

Philipps



Universität
Marburg

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie

Geschäftsführende Direktorin: Univ.-Prof. Dr. S. Fuchs-Winkelmann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

„Funktionalisierung von PLLA-Nanofasern mittels Kollagen Typ 1 und BMP-2 – Einfluss auf die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen“

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anne Veltum

aus Fulda

Marburg, 2012

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 13.07.2012

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Markus D. Schofer

Korreferent: PD Dr. Ulrich Mühlenhoff

Meinem Vater Johannes Veltum †
und meiner Großmutter Theresia Budenz †

„Ist dies schon Wahnsinn, hat es doch Methode“
(Hamlet, William Shakespeare)

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG.....	11
1.1.	Knochenersatzmaterial.....	11
1.1.1.	Autogenes Knochengewebe	12
1.1.2.	Allogenes Knochengewebe.....	13
1.1.3.	Synthetisches Knochenersatzmaterial und Tissue Engineering	13
1.2.	Das Elektrospinnen	17
1.3.	Stammzellendifferenzierung.....	19
1.4.	BMP – Bone morphogenetic Protein	21
1.4.1.	Extrazelluläre Matrix, Integrinstoffwechsel und BMP-2-Integrin- Crosstalk.....	24
1.5.	Ziel der Arbeit.....	26
2.	MATERIAL UND METHODEN	26
2.1.	Chemikalien, Materialien und Geräte	26
2.1.1.	Kits und Antikörper	28
2.2.	Konstruktion und Charakterisierung der Nanofasern	29
2.2.1.	Kontaktwinkel	30
2.2.2.	Elektronenmikroskopie	30
2.2.3.	Porengröße	31
2.2.4.	Elektrische Leitfähigkeit.....	31
2.2.5.	Viskositätsmessungen.....	32
2.2.6.	Oberflächenspannung	32
2.2.7.	Release - Freisetzung	32
2.3.	hMSC Isolation, Charakterisierung, Kultivierung.....	33

2.4.	Genexpressionsanalyse	34
2.4.1.	RNA-Isolierung	34
2.4.2.	c-DNA-Synthese.....	35
2.4.3.	Quantitative Real-Time-PCR.....	36
2.5.	Immunfluoreszenz	37
2.6.	Von Kossa, Alizarin	38
2.7.	Statistik.....	38
3.	ERGEBNIS.....	39
3.1.	Charakterisierung der Lösungen zur Herstellung der Fasern	39
3.1.1.	Leitfähigkeit, Oberflächenspannung und Viskosität	39
3.2.	Charakterisierung der Nanofasern	39
3.2.1.	Elektronenmikroskopie, Porosität und Kontaktwinkel.....	39
3.2.2.	Release - Freisetzungskinetik	42
3.3.	Adhäsion, Wachstum und Proliferation der Zellen	43
3.3.1.	Adhäsionsversuch	43
3.3.2.	Zelldichten	44
3.3.3.	Proliferation	46
3.4.	Einfluss der BMP-2 enthaltenden PLLA-Koll1-Blendnanofasern auf die Differenzierung und Matrixformation der hMSC.....	48
3.4.1.	Genexpressionsanalyse AP,OC und Koll1 mittels PCR.....	48
3.4.2.	Immunfluoreszenzanalyse, Kollagenablagerung der hMSC	50
3.4.3.	Von-Kossa-Färbung, Alizarin-Färbung.....	51
3.4.4.	Signaltransduktion.....	52
4.	DISKUSSION	56
4.1.	Verwendete Materialien.....	57
4.2.	Fasermorphologie	57

4.3.	Freisetzungskinetik.....	59
4.4.	Biologische Wirksamkeit	60
4.4.1.	Adhäsion, Wachstum und Proliferation der Zellen	60
4.4.2.	Einfluss der BMP-2 enthaltenden PLLA-Koll1-Blend-Fasern auf die Differenzierung und Matrixformation der hMSC.....	61
4.5.	Fazit.....	63
5.	ZUSAMMENFASSUNG	64
5.1.	Deutsche Zusammenfassung.....	64
5.2.	Englische Zusammenfassung	65
	LITERATURVERZEICHNIS.....	67
	TABELLARISCHER LEBENS LAUF	84
	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	85
	DANKSAGUNG	86
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG ÜBER DIE SELBSTSTÄNDIGE ANFERTIGUNG DER DISSERTATION.....	88
	ANHANG	89

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1.	Tissue Engineering:	15
Abb. 2.	Elektrospinning	18
Abb. 3.	BMP-Wirkung.....	22
Abb. 4.	Signaltransduktion	23
Abb. 5.	Porenverteilung.....	40
Abb. 6.	SEM-Analyse	41
Abb. 7.	Freisetzungskinetik	42

Abb. 8.	Adhäsion nach 12 Stunden.....	44
Abb. 9.	Wachstumskurve über 22 Tage unter Wachstumsbedingungen.....	45
Abb. 10.	Wachstumskurve über 22 Tage unter osteoinduktiven Bedingungen	45
Abb. 11.	Proliferation	47
Abb. 12.	CCND Genexpression	48
Abb. 13.	Expression AP, OC, Koll1 über 22 Tage	49
Abb. 14.	Immunfluoreszenz.....	50
Abb. 15.	Alizarin und von Kossa Tag 10	51
Abb. 16.	Alizarin und von Kossa Tag 22	52
Abb. 17.	Genexpressionsanalyse von FAK und Smad-5.....	53
Abb. 18.	Immunfluoreszenzanalyse von Smad-5 und FAK	54
Abb. 19.	Immunfluoreszenzmikroskopie von FAK und Smad-5.....	55

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1.	Verwendete Laborgeräte	27
Tab. 2.	Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	27
Tab. 3.	Verwendete Chemikalien	28
Tab. 4.	Verwendete Kits	28
Tab. 5.	Verwendete Antikörper	29
Tab. 6.	Reaktionsmix	36
Tab. 7.	PCR-Programm	36
Tab. 8.	Verwendete Primer	37
Tab. 9.	Leitfähigkeit, Oberflächenspannung, Viskosität.....	39

Abkürzungsverzeichnis:

In dieser Arbeit wurden die internationalen SI-Einheiten und davon abgeleitete Einheiten mit SI-Präfixen verwendet.

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
Abb.	Abbildung
Bed.	Bedingung
AKT	Aktin
Alk3 / Alk6	activin-like kinase
AP	Alkalische Phosphatase
BMP	bone morphogenetic protein
BMPRI / BMPRII	BMP receptor type I/II
CCND	Cyclin 1D
Cox-2	Cyclooxygenase 2
Cy2 / Cy3	Cyanine 2/3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dichlormethan
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
RT	Reverse Transcriptase
dT	Desoxythymidin
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinasen
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GSK3β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
HFIP	Hexafluoroisopropanol
JNK	c-Jun N-terminal kinase
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
Kap.	Kapitel
Koll1	Kollagen Typ 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK Kinase
M	molar
OC	Osteocalcin
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PBE	Phosphat buffer with edta
PBS	phosphate buffered saline
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PLLA	Poly-L-Laktatsäure (poly(L-lactic acid))
PYK	Pyruvatkinase
RAS	Rat sarcoma
RAF	rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
R-Smad	Receptor-regulated Smad
Smad	Sma and Mad related protein
SEM	Scanning Electron Microscope
Tab.	Tabelle
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
w/v	Gewicht/Volumen (weight/volume)
w/w	Gewicht/Gewicht (weight/weight)

1. Einleitung

1.1. Knochenersatzmaterial

Die Implantation von allogenen und autogenem Knochengewebe für die Knochendefektheilung und Regeneration ist Gegenstand der aktuellen Forschung in der Orthopädie und der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie (Włodarski et al., 2008, Hutmacher and Cool, 2007). Traumata, Tumore, Pseudoarthrosen und Infektionen können zu unüberbrückbaren Knochendefekten führen, die eine Knochen transplantation unumgänglich machen (Bullens et al., 2009, Matejovsky et al., 2006, Koskinen, 1978, Lifeso and Al-Saati, 1984). So ist Knochen hinter Blut das meist transplantierte Gewebe (Van Heest and Swiontkowski, 1999). Jährlich werden 2,2 Millionen Knochen transplantationen durchgeführt, um Knochen defekte in der Orthopädie, Neuro- und Kieferchirurgie zu behandeln (Lewandowski et al., 2000). Der Standard des Knochenersatzes ist hierbei autogenes Knochengewebe, meist Spongiosa, die aus dem Beckenkamm gewonnen wird (Giannoudis et al., 2005, Schmidt-Rohlfing et al., 2009, Sen and Miclau, 2007, Agarwal et al., 2009, Pape et al., 2010, Putzier et al., 2009, Chau and Mobbs, 2009).

Neben körpereigenem Knochen und Spenderknochen gibt es immer mehr Knochenersatzmaterialien (Włodarski et al., 2008, Callan et al., 2000, Buser et al., 1993). Die Komponenten bestehen hierbei aus anorganischen und organischen Materialien und sollten verschiedene Voraussetzungen erfüllen (Hutmacher and Cool, 2007). Hierzu zählen ein dreidimensionales strukturelles Grundgerüst, die Besiedlung mit Zellen und - wenn möglich - der Zusatz von Wachstumsfaktoren (Damien and Parsons, 1991, Lane et al., 1999, Giannoudis et al., 2007a). Diese Eigenschaften des Knochenmaterials stellen definitionsgemäß die Voraussetzungen für das Tissue Engineering dar (Hutmacher and Cool, 2007). Das Knochenmaterial sollte neben den bereits genannten Voraussetzungen drei weitere Kriterien erfüllen: Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion, d.h. die Knochenneubildung, die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoblasten und das Einwachsen von Zellen aus der Umgebung (Chau and Mobbs, 2009, Beaman et al., 2006). Weitere wichtige Eigenschaften sind z.B. die Porosität

(Kübler et al., 2004, Leong et al., 2009), die die Einwanderung von Zellen verstärkt, die Biokompatibilität (Khan et al., 2008) und die biologische Abbaubarkeit (Liu and Ma, 2004, Yang et al., 2001).

Zu den Knochenersatzmaterialien gehören Keramik, wie Tricalciumphosphat, Hydroxylapatit, Calciumsulfat (Damien and Parsons, 1991, Klawitter and Weinstein, 1974, Rodríguez-Lorenzo and Ferreira, 2004, Coetzee, 1980) oder bioaktives Glas (Peltola et al., 2000), Zement (Friedman et al., 2000), Metalle (Du et al., 2005, Chen et al., 2007), Nanofaseraffolds aus Polymeren (Ayres et al., 2010, Chan et al., 2009, El-Amin et al., 2003, Liu and Ma, 2004) und Komposite, die eine Kombination aus den einzelnen Stoffen, gegebenenfalls mit Zellen und Wachstumsfaktoren, darstellen (Giannoudis et al., 2005).

Diese aktuelle Entwicklung der orthopädischen Möglichkeiten und die technischen Fortschritte im Tissue Engineering haben zu vielen Erfolgen in der Orthopädie und Unfallchirurgie bei der Therapie von Knochendefekten geführt (Schmidmaier et al., 2009). Trotzdem bleibt es weiterhin schwierig, große Knochendefekte zu heilen (Schmidmaier et al., 2009, Pelled et al., 2010, Hollinger and Kleinschmidt, 1990) und ein dem autogenen Knochen gleichwertiges Knochenersatzmaterial ist aktuell noch nicht realisierbar (Aebi et al., 1991, Sen and Miclau, 2007).

1.1.1. Autogenes Knochengewebe

In der Tat besitzt autogenes Knochengewebe gegenüber den anderen Knochenimplantaten viele Vorteile wie ein großes osteogenes Potential, Osteoinduktion, Osteokonduktion und eine große Biokompatibilität. Kein anderes Knochenersatzmaterial vereinigt diese für die Knochenheilung wichtigen Eigenschaften in dem Maße wie autogenes Knochenmaterial (Pape et al., 2010, Sen and Miclau, 2007, Megas and Panagiotis, 2005). Obwohl die Beckenkamm-spongiosa, die meist als autogenes Knochenmaterial verwendet wird, mechanisch sehr instabil ist, wird sie dadurch schnell in den Knochen eingebaut (Khan et al., 2005, Sen and Miclau, 2007). Nachteil von autogenem Knochenmaterial ist jedoch, dass es durch die Entnahme zu anderen Morbiditäten wie Schmerzen und Infektionen an der Entnahmestelle und chirurgischen Komplikationen

kommen kann. So treten teilweise Hämatome, Blutverlust, Gefäß- und Nervenläsionen, Narben und chronische Schmerzen an der Entnahmestelle auf (Ross et al., 2000, Pape et al., 2010).

1.1.2. Allogenes Knochengewebe

Allogenes Knochenmaterial, also menschliches Spendermaterial, zeigt zwar nicht die Nachteile einer Knochenentnahme, kommt jedoch nicht an die osteoinduktiven Eigenschaften von autogenen Knochen heran (Schmidt-Rohlfing et al., 2009, Sen and Miclau, 2007, Bauer and Muschler, 2000). Außerdem kann es durch die Implantationen eines körperfremden Materials zu Infektionen und Immunreaktionen kommen (Samartzis et al., 2005). Durch Gefriertrocknung werden diese Nebenwirkungen zwar reduziert, aber gleichzeitig vermindert sich auch der osteoinduktive Effekt (Giannoudis et al., 2005, Tomford, 1995). Allogenes Knochenmaterial ist in zwei Formen erhältlich: Mineralisiertes allogenes Knochenmaterial ist nicht osteogen, leicht osteoinduktiv und sehr osteokonduktiv und verfügbar als frisch, gefrorene und gefriergetrocknete Präparate, wohingegen entmineralisierte Knochenmatrix osteokonduktiv und osteoinduktiv sein kann (Chau and Mobbs, 2009).

Zusätzliche Nachteile von allogenem Knochenmaterial sind außerdem die Resorption durch Osteoklasten, erhöhte Prävalenz von Mikrofrakturen, fehlende Einheilung, verminderte mechanische Stabilität bis hin zu makroskopischen Frakturen und verminderte Knochendichte (Schmidt-Rohlfing et al., 2009). Trotzdem gibt es weitere Vorteile wie eine bessere Verfügbarkeit oder eine längere Haltbarkeit (Putzier et al., 2009).

1.1.3. Synthetisches Knochenersatzmaterial und Tissue Engineering

Der kontinuierliche Fortschritt in der Medizin könnte es uns in der Zukunft erlauben, annähernd jedes Gewebe bzw. Organ des menschlichen Körpers selbst herzustellen und zu ersetzen (Boudriot et al., 2006, Ayres et al., 2010). Eingeschränkte Verfügbarkeit des autogenen Knochenmaterials, mögliche Kontaminationen des allogenen Spendermaterials bzw. Immunreaktionen auf dieses,

beschleunigt die Suche nach neuen Ersatzmaterialien (Boudriot et al., 2006). Darüber hinaus wird bereits eine große Anzahl von alloplastischen Knochenersatzmaterialien in der Orthopädie verwendet (Moore et al., 2001).

Zu diesen synthetischen Knochenersatzmaterialien gehören synthetische und natürliche Polymere, Keramik, Metalle und Komposite, d.h. Verbundstoffe aus verschiedenen Einzelkomponenten (Khan et al., 2008, Chen et al., 2007, Chan et al., 2009).

Keramik wie Calciumsulfat, Calciumphosphat, β -Tricalciumphosphat und Hydroxylapatit kommen hierbei sehr häufig zum Einsatz (Sen and Miclau, 2007, Damien and Parsons, 1991, Klawitter and Weinstein, 1974, Rodríguez-Lorenzo and Ferreira, 2004, Coetzee, 1980). Sie werden oft als Füllstoff benutzt, haben osteokonduktive Eigenschaften und sind biokompatibel (Sen and Miclau, 2007, Helm, 2005, Jarcho, 1981, Matsumine et al., 2004). Ein Nachteil sind die fehlenden osteoinduktiven und osteogenen Eigenschaften (Loty et al., 2000). Zu den keramischen Stoffen gehört außerdem noch bioaktives Glas, das eine chemische Bindung zum Knochen aufbauen kann und meist als Komposit verwendet wird (Khan et al., 2008, Peltola et al., 2000, Hench and Wilson, 1984). Ein weiteres Konzept in der Behandlung von Knochendefekten war die Einführung von auf Calciumphosphaten basierenden Zementen, die im Knochendefekt aushärten und sich gut an die Defektstruktur anpassen (Friedman et al., 2000, Constantz et al., 1995).

Zusätzlich werden Metalle als Implantate in der Orthopädie und Kieferchirurgie zur Osteosynthese und als Träger für Wachstumsfaktoren verwendet. Hier kommen Legierungen bzw. amorphe Verbindungen aus Schwermetallen zum Einsatz (Chen et al., 2007, Du et al., 2005, Miller et al., 2001, Yao et al., 1997).

Die dritte große Gruppe der Knochenersatzmaterialien, die Polymere, können je nach Zusammensetzung ganz verschiedene physikochemische und mechanische Eigenschaften haben. So gibt es natürliche Polymere wie Kollagen, Hyaluronsäure und Chitosan und synthetische wie Polyanhydride, Polypropylenfumarat, Polycaprolacton, Polyphosphazene, Polylactide und Polyglykolide (Khan et al., 2008, Ayres et al., 2010, Chan et al., 2009, El-Amin et al., 2003, Liu and Ma, 2004).

Poly lactide (PLA), Polyglycolide (PGA) und deren Copolymer Poly-lactide-co-glycolid (PLGA) gehören zu den Polyhydroxysäuren und sind die am meisten benutzten synthetischen Polymere für die synthetische Herstellung von Knochengewebe (Liu and Ma, 2004).

Ein Nachteil der synthetischen Polymerstoffe ist, dass sie wenig biologische Erkennung auf ihrer Oberfläche besitzen (Liu and Ma, 2004). Darüber hinaus stellen hydrophobe Polymere keine ideale Umgebung für Zellinteraktionen dar (Mikos et al., 1994).

Neue Ansätze kombinieren artifizielle Knochenersatzmaterialien mit autogenem Gewebe (Kübler et al., 2004) oder Wachstumsfaktoren (Schmidmaier et al., 2008, Giannoudis et al., 2007b). So kommt bei der Bildung von synthetischem Knochenersatzmaterial dem Tissue Engineering eine immer größer werdende Bedeutung zu (Jabbarzadeh et al., 2008). Voraussetzung für das Tissue Engineering ist die Herstellung eines dreidimensionalen Konstrukts, das mit Zellen kultiviert und mit Wachstumsfaktoren versetzt wird (siehe Abb.1.) (Hutmacher and Cool, 2007, Schmidt-Rohlfing et al., 2009).

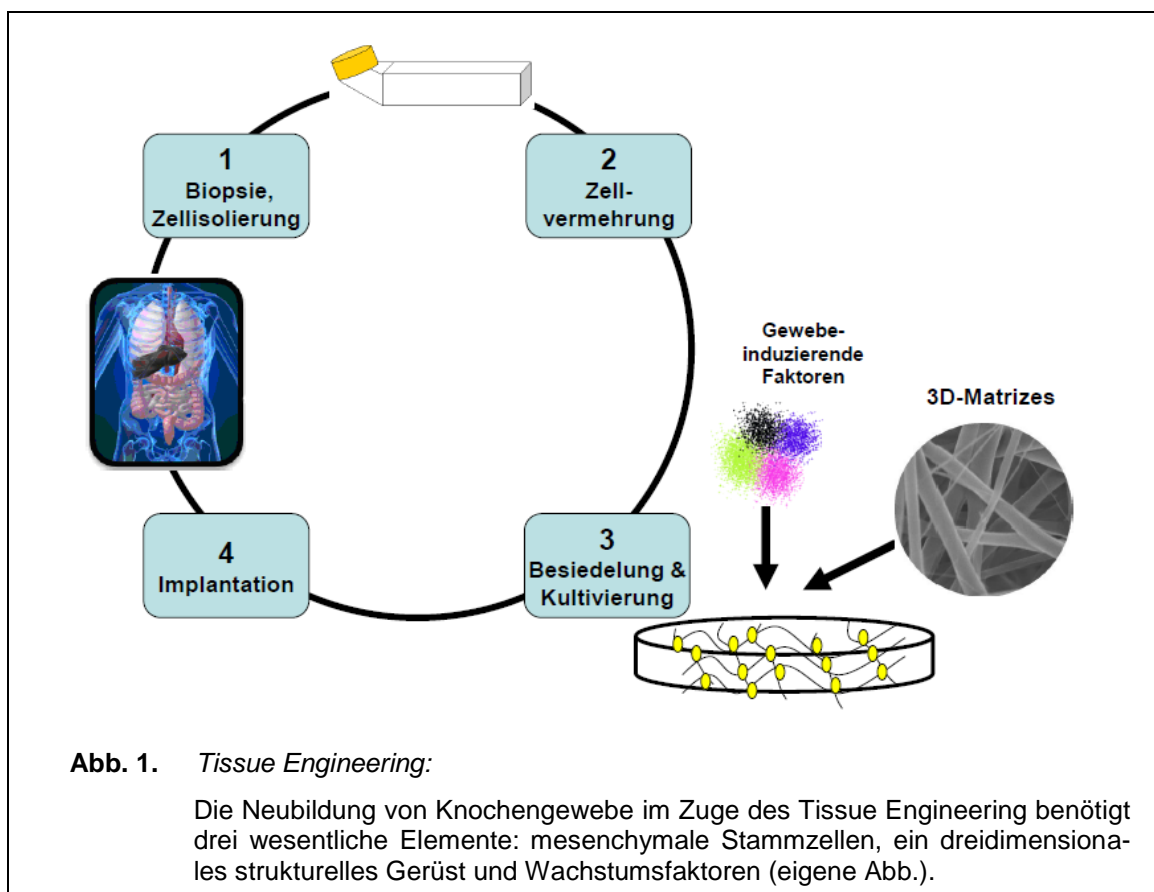


Abb. 1. Tissue Engineering:

Die Neubildung von Knochengewebe im Zuge des Tissue Engineering benötigt drei wesentliche Elemente: mesenchymale Stammzellen, ein dreidimensionales strukturelles Gerüst und Wachstumsfaktoren (eigene Abb.).

Man konzentriert sich darauf, die Adhäsion, das Wachstum und die Funktion der Zellen zu unterstützen, indem man z.B. die Interaktion zwischen der extrazellulären Matrix und Rezeptoren an der Zelloberfläche imitiert, wodurch es zu Differenzierung, Proliferation und Migration der Zellen kommt (Hutmacher and Cool, 2007). Wichtige Aufgaben haben hier die Integrin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und Heparinproteoglykane (Cool and Nurcombe, 2006).

Aber auch Wachstumsfaktoren oder biologische Moleküle nehmen beim Tissue Engineering eine große Rolle ein (Carson and Bostrom, 2007, Drosse et al., 2008, Rosen, 2009). BMP-2 und BMP-7 werden bereits in der Klinik zur Frakturheilung benutzt (Axelrad et al., 2007, Axelrad and Einhorn, 2009). Wichtig ist es hier, geeignete Trägermaterialien zu finden, die eine komplette biologische Aktivität und einen geregelten Release der Wachstumsfaktoren ermöglichen (Hutmacher and Cool, 2007, Hosseinkhani et al., 2007). Um die kurze Halbwertszeit von BMP-2 zu unterdrücken, wurde schon in anderen Studien versucht, die Freisetzung von BMP-2 aus verschiedenen Polymerträgern zu kontrollieren (Hosseinkhani et al., 2007). Auch das Einbringen von BMP-2 in Scaffolds aus dem Polymer PLLA wurde untersucht, wobei ein bioaktiver Effekt des Wachstumsfaktors nachgewiesen werden konnte (Schofer et al., 2008).

Zu weiteren Verbesserungen des Tissue Engineerings und somit der Knochenheilung haben nanotechnologische Fortschritte geführt (Harvey et al., 2010). So ermöglicht z.B. die Methode des Elektrosplinnings, die Herstellung von Fasern für das Tissue Engineering im Nanobereich (Greiner and Wendorff, 2007). Diese meist aus Polymerstoffen hergestellten Nanofaserscaffolds mimen die extrazelluläre Matrix (Liao et al., 2006), sind adhäsiv für Zellen und fördern somit die Proliferation (Chan et al., 2009, Zhang and Lim, 2008) und Differenzierung (Boudriot et al., 2006). Hier spielt die Porosität eine wichtige Rolle (Zhang et al., 2007). Die Fasern haben ein großes Volumenoberflächenverhältnis, was durch eine vermehrte Porosität noch erhöht wird (Lin et al., 2010). Außerdem beeinflusst die Porosität die Zellinfiltration in das Scaffold (Leong et al., 2009).

In vorangegangenen Arbeiten konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass Nanofaserscaffolds aus dem Polymer PLLA zwar mit Stammzellen kultiviert werden können, aber es eher zu einer Downregulation der Gene für die Differenzierung zu Osteoblasten kommt (Schofer et al., 2009b). Dies kann

z.B. durch eine Plasmabehandlung verbessert werden (Neff et al., 1998). Benutzt man ausschließlich Kollagen als Polymer, hat man den Nachteil, dass die hergestellten Fasern mit der Luftfeuchtigkeit reagieren und dadurch sehr instabil sind, trotzdem aber die Differenzierung eher fördern als PLLA (Schofer et al., 2009c). Die Herstellung eines Kollagen-PLLA-Blend konnte die Stabilität für hMSC verbessern (Schofer et al., 2009b). Außerdem wurden die PLLA-Fasern mit RGD-Sequenzen gekoppelt, über die Kollagen in der Lage ist, mit der Integrin-Familie zu interagieren, wobei auch hier ein positiver Effekt gezeigt werden konnte (Schofer et al., 2009a, Paletta et al., 2009a).

1.2. Das Elektrosponnen

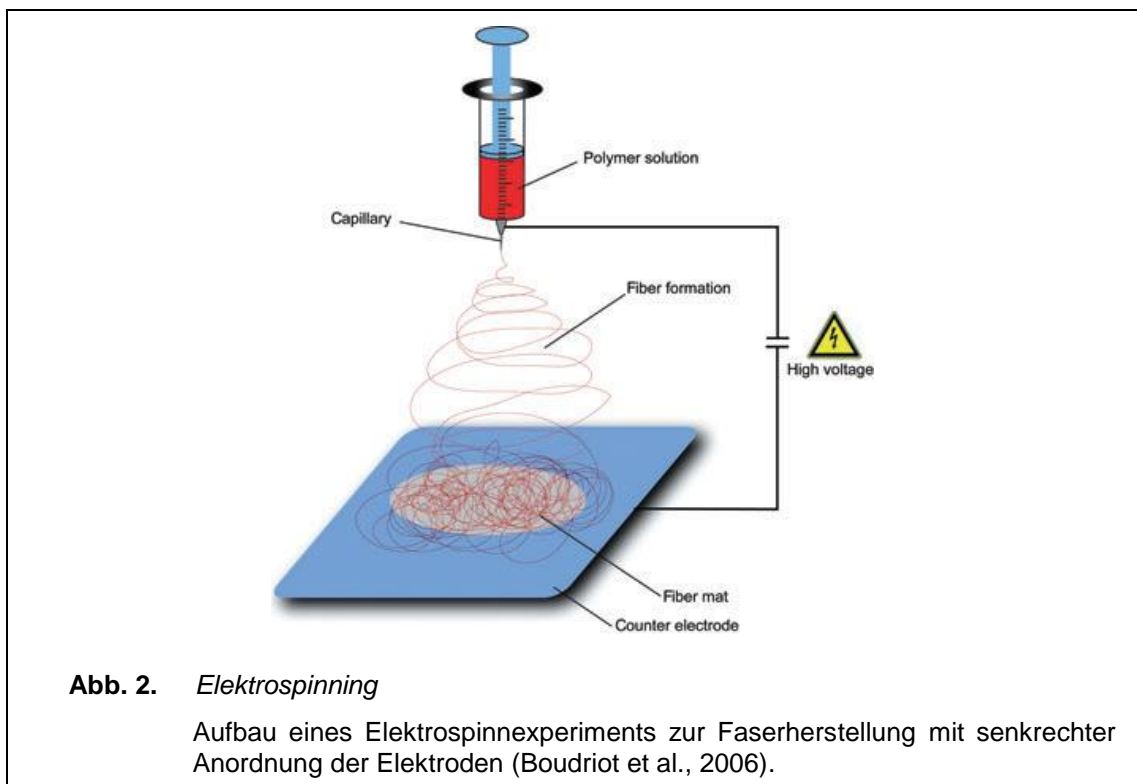
Die Herstellung von Nanofasern mittels des Elektrosponnens hat zu großen Fortschritten im Tissue Engineering, aber auch in technischen Bereichen geführt (Greiner and Wendorff, 2007, Boudriot et al., 2006, Dersch et al., 2003). Es werden Fasern mit Durchmessern im Bereich zwischen <10 nm bis etwa 1µm hergestellt (Boudriot et al., 2004, Hohman et al., 2001a, Greiner and Wendorff, 2007, Reneker and Chun, 1996). Für das Elektrosponnen können synthetische und organische Polymere verwendet werden, wobei als Lösungsmittel Wasser, organische Lösungsmittel aber auch der geschmolzene Zustand des Polymers verwendet werden kann (Boudriot et al., 2006, Greiner and Wendorff, 2007). Aber auch Fasern aus Metallen und Keramiken sind realisierbar (Li et al., 2003, Vander Wal et al., 2001). Der Spinnprozess ermöglicht außerdem das Einfügen von funktionellen Stoffen in die Faserstruktur, wie z.B. Farbstoffe, Wachstumsfaktoren, Enzyme, Medikamente (z.B. Antibiotika) und leitende oder magnetische Teilchen (Boudriot et al., 2006, Greiner and Wendorff, 2007). Koaxiale Fasern mit einem Kern und einer Hülle (McCann et al., 2006), nebeneinander liegende Strukturen (Lin et al., 2005) und kombinierte Fasern aus mehr als einem Polymer (Dosunmu et al., 2006) können hergestellt werden.

