorläuferzellen, MSCs, im Allgemeinen nicht mit der Expression osteogener Differenzierungsmarker wie alkalischer Phosphatase (ALP) auf die Stimulation mit BMP-2²⁷⁰, so wie auch die hier untersuchten primären, humanen Osteoblasten auf BMP-2-Stimulation nicht wie erwartet reagiert haben. Wie die Literatur außerdem zeigt, kann ein solcher Dedifferenzierungsprozess auf biochemische Faktoren, etwa solche im verwendeten Kulturmedium, zurückgehen. Die hier verwendeten Zellen waren nur dann in der Lage, mineralisierte Matrix zu bilden, wenn sie für mehrere Wochen in Mineralisierungsmedium auf der Basis von DMEM kultiviert wurden, nicht aber während der Kultur im osteoblastenspezifischen ObM, das weitere Mediumsupplemente unbekannter Zusammensetzung enthält. Gleichzeitig war bei Kultur in ObM im Vergleich zur Kultur in DMEM eine deutlich stärkere Proliferation der Zellen zu beobachten. Die osteogene Differenzierung von Osteoblastenvorläuferzellen und die damit verbundene Aktivierung von RUNX2 geht einher mit dem p27- und pRb-vermittelten Zellzyklusarrest.²⁷¹ RUNX2 steuert diesen Prozess, der eine Inhibition der Proliferation bedeutet, und wird dadurch selbst noch zusätzlich aktiviert („feed forward loop“).^{271,272} Dies stimmt gut überein mit der in diesem Projekt gemachten Beobachtung, dass die untersuchten Zellen bei Kultur in ObM zwar sehr schnell proliferieren, aber keine erhöhte Expression von RUNX2 zeigen, bei Kultur in DMEM dagegen nur langsam proliferieren, aber zur Ausbildung mineralisierter Matrix fähig waren. Die Stimulation mit BMP-2 bei Kultur in DMEM wurde im Projekt nicht versucht, könnte aber weitere Erkenntnisse zu der Reaktionsfähigkeit der Zellen erlauben.

Zusammengenommen lassen die hier gewonnenen Daten Zweifel an der genauen Identität der verwendeten primären, humanen Zellen aufkommen. Obwohl laut Hersteller als Osteoblasten bezeichnet, zeigen sie bei der Kultur im vom Hersteller dafür vorgesehenen, proprietären Medium nicht die für Osteoblasten in der Literatur beschriebenen Eigenschaften. Es ist möglich, dass die verwendeten Zellen unter den beschriebenen Zellkulturbedingungen auf dem Spektrum von multipotenter MSC bis zum reifen Osteoblasten eher einen dedifferenzierten Osteoblastenvorläufer darstellen.

Die Vermutung liegt nahe, dass das verwendete Medium ObM für diese Dedifferenzierung verantwortlich sein könnte. Der Einfluss biochemischer Faktoren auf die Differenzierung von MSCs und Osteoblasten wurde gezeigt.²⁶⁶ Auch die Inhibition der Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten durch TNF α wurde beschrieben.²⁶⁷ Da die Zusammensetzung des Mediums nicht bekannt ist und vom Hersteller auch auf Nachfrage nicht preisgegeben wurde, kann nicht ausgeschlossen, dass das Medium ObM TNF α oder andere biochemische Faktoren enthält, die zwar die Kultur der Zellen durch gesteigerte Proliferation erleichtern, das Zellverhalten im Sinne einer osteogenen Differenzierung und osteoblastenspezifischer Reaktionsfähigkeit aber entscheidend stören.

Die Untersuchung des Einflusses der Mediumsupplemente (ObGS) und des außerdem im Medium enthaltenen Serums hat hier allerdings auch keine klaren Erkenntnisse über ihren Einfluss auf das Verhalten der primären, humanen Osteoblasten erbracht.

Zwar wurden die Genexpressionsänderungen der Osteoblasten nicht spezifisch im Kontext Proliferation untersucht, trotzdem konnte die Genexpressionsanalyse von Osteoblasten in Passage 4 bei Kultur in ObM ohne Mediumsupplemente und ohne Serum zeigen, dass einige Gene mit Bedeutung für proliferative Prozesse stärker exprimiert wurden (*FGF1*, *FGF2*, *TGFB3*, *VEGFB*, siehe Kapitel 5.2.4). Eine solche Reaktion der Zellen in Passage 5 war allerdings nicht zu beobachten, hier

wurden insgesamt nur drei Gene differenziell exprimiert (*PHEX*, *VEGFA*, *VEGFB*). Zusätzlich war zu beobachten, dass Zellen in Passage 5 auch in Medium mit Supplementen, aber ohne Serum einige Gene stärker exprimierten, die mit verstärkter Proliferation (*FGF1*, *FGF2*, *TGFBR2*, *VEGFB*) und verringerter Apoptose assoziiert sind (*SMAD5*, *SOX9*, *IGF2*, *VEGFA*). Ein eindeutiger Effekt der Mediumzusammensetzung auf das Proliferationsverhalten der Osteoblasten konnte hier also nicht beobachtet werden.

Nur weitere Untersuchungen, zum Beispiel mit der gezielteren Untersuchung der Expression von Genen mit Bezug zu Proliferationsprozessen können hier konkretere Erklärungen für das beobachtete Zellverhalten ermöglichen. Insbesondere die Kultivierung der Osteoblasten in ObM ohne Mediumsupplemente (ObGS), aber mit fötalem Kälberserum könnte weitere Erkenntnisse liefern. Medium ohne diese Supplemente wurde im vorliegenden Projekt zwar verwendet, dies enthielt darüber hinaus aber auch kein Serum, sodass die Zellen möglicherweise durch diesen Umstand in ihrem physiologischen Zellverhalten und ihrer Proliferation gestört waren. Insbesondere ist vorstellbar, dass das verwendete Medium bereits BMP-2 enthält, und das Aktivierungspotential der Zellen dadurch bereits gesättigt war. Dies würde die fehlende weitere Steigerung der untersuchten Genexpressionsaktivität erklären, lässt aber offen, warum die verwendeten Zellen im ObM-basierten Mineralisierungsmedium nicht zur Bildung mineralisierter Matrix fähig waren.

Neben dem Einfluss des Mediums sind weitere Gründe für das unerwartete Zellverhalten denkbar. So können während der Zellkultur, besonders bei der Kultur über längere Zeiträume, spontane Mutationen vorkommen und für Veränderungen im Zellverhalten sorgen.²⁷³ Zur Erklärung der fehlenden Reaktion auf BMP-2 kommen hierbei unter anderem alle Mutationen in Frage, die Komponenten der von BMP-2 aktivierten intrazellulären Signalkaskade beeinflussen (siehe Kapitel 3.2.4). Eine Beeinträchtigung der Rezeptorfunktion könnte die Aktivierung der intrazellulären Mediatoren Smad 1/5/8 verhindern. Defekte in diesen Proteinen könnten möglicherweise die Bindung an Smad 4 stören und so die Translokation des Komplexes in den Zellkern verhindern. Aber auch ein Defekt in der Expression der Zielmoleküle der BMP-2-Signaltransduktion, wie etwa *RUNX2*, *DLX5* oder *OSX*, der eine Aktivierung dieser Gene verhindert, ist denkbar. Diese genannten möglichen Erklärungen für das beobachtete Zellverhalten bleiben ohne weitere Untersuchungen jedoch spekulativer Natur.

6.3.2. Lokalisation von Adhäsionsmolekülen

Zur weiteren Charakterisierung wurden die hier verwendeten primären, humanen Osteoblasten auf ihre Expression zentraler Moleküle der Fokaladhäsionen untersucht, die für die Aufnahme und Verarbeitung mechanischer Reize eine entscheidende Rolle spielen (siehe Kapitel 3.2.5). Dabei wurde die Expression von Paxillin, Vinculin, fokaler Adhäsionskinase (FAK), sowie den osteoblastenspezifischen Integrinen $\beta 1$ und $\beta 3$ zwar beobachtet, nur Paxillin wurde allerdings in dem für vollständig ausgebildete Fokaladhäsionen typischen, punktförmigen Lokalisierungsmuster gefunden. Die anderen genannten Proteine lagen in einer diffusen Verteilung im Zytoplasma vor. Gleichzeitig zeigten die Osteoblasten eine schwache Adhäsion auf ihrem Zellkulturuntergrund (siehe Abbildung 42). Da Zellen über die Fokaladhäsionen ihre Adhäsion an Strukturen ihrer Umgebung erreichen, auch auf Glasoberflächen²⁷⁴, scheint ein Defekt in der Ausbildung voll funktionaler Fokaladhäsionen in den verwendeten primären, humanen Osteoblasten vorzuliegen.

Die Bildung von Fokaladhäsionen beginnt in der Regel mit der RhoA-vermittelten Bindung der Adapterproteine Talin und Kindlin aus dem Zytoplasma an die zytoplasmatische Domäne von Integrinen.^{275,276} Durch mechanische Belastung der sich entwickelnden Fokaladhäsion wird Talin aktiviert und rekrutiert Paxillin und FAK, die dort auch direkt miteinander interagieren.²⁷⁵ Der Literatur sind unterschiedliche Angaben darüber zu entnehmen, ob Paxillin FAK rekrutiert, oder andersherum FAK für die Rekrutierung von FAK verantwortlich ist^{275,277,278}, Paxillin ist in jedem Fall jedoch aufgrund seiner Fähigkeit, viele weitere Fokaladhäsionsproteine zu binden ein wichtiges Adapterprotein.^{279,280} Wurde die Bindung von FAK an Paxillin durch Mutation gestört, war FAK in einer Studie nicht mehr in Fokaladhäsionen lokalisiert. Darüber hinaus war dort auch die Bildung neuer Fokaladhäsionen gestört, sowie die Adhäsion der betroffenen Zellen abgeschwächt.^{88,279} Auch das hier untersuchte

Protein Vinculin, das an der Bindung der Fokaladhäsion an die intrazellulären Aktinfilamente des Zellskeletts beteiligt ist, wird von Talin aus dem Zytoplasma an die Fokaladhäsion rekrutiert, dadurch aktiviert und ist ein direkter Bindungspartner von Paxillin.^{275,276,278}

Es sind also für eine Reihe von Proteinen vorstellbar, dass Defekte in ihrer fokaladhäsionsbezogenen Funktion Ursache für die hier beobachteten beeinträchtigten Ausbildung von Fokaladhäsionen und der verringerten Adhäsion waren. Defekte, die eine Störung der Ausbildung von Fokaladhäsionen hervorrufen können, sind zuvor beschrieben worden und erscheinen auch hier als Grund für die gemachten Beobachtungen möglich. Paxillin, als zentrales Adapterprotein mit wichtiger Funktion für die Bindung von FAK und Vinculin kommt hier in Frage. Da Paxillin aber in der erwarteten Lokalisierung an FAs gefunden wurde, scheint die Rekrutierung von Paxillin selbst an die Fokaladhäsion nicht gestört zu sein. Wäre die Bindung an nachgelagerte Bindungspartner von Paxillin gestört, könnte das die beobachteten Defekte erklären. Ohne weitere Versuche zur Rekrutierung von Fokaladhäsionsproteinen, zum Beispiel auch Talin, ist hier aber keine abschließende Erklärung möglich. Auch eine Störung der Funktion von FAK bei der Aktivierung von Fokaladhäsionsproteinen durch Phosphorylierung ist denkbar. Hier könnten Analysen des Phosphorylierungsstatus von FAK-Substratproteinen der Fokaladhäsionen weiteren Aufschluss ermöglichen. Auch und besonders die Phosphorylierung von Paxillin wäre hier ein interessantes Untersuchungsziel, da diese nötig für die Bindung von Paxillin zu vielen seiner Bindungspartner ist, sie gleichzeitig für die Rekrutierung von Paxillin an die Fokaladhäsion aber nicht zwingend vorhanden sein muss.^{278,280}

Bemerkenswert ist außerdem die Beobachtung, dass zwar Paxillin in dem für Fokaladhäsionen typischen Lokalisierungsmuster gefunden wurde, nicht aber die Integrine $\beta 1$ und $\beta 3$ und auch nicht Vinculin. Es lagen also auf der einen Seite diejenigen Proteine, die die Verankerung der Fokaladhäsionen an der Zellmembran vermitteln, nicht in der physiologischen Lokalisierung vor. Auf der anderen Seite war aber mit Vinculin aber auch eines der Proteine, das die Verbindung zwischen Fokaladhäsionen und den Aktinfasern herstellt, nicht in seiner physiologischen Lokalisierung zu finden. Trotzdem war Paxillin in Zellausläufern und an den Enden von Aktinfasern lokalisiert (siehe Abbildung 42A). Dies wirft die Frage auf, mit welchen Fokaladhäsionsproteinen Paxillin hier interagieren konnte, um in der für Fokaladhäsionen typischen Lokalisierung vorzuliegen. Es ist mit Actopaxin ein weiteres Adapterprotein bekannt, das die Bindung von Paxillin an Aktinfasern vermittelt²⁷⁸ und das daher hier in Frage kommt. Darüber hinaus waren die Osteoblasten offenbar zumindest in eingeschränktem Maß zu einer Adhäsion auf dem Zellsubstrat und zur Ausbildung einer ausgestreckten und erkennbar von Aktinfasern gestützten Zellmorphologie fähig. Die Beschaffenheit der dafür nötigen Zelladhäsionsstrukturen und bis zu welchem Grad diese mit Fokaladhäsionen in Zusammensetzung und Struktur identisch waren, bleibt offen.

6.4. Effekte mechanischer Stimulation durch ‚confined compression‘ auf primäre, humane Osteoblasten

Die Kompression der zuvor charakterisierten, primären, humanen Osteoblasten in Fibrinscaffolds durch ‚confined compression‘ resultierte hier nicht in signifikanten Änderungen der Expression von Genen im Kontext Osteogenese. Dieses Ergebnis überrascht angesichts der biologischen Funktion von Osteoblasten bei der Knochenregeneration, die durch mechanische Stimulation stimuliert wird und angesichts der in der Literatur vielfach beschriebenen Effekte mechanischer Stimulation auf Osteoblasten.

In einem umfangreichen Übersichtsartikel von Yu et al.²²⁶ wird etwa über eine gesteigerte Proliferation und Migration, sowie über gesteigerte Expression der Osteogenese-assoziierten Markerproteine RUNX2, ALP, BGLAP und Osteopontin bei zyklischer Dehnung von Osteoblasten mit Amplituden von 0,8 bis 9% berichtet. Die in den dafür zitierten Studien häufigste Stimulationsfrequenz war 1 Hz.

