

Aus der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und
Kieferheilkunde Tübingen
Abteilung Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie

**„Biofunktionalisierung von β -Trikalziumphosphat Matrizen
mit RGD-Peptiden und Aptameren für das Tissue
Engineering von Knochen“**

**Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Ardjomandi, Nina Gitti

2016

Dekan:	Professor Dr. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Dr. S. Reinert
2. Berichterstatter:	Professor Dr. A. Nuessler
Tag der Disputation:	14.12.2016

Für meine Familie...

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
Einleitung	6
Tissue Engineering.....	6
Mesenchymale Stammzellen	9
Mesenchymale Stammzellen aus dem Periostgewebe	10
Trägermaterialien für das Knochen Tissue Engineering	11
Kommerziell erwerbliche Trägermaterialien.....	11
β -Trikalziumphosphat als Trägermaterial für das Knochen Tissue Engineering.....	14
Biofunktionalisierung von Trägermaterialien.....	15
Kovalente Immobilisierung von Molekülen an Trägermatrizen	16
Testsysteme zum Nachweis der immobilisierten Peptide.....	17
Kontaktwinkelanalyse zur Oberflächencharakterisierung von Feststoffen.....	18
Graphenoxid und seine Anwendungen	19
Polylaktid-Polyglykolid (PLGA) und seine Anwendungen.....	22
RGD-Peptide	24
Aptamere	25
Aptamer-Analytik: Rasterkraft-Spektroskopie	28
Applikationen von Aptameren.....	29
Aptamere im Tissue Engineering	30
Zielsetzung	32
Material und Methoden.....	33
Zellkultur	33
Erstellen von Primärkulturen.....	33
Besiedelung der Trägermatrizen	33
Biofunktionalisierung der Trägermatrizen	33
PLGA Ummantelung	33
Graphenoxid Ummantelung	34
Immobilisierung der PLGA-beschichteten/-ummantelten 2D Oberflächen bzw. 3D Trägermatrizen mit RGD-Peptiden	35
Immobilisierung der PLGA-beschichteten/-ummantelten 2D Oberflächen bzw. 3D Trägermatrizen mit Aptameren.....	38
Quantifizierung der immobilisierten Aptamermenge	38
Rasterkraft-Spektroskopie (Atomic Force Microscopy - AFM Spektroskopie) zur Ermittlung der Bindungsaffinität der Aptamere an Kieferperiostzellen.....	39
Cantilever-Beschichtung	39
AFM-Messungen	39
Nachweis der Aptamerstabilität im humanen Plasma.....	41
Kontaktwinkelanalysen zur Oberflächencharakterisierung der beschichteten Konstrukte.....	41
Rasterelektronenmikroskopie der 3D-ummantelten β-TCP Blöcke	41
Messung der Porengröße der ummantelten Trägermatrizen	42
In-vitro Analysen	42
Adhäsionsassay	42
Fluoreszenzfärbungen zur konfokalen Laserscanning Mikroskopie.....	42
Kristallviolett-färbung der adhärennten Zellen	43
Metabolischer Proliferationsassay	43
Osteogene Differenzierung.....	44