Weitere Möglichkeiten für die Herstellung von Nanofasern stellen das Self-Assembly (Fields et al., 1998, Hartgerink et al., 2001), die Phasenseparation

(Vasita and Katti, 2006, Ma and Zhang, 1999, Ayres et al., 2010) und die Kohlenstoffdioxidlasermethode dar (Suzuki and Tanizawa, 2009).

Obwohl die Originalmethode des Elektrospinprozesses 1934 veröffentlicht wurde, wurde die Technik erst 60 Jahre später etabliert (Reneker and Chun, 1996).

Beim Elektrospinning wird ein starkes elektrisches Feld erzeugt, in dem die Polymerlösung durch eine dünne Düse geschleust wird, die als Elektrode fungiert und tropfenweise Polymer abgibt, welches zu der Gegenelektrode geleitet wird (Boudriot et al., 2006, Li and Xia, 2004, Dzenis, 2004, Dersch et al., 2003). Der Nadel- bzw. Düsendurchmesser beträgt ca. 100 μm und der Abstand zwischen beiden Elektroden ca. 10-25 cm (Greiner and Wendorff, 2007). Die angelegte Hochspannung bewirkt eine konusförmige Verformung des Tropfens in Richtung auf die Gegenelektrode (Greiner and Wendorff, 2007, Rutledge and Fridrikh, 2007).



Ab einer gewissen Spannung überwiegt das Ladungsungleichgewicht gegenüber der Oberflächenspannung der Polymerlösung und es kommt zur Bildung

eines feinen, geladenen Flüssigkeitsstrahls („Jet“), der zum Boden geleitet wird, auf dem sich die dünnen Fasern ablegen (Liu and Ma, 2004). Das Lösungsmittel verdunstet und die entstandenen Fasern werden als ungeordnete bzw. ungewebte (Leong et al., 2009) Fasermatte abgeschieden (siehe Abb. 2.) (Boudriot et al., 2004, Bognitzki et al., 2001).

Es gibt verschiedene Faktoren, die die Gestalt des Scaffolds und der Fasern beeinflussen können, wie z.B. die Konzentration und Leitfähigkeit der Lösung und die Geschwindigkeit, mit der die Polymerflüssigkeit aus der Spritze fließt (Boudriot et al., 2006, Ayres et al., 2010). So nimmt die Dicke der Fasern mit steigender Konzentration und Vorschubgeschwindigkeit der Polymerflüssigkeit zu und bei steigender Leitfähigkeit ab (Boudriot et al., 2006). Weitere beeinflussende Faktoren sind z.B. Polymereigenschaften wie das Molekulargewicht, die Molekulargewichtsverteilung, der Glaspunkt oder die Löslichkeit sowie auch die Viskosität und Viskoelastizität, die Oberflächenspannung, der Dampfdruck des Lösungsmittels (Greiner and Wendorff, 2007) und die relative Feuchtigkeit der Umgebung (Casper et al., 2004). Ebenfalls eine große Rolle spielen die Eigenschaften des Substrats, die Feldstärke und Elektrodengeometrien und damit die Form des elektrischen Feldes, was zu verschiedenen Ablagerungen der Fasern führt (Greiner and Wendorff, 2007, Li et al., 2003, Dersch et al., 2003, Theron et al., 2001).

Drei Instabilitätsprozesse spielen beim Spinnvorgang eine Rolle: die Rayleigh Instabilität, die durch das elektrische Feld induzierte axisymmetrische Instabilität und die Biegeinstabilität (Whipping instability) (Hohman et al., 2001a, Hohman et al., 2001b, Shin et al., 2001). Nanofasern mit Beads werden durch die Rayleigh Instabilität von ungeladenen Lösungsmitteln vermehrt gebildet (Hohman et al., 2001a, Hohman et al., 2001b). Auch die ladungsgetriebene axisymmetrische Instabilität führt zu dieser Tropfenbildung (Greiner and Wendorff, 2007).

1.3. Stammzellendifferenzierung

Auf Stammzellen basierendes Tissue Engineering eröffnet neben den nanotechnologischen Fortschritten neue Möglichkeiten für die Knochendefektheilung

(Muschler et al., 2004, Tseng et al., 2008). Als Stammzellen werden alle nicht spezialisierten Körperzellen bezeichnet, die die Fähigkeit besitzen, sich in verschiedenartige Zelltypen zu entwickeln. Stammzellen sind die Quelle für alle neuen Gewebe und werden durch chemische und physikalische Signale beeinflusst, wodurch es zur Aktivierung, Proliferation, Migration, Differenzierung und zum Überleben kommt. Eine weitere Eigenschaft ist die Selbsterneuerung (Potten and Loeffler, 1990, Owen and Friedenstein, 1988, Cancedda et al., 2003, Derubeis and Cancedda, 2004, Morrison et al., 1997, Muschler et al., 2004, Caplan, 2005, Lajtha, 1967). Mesenchymale Stammzellen gehören zu den adulten Stammzellen, sind multipotent und befinden sich hauptsächlich im Knochenmark, außerdem in Periost, Muskelgewebe, Synovia, Placenta, Haut und im peripheren Blut (Tseng et al., 2008, Jiang et al., 2002, Freitas and Dalmau, 2006, Caplan, 2005). Zu den adulten Stammzellen gehören außerdem noch die hämatopoetischen Zellen, die den größten Anteil im Knochenmark ausmachen (Till and McCulloch, 1961, Spangrude et al., 1988).

1974 machte Friedenstein das erste Mal auf die von der Blutbildung unabhängige Population mesenchymaler Vorläuferzellen im Knochenmark aufmerksam (Friedenstein et al., 1974). Später charakterisierte er sie als fibroblastäre Vorläuferzellen, die flächenadhärent sind, die Eigenschaft zur klonalen Proliferation besitzen und eine spindelförmige Morphologie aufzeigen (Friedenstein et al., 1976). Mesenchymale Stammzellen sind leicht zu isolieren und in der Lage, sich zu Osteoblasten, Chondrozyten, Muskelzellen, Sehnenzellen und Adipozyten zu differenzieren (Mastrogiacomo et al., 2005, Barbagallo et al., 2009, Kraus and Kirker-Head, 2006, Chan et al., 2009, Marie and Fromigué, 2006, Jaiswal et al., 1997, Pittenger et al., 1999). Sie differenzieren sich durch die Anwesenheit von Ascorbinsäure-2-phosphat, β -Glycerolphosphat und Dexamethason zu Osteoblasten und sezernieren und organisieren die ECM, in der Calciumphosphat als Hydroxyapatitkristalle abgelagert wird (Bruder et al., 1997, Jaiswal et al., 1997). Auch BMP hat einen differenzierenden Effekt auf die hMSC (Jørgensen et al., 2004, Koch et al., 2005). Es kommt durch dessen Zugabe zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen und der Expression von Genen, die wichtig für die Osteogenese sind wie Kollagen, Osteocalcin, Osteopontin und alkalische Phosphatase (Jaiswal et al., 2000, Doi et al., 2002).

1.4. BMP – Bone morphogenetic Protein

Ein weiterer Fortschritt bei der Knochendefektheilung ist neben dem Einsatz adulter Stammzellen und der Verwendung von Nanofasercscaffolds der Einsatz von Wachstumsfaktoren, insbesondere von BMP. BMPs sind multifunktionale Wachstumsfaktoren, die zu der Gruppe der TGF β (Transforming Growth Factor) gehören (Wozney et al., 1988, Saito et al., 2008, Rankin et al., 2000, Cheng et al., 2003a).

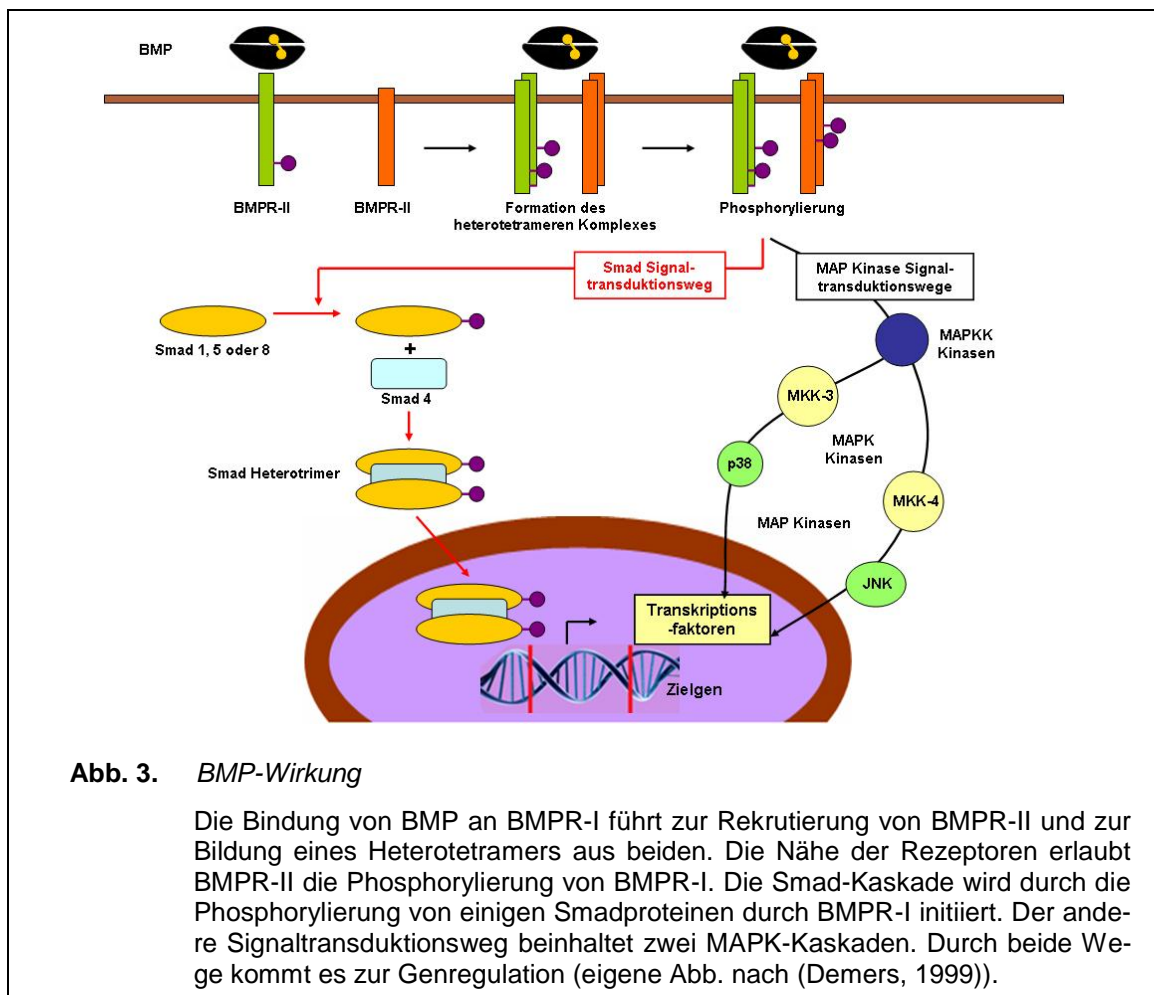
1965 wurde zum ersten Mal der Effekt von Knochenwachstum anregenden Stoffen gezeigt (Urist, 1965). 1971 wurde nachgewiesen, dass es sich dabei um Proteine handelt, die seitdem Bone morphogenetic Proteins genannt werden (Urist and Strates, 1971). 1988 konnten sie zum ersten Mal isoliert und ihre Aminosäuresequenz analysiert werden (Wang et al., 1988).

Verschiedene Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten wie Runx2, Dlx5, Osterix, Msx2 und AJ18 werden durch Bone morphogenetic Proteine stimuliert (Cheng et al., 2003b, Komori et al., 1997, Nakashima et al., 2002, Lee et al., 2003, Liu et al., 2007, Kato et al., 2009). Besonders BMP-2 wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht und dessen entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten nachgewiesen (Wozney et al., 1988). Ein Mausversuch konnte z.B. zeigen, dass bei Mäusen, die nicht in der Lage waren, BMP-2 zu exprimieren, Heilungsstörungen von Frakturen auftraten (Rosen, 2009, Chandler et al., 2007, Tsuji et al., 2006).

Alle BMP-Signale werden durch Serin/Threonin-Kinasen vermittelt, wobei es zwei Rezeptoren gibt, Type I Rezeptoren (BMPRI) und Type II Rezeptoren (BMPRII) (Schwappacher et al., 2009, Rosen, 2009). BMPRI wird noch einmal eingeteilt in ActRIa (Alk2), BMPRI-IA (ALK3) und BMPRI-IB (ALK6) und BMPRII in BMPRII und die Activin Receptor Typen IIA und IIB (ActRIIA und ActRIIB) (Tsuchida et al., 2008, Miyazono et al., 2005). Ligandenbindung an die Rezeptoren führt zur deren Phosphorylierung und somit zur Phosphorylierung und Aktivierung von R-SMADs 1/5/8 (Nohe et al., 2002). Der aktivierte BMPRII phosphoryliert hierbei BMPRI, der daraufhin R-SMAD 1/5/8 phosphoryliert und somit aktiviert (Rosen, 2009, Shi and Massagué, 2003, Feng and Derynck, 2005).

Es kommt zu einer Interaktion zwischen R-Smad 1/5/8 und co-Smad4, wodurch es zur Translokation in den Zellkern und somit zur Genexpression BMP spezifischer Gene kommt (siehe Abb.3.) (Feng and Derynck, 2005, Shi and Massagué, 2003, Rosen, 2009).

Smad-Proteine spielen folglich eine zentrale Rolle beim BMP-Signaltransduktionsweg und bei der Osteoblastendifferenzierung (Cao and Chen, 2005). So konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Smad-1 und Smad-5 die Expression von COX-2 und Typ X Kollagen in Osteoblasten und Chondrozyten anregen (Chikazu et al., 2002). Außerdem aktiviert Smad-1 direkt die Expression von Osteopontin, was ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Osteoblasten spielt (Liu et al., 2004).



BMPs aktivieren außerdem neben dem Smad-Signaltransduktionsweg die Signaltransduktionswege der MAP-Kinase (mitogenactivated protein kinase) (siehe

Abb. 3.) (Reilly et al., 2005, Ryoo et al., 2006). Der MAPK-Signaltransduktionsweg führt über verschiedene Signale zu Zellwachstum, Differenzierung und zum programmierten Zelltod (Pearson et al., 2001, Brewster et al., 1993, Han et al., 1994, Rouse et al., 1994).

Die MAP-Kinase Familie gehört zu den Serin/Threonin Protein Kinasen. Zu den MAP-Kinasen gehören die ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase), die (c-Jun-N-terminale) JNK und die p38 MAP-Kinase (Ryoo et al., 2006, Pearson et al., 2001). Alle Kinasen translozieren nach Aktivierung durch BMP in den Zellkern, wo sie ATF2, c-Jun oder c-Fos aktivieren, um BMP-Zielgene zu regulieren, wie Osteopontin, Alkalische Phosphatase (ALP) oder Kollagen I (siehe Abb. 3.) (Lai and Cheng, 2002).

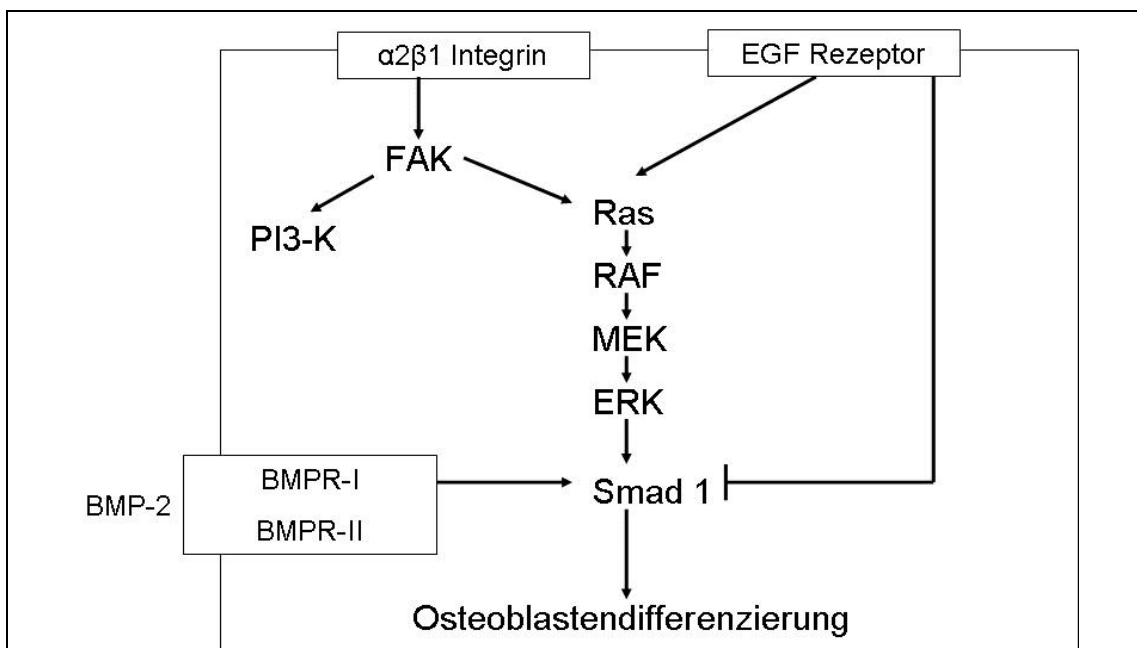


Abb. 4. *Signaltransduktion*

Die Abbildung zeigt eine schematische Illustration des Cross-talks zwischen intrazellulären Signaltransduktionswegen der Osteoblastendifferenzierung. BMP-2 bindet an die BMP-Rezeptoren (BMPR-I and BMPR-II) und aktiviert Smad1, einen essentiellen Transkriptionsfaktor für die Osteoblastendifferenzierung. Kollagen bindet an $\alpha 2\beta 1$ -Integrin um FAK zu aktivieren, das verschiedene Signalmoleküle aktiviert (Ras, PI3-K). Der Ras-ERK-Signaltransduktionsweg wird außerdem durch EGF stimuliert (eigene Abb. nach (Suzawa et al., 2002)).

ERK spielt zusätzlich eine spezielle Rolle bei der Osteoblastendifferenzierung in Verbindung mit der Integrin-vermittelten Zellmatrixinteraktion (siehe Abb. 4.)

(Suzawa et al., 2002). Nach Aktivierung einer Tyrosinkinase durch einen Wachstumsfaktor, erfolgt der Austausch GDP durch GTP an Ras, einem G-Protein (McCormick, 1993). Ras bindet an RAF (Serin-Threonin-Kinase) (McCormick, 1993, Moodie and Wolfman, 1994), was daraufhin MEK (MAPK/ERK Kinase) aktiviert (Schaeffer and Weber, 1999). Dieses wiederum aktiviert ERK (Dhanasekaran and Premkumar Reddy, 1998). Der Ablauf des Ras/MAPK -Transduktionsweges bis hin zur Osteoblastendifferenzierung erfolgt letztendlich über SMAD-1 (Yue and Mulder, 2000, Shim et al., 2009). In Froschembryonen konnte gezeigt werden, dass BMP-2 an einen BMP-Rezeptorkomplex bindet und es dadurch zu drei Phosphorylierungen in SMAD-1 kommt (Rosen, 2009, Fuentealba et al., 2007). Die erste Phosphorylierung, ausgelöst durch BMPR1 (Alks), resultiert in einer Aktivierung des BMP-Signals und ist notwendig für die anschließende Phosphorylierung durch die MAPK und schließlich durch die GSK3 β , die zum protosomalen Abbau von SMAD-1 und somit zum Ende des BMP-Signals führt (siehe Abb. 4.) (Rosen, 2009, Fuentealba et al., 2007).

1.4.1. Extrazelluläre Matrix, Integrinstoffwechsel und BMP-2-Integrin-Crosstalk

Extrazelluläre Matrixproteine (ECM) spielen neben den Wachstumsfaktoren zusätzlich eine große Rolle bei der Knochenentwicklung (Lai and Cheng, 2005). ECMs und ihre heterodimeren transmembranen Integrin-Rezeptoren aktivieren Signalkaskaden, die zum Zellüberleben, zur Proliferation und Differenzierung führen (Hynes, 2002). Kollagen I ist das am häufigsten vorkommende Protein in der ECM (Rodríguez et al., 2000). Die Produktion von Kollagen Typ 1 ist einer der ersten Schritte der Stammzellen, gefolgt von der Expression von Alkalischer Phosphatase und Osteocalcin (Stein and Lian, 1993, Salaszyk et al., 2004). Osteoblasten benötigen Kollagen Typ I für ihre Differenzierung (Takeuchi et al., 1996). Es wurde gezeigt, dass die Expression von Kollagen Typ 1 von hMSC, die aus Osteoporosepatienten isoliert wurden, vermindert war (Rodríguez et al., 2000).

ECMs docken an Integrin-Rezeptoren von Zellen an und aktivieren auf diese Weise Signaltransduktionswege, Genexpression, Zytoskelett- und Zellmorphologie (Salasznyk et al., 2004, Lai and Cheng, 2005, Schwartz and Ginsberg, 2002). So wurde nachgewiesen, dass Kollagen Typ 1 an $\alpha 2\beta 1$ -Integrin andockt, wodurch es durch die Aktivierung von fokalen Adhensionskinasen (FAK) zur Zelldifferenzierung, aber Herunterregulation von TGF β kommt (siehe Abb. 4.) (Takeuchi et al., 1997, Meyers et al., 2004). Kollagen I erhöht über diese Aktivierung der Integrine die Produktion von Aktin und ERK und die Aktivierung des ERK/PI3K Signaltransduktionsweges (Tsai et al., 2010). ERK aktiviert dabei die Osteoblastendifferenzierung (Lai et al., 2001) über Smad1 und somit den Transkriptionsfaktor Runx2 (siehe Abb. 4.) (Xiao et al., 2000).

Es sind über 20 verschiedene Integrin-Rezeptoren bekannt, die wiederum an 20 unterschiedliche extrazelluläre Matrixproteine binden und dadurch 6 intrazelluläre Signalmoleküle aktivieren (Protein Tyrosin Kinasen, Serine/Threonin Kinasen, Lipid Kinasen, Lipid Phosphatasen, Protein Phosphatasen, und intrazellulärer Ionenfluss) (Schwartz and Ginsberg, 2002).

Neben den Integrinen gibt es noch weitere Adhäsionsmoleküle, die wichtig für die Osteoblastendifferenzierung sind (Anselme, 2000): Die Cadherine sorgen für Zell-Zell-Kontakte und die Expression von Cadherin 4 wird durch BMP-2 moduliert (Cheng et al., 1998).

BMP-2 zeigt ebenfalls einen positiven Effekt auf die Interaktion zwischen den ECM und der Zelloberfläche. So wurde gezeigt, dass das Kollagen-Integrin-Signal mit BMP-2 kooperiert, um die Osteoblastendifferenzierung zu verstärken. Anscheinend laufen beide Signaltransduktionswege beim MAPK-Signaltransduktionsweg zusammen (siehe Abb. 4.) (Xiao et al., 2002, Ronzière et al., 2005). Außerdem werden die $\alpha\beta$ -Integrine auf den Osteoblasten durch BMP-2 erhöht und reguliert (Jikko et al., 1999, Lai and Cheng, 2005). Diese Integrine wiederum beeinflussen die BMP-2-Funktion in Osteoblasten (Lai and Cheng, 2005). Es wurde festgestellt, dass Signale der BMP-Familie ECM-Integrin-Signale modulieren, so dass es zu Zellmigration, Formation von Fokalkontakten (Focal Adhesion) und Phosphorylierung von FAK kommt (Sotobori et al., 2006, Tamura et al., 2001). Phosphoryliertes FAK aktiviert über verschiedene Signaltransduktionswege via RAS die MAPK, also auch die ERK und ver-

stärkt dadurch ebenfalls über Smad 1 die Zelldifferenzierung (Schlaepfer et al., 1994, Suzawa et al., 2002). Es besteht folglich ein Crosstalk zwischen dem BMP-2- und dem Integrin-Signal.

1.5. Ziel der Arbeit

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass sich auf PLLA basierende Nanofasern sowohl durch BMP-2 als auch durch Kollagen funktionalisieren lassen. Um die positiven Eigenschaften von PLLA, Kollagen und BMP-2 zu kombinieren, soll nun in dieser Arbeit ein PLLA-Koll1-BMP-2-Scaffold hergestellt und charakterisiert werden. Anschließend werden hMSC auf solchen Scaffolds über einen Zeitraum von 22 Tagen kultiviert, die Expression von Markern der Osteogenese mittels real time PCR und Fluoreszenzmikroskopie analysiert und mit entsprechenden Kontrollen verglichen. Außerdem werden die beteiligten Signaltransduktionswege und die Expression der entsprechenden Gene untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Materialien und Geräte

Gerätename/Material	Firma
Fluoreszenzmikroskop Leica DM5000	Leica, Bensheim
Lichtmikroskop	Leica, Bensheim
Mastercycler realplex	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer accu-jet	Brand, Wertheim
GPKR Untertischzentrifuge	Beckmann, München
Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau
Autoklav	Biomedis, Gießen
Brutschrank	Heraeus, Kendro, Hanau
Laborwaage	Kern, Balingen-Frommern
Sterilbank	Heraeus, Hanau

Spinnmaschine	Eigenbau
Kapillarfluss-Porometer CFP-1200-AEXL	Porous Materials Inc., USA
inoLab Cond Level 3 Konduktometer	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten Weilheim
Haake PK 100 Scherviskosimeter	Thermo Scientific, Karlsruhe
Tensiometer Modell DCAT 11	Dataphysics, Filderstadt
Elektronenmikroskop S-4100	Hitachi Ltd., Tokyo, Japan
Auto-306 Vakuum System	BOC Edwards, Crawley, Sussex, England
G10 Drop Shape Analysis System	Krüss, Hamburg
Heizblock	Thermo Scientific, Karlsruhe
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Vortex	Heidolph, Schwabach

Tab. 1. *Verwendete Laborgeräte*

Verbrauchsmaterial	Firma
Multischale 12 Well mit Abdeckplatte	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 5ml, 10ml, 25ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Menzel-Gläser	Menzel GmbH, Braunschweig
Deckgläschen rund Ø18mm	Kobe, Marburg
50ml Sterilröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellfilter	BD Biosciences, San Jose, California, USA
Spritzen 1ml	BD Biosciences, San Jose, California, USA
Nadeln 0,45 x 25mm	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen 1ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Latexhandschuhe	Hartmann, Heidenheim
ABgene PCR Plates	Thermo Scientific, Karlsruhe
Reaktionsgefäße farblos 1ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg

Tab. 2. *Verwendete Verbrauchsmaterialien*

Chemikalien	Firma
D-MEM	PAA, Linz Österreich
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
FCS Fetal Bovine Serum	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Ethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Aceton	Sigma Aldrich, Steinheim
Methanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Eselserum	Dianova, Hamburg
Fluoromont	Southern Biotech, Birmingham, USA
Dichlormethan	Sigma Aldrich, Steinheim
HFIP	Sigma Aldrich, Steinheim
PLLA L210	Boeringer, Ingelheim
Kollagen I	Sigma Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ficoll-Paque	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
BMP-2 für Fasern	ReliaTech GmbH, Braunschweig
FITC	Sigma Aldrich, Steinheim
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Merck, Darmstadt
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Primer	TIB Biomol, Berlin
Galwick	Porous Materials Inc., USA

Tab. 3. *Verwendete Chemikalien*

2.1.1. Kits und Antikörper

Kit	Firma
Verso cDNA Kit	Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA
Absolute Blue QPCR Sybr Green Mix	Thermo Fisher Scientific, Lafayette, USA
Peq Gold total RNA Kit	PeqLab, Erlangen

Tab. 4. *Verwendete Kits*

Antikörper	Verdünnung in PBS	Generiert in	Firma
Primärantikörper			
Ki 67 Antikörper	1:75		Darko Cytomation, Hamburg
Kollagen I Antikörper	1:500	Maus	Abcam, Ab6308, Cambridge, U.K.
Anti Osteokalcin	1:30	Kaninchen	Acris, BP710, Hiddenhausen
Anti Smad-5	1:50	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg
Anti-FAK IgG	1:50	Maus	BD Biosciences, San Jose, California, USA
Sekundärantikörper			
Cy-2 Anti Kaninchen IgG	1:100	Esel	Dianova, Hamburg
Cy-3 Anti Maus IgG	1:100	Esel	Dianova, Hamburg
Cy-3 Anti Ziege IgG	1:100	Esel	Dianova, Hamburg
Cy-2 Anti Maus IgG	1:50	Esel	Dianova, Hamburg
Zellkernfärbung			
Dapi	1:20000		Sigma Aldrich, Steinheim

Tab. 5. *Verwendete Antikörper*

2.2. Konstruktion und Charakterisierung der Nanofasern

Die Herstellung, Konstruktion und Charakterisierung der Nanofasern erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Tissue Engineering.