Auch für die Kompression von Osteoblasten sind bereits Effekte auf die Expression osteoblastenspezifischer Differenzierungsmarker gezeigt worden. Die statische Kompression von primären calvarialen Mausosteoblasten in dreidimensionalen Kollagen-Scaffolds resultierte in einer erhöhten Expression der Marker für osteogener Differenzierung RUNX2, ALP und BGLAP.²²⁸ Die

zyklische Kompression von MC3T3-Osteoblasten-Monolayern führte dagegen nicht zu einer veränderten Expression der Gene für RUNX2, ALP, den WNT-Signalweg-Inhibitor DKK1 oder den Osteoklasten-Aktivator RANKL.²²⁷

Bei mehrstündiger zyklischer Kompression von Osteoblasten in Agarosegelen bei einer Kompressionsfrequenz von 1 Hz waren die Gene für ALP, BGLAP, RUNX2 und Osterix signifikant hochreguliert.²⁸¹ Die Kompression von Osteoblasten in Kollagengelen (mehrstündig, wiederholt) in einer weiteren Studie löste die Ausbildung mineralisierter Matrix aus, obwohl außer β -Glycerolphosphat keine die Mineralisierung stimulierenden Supplemente im verwendeten Medium enthalten waren. Außerdem war die Expression des für die Osteoblastendifferenzierung wichtigen Transkriptionsfaktors Osterix, sowie von BGLAP und RUNX2 durch die Kompression erhöht.²⁸²

In mesenchymalen Stammzellen, die in elektrogenesponnen Poly(lactid-co-glycolid)-Scaffolds (PLGA) kultiviert wurden, führte die konstante Perfusion des Scaffolds mit Zellkulturmedium kombiniert mit einer zyklischen Kompression mit einer Amplitude von 5% der Ausgangshöhe bei 1 Hz Kompressionsfrequenz zu einer Verringerung der Expression der Osteoblastenmarkergene für RUNX2, BGLAP, ALP und Kollagen 1.²³² Bei Verwendung von ebenfalls elektrogenesponnen Scaffolds aus Polycaprolacton (PCL) führte eine Kompression mit 0,5 Hz und einer Amplitude 10% dagegen zu einer erhöhten Expression von RUNX2, BMP2, sowie SMAD5.²⁸³ MC3T3-Osteoblasten, die durch Bildung von extrazellulärer Matrix selbst ein dreidimensionales Scaffold geschaffen hatten und darin zyklisch komprimiert wurden (Kompressionsfrequenz 1 Hz), exprimierten verstärkt die Gene für RUNX2, BMP2 und Osteopontin.²⁸⁴

Im Allgemeinen sorgt die mechanische Stimulation, besonders auch durch zyklische Kompression, in Osteoblasten also für eine Hochregulierung der Aktivität der typischerweise mit der Osteogenese assoziierten Gene wie RUNX2, BGLAP und ALP bei Verwendung von Stimulationsfrequenzen um 1 Hz und Amplituden bis circa 10%.

Die Wahl von Kompressionsfrequenzen um 1 Hz, wie sie auch im vorliegenden Projekt für die Stimulation der primären, humanen Osteoblasten verwendet wurde, beruhte auf der Beobachtung, dass die Schrittfrequenz beim Gehen, die eine vergleichsweise starke Belastung des Skelettsystems bedeutet, im unteren einstelligen Bereich liegt.^{285,286} Die im Projekt verwendete Kompressionsamplitude von 10% liegt ebenfalls im in der Literatur in der Regel berichteten Bereich. Hier gibt es jedoch größere Unterschiede zwischen den Studien, die sich schon allein aus den sehr unterschiedlichen Versuchsaufbauten ergeben. Werden Zellen durch Stauchung des Zellsubstrats komprimiert²²⁷, wirken sicher andere Stimulationsbedingungen auf die komprimierten Zellen als bei Kompression in dreidimensionalen Scaffolds.²⁸¹ Ohnehin unterscheidet sich die *in vitro* ausgeübte Kompression in Art und Stärke aber grundsätzlich von der durch mechanische Belastung ausgeübte Verformung von mechanosensitiven Zellen in Knochengewebe. Die im Knochen *in vivo* hauptsächlich für die Aufnahme mechanischer Reize verantwortlichen Osteozyten detektieren mechanische Belastungen des Knochens einerseits über direkte Verformung ihres Zellkörpers und ihrer ausgedehnten dendritischen Zellausläufer, andererseits aber auch über Flüssigkeitsfluss in den Lacunae und Canaliculi, in sie diese ins Knochengewebe eingebettet sind, sowie über elektrische Potentialänderungen, die ebenfalls durch mechanische Belastungen des Knochens entstehen.^{40,65} In welchem Maße diese Mechanismen die Mechanosensitivität von Osteozyten bestimmen, ist bisher nicht abschließend geklärt. Die Lacunae wirken dabei *in vivo* als Verstärker der Verformung von Knochenzellen und können die auf die Osteozyten wirkenden Verformungen im Vergleich zur Verformung des gesamten Knochengewebes um ein Vielfaches verstärken.²⁸⁷ Da dieser komplexe und sehr fein strukturierte Aufbau des mineralisierten Knochengewebes *in vitro* bisher nicht vollständig nachgebildet werden kann, fehlt die verstärkende Wirkung durch die Lacunae, sodass auch der Effekt mechanischer Belastung *in vitro* nicht vollständig nachgestellt werden kann. Die Kompression von Osteoblasten in dreidimensionalen Hydrogelen bedeutet aber eine mechanische Verformung der Zellen und einen Flüssigkeitsfluss durch das Scaffoldmaterial. Zwei der drei beschriebenen Stimuli auf mechanosensitive Knochenzellen *in vivo* werden so also nachgebildet. Der in der Literatur vielfach beschriebene Effekt mechanischer Stimulation auf Osteoblasten demonstriert die grundsätzliche Effektivität solcher Versuchsaufbauten.

Während primäre, humane Osteoblasten vielfach auf ihr Zellverhalten in Bezug auf ihre Mechanosensitivität untersucht werden, sind die hier verwendeten calvarialen Osteoblasten der Firma Sciencell im Speziellen bisher nicht sehr umfangreich beschrieben. In Bezug auf die Expression von osteogenen Markerproteinen ist von einer erhöhten Expression von ALP, BGLAP, OPN und COL1 bei Kokultur mit humanen Endothelzellen der Nabelschnur und Neutrophilen berichtet worden.²⁸⁸ Die Kokultur mit Peridontalligamentzellen auf Amnionmembranen hat in einer weiteren Studie die primären, humanen Osteoblasten zur Bildung von mineralisiertem Gewebe angeregt.²⁸⁹ Bei Kultur auf dreidimensionalen Aerogel-Scaffolds exprimierten die primären, humanen Osteoblasten mehr BGLAP und hatten eine höhere ALP-Aktivität als Vergleichszellen in zweidimensionaler Kultur.²⁹⁰ Auch auf die Stimulation mit hochfrequenter elektrischer Wechselfeldspannung reagierten Osteoblasten mit der hochregulierten Expression von Osteogenese-spezifischen Genen (BMP2, BMP4, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, FGF2, BGLAP, ALP).²⁹¹

Die Reaktionsfähigkeit von primären, humanen, calvarialen Osteoblasten dieses Herstellers im Sinne der typischen, osteogenen Zellfunktion ist also bereits gezeigt worden. Da der Hersteller jedoch keinerlei Angaben zum Spender oder Spenderpool macht und außerdem einige der zitierten Studien schon mehr als 10 Jahre in der Vergangenheit liegen, ist nicht damit zu rechnen, dass die für die hier vorgestellten Versuche verwendeten Zellen (erhalten im Oktober 2019) aus derselben Ursprungspopulation stammen. Beobachtungen aus anderen Studien mit Zellen des gleichen Herstellers lassen sich also nicht unbedingt übertragen.

Trotzdem bemerkenswert im Hinblick auf die hier durchgeführten Versuche ist jedoch eine Studie von Zhang et al., für die calvariale Osteoblasten der Firma Sciencell verwendet wurden.²⁹² Die Autoren berichten, dass diese Zellen auf Stimulation durch Dehnung des Zellkulturuntergrunds mit erhöhter Proliferation und Viabilität, sowie verringerter Apoptose reagierten. Bei außerdem durchgeführten Analysen der Expression von Genen im Kontext der Osteogenese mit denselben qPCR-Arrays, die auch in der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurden, waren signifikante Änderungen aber nur für wenige Gene zu detektieren. So waren die Gene für den Calcitonin-Rezeptor, Cathepsin K, Kollagen Typ 10 und Chordin (CALCR, CTSK, COL10A1, CHRD) signifikant reguliert, die Regulationsrichtung (Inhibierung oder Aktivierung der Genexpression) war jedoch für alle diese Gene nicht über alle untersuchten Stimulationsdauern gleich. Die calvarialen primären humanen Osteoblasten reagierten also auf die mechanische Stimulation nicht mit einer eindeutigen Aktivierung von Osteogenese-assoziierten Genen. Auch solche Gene, die als klassische Osteogenesemarker gelten, wie RUNX2, ALP oder BGLAP waren hier nicht signifikant reguliert. In einer weiteren Studie wurden die calvarialen, primären humanen Osteoblasten von Sciencell durch Kompression in dreidimensionalen Scaffolds mechanisch stimuliert.²⁹³ Dabei kam ein Medium zum Einsatz, das Ascorbinsäure, Dexamethason und β -Glycerolphosphat enthielt (vergleiche das hier verwendete Differenzierungsmedium; Kapitel 4.2). Eine Veränderung der Genexpressionsaktivität von ALP, BMP2 oder Kollagen Typ 1 wurde nicht beobachtet.

Die hier gemachten Beobachtungen zur ausbleibenden Reaktion der primären, humanen Osteoblasten der Firma Sciencell bei mechanischer Stimulation durch zyklische ‚confined compression‘ stimmen also mit den in der Literatur veröffentlichten Beobachtungen zu Zellen der gleichen Quelle überein, widersprechen jedoch den Ergebnissen aus Studien mit Osteoblasten im Allgemeinen.

Da die verwendeten primären, humanen Osteoblasten im hier verwendeten Versuchsaufbau eine stark abgekugelte Zellmorphologie aufwiesen und keine dendritischen Zellausläufer ausgebildet hatten (siehe Abbildung 54), konnte auch keine Stimulierung der Zellen über solche Zellausläufer erfolgen. Osteoblasten, die im Rahmen von in der Literatur beschriebenen Studien in dreidimensionalen Scaffolds kultiviert wurden, wiesen dabei grundsätzlich andere Zellmorphologien auf. Die von Sawa et al. gezeigten primären Mausosteoblasten wiesen beispielsweise in zweidimensionaler Kultur zwar eine weniger ausgestreckte Zellmorphologie auf, als die hier verwendeten humanen Osteoblasten, bilden in dreidimensionaler Kultur in Kollagengelen aber lange Zellausläufer.²⁶⁹ Deren Fehlen erklärt das Ausbleiben einer Reaktion der hier untersuchten Zellen auf Genexpressionsebene vielleicht teilweise.

Auch die oben bereits angesprochene, eingeschränkte Adhäsionsfähigkeit der verwendeten Zellen und ihre unvollständig ausgebildeten Fokaladhäsionen haben vermutlich zum Ausbleiben einer Reaktion auf die mechanische Stimulierung beigetragen. Da Osteoblasten mechanische Reize wesentlich auch über Fokaladhäsionen wahrnehmen⁶¹, fällt bei deren Defekt ein Mechanismus für ihre Detektion weg, sodass die nachfolgende Signaltransduktionskaskade, die die Expression der Osteogenese-assoziierten Genen auslösen könnte, nicht aktiviert werden kann. Eine Analyse des Aktivierungsstatus‘ verschiedener Proteine dieser Signalwege, etwa durch die phosphorylierungsspezifische Proteinanalyse (zum Beispiel per Western-Blot), könnte hier eventuell mehr Aufschluss darüber geben, inwieweit die Osteoblasten in der Lage sind, Stimuli zu verarbeiten und welche Elemente der Signaltransduktion möglicherweise ihre Funktion nicht wie erwartet erfüllen.

6.5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Insgesamt ergeben die in diesem Projekt gemachten Beobachtungen und entwickelten Methoden ein umfassendes Modellsystem, dass die Beurteilung der *in vitro*-Biokompatibilität dreidimensionaler - auch 3D-gedruckter - Materialien in Bezug auf ihre Eignung für die Knochengeweberegeneration erlaubt. Über die reine Zytotoxizitätsprüfung hinaus erweitert das gezeigte Methodenspektrum die Evaluation von Biomaterialien um die Möglichkeit, Interaktionen zwischen Zellen und Material im Hinblick auf Adhäsion, Migration und die Bildung extrazellulärer Matrix zu zeigen, was Grundvoraussetzungen für die Regeneration nativen Gewebes sind. Die neuentwickelte Methode und Apparatur zur mechanischen Stimulation von zielgewebespezifischen Osteoblasten während der Interaktion mit einem dreidimensionalen Biomaterial stellt eine zusätzliche Erweiterung der Untersuchungsmethoden dar. Mit diesem System kann auch die Interaktion zwischen Materialien und Zellen bei mechanischer Belastung *in vitro* nachgestellt werden, die einen signifikanten Einfluss auf die Regeneration von Knochengewebe hat.

Die *in vitro*-Biokompatibilitätsprüfung der PVCA-/PHM-, sowie alginatgelbasierten Biomaterialien hat wichtige Impulse für deren Entwicklungsprozess in der Kooperation mit den beteiligten Arbeitsgruppen geliefert. Es konnten schlussendlich Materialvarianten identifiziert werden, die gute *in vitro*-Biokompatibilität gezeigt haben und vielversprechende Knochenersatzmaterialien für die Weiterentwicklung von neuartigen Implantaten für die Versorgung großer Knochendefekte darstellen.

Durch die entwickelte Kompressionsapparatur und der dazugehörigen experimentellen Methodik sind Versuche zur mechanischen Stimulation von Zellen in dreidimensionalen Scaffolds mit einem breiten Spektrum an rheologischen Eigenschaften möglich. Dies schließt sehr steife Materialien mit ein, die im Kontext der Knochenregeneration besonders von Interesse sind. Die Ermöglichung der ‚confined compression‘ stellt eine Erweiterung der bisher verfügbaren und in der Literatur beschriebenen Methoden dar und bedeutet eine Verbesserung der Nachahmung physiologischer Prozesse in einem *in vitro*-Experimentalsystem. Insbesondere ist die Apparatur entwickelt worden, um Osteoblasten während der Kultur in Scaffolds aus den im Projekt entwickelten Materialien zu stimulieren. Diese Versuche können nun durchgeführt werden, sobald entsprechende Materialprobekörpern zur Verfügung stehen.

Die Charakterisierung der hier verwendeten calvarialen, primären, humanen Osteoblasten hat jedoch einige Ergebnisse hervorgebracht, die ihre Eignung für die weitere Verwendung und die Durchführung tiefergehender Analysen von Prozessen der Knochengeweberegeneration in Frage stellen. Die Reaktion auf biochemische und mechanische Stimulation, die in Osteoblasten im Allgemeinen zur Aktivierung osteogener Prozesse führt, kann als Grundvoraussetzung für ein geeignetes, osteoblastentypisches Zellverhalten betrachtet werden. Ihr Ausbleiben hier war überraschend. Die Ursache dafür konnte auf Basis der bisherigen Ergebnisse jedoch leider nicht abschließend aufgeklärt werden.