Alizarinrotfärbung der Kalziumphosphatpräzipitate	44
Durchflusszytometrische Messung der Bindungsaffinitäten der stabilisierten Aptamere an Kieferperiostzellen.....	45
Ergebnisse	46
Zellmorphologie und –proliferation auf PLGA- und GO- beschichteten 2D Oberflächen	46
Zelladhäsion auf PLGA- und GO- beschichteten 2D Oberflächen.....	47
3D Ummantelung von β-TCP Blöcken mit PLGA und GO.....	49
Oberflächencharakterisierung der ummantelten 3D β-TCP-Blöcke	50
Kontaktwinkelanalysen der Oberflächen	50
Rasterelektronenmikroskopie der PLGA- und GO-ummantelten β -TCP Matrizen.....	52
3D Proliferation auf PLGA- und GO-ummantelten Konstrukten	54
Immobilisierung der RGD-Peptide.....	55
Effizienzbestimmung der Peptid Immobilisierung.....	55
Adhäsion und Proliferation auf Peptid-immobilisierten 2D Oberflächen	56
Nachweis der osteogenen Differenzierung auf Peptid-immobilisierten 2D Oberflächen.....	60
Adhäsion und Proliferation auf Peptid-immobilisierten 3D Konstrukten	61
Immobilisierung der Aptamere	62
Bestimmung der Plasmastabilität und Bindungsaffinität der Aptamere	62
AFM-Spektroskopie	64
2D Adhäsion auf Aptamer-immobilisierten Oberflächen	67
2D Proliferation auf Aptamer-immobilisierten Oberflächen.....	68
Osteogene Differenzierung auf Aptamer-immobilisierten 2D Oberflächen	69
Effizienzbestimmung der Aptamer Immobilisierung.....	70
3D Adhäsion auf Aptamer-immobilisierten Konstrukten	71
3D Proliferation auf Aptamer-immobilisierten Konstrukten.....	72
Osteogene Differenzierung auf Aptamer-immobilisierten 3D Konstrukten	73
Diskussion	75
Zusammenfassung	88
Summary	90
Erklärung zum Eigenanteil.....	100
Danksagung	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Tissue Engineering- Prinzips.....	8
Abbildung 2: Darstellung verschiedener Graphenstrukturen.	20
Abbildung 3: Schematische Darstellung von Graphenoxid mit den funktionellen Gruppen zur kovalenten Kopplung von Molekülen.....	20
Abbildung 4: Strukturformel Polylaktid-Polyglykolid.....	22
Abbildung 5: Applikationsbereiche von Aptameren.	26
Abbildung 6: Struktur des generierten Aptamer 74 gegen humane Kieferperiostzellen.	27
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Prinzips von Rasterkraft-Messungen.	29
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Aptamerimmobilisierung auf den β -TCP-Blöcken.	31
Abbildung 9: Schematische Darstellung der verschiedenen Peptid-Kopplungsvarianten.....	37
Abbildung 10: Optimierung der PLGA-Beschichtung auf zweidimensionaler Kultivierungsebene.....	47
Abbildung 11: Morphologie der Kieferperiostzellen in GO-beschichteten 2D Wells in Abhängigkeit von der Überschichtungs-Anzahl.....	47
Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopischer Zelladhäsionsassay auf den beschichteten Oberflächen auf zweidimensionaler Kultivierungsebene.	48
Abbildung 13: Metabolischer Zellproliferationsassay von Kieferperiostzellen, die 3 Tage auf PLGA- und GO-beschichteten 96-Well Zellkulturplatten proliferierten.	49
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Dip und Dry Coating Variante.	49
Abbildung 15: Charakterisierung der Trägermaterial-Oberfläche – Test zur Ermittlung der Hydrophilizität mittels Kontaktwinkelanalysen.	50
Abbildung 16: Kontaktwinkelmessungen der 3D Oberflächen in Abhängigkeit von der sauren oder basischen Behandlung für die Aktivierung der funktionellen Gruppen.....	51
Abbildung 17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der PLGA- und GO- ummantelten 3D β -TCP Konstrukte und der vermessenen Porengröße auf den Oberflächen.....	53
Abbildung 18: Visualisierung der auf 3D Konstrukten wachsenden Zellen nach 7 Tagen in Kultur mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und Bestimmung der Zellvitalität nach 7 und 11 Tagen auf GO- und PLGA-ummantelten Konstrukten anhand eines metabolischen Assays.	55
Abbildung 19: Aminosäureanalyse der immobilisierten Konstrukte.....	56
Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopischer Adhäsionsassay auf 2D-beschichteten Oberflächen.	57
Abbildung 21: Metabolische Bestimmung der Zellproliferation auf den unterschiedlich beschichteten 2D Oberflächen nach 3 und 5 Tagen der Zellkultivierung.....	58
Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie/-verteilung auf 2D-beschichteten Oberflächen nach 3 und 5 Tagen der Zellkultivierung.....	60
Abbildung 23: Übersichtsaufnahme der Alizarinfärbungen in 2D-beschichteten Wells nach 30 Tagen der osteogenen Differenzierung.	60
Abbildung 24: Zelladhäsionsassay auf 3D Konstrukten nach 3 h.	61
Abbildung 25: Metabolische Bestimmung der Zellproliferation auf den unterschiedlich beschichteten 3D Konstrukten nach 5 Tagen der Zellkultivierung.....	62
Abbildung 26: Analyse der Plasmastabilität der modifizierten (11 kDa PEG, 11 kDa PEG + 2 PTO) und nicht-modifizierten Aptamere nach Inkubation in Vollblut zu verschiedenen Zeitpunkten.....	63
Abbildung 27: Kraftkurven der Rasterkraftmikroskopischen Analysen an osteogen induzierten Kieferperiostzellen (Tag 3, 5, 7 und 15).....	65
Abbildung 28: Kraftkurven der Rasterkraftmikroskopischen Analysen zu Beginn (Tag 3) und zum späteren Zeitpunkt der Osteogenese (Tag 15).	66
Abbildung 29: Zelladhäsionsassay auf zweidimensionaler Ebene anhand der Kristallviolett- und der Fluoreszenzfärbung.	68
Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der auf zweidimensionaler Kultivierungsebene wachsenden Kieferperiostzellen.....	69
Abbildung 31: Nachweis der Kalziumphosphatpräzipitate in Kieferperiostzellen, die für 30 Tage osteogen induziert wurden anhand der Alizarinfärbung.	70
Abbildung 32: Quantifizierung