Es wurden drei verschiedene Polymere für das Spinnen der Fasermatten verwendet:

PLLA wurde zu 4% (w/w) in eine DCM-Lösung gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Um den PLLA-Koll1-Blend herzustellen, wurden 0,9 w/v Kollagen und 3,6 w/v PLLA in HFIP gegeben, um ein Verhältnis von 1:4 von Kollagen und PLLA zu gewährleisten und eine 4.5%ige (w/v) Polymerlösung in HFIP herzustellen.

Um nun BMP-2 in den PLLA-Koll1-Blend einzubringen, wurden 25 µg lyophilisiertes BMP-2 in 125 µl 50 mM Essigsäure gelöst und mit einer Zugabe von 25 µl FCS stabilisiert. Diese BMP-2-Lösung wurde zu 2,5 ml PLLA-Koll1-Blend gegeben und um eine Emulsion zu bilden, eine Minute mit Hilfe des Vortex gemischt. Die Lösung war zum Spinnen von ca. 50 Plättchen ausreichend.

Der Spinnvorgang der Fasermatten wurde mit einer Elektrospinn-Apparatur unter der Sterilbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Die Durchflussrate betrug 14 µl/min bei einem Elektrodenabstand von 15 cm und einer angelegten Spannung 20 - 30 kV für die 4%ige PLLA-Lösung. Für die PLLA-Koll1-Blend-Lösung und die BMP-2 enthaltende PLLA-Koll1-Blend-Lösung betrug die Durchflussrate 14 µl/min bei einem Elektrodenabstand von 15 cm und einer angelegten Spannung 10 - 18 kV Die Fasermatten wurden auf sterilisierte Glasplättchen (Ø18mm) aufgesponnen und mit 4%iger PLLA in DCM Lösung auf diesen punktuell verklebt.

In manchen Versuchen wurde BMP-2 durch FITC-gekoppeltes Protein ersetzt, um die Freisetzung aus den Fasern zu untersuchen. Dafür wurde 2,26 mg Fluoresceinisothiocyanat in 2 ml PBS gelöst. Von dieser Lösung wurden dann 40 µl in 0,6 ml Polymerlösung gegeben und mit Hilfe des Vortex gemischt.

2.2.1. Kontaktwinkel

Statische Kontaktwinkel der Fasermatten mit Wasser wurden mit der Sessile-Drop-Methode mit einem G10 Drop Shape Analyse System bestimmt und mit Data Physics Kontaktwinkel Analyse Software ausgewertet.

2.2.2. Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Proben mit einer feinen Goldschicht in einem Auto-306 Vakuum System überzogen und im Elektronenmikroskop bei 5 kV im SE Mode betrachtet.

2.2.3. Porengröße

Für die Bestimmung der Porengröße wurden Fasermatten, wie oben beschrieben, aus PLLA in DCM und PLLA-Koll1-Blend in HFIP gesponnen. Für die Messung wurde ein Kapillarfluss-Porometer Typ CFP-1200-AEXL verwendet. Als Benetzungsflüssigkeit für die Fasermatten wurde Galwick verwendet, das nach Auftragung spontan die Poren füllte. Um die Poren wieder vom Galwick zu reinigen, wurde mit verschiedenem Druck Stickstoff auf die Fasermatten gegeben, bis sich ein Gasfluss durch die Matten einstellte. Die verschiedenen Drücke und Gasdurchflussraten von Stickstoff wurden auf den trockenen und feuchten Fasermatten gemessen. Alle erhaltenen Porengrößen wurden aus den gemessenen Drücken und Gasdurchflussraten errechnet (Jena, 2002). Die Beziehung zwischen der Porengröße und dem entsprechendem Druck ist durch die Young-Laplace-Gleichung gegeben:

$$R = \frac{2\gamma}{\Delta p} \cos \theta \quad (1)$$

R ist der Porenradius, ΔP steht für den verwendeten Gasdruck, γ ist die Oberflächenspannung der verwendeten Benetzungsflüssigkeit Galwick. ($\gamma = 15.9 \times 10^{-5}$ N/cm) und θ ist der Kontaktwinkel. Der Druck, bei dem die erste Blase durch die Matte aufsteigt, ist der Öffnungsdruck für eine Pore (engl. Bubble Point). Der Öffnungsdruck der Pore wurde verwendet, um mit der Gleichung die größte Pore des Scaffolds zu berechnen. Die mittlere Durchflusporengröße wurde aus dem mittleren Durchflussdruck berechnet (Gopal et al., 2007).

2.2.4. Elektrische Leitfähigkeit

Die Messung der Leitfähigkeit erfolgte mit einem inoLab Cond Level 3 Konduktometer. Die Kalibrierung wurde mit einer Kaliumchlorid-Lösung durchgeführt. Für Leitfähigkeiten bis zu 1 μ S/cm wurde eine LR325/001 Messzelle verwendet, während höhere Leitfähigkeiten mit einem TetraCon 325 gemessen wurden.

2.2.5. Viskositätsmessungen

Die Messung der Viskosität erfolgte mittels Rotationsscherviskosimetrie. Dafür wurde ein Haake PK 100 Scherviskosimeter verwendet. Die Scherrate betrug dabei 0 bis 1000 s^{-1} , bei einem Winkel der verwendeten konischen Messplatte, Modell Haake PK 1, von 1° . Die Auswertung erfolgte mittels der dem Gerät zugehörigen Software Rheowin.

2.2.6. Oberflächenspannung

Die Messung der Oberflächenspannung erfolgte bei $23\text{ }^\circ\text{C}$ mit dem Tensiometer Modell DCAT 11 von Dataphysics. Das Gerät besaß eine Wilhelmy-Platte aus Palladium-Iridium-Legierung. Die Auswertung erfolgte mittels der Computer-Software SCAT 12. Zur Messung wurden ca. 40-50 ml der Polymerlösung in ein Gefäß aus Borosilikatglas gegeben. Die Wilhelmy-Platte wurde an der Hochpräzisionswaage des Gerätes montiert und über einen vorprogrammierten Ablauf kurz in die Lösung getaucht. Nach dem Wiegen wurde die Differenz zum Gewicht der Wilhelmy-Platte zeitabhängig in die aus der Oberflächenspannung resultierenden Kräfte umgerechnet. Die für die Messung verwendete Wilhelmy-Platte musste vor jedem Gebrauch durch Ausglühen gereinigt werden.

2.2.7. Release - Freisetzung

Um die Freisetzungskinetik bzw. den Release aus den PLLA-Fasern und dem PLLA-Koll1-Blend zu vergleichen, wurden beide Polymere mit Albumin Dog Fluorescein Isothiocyanat versetzt. Dafür wurde, wie bereits beschrieben, 2,26 mg Fluorescein in 2 ml PBS gelöst. Von dieser Lösung wurden dann $40\text{ }\mu\text{l}$ in 0,6 ml Polymerlösung gegeben und mit Hilfe des Vortex gemischt. Aus beiden Polymerlösungen wurden jeweils drei Fasermatten besponnen, in PBS gegeben und bei 37°C aufbewahrt. Über einen Zeitraum von 20 Tagen wurde immer wieder die PBS-Lösung abgenommen und durch frische ersetzt. Von den gewonnenen Proben wurde die Freisetzung des Fluoresceins mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und UV-Spektroskopie bestimmt.

2.3. hMSC Isolation, Charakterisierung, Kultivierung

Unter Zustimmung der Ethikkommission (Az. 30/06) wurden mesenchymale Stammzellen aus Hüftknochen von Patienten verwendet, die ein künstliches Hüftgelenk bekamen und mit der Verwendung ihrer Stammzellen einverstanden waren. Die OP-Indikation dieser Patienten war eine Arthrose des Hüftgelenks mit zunehmenden Schmerzen, abnehmender Bewegungsfähigkeit und sicheren Arthrosezeichen im Röntgenbild. Die Patienten hatten keine Anzeichen für andere Knochen- oder Autoimmunkrankheiten. Von dem proximalen Femur, der routinemäßig präpariert wurde, um Platz für die Hüftprothese zu schaffen, wurde ein Stück Hüftspongiosa entfernt. Alle nachfolgend beschriebenen Versuche wurden auf einer Sterilbank mit stetigem laminarem Luftstrom durchgeführt. Die Isolierung und Kultivierung der Stammzellen erfolgte nach Pittenger (Pittenger et al., 1999) und zusätzlichen Modifikationen von Brendel (Brendel et al., 2005). Die Spongiosa wurde mit einer Hohlmeißelzange nach Luer in PBS-Lösung zerkleinert. Das Spongiosa-PBS-Gemisch wurde mit einem Zellfilter filtriert und das Spongiosa-Filtrat in ein 50 ml Sterilröhrchen gegeben. In einem weiteren 50ml Falconröhrchen wurde 15 ml Ficoll-Paque vorgelegt. Das Ficoll-Paque wurde vorsichtig mit dem Spongiosa-Filtrat überschichtet und bei 1680 Umdrehungen für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich die mononucleären Zellen als Zellwolke unter dem Zellplasma und über dem Ficoll-Paque und wurden abpipettiert, erneut in PBS-Lösung genommen und bei 1280 Umdrehungen für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 12 ml Medium gelöst und in eine Kulturflasche gegeben. Das Medium für die Zellen war DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Nach 24h kam es zur Adhäsion der Zellen an die Kulturflasche und die Kultur wurde mit PBS gewaschen. Nach ca. 2 Wochen konnte eine 90%ige Konfluenz erreicht werden und die Zellen wurden passagiert, indem das Medium abgenommen und die Kultur mit 10 ml PBS gewaschen wurde. Danach wurde die Kulturflasche mit 2 ml Trypsin bedeckt und 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden durch Abklopfen vom Boden gelöst und nach mikroskopischer Kontrolle zur Neutralisierung des Trypsins frisches Medium hinzugegeben. Diese Lösung wurde dann aus der Kulturflasche abpipettiert, bei 1280

Umdrehungen für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet mit 25 ml Medium aufgelöst und auf 2 neue Kulturflaschen verteilt. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium erneuert. Für die Versuche wurden Zellen bis zur dritten Passage verwendet.

Dass die auf diese Weise isolierten mesenchymalen Stammzellen negativ für CD34 und CD40 und positiv für CD90 und CD105 sind, wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt (Schofer et al., 2009c). Um das osteoinduktive Potential der verwendeten Zellen zu bestätigen, wurde vor den Versuchen eine Geneexpressionsanalyse von alkalischer Phosphatase (AP) in Abhängigkeit von Dexamethason durchgeführt.

Für die Experimente wurden die Zellen mit einer Dichte von 3×10^4 Zellen/cm² auf Deckgläschen mit PLLA-Nanofasern, PLLA-Koll1-Blend-Nanofasern oder PLLA-Koll1-Blend-BMP-Nanofasern unter Wachstumsbedingungen in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin ausgesät. Dafür wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, erneut nach Mediumzugabe zentrifugiert und das Pellet in Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in der Neubauerzellkammer ausgezählt und so mit Medium verdünnt, dass sich 3×10^4 Zellen in 1 ml befanden, der jeweils auf die Deckgläschen gegeben wurde. Für einige Versuche wurde Differenzierungsmedium für die Kultivierung der Zellen verwendet. Dafür wurde auf 500 ml DMEM 50 ml (10%) FCS und 5 ml (1%) P/S und 1,08g (10 mM) β -Glycerolphosphat gegeben. Von dieser Lösung wurden dann 10 ml mit 2 μ l (0.05 mM) Ascorbinsäure-2-phosphat und 1 μ l (0,1 μ M) Dexamethason versetzt (Jaiswal et al., 1997).

Das Medium in den Versuchsreihen wurde jeden 2. Tag gewechselt.

2.4. Genexpressionsanalyse

2.4.1. RNA-Isolierung

RNA wurde an Tag 2, 4, 10 und 22 aus den Proben mittels Peq Gold Total RNA Kit isoliert. Das Medium wurde dafür von den Proben abgesaugt und 400 μ l RNA Lysis Buffer T zu den Proben gegeben. Der Puffer sollte dabei gleichmäßig über die ganze Oberfläche verteilt und auch am Präparat geschabt werden,

um eine möglichst vollständige Lyse der Zellen zu erzielen. Eine Shredder-Säule wurde dann auf ein 2 ml Tube gesteckt, das Lysat aufgeladen und anschließend für eine Minute bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl 70% Ethanol versetzt und durch vortexen gemischt. Dann wurde eine neue Zentrifugensäule (PerfectBind RNA Column) auf ein 2-ml-Tube gesteckt, mit dem Eluat beladen und eine Minute bei 10000 x g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen und die Zentrifugensäule auf ein neues Tube gesteckt. Anschließend wurden 500 µl RNA Wash Buffer I auf die Zentrifugensäule gegeben und für 15 s bei 10000 x g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen und die Zentrifugensäule nun mit RNA Wash Buffers II (Pufferkonzentrat plus 4 Volumen 100 % Ethanol) zum 2. Mal gewaschen und für 15 s bei 10000 x g zentrifugiert und der Säulendurchfluss verworfen. Zum Trocknen wurde das Zentrifugenröhrchen in das geleerte Tube gesteckt und bei 10000 x g 2 Minuten zentrifugiert. Für die Elution wurde das Zentrifugenröhrchen auf ein neues Tube gesteckt, 50 µl RNase freies Wasser darauf pipettiert und eine Minute bei 5000 x g zentrifugiert. Die gewonnene RNA konnte nun weiterverarbeitet oder bei -70°C gelagert werden.

2.4.2. c-DNA-Synthese

Die c-DNA-Synthese erfolgte mit dem Verso™ cDNA Kit. Als Ausgangsmaterial diente die zuvor isolierte RNA. Der Verso™ Enzyme Mix enthält Verso™ Reverse Transkriptase, welche bei hohen Temperaturen aktiviert wird, sehr sensitiv ist und lange cDNA-Stränge bildet. Der Mix enthält außerdem RNase-Hemmer, um die RNA vor ihrem Abbau zu schützen. Als Substrat für die Reverse Transkriptase dient der dNTP-Mix. Der 5xcDNA-Synthese-Puffer verbessert die Wirkung der Reversen Transkriptase. Als Primer für die cDNA-Synthese dienen Oligo-dTs. Der RT-Enhancer hat die Funktion, funktionslose cDNA zu spalten und wird bei 95°C inaktiviert. Als Reaktionsansatz wurden pro Probe 4 µl 5xcDNA Synthese Puffer, 2 µl dNTP Mix, 1 µl Oligo-dT, 1 µl RT Enhancer, 1 µl Verso Enzyme Mix, 3 µl RNase freies Wasser mit 8 µl RNA in einem 0,2ml Tube gemischt und zentrifugiert. Für die cDNA-Synthese kamen die Tubes mit dem Reaktionsmix erst bei 42°C für 30 Minuten und anschließend bei

95°C für 2 Minuten auf den Cycler, wodurch als Endprodukt 20 µl cDNA entstanden. Die gewonnene cDNA konnte nun bei -20°C eingefroren oder für eine PCR verwendet werden.

2.4.3. Quantitative Real-Time-PCR

Als Ausgangsmaterial diente die hergestellte doppelsträngige cDNA, welche in der RT-PCR amplifiziert wird. Zur Durchführung der PCR wurden das Mastercycler ep realplex Detection System und der Absolute Blue QPCR SYBR Green Mix verwendet.

Reaktionsmix	Volumen
Absolute QPCR SYBR Green Mix	12,5 µl
Forward Primer	0,05 µl
Reverse Primer	0,05 µl
RNAse freies Wasser	11 µl
cDNA	1,5 µl
Endvolumen:	25 µl

Tab. 6. *Reaktionsmix*

Der Reaktionsmix und die zu untersuchende cDNA wurden in die PCR-Platten pipettiert, die danach mit einer Folie verschlossen wurde. Anschließend wurde die Platten zentrifugiert und die PCR durchgeführt.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Enzymaktivierung	95°C	15min	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	15s	40 Zyklen
Annealing	54°C	30s	
Extension	72°C	30s	

Tab. 7. *PCR-Programm*

Primer	Primersequenz	
	forward	reverse
18srRNA	CggCTACCAC ATCCAaggAA	gCTggAATTA CCgCggCT
Kollagen 1	CAGCCgCTTC ACCTACAgC	TTTTgTATTCAAT CACTgTCTTgCC
Osteokalcin	gAAgCCCA gCggTgCA	CACTACCTCg CTgCCCTCC
Alkalische Phosphatase	gACCCTTgAC CCCACAAT	gCTCgTACTg CATgTCCCCT
Smad-5	Erhältlich auf realtimeprimers.com	
Smad-2	Erhältlich auf realtimeprimers.com	
Jun	gCgTTagCA TgAgTTggCAC	CgCATgAggA ACCgCATCgC
FAK-2	ACCTCAgCTA gTgACgTATgg	CggAgTCCC AggACACTgTg
CCND-1	ACgAAggTC TgCgCgTgTT	CCgCTggCCA TgAACTACCT

Tab. 8. *Verwendete Primer*

2.5. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Proben nach Mediumabnahme dreimal mit PBS gewaschen und anschließend erst 5 Minuten mit Methanol fixiert, dann eine Minute mit Aceton permeabilisiert. Um unspezifische Bindungsstellen der kultivierten Zellen zu blocken, wurden die Proben für 30 Minuten mit 5%igem Eselserum inkubiert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschvorgang mit PBS wurden die Proben eine Stunde mit den jeweiligen Primärantikörpern (300 µl) inkubiert und anschließend wieder dreimal mit PBS gewaschen. Nun folgte die Visualisierung mittels Cy2- bzw. Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern (siehe Tab. 5.) (300 µl) für eine Stunde. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach Hinzugabe von DAPI für 30 s wurden die Proben erneut dreimal mit PBS gewaschen und mit Fluoromont auf Objektträgern

eingebettet. Als Primärantikörper wurden Antikörper gegen Koll 1, Osteokalzin, FAK, Smad-5 und der Antikörper Ki67 verwendet. Alle Antikörper wurden wie oben in der Chemikalienliste angegeben mit PBS verdünnt (siehe Tab. 5.). Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einer LeicaDM5000. Die Auswertung der Intensitäten wurde mit der Quips Analyse Software durchgeführt.

2.6. Von Kossa, Alizarin

Um die Calciumablagerung der hMSC darstellen zu können, wurden die Plättchen für die von Kossafärbung für eine Stunde in wässrige 1%ige Silbernitratlösung gegeben. Nach mehreren Waschvorgängen mit destilliertem Wasser, erfolgte die Inkubation der Plättchen in 5%iger Natriumthiosulfatlösung.

Für die Alizarinfärbung wurde nach der Fixierung eine 2%ige Alizarinrotlösung bei einem pH von 4,1-4,3 verwendet.

2.7. Statistik

Alle Werte wurden durch den Mittelwert \pm Standardfehler von mindestens drei Patienten dargestellt und durch den T-Test oder ANOVA mit Bonferroni als Post Hoc Test verglichen. Werte mit $p < 0,05$ galten als signifikant und wurden mit einem * markiert.

3. Ergebnis

3.1. Charakterisierung der Lösungen zur Herstellung der Fasern

3.1.1. Leitfähigkeit, Oberflächenspannung und Viskosität

Um die Polymerlösungen zur Herstellung der Fasern zu analysieren, wurden die Leitfähigkeit, die Oberflächenspannung und die Viskosität von PLLA in DCM und dem PLLA-Koll1-Blend bestimmt.

	PLLA in DCM	PLLA-Koll1-Blend in HFIP
Leitfähigkeit bei 22°C	~ 0 $\mu\text{s}/\text{cm}$	~ 4,7 $\mu\text{s}/\text{cm}$
Oberflächenspannung bei 23°C	28,34 \pm 0,03 mN/m	18,33 \pm 0,03 mN/m
Viskosität bei 23°C, 600 1/s [y]	1,561 Pas [η]	1,529 Pas [η]

Tab. 9. Leitfähigkeit, Oberflächenspannung, Viskosität

3.2. Charakterisierung der Nanofasern

3.2.1. Elektronenmikroskopie, Porosität und Kontaktwinkel

Die Elektronenmikroskopie der PLLA-Fasern zeigte ein dreidimensionales, nicht gewebtes Netzwerk mit einem Durchmesser von $0,775 \pm 0,294 \mu\text{m}$. Die Fasern zeigten eine poröse Struktur. Sie hatten einen Kontaktwinkel von $124,6 \pm 5,7^\circ$ (Schofer et al., 2009c).

Die PLLA-Koll1-Blendfasern bildeten in der Elektronenmikroskopie ein dreidimensionales, nicht gewebtes Netzwerk mit einem Durchmesser von $0,421 \pm 0,023 \mu\text{m}$ (siehe Abb. 6.a.). Der Kontaktwinkel betrug hier $51 \pm 8^\circ$ (Schofer et

al., 2009b). Die PLLA-Koll1-Blendfasern zeigten eine sehr glatte Oberfläche. Die Porengröße der resultierenden Scaffolds betrug 2 μm (siehe Abb. 5.a.).

Das Einfügen von BMP-2 in die PLLA-Koll1-Blendfasern reduzierte den Durchmesser auf $0,217 \pm 0,009 \mu\text{m}$ (siehe Abb. 6.b.). Auch die Porengröße wurde kleiner (ca. 0,6 μm) (siehe Abb. 5.b.).

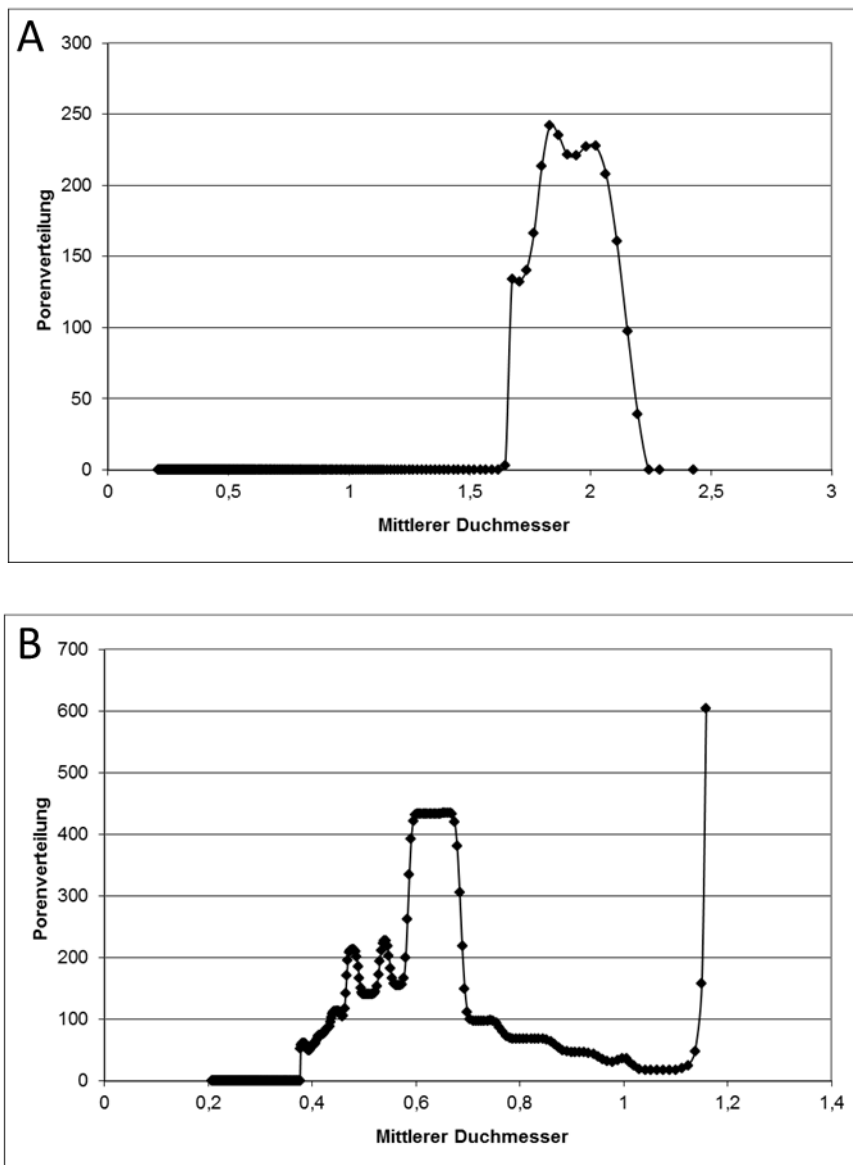


Abb. 5. Porenverteilung

Porenverteilung von PLLA-Koll1-Blend-Fasern (a) und PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern (b).