Diese Umstände haben jedoch die Notwendigkeit einer umfassenden Charakterisierung aller Teile eines experimentellen Systems, besonders aber der verwendeten Modellzellen aufgezeigt. Aussagen über möglicherweise unterschiedliche Einflüsse verschiedener Versuchsbedingungen (Scaffoldmaterialien, Kompressionsparameter, etc.) auf das Zellverhalten während der Kompression

könnten unter den gegebenen Umständen nicht verlässlich gemacht werden, da unklar ist, inwieweit die verwendeten Zellen entsprechende Stimuli wahrnehmen und verarbeiten können. Hier wären weitere Untersuchungen der verwendeten Modellzellen oder ihr Austausch nötig. Da die Wahl primärer, humaner Zellen aufgrund der hohen *in vivo*-Relevanz weiterhin richtig erscheint, kommen dafür wohl vor allem Osteoblasten aus Explantatkulturen in Frage. Dies ist für Osteoblasten anderer Knochenentitäten (Beckenkamm, Alveolarknochen) in der Arbeitsgruppe Orale Biotechnologie auch bereits übliche Praxis.²⁹⁴

Mit methodischen Verbesserungen dieser Art kann das hier entwickelte System sicher zur weiteren Untersuchung von Regenerationsprozessen im Knochen beitragen. Auch die hier evaluierten Biomaterialien haben durch ihre speziellen mechanischen und biologischen Eigenschaften Potential für die Verwendung als Knochenersatzmaterial für die Versorgung großer Knochendefekte und lassen sich durch den 3D-Druck besonders flexibel und patientenspezifisch verarbeiten. Die im Projekt erzielten Ergebnisse und die erarbeiteten Methoden stellen daher einen relevanten Beitrag zur Entwicklung neuartiger, patientenspezifischer Knochenersatzimplantate für die personalisierte Medizin dar.

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	mehrschichtiger Aufbau des geplanten Knochenimplantats auf Alginatgelbasis; HGA: äußere inerte Deckschicht, HGB: osteokonduktive Knochenregenerationsschicht, HGC: innerer inerte Deckschicht, HGD: verworfen.....	5
Abbildung 2:	Übersicht über mechanoresponsive Signaltransduktionswege in Osteoblasten; rote Symbole: Second Messenger, blaue Symbole: intrazelluläre Signaltransduktionsproteine, grüne Symbole: aktivierte Transkriptionsfaktoren, Grafik erstellt mit Biorender (biorender.com).....	11
Abbildung 3:	chemische Strukturen von A: PVCA, B: PHM	19
Abbildung 4:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Hydroxylapatit-Varianten; links: Partikel mit 10/50 µm („grob“), rechts: Partikel mit 5/25 µm („fein“); Aufnahmen angefertigt von Vera Bednarzig, Universität Erlangen-Nürnberg; Maßstabsbalken: 20 µm	21
Abbildung 5:	Ermittlung der Skalierung der gemessenen Kräfte am Stempeladapter, aufgetragen ist die gemessene Kraft über die Zeit während der Messung.....	24
Abbildung 6:	Verlauf von gemessener Kraft und gefahrenem Weg des Stempels während der zyklischen Kompression von Fibringelen mit 5 mg/ml Fibrinogen bei 0,1 Hz, 10% Kompression über 25 Zyklen; schwarz: gemessene Kraft [N], schwarz gestrichelt: vom Stempel gefahrener Weg [mm].....	26
Abbildung 7:	Spannungs-Dehnungs-Diagramm der zyklischen Kompression von Fibringelen mit 5 mg/ml Fibrinogen bei 0,1 Hz, 10% Kompression; schwarz: Mittelwerte über die ersten zwei Zyklen, rot: Bereich der Spannungs-Dehnungskurve für die eine polynomiale Näherungsfunktion ermittelt wurde, schwarz gestrichelt: Steigungstangente am Umkehrpunkt der Spannungs-Dehnungskurve mit Steigung aus polynomialer Näherungsfunktion	26
Abbildung 8:	Kultivierung von Gingivakeratinozyten in A: PVCA-Eluat, B: PHM-Eluat	31
Abbildung 9:	Kultivierung von Gingivakeratinozyten in A: PVCA-Eluat nach Soxhlet-Aufreinigung, B: PHM-Eluat nach Soxhlet-Aufreinigung	31
Abbildung 10:	Kultivierung von Gingivakeratinozyten in Eluaten von PHM mit A: Hydroxylapatit, B: MgO-Nanopartikeln, von PVCA mit C: Aerosil 200.....	32
Abbildung 11:	Ergebnis der statistischen Auswertung der iCelligence-Versuche zum Einfluss von Materialeluaten auf die Proliferation von primären, humanen Osteoblasten; angegeben ist der jeweilige kumulative Zellindex nach 100 h Inkubation normalisiert auf den Zellindex in unbehandeltem Kontrollmedium; n≥3; #: statistisch signifikant unterschiedliche Proliferation im Vergleich zum Vergleichsmedium (p<0,05); statistisch signifikant unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeiten im Vergleich zwischen ausgewählten Materialvarianten mit Balken eingetragen (*: p<0,05, ***: p<0,005, ****: p<0,0001); publiziert in Stolz et al., 2021 ¹³³	33
Abbildung 12:	rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von PVCA-Proben nach Anschleifen; Maßstabsbalken: A: 500 µm, B: 50 µm, C, D: 10 µm.....	34
Abbildung 13:	rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von PHM-Proben nach Anschleifen in verschiedenen Vergrößerungen; C, D: gleicher Bildausschnitt mit unterschiedlicher Fokussierung; Maßstabsbalken: A: 500 µm, B: 100 µm, C, D: 20 µm.....	35
Abbildung 14:	Besiedelung von PVCA- (A, B) und PHM-Oberflächen (C, D) mit primären, humanen Osteoblasten, 72 h nach Aussäen; zu erkennen ist auch die starke Porosität der Materialien; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 200 µm	36
Abbildung 15:	Besiedelung von PVCA- (A, B) und PHM-Oberflächen (C, D) mit 56% Hydroxylapatitzusatz mit primären, humanen Osteoblasten, 72 h nach Aussäen; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 200 µm	37
Abbildung 16:	Besiedelung von PVCA- (A, B) und PHM-Oberflächen (C, D) nach kryo-Druck mit primären, humanen Osteoblasten, 72 h nach Aussäen; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 200 µm.....	38
Abbildung 17:	Besiedelung von PVCA-Gittern (A, B: 200 µm, C, D: 500 µm nominelle Porengröße) mit primären, humanen Osteoblasten, 2 Wochen nach Aussäen; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 200 µm	39
Abbildung 18:	Besiedelung von PHM-Gittern (A, B: 200 µm, C, D: 500 µm nominelle Porengröße) mit primären, humanen Osteoblasten, 2 Wochen nach Aussäen; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 200 µm	40
Abbildung 19:	Besiedelung von PVCA-Gittern (500 µm nominelle Porengröße) mit 5% Gelatinevlieszusatz mit primären, humanen Osteoblasten, 2 Wochen nach Aussäen; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 µm	41

- Abbildung 20: Besiedelung von PHM-Gittern (A, B: 200 μm , C, D: 500 μm nominelle Porengröße) mit 5% Gelatinevlieszusatz mit primären, humanen Osteoblasten, 2 Wochen nach Aussäen; blau: Eigenfluoreszenz des Materials, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 μm 42
- Abbildung 21: Gefrierschnitt eines PHM-Probekörpers nach Langzeitbesiedelung mit primären Osteoblasten (8 Wochen); Immunfluoreszenzfärbung von grün: Osteopontin, rot: RUNX2; aus Einzelbildern zusammengesetztes Panoramabild; zu erkennen ist die Besiedelung aller Hohlräume des Probekörpers zwischen den hier schwarz erscheinenden Materialsträngen; während der Besiedelung nach oben zeigende Probenfläche hier links; Maßstabsbalken: 1 mm 43
- Abbildung 22: Veränderung der Oberfläche von Proben von Schicht A während der Inkubation in verschiedenen Medien; rot: DMEM, schwarz: PBS, blau: HBSS mit Calcium (1,26 mM) 44
- Abbildung 23: Veränderung der Oberfläche von Proben von Schicht B während der Inkubation in verschiedenen Medien; rot: DMEM, schwarz: PBS, blau: HBSS mit Calcium (1,26 mM) 44
- Abbildung 24: Veränderung der Oberfläche von Proben von Schicht B während der Inkubation in verschiedenen Medien; rot, durchgehende Linie: HBSS mit Calcium (1,26 mM), rot, gestrichelte Linie: DMEM ohne Zusätze, schwarz, durchgehende Linie: DMEM mit Kanamycin, schwarz, gestrichelte Linie: DMEM mit FCS, blau, durchgehende Linie: DMEM mit Glutamax, blau, gestrichelte Linie: DMEM mit Kanamycin, FCS, Glutamax (vollständiges Medium)..... 45
- Abbildung 25: Veränderung des Durchmessers von Proben von Schicht B während der Inkubation in verschiedenen Varianten von alphaMEM; rot: alphaMEM mit Glutamax, schwarz: alphaMEM mit Glutamax, FCS, blau: alphaMEM mit Glutamax, FCS, Penicillin/Streptomycin 45
- Abbildung 26: Besiedelung von Alginatgelen mit 14% Hydroxylapatit (grob) mit primären, humanen Osteoblasten, 48 h nach Aussäen, A: massiv gedruckt, B: porös gedruckt; blau: DNA, Eigenfluoreszenz des Hydroxylapatits, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 μm 46
- Abbildung 27: Besiedelung von Alginatgelen mit feinem Hydroxylapatit mit primären, humanen Osteoblasten, 72 h nach Aussäen, A, C: massiv gedruckt, B, D: Gitter; A, B: 14% Hydroxylapatitgehalt, C, D: 21% Hydroxylapatitgehalt; blau: DNA, Eigenfluoreszenz des Hydroxylapatits, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 μm 47
- Abbildung 28: Besiedelung von Hydrogelen aus Alginat-Gelatine-blend (Typ B) mit Hydroxylapatit (fein) mit primären, humanen Osteoblasten, 48 h nach Aussäen, A, B: 0,5% Gelatinegehalt, C, D: 1% Gelatinegehalt; blau: DNA, Eigenfluoreszenz des Hydroxylapatits, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 μm 48
- Abbildung 29: Besiedelung von Hydrogelen aus Alginat-Gelatine-blend (Typ A) mit Hydroxylapatit (fein) mit primären, humanen Osteoblasten, 7 Tage nach Aussäen; A, B: 0,5% Gelatinegehalt, C, D: 1% Gelatinegehalt, E, F: 1,5% Gelatinegehalt; blau: DNA, Eigenfluoreszenz des Hydroxylapatits, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 μm 50
- Abbildung 30: Besiedelung von makroporös gedruckten Hydrogelen aus Alginat-Gelatine-blend (Typ A) mit Hydroxylapatit (fein) mit primären, humanen Osteoblasten, 2 Tage nach Aussäen; A, B: 0,5% Gelatinegehalt, C: 1% Gelatinegehalt, D, E: 1,5% Gelatinegehalt; blau: DNA, Eigenfluoreszenz des Hydroxylapatits, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 μm 52
- Abbildung 31: Besiedelung von UV-sterilisierten (500 mJ/cm^2) Hydrogelen aus Alginat-Gelatine-blend (Typ A) mit Hydroxylapatit (fein) mit primären, humanen Osteoblasten, 7 Tage nach Aussäen; grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 μm 52
- Abbildung 32: Zersetzungserscheinungen von UV-C-bestrahlten (250 mJ/cm^2) und mit primären Osteoblasten besiedelten Proben von makroporös (A) und massiv (B) gedrucktem Alginatgel mit Hydroxylapatit (fein) und Gelatine (Schicht B) nach 3 Wochen Inkubation; Maßstabsbalken: 10 mm 53
- Abbildung 33: Immunzytochemisch gefärbte Gefrierschnitte von massiv gedruckten Alginatgelproben mit Hydroxylapatit (fein) und Gelatine (Schicht B) nach UV-C-Bestrahlung, 3 Wochen nach Aussäen; blau: DAPI, A, B: grün: Osteopontin, rot: RUNX2; C, D: rot: Osteocalcin; sehr lange Belichtungszeiten von 1,5 s (rot, blau), beziehungsweise 0,4 s (grün); Maßstabsbalken: 500 μm 54
- Abbildung 34: Immunzytochemisch gefärbte Gefrierschnitte von makroporös gedruckten Alginatgelproben mit Hydroxylapatit (fein) und Gelatine (Schicht B) nach UV-C-Bestrahlung, 3 Wochen nach Aussäen; blau: DAPI, A, B: grün: Osteopontin, rot: RUNX2; C, D: rot: Osteocalcin; sehr lange Belichtungszeiten von 1,5 s (rot, blau), beziehungsweise 0,5 s (grün); Maßstabsbalken: 500 μm 55
- Abbildung 35: Besiedelung von gamma-sterilisierten (15 kGy) makroporös gedruckten Hydrogelen aus Alginat-Gelatine-blend (Typ A) mit Hydroxylapatit (fein) mit primären, humanen Osteoblasten, 48 Tage nach Aussäen; blau: DNA, Eigenfluoreszenz des Hydroxylapatits, grün: Actin; Maßstabsbalken: 100 μm 56
- Abbildung 36: Immunzytochemisch gefärbte Gefrierschnitte von gamma-sterilisierten (15 kGy) makroporös gedruckten Hydrogelen aus Alginat-Gelatine-blend (Typ A) mit Hydroxylapatit (fein) nach Besiedelung mit primären,

	humanen Osteoblasten, 65 Tage nach Aussäen; links jeweils 4-fache, rechts 20-fache Vergrößerung des selben Bildausschnitts; blau: DNA, grün: Actin; Maßstabsbalken: A, C: 500 µm, B, D: 100 µm.....	57
Abbildung 37:	Proliferationsgeschwindigkeiten der primären, humanen Osteoblasten in verschiedenen Zellkulturpassagen (P1 bis P6), ab P3: hellgrau: Zellen für Versuche zur Zellcharakterisierung, dunkelgrau: Zellen für Versuche zur mechanischen Stimulation, weiß: weitere aus Passage 1 expandierte, in P3 aufgetaute Zellen; statistisch signifikant unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeiten mit Balken eingetragen für ausgewählte Passagenpaare; *: p<0,05, **: p<0,01, ****: p<0,0001; 3<n<67.....	59
Abbildung 38:	Alizarin-Rot-Färbung von primären, humanen Osteoblasten nach Kultivierung in DMEM beziehungsweise DMEM-Mineralisierungsmedium; A: 7 Tage Kultivierung, DMEM; B: 7 Tage Kultivierung, DMEM-Mineralisierungsmedium; C: 21 Tage Kultivierung, DMEM; D: 21 Tage Kultivierung, DMEM-Mineralisierungsmedium.....	60
Abbildung 39:	Alizarin-Rot-Färbung von primären, humanen Osteoblasten nach Kultivierung in ObM beziehungsweise ObM-Mineralisierungsmedium; A: 7 Tage Kultivierung, ObM; B: Tage Kultivierung, ObM - Mineralisierungsmedium; C: 21 Tage Kultivierung, ObM; D: 21 Tage Kultivierung, ObM - Mineralisierungsmedium.....	60
Abbildung 40:	Übersicht über die relativen Genexpressionsaktivitäten von primären, humanen Osteoblasten in A,B: Passage 4, C, D, E: Passage 5 nach Kultur in A, D: ObM -Serum, B, E: ObM -Serum -ObGS, C: ObM im Vergleich zur Kultur A, B, D, E: der entsprechenden Passage in ObM, C: von Passage 4; *: statistisch signifikante Genexpressionsänderung, p<0,05; n=3	74
Abbildung 41:	Clustergram der Genexpressionsmuster von primären Osteoblasten in verschiedenen Passagen (P4, P5) in verschiedenen Mediumvariationen (ohne Serum, ohne Serum und ohne ObGS); farbcodiert aufgetragen sind die Genexpressionsaktivitäten aller im qPCR gemessenen Gene als ΔCq-Werte (Cq-Wert des jeweiligen Gens minus Cq-Wert des Referenzgens), blau zeigt geringere Expression an, rot stärkere Expression als das Referenzgen; hierarchisches Clustering mit ‚average-linkage‘, euklidische Distanzmetrik	77
Abbildung 42:	primäre, humane Osteoblasten auf Glasoberflächen; Färbung von Zytoskelett und Fokaladhäsionsproteinen; blau: DNA, rot: Actin, grün: A, B: Paxillin; C, D: Vinculin; E, F: fokale Adhäsionskinase (FAK); G, H: Integrin β1; I, J: Integrin β3; Maßstabsbalken: 100 µm	79
Abbildung 43:	primäre, humane Osteoblasten auf Glasoberflächen; Färbung von Zytoskelett und Fokaladhäsionsproteinen; blau: DNA, rot: Actin; A: grün: Paxillin; B: grün: Vinculin Maßstabsbalken: 50 µm	80
Abbildung 44:	primäre, humane Osteoblasten auf Fibronectin-beschichteten Glasoberflächen; Färbung von Zytoskelett und Fokaladhäsionsproteinen; blau: DNA, rot: Actin, grün: A, B: Paxillin; C, D: fokale Adhäsionskinase (FAK); Maßstabsbalken: 100 µm.....	80
Abbildung 45:	primäre, humane Osteoblasten auf Kunststoffoberflächen; Färbung von Zytoskelett und Fokaladhäsionsproteinen; blau: DNA, rot: Actin, grün: A, B: Paxillin; C, D: fokale Adhäsionskinase (FAK); Maßstabsbalken: 100 µm	80
Abbildung 46:	Übersicht über die relativen Genexpressionsaktivitäten von primären, humanen Osteoblasten bei Kultur in ObM mit A, B: 50 ng/ml BMP-2, C, D: 300 ng/ml BMP-2 nach A, C: 2 Tagen, B, D: 7 Tagen in Kultur; *: statistisch signifikante Genexpressionsänderung, p<0,05; n=3	83
Abbildung 47:	Übersicht über die relativen Genexpressionsaktivitäten von primären, humanen Osteoblasten bei Kultur in ObM ohne Serum mit A, B: 50 ng/ml BMP-2, C, D: 300 ng/ml BMP-2 nach A, C: 2 Tagen, B, D: 7 Tagen in Kultur; *: statistisch signifikante Genexpressionsänderung, p<0,05; n=3	84
Abbildung 48:	Clustergram der Expressionsmuster von primären Osteoblasten nach Stimulierung mit BMP-2 (0 / 50 / 300 ng/ml) für 2 / 7 Tage; farbcodiert aufgetragen sind die Genexpressionsaktivitäten aller im qPCR gemessenen Gene als ΔCq-Werte (Cq-Wert des jeweiligen Gens minus Cq-Wert des Referenzgens), blau zeigt geringere Expression an, rot stärkere Expression als das Referenzgen; hierarchisches Clustering mit ‚average-linkage‘, euklidische Distanzmetrik.....	89
Abbildung 49:	Konstruktionszeichnung der Kompressionsapparatur; links: Aufsicht, rechts: Seitenansicht (untere Fläche der Apparatur hier nach links zeigend); Maße in Millimeter	92
Abbildung 50:	Konstruktionszeichnung der Gießform; links: Aufsicht, rechts: Seitenansicht (untere Fläche der Apparatur hier nach links zeigend); Maße in Millimeter	93
Abbildung 51:	Zellviabilität von Osteoblasten in Fibringelen im zeitlichen Verlauf nach Herstellung der Gele	94
Abbildung 52:	Ermittlung des Rauschanteils der gemessenen Kraft bei der Kontaktfindung (hier: bestehender Kontakt; S/R = -60,32); aufgetragen ist die Stempelposition (grau), sowie die gemessene Kraft (schwarz), der gleitende Durchschnitt der gemessenen Kraft (Fenstergröße 3) (blau) und der Rauschanteil des gemessenen Kraftsignals als Differenz aus gemessener Kraft und gleitendem Durchschnitt (rot).....	95

Abbildung 53:	gemessene E-Moduln der Fibringele in Abhängigkeit von Fibrinogenkonzentration (A) und Kompressionsfrequenz (B); statistisch signifikante Unterschiede im E-Modul mit Balken eingetragen; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, $n=4$ 96
Abbildung 54:	rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Osteoblasten-beladenen Fibringelen; Maßstabsbalken: A, B: 10 μm , C, D: 5 μm 98
Abbildung 55:	Übersicht über die relative Genexpressionsaktivität von primären, humanen Osteoblasten in Fibringelen mit 50 mg/ml Fibrinogen nach 2 h zyklischer Kompression, 1 Hz im Kontext Osteogenese im Vergleich zu unkomprimierten Zellen; keine statistisch signifikanten Änderungen in der Expressionsaktivität (paarweiser Vergleich); $n=4$ 99
Abbildung 56:	chemische Strukturen von A: PVCA, B: PHM 109

8. REFERENZEN

1. Siracusa, V., Maimone, G. & Antonelli, V. State-of-art of standard and innovative materials used in cranioplasty. *Polymers (Basel)*. **13**, (2021).
2. Zanotti, B. *et al.* Cranioplasty: Review of materials. *J. Craniofac. Surg.* **27**, 2061–2072 (2016).
3. Roddy, E., DeBaun, M. R., Daoud-Gray, A., Yang, Y. P. & Gardner, M. J. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* **28**, 351–362 (2018).
4. Blokhuis, T. J. *Bioresorbable bone graft substitutes. Bone Substitute Biomaterials* (Woodhead Publishing Limited, 2014). doi:10.1533/9780857099037.1.80
5. Lowther, M. *et al.* Clinical, industrial, and research perspectives on powder bed fusion additively manufactured metal implants. *Addit. Manuf.* **28**, 565–584 (2019).
6. Lethaus, B., Bloebaum, M., Koper, D., Poort-Ter Laak, M. & Kessler, P. Interval cranioplasty with patient-specific implants and autogenous bone grafts - Success and cost analysis. *J. Cranio-Maxillofacial Surg.* **42**, 1948–1951 (2014).
7. Naghavi, S. A. *et al.* Stress Shielding and Bone Resorption of Press-Fit Polyether–Ether–Ketone (PEEK) Hip Prosthesis: A Sawbone Model Study. *Polymers (Basel)*. **14**, (2022).
8. Kwarcinski, J., Boughton, P., Ruys, A., Doolan, A. & van Gelder, J. Cranioplasty and craniofacial reconstruction: A review of implant material, manufacturing method and infection risk. *Appl. Sci.* **7**, 1–17 (2017).
9. Parthasarathy, J. 3D modeling, custom implants and its future perspectives in craniofacial surgery. *Ann. Maxillofac. Surg.* **4**, 9 (2014).
10. Larsson, S. Calcium phosphates: What is the evidence? *J. Orthop. Trauma* **24**, 41–45 (2010).
11. Naujokat, H. *et al.* Osteosynthesis of a craniosteoplasty with a biodegradable magnesium plate system in miniature pigs. *Acta Biomater.* **62**, 434–445 (2017).
12. Petersmann, S. *et al.* Mechanical properties of polymeric implant materials produced by extrusion-based additive manufacturing. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **104**, 103611 (2020).
13. Wong, K. V. & Hernandez, A. A Review of Additive Manufacturing. *ISRN Mech. Eng.* **2012**, 1–10 (2012).
14. Lakshmi, U. *et al.* 'Point-of-Care Manufacturing'. *Proc. ACM Human-Computer Interact.* **3**, 1–23 (2019).
15. Tortelli, F. & Cancedda, R. Three-dimensional cultures of osteogenic and chondrogenic cells: A tissue engineering approach to mimic bone and cartilage in vitro. *Eur. Cells Mater.* **17**, 1–14 (2009).
16. Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3 Suppl 3**, 131–139 (2008).
17. Chang, H. & Knothe Tate, M. L. Concise Review: The Periosteum: Tapping into a Reservoir of Clinically Useful Progenitor Cells. *Stem Cells Transl. Med.* **1**, 480–491 (2012).
18. Le, B. Q. *et al.* The Components of bone and what they can teach us about regeneration. *Materials (Basel)*. **11**, 1–16 (2017).
19. Ascenzi, M.-G. The osteon: the micromechanical unit of compact bone. *Front. Biosci.* **17**, 1551 (2012).
20. Young, M. F. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos. Int.* **14 Suppl 3**, 35–42 (2003).
21. George, A. & Veis, A. Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chem. Rev.* **108**, 4670–4693 (2008).
22. Kono, T., Sakae, T., Nakada, H., Kaneda, T. & Okada, H. Confusion between Carbonate Apatite and Biological Apatite (Carbonated Hydroxyapatite) in Bone and Teeth. *Minerals* **12**, 1–11 (2022).
23. Bonucci, E. Bone mineralization. *Front. Biosci.* **17**, 100–128 (2012).
24. Hartmann, C. & Yang, Y. Molecular and cellular regulation of intramembranous and endochondral bone formation during embryogenesis. in *Principles of Bone Biology* (eds. Bilezikian, J. P., Martin, T. J., Clemens, T. L. & Rosen, C. J.) (Academic Press, 2020).
25. Breeland, G., Sinkler, M. A. & Menezes, R. G. Embryology, Bone Ossification. in *StatPearls [Internet]* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2022).
26. Seeman, E. Modeling and remodeling: the cellular machinery responsible for bone's material and structural strength during growth, aging, and drug therapy. in *Principles of Bone Biology* (eds. Bilezikian, J. P., Martin, T. J., Clemens, T. L. & Rosen, C. J.) 245–274 (Academic Press, 2020).
27. Komori, T. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass. *Cell Tissue Res.* **352**, 191–198 (2013).
28. Takahashi, N., Kobayashi, Y. & Udagawa, N. Osteoclasts. in *Principles of Bone Biology* (eds. Bilezikian, J. P., Martin, T. J., Clemens, T. L. & Rosen, C. J.) 111–131 (Academic Press, 2020).
29. Sims, N. A. & Martin, T. J. The osteoblast lineage: its actions and communication mechanisms. in *Principles of Bone Biology* 89–110 (2020).
30. Marie, P. J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**, 98–105 (2008).
31. Mizoguchi, T. & Ono, N. The diverse origin of bone-forming osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* **36**, 1432–1447 (2021).

32. Karsenty, G. & Wagner, E. F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell* **2**, 389–406 (2002).
33. Komori, T. Whole Aspect of Runx2 Functions in Skeletal Development. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
34. Komori, T. Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by runx2. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
35. Arvidson, K. *et al.* Bone regeneration and stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 718–746 (2011).
36. Komori, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* **339**, 189–195 (2010).
37. Vimalraj, S. Alkaline phosphatase : Structure , expression and its function in bone mineralization. *Gene* **754**, 144855 (2020).
38. Staines, K. A., MacRae, V. E. & Farquharson, C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *J. Endocrinol.* **214**, 241–255 (2012).
39. Tresguerres, F. G. F. *et al.* The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. *Ann. Anat.* **227**, 151422 (2020).
40. Dallas, S. L., Prideaux, M. & Bonewald, L. F. The osteocyte: An endocrine cell . . . and more. *Endocr. Rev.* **34**, 658–690 (2013).
41. Franz-Odenaal, T. A., Hall, B. K. & Witten, P. E. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev. Dyn.* **235**, 176–190 (2006).
42. Manolagas, S. C. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* **21**, 115–137 (2000).
43. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. & Cerri, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–17 (2015).
44. Wu, M., Chen, G. & Li, Y. P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* **4**, (2016).
45. Phimpilai, M., Zhao, Z., Boules, H., Roca, H. & Franceschi, R. T. BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 637–646 (2006).
46. Wang, E. A. *et al.* Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 2220–2224 (1990).
47. Shimoaka, T. *et al.* Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *J. Biol. Chem.* **277**, 7493–7500 (2002).
48. Bosetti, M., Boccafoschi, F., Leigheb, M. & Cannas, M. F. Effect of different growth factors on human osteoblasts activities: A possible application in bone regeneration for tissue engineering. *Biomol. Eng.* **24**, 613–618 (2007).
49. Marie, P. J. Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: An update. *Gene* **498**, 1–4 (2012).
50. Lin, G. L. & Hankenson, K. D. Integration of BMP, Wnt, and Notch Signaling Pathways in Osteoblast Differentiation. *J. Cell. Biochem.* **112**, 3491–3501 (2011).
51. Williams, B. O. & Johnson, M. L. Wnt signaling and bone cell activity. in *Principles of Bone Biology* (eds. Bilezikian, J. P., Martin, T. J., Clemens, T. L. & Rosen, C. J.) 177–204 (Academic Press, 2020).
52. Davis, L. A. & Zur Nieden, N. I. Mesodermal fate decisions of a stem cell: The Wnt switch. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2658–2674 (2008).
53. Lojk, J. & Marc, J. Roles of non-canonical wnt signalling pathways in bone biology. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
54. Tu, X. *et al.* Noncanonical Wnt Signaling through G Protein-Linked PKC δ Activation Promotes Bone Formation. *Dev. Cell* **12**, 113–127 (2007).
55. Wolff, J. Das Gesetz von der Transformation der Knochen. (1892).
56. Mellon, S. J. & Tanner, K. E. Bone and its adaptation to mechanical loading: A review. *Int. Mater. Rev.* **57**, 235–255 (2012).
57. Qin, L., Liu, W., Cao, H. & Xiao, G. Molecular mechanosensors in osteocytes. *Bone Res.* **8**, 1–24 (2020).
58. Chiquet, M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol.* **18**, 417–426 (1999).
59. Weinkamer, R., Eberl, C. & Fratzl, P. Mechanoregulation of bone remodeling and healing as inspiration for self-repair in materials. *Biomimetics* **4**, 1–16 (2019).
60. Papachroni, K. K., Karatzas, D. N., Papavassiliou, K. A., Basdra, E. K. & Papavassiliou, A. G. Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends Mol. Med.* **15**, 208–216 (2009).
61. Rutkovskiy, A., Stenslökken, K.-O. & Vaage, I. J. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **22**, 95–106 (2016).
62. Sun, W. *et al.* The mechanosensitive Piezo1 channel is required for bone formation. *Elife* **8**, 8–10 (2019).
63. Xiao, Z. & Quarles, L. D. Physiological mechanisms and therapeutic potential of bone mechanosensing. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **16**, 115–129 (2015).
64. Qiu, N., Zhou, H. & Xiao, Z. Downregulation of PKD1 by shRNA results in defective osteogenic differentiation via cAMP/PKA pathway in human MG-63 cells. *J. Cell. Biochem.* **113**, 967–976 (2012).