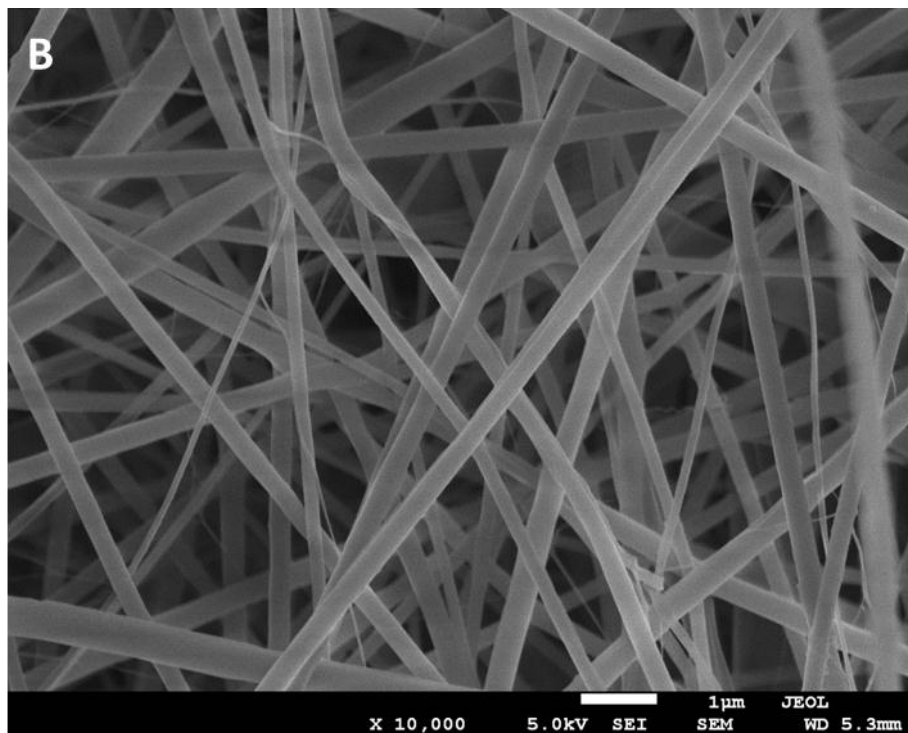
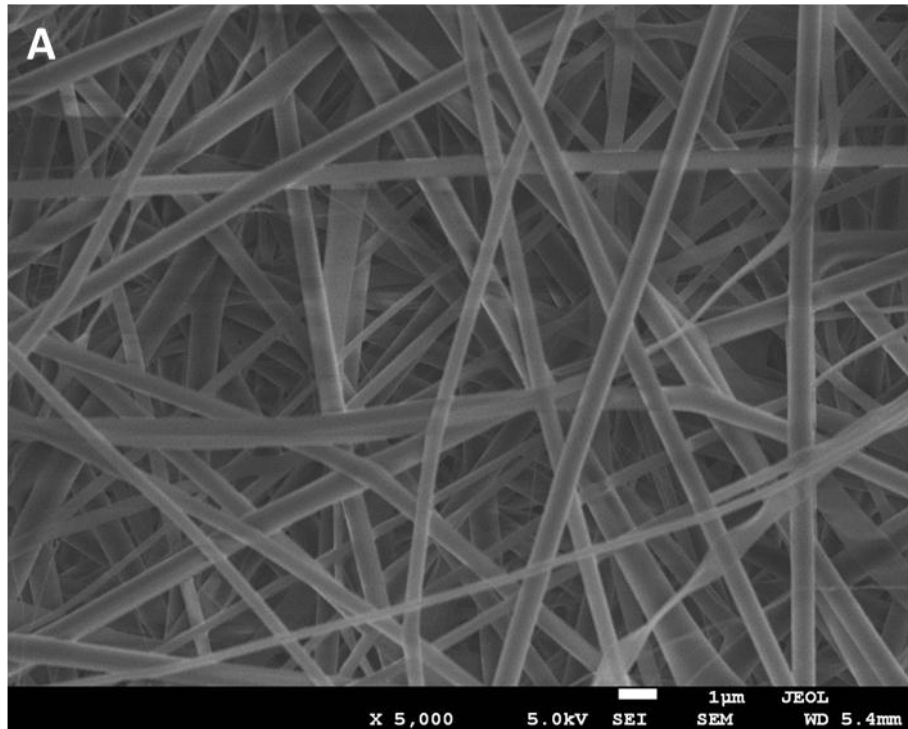


Abb. 6. SEM-Analyse

SEM-Analyse von PLLA-Koll1-Blend-Fasern (a) und PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern (b).

3.2.2. Release - Freisetzungskinetik

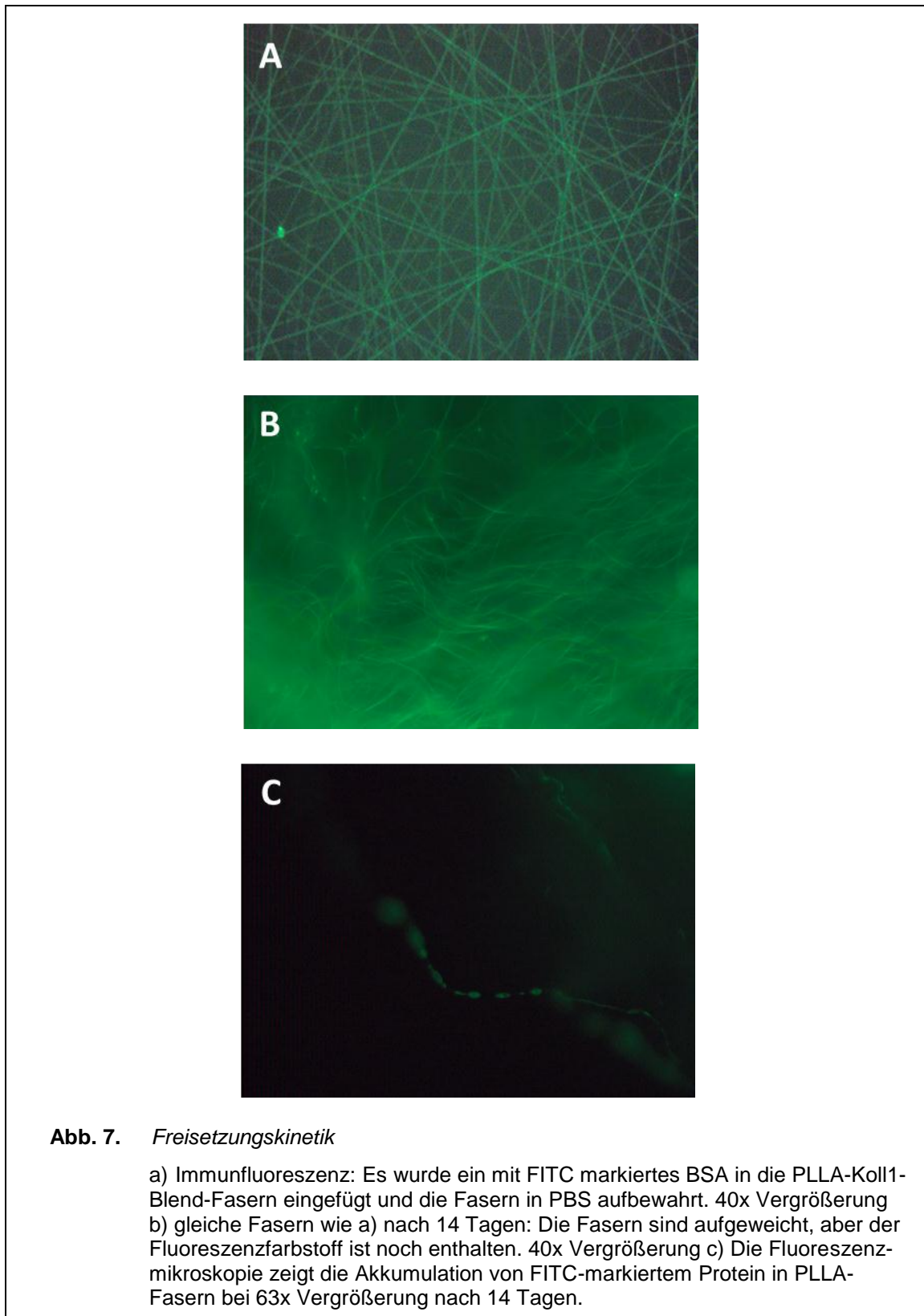


Abb. 7. *Freisetzungskinetik*

a) Immunfluoreszenz: Es wurde ein mit FITC markiertes BSA in die PLLA-Koll1-Blend-Fasern eingefügt und die Fasern in PBS aufbewahrt. 40x Vergrößerung
b) gleiche Fasern wie a) nach 14 Tagen: Die Fasern sind aufgeweicht, aber der Fluoreszenzfarbstoff ist noch enthalten. 40x Vergrößerung
c) Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt die Akkumulation von FITC-markiertem Protein in PLLA-Fasern bei 63x Vergrößerung nach 14 Tagen.

Es wurde ein mit FITC markiertes BSA (bovine serum albumin) in die PLLA-Fasern und in die PLLA-Koll1-Blend-Fasern eingefügt. Durch fluoreszenzmikroskopischen Nachweis konnte gezeigt werden, dass das Protein bzw. Färbemittel sich gleichmäßig in der Faser verteilte (siehe Abb. 7.a.).

Während die Fasern bei 37°C in PBS aufbewahrt wurden, blieb die Fluoreszenz in der Faser erhalten. Dementsprechend wurde in der UV-Spektroskopie keine zeitabhängige Freisetzung des Farbstoffes gefunden. Nach 14 Tagen waren die Fasern zwar aufgeweicht, aber der Fluoreszenzfarbstoff blieb sichtbar in den Fasern (siehe Abb. 7.b. und Abb. 7.c.).

3.3. Adhäsion, Wachstum und Proliferation der Zellen

3.3.1. Adhäsionsversuch

Um den Einfluss von BMP-2 enthaltenden PLLA-Koll1-Blendfasern auf die Adhäsion nachzuweisen, wurden 3×10^4 Zellen/cm² auf den jeweiligen Fasermatten ausgesät. Die Zelldichte auf den Fasermatten wurde jeweils nach 12 Stunden bestimmt und analysiert. Dafür wurden nach Mediumabnahme, die Proben gewaschen und mittels Aceton und Methanol fixiert. Nach erneutem Waschvorgang wurden die Proben 30 s mit DAPI inkubiert und dann mit Fluoromont auf Objektträgern eingedeckelt. Die Auszählung der Zellen von drei Bildausschnitten erfolgte bei 20facher Vergrößerung.

Das Ergebnis zeigt, dass eine Funktionalisierung der PLLA-Fasern mittels Kollagen 1 zu einer Erhöhung der Zelladhäsion führt. Der Unterschied in der Adhäsion der Zellen auf den PLLA-Fasermatten im Vergleich zu der Adhäsion der Zellen auf den PLLA-Koll1-Fasermatten war jedoch nicht signifikant ($p=0,275$). Jedoch konnte ein signifikanter Effekt im Vergleich zu den PLLA-Fasern ($p=0,044$) durch das Einbringen von BMP-2 in den PLLA-Koll1-Blend nachgewiesen werden (siehe Abb. 8.). Hier lag die Zellzahl um den Faktor 4 höher.

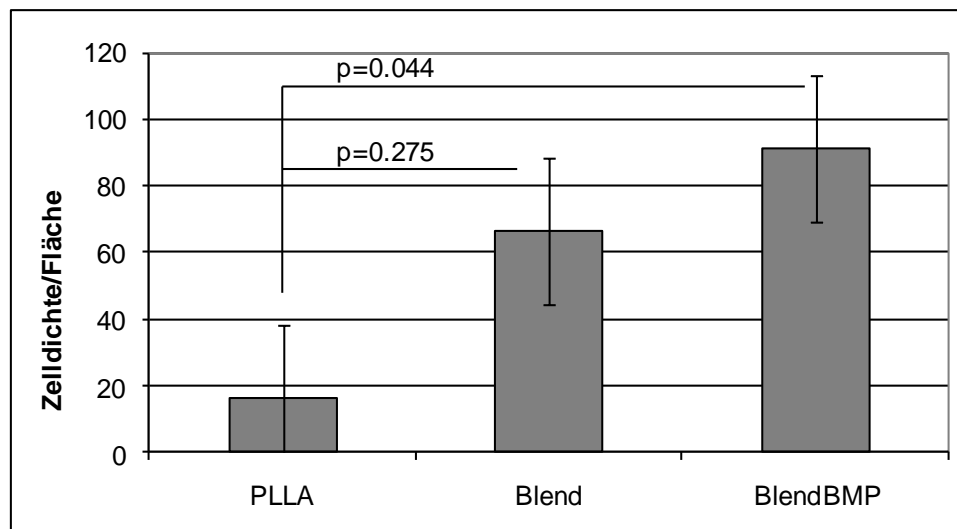


Abb. 8. Adhäsion nach 12 Stunden

Darstellung der Zelladhäsion nach 12 Stunden auf PLLA-Fasern, PLLA-Koll1-Blend-Fasern, und PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern.

3.3.2. Zelldichten

Um die biologischen Effekte der jeweiligen Nanofaser zu untersuchen, wurden die Einflüsse von PLLA-Fasern, PLLA-Koll1-Blend-Fasern und PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern auf das Wachstum sowie die Differenzierung der hMSC untersucht. Um den Einfluss von BMP-2 und Kollagen1 auf die Zelldichten zu vergleichen, wurden die Zellzahlen an Tag 4, 10, 22 unter Wachstumsbedingungen und osteoinduktiven Bedingungen bestimmt und analysiert. Die Zellen wurden dafür mit einer Zelldichte von 3×10^4 Zellen/cm² auf den Scaffolds kultiviert. Die höchsten Zellzahlen zeigten sich insgesamt unter Wachstumsbedingungen sowie unter osteoinduktiven Bedingungen auf den PLLA-Koll1-Blend-Fasern (siehe Abb. 9. und Abb. 10.).

Unter Wachstumsbedingungen wurden signifikante Unterschiede zwischen den Zelldichten nach 22 Tagen zwischen PLLA-Fasern und PLLA-Koll1-Fasern ($p=0,000$) und zwischen PLLA-Fasern und PLLA-Koll1-BMP-2-Fasern ($p=0,015$) gefunden (siehe Abb. 9.).

Unter osteoinduktiven Bedingungen wurde nach 4 Tagen ein signifikanter Unterschied im Zellwachstum zwischen PLLA-Fasern und PLLA-Koll1-Fasern bzw.

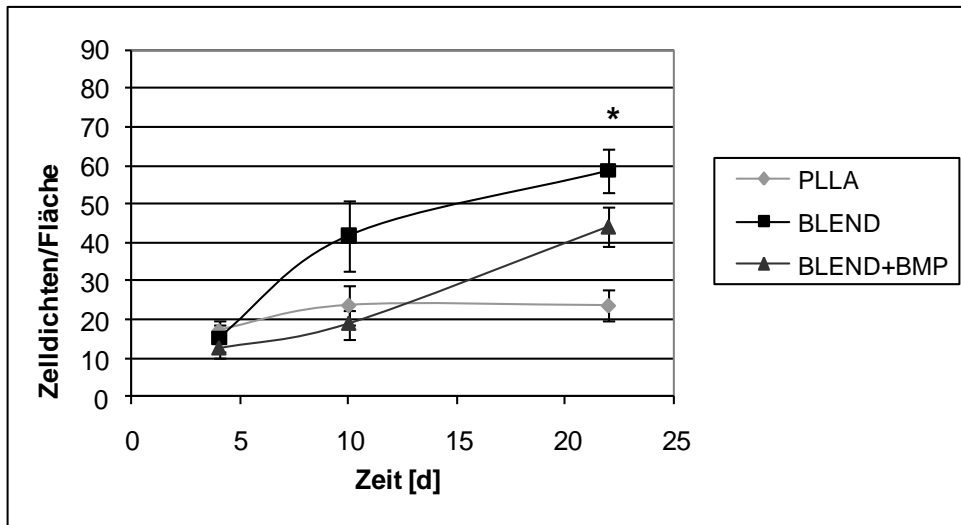


Abb. 9. Wachstumskurve über 22 Tage unter Wachstumsbedingungen

Darstellung des Zellwachstums unter Wachstumsbedingungen über 22 Tage auf PLLA-Fasern, PLLA-Koll1-Blend-Fasern und PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern. Datenerhebung an Tag 4, 10, 22.

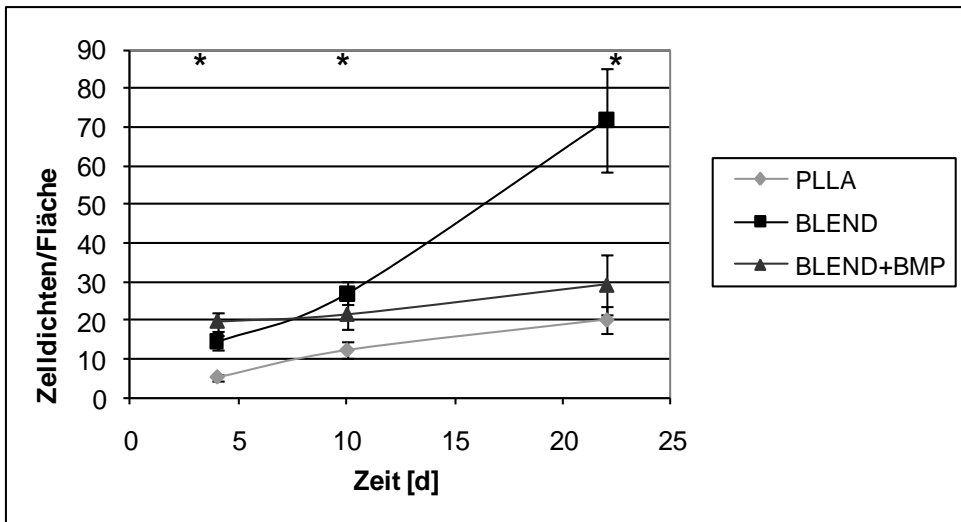


Abb. 10. Wachstumskurve über 22 Tage unter osteoinduktiven Bedingungen

Darstellung des Zellwachstums unter osteoinduktiven Bedingungen über 22 Tage auf PLLA-Fasern, PLLA-Koll1-Blend-Fasern und PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern. Datenerhebung an Tag 4, 10, 22.

PLLA-Koll1-BMP-2-Fasern erreicht (Tag 4: PLLA/Blend $p=0,001$, PLLA/Blend-BMP $p=0,000$). An Tag 10 und 22 waren die Unterschiede zwischen PLLA-Fasern und PLLA-Koll1-Blendfasern unter osteoinduktiven Bedingungen ebenfalls signifikant (Tag 10: PLLA/Blend $p=0,004$; Tag 22: PLLA/Blend $p=0,006$), jedoch nicht zwischen PLLA-Fasern und BMP-2 enthaltenden PLLA-Koll1-Blendfasern (10: PLLA/Blend-BMP $p=0,117$; 22: PLLA/Blend-BMP $p=1,00$) (siehe Abb. 10.).

3.3.3. Proliferation

Um den Einfluss von PLLA-Koll1-BMP-2-Fasern zusätzlich auf die Proliferation zu untersuchen, wurden die Zellen auf PLLA-Fasern, PLLA-Koll1-Blend-Fasern und PLLA-Koll1-BMP-2-Fasern vier Tage unter Wachstums- und osteoinduktiven Bedingungen fixiert und anschließend mit einem Antikörper gegen Ki67 inkubiert. Bei den Zellen, die sich in Proliferation befanden, leuchtete der Zellkern in der Immunfluoreszenz rot. Anschließend wurde das Verhältnis von positiven zu allen Zellen bestimmt, wodurch keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation festgestellt werden konnten. Die Ergebnisse waren rein qualitativ und wiesen die Proliferation der Zellen nach. Die hier gezeigte Aufnahme stellt die Proliferation der Zellen auf den drei verschiedenen Fasermatten dar (siehe Abb. 11.).

Um die Proliferation der Zellen auf der jeweiligen Fasermatte weiter zu untersuchen, wurden zusätzlich nach vier Tagen die Expressionslevel der Zellen für Cyclin 1D (CCND) auf PLLA, PLLA-Koll1-Blend, PLLA-Koll1-Blend-BMP-2 bestimmt. Eine CCND abhängige Kinaseaktivität bringt fast ausdifferenzierte Zellen wieder in den Zellzyklus (Latella et al., 2001). Die höchste CCND-Expression zeigten die Zellen auf den PLLA-Koll1-Blend-Fasern (siehe Abb. 12.).

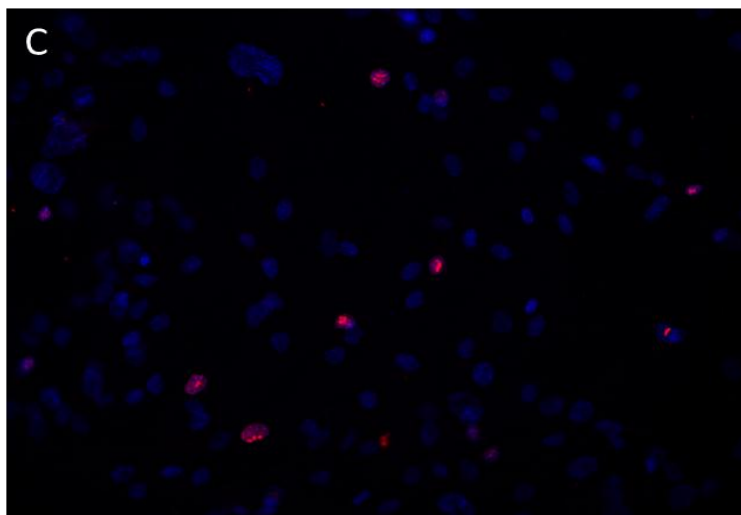
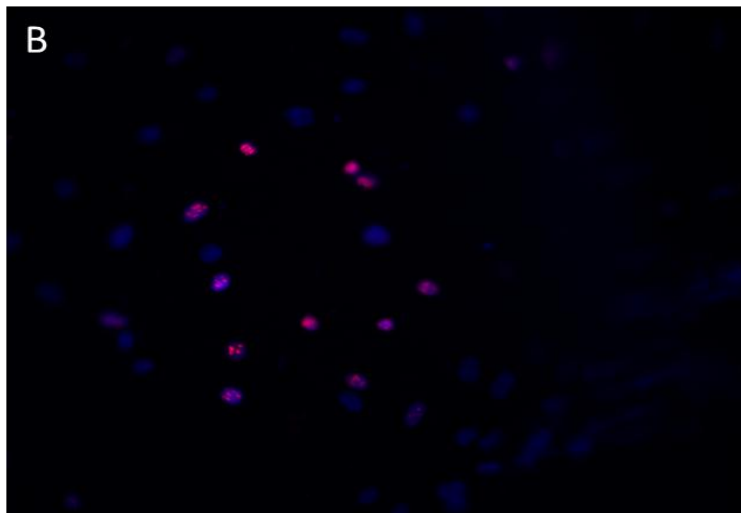
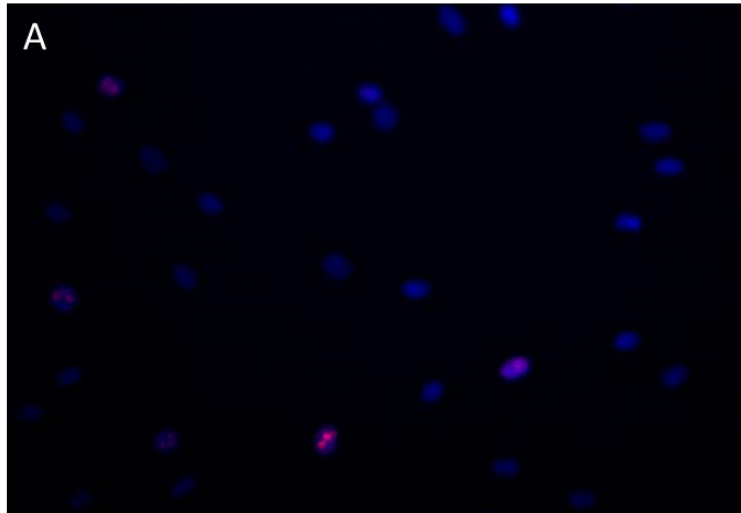
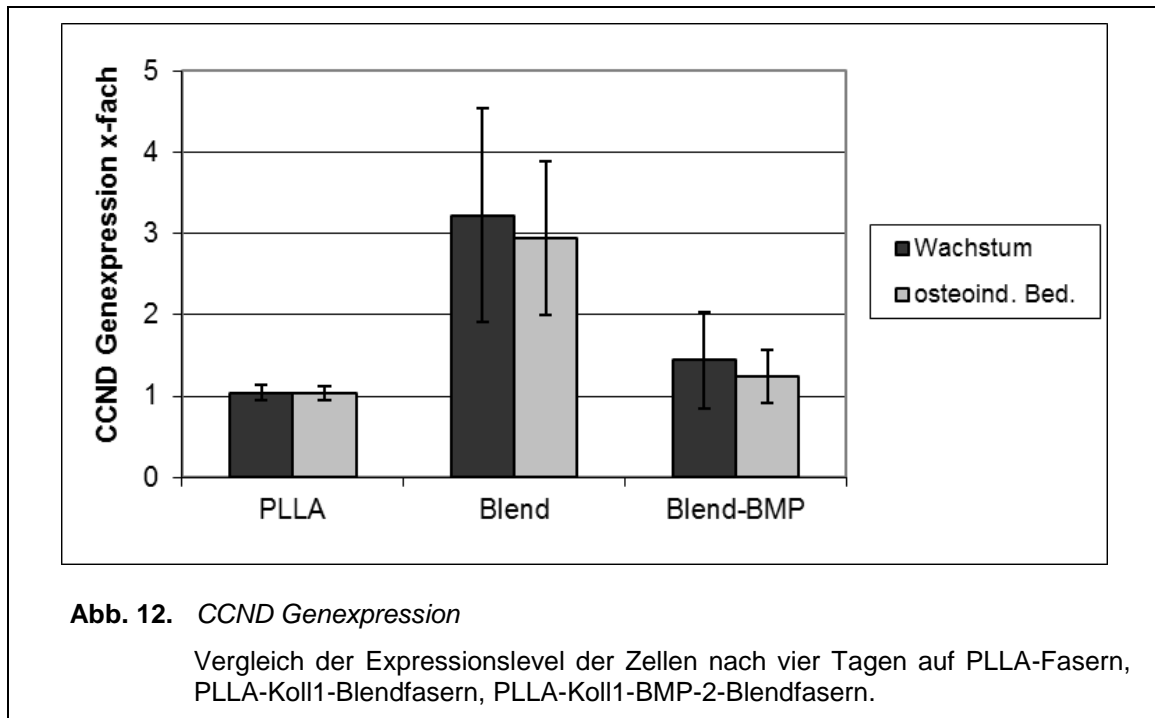


Abb. 11. *Proliferation*

Um den Einfluss von PLLA-Koll1-BMP-2-Fasern auf die Proliferation zu vergleichen, wurden die Zellen auf a) PLLA-Fasern, b) PLLA-Koll1-Blend-Fasern und c) PLLA-Koll1-BMP-2-Fasern vier Tage unter osteoinduktiven Bedingungen kultiviert und anschließend mit einem Antikörper gegen Ki67 inkubiert. 20x Vergrößerung.



3.4. Einfluss der BMP-2 enthaltenden PLLA-Koll1-Blendnanofasern auf die Differenzierung und Matrixformation der hMSC

3.4.1. Genexpressionsanalyse AP,OC und Koll1 mittels PCR

Damit der Einfluss von PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern auf die Differenzierung der Stammzellen zu Osteoblasten untersucht werden konnte, wurden die Genexpressionslevel für Osteocalcin (OC), Kollagen 1 (Koll1) und Alkalische Phosphatase (AP) der Zellen auf PLLA-Koll1-Blend und PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern an Tag 2, 4, 10, 22 mittels Real-Time-quantitative-PCR analysiert. Hierbei handelt es sich um Gene, die während der Osteoblastendifferenzierung und Matrixformation von Stammzellen hoch reguliert werden.