65. Uda, Y., Azab, E., Sun, N., Shi, C. & Pajevic, P. D. Osteocyte Mechanobiology. *Curr. Osteoporos. Rep.* **15**, 318–325 (2017).
66. Ajubi, N. E., Klein-Nulend, J., Alblas, M. J., Burger, E. H. & Nijweide, P. J. Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **276**, (1999).
67. Norvell, S. M., Ponik, S. M., Bowen, D. K., Gerard, R. & Pavalko, F. M. Fluid shear stress induction of COX-2 protein and prostaglandin release in cultured MC3T3-E1 osteoblasts does not require intact microfilaments or microtubules. *J. Appl. Physiol.* **96**, 957–966 (2004).
68. Chen, N. X., Geist, D. J., Genetos, D. C., Pavalko, F. M. & Duncan, R. L. Fluid shear-induced NFκB translocation in osteoblasts is mediated by intracellular calcium release. *Bone* **33**, 399–410 (2003).
69. Kanno, T., Takahashi, T., Tsujisawa, T., Ariyoshi, W. & Nishihara, T. Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* **101**, 1266–1277 (2007).
70. Zayzafoon, M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. *J. Cell. Biochem.* **97**, 56–70 (2006).
71. Li, Y. *et al.* Biomechanical stimulation of osteoblast gene expression requires phosphorylation of the RUNX2 transcription factor. *J. Bone Miner. Res.* **27**, 1263–1274 (2012).
72. Iqbal, J. & Zaidi, M. Molecular regulation of mechanotransduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 751–755 (2005).
73. Danen, E. H. J. & Sonnenberg, A. Erratum: Integrins in regulation of tissue development and function (Journal of Pathology vol. 200 (471-480)). *J. Pathol.* **201**, 632 (2003).
74. Sheetz, M. P., Felsenfeld, D. P. & Galbraith, C. G. Cell migration: Regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol.* **8**, 51–54 (1998).
75. Painter, K. J. Modelling cell migration strategies in the extracellular matrix. *J. Math. Biol.* **58**, 511–543 (2009).
76. Arcangelis, A. De & Labouesse, E. G.-. Integrin and ECM functions - roles in vertebrate development. *Trends Genet.* **16**, 389–395 (2000).
77. Carvalho, R. S., Schaffer, J. L. & Gerstenfeld, L. C. Osteoblasts induce osteopontin expression in response to attachment on fibronectin: Demonstration of a common role for integrin receptors in the signal transduction processes of cell attachment and mechanical stimulation. *J. Cell. Biochem.* **70**, 376–390 (1998).
78. Lim, J. Y. *et al.* The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography. *Biomaterials* **28**, 1787–1797 (2007).
79. Geiger, B. & Bershadsky, A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 584–592 (2001).
80. Oakes, P. W. & Gardel, M. L. Stressing the limits of focal adhesion mechanosensitivity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **30**, 68–73 (2014).
81. Bershadsky, A. D. *et al.* Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: Experiments and models. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 165–173 (2006).
82. Grzesik, W. J. & Robey, P. G. Bone matrix RGD glycoproteins: Immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **9**, 487–496 (1994).
83. Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* **21**, 667–681 (2000).
84. Gronthos, S., Stewart, K., Graves, S. E., Hay, S. & Simmons, P. J. Integrin expression and function on human osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* **12**, 1189–1197 (1997).
85. Marquis, M. E. *et al.* Bone cells-biomaterials interactions. *Front. Biosci.* **14**, 1023–1067 (2009).
86. Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R. & Geiger, B. Functional atlas of the integrin adhesome Ronen. *Nat Cell Biol.* **9**, 858–867 (2007).
87. Thwaites, T. *et al.* The Chlamydia Effector TarP Mimics the Mammalian Leucine- Aspartic Acid Motif of Paxillin to Subvert the Focal Adhesion Kinase during Invasion *. *J. Biol. Chem.* **289**, 30426–30442 (2014).
88. Deramaudt, T. B. *et al.* Altering FAK-Paxillin Interactions Reduces Adhesion , Migration and Invasion Processes. *PLoS One* **9**, (2014).
89. Theodosiou, M. *et al.* Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *Elife* **5**, 1–24 (2015).
90. Sulzmaier, F. J., Jean, C. & Schlaepfer, D. D. FAK in cancer: Mechanistic findings and clinical applications. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 598–610 (2014).
91. Martínez, P. T., Navajas, P. L. & Lietha, D. FAK structure and regulation by membrane interactions and force in focal adhesions. *Biomolecules* **10**, (2020).
92. Cohen, D. M., Kutscher, B., Chen, H., Murphy, D. B. & Craig, S. W. A conformational switch in vinculin drives formation and dynamics of a talin-vinculin complex at focal adhesions. *J. Biol. Chem.* **281**, 16006–16015 (2006).
93. Humphries, J. D. *et al.* Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J. Cell Biol.* **179**, 1043–1057 (2007).
94. Carisey, A. & Ballestrem, C. Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *Eur. J. Cell Biol.* **90**,

- 157–163 (2011).
95. Balaban, N. Q. *et al.* Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.* **3**, 466–473 (2001).
 96. Elineni, K. K. & Gallant, N. D. Regulation of cell adhesion strength by peripheral focal adhesion distribution. *Biophys. J.* **101**, 2903–2911 (2011).
 97. Williams, D. F. *Definitions in biomaterials*. (Elsevier, 1987).
 98. Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**, 2941–2953 (2008).
 99. Vajgel, A. *et al.* A systematic review on the critical size defect model. *Clin. Oral Implants Res.* **25**, 879–893 (2014).
 100. Nauth, A., Schemitsch, E., Norris, B., Nollin, Z. & Watson, J. T. Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? *J. Orthop. Trauma* **32**, S7–S11 (2018).
 101. Shafaghi, R. *et al.* A review of materials for managing bone loss in revision total knee arthroplasty. *Mater. Sci. Eng. C* **104**, 109941 (2019).
 102. Khan, Y., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G. & Laurencin, C. T. Tissue engineering of bone: Material and matrix considerations. *J. Bone Jt. Surg.* **90**, 36–42 (2008).
 103. Wheeler, D. L. & Enneking, W. F. Allograft bone decreases in strength in vivo over time. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **435**, 36–42 (2005).
 104. Lobb, D. C., DeGeorge, B. R. & Chhabra, A. B. Bone Graft Substitutes: Current Concepts and Future Expectations. *J. Hand Surg. Am.* **44**, 497-505.e2 (2019).
 105. García-Gareta, E., Coathup, M. J. & Blunn, G. W. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone* **81**, 112–121 (2015).
 106. Kelly, C. M. *et al.* The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: Results of a multicenter trial. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **382**, 42–50 (2001).
 107. Sabir, M. I., Xu, X. & Li, L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *J. Mater. Sci.* **44**, 5713–5724 (2009).
 108. Dwivedi, R. *et al.* Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* **10**, 381–388 (2020).
 109. Polo-Corrales, L., Latorre-Esteves, M. & Ramirez-Vick, J. E. Scaffold Design for Bone Regeneration. *J Nanosci Nanotechnol* **14**, 15–56 (2014).
 110. Guarino, V., Causa, F. & Ambrosio, L. Bioactive scaffolds for bone and ligament tissue. *Expert Rev. Med. Devices* **4**, 405–418 (2007).
 111. Kohli, N. *et al.* Bone remodelling in vitro: Where are we headed? *Bone* **110**, 38–46 (2018).
 112. Murray, P. E., García Godoy, C. & García Godoy, F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **12**, (2007).
 113. Europäisches Komitee für Normung. *ISO 10993-5 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität*. (Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin, 2009).
 114. Pereira, C. T. *et al.* Human and mouse osteoprogenitor cells exhibit distinct patterns of osteogenesis in three-dimensional tissue engineering scaffolds. *Plast. Reconstr. Surg.* **124**, 1869–1879 (2009).
 115. Heino, T. J., Alm, J. J., Moritz, N. & Aro, H. T. Comparison of the osteogenic capacity of minipig and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **30**, 1019–1025 (2012).
 116. Torricelli, P. *et al.* Comparative interspecies investigation on osteoblast cultures: Data on cell viability and synthetic activity. *Biomed. Pharmacother.* **57**, 57–62 (2003).
 117. Czekanska, E. M., Stoddart, M. J., Richards, R. G. & Hayes, J. S. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur. Cells Mater.* **24**, 1–17 (2012).
 118. Ghimire, S. *et al.* The investigation of bone fracture healing under intramembranous and endochondral ossification. *Bone Reports* **14**, 100740 (2021).
 119. Augat, P., Hollensteiner, M. & von Rüden, C. The role of mechanical stimulation in the enhancement of bone healing. *Injury* **52**, S78–S83 (2021).
 120. Loy, B. N. *et al.* A Biomechanical and Structural Comparison of Articular Cartilage and Subchondral Bone of the Glenoid and Humeral Head. *Orthop. J. Sport. Med.* **6**, 232596711878585 (2018).
 121. Chokhandre, S. & Erdemir, A. A comprehensive testing protocol for macro-scale mechanical characterization of knee articular cartilage with documented experimental repeatability. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **112**, 104025 (2020).
 122. Brown, T. D. Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review. *J. Biomech.* **33**, 3–14 (2000).
 123. Li, Y., Jacox, L. A., Little, S. H. & Ko, C. C. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **34**, 207–214 (2018).
 124. Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. & Baltimore, D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8392–6 (1993).
 125. Roesch-Ely, M. *et al.* Organotypic co-cultures allow for immortalized human gingival keratinocytes to reconstitute a

- gingival epithelial phenotype in vitro. *Differentiation*. **74**, 622–37 (2006).
126. Ogasawara, T. *et al.* Bone Morphogenetic Protein 2-Induced Osteoblast Differentiation Requires Smad-Mediated Down-Regulation of Cdk6. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6560–6568 (2004).
 127. Haij, E. *et al.* N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2. *J. Cell. Physiol.* **183**, 117–128 (2000).
 128. Hay, E., Hott, M., Graulet, A. M., Lomri, A. & Marie, P. J. Effects of bone morphogenetic protein-2 on human neonatal calvaria cell differentiation. *J. Cell. Biochem.* **72**, 81–93 (1999).
 129. Harada, K. *et al.* Crossveinless-2 controls bone morphogenetic protein signaling during early cardiomyocyte differentiation in P19 cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 26705–26713 (2008).
 130. Mukherjee, A. & Rotwein, P. Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits osteoblast differentiation and skeletal growth by blocking insulin-like growth factor actions. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1238–1250 (2008).
 131. Rawadi, G., Vayssière, B., Dunn, F., Baron, R. & Roman-Roman, S. BMP-2 Controls Alkaline Phosphatase Expression and Osteoblast Mineralization by a Wnt Autocrine Loop. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 1842–1853 (2003).
 132. Lee, K.-S. *et al.* Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor β 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8783–8792 (2000).
 133. Stolz, B., Mader, M., Volk, L., Steinberg, T. & Mülhaupt, R. Cryo-3D Printing of Hierarchically Porous Polyhydroxymethylene Scaffolds for Hard Tissue Regeneration. *Macromol. Mater. Eng.* **306**, 1–13 (2021).
 134. Stolz, B. *et al.* Polyhydroxymethylenes as Multifunctional High Molecular Weight Sugar Alcohols Tailored for 3D Printing and Medical Applications. *Macromol. Chem. Phys.* **221**, (2020).
 135. Angarano, M. *et al.* Layered Gradient Nonwovens of In Situ Crosslinked Electrospun Collagenous Nanofibers Used as Modular Scaffold Systems for Soft Tissue Regeneration. *Adv. Funct. Mater.* **23**, 3277–3285 (2013).
 136. Distler, T. *et al.* Ionically and Enzymatically Dual Cross-Linked Oxidized Alginate Gelatin Hydrogels with Tunable Stiffness and Degradation Behavior for Tissue Engineering. (2020). doi:10.1021/acsbiomaterials.0c00677
 137. International Organization for Standardization. *ISO 10993-12 Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials*. **12**, (ISO copyright office Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20 Tel., 2012).
 138. Frank, E. H., Jin, M., Loening, A. M., Levenston, M. E. & Grodzinsky, A. J. A versatile shear and compression apparatus for mechanical stimulation of tissue culture explants. *J. Biomech.* **33**, 1523–1527 (2000).
 139. Hales, R., Holdsworth, S. R., O'Donnell, M. P., Perrin, I. J. & Skelton, R. P. A code of practice for the determination of cyclic stress-strain data. *Mater. High Temp.* **19**, 165–185 (2002).
 140. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
 141. Strathmann, H., Kock, K., Amar, P. & Baker, R. W. The formation mechanism of asymmetric membranes. *Desalination* **16**, 179–203 (1975).
 142. Dennis, G. *et al.* DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **4**, (2003).
 143. Ratner, B. D. The biocompatibility manifesto: Biocompatibility for the twenty-first century. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **4**, 523–527 (2011).
 144. Przekora, A. The summary of the most important cell-biomaterial interactions that need to be considered during in vitro biocompatibility testing of bone scaffolds for tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C* **97**, 1036–1051 (2019).
 145. Jung, S. *et al.* Cytotoxic effects of four different root canal sealers on human osteoblasts. *PLoS One* **13**, 1–14 (2018).
 146. Gassling, V. *et al.* Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clin. Oral Implants Res.* **24**, 320–328 (2013).
 147. Ueda-Yukoshi, T. & Matsuda, T. Cellular Responses on a Wettability Gradient Surface with Continuous Variations in Surface Compositions of Carbonate and Hydroxyl Groups. *Langmuir* **11**, 4135–4140 (1995).
 148. Fischer, J. P. *et al.* The preparation and characterization of surface-grafted plastic materials designed for the evaluation of their tissue and blood compatibility. *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* **66**, 443–463 (1979).
 149. Peters, K., Unger, R. E. & Kirkpatrick, C. J. Biocompatibility Testing. in *Biomedical Materials* 423–453 (Springer International Publishing, 2021). doi:10.1007/978-3-030-49206-9_13
 150. Jiang, F., Zhou, M. & Drummer, D. Effects of Fumed Silica on Thixotropic Behavior and Processing Window by UV-Assisted Direct Ink Writing. *Polymers (Basel)*. **14**, (2022).
 151. Vatani, M. & Choi, J. W. Direct-print photopolymerization for 3D printing. *Rapid Prototyp. J.* **23**, 337–343 (2017).
 152. Benjamin Florian Stolz. 3D-Druck kohlenhydratinspirierter Materialien für Anwendungen im Leichtbau, der regenerativen Knochen- und Knorpelheilung sowie für thermoresponsive Wundauflagen. (2020). doi:10.6094/UNIFR/165776
 153. Wiemann, M. *et al.* Effects of ultrasonic dispersion energy on the preparation of amorphous SiO₂ nanomaterials for in vitro toxicity testing. *Nanomaterials* **9**, (2019).
 154. Solarska-Ściuk, K. *et al.* Are Biogenic and Pyrogenic Mesoporous SiO₂ Nanoparticles Safe for Normal Cells?

- Molecules* **26**, 1427 (2021).
155. Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H. & Adibkia, K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **44**, 278–284 (2014).
 156. Beyth, N., Hourri-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W. & Hazan, R. Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2015**, (2015).
 157. Leung, Y. H. *et al.* Mechanisms of Antibacterial Activity of MgO: Non-ROS Mediated Toxicity of MgO Nanoparticles Towards *Escherichia coli*. *Small* **10**, 1171–1183 (2014).
 158. Coelho, C. C. *et al.* The antibacterial and angiogenic effect of magnesium oxide in a hydroxyapatite bone substitute. *Sci. Rep.* **10**, 1–15 (2020).
 159. Coelho, C. C., Araújo, R., Quadros, P. A., Sousa, S. R. & Monteiro, F. J. Antibacterial bone substitute of hydroxyapatite and magnesium oxide to prevent dental and orthopaedic infections. *Mater. Sci. Eng. C* **97**, 529–538 (2019).
 160. Evans, M. D., Griffiths, H. R. & Lunec, J. *Reactive Oxygen Species and their Cytotoxic Mechanisms. Advances in Molecular and Cell Biology* **20**, (1997).
 161. Sawai, J. *et al.* Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. *J. Chem. Eng. JAPAN* **29**, 627–633 (1996).
 162. Pallavi, M., Waterman, J., Koo, Y., Sankar, J. & Yun, Y. Assessment of cytotoxicity of magnesium oxide and magnesium hydroxide nanoparticles using the electric cell-substrate impedance sensing. *Appl. Sci.* **10**, (2020).
 163. Krishnamoorthy, K., Moon, J. Y., Hyun, H. B., Cho, S. K. & Kim, S. J. Mechanistic investigation on the toxicity of MgO nanoparticles toward cancer cells. *J. Mater. Chem.* **22**, 24610–24617 (2012).
 164. Balraj, B., Senthilkumar, N., Vetha Potheher, I. & Arulmozhi, M. Characterization, antibacterial, anti-arthritis and in-vitro cytotoxic potentials of biosynthesized Magnesium Oxide nanomaterial. *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* **231**, 121–127 (2018).
 165. Schulz, S. *et al.* Nonwoven-Based Gelatin/Polycaprolactone Membrane Proves Suitability in a Preclinical Assessment for Treatment of Soft Tissue Defects. *TISSUE Eng. Part A* **20**, 1935–1947 (2014).
 166. Schindler, O. S., Cannon, S. R., Briggs, T. W. & Blunn, G. W. Composite ceramic bone graft substitute in the treatment of locally aggressive benign bone tumours. *J. Orthop. Surg. (Hong Kong)* **16**, 66–74 (2008).
 167. Pham, P. Van. *Bone and Cartilage Regeneration*. (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-40144-7
 168. Barradas, A. M. C., Yuan, H., Blitterswijk, C. A. van & Habibovic, P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur. Cell. Mater.* **21**, 407–429 (2011).
 169. Wang, X. Insight into the Influence of Surface Roughness on the Wettability of Apatite and Dolomite. 1–18 (2020).
 170. Castañeda, F. & Kinne, R. K. H. Cytotoxicity of millimolar concentrations of ethanol on HepG2 human tumor cell line compared to normal rat hepatocytes in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **126**, 503–510 (2000).
 171. Kosaka, T. *et al.* Comparison of various methods of assaying the cytotoxic effects of ethanol on human hepatoblastoma cells (HUH-6 line). *Acta Med. Okayama* **50**, 151–6 (1996).
 172. Altmann, B., Kohal, R., Steinberg, T., Tomakidi, P. & Ba, M. Distinct Cell Functions of Osteoblasts on UV-Functionalized Titanium- and Zirconia-Based Implant Materials Are Modulated by Surface Topography. **19**, 850–863 (2013).
 173. Anselme, K. Biomaterials and interface with bone. *Osteoporos. Int.* **22**, 2037–2042 (2011).
 174. Abagnale, G. *et al.* Surface topography enhances differentiation of mesenchymal stem cells towards osteogenic and adipogenic lineages. *Biomaterials* **61**, 316–326 (2015).
 175. Lincks, J. *et al.* Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomater. Silver Jubil. Compend.* **19**, 147–160 (1998).
 176. Athukorala, S. S., Liyanage, C. J. & Jayasundera, A. C. A. Hydroxyapatite incorporated bacterial cellulose hydrogels as a cost-effective 3D cell culture platform. *Soft Mater.* **20**, 183–192 (2022).
 177. Pasqui, D., Torricelli, P., De Cagna, M., Fini, M. & Barbucci, R. Carboxymethyl cellulose - Hydroxyapatite hybrid hydrogel as a composite material for bone tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **102**, 1568–1579 (2014).
 178. Liu, C. *et al.* Enhancing Tissue Adhesion and Osteoblastic Differentiation of MC3T3-E1 Cells on Poly(aryl ether ketone) by Chemically Anchored Hydroxyapatite Nanocomposite Hydrogel Coating. *Macromol. Biosci.* **21**, 1–14 (2021).
 179. Sanchez, C., Gabay, O., Salvat, C., Henrotin, Y. E. & Berenbaum, F. Mechanical loading highly increases IL-6 production and decreases OPG expression by osteoblasts. *Osteoarthr. Cartil.* **17**, 473–481 (2009).
 180. Sanchez, C. *et al.* Regulation of subchondral bone osteoblast metabolism by cyclic compression. *Arthritis Rheum.* **64**, 1193–1203 (2012).
 181. Paul, W. & Sharma, C. P. Chitosan and Alginate Wound Dressings : A Short Review. *Trends Biomater. Artif. Organs* **18**, 18–23 (2004).
 182. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 106–126 (2012).
 183. Rowley, J. A., Madlambayan, G. & Mooney, D. J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials.

- Biomaterials* **20**, 45–53 (1999).
184. Eiselt, P., Yeh, J., Latvala, R. K., Shea, L. D. & Mooney, D. J. Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. *Biomaterials* **21**, 1921–1927 (2000).
 185. Al-Shamkhani, A. & Duncan, R. Radioiodination of Alginate via Covalently-Bound Tyrosinamide Allows Monitoring of Its Fate In Vivo. *J. Bioact. Compat. Polym.* **10**, (1995).
 186. Su, W. *et al.* Alginate-Assisted Mineralization of Collagen by Collagen Reconstitution and Calcium Phosphate Formation. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **6**, 3275–3286 (2020).
 187. Dittrich, R. *et al.* Scaffolds for hard tissue engineering by ionotropic gelation of alginate-influence of selected preparation parameters. *J. Am. Ceram. Soc.* **90**, 1703–1708 (2007).
 188. Turco, G. *et al.* Alginate/Hydroxyapatite Biocomposite For Bone Ingrowth: A Trabecular Structure With High And Isotropic Connectivity. *Biomacromolecules* **10**, 1575–1583 (2009).
 189. Luo, Y., Li, Y., Qin, X. & Wa, Q. 3D printing of concentrated alginate/gelatin scaffolds with homogeneous nano apatite coating for bone tissue engineering. *Mater. Des.* **146**, 12–19 (2018).
 190. Kołodziejska, B., Kafłak, A. & Kolmas, J. Biologically inspired collagen/apatite composite biomaterials for potential use in bone tissue regeneration-A review. *Materials (Basel)*. **13**, (2020).
 191. Giuseppe, M. Di *et al.* Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **79**, 150–157 (2018).
 192. Łabowska, M. B. *et al.* A review on the adaptation of alginate-gelatin hydrogels for 3D cultures and bioprinting. *Materials (Basel)*. **14**, 1–28 (2021).
 193. Siimon, K. *et al.* Effect of glucose content on thermally cross-linked fibrous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **42**, 538–545 (2014).
 194. Sewald, L. *et al.* Beyond the Modification Degree: Impact of Raw Material on Physicochemical Properties of Gelatin Type A and Type B Methacryloyls. *Macromol. Biosci.* **18**, 1–10 (2018).
 195. Kuboki, Y. *et al.* BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of osteogenesis. *J. Biomed. Mater. Res.* **39**, 190–199 (1998).
 196. Karageorgiou, V. & Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* **26**, 5474–5491 (2005).
 197. Hulbert, S. F. *et al.* Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.* **4**, 433–456 (1970).
 198. Tsuruga, E., Takita, H., Itoh, H., Wakisaka, Y. & Kuboki, Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J. Biochem.* **121**, 317–324 (1997).
 199. Kuboki, Y., Jin, Q. & Takita, H. Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *J. Bone Joint Surg. Am.* **83-A Suppl**, S105-15 (2001).
 200. Habibovic, P. *et al.* 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* **26**, 3565–3575 (2005).
 201. Yuan, H. *et al.* A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* **20**, 1799–1806 (1999).
 202. Ansari, I. A. & Datta, A. K. An Overview of Sterilization Methods for Packaging Materials Used in Aseptic Packaging Systems. *Food Bioprod. Process.* **81**, 57–65 (2003).
 203. Dempsey, D. J. & Thirucote, R. R. Sterilization of Medical Devices: A Review. *J. Biomater. Appl.* **3**, 454–523 (1988).
 204. Nagasawa, N., Mitomo, H., Yoshii, F. & Kume, T. Radiation-induced degradation of sodium alginate. *Polym. Degrad. Stab.* **69**, 279–285 (2000).
 205. Park, J. H. *et al.* Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. *Acta Biomater.* **8**, 1966–1975 (2012).
 206. Bednarzig, V. *et al.* Improved 3D Printing and Cell Biology Characterization of Inorganic-Filler Containing Alginate-Based Composites for Bone Regeneration: Particle Shape and Effective Surface Area Are the Dominant Factors for Printing Performance. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
 207. Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T. & Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3. *J. Biomed. Mater. Res.* **24**, 721–734 (1990).
 208. Suchý, T. *et al.* Various Simulated Body Fluids Lead to Significant Differences in Collagen Tissue Engineering Scaffolds. *Materials (Basel)*. **14**, 4388 (2021).
 209. Lee, J. T. Y. *et al.* Cell culture medium as an alternative to conventional simulated body fluid. *Acta Biomater.* **7**, 2615–2622 (2011).
 210. Göpferich, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. in *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium* **17**, 117–128 (Elsevier, 1996).
 211. Davison, N. L., Barrère-de Groot, F. & Grijpma, D. W. Degradation of Biomaterials. in *Tissue Engineering* 177–215 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-420145-3.00006-7
 212. Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 762–798 (2007).

213. Yildirimer, L. & Seifalian, A. M. Three-dimensional biomaterial degradation - Material choice, design and extrinsic factor considerations. *Biotechnol. Adv.* **32**, 984–999 (2014).
214. Kirby, A. J. Hydrolysis and Formation of Esters of Organic Acids. *Compr. Chem. Kinet.* **10**, 57–207 (1972).
215. Mistry, A. S. & Mikos, A. G. Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **94**, 1–22 (2005).
216. Erickson, C. B. *et al.* In vivo degradation rate of alginate–chitosan hydrogels influences tissue repair following physeal injury. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **108**, 2484–2494 (2020).
217. Bonfield, W. & Datta, P. K. Young's modulus of compact bone. *J. Biomech.* **7**, 147–149 (1974).
218. Reilly, D. T. & Burstein, A. H. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. *J. Biomech.* **8**, (1975).
219. Ashman, R. B., Cowin, S. C., Van Buskirk, W. C. & Rice, J. C. A continuous wave technique for the measurement of the elastic properties of cortical bone. *J. Biomech.* **17**, 349–361 (1984).
220. Currey, J. D. Mechanical properties of vertebrate hard tissues. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* **212**, 399–411 (1998).
221. Reilly, D. T., Burstein, A. H. & Frankel, V. H. The elastic modulus for bone. *J. Biomech.* **7**, (1974).
222. Skinner, H. B. Composite Technology for Total Hip Arthroplasty. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **235**, (1988).
223. Rae, P. J., Brown, E. N. & Orler, E. B. The mechanical properties of poly(ether-ether-ketone) (PEEK) with emphasis on the large compressive strain response. *Polymer (Guildf)*. **48**, 598–615 (2007).
224. Graupner, N., Herrmann, A. S. & Müssig, J. Natural and man-made cellulose fibre-reinforced poly(lactic acid) (PLA) composites: An overview about mechanical characteristics and application areas. *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* **40**, 810–821 (2009).
225. Field, N. D. & Schaeffgen, J. R. High molecular weight poly(vinylene carbonate) and derivatives. *J. Polym. Sci.* **58**, 533–543 (1962).
226. Yu, H. S., Kim, J. J., Kim, H. W., Lewis, M. P. & Wall, I. Impact of mechanical stretch on the cell behaviors of bone and surrounding tissues. *J. Tissue Eng.* **7**, (2016).
227. Wu, Y. *et al.* Dkk-1–TNF- α crosstalk regulates MC3T3E1 pre-osteoblast proliferation and differentiation under mechanical stress through the ERK signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* (2023). doi:10.1007/s11010-022-04645-4
228. Shen, X. Q. *et al.* Magnitude-dependent response of osteoblasts regulated by compressive stress. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
229. Koyama, Y. *et al.* Effect of compressive force on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in osteoblastic Saos-2 cells. *Arch. Oral Biol.* **53**, 488–496 (2008).
230. Sun, Q. *et al.* Ex vivo replication of phenotypic functions of osteocytes through biomimetic 3D bone tissue construction. *Bone* **106**, 148–155 (2018).
231. TA Instruments. ELECTROFORCE BIODYNAMIC TEST INSTRUMENTS. (2016).
232. Baumgartner, W. *et al.* Cyclic uniaxial compression of human stem cells seeded on a bone biomimetic nanocomposite decreases anti-osteogenic commitment evoked by shear stress. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **83**, 84–93 (2018).
233. Nam, J., Rath, B., Knobloch, T. J., Lannutti, J. J. & Agarwal, S. Novel electrospun scaffolds for the molecular analysis of chondrocytes under dynamic compression. *Tissue Eng. - Part A* **15**, 513–523 (2009).
234. Dumas, V. *et al.* The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression. *Biomaterials* **30**, 3279–3288 (2009).
235. Pampaloni, F., Reynaud, E. G. & Stelzer, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 839–45 (2007).
236. Shiu, H. T., Goss, B., Lutton, C., Crawford, R. & Xiao, Y. Formation of Blood Clot on Biomaterial Implants Influences Bone Healing. *Tissue Eng. Part B Rev.* **20**, 697–712 (2014).
237. Peretti, G. M. *et al.* Review of Injectable Cartilage Engineering Using Fibrin Gel in Mice and Swine Models. *Tissue Eng.* **12**, 1151–1168 (2006).
238. Silverman, R. P., Passaretti, D., Huang, W., Randolph, M. A. & Yaremchuk, M. J. Injectable Tissue-Engineered Cartilage Using a Fibrin Glue Polymer. *Plast. Reconstr. Surg.* **103**, 1809–1818 (1999).
239. De la Puente, P. & Ludeña, D. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Exp. Cell Res.* **322**, 1–11 (2014).
240. Dare, E. V. *et al.* Genipin cross-linked fibrin hydrogels for in vitro human articular cartilage tissue-engineered regeneration. *Cells Tissues Organs* **190**, 313–325 (2009).
241. Jarrell, D. K. *et al.* Increasing salinity of fibrinogen solvent generates stable fibrin hydrogels for cell delivery or tissue engineering. *PLoS One* **16**, 1–16 (2021).
242. Bachmann, B. *et al.* Engineering of three-dimensional pre-vascular networks within fibrin hydrogel constructs by microfluidic control over reciprocal cell signaling. *Biomicrofluidics* **12**, (2018).
243. Davis, H. E., Miller, S. L., Case, E. M. & Leach, J. K. Supplementation of fibrin gels with sodium chloride enhances physical properties and ensuing osteogenic response. *Acta Biomater.* **7**, 691–699 (2011).