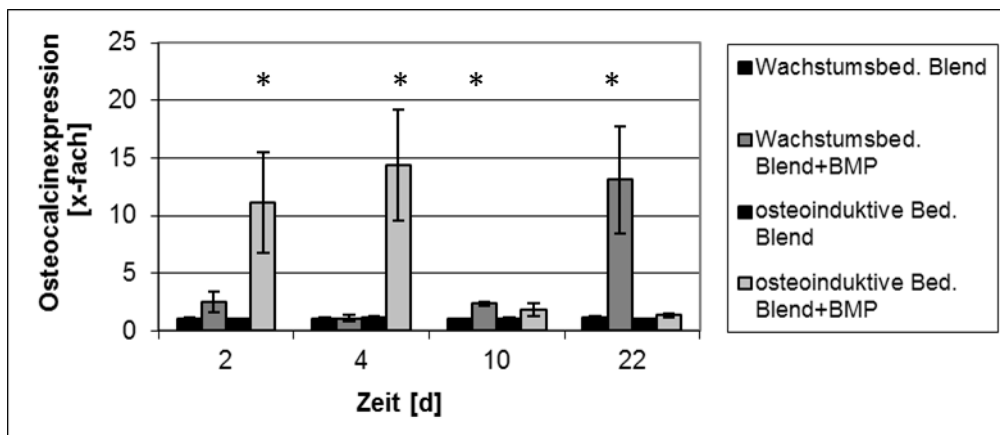
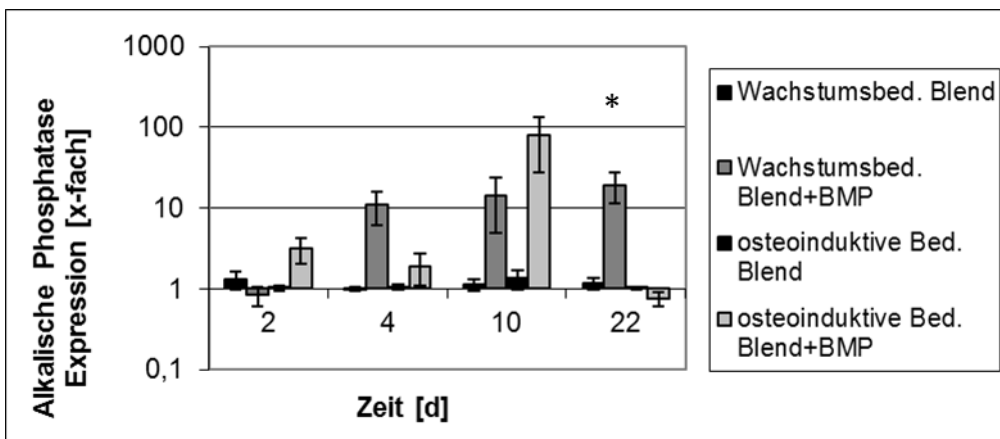
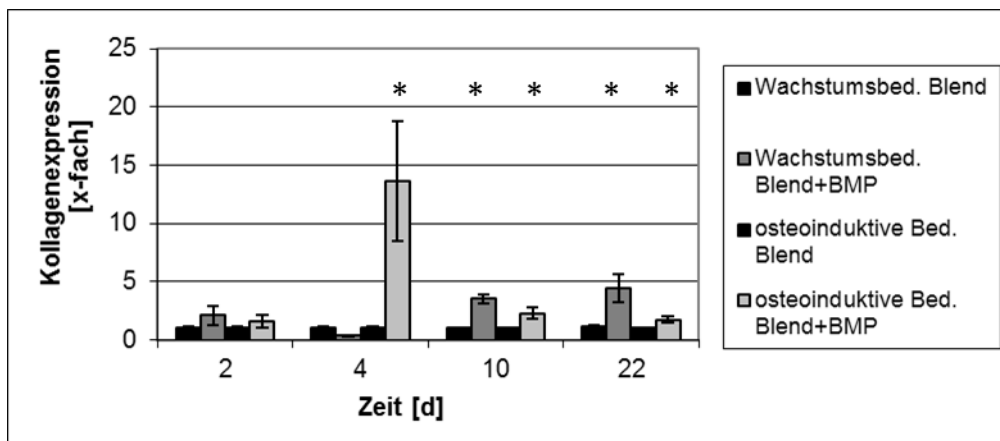


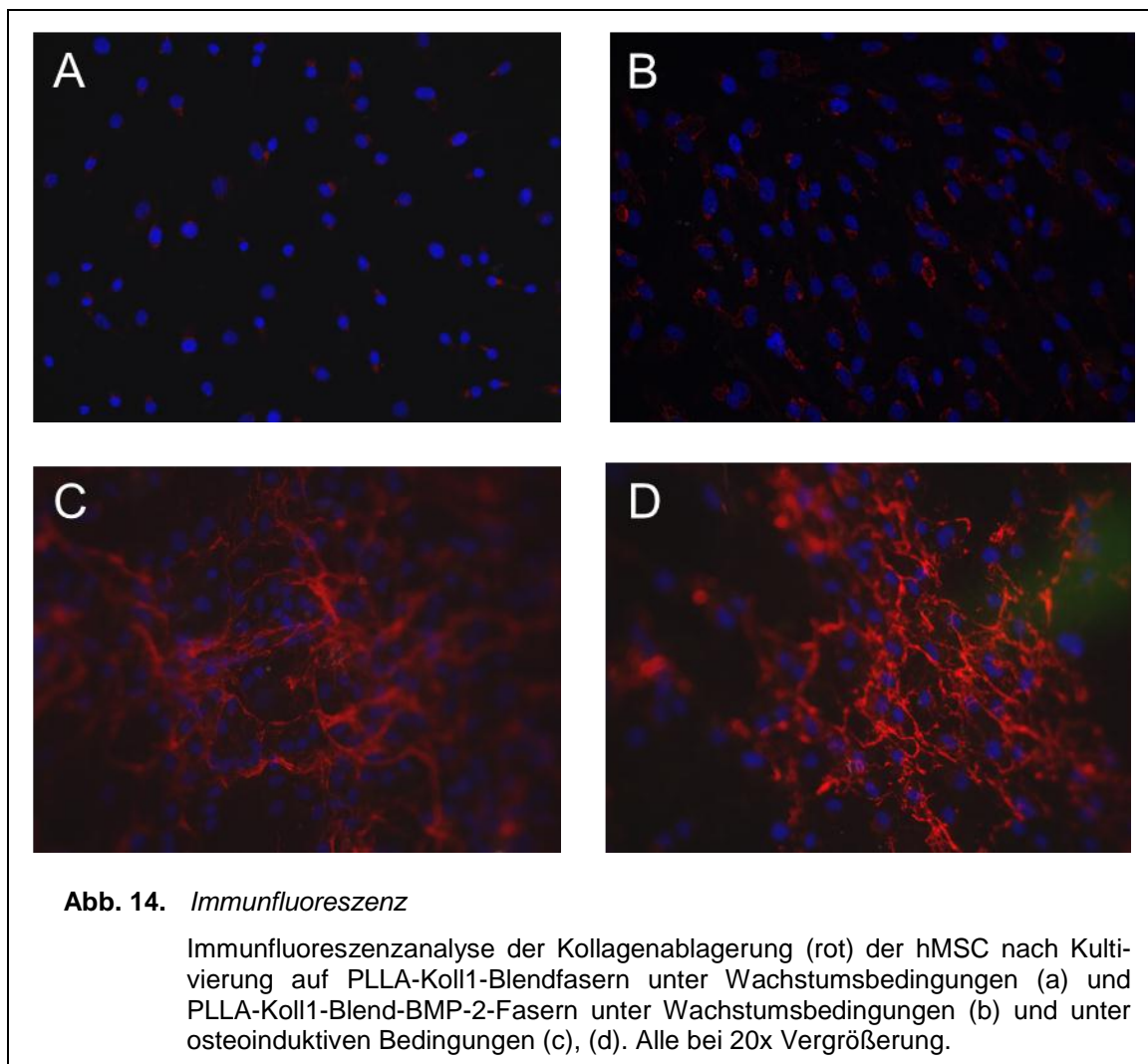
Abb. 13. Expression AP, OC, Koll1 über 22 Tage

Genexpressionsanalyse spezifischer Gene der Osteoblastendifferenzierung und Matrixformation während der Kultivierung von Stammzellen auf Nanofasern unter Wachstums- und osteoinduktiven Bedingungen. Die Zellen wurden auf PLLA-Fasern, PLLA-Koll1-Blend-Fasern und PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern ausgesät und unter Wachstumsbedingungen bzw. osteoinduktiven Bedingungen kultiviert. Es wurden die Genexpression von OC, Koll1 und AP analysiert und verglichen.

Die Anwesenheit von BMP-2 führte zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression von Kollagen Typ I unter Wachstums- und osteoinduktiven Bedingungen (siehe Abb. 13.a.). Auch die Genexpressionslevel von Alkalischer Phosphatase und Osteokalcin wurden durch die Anwesenheit von BMP-2 insgesamt hochreguliert. Es zeigte sich teilweise ein großer Standardfehler des Mittelwerts (siehe Abb. 13.b. und 13.c.).

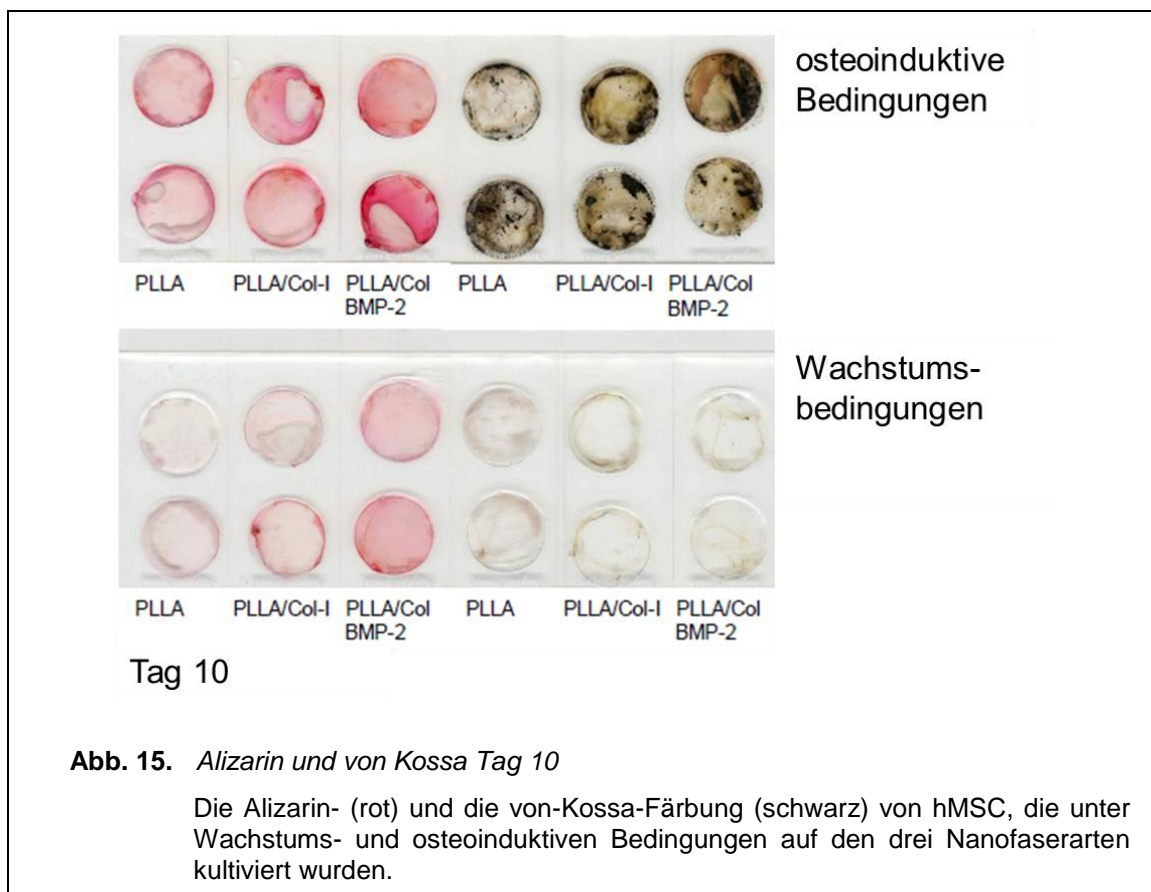
3.4.2. Immunfluoreszenzanalyse, Kollagenablagerung der hMSC

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen 22 Tage auf PLLA-Koll1-Blendfasern und PLLA-Koll1-Blend-BMP2-Fasern ausgesät und kultiviert und am Tag 22 fixiert.



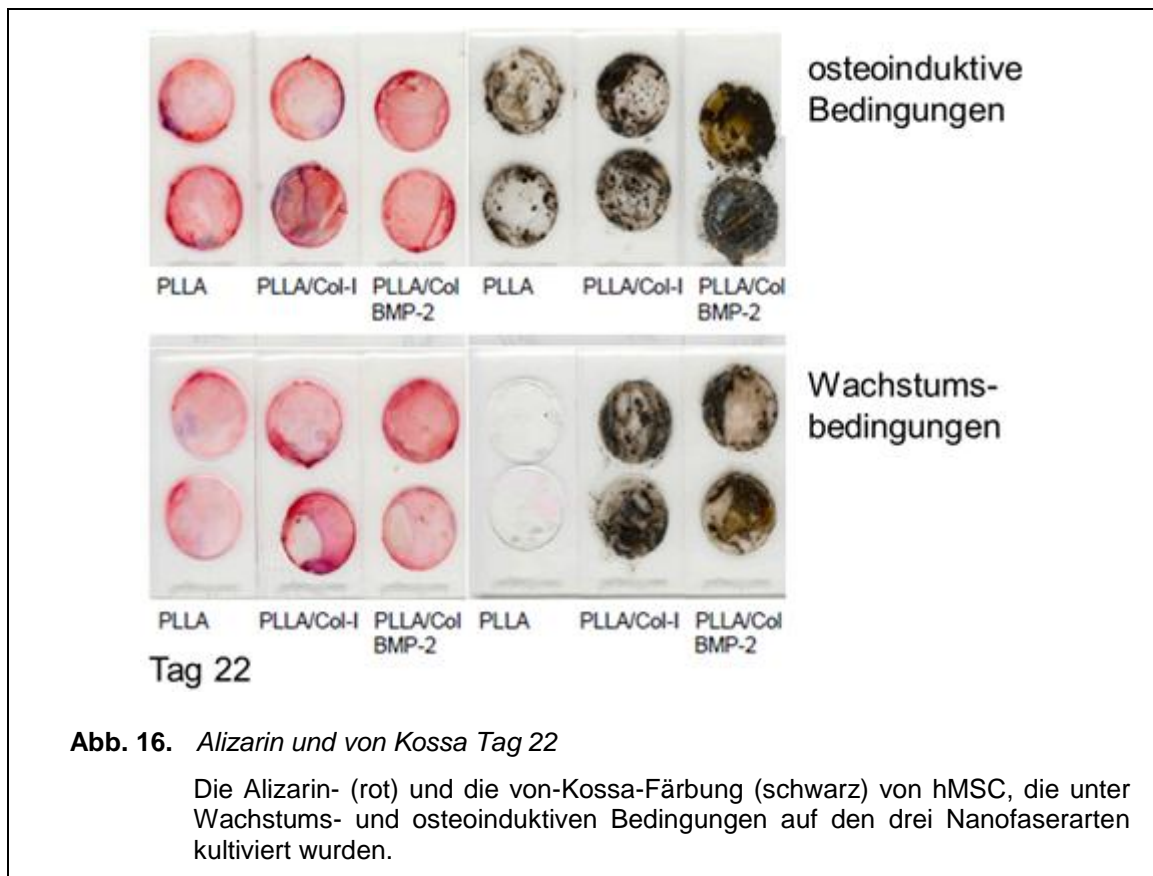
Es erfolgte die Inkubation mit einem Primärantikörper gegen Koll1 und nach erneutem Waschen die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Cy3. Eine höhere Produktion dieser Proteine durch die Zellen ließ sich auch hier nachweisen. Es kam zu einer größeren Produktion und Ablagerung von Kollagen 1 (rot) in die extrazelluläre Matrix unter osteoinduktiven Bedingungen. Dieser Effekt war für PLLA-Kol1-Blend-BMP-2-Fasern besonders stark und bestätigte die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für Kollagen 1 (siehe Abb. 14.).

3.4.3. Von-Kossa-Färbung, Alizarin-Färbung



Um die Calciumablagerung der Zellen in die extrazelluläre Matrix weiter zu untersuchen, wurden die Plättchen aller drei Nanofaserarten mit der von-Kossa-Färbung und der Alizarin-Färbung behandelt. Dies erfolgte nach 10 und 22 Tagen. Beide Färbungen bestätigten, dass die Differenzierung der Zellen, hier in Form der Calciumablagerung zu sehen, unter osteoinduktiven Bedingungen für

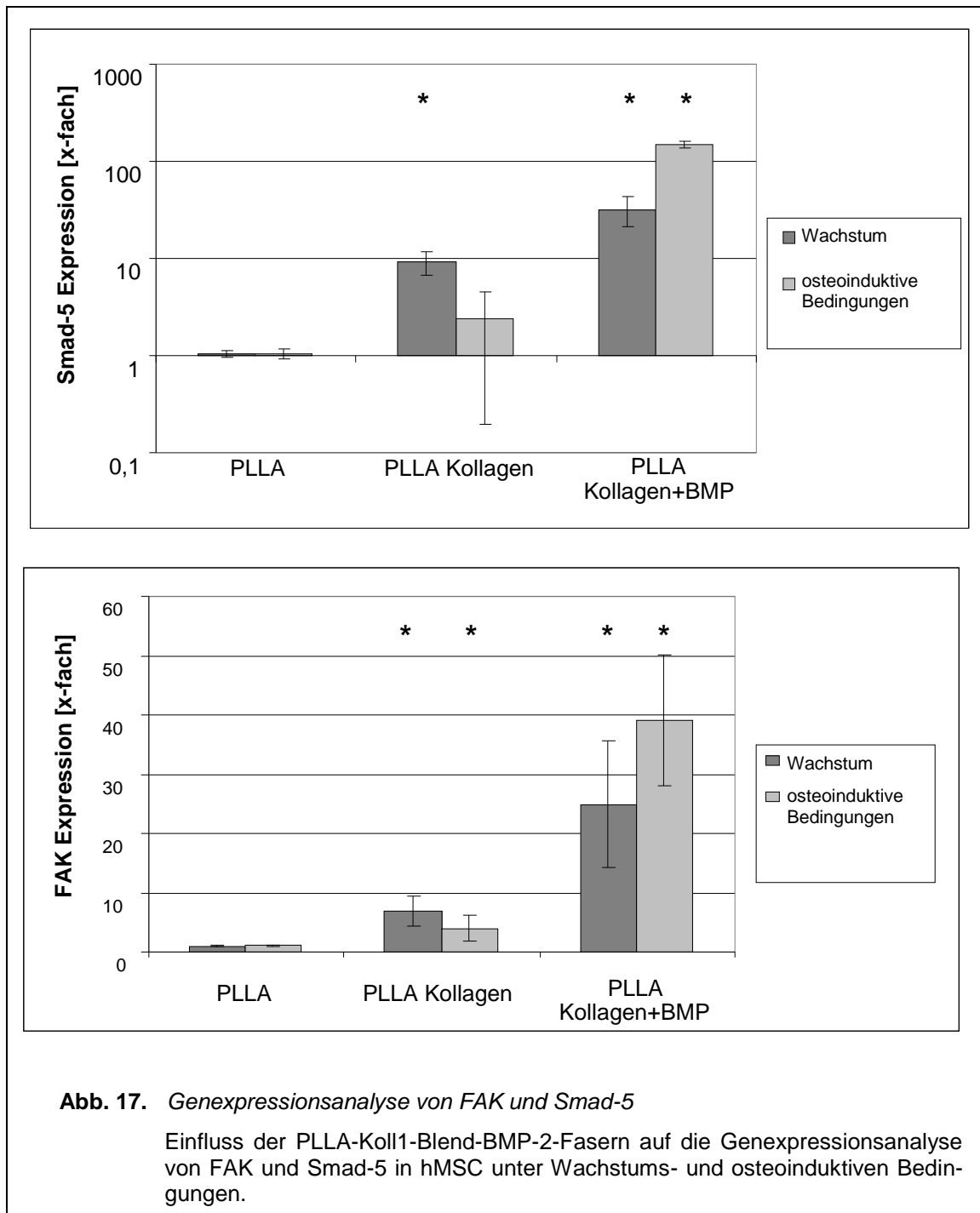
alle drei Faserarten stärker war. Außerdem wurde dieser Effekt noch mehr durch die Zugabe von BMP-2 verstärkt (siehe Abb. 15. und Abb. 16.).



3.4.4. Signaltransduktion

Um die osteogene Differenzierung über die BMP-2 abhängigen Signalkaskaden näher zu untersuchen, wurde die Genexpression der Zellen von Jun, Smad-5 und FAK (Focal Adhesion Kinase), den Regulationsmolekülen verschiedener Signaltransduktionswege, analysiert. Dafür wurden die Zellen für 4 Tage auf PLLA-, PLLA-Koll1-Blend-, PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern kultiviert und anschließend die Expressionslevel mittels Real-Time-quantitative-PCR für Tag 2 und Tag 4 bestimmt. An Tag 2 konnten noch keine signifikanten Unterschiede in den Genexpressionsanalyse für FAK und Smad-5 gefunden werden. Nur die Genexpression von Jun zeigte unter osteoinduktiven Bedingungen einen signifikanten Einfluss von BMP-2. Die Genexpressionsanalyse an Tag 4 für FAK, Smad-5 und Jun zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen PLLA-Fasern und PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern und ebenfalls zwischen PLLA-Koll1-

Blend-Fasern und PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern unter osteoinduktiven Bedingungen. Unter Wachstumsbedingungen waren die Unterschiede nicht signifikant (siehe Abb. 17.).



Außerdem wurden die Zellen an Tag 4 mit Antikörpern gegen Smad-5 und FAK inkubiert. Nach Hinzugabe von Sekundärantikörpern erfolgte die Intensitätsbestimmung der Fluoreszenzsignale unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Er-

gebnisse der Fluoreszenzmikroskopie bestätigen hierbei die Genexpressionsanalyse. So waren die Unterschiede zwischen PLLA-Fasern und PLLA-Koll1-Blend-Fasern zu BMP-2 enthaltenden PLLA-Koll1-Blendfasern in allen Fällen unter Wachstumsbedingungen und unter osteoinduktiven Bedingungen signifikant (siehe Abb. 18.). Besonders unter osteoinduktiven Bedingungen war dieser Effekt vorhanden (siehe Abb. 19.)

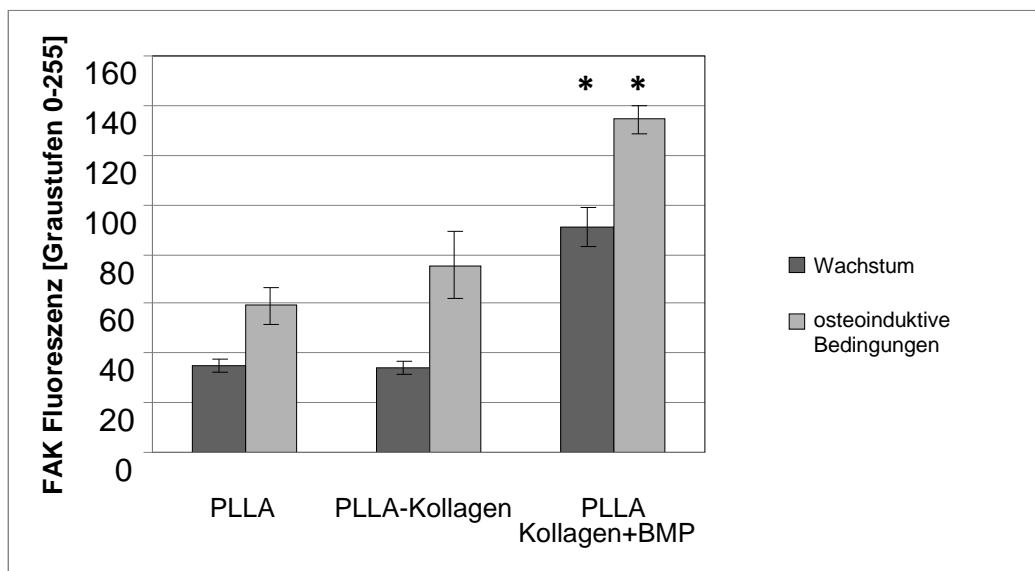
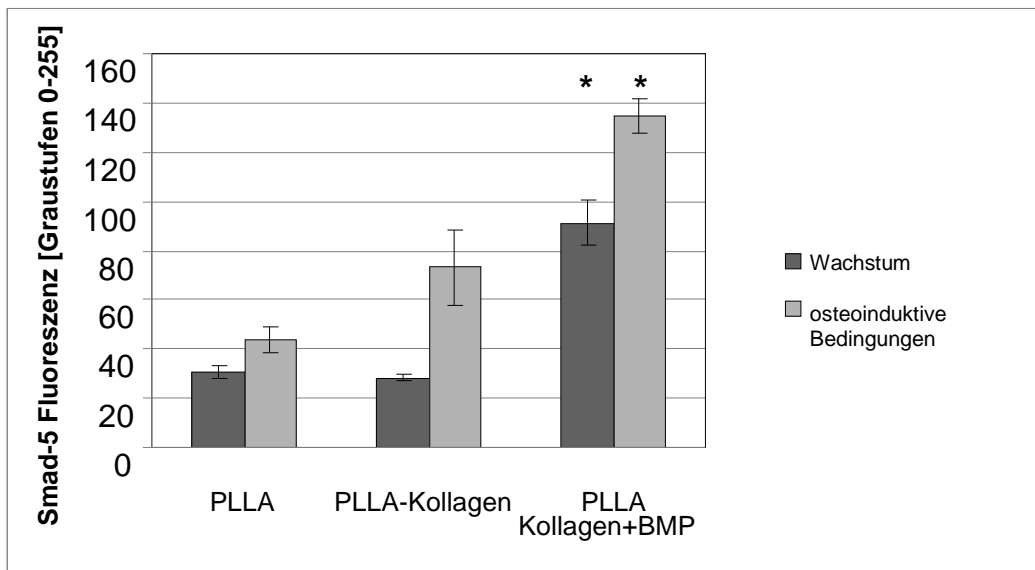
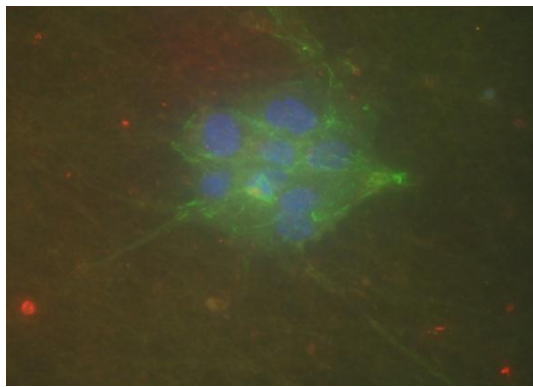
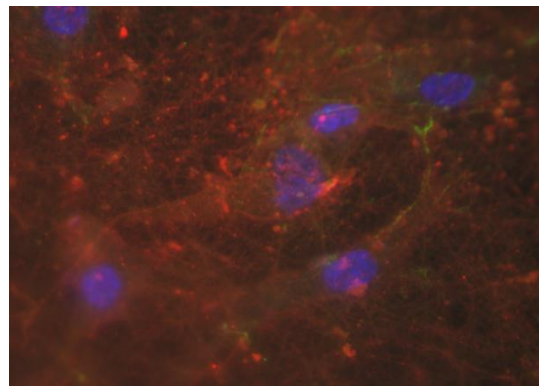


Abb. 18. Immunfluoreszenzanalyse von Smad-5 und FAK

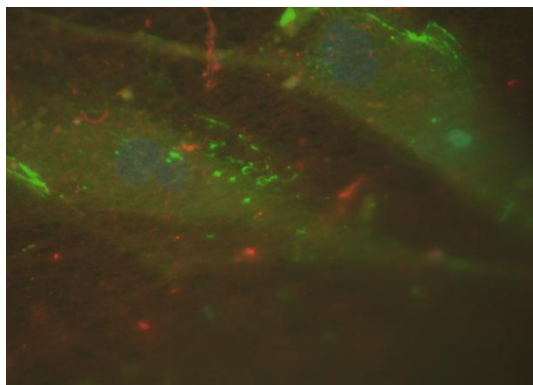
Immunfluoreszenzanalyse der FAK- und Smad-5-Expression der hMSC nach Kultivierung auf PLLA-Koll1-Blendfasern und PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern unter Wachstumsbedingungen und osteoinduktiven Bedingungen.



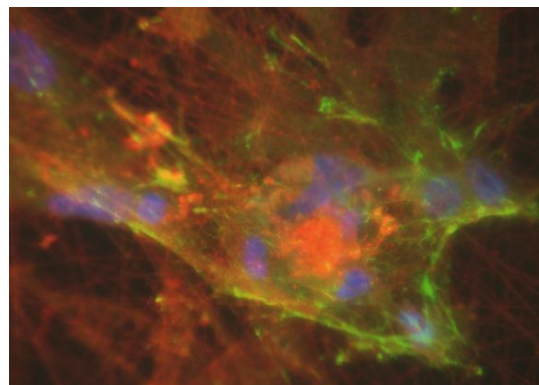
Wachstumsbedingungen BMP-Fasern



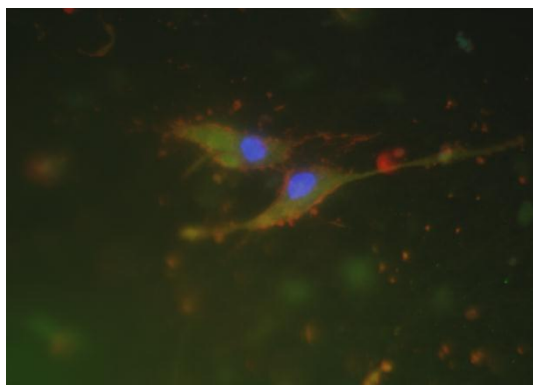
Wachstumsbedingungen BMP-Fasern



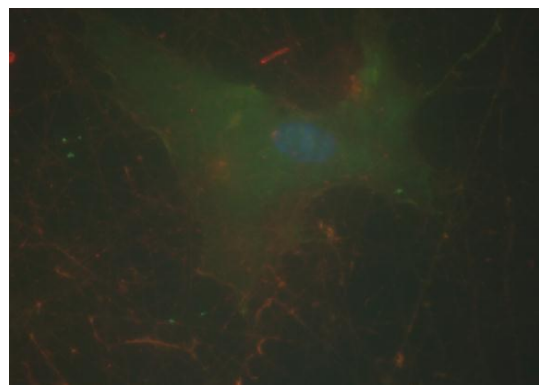
Wachstumsbedingungen Blendfasern



osteoinduktive Bed. Blendfasern



osteoinduktive Bed. BMP-Fasern



osteoinduktive Bed. BMP-Fasern

Abb. 19. Immunfluoreszenzmikroskopie von FAK und Smad-5

Immunfluoreszenzmikroskopie der FAK (rot)- und Smad-5 (grün) -Expression der hMSC nach Kultivierung auf PLLA-Koll1-Blendfasern und PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern unter Wachstumsbedingungen und osteoinduktiven Bedingungen. 63x Vergrößerung.