244. Zhao, H., Ma, L., Gao, C., Wang, J. & Shen, J. Fabrication and properties of injectable β -tricalcium phosphate particles/fibrin gel composite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **29**, 836–842 (2009).
245. Liu, Y. *et al.* Segmental bone regeneration using an rhBMP-2-loaded gelatin/nanohydroxyapatite/fibrin scaffold in a rabbit model. *Biomaterials* **30**, 6276–6285 (2009).
246. Oh, S. H., An, D. B., Kim, T. H. & Lee, J. H. Wide-range stiffness gradient PVA/HA hydrogel to investigate stem cell differentiation behavior. *Acta Biomater.* **35**, 23–31 (2016).
247. Currey, J. D. Effects of differences in mineralization on the mechanical properties of bone. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **304**, 509–518 (1984).
248. Li, B. & Aspden, R. M. Material properties of bone from the femoral neck and calcar femorale of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *Osteoporos. Int.* **7**, 450–456 (1997).
249. Shalon, D., Smith, S. J. & Brown, P. O. A DNA Microarray System for Analyzing Complex DNA Samples Using Two-color Fluorescent Probe Hybridization. 639–645 (1996).
250. Zhao, S., Bittner, A., Ngo, K. & Liu, X. Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells. **9**, (2014).
251. Eichler, G. S. *Molecular Profiling*. **823**, (Humana Press, 2012).
252. Pablo, J., Campello, R. J. & Costa, I. G. On the Selection of Appropriate Proximity Measurement for Gene Expression Data. in *The Twelfth Asia Pacific Bioinformatics Conference (APBC 2014) Shanghai, China. 17-19 January 2014; BMC Bioinformatics* **15**, S2 (2014).
253. Murtagh, F. & Contreras, P. Algorithms for hierarchical clustering: An overview. *Wiley Interdiscip. Rev. Data Min. Knowl. Discov.* **2**, 86–97 (2012).
254. D'Haeseleer, P. How does gene expression clustering work? *Nat. Biotechnol.* **23**, 1499–1501 (2005).
255. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1–13 (2009).
256. du Plessis, L., Skunca, N. & Dessimoz, C. The what, where, how and why of gene ontology--a primer for bioinformaticians. *Brief. Bioinform.* **12**, 723–735 (2011).
257. Thomas, P. D. *et al.* PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Sci.* **31**, 8–22 (2022).
258. Trevino, V., Falciani, F. & Barrera-Saldaña, H. A. DNA Microarrays: a Powerful Genomic Tool for Biomedical and Clinical Research. *Mol. Med.* **13**, 527–541 (2007).
259. Ryoo, H. M., Lee, M. H. & Kim, Y. J. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* **366**, 51–57 (2006).
260. Takuwa, Y., Ohse, C., Wang, E. A., Wozney, J. M. & Yamashita, K. Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 96–101 (1991).
261. Kanzaki, S. *et al.* Heparin inhibits BMP-2 osteogenic bioactivity by binding to both BMP-2 and BMP receptor. *J. Cell. Physiol.* **216**, 844–850 (2008).
262. Von Der Mark, K., Gauss, V., Von Der Mark, H. & Müller, P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture [26]. *Nature* **267**, 531–532 (1977).
263. Steinert, A. F. *et al.* Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res. Ther.* **9**, 1–15 (2007).
264. Pankratz, F. *et al.* BMPER Improves Vascular Remodeling and the Contractile Vascular SMC Phenotype. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, (2023).
265. Knopf, F. *et al.* Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin. *Dev. Cell* **20**, 713–724 (2011).
266. Rui, Y. *et al.* Epigenetic memory gained by priming with osteogenic induction medium improves osteogenesis and other properties of mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* **5**, 1–15 (2015).
267. Gilbert, L. *et al.* Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology* **141**, 3956–3964 (2000).
268. Chien, H. H., Lin, W. L. & Cho, M. I. Down-regulation of osteoblastic cell differentiation by epidermal growth factor receptor. *Calcif. Tissue Int.* **67**, 141–150 (2000).
269. Sawa, N., Fujimoto, H., Sawa, Y. & Yamashita, J. Alternating Differentiation and Dedifferentiation between Mature Osteoblasts and Osteocytes. *Sci. Rep.* **9**, 1–9 (2019).
270. Diefenderfer, D. L., Osyczka, A. M., Reilly, G. C. & Leboy, P. S. BMP Responsiveness in Human Mesenchymal Stem Cells. *Connect. Tissue Res.* **44**, 305–311 (2003).
271. Thomas, D. M. *et al.* Terminal osteoblast differentiation, mediated by runx2 and p27 KIP1, is disrupted in osteosarcoma. *J. Cell Biol.* **167**, 925–934 (2004).
272. Pratap, J. *et al.* Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts. *Cancer Res.* **63**, 5357–5362 (2003).
273. Masters, J. R. & Stacey, G. N. Changing medium and passaging cell lines. *Nat. Protoc.* **2**, 2276–2284 (2007).
274. Burridge, K. Focal adhesions: a personal perspective on a half century of progress. *FEBS J.* **284**, 3355–3361 (2017).

275. Wehrle-Haller, B. Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 569–581 (2012).
276. Critchley, D. R. Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 831–836 (2004).
277. Hu, Y. L. *et al.* FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Sci. Rep.* **4**, 1–7 (2014).
278. Turner, C. E. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat. Cell Biol.* **2**, 231–236 (2000).
279. Kanteti, R., Batra, S. K., Lennon, F. E. & Salgia, R. FAK and paxillin, two potential targets in pancreatic cancer. *Oncotarget* **7**, 31586–31601 (2016).
280. Schaller, M. D. Paxillin: A focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* **20**, 6459–6472 (2001).
281. Chen, X. *et al.* Cyclic compression stimulates osteoblast differentiation via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* **15**, 2890–2896 (2017).
282. Damaraju, S., Matyas, J. R., Rancourt, D. E. & Duncan, N. A. The effect of mechanical stimulation on mineralization in differentiating osteoblasts in collagen-i scaffolds. *Tissue Eng. - Part A* **20**, 3142–3153 (2014).
283. Rath, B., Nam, J., Knobloch, T. J., Lannutti, J. J. & Agarwal, S. Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts. *J. Biomech.* **41**, 1095–1103 (2008).
284. Wang, D., Wang, H., Gao, F., Wang, K. & Dong, F. CIC-3 Promotes Osteogenic Differentiation in MC3T3-E1 Cell After Dynamic Compression. *J. Cell. Biochem.* **118**, 1606–1613 (2017).
285. BenAbdelkader, C., Cutler, R. & Davis, L. Stride and cadence as a biometric in automatic person identification and verification. in *Proceedings of Fifth IEEE International Conference on Automatic Face Gesture Recognition 372–377* (IEEE, 2002). doi:10.1109/AFGR.2002.1004182
286. Turner, C. H., Yoshikawa, T., Forwood, M. R., Sun, T. C. & Burr, D. B. High frequency components of bone strain in dogs measured during various activities. *J. Biomech.* **28**, 39–44 (1995).
287. Nicoletta, D. P., Moravits, D. E., Gale, A. M., Bonewald, L. F. & Lankford, J. Osteocyte lacunae tissue strain in cortical bone. *J. Biomech.* **39**, 1735–1743 (2006).
288. Herath, T. D. K., Larbi, A., Teoh, S. H., Kirkpatrick, C. J. & Goh, B. T. Neutrophil-mediated enhancement of angiogenesis and osteogenesis in a novel triple cell co-culture model with endothelial cells and osteoblasts. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **12**, e1221–e1236 (2018).
289. Akazawa, K. *et al.* Double-layered cell transfer technology for bone regeneration. *Sci. Rep.* **6**, 1–5 (2016).
290. Rubenstein, D. A., Lu, H., Mahadik, S. S., Leventis, N. & Yin, W. Characterization of the physical properties and biocompatibility of polybenzoxazine-based aerogels for use as a novel hard-tissue scaffold. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **23**, 1171–1184 (2012).
291. Clark, C. C., Wang, W. & Brighton, C. T. Up-regulation of expression of selected genes in human bone cells with specific capacitively coupled electric fields. *J. Orthop. Res.* **32**, 894–903 (2014).
292. Zhang, J., Xu, S., Zhang, Y., Zou, S. & Li, X. Effects of equibiaxial mechanical stretch on extracellular matrix-related gene expression in human calvarial osteoblasts. *Eur. J. Oral Sci.* **127**, 10–18 (2019).
293. Itskovich, Y. *et al.* Differential behaviour and gene expression in 3D cultures of femoral- and calvarial-derived human osteoblasts under a cyclic compressive mechanical load. *Eur. J. Oral Sci.* 1–11 (2021). doi:10.1111/eos.12818
294. Wein, M. *et al.* Pilot investigation of the molecular discrimination of human osteoblasts from different bone entities. *J. Cranio-Maxillofacial Surg.* **43**, 1487–1493 (2015).

9. DANKSAGUNG

Ich möchte mich zuallererst bedanken bei Prof. Dr. Thorsten Steinberg für seine ausdauernde Betreuung meiner Doktorarbeit und für die Bereitstellung des interessanten und herausfordernden Themas. Ebenso danke ich Prof. Dr. Pascal Tomakidi für seine unermüdliche Motivation. Ich habe während meiner Promotion in ihrer Arbeitsgruppe unglaublich viel gelernt.

Für die großzügige Unterstützung und für die Bereitstellung von Labor und Kompressionsmaschine für einen wichtigen Teil meiner Versuche möchte ich mich herzlich bedanken bei Prof. Dr. Bernd Rolaußs und Marita Völker.

Danke an Dr. Rainer Detsch und Dr. Vera Bednarzig, sowie Prof. Dr. Rolf Mülhaupt, Dr. Benjamin Stolz, Dr. Florian Mönkemeyer und Markus Mader für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Der Privaten Stiftung Ewald Marquardt für Wissenschaft und Technik, Kunst und Kultur möchte ich danken für die großzügige und unkomplizierte finanzielle Förderung, die ich von Januar bis Oktober 2022 zur Fertigstellung meiner Dissertation erhalten habe.

Das Team des Life Imaging Centers, besonders häufig Dr. Angela Naumann und Dr. Roland Nitschke, hat mir sehr bei der konfokalen Mikroskopie geholfen. Danke dafür.

Ich danke PD Dr. Brigitte Altmann für ihr immer offenes Ohr bei Fragen rund um Osteoblasten und Knochenregeneration.

Ich bedanke mich bei Heike Jahnke und Anette Lindner für ihre umfangreiche Hilfe bei allen möglichen Aspekten der histologischen Technik.

Sehr viel Hilfe im Labor und moralische Unterstützung in allen Lebenslagen habe ich bekommen von meinen Kolleg*innen in der Oralen Biotechnologie: Imke, Yrgalem, Charlotte, Julie, Amélie, Nicole, Ayman, Xiaoling, Martin, Diana, Elisa und Brunhild. Von Herzen vielen Dank!

Ich danke Christopher genauso herzlich für seine vielfältige Unterstützung in- und außerhalb der Biologie, die abendliche Ablenkung und seine langjährige Freundschaft.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Ausbildung bis hin zu meiner Promotion sehr unterstützt und gefördert haben. Sie haben mir immer ein Gefühl der Sicherheit gegeben, ohne das ich nicht alle Herausforderungen hätte meistern können.

10. ANHANG

10.1. qPCR-Array Osteogenese

Tabelle 18: Liste aller gemessenen Gene auf dem im Projekt verwendeten qPCR-Array

Gensymbol	Gename
ACVR1	Activin A receptor, type I
AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein
ALPL	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
ANXA5	Annexin A5
BGLAP	Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein
BGN	Biglycan
BMP1	Bone morphogenetic protein 1
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
BMP3	Bone morphogenetic protein 3
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
BMP5	Bone morphogenetic protein 5
BMP6	Bone morphogenetic protein 6
BMP7	Bone morphogenetic protein 7
BMPR1A	Bone morphogenetic protein receptor, type IA
BMPR1B	Bone morphogenetic protein receptor, type IB
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)
CALCR	Calcitonin receptor
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
CDH11	Cadherin 11 type 2, OB-cadherin (osteoblast)
CHRD	Chordin
COL10A1	Collagen, type X, alpha 1
COL14A1	Collagen, type XIV, alpha 1
COL15A1	Collagen, type XV, alpha 1
COL1A1	Collagen, type I, alpha 1
COL1A2	Collagen, type I, alpha 2
COL2A1	Collagen, type II, alpha 1
COL3A1	Collagen, type III, alpha 1
COL5A1	Collagen, type V, alpha 1
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
CTSK	Cathepsin K
DLX5	Distal-less homeobox 5
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)
FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2
FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
FN1	Fibronectin 1
GDF10	Growth differentiation factor 10
GLI1	GLI family zinc finger 1
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
IHH	Indian hedgehog
ITGA1	Integrin, alpha 1
ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
ITGA3	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)
ITGAM	Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)

MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
MMP8	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NOG	Noggin
PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide
PHEX	Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SERPINH1	Serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)
SMAD1	SMAD family member 1
SMAD2	SMAD family member 2
SMAD3	SMAD family member 3
SMAD4	SMAD family member 4
SMAD5	SMAD family member 5
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9
SP7	Sp7 transcription factor
SPP1	Secreted phosphoprotein 1
TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
TGFB2	Transforming growth factor, beta 2
TGFB3	Transforming growth factor, beta 3
TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor 1
TGFBR2	Transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDA)
TNF	Tumor necrosis factor
TNFSF11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
VDR	Vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
VEGFB	Vascular endothelial growth factor B
ACTB	Actin, beta
B2M	Beta-2-microglobulin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0