4. Diskussion

Bei der Knochendefektheilung kommt dem Tissue Engineering eine immer größere Bedeutung zu (Moore et al., 2001, Jabbarzadeh et al., 2008, Harvey et al., 2010). Materialien, die für das Tissue Engineering von Knochengewebe verwendet werden, sollten ähnliche chemische und physikalische Eigenschaften wie die extrazelluläre Matrix besitzen. Nanofaseraffolds, die aus Polymeren gesponnen werden, ähneln morphologisch und strukturell der ECM und können deshalb gut für das Tissue Engineering verwendet werden (Ma et al., 2005). Die beiden anderen wichtigen Komponenten des Tissue Engineerings sind Zellen und Wachstumsfaktoren, die die Proliferation und Differenzierung der Zellen anregen (Hutmacher and Cool, 2007). Mesenchymale Stammzellen eignen sich für den Knochenaufbau, da sie sich zu Osteoblasten differenzieren können (Bruder et al., 1997, Jaiswal et al., 1997). Eine wichtige Rolle bei der Knochenregeneration nehmen als Wachstumsfaktoren die BMPs ein, die zur Gruppe der TGF β -Superfamilie gehören und die Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten anregen (Wozney et al., 1988, Rankin et al., 2000, Komori et al., 1997, Nakashima et al., 2002). Mit dieser Arbeit soll versucht werden, das Konzept des Tissue Engineerings zu verwirklichen und für die Knochendefektheilung positiv zu nutzen.

Um dieses Ziel zu verwirklichen und den Einsatz von Wachstumsfaktoren für das Tissue Engineering von Knochengewebe abzuwägen, wurde der Einfluss von BMP-2 in gesponnenen PLLA-Koll1-Blendfasern auf das Wachstum und die Differenzierung von hMSC untersucht. Dafür wurden die BMP-2 enthaltenden PLLA-Koll1-Blendfasern mit PLLA-Koll1-Blendfasern und PLLA-Fasern verglichen.

Schon in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Einbringen von BMP-2 in die PLLA-Nanofasern zu einer höheren Expression für den Knochenaufbau relevanter Gene führt (Schofer et al., 2008). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass BMP-2 einen positiven Einfluss auf die Integrine der Osteoblasten ausübt (Jikko et al., 1999, Lai and Cheng, 2005). Zusätzlich kommt es durch Kollagen 1 über die Integrine auch ohne exogene Stimuli zu einer Erhöhung der fokalen Adhensionskinasen (FAK) und darüber zur vermehrten Zelldifferenzierung (Takeuchi et al., 1997). So zeigte das Bilden eines Blends aus

PLLA-Fasern und Koll1-Fasern eine größere Proliferation und Differenzierung der verwendeten mesenchymalen Stammzellen (Schofer et al., 2009b).

Hier soll nun ein möglicher kooperativer Effekt beider Stimuli, sprich BMP-2 und Kollagen 1, nachgewiesen und analysiert werden.

4.1. Verwendete Materialien

PLLA ist ein biologisch abbaubares und verträgliches Polymer, das von der Food und Drug Administration genehmigt worden ist (Waris et al., 2004, Giavaresi et al., 2004). Kollagen ist ein Hauptbestandteil von Knochengewebe und beeinflusst dessen mechanische Eigenschaften (Catanese lii et al., 1999). Außerdem hat es wichtige Eigenschaften wie eine hohe Zellkompatibilität, eine hohe Wasseraffinität, Resorbierbarkeit, Informationsweiterleitung und Stabilität (Kolácná et al., 2007). Wird HFIP als Lösungsmittel für Kollagen benutzt, ähneln die gesponnenen Fasern Gelatinefasern (Zeugolis et al., 2008).

BMP-2 gehört zu den Wachstumsfaktoren und regt die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten an (Liu et al., 2007, Wozney et al., 1988, Kato et al., 2009, Cheng et al., 2003a, Jørgensen et al., 2004). BMP-2 und BMP-7 werden bereits in der Klinik zur Frakturheilung eingesetzt (Axelrad et al., 2007).

4.2. Fasermorphologie

Schon früher konnte gezeigt werden, dass PLLA-Fasern (Dersch et al., 2003, Boudriot et al., 2004, Maretschek et al., 2008, Paletta et al., 2009b) sowie auch Kollagenfasern (Matthews et al., 2002, Sell et al., 2009, Schofer et al., 2009c) einfach elektrogewoben werden können, wodurch sich ungewebte 3D-Gebilde aus Fasern bilden lassen.

Es wurde nachgewiesen, dass sich BMP-2 in PLLA einbringen lässt, ohne seine biologische Aktivität zu verlieren (Schmidmaier et al., 2002, Schmidmaier et al., 2006, Niu et al., 2009, Schofer et al., 2008). Durch die von uns gezeigten Effek-

te von BMP-2 auf die Genexpression für den Zellzyklus relevanter Gene können wir diese These bestätigen und insoweit ergänzen, dass sich BMP-2 auch in einen PLLA-Koll1-Blend ohne Aktivitätsverlust einfügen lässt.

Zusätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass das Bilden eines Blends aus PLLA-Fasern und Koll1-Fasern im Verhältnis 4:1 zu einer Abnahme der Hydrophobie führt, da der Kontaktwinkel deutlich im Vergleich mit dem Kontaktwinkel der PLLA-Fasern abnahm (Schofer et al., 2009b). Außerdem zeigten sich Durchmesser, die nur der Hälfte der Durchmesser der PLLA-Fasern entsprachen (Schofer et al., 2009b). Insgesamt ähnelten die PLLA-Koll1-Blend-Fasern in ihrer Morphologie Kollagen1-Fasern (Schofer et al., 2009c). Diese Ergebnisse vorangegangener Arbeiten konnten wir in dieser Studie bestätigen (siehe Kap. 3.2.1.).

Durch das Einbringen von BMP-2 in die PLLA-Koll1-Fasern, kam es zu einer Reduktion des Faserdurchmessers auf die Hälfte. Auch die Porengröße der Fasern verkleinerte sich von 2 μm auf 0,6 μm . Im Gegensatz zu PLLA-BMP-2-Fasern, welche das eingesponnen BMP-2 in Beads akkumulieren (Schofer et al., 2008), kam es bei der Inkorporation von BMP-2 in die PLLA-Koll1-Blend-Fasern zu einer gleichmäßigen Verteilung (siehe Abb. 7.c.). Die gemessenen Porengrößen entsprechen hingegen nicht den in der Literatur für das Tissue Engineering geforderten idealen Porengrößen von 100-350 μm (Bruder and Fox, 1999, Hutmacher, 2000).

Die Leitfähigkeit lag für die PLLA-Koll1-Blendlösung höher als für die PLLA-Fasern, was den geringeren Durchmesser der PLLA-Koll1-Fasern erklären könnte (Boudriot et al., 2006, Hohman et al., 2001a, Hohman et al., 2001b).

Die PLLA-Lösung in DCM zeigte eine höhere Oberflächenspannung, was die schlechtere Spinnbarkeit beim Spinnprozess möglicherweise herleitet.

Die Viskosität beider Lösungen liegt nahezu im selben Bereich. Auch die Viskosität hat Einfluss auf den Spinnprozess (Boudriot et al., 2006). Eine zu geringe Viskosität der Polymerlösung führt zur Bildung von Beads, d.h. Unregelmäßigkeiten und Tropfenbildung in der Faser (Kriegel et al., 2009). Ein Anstieg der Viskosität führt zu gleichmäßigen Fasern mit größeren Durchmessern (Zong et al., 2002). Steigt die Viskosität aber zu stark an, führt dies zu schlechterer Spinnbarkeit und Gelbildung an der Nadelspitze (Zong et al., 2002).

4.3. Freisetzungskinetik

In den letzten Jahren haben viele Studien gezeigt, dass sich Polymere gut als Trägermaterialien für Medikamente und Wachstumsfaktoren eignen, weshalb sie häufig im Tissue Engineering verwendet wurden (Langer, 1990, Stasiak et al., 2007, Sell et al., 2009, Schmidmaier et al., 2008, Niu et al., 2009, Kriegel et al., 2009, Haidar et al., 2009). Die Trägermaterialien lassen sich hierbei in vier Kategorien einteilen: polymere Nanopartikel (Singh et al., 2001), Hydrogele (DuBose et al., 2005), Mizellen (Nishiyama and Kataoka, 2006) und faserartige Polymere (Kim et al., 2004).

Um die Freisetzung von BMP-2 aus PLLA-Fasern und PLLA-Koll-1-Blend-Fasern vergleichen zu können, wurde ein mit FITC gekoppeltes Protein in die Fasern eingesponnen. Die PLLA-Fasern setzten kaum BMP-2 aus ihren Fasern frei. Dies könnte auf ihre hydrophobe Oberfläche zurückzuführen sein (Maretschek et al., 2008). Die Freisetzung läuft eigentlich über Hydrolyse des Polymers. PLLA ist kristallin und hydrolysiert sehr langsam (Tsuji and Ikarashi, 2004). Jedoch lagern sich hydrophile Komponenten wie BMP-2 während des Spinnprozesses an der Oberfläche an und zeigen so trotzdem ihre biologische Wirksamkeit (Kim et al., 2004). Außerdem könnte die poröse Oberfläche der PLLA-Fasern einen Kontakt zu den BMP-Rezeptoren der Zellen begünstigen (Schofer et al., 2008).

Auch die PLLA-Koll1-Blend-Fasern setzten trotz ihrer Wasserlöslichkeit keinen Fluoreszenzfarbstoff frei (siehe Kap. 3.2.2). Der Fluoreszenzfarbstoff zeigte sich auch nach 14 Tagen in den Fasern. Dass trotzdem ein Effekt durch BMP-2 in den PLLA-Koll1-Blend-Fasern nachzuweisen war, liegt wahrscheinlich an der starken Interaktion von BMP-2 mit der extrazellulären Matrix. So bindet BMP-2 z.B. an sulfatierte Polysaccharide auf der Zelloberfläche wie Heparin und Heparansulfat. Dies geschieht über eine negativ geladene Kette dieser Moleküle, wodurch es zu einer vermehrten Phosphorylierung von SMAD1/5/8 kommt (Zhao et al., 2006, Takada et al., 2003). Der hier gezeigte Anstieg von Smad-5 in der Genexpressionsanalyse und der Signalfluoreszenz bestätigt diese These (siehe Kap. 3.4.4.). Auch andere Moleküle der extrazellulären Matrix gehen durch BMP-2 eine stärkere Interaktion mit der Zelloberfläche ein. So wird das

Kollagen-Integrin-Signal durch BMP-2 verstärkt (Xiao et al., 2002, Ronzière et al., 2005).

4.4. Biologische Wirksamkeit

Das Wachstum von Zellen auf elektrogewebenen Nanofasern wurde bereits nachgewiesen (Schofer et al., 2008, Hosseinkhani et al., 2007, Donzelli et al., 2007). Bei der Produktion der Scaffolds zeigt sich, dass PLLA-Fasern leichter zu produzieren und stabiler als Kollagenfasern sind, aber nicht die osteogenen und differenzierenden Eigenschaften von Kollagenfasern besitzen (Schofer et al., 2009c). Das Bilden eines Blends aus Kollagen und PLLA in DCM im Verhältnis 4:1 konnte eine höhere Stabilität erzielen als die alleinigen Kollagenfasern und höhere Zelldichten bei einer höheren Differenzierung als die PLLA-Fasern bewerkstelligen (Schofer et al., 2009b). Auch wurde bereits BMP-2 in PLLA-Fasern versponnen, wobei eine höhere Genexpression erzielt werden konnte (Schofer et al., 2008). Wie bereits bekannt, führt BMP-2 in Bezug auf die osteogene Differenzierung zu einer vermehrten Differenzierung und größeren Osteoblastenaktivität (Jäger et al., 2008). In dieser Arbeit sollte ein möglicher kooperativer Effekt von BMP-2 und Kollagen nutzbar gemacht werden.

4.4.1. Adhäsion, Wachstum und Proliferation der Zellen

Die hMSC wurden auf den PLLA-Fasern, den PLLA-Koll1-Blend-Fasern und den PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern für 12 h ausgesät und anschließend ausgezählt. Es zeigte sich eine höhere Adhäsion nach 12 h auf den BMP-2 enthaltenden Fasern. Dieser Effekt könnte durch den positiven Einfluss von BMP-2 auf die Integrine der Zelloberfläche auslösbar sein. Durch BMP-2 kommt es zu einer vermehrten Aktivierung der Integrine, was eine größere Aktivierung der fokalen Kontakte nach sich zieht. Hierdurch kommt es zu vermehrten Zellkontakten und Proliferation (Shah et al., 1999, Sotobori et al., 2006, Jikko et al., 1999). Außerdem könnten der kleinere Durchmesser der BMP-2 enthaltenden Fasern und die Porengröße zusätzlich einen Effekt auf die Adhäsion gehabt haben.

Um den Einfluss von BMP-2 auf die Zellproliferation und das biologische Wachstum zu beurteilen, wurden die Zelldichten über einen Zeitraum von 22 Tagen auf den jeweiligen Fasermatten untersucht und verglichen. Es kam zu einem Anstieg der Zelldichten auf PLLA-Koll1-Fasern und PLLA-Koll1-BMP-2-Fasern gegenüber den alleinigen PLLA-Fasern. Jedoch zeigten sich geringere Zelldichten bei Fasern, die BMP-2 enthielten gegenüber den PLLA-Koll1-Blendfasern ohne BMP-2, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass es durch BMP-2 eher zu einer verstärkten Differenzierung der Zellen als zu ihrer Proliferation kommt (Guicheux et al., 2003).

Ein Anfärben der Zellen mit dem Ki67-Antikörper nach 4 Tagen zeigte rein qualitative Ergebnisse zwischen den Fasern. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich, dass Ki67 bei allen drei Faserarten nachweisbar war (siehe Abb. 10.). Ki67 ist ein Proliferationsmarker, der in der G0-Phase der Zellen abwesend ist und die Zellteilung anzeigt (Scholzen and Gerdes, 2000).

Um die Proliferation der Zellen noch weiter quantitativ zu untersuchen, wurden die Expressionslevel der Zellen auf den drei verschiedenen Faserarten nach vier Tagen für CCND bestimmt. Cyclin D1 ist das Produkt des CCND1-Gens und hat eine wichtige Aufgabe bei der Regulation des Zellzyklus (Draetta and Beach, 1988). Hier bestätigten sich die Ergebnisse der Zelldichten und der Proliferation nach 4 Tagen. Es kam zu einer vermehrten Genexpression von CCND der Zellen auf PLLA-Koll1-Blend-Fasern gegenüber PLLA-Fasern und PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern. Dies kann ebenfalls dadurch erklärt werden, dass durch das Zufügen von BMP-2 die Zellen sich eher weiter differenzieren (Jäger et al., 2008).

4.4.2. Einfluss der BMP-2 enthaltenden PLLA-Koll1-Blend-Fasern auf die Differenzierung und Matrixformation der hMSC

Die PLLA-Koll1-Blendfasern mit BMP-2 zeigte in der Genexpression gegenüber den PLLA-Koll1-Blendfasern ohne BMP-2 einen Anstieg der Gene, die u.a. für die Differenzierung der Stammzellen zu Osteoblasten notwendig ist, wie Kollagen 1, Alkalische Phosphatase und Osteocalcin (Jaiswal et al., 2000, Doi et al., 2002, Salasznyk et al., 2004) (siehe Kap. 3.4.1.). Somit bleibt die biologi-

sche Wirkung von BMP-2 trotz des Einspinnprozesses erhalten. Auch die Auswertung mittels der Fluoreszenzmikroskopie konnte eine stärkere Matrixformation durch BMP-2 nachweisen (siehe Kap. 3.4.2, Kap. 3.4.3.). Dass BMP-2 einen positiven Einfluss auf die Differenzierung von Stammzellen hat, wurde bereits in einigen Studien nachgewiesen (Kato et al., 2009, Liu et al., 2007, Lee et al., 2003, Komori et al., 1997, Schofer et al., 2011). So wurde z.B. eine höhere Expression der Alkalischen Phosphatase bei Vorläuferzellen durch BMP-2 nachgewiesen (Bae et al., 2001). Auch im Tierversuch konnte eine Hochregulation von Osteocalcin und Smad-5 durch BMP-2 nachgewiesen werden (Schofer et al., 2011).

BMP-2 bindet an seine Rezeptoren, wodurch es zur Phosphorylierung dieser und somit zur Phosphorylierung und Aktivierung von R-SMADs 1/5/8 kommt (Nohe et al., 2002). Durch eine Annäherung zwischen R-Smad 1/5/8 und co-Smad4, kommt es zur Translokation in den Zellkern und somit zur Genexpression BMP spezifischer Gene (Feng and Derynck, 2005, Shi and Massagué, 2003, Rosen, 2009). Zu diesen schon bekannten Forschungsergebnissen passen unsere Ergebnisse aus der Genexpressionsanalyse für Smad-5. Hier kam es durch BMP-2 zu einer signifikanten Hochregulation von Smad-5. Auch auf den PLLA-Koll1-Blendfasern ohne BMP-2 war es zu einer Hochregulation der Gene gekommen, die für die Differenzierung der hMSC notwendig sind (siehe Kap. 3.4.). Folglich vereinen die PLLA-Koll1-Blendfasern mit BMP-2 den osteoinduktiven Effekt von Kollagen Typ 1 und BMP-2. Dass die Hochregulation der für die Osteogenese wichtigen Gene besonders unter osteoinduktiven Bedingungen so eindeutig war, lässt sich durch die wechselseitige Verstärkung von BMP-2 und Dexamethason erklären (Jäger et al., 2008).

Neben dem schon vorher aufgeführten Effekt zwischen BMP-2 und sulfatierten Polysacchariden und dem von BMP-2 beeinflussten SMAD-Signaltransduktionsweg, der die Differenzierung der Stammzellen zu Osteoblasten anregt (Lin et al., 2008, Takada et al., 2003, Zhao et al., 2006, Rosen, 2009), gibt es noch einen bereits nachgewiesenen Effekt von BMP-2. So verstärkt BMP-2 die Wechselwirkung zwischen Integrinen und Kollagen und erhöht somit zusätzlich die Differenzierung (Jikko et al., 1999, Lai and Cheng, 2005). Durch die Interaktion zwischen der ECM und Integrinen kommt es über die Aktivierung von FAK zur Differenzierung der Zellen (Takeuchi et al., 1997,

Sotobori et al., 2006, Tamura et al., 2001). FAK aktiviert hierbei die ERK, eine MAPKinase, und regt dadurch die Differenzierung weiter an (Suzawa et al., 2002). Außerdem kommt es neben der BMP-2-Aktivierung zu einer direkten Wirkung von Kollagen an $\alpha 2\beta 1$ -Integrin und somit zur weiteren FAK-Aktivierung (Takeuchi et al., 1997). Dies erklärt den höheren Anstieg der Genexpression von FAK der Zellen, die auf PLLA-Koll1-Blend-BMP-Fasern kultiviert wurden gegenüber den Fasern ohne BMP-2 (siehe Kap. 3.4.4.).

MAPKinasen, wie ERK, aktivieren im Zellkern ATF2, c-Jun oder c-Fos, um Osteopontin, Alkalische Phosphatase (ALP) oder Kollagen I zu regulieren (Lai and Cheng, 2002), was eine erhöhte Expression von JUN erklären würde. Auch die MAPKinasen p38 und JNK sorgen über diesen Weg für Osteoblastendifferenzierung und werden ebenfalls positiv durch BMP-2 beeinflusst (Guicheux et al., 2003).

4.5. Fazit

Zusammenfassend lässt sich aufgrund unserer Ergebnisse vor dem Hintergrund bestehender Literatur davon ausgehen, dass die PLLA-Koll1-Blend-BMP-2-Fasern genutzt werden können, um die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege zu kombinieren. Sie vereinen die osteoinduktiven Effekte von Kollagen Typ 1 und BMP-2 und regen somit die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten an. So kam es zu einer Hochregulation der Gene Smad-5, Kollagen, Osteocalcin, Alkalische Phosphatase und FAK. Das Scaffold stellt somit einen weiteren Fortschritt im Zuge des Tissue Engineerings und der Knochendefektheilung dar.

Um das Scaffold weiter hinsichtlich seiner Haltbarkeit und mechanischen Stabilität zu untersuchen, wäre eine Übertragung des Versuchs auf ein Tiermodell sinnvoll. Außerdem bedarf es weiterer Untersuchungen des kontrollierten Release, um das Scaffold zu modifizieren.

5. Zusammenfassung

5.1. Deutsche Zusammenfassung

Neuartige Knochenersatzmaterialien gewinnen in der Orthopädie und der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie einen immer höheren Stellenwert bei der Behandlung von unüberbrückbaren Knochendefekten. Standard bei der Knochen transplantation ist der Einsatz von autogener Spongiosa aus dem Beckenkamm. Die darüber hinaus zunehmend eingesetzten synthetischen Knochenersatzmaterialien bestehen aus Metallen, Polymeren, Keramik und Kompositen und sollten als Voraussetzung die Prinzipien des Tissue Engineering erfüllen, sprich ein dreidimensionales Grundgerüst besitzen, das bestenfalls mit Wachstumsfaktoren und Stammzellen besiedelt wird. Häufig werden für das Tissue Engineering Polymerstoffe oder deren Nanofasern eingesetzt. So vereinen aus Polymeren gesponnene Nanofasern, eingesetzt als Knochenersatzstoffe, verschiedene Vorteile. Sie imitieren die extrazelluläre Matrix, was auf ihnen kultivierte Zellen zur Differenzierung, Migration und Proliferation anregt. Dabei hängt die biologische Wirksamkeit von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Fasern ab. Die aus PLLA gesponnen Fasern zeigen nach der Kultivierung mit mesenchymalen Stammzellen im Verlauf eine hohe Zelldichte bei einer niedrigen Zelldifferenzierung. Eine bessere Zelldifferenzierung und höhere Zelldichten erhält man bei einer Funktionalisierung der Zellen mit Kollagen Typ 1 oder dem Wachstumsfaktor BMP-2. In dieser Arbeit sollte ein möglicher kooperativer Effekt zwischen Kollagen Typ 1 und BMP-2 auf die Nanofasern übertragen werden. Dafür wurden Scaffolds aus PLLA-Fasern, PLLA-Koll1-Blend-Fasern und PLLA-Koll1-BMP-2-Fasern mit humanen mesenchymalen Stammzellen unter Wachstums- und osteoinduktiven Bedingungen über 22 Tage kultiviert. Im Verlauf wurde die Genexpression von Alkalischer Phosphatase, Osteokalcin und Kollagen Typ 1 bestimmt. Außerdem wurde die Genexpression der Signaltransduktionsmoleküle FAK und Smad-5 analysiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Ablagerung von Calcium und Kollagen Typ 1 im Extrazellulärraum sowie die Zelldichte dargestellt. Durch das Einfügen von BMP-2 in die PLLA-Koll1-Blend-Faser kam es zu einer Abnahme des Faserdurchmessers und der Porengröße. Auf den BMP-2 enthaltenden Scaffolds

zeigte sich eine bessere Adhäsion, aber eine schlechtere Proliferation der mesenchymalen Stammzellen. Außerdem zeigten die Zellen auf diesen Scaffolds einen Anstieg der Genexpression von Alkalischer Phosphatase, Osteocalcin und Kollagen Typ 1. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte eine höhere Ablagerung von Kollagen Typ 1 und Calcium in die extrazelluläre Matrix. Das Vorhandensein von BMP-2 in den Fasern führte zu einer Hochregulierung der Genexpression von FAK. Der Einfluss von Kollagen Typ 1 auf die Genregulierung zeigte sich vor allem in einer Hochregulierung von Smad-5. Folglich kann man die Einflüsse von BMP-2 und Kollagen Typ 1 auf die mesenchymalen Stammzellen, kultiviert auf PLLA-Fasern, kombinieren. Auf diese Weise lässt sich die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege erreichen, die zu einer zunehmenden Differenzierung der Stammzellen führen und dieses Scaffold zu einem möglichen Träger für mesenchymale Stammzellen im Zuge des Tissue Engineering von Knochengewebe machen.

5.2. Englische Zusammenfassung

New bone substitute materials take a great role in the treatment of bone defects in orthopedic, oral and maxillofacial surgery. Standard procedure for bone grafting is the use of autogenous cancellous bone from the iliac crest. Synthetic bone replacement materials consist of metals, polymers, ceramics and composites, and should require a three-dimensional skeleton and are, if at all, mixed with growth factors and stem cells. These are the properties of tissue engineering, which polymeric material is often used for. For example, spun nanofibers of polymers show several advantages. These imitate the extracellular matrix, which stimulates the cultured cells to differentiate, migrate and proliferate. The biological effect of this stimulation depends on the physical and chemical properties of the fibers. In this context, fibers that were spun from PLLA, after cultivation with mesenchymal stem cells, possess a high cell density and a low cell differentiation. A better cell differentiation is obtained by functionalizing of the cells with collagen type 1 or the growth factor BMP-2. Objective of this dissertation is to show a possible cooperative effect between type 1 collagen and BMP-2. For this purpose, scaffolds made of PLLA, PLLA-coll1-blend and PLLA-

coll1-blend-BMP-2 were cultured with human mesenchymal stem cells under growth and osteoinductive conditions for 22 days. In the course of this process the gene expression of alkaline phosphatase, osteocalcin, and collagen type 1 was determined. In addition, the gene expression of the signal transduction molecules FAK and Smad 5 was analyzed. The cell density and the deposition of calcium and collagen type 1 in the extracellular space were shown by fluorescence microscopy. The insertion of BMP-2 in the PLLA-coll1-blend fiber caused a decrease in the diameter and the pore size. The BMP-2 containing scaffolds showed a better adhesion but a lower proliferation of mesenchymal stem cells. In addition, the cells on these scaffolds showed an increase in gene expression of alkaline phosphatase, osteocalcin and collagen type 1. The fluorescence microscopy showed a higher deposition of collagen type 1 and calcium. The presence of BMP-2 in the fibers resulted in an upregulation of gene expression of FAK. The influence of collagen type 1 revealed the gene regulation primarily in up-regulation of Smad 5. This means that by cultivating mesenchymal stem cells on PLLA fibers a combined effect of BMP-2 and collagen type 1 can be realized. This activates different signaling pathways leading to an increasing differentiation of stem cells. Thus the scaffold can be used for tissue engineering.

Literaturverzeichnis

- AEBI, M., ZUBER, K. & MARCHESI, D. 1991. Treatment of cervical spine injuries with anterior plating. Indications, techniques, and results. *Spine (Phila Pa 1976)*, 16, S38-45.
- AGARWAL, R., WILLIAMS, K., UMSCHIED, C. & WELCH, W. 2009. Osteoinductive bone graft substitutes for lumbar fusion: a systematic review. *J Neurosurg Spine*, 11, 729-40.
- ANSELME, K. 2000. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21, 667-81.
- AXELRAD, T. & EINHORN, T. 2009. Bone morphogenetic proteins in orthopaedic surgery. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20, 481-8.
- AXELRAD, T., KAKAR, S. & EINHORN, T. 2007. New technologies for the enhancement of skeletal repair. *Injury*, 38 Suppl 1, S49-62.
- AYRES, C. E., JHA, B. S., SELL, S. A., BOWLIN, G. L. & SIMPSON, D. G. 2010. Nanotechnology in the design of soft tissue scaffolds: innovations in structure and function. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, 20-34.
- BAE, S., LEE, K., ZHANG, Y. & ITO, Y. 2001. Intimate relationship between TGF-beta/BMP signaling and runt domain transcription factor, PEBP2/CBF. *J Bone Joint Surg Am*, 83-A Suppl 1, S48-55.
- BARBAGALLO, I., VANELLA, A., PETERSON, S., KIM, D., TIBULLO, D., GIALONGO, C., VANELLA, L., PARRINELLO, N., PALUMBO, G., RAIMONDO, F., ABRAHAM, N. & ASPRINIO, D. 2009. Overexpression of heme oxygenase-1 increases human osteoblast stem cell differentiation. *J Bone Miner Metab*.
- BAUER, T. & MUSCHLER, G. 2000. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*, 10-27.
- BEAMAN, F. D., BANCROFT, L. W., PETERSON, J. J. & KRANSDORF, M. J. 2006. Bone Graft Materials and Synthetic Substitutes. *Radiologic Clinics of North America*, 44, 451-461.
- BOGNITZKI, M., CZADO, W., FRESE, T., SCHAPER, A., HELLWIG, M., STEINHART, M., GREINER, A. & WENDORFF, J. H. 2001. Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Advanced Materials*, 13, 70-72.
- BOUDRIOT, U., DERSCH, R., GOETZ, B., GRISS, P., GREINER, A. & WENDORFF, J. 2004. [Electrospun poly-L-lactide nanofibres as scaffolds for tissue engineering]. *Biomed Tech (Berl)*, 49, 242-7.
- BOUDRIOT, U., DERSCH, R., GREINER, A. & WENDORFF, J. 2006. Electrospinning approaches toward scaffold engineering--a brief overview. *Artif Organs*, 30, 785-92.
- BRENDEL, C., KUKLICK, L., HARTMANN, O., KIM, T., BOUDRIOT, U., SCHWELL, D. & NEUBAUER, A. 2005. Distinct gene expression profile of human mesenchymal stem cells in comparison to skin fibroblasts

- employing cDNA microarray analysis of 9600 genes. *Gene Expr*, 12, 245-57.
- BREWSTER, J. L., DE VALOIR, T., DWYER, N. D., WINTER, E. & GUSTIN, M. C. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259, 1760-3.
- BRUDER, S., JAISWAL, N. & HAYNESWORTH, S. 1997. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*, 64, 278-94.
- BRUDER, S. P. & FOX, B. S. 1999. Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res*, S68-83.
- BULLENS, P., MINDERHOUD, N., DE WAAL MALEFIJT, M., VETH, R., BUMA, P. & SCHREUDER, H. 2009. Survival of massive allografts in segmental oncological bone defect reconstructions. *Int Orthop*, 33, 757-60.
- BUSER, D., DULA, K., BELSER, U., HIRT, H. P. & BERTHOLD, H. 1993. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 13, 29-45.
- CALLAN, D. P., SALKELD, S. L. & SCARBOROUGH, N. 2000. Histologic analysis of implant sites after grafting with demineralized bone matrix putty and sheets. *Implant Dent*, 9, 36-44.
- CANCEDDA, R., MASTROGIACOMO, M., BIANCHI, G., DERUBEIS, A., MURAGLIA, A. & QUARTO, R. 2003. Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Novartis Found Symp*, 249, 133-43; discussion 143-7, 170-4, 239-41.
- CAO, X. & CHEN, D. 2005. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene*, 357, 1-8.
- CAPLAN, A. I. 2005. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng*, 11, 1198-211.
- CARSON, J. & BOSTROM, M. 2007. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury*, 38 Suppl 1, S33-7.
- CASPER, C. L., STEPHENS, J. S., TASSI, N. G., CHASE, D. B. & RABOLT, J. F. 2004. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules*, 37, 573-578.
- CATANESE III, J., IVERSON, E. P., NG, R. K. & KEAVENY, T. M. 1999. Heterogeneity of the mechanical properties of demineralized bone. *Journal of Biomechanics*, 32, 1365-1369.
- CHAN, C., LIAO, S., LI, B., LAREU, R., LARRICK, J., RAMAKRISHNA, S. & RAGHUNATH, M. 2009. Early adhesive behavior of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on collagen electrospun fibers. *Biomed Mater*, 4, 035006.
- CHANDLER, R., CHANDLER, K., MCFARLAND, K. & MORTLOCK, D. 2007. Bmp2 transcription in osteoblast progenitors is regulated by a distant 3'

- enhancer located 156.3 kilobases from the promoter. *Mol Cell Biol*, 27, 2934-51.
- CHAU, A. & MOBBS, R. 2009. Bone graft substitutes in anterior cervical discectomy and fusion. *Eur Spine J*, 18, 449-64.
- CHEN, F., FENG, X., WU, W., OUYANG, H., GAO, Z., CHENG, X., HOU, R. & MAO, T. 2007. Segmental bone tissue engineering by seeding osteoblast precursor cells into titanium mesh-coral composite scaffolds. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 36, 822-7.
- CHENG, H., JIANG, W., PHILLIPS, F., HAYDON, R., PENG, Y., ZHOU, L., LUU, H., AN, N., BREYER, B., VANICHAKARN, P., SZATKOWSKI, J., PARK, J. & HE, T. 2003a. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*, 85-A, 1544-52.
- CHENG, S., LECANDA, F., DAVIDSON, M., WARLOW, P., ZHANG, S., ZHANG, L., SUZUKI, S., ST JOHN, T. & CIVITELLI, R. 1998. Human osteoblasts express a repertoire of cadherins, which are critical for BMP-2-induced osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res*, 13, 633-44.
- CHENG, S., SHAO, J., CHARLTON-KACHIGIAN, N., LOEWY, A. & TOWLER, D. 2003b. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem*, 278, 45969-77.
- CHIKAZU, D., LI, X., KAWAGUCHI, H., SAKUMA, Y., VOZNESENSKY, O., ADAMS, D., XU, M., HOSHIO, K., KATAVIC, V., HERSCHMAN, H., RAISZ, L. & PILBEAM, C. 2002. Bone morphogenetic protein 2 induces cyclo-oxygenase 2 in osteoblasts via a Cbfa1 binding site: role in effects of bone morphogenetic protein 2 in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res*, 17, 1430-40.
- COETZEE, A. S. 1980. Regeneration of bone in the presence of calcium sulfate. *Arch Otolaryngol*, 106, 405-9.
- CONSTANTZ, B. R., ISON, I. C., FULMER, M. T., POSER, R. D., SMITH, S. T., VANWAGONER, M., ROSS, J., GOLDSTEIN, S. A., JUPITER, J. B. & ROSENTHAL, D. I. 1995. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science*, 267, 1796-9.
- COOL, S. & NURCOMBE, V. 2006. Heparan sulfate regulation of progenitor cell fate. *J Cell Biochem*, 99, 1040-51.
- DAMIEN, C. J. & PARSONS, J. R. 1991. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater*, 2, 187-208.
- DEMERS, C. 1999. Bone morphogenetic proteins. *Science & Medicine*, 6, 8-17.
- DERSCH, R., LIU, T., SCHAPER, A. K., GREINER, A. & WENDORFF, J. H. 2003. Electrospun nanofibers: Internal structure and intrinsic orientation. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41, 545-553.

- DERUBEIS, A. R. & CANCEDDA, R. 2004. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng*, 32, 160-5.
- DHANASEKARAN, N. & PREMKUMAR REDDY, E. 1998. Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*, 17, 1447-55.
- DOI, M., NAGANO, A. & NAKAMURA, Y. 2002. Genome-wide screening by cDNA microarray of genes associated with matrix mineralization by human mesenchymal stem cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 290, 381-90.
- DONZELLI, E., SALVADÈ, A., MIMO, P., VIGANÒ, M., MORRONE, M., PAPAGNA, R., CARINI, F., ZAOPO, A., MILOSO, M., BALDONI, M. & TREDICI, G. 2007. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Arch Oral Biol*, 52, 64-73.
- DOSUNMU, O. O., CHASE, G. G., KATAPHINAN, W. & RENEKER, D. H. 2006. Electrospinning of polymer nanofibres from multiple jets on a porous tubular surface. *Nanotechnology*, 17, 1123-1127.
- DRAETTA, G. & BEACH, D. 1988. Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell*, 54, 17-26.
- DROSSE, I., VOLKMER, E., CAPANNA, R., DE BIASE, P., MUTSCHLER, W. & SCHIEKER, M. 2008. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury*, 39 Suppl 2, S9-20.
- DU, C., SCHNEIDER, G. B., ZAHARIAS, R., ABBOTT, C., SEABOLD, D., STANFORD, C. & MORADIAN-OLDAK, J. 2005. Apatite/amelogenin coating on titanium promotes osteogenic gene expression. *J Dent Res*, 84, 1070-4.
- DUBOSE, J., CUTSHALL, C. & METTERS, A. 2005. Controlled release of tethered molecules via engineered hydrogel degradation: model development and validation. *J Biomed Mater Res A*, 74, 104-16.
- DZENIS, Y. 2004. Material science. Spinning continuous fibers for nanotechnology. *Science*, 304, 1917-9.
- EL-AMIN, S. F., LU, H. H., KHAN, Y., BUREMS, J., MITCHELL, J., TUAN, R. S. & LAURENCIN, C. T. 2003. Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 1213-21.
- FENG, X. & DERYNCK, R. 2005. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 659-93.
- FIELDS, G., LAUER, J., DORI, Y., FORNS, P., YU, Y. & TIRRELL, M. 1998. Protein-like molecular architecture: biomaterial applications for inducing cellular receptor binding and signal transduction. *Biopolymers*, 47, 143-51.
- FREITAS, C. & DALMAU, S. 2006. Multiple sources of non-embryonic multipotent stem cells: processed lipoaspirates and dermis as promising alternatives to bone-marrow-derived cell therapies. *Cell Tissue Res*, 325, 403-11.

- FRIEDENSTEIN, A. J., DERIGLASOVA, U. F., KULAGINA, N. N., PANASUK, A. F., RUDAKOWA, S. F., LURIA, E. A. & RUADKOW, I. A. 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*, 2, 83-92.
- FRIEDENSTEIN, A. J., GORSKAJA, J. F. & KULAGINA, N. N. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4, 267-74.
- FRIEDMAN, C. D., COSTANTINO, P. D., SYNDERMAN, C. H., CHOW, L. C. & TAKAGI, S. 2000. Reconstruction of the frontal sinus and frontofacial skeleton with hydroxyapatite cement. *Arch Facial Plast Surg*, 2, 124-9.
- FUENTEALBA, L., EIVERS, E., IKEDA, A., HURTADO, C., KURODA, H., PERA, E. & DE ROBERTIS, E. 2007. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell*, 131, 980-93.
- GIANNOUDIS, P., DINOPOULOS, H. & TSIRIDIS, E. 2005. Bone substitutes: an update. *Injury*, 36 Suppl 3, S20-7.
- GIANNOUDIS, P. V., EINHORN, T. A. & MARSH, D. 2007a. Fracture healing: the diamond concept. *Injury*, 38 Suppl 4, S3-6.
- GIANNOUDIS, P. V., PSARAKIS, S., KANAKARIS, N. K. & PAPE, H. C. 2007b. Biological enhancement of bone healing with Bone Morphogenetic Protein-7 at the clinical setting of pelvic girdle non-unions. *Injury*, 38 Suppl 4, S43-8.
- GIAVARESI, G., TSCHON, M., BORSARI, V., DALY, J., LIGGAT, J., FINI, M., BONAZZI, V., NICOLINI, A., CARPI, A., MORRA, M., CASSINELLI, C. & GIARDINO, R. 2004. New polymers for drug delivery systems in orthopaedics: in vivo biocompatibility evaluation. *Biomed Pharmacother*, 58, 411-7.
- GOPAL, R., KAUR, S., FENG, C. Y., CHAN, C., RAMAKRISHNA, S., TUBE, S. & MATSUURA, T. 2007. Electrospun nanofibrous polysulfone membranes as pre-filters: Particulate removal. *Journal of Membrane Science*, 289, 210-219.
- GREINER, A. & WENDORFF, J. 2007. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46, 5670-703.
- GUICHEUX, J., LEMONNIER, J., GHAYOR, C., SUZUKI, A., PALMER, G. & CAVERZASIO, J. 2003. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res*, 18, 2060-8.
- H Aidar, Z., Hamdy, R. & Tabrizian, M. 2009. Delivery of recombinant bone morphogenetic proteins for bone regeneration and repair. Part B: Delivery systems for BMPs in orthopaedic and craniofacial tissue engineering. *Biotechnol Lett*, 31, 1825-35.
- HAN, J., LEE, J. D., BIBBS, L. & ULEVITCH, R. J. 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265, 808-11.

- HARTGERINK, J., BENIASH, E. & STUPP, S. 2001. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science*, 294, 1684-8.
- HARVEY, E., HENDERSON, J. & VENGALLATORE, S. 2010. Nanotechnology and bone healing. *J Orthop Trauma*, 24 Suppl 1, S25-30.
- HELM, G. A. 2005. Bone graft substitutes for use in spinal fusions. *Clin Neurosurg*, 52, 250-5.
- HENCH, L. L. & WILSON, J. 1984. Surface-active biomaterials. *Science*, 226, 630-6.
- HOHMAN, M. M., SHIN, M., RUTLEDGE, G. & BRENNER, M. P. 2001a. Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory. *Physics of Fluids*, 13, 2201-2220.
- HOHMAN, M. M., SHIN, M., RUTLEDGE, G. & BRENNER, M. P. 2001b. Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications. *Physics of Fluids*, 13, 2221-2236.
- HOLLINGER, J. & KLEINSCHMIDT, J. 1990. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*, 1, 60-8.
- HOSSEINKHANI, H., HOSSEINKHANI, M., KHADEMHOSEINI, A. & KOBAYASHI, H. 2007. Bone regeneration through controlled release of bone morphogenetic protein-2 from 3-D tissue engineered nano-scaffold. *J Control Release*, 117, 380-6.
- HUTMACHER, D. & COOL, S. 2007. Concepts of scaffold-based tissue engineering--the rationale to use solid free-form fabrication techniques. *J Cell Mol Med*, 11, 654-69.
- HUTMACHER, D. W. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529-43.
- HYNES, R. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-87.
- JABBARZADEH, E., STARNES, T., KHAN, Y., JIANG, T., WIRTEL, A., DENG, M., LV, Q., NAIR, L., DOTY, S. & LAURENCIN, C. 2008. Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 11099-104.
- JAISWAL, N., HAYNESWORTH, S., CAPLAN, A. & BRUDER, S. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, 64, 295-312.
- JAISWAL, R., JAISWAL, N., BRUDER, S., MBALAVIELE, G., MARSHAK, D. & PITTENGER, M. 2000. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 275, 9645-52.
- JARCHO, M. 1981. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop Relat Res*, 259-78.
- JENA, A. 2002. Characterization of pore structure of filtration media. *Fluid Particle Separation Journal*, 4, 227-241.

- JIANG, Y., JAHAGIRDAR, B., REINHARDT, R., SCHWARTZ, R., KEENE, C., ORTIZ-GONZALEZ, X., REYES, M., LENVIK, T., LUND, T., BLACKSTAD, M., DU, J., ALDRICH, S., LISBERG, A., LOW, W., LARGAESPADA, D. & VERFAILLIE, C. 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 41-9.
- JIKKO, A., HARRIS, S., CHEN, D., MENDRICK, D. & DAMSKY, C. 1999. Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2. *J Bone Miner Res*, 14, 1075-83.
- JÄGER, M., FISCHER, J., DOHRN, W., LI, X., AYERS, D., CZIBERE, A., PRALL, W., LENSING-HÖHN, S. & KRAUSPE, R. 2008. Dexamethasone modulates BMP-2 effects on mesenchymal stem cells in vitro. *J Orthop Res*, 26, 1440-8.
- JØRGENSEN, N., HENRIKSEN, Z., SØRENSEN, O. & CIVITELLI, R. 2004. Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts. *Steroids*, 69, 219-26.
- KATO, S., KAWABATA, N., SUZUKI, N., OHMURA, M. & TAKAGI, M. 2009. Bone morphogenetic protein-2 induces the differentiation of a mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26, into mature osteoblasts and adipocytes. *Life Sci*, 84, 302-10.
- KHAN, S., CAMMISA, F. J., SANDHU, H., DIWAN, A., GIRARDI, F. & LANE, J. 2005. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*, 13, 77-86.
- KHAN, Y., YASZEMSKI, M., MIKOS, A. & LAURENCIN, C. 2008. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg Am*, 90 Suppl 1, 36-42.
- KIM, K., LUU, Y., CHANG, C., FANG, D., HSIAO, B., CHU, B. & HADJIARGYROU, M. 2004. Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *J Control Release*, 98, 47-56.
- KLAWITTER, J. J. & WEINSTEIN, A. M. 1974. The status of porous materials to obtain direct skeletal attachment by tissue ingrowth. *Acta Orthop Belg*, 40, 755-65.
- KOCH, H., JADLOWIEC, J., WHALEN, J., ROBBINS, P., LATTERMANN, C., FU, F., MERK, H. & HOLLINGER, J. 2005. [Osteoblastic differentiation of human adult mesenchymal stem cells after through gene transfer of BMP-2 in the absence of dexamethasone]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 143, 684-90.
- KOLÁČNÁ, L., BAKESOVÁ, J., VARGA, F., KOSTÁKOVÁ, E., PLÁNKA, L., NECAS, A., LUKÁS, D., AMLER, E. & PELOUCH, V. 2007. Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix. *Physiol Res*, 56 Suppl 1, S51-60.
- KOMORI, T., YAGI, H., NOMURA, S., YAMAGUCHI, A., SASAKI, K., DEGUCHI, K., SHIMIZU, Y., BRONSON, R., GAO, Y., INADA, M., SATO, M., OKAMOTO, R., KITAMURA, Y., YOSHIKI, S. & KISHIMOTO, T. 1997. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89, 755-64.

- KOSKINEN, E. 1978. Wide resection of primary tumors of bone and replacement with massive bone grafts: an improved technique for transplanting allogeneic bone grafts. *Clin Orthop Relat Res*, 302-19.
- KRAUS, K. & KIRKER-HEAD, C. 2006. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg*, 35, 232-42.
- KRIEGEL, C., KIT, K., MCCLEMENTS, D. & WEISS, J. 2009. Nanofibers as carrier systems for antimicrobial microemulsions. Part I: fabrication and characterization. *Langmuir*, 25, 1154-61.
- KÜBLER, A., NEUGEBAUER, J., OH, J., SCHEER, M. & ZÖLLER, J. 2004. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes: an in vitro study. *Implant Dent*, 13, 171-9.
- LAI, C., CHAUDHARY, L., FAUSTO, A., HALSTEAD, L., ORY, D., AVIOLI, L. & CHENG, S. 2001. Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 276, 14443-50.
- LAI, C. & CHENG, S. 2002. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 277, 15514-22.
- LAI, C. & CHENG, S. 2005. Alphasbeta integrins play an essential role in BMP-2 induction of osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*, 20, 330-40.
- LAJTHA, L. G. 1967. Stem cells and their properties. *Proc Can Cancer Conf*, 7, 31-9.
- LANE, J. M., TOMIN, E. & BOSTROM, M. P. 1999. Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop Relat Res*, S107-17.
- LANGER, R. 1990. New methods of drug delivery. *Science*, 249, 1527-33.
- LATELLA, L., SACCO, A., PAJALUNGA, D., TIAINEN, M., MACERA, D., D'ANGELO, M., FELICI, A., SACCHI, A. & CRESCENZI, M. 2001. Reconstitution of cyclin D1-associated kinase activity drives terminally differentiated cells into the cell cycle. *Mol Cell Biol*, 21, 5631-43.
- LEE, M., KWON, T., PARK, H., WOZNEY, J. & RYOO, H. 2003. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun*, 309, 689-94.
- LEONG, M., RASHEED, M., LIM, T. & CHIAN, K. 2009. In vitro cell infiltration and in vivo cell infiltration and vascularization in a fibrous, highly porous poly(D,L-lactide) scaffold fabricated by cryogenic electrospinning technique. *J Biomed Mater Res A*, 91, 231-40.
- LEWANDROWSKI, K., GRESSER, J., WISE, D. & TRANTOL, D. 2000. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats. *Biomaterials*, 21, 757-64.
- LI, D., WANG, Y. L. & XIA, Y. N. 2003. Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays. *Nano Letters*, 3, 1167-1171.

- LI, D. & XIA, Y. 2004. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? *Advanced Materials*, 16, 1151-1170.
- LIAO, S., LI, B., MA, Z., WEI, H., CHAN, C. & RAMAKRISHNA, S. 2006. Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. *Biomed Mater*, 1, R45-53.
- LIFESO, R. & AL-SAATI, F. 1984. The treatment of infected and uninfected non-union. *J Bone Joint Surg Br*, 66, 573-9.
- LIN, H., ZHAO, Y., SUN, W., CHEN, B., ZHANG, J., ZHAO, W., XIAO, Z. & DAI, J. 2008. The effect of crosslinking heparin to demineralized bone matrix on mechanical strength and specific binding to human bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials*, 29, 1189-97.
- LIN, J., DING, B. & YU, J. 2010. Direct Fabrication of Highly Nanoporous Polystyrene Fibers via Electrospinning. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2, 521-8.
- LIN, T., WANG, H. X. & WANG, X. G. 2005. Self-crimping bicomponent nanofibers electrospun from polyacrylonitrile and elastomeric polyurethane. *Advanced Materials*, 17, 2699-+.
- LIU, T., GAO, Y., SAKAMOTO, K., MINAMIZATO, T., FURUKAWA, K., TSUKAZAKI, T., SHIBATA, Y., BESSHO, K., KOMORI, T. & YAMAGUCHI, A. 2007. BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx2-deficient cell lines. *J Cell Physiol*, 211, 728-35.
- LIU, X. & MA, P. 2004. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng*, 32, 477-86.
- LIU, Z., SHI, W., JI, X., SUN, C., JEE, W., WU, Y., MAO, Z., NAGY, T., LI, Q. & CAO, X. 2004. Molecules mimicking Smad1 interacting with Hox stimulate bone formation. *J Biol Chem*, 279, 11313-9.
- LOTY, C., SAUTIER, J. M., BOULEKBACHE, H., KOKUBO, T., KIM, H. M. & FOREST, N. 2000. In vitro bone formation on a bone-like apatite layer prepared by a biomimetic process on a bioactive glass-ceramic. *J Biomed Mater Res*, 49, 423-34.
- MA, P. & ZHANG, R. 1999. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J Biomed Mater Res*, 46, 60-72.
- MA, Z., KOTAKI, M., INAI, R. & RAMAKRISHNA, S. 2005. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Eng*, 11, 101-9.
- MARETSCHKE, S., GREINER, A. & KISSEL, T. 2008. Electrospun biodegradable nanofiber nonwovens for controlled release of proteins. *J Control Release*, 127, 180-7.
- MARIE, P. & FROMIGUÉ, O. 2006. Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regen Med*, 1, 539-48.
- MASTROGIACOMO, M., MURAGLIA, A., KOMLEV, V., PEYRIN, F., RUSTICHELLI, F., CROVACE, A. & CANCEDDA, R. 2005. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res*, 8, 277-84.

- MATEJOVSKY, Z. J., MATEJOVSKY, Z. & KOFRANEK, I. 2006. Massive allografts in tumour surgery. *Int Orthop*, 30, 478-83.
- MATSUMINE, A., MYOUI, A., KUSUZAKI, K., ARAKI, N., SETO, M., YOSHIKAWA, H. & UCHIDA, A. 2004. Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumour surgery. A long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Br*, 86, 719-25.
- MATTHEWS, J., WNEK, G., SIMPSON, D. & BOWLIN, G. 2002. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 3, 232-8.
- MCCANN, J., MARQUEZ, M. & XIA, Y. 2006. Highly porous fibers by electrospinning into a cryogenic liquid. *J Am Chem Soc*, 128, 1436-7.
- MCCORMICK, F. 1993. Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature*, 363, 15-6.
- MEGAS, P. & PANAGIOTIS, M. 2005. Classification of non-union. *Injury*, 36 Suppl 4, S30-7.
- MEYERS, V., ZAYZAFOON, M., GONDA, S., GATHINGS, W. & MCDONALD, J. 2004. Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 93, 697-707.
- MIKOS, A., LYMAN, M., FREED, L. & LANGER, R. 1994. Wetting of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials*, 15, 55-8.
- MILLER, A. C., MOG, S., MCKINNEY, L., LUO, L., ALLEN, J., XU, J. & PAGE, N. 2001. Neoplastic transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by heavy metal-tungsten alloy particles: induction of genotoxic effects. *Carcinogenesis*, 22, 115-25.
- MIYAZONO, K., MAEDA, S. & IMAMURA, T. 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16, 251-63.
- MOODIE, S. & WOLFMAN, A. 1994. The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet*, 10, 44-8.
- MOORE, W., GRAVES, S. & BAIN, G. 2001. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*, 71, 354-61.
- MORRISON, S. J., SHAH, N. M. & ANDERSON, D. J. 1997. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88, 287-98.
- MUSCHLER, G., NAKAMOTO, C. & GRIFFITH, L. 2004. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am*, 86-A, 1541-58.
- NAKASHIMA, K., ZHOU, X., KUNKEL, G., ZHANG, Z., DENG, J., BEHRINGER, R. & DE CROMBRUGGHE, B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108, 17-29.
- NEFF, J., CALDWELL, K. & TRESKO, P. 1998. A novel method for surface modification to promote cell attachment to hydrophobic substrates. *J Biomed Mater Res*, 40, 511-9.

- NISHIYAMA, N. & KATAOKA, K. 2006. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacol Ther*, 112, 630-48.
- NIU, X., FENG, Q., WANG, M., GUO, X. & ZHENG, Q. 2009. Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2. *J Control Release*, 134, 111-7.
- NOHE, A., HASSEL, S., EHRLICH, M., NEUBAUER, F., SEBALD, W., HENIS, Y. & KNAUS, P. 2002. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem*, 277, 5330-8.
- OWEN, M. & FRIEDENSTEIN, A. J. 1988. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*, 136, 42-60.
- PALETTA, J., BOCKELMANN, S., WALZ, A., THEISEN, C., WENDORFF, J., GREINER, A., FUCHS-WINKELMANN, S. & SCHOFER, M. 2009a. RGD-functionalisation of PLLA nanofibers by surface coupling using plasma treatment: influence on stem cell differentiation. *J Mater Sci Mater Med*.
- PALETTA, J., ERFFMEIER, K., THEISEN, C., HUSSAIN, D., WENDORFF, J., GREINER, A., FUCHS-WINKELMANN, S. & SCHOFER, M. 2009b. Influence of poly-(L-lactic acid) nanofiber functionalization on maximum load, Young's modulus, and strain of nanofiber scaffolds before and after cultivation of osteoblasts: an in vitro study. *ScientificWorldJournal*, 9, 1382-93.
- PAPE, H., EVANS, A. & KOBBE, P. 2010. Autologous bone graft: properties and techniques. *J Orthop Trauma*, 24 Suppl 1, S36-40.
- PEARSON, G., ROBINSON, F., BEERS GIBSON, T., XU, B. E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K. & COBB, M. H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22, 153-83.
- PELLED, G., BEN-ARAV, A., HOCK, C., REYNOLDS, D., YAZICI, C., ZILBERMAN, Y., GAZIT, Z., AWAD, H., GAZIT, D. & SCHWARZ, E. 2010. Direct gene therapy for bone regeneration: gene delivery, animal models, and outcome measures. *Tissue Eng Part B Rev*, 16, 13-20.
- PELTOLA, M., SUONPÄÄ, J., AITASALO, K., MÄÄTTÄNEN, H., ANDERSSON, O., YLI-URPO, A. & LAIPPALA, P. 2000. Experimental follow-up model for clinical frontal sinus obliteration with bioactive glass (S53P4). *Acta Otolaryngol Suppl*, 543, 167-9.
- PITTINGER, M., MACKAY, A., BECK, S., JAISWAL, R., DOUGLAS, R., MOSCA, J., MOORMAN, M., SIMONETTI, D., CRAIG, S. & MARSHAK, D. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.
- POTTEN, C. S. & LOEFFLER, M. 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, 110, 1001-20.

- PUTZIER, M., STRUBE, P., FUNK, J., GROSS, C., MÖNIG, H., PERKA, C. & PRUSS, A. 2009. Allogenic versus autologous cancellous bone in lumbar segmental spondylodesis: a randomized prospective study. *Eur Spine J*, 18, 687-95.
- RANKIN, C., BUNTON, T., LAWLER, A. & LEE, S. 2000. Regulation of left-right patterning in mice by growth/differentiation factor-1. *Nat Genet*, 24, 262-5.
- REILLY, G., GOLDEN, E., GRASSO-KNIGHT, G. & LEBOY, P. 2005. Differential effects of ERK and p38 signaling in BMP-2 stimulated hypertrophy of cultured chick sternal chondrocytes. *Cell Commun Signal*, 3, 3.
- RENEKER, D. H. & CHUN, I. 1996. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*, 7, 216-223.
- RODRÍGUEZ, J., MONTECINOS, L., RÍOS, S., REYES, P. & MARTÍNEZ, J. 2000. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J Cell Biochem*, 79, 557-65.
- RODRÍGUEZ-LORENZO, L. M. & FERREIRA, J. M. F. 2004. Development of porous ceramic bodies for applications in tissue engineering and drug delivery systems. *Materials Research Bulletin*, 39, 83-91.
- RONZIÈRE, M., AUBERT-FOUCHER, E., GOUTTENOIRE, J., BERNAUD, J., HERBAGE, D. & MALLEIN-GERIN, F. 2005. Integrin alpha1beta1 mediates collagen induction of MMP-13 expression in MC615 chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1746, 55-64.
- ROSEN, V. 2009. BMP2 signaling in bone development and repair. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20, 475-80.
- ROSS, N., TACCONI, L. & MILES, J. 2000. Heterotopic bone formation causing recurrent donor site pain following iliac crest bone harvesting. *Br J Neurosurg*, 14, 476-9.
- ROUSE, J., COHEN, P., TRIGON, S., MORANGE, M., ALONSO-LLAMAZARES, A., ZAMANILLO, D., HUNT, T. & NEBREDA, A. R. 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, 78, 1027-37.
- RUTLEDGE, G. & FRIDRIKH, S. 2007. Formation of fibers by electrospinning. *Adv Drug Deliv Rev*, 59, 1384-91.
- RYOO, H., LEE, M. & KIM, Y. 2006. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*, 366, 51-7.
- SAITO, S., YANO, K., SHARMA, S., MCMAHON, H. & SHIMASAKI, S. 2008. Characterization of the post-translational modification of recombinant human BMP-15 mature protein. *Protein Sci*, 17, 362-70.
- SALASZNYK, R., WILLIAMS, W., BOSKEY, A., BATORSKY, A. & PLOPPER, G. 2004. Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic

- Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol*, 2004, 24-34.
- SAMARTZIS, D., KHANNA, N., SHEN, F. & AN, H. 2005. Update on bone morphogenetic proteins and their application in spine surgery. *J Am Coll Surg*, 200, 236-48.
- SCHAEFFER, H. & WEBER, M. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, 19, 2435-44.
- SCHLAEPFER, D., HANKS, S., HUNTER, T. & VAN DER GEER, P. 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, 372, 786-91.
- SCHMIDMAIER, G., CAPANNA, R., WILDEMANN, B., BEQUE, T. & LOWENBERG, D. 2009. Bone morphogenetic proteins in critical-size bone defects: what are the options? *Injury*, 40 Suppl 3, S39-43.
- SCHMIDMAIER, G., LUCKE, M., SCHWABE, P., RASCHKE, M., HAAS, N. & WILDEMANN, B. 2006. Collective review: bioactive implants coated with poly(D,L-lactide) and growth factors IGF-I, TGF-beta1, or BMP-2 for stimulation of fracture healing. *J Long Term Eff Med Implants*, 16, 61-9.
- SCHMIDMAIER, G., SCHWABE, P., STROBEL, C. & WILDEMANN, B. 2008. Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics. *Injury*, 39 Suppl 2, S37-43.
- SCHMIDMAIER, G., WILDEMANN, B., CROMME, F., KANDZIORA, F., HAAS, N. & RASCHKE, M. 2002. Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone*, 30, 816-22.
- SCHMIDT-ROHLFING, B., TZIOUPIS, C., MENZEL, C. & PAPE, H. 2009. [Tissue engineering of bone tissue. Principles and clinical applications]. *Unfallchirurg*, 112, 785-94; quiz 795.
- SCHOFER, M., BOUDRIOT, U., BOCKELMANN, S., WALZ, A., WENDORFF, J., GREINER, A., PALETTA, J. & FUCHS-WINKELMANN, S. 2009a. Effect of direct RGD incorporation in PLLA nanofibers on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med*, 20, 1535-40.
- SCHOFER, M., BOUDRIOT, U., LEIFELD, I., SÜTTERLIN, R., RUDISILE, M., WENDORFF, J., GREINER, A., PALETTA, J. & FUCHS-WINKELMANN, S. 2009b. Characterization of a PLLA-collagen I blend nanofiber scaffold with respect to growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal*, 9, 118-29.
- SCHOFER, M., BOUDRIOT, U., WACK, C., LEIFELD, I., GRÄBEDÜNKE, C., DERSCH, R., RUDISILE, M., WENDORFF, J., GREINER, A., PALETTA, J. & FUCHS-WINKELMANN, S. 2009c. Influence of nanofibers on the growth and osteogenic differentiation of stem cells: a comparison of biological collagen nanofibers and synthetic PLLA fibers. *J Mater Sci Mater Med*, 20, 767-74.

- SCHOFER, M., FUCHS-WINKELMANN, S., GRÄBEDÜNDEL, C., WACK, C., DERSCH, R., RUDISILE, M., WENDORFF, J., GREINER, A., PALETTA, J. & BOUDRIOT, U. 2008. Influence of poly(L-lactic acid) nanofibers and BMP-2-containing poly(L-lactic acid) nanofibers on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal*, 8, 1269-79.
- SCHOFER, M. D., ROESSLER, P. P., SCHAEFER, J., THEISEN, C., SCHLIMME, S., HEVERHAGEN, J. T., VOELKER, M., DERSCH, R., AGARWAL, S., FUCHS-WINKELMANN, S. & PALETTA, J. R. 2011. Electrospun PLLA nanofiber scaffolds and their use in combination with BMP-2 for reconstruction of bone defects. *PLoS One*, 6, e25462.
- SCHOLZEN, T. & GERDES, J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182, 311-22.
- SCHWAPPACHER, R., WEISKE, J., HEINING, E., EZERSKI, V., MAROM, B., HENIS, Y., HUBER, O. & KNAUS, P. 2009. Novel crosstalk to BMP signalling: cGMP-dependent kinase I modulates BMP receptor and Smad activity. *EMBO J*, 28, 1537-50.
- SCHWARTZ, M. & GINSBERG, M. 2002. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol*, 4, E65-8.
- SELL, S., MCCLURE, M., GARG, K., WOLFE, P. & BOWLIN, G. 2009. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 1007-19.
- SEN, M. & MICLAU, T. 2007. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury*, 38 Suppl 1, S75-80.
- SHAH, A. K., LAZATIN, J., SINHA, R. K., LENNOX, T., HICKOK, N. J. & TUAN, R. S. 1999. Mechanism of BMP-2 stimulated adhesion of osteoblastic cells to titanium alloy. *Biology of the Cell*, 91, 131-142.
- SHI, Y. & MASSAGUÉ, J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113, 685-700.
- SHIM, J., GREENBLATT, M., XIE, M., SCHNEIDER, M., ZOU, W., ZHAI, B., GYGI, S. & GLIMCHER, L. 2009. TAK1 is an essential regulator of BMP signalling in cartilage. *EMBO J*, 28, 2028-41.
- SHIN, Y. M., HOHMAN, M. M., BRENNER, M. P. & RUTLEDGE, G. C. 2001. Electrospinning: A whipping fluid jet generates submicron polymer fibers. *Applied Physics Letters*, 78, 1149-1151.
- SINGH, M., SHIRLEY, B., BAJWA, K., SAMARA, E., HORA, M. & O'HAGAN, D. 2001. Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of polylactide-co-glycolide microparticles. *J Control Release*, 70, 21-8.
- SOTOBORI, T., UEDA, T., MYOUI, A., YOSHIOKA, K., NAKASAKI, M., YOSHIKAWA, H. & ITOH, K. 2006. Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts. *Exp Cell Res*, 312, 3927-38.

- SPANGRUDE, G. J., HEIMFELD, S. & WEISSMAN, I. L. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 241, 58-62.
- STASIAK, M., STUDER, A., GREINER, A. & WENDORFF, J. 2007. Polymer fibers as carriers for homogeneous catalysts. *Chemistry*, 13, 6150-6.
- STEIN, G. & LIAN, J. 1993. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev*, 14, 424-42.
- SUZAWA, M., TAMURA, Y., FUKUMOTO, S., MIYAZONO, K., FUJITA, T., KATO, S. & TAKEUCHI, Y. 2002. Stimulation of Smad1 transcriptional activity by Ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: a possible mechanism for collagen-dependent osteoblastic differentiation. *J Bone Miner Res*, 17, 240-8.
- SUZUKI, A. & TANIZAWA, K. 2009. Poly(ethylene terephthalate) nanofibers prepared by CO₂ laser supersonic drawing. *Polymer*, 50, 913-921.
- TAKADA, T., KATAGIRI, T., IFUKU, M., MORIMURA, N., KOBAYASHI, M., HASEGAWA, K., OGAMO, A. & KAMIJO, R. 2003. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem*, 278, 43229-35.
- TAKEUCHI, Y., NAKAYAMA, K. & MATSUMOTO, T. 1996. Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor-beta receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 271, 3938-44.
- TAKEUCHI, Y., SUZAWA, M., KIKUCHI, T., NISHIDA, E., FUJITA, T. & MATSUMOTO, T. 1997. Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen-alpha2beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 272, 29309-16.
- TAMURA, Y., TAKEUCHI, Y., SUZAWA, M., FUKUMOTO, S., KATO, M., MIYAZONO, K. & FUJITA, T. 2001. Focal adhesion kinase activity is required for bone morphogenetic protein--Smad1 signaling and osteoblastic differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 16, 1772-9.
- THERON, A., ZUSSMAN, E. & YARIN, A. L. 2001. Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibres. *Nanotechnology*, 12, 384-390.
- TILL, J. E. & MCCULLOCH, E. A. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14, 213-22.
- TOMFORD, W. 1995. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am*, 77, 1742-54.
- TAI, K.-S., KAO, S.-Y., WANG, C.-Y., WANG, Y.-J., WANG, J.-P. & HUNG, S.-C. 2010. Type I collagen promotes proliferation and osteogenesis of human mesenchymal stem cells via activation of ERK and Akt pathways. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 9999, NA.
- TSENG, S., LEE, M. & REDDI, A. 2008. Nonunions and the potential of stem cells in fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*, 90 Suppl 1, 92-8.

- TSUCHIDA, K., NAKATANI, M., UEZUMI, A., MURAKAMI, T. & CUI, X. 2008. Signal transduction pathway through activin receptors as a therapeutic target of musculoskeletal diseases and cancer. *Endocr J*, 55, 11-21.
- TSUJI, H. & IKARASHI, K. 2004. In vitro hydrolysis of poly(L-lactide) crystalline residues as extended-chain crystallites. Part I: long-term hydrolysis in phosphate-buffered solution at 37°C. *Biomaterials*, 25, 5449-5455.
- TSUJI, K., BANDYOPADHYAY, A., HARFE, B., COX, K., KAKAR, S., GERSTENFELD, L., EINHORN, T., TABIN, C. & ROSEN, V. 2006. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet*, 38, 1424-9.
- URIST, M. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150, 893-9.
- URIST, M. & STRATES, B. 1971. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*, 50, 1392-406.
- VAN HEEST, A. & SWIONTKOWSKI, M. 1999. Bone-graft substitutes. *Lancet*, 353 Suppl 1, S128-9.
- VANDER WAL, R. L., TICICH, T. M. & CURTIS, V. E. 2001. Substrate-support interactions in metal-catalyzed carbon nanofiber growth. *Carbon*, 39, 2277-2289.
- VASITA, R. & KATTI, D. 2006. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int J Nanomedicine*, 1, 15-30.
- WANG, E., ROSEN, V., CORDES, P., HEWICK, R., KRIZ, M., LUXENBERG, D., SIBLEY, B. & WOZNEY, J. 1988. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 9484-8.
- WARIS, E., ASHAMMAKHI, N., KAARELA, O., RAATIKAINEN, T. & VASENIUS, J. 2004. Use of bioabsorbable osteofixation devices in the hand. *J Hand Surg Br*, 29, 590-8.
- WOZNEY, J., ROSEN, V., CELESTE, A., MITSOCK, L., WHITTERS, M., KRIZ, R., HEWICK, R. & WANG, E. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242, 1528-34.
- WŁODARSKI, K., WŁODARSKI, P. & GALUS, R. 2008. Bioactive composites for bone regeneration. Review. *Ortop Traumatol Rehabil*, 10, 201-10.
- XIAO, G., GOPALAKRISHNAN, R., JIANG, D., REITH, E., BENSON, M. & FRANCESCHI, R. 2002. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 17, 101-10.
- XIAO, G., JIANG, D., THOMAS, P., BENSON, M., GUAN, K., KARSENTY, G. & FRANCESCHI, R. 2000. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem*, 275, 4453-9.
- YANG, S., LEONG, K., DU, Z. & CHUA, C. 2001. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*, 7, 679-89.

- YAO, J., CS-SZABÓ, G., JACOBS, J. J., KUETTNER, K. E. & GLANT, T. T. 1997. Suppression of osteoblast function by titanium particles. *J Bone Joint Surg Am*, 79, 107-12.
- YUE, J. & MULDER, K. 2000. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway. *J Biol Chem*, 275, 30765-73.
- ZEUGOLIS, D., KHEW, S., YEW, E., EKAPUTRA, A., TONG, Y., YUNG, L., HUTMACHER, D., SHEPPARD, C. & RAGHUNATH, M. 2008. Electrospinning of pure collagen nano-fibres - just an expensive way to make gelatin? *Biomaterials*, 29, 2293-305.
- ZHANG, Y. Z. & LIM, C. T. 2008. The development of biocomposite nanofibers for tissue scaffolding applications. *Jom*, 60, 45-48.
- ZHANG, Y. Z., SU, B., VENUGOPAL, J., RAMAKRISHNA, S. & LIM, C. T. 2007. Biomimetic and bioactive nanofibrous scaffolds from electrospun composite nanofibers. *International Journal of Nanomedicine*, 2, 623-638.
- ZHAO, B., KATAGIRI, T., TOYODA, H., TAKADA, T., YANAI, T., FUKUDA, T., CHUNG, U., KOIKE, T., TAKAOKA, K. & KAMIJO, R. 2006. Heparin potentiates the in vivo ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem*, 281, 23246-53.
- ZONG, X., KIM, K., FANG, D., RAN, S., HSIAO, B. S. & CHU, B. 2002. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*, 43, 4403-4412.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Anne Veltum
Adresse:	In der Grebe 19, 36169 Rasdorf
Geburtstag:	28.02.86
Geburtsort:	Fulda
Familienstand:	ledig
Religion:	römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schule

08/92-07/96	Grundschule: Hrabanusschule Rasdorf
08/96-06/05	Gymnasium: Wigbertschule Hünfeld
08/06/05	Abitur an der Wigbertschule in Hünfeld

Studium

10/05	Aufnahme des Medizinstudiums an der Philipps-Universität Marburg
21/09/07	Erfolgreich bestandener Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/11/11	Erfolgreich bestandener Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren (Nur Nachnamen in alphabetischer Reihenfolge):

- **in Marburg:** Adamkiewicz, Aumüller, Bahr, Barth, Basler, Bartsch, Baum, Baumann, Becker, Berger, Bien, Braun, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Dodel, Eilers, Fensterer, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Görg, Gress, Grzeschick, Grundmann, Hassan, Hertl, Höffken, Hoyer, Jansen, Kann, Kircher, Kessler-Thönes, Klose, Koolman, Kruse, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Opitz, Paletta, Plant, Preisig-Müller, Renz, Richter, Rothmund, Röhm, Röper, Ruchholtz, Schäfer, Schäfer, Seitz, Sekundo, Schmidt, Schmitt, Schofer, Schrader, Steiniger, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Weihe, Welter, Werner, Westermann, Wilhelm, Wulf
- **in Siegen:** Burghard, Darwich, Friedberg, Hees, Hensel, Hoffmann, Leuthold, Pritsch, Stephan, Willeke, Wolf
- **in Fulda:** Jaspersen
- **in Hünfeld:** Petsch, Rügamer

Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Markus Schofer für die Annahme als Doktorand in der orthopädischen Abteilung des Universitätsklinikum Marburgs und die Bereitstellung des sehr interessanten Themas. Außerdem möchte ich mich für die stete Diskussionsbereitschaft und die Gewinnung der Knochenproben bedanken.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei der Direktorin der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie der Philipps-Universität Marburg, Frau Prof. Dr. med. Susanne Fuchs-Winkelmann und ihren Mitarbeitern für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Materialien.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Jürgen Paletta, der mir in den letzten Jahren mit Rat und Tat bei vielen Fragen und Problemen bei der Durchführung der Experimente und ihrer Ausführung zur Seite stand und darüber hinaus ein guter Freund geworden ist.

Sarah Bockelmann, Irini Leifeld, Eleni Archontidou-Aprin und Sonja Schlimme danke ich für die freundschaftliche Unterstützung und die vielen guten Tipps bei der Laborarbeit.

Ich danke Prof. Dr. Seema Agarwal, Dr. Fei Chen und Dr. Marcel Thieme für die gute Zusammenarbeit mit dem Fachbereich Chemie der Universität Marburg.

Für die Mitbenutzung des Labors und auch einige hilfreiche Tipps bei den Experimenten danke ich der Kardiologie der Universität Marburg, insbesondere dem Laborleiter Dr. Volker Ruppert und Dr. Verena Koch.

Meinen Mitdoktoranden Dr. Johannes Reichelt und Dr. Philip Rößler danke ich für die Ratschläge bei der Fertigstellung der Arbeit.

Für das fleißige Korrekturlesen und die Hilfe beim Layout danke ich Elisabeth Eitel, Mario Hartmann, Nico Hartmann und Hubertus Hartmann.

Ein großer Dank gilt abschließend meiner Mutter Ursula Veltum, meinem Freund Mario Hartmann, meiner Schwester Katrin Veltum und meinen Freun-

dinnen Julia von Ehr und Friederike Urban, die es nie leid waren, mich bei der Fertigstellung der Arbeit seelisch und moralisch zu unterstützen.

Ich danke meinem verstorbenem Vater Johannes Veltum, der es mir überhaupt erst ermöglicht hat, nach Marburg zu gehen und sorgenfrei zu studieren.

Ehrenwörtliche Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Dissertation

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Funktionalisierung von PLLA-Nanofasern mittels Kollagen Typ 1 und BMP-2 – Einfluss auf die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen“ in der Klinik für Orthopädie und Rheumathologie (Direktorin Frau Prof. Dr. med. S. Fuchs-Winkelmann) unter Leitung von Prof. Dr. Markus Schofer mit Unterstützung durch Dr. Jürgen Paletta ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde im folgenden Publikationsorgan veröffentlicht:

SCHOFER, M. D., VELTUM, A., THEISEN, C., CHEN, F., AGARWAL, S., FUCHS-WINKELMANN, S. & PALETTA, J. R. 2011. Functionalisation of PLLA nanofiber scaffolds using a possible cooperative effect between collagen type I and BMP-2: impact on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med*, 22, 1753-62.

Ort, Datum

Unterschrift

Anhang

- I. **Publikation**
- II. **Patienteninformation** "Untersuchung von Stammzellen auf Knochenersatzmaterialien"
- III. **positives Ethikvotum (30/06)** vom 26.03.2008 durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
- IV. **Einwilligungserklärung** "Untersuchung von Stammzellen auf Knochenersatzmaterialien"

I. Publikation

SCHOFER, M. D., VELTUM, A., THEISEN, C., CHEN, F., AGARWAL, S., FUCHS-WINKELMANN, S. & PALETTA, J. R. 2011. Functionalisation of PLLA nanofiber scaffolds using a possible cooperative effect between collagen type I and BMP-2: impact on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med*, 22, 1753-62.

Abstract

Mesenchymal stem cell differentiation of osteoblasts is triggered by a series of signaling processes including integrin and bone morphogenetic protein (BMP), which therefore act in a cooperative manner. The aim of this study was to analyze whether these processes can be remodeled in an artificial poly-(L)-lactide acid (PLLA) based nanofiber scaffold. Matrices composed of PLLA-collagen type I or BMP-2 incorporated PLLA-collagen type I were seeded with human mesenchymal stem cells (hMSC) and cultivated over a period of 22 days, either under growth or osteoinductive conditions. During the course of culture, gene expression of alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OC) and collagen I (COL-I) as well as Smad5 and focal adhesion kinase (FAK), two signal transduction molecules involved in BMP-2 or integrin signaling were analyzed. Furthermore, calcium and collagen I deposition, as well as cell densities and proliferation, were determined using fluorescence microscopy. The incorporation of BMP-2 into PLLA-collagen type I nanofibers resulted in a decrease in diameter as well as pore sizes of the scaffold. Mesenchymal stem cells showed better adherence and a reduced proliferation on BMP-2 containing scaffolds. This was accompanied by an increase in gene expression of ALP, OC and COL-I. Furthermore the presence of BMP-2 resulted in an upregulation of FAK, while collagen had an impact on the gene expression of Smad5. Therefore these different strategies can be combined in order to enhance the osteoblast differentiation of hMSC on PLLA based nanofiber scaffold. By doing this, different signal transduction pathways seem to be up regulated.

II. Patienteninformation

Philipps-Universität Marburg
FACHBEREICH MEDIZIN



**Klinik für Orthopädie
und Rheumatologie – ~~Marburg~~/Lahn**

Patienteninformation

Untersuchung von Stammzellen auf Knochenersatzmaterialien

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Sie um die Teilnahme an der o. g. Untersuchung bitten.

Wie Sie vielleicht wissen, gewinnt der Ersatz von zerstörtem Knochen mittels Bone Tissue Engineering (Verwendung von Knochenersatzmaterialien) zunehmend an Bedeutung. Eine wesentliche Voraussetzung für die Herstellung von biologischen Regeneraten ist der Einsatz eines geeigneten Trägermaterials. Hier bietet der Einsatz von elektrogesponnenen Nanofasern eine interessante Perspektive. Diese werden mit menschlichen Stammzellen besiedelt und untersucht.


Die Stammzellen leben als „Knochenmark“ in den Hohlräumen zwischen Knochenbälkchen aller großen Knochen des Menschen. Bei einer Hüftoperation mit prothetischem Hüftersatz wird ein wenig Knochensubstanz aus dem Oberschenkelknochen entfernt, um den Prothesenschaft einbringen zu können. Dieses Knochenmark wird im Allgemeinen, genau wie der entfernte Hüftkopf selbst, verworfen.

Wir möchten Sie bitten, uns ein wenig Millimeter großes Fragment von dem bei der Hüftoperation entfernten Knochen aus dem Oberschenkelchaft oder Hüftkopf zur Verfügung zu stellen, um damit Untersuchungen an gesunden Stammzellen durchführen zu können.

Das Knochenmarksfragment erhält beim Eintreffen im Labor eine Probennummer, der Ihr Name, ihr Alter und das Eingangsdatum zugeordnet ist. Alle weiteren Untersuchungen werden anhand der anonymisierten Probennummer durchgeführt.

Durch Ihre Teilnahme an dem Studienprojekt wird ein besseres Verständnis biologischer Interaktion, zwischen Stammzellen und verwendetem Trägermaterial, erzielt. Sie können über Ihre Teilnahme an der Untersuchung selbstverständlich frei entscheiden und Ihre Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen bzw. zurückziehen. Im Falle einer Ablehnung werden Ihnen bezüglich Ihrer weiteren Behandlung natürlich keine Nachteile entstehen.

III. Positives Ethikvotum

	Philipps Universität Marburg
<p>Philipps-Universität - 35032 Marburg</p> <p>Herrn Dr. M. Schofer Universitätsklinikum Giessen u. Marburg GmbH Standort Marburg Klinik für Orthopädie und Rheumatologie</p> <p>- im Hause -</p>	<p>Fachbereich Medizin Dekanat/Ethikkommission Prof. Dr. med. Gerd Richter (Vors.) PD Dr. med. Tanja Krones</p> <p>Tel.: 06421 286 6487 Fax: 06421 286 6585 Sek.: D. Raiss E-Mail: ethikkom@post.med.uni-marburg.de Anschrift: Baldingerstrasse/Postfach 2360 35032 Marburg Web: www.med.uni-marburg.de/ethikkom Az.: 30/06</p> <p>Marburg, den 26.03.2008</p>
<p>Nachr.: KKS Marburg</p>	
<p>Ihre Studie: „Humane mesenchymale Stammzellen als in vitro Zellkulturmodell unter besonderer Berücksichtigung der Biokompatibilitätsprüfung von elektrogewebenen Nanofasern als Matrix für Tissue Engineering“.</p>	
<p>Eingereichte Unterlagen:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Ethikantrag,2. Patienteninformation,3. Einwilligungserklärung,4. Bescheinigung über Hauptprüferwechsel.	
<p>Sehr geehrter Herr Dr. Schofer,</p> <p>vielen Dank für die Stellungnahme zur o. g. Studie zu unserem Gutachten vom 24.03.2006. Darüber hinaus wird jetzt ein Wechsel des Hauptprüfers vorgenommen. Hinsichtlich der in unserem Gutachten aufgeworfenen Fragen können diese als getätigt angesehen werden, gegen den Wechsel des Hauptprüfers erhebt die Ethikkommission keinen Einspruch.</p> <p>Damit schließt die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg ihr Gutachten mit einem positiven Ethikkommissionsvotum ab.</p> <p>Damit schließt die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg ihr Gutachten mit einem positiven Ethikkommissionsvotum ab.</p> <p>Entsprechend der ausschließlich beratenden Funktion der Ethik-Kommission betrifft dieses Votum nur die ethische Beurteilung der Konzeption, der vorgesehenen Methoden, der Durchführung und Überwachung des betreffenden Projektes sowie der beabsichtigten Patientenaufklärung. Die ärztliche und juristische Verantwortung verbleibt jedoch uneingeschränkt beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern.</p> <p>Bitte geben Sie uns jede Änderung in der Protokolldurchführung bekannt. Es muss dann geklärt werden, ob das Votum der Ethik-Kommission noch Gültigkeit hat.</p>	
<p>Sekretariat : Frau Raiss, Montag – Donnerstag 8 – 12 Uhr, Freitag 8 – 11 Uhr</p>	
<p><small>Kommissionsmitglieder: <input type="checkbox"/> Prof. Dr. med. R. Berger, <input type="checkbox"/> Prof. Dr. jur. G. Freund., <input type="checkbox"/> Ref. jur. Philipp Georgy, <input type="checkbox"/> Prof. Monika Böhm, <input type="checkbox"/> Prof. Dr. med. J.-C. Krieg, <input type="checkbox"/> Prof. Dr. M. Koch, <input type="checkbox"/> Prof. Dr. med. Czubayko, <input type="checkbox"/> Prof. Dr. med. G. Richter (Vorsitzender), <input type="checkbox"/> Dr. med. Dipl. Soz. Tanja Krones (Geschäftsführung) <input type="checkbox"/> cand. med. Christoph Paul <input type="checkbox"/> Prof. Dr. rer. nat. H. Schäfer, <input type="checkbox"/> Prof. Dr. med. Uwe Wagner (stellver-retender Vorsitzender), <input type="checkbox"/> Prof. Dr. med. R. Maier, <input type="checkbox"/> Prof. Dr. med. N. Donner-Banzhoff, <input type="checkbox"/> PD Dr. H.-H. Müller, <input type="checkbox"/> Prof. Dr. med. A. Neubauer, <input type="checkbox"/> Dr. B. Tackenberg, <input type="checkbox"/> Bettina Nieth, <input type="checkbox"/> Dr. Thomas Neubert.</small></p>	

IV. Einwilligungserklärung

Philipps-Universität Marburg
FACHBEREICH MEDIZIN



Klinik für Orthopädie
und Rheumatologie – Marburg/Lahn

Einwilligungserklärung

Untersuchung von Stammzellen auf Knochenersatzmaterialien

Ich, bin über die Bedeutung und Tragweite der o. g. Studie aufgeklärt worden und habe die Patienteninformation gelesen und verstanden. Alle Fragen zu dieser vorgesehenen Studie wurden von Herrn/Frau Dr. med. zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich hatte genügend Zeit für meine Entscheidung und bin bereit, ein bei der Operation anfallendes Knochenfragment für die Untersuchung von Stammzellen zur Verfügung zu stellen. Ich bin mit der im Rahmen der Studie erforderlichen Aufzeichnung von Krankheitsdaten entsprechend der Patienteninformation einverstanden.

Ich weiß, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

Eine Ausfertigung des Aufklärungs-/Informationsblatts und der Einwilligungserklärung habe ich erhalten.

Marburg, den

.....
(Unterschrift des Patienten)

.....
(Unterschrift des Arztes)