10.2. Auswertungsalgorithmus für paarweisen Vergleich der $\Delta\Delta Cq$ -Werte

```
!pip install dash_bio
import pandas as pd
import dash_bio
import numpy as np
from google.colab import files
from google.colab import drive
drive.mount('/content/drive')
from IPython import get_ipython
get_ipython().magic('reset -sf')

import pandas as pd
import dash_bio
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import math
import scipy

#Funktion für 2^-x
def exp2(exponent):
    #a=np.array(iterable)
    return 2**(-exponent)

#Funktion für teilen durch
def div(dividend, divisor):
    return dividend/divisor

#=====  
#importiere Daten aus csv  
#=====  
Cq=pd.read_csv('/content/drive/MyDrive/qPCRAuswertung/230119_LV434-  
441_paarweise_Cq.csv', header=[0,1,2], index_col=0).astype('float64') #  
.astype nötig, da Werte als object(Text) gespeichert, weil die Zeile Te  
st Group Text enthalten hat

#=====  
#Extrahiere Testgruppen, Replikatliste  
#=====  
TestGroups=set(Cq.columns.levels[0].tolist()) #set() reduziert Liste au  
f einzigartige Einträge  
print(f'Folgende {len(TestGroups)} Testgruppen wurden gefunden: {TestGr  
oups}')  
Replikate=set(Cq.columns.levels[1].tolist())  
print(f'Es liegen {len(Replikate)} Replikate vor.')

#=====  
#Prüfe ob alle GDC = NaN oder >35  
#=====
```

```

GDCisna=Cq.loc['GDC'].isna()
GDCis35=Cq.loc['GDC']>35

GDCpass=(GDCisna+GDCis35).all() #.all() Return whether all elements are
True, potentially over an axis.
if GDCpass:
    print('GDC ist ok (<35) für alle Proben.')
else:
    print('GDC ist nicht ok (>35).')

#=====
#Prüfe PPC
#=====
RTC=Cq.drop(Cq.head(90).index)
RTC=RTC.drop(Cq.tail(3).index)
# RTC=RTC.apply(geo_mean, axis=0)
RTC=RTC.apply(np.mean, axis=0)

PPC=Cq.drop(Cq.head(93).index).apply(np.mean, axis=0)

PPCgreaterRTC=((RTC-PPC)<5).all()
if PPCgreaterRTC:
    print('RTC-PPC ist ok (<5) für alle Proben.')
else:
    print('RTC-PPC ist nicht ok (>=5) für mindestens eine Probe.')

#=====
#Auswahl des HKG
#=====
#berechne Mittelwerte für alle HKG
CqHKG=Cq.drop(Cq.head(84).index).drop(Cq.tail(7).index)
CqHKGaverage=CqHKG.apply(np.mean, axis=1) #Mittelwert per arithmetic me
an

CqHKGvariances=CqHKG.sub(CqHKGaverage, axis=0) #Abweichungen der Cqs de
r HKGs vom Mittelwert über alle HKGs
#print(CqHKGvariances)
CqHKGvarrange=(CqHKGvariances.max(axis=1)-
CqHKGvariances.min(axis=1)).to_frame('range') #berechne Abstand von max
zu min und verwandle in dataframe mit column name 'range'
# print(CqHKGvarrange)
# print((CqHKGvarrange<1).any().all())

#prüfe, ob Varianz für min. 1 HKG <1; HKG enthält Genname und Varianz d
er ausgewählten HKGs
if (CqHKGvarrange<1).any().all(): #.all() um zu reinem bool umzuformen
    HKG=CqHKGvarrange[CqHKGvarrange.range<1] #übernehme nur rows, in dene
n range<1
    #print(HKG)

```

```

    print(f'Folgende HKG(s) werden verwendet (Varianz<1): {HKG.index.tolist()}')
else:
    HKG=CqHKGvarrange[CqHKGvarrange.range==CqHKGvarrange.range.min()] #ermittle HKG mit geringster Varianz, schreibe dessen Zeile in CqHKGvarrange in HKG
    print(f'Varianz für keines der HKG <1, benutze HKG mit kleinster Abweichung: {HKG.index.tolist()}')

# print('HKG:')
# print(HKG)

#=====
#Cq < cutoff?
#=====
cutoff=35 #hier Cutoff-Wert festlegen
# cutoff=float(input('Cq cutoff eingeben (z.B. 35):'))
Cqcuttoff=pd.DataFrame(columns=TestGroups, index=Cq.index).drop(Cq.tail(7).index)
for row in Cqcuttoff.itertuples(index=True):
    for TestGroup in TestGroups:
        # print(f'row: {row}')
        # print(f'TestGroup: {TestGroup}')
        # print(f'Cq35 row, testgroup: {row[0]}, {TestGroup}')
        # print((Cq.loc[row[0],TestGroup]<35).all()) #prüft, ob alle Werte <35; NaN ergibt False, daher mit abgedeckt
        Cqcuttoff.loc[row[0],TestGroup]=(Cq.loc[row[0],TestGroup]<cutoff).all() #schreibe ...<cutoff.all() in row[0] und TestGroup entsprechende Zeile in Cqcuttoff

#=====
#delta Cq (GOI-HKG pro Sample)
#=====
Cqdelta=pd.DataFrame(columns=Cq.columns, index=Cq.index).astype(float).drop(Cq.tail(7).index)

for row in Cqdelta.itertuples(index=True):
    for Testgroup in TestGroups:
        for Replikate in Replikate:
            Cqdelta.loc[row[0]][Testgroup,Replikate]=float(Cq.loc[row[0]][Testgroup,Replikate]-np.mean(Cq.loc[list(HKG.index)][Testgroup,Replikate]))

# print(Cqdelta)

#=====
#delta delta Cq
#=====

```

```

ContrSample='NC' #hier festlegen, welches Sample als Kontrolle dienen
soll
Sample='komprimiert' #hier festlegen, welches Sample analysiert werden
soll

Cqdeltdelta=pd.DataFrame(columns=Replikate, index=Cq.index).astype(float)
.drop(Cq.tail(7).index)
# print(Cqdelta["komprimiert","1"])

for row in Cqdelta.itertuples(index=True):
    for Replikat in Replikate:
        Cqdeltdelta.loc[row[0]][Replikat]=float(Cqdelta.loc[row[0]][Sample,Replikat].subtract(float(Cqdelta.loc[row[0]][ContrSample,Replikat]), axis=0))

# print(Cqdeltdelta)

#=====
#average deltadeltaCq paarweise Vergleich
#=====
Cqdeltdeltamean=pd.DataFrame(columns=[Sample], index=Cqdeltdelta.index)
for row in Cqdeltdeltamean.itertuples(index=True):
    # print(f'Testgroup: {TestGroup}')
    if Cqcutoff.loc[row[0],TestGroup]:
        Cqdeltdeltamean.loc[row[0]]=np.mean(Cqdeltdelta.loc[row[0]])
# print(Cqdeltdeltamean)

#=====
#Standardabweichung der Cqdeltdelta-Werte
#=====
CqdeltdeltaStDev=pd.DataFrame(columns=[Sample], index=Cqdeltdelta.index).astype(float)
# print(CqdeltdeltaStDev)
for row in CqdeltdeltaStDev.itertuples(index=True):
    if Cqcutoff.loc[row[0]].all():
        CqdeltdeltaStDev.loc[row[0]]=float(Cqdeltdelta.loc[row[0]].std())
        #berechnet Standardabweichung der deltadeltaCq-
Werte pro Gen pro Testgruppe
# print(CqdeltdeltaStDev)

#=====
#Cqdeltdeltamean + jew. Standardabweichung
#=====
Cqdeltdeltamean_plus_StDev=pd.DataFrame(columns=[Sample], index=Cqdeltdelta.index).astype(float)

```

```

Cqdelatadeltamean_plus_StDev[Sample]=Cqdelatadeltamean[Sample]
Cqdelatadeltamean_plus_StDev['- StDev']=Cqdelatadeltamean[Sample]-
CqdelatadeltaStDev[Sample]
Cqdelatadeltamean_plus_StDev['+ StDev']=Cqdelatadeltamean[Sample]+Cqdelta
deltaStDev[Sample]
# print(Cqdelatadeltamean_plus_StDev)

#=====
#T-Test
#=====
pvalues=pd.DataFrame(index=Cq.index).astype(float).drop(Cq.tail(7).inde
x)

pvalues[Sample]=scipy.stats.ttest_ind(np.array(Cqdelta[Sample]), np.arr
ay(Cqdelta[ContrSample]), axis=1, equal_var=True, alternative='two-
sided')[1]
# print(pvalues)

#=====
#Regulation
#=====
Reg=Cqdelatadeltamean_plus_StDev.apply(lambda x: exp2(x)) #berechnet fol
d-regulation als deltadelta-Cq-Werten (und aus deltadeltaCq +/- StAbw.)
# print(Reg)
#Notiz: fold regulation aus expression data: -1/x

```

10.3. Stimulation mit BMP-2 - Datenbanksuche mit PANTHER

Tabelle 19: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM** mit **50 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **2 Tage** mit Zuordnung zu den 4 ‚functional annotations‘ der PANTHER-Datenbank mit bester Übereinstimmung

50 ng/ml BMP-2, 2 Tage			functional annotation PANTHER			
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	membrane to membrane docking	intra-membranous ossification	collagen biosynthetic process	positive regulation of vascular endothelial cell proliferation
CHRD	0.48	0.0330				
COL14A1	0.22	0.0065				
COL15A1	0.50	0.0098				
COL1A1	1.51	0.0443		x	x	
COL5A1	1.92	0.0062			x	
CTSK	0.50	0.0171		x		
FGF2	1.65	0.0162				x
FGFR1	0.67	0.0313				x
ICAM1	0.28	0.0114	x			
IGF2	4.30	0.0435				x
ITGA1	1.85	0.0150				
PHEX	0.43	0.0193				
TGFB1	1.67	0.0182				
TGFB2	2.26	0.0232				
VCAM1	0.60	0.0366	x			

Tabelle 20: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM** mit **50 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **7 Tage** mit Zuordnung zu den 4 ‚functional annotations‘ der PANTHER-Datenbank mit bester Übereinstimmung

50 ng/ml BMP-2, 7 Tage			functional annotation PANTHER			
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	membrane to membrane docking	positive regulation of vascular endothelial cell proliferation	positive regulation of mononuclear cell proliferation	ossification
CHRD	0.18	0.0266				
COL10A1	0.23	0.0085				
COL14A1	0.11	0.0040				
CSF1	0.29	0.0155			x	x
CTSK	0.26	0.0293				x
FGFR1	0.32	0.0136		x		
ICAM1	0.13	0.0064	x			
IGF2	8.59	0.0161		x	x	x
SMAD3	0.12	0.0058				x
VCAM1	0.25	0.0147	x		x	
B2M	0.34	0.0120				

Tabelle 21: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM** mit **300 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **2 Tage** mit Zuordnung zu den 4 ‚functional annotations‘ der PANTHER-Datenbank mit bester Übereinstimmung

300 ng/ml BMP-2, 2 Tage			functional annotation PANTHER			
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	positive regulation of transforming growth factor β 3 production	positive regulation of macrophage colony-stimulating factor signaling pathway	intermediate mesodermal cell differentiation	various BMP signaling pathways in organ development
BGN	1.55	0.0441				
BMP4	0.17	0.0162			x	x
BMP6	6.31	0.0238				
BMPR1B	0.30	0.0474				
CHRD	0.30	0.0113				
COL10A1	4.07	0.0495				
COL15A1	0.17	0.0019				
COL1A1	1.83	0.0220				
COL5A1	2.76	0.0058				
CSF1	0.33	0.0064		x		
CTSK	0.40	0.0047				
EGFR	0.42	0.0142				
FGF2	1.75	0.0472				
FGFR1	0.50	0.0043				
ICAM1	0.12	0.0009				
IGF2	8.75	0.0201				
ITGA1	2.30	0.0051				
MMP2	1.90	0.0070				
PHEX	0.28	0.0021				
SERPINH1	1.83	0.0108				
SMAD3	0.13	0.0005	x			
TGFB1	2.50	0.0045				
TGFB2	2.71	0.0102				
TGFB3	0.42	0.0179				
TGFBR1	1.68	0.0315				
TGFBR2	0.61	0.0489				
VCAM1	0.26	0.0020				
B2M	0.61	0.0269				

Tabelle 22: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM** mit **300 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **7 Tage** mit Zuordnung zu den 4 ‚functional annotations‘ der PANTHER-Datenbank mit bester Übereinstimmung

300 ng/ml BMP-2, 7 Tage			functional annotation PANTHER			
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	positive regulation of odontogenesis	membrane to membrane docking	positive regulation of miRNA maturation	pathway-restricted SMAD protein phosphorylation
BGN	2.94	0.0250				
BMP2	0.26	0.0287	x			x
COL5A1	3.31	0.0214				
CSF1	0.12	0.0066	x			
CTSK	0.18	0.0283				
EGFR	0.28	0.0263			x	
FGFR1	0.30	0.0156				
ICAM1	0.05	0.0022		x		
IGF2	31.85	0.0024				
MMP2	2.54	0.0398				
TGFB1	3.73	0.0338	x		x	x
VCAM1	0.08	0.0085		x		
B2M	0.31	0.0167				

Tabelle 23: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM -Serum mit 50 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM -Serum mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **2 Tage**, keine Zuordnung zu ‚functional annotations‘ in der PANTHER-Datenbank

50 ng/ml BMP-2, 2 Tage

Gen	Expressionsaktivität	p-Wert
COL14A1	0.17	0.0428
ICAM1	0.19	0.0390

Tabelle 24: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM -Serum mit 50 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM -Serum mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **7 Tage**, keine Zuordnung zu ‚functional annotations‘ in der PANTHER-Datenbank

50 ng/ml BMP-2, 7 Tage

Gen	Expressionsaktivität	p-Wert
TGFB1	2.68	0.0302

Tabelle 25: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM -Serum mit 300 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM -Serum mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **2 Tage** mit Zuordnung zu den 4 ‚functional annotations‘ der DAVID-Datenbank mit bester Übereinstimmung

300 ng/ml BMP-2, 2 Tage			functional annotation PANTHER			
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	positive regulation of macrophage colony-stimulating factor signaling pathway	integrin biosynthetic process	intermediate mesodermal cell differentiation	various BMP signaling pathways in organ development
BMP4	0.24	0.0432			x	x
BMP6	4.53	0.0491				
BMPR1B	0.32	0.0284				
CHRD	0.38	0.0290				
COL14A1	0.08	0.0213				
COL5A1	3.39	0.0462		x		
CSF1	0.38	0.0396	x			
CTSK	0.26	0.0240				
ICAM1	0.08	0.0055				
ITGA1	2.34	0.0493				
TGFB1	4.19	0.0203				
TGFB2	4.24	0.0136				
TGFBR1	2.42	0.0493				

Tabelle 26: Übersicht über die statistisch signifikant ($p < 0,05$) regulierten Gene im Kontext Osteogenese von Osteoblasten in **ObM -Serum mit 300 ng/ml BMP-2** im Vergleich zu ObM -Serum mit 0 ng/ml BMP-2 nach Kultur für **7 Tage** mit Zuordnung zu den 4 ‚functional annotations‘ der DAVID-Datenbank mit bester Übereinstimmung

300 ng/ml BMP-2, 7 Tage			functional annotation PANTHER			
Gen	Expressionsaktivität	p-Wert	positive regulation of odontogenesis	collagen biosynthetic process	positive regulation of macrophage	positive regulation of vascular
BGN	3.31	0.0212				
BMP6	7.46	0.0036				x
BMPR1B	0.47	0.0399				
COL1A1	5.58	0.0382		x		
COL5A1	8.55	0.0358		x		
CSF1	0.20	0.0306	x		x	
PHEX	0.33	0.0380				
TGFB1	4.36	0.0084	x		x	x
BGN	3.31	0.0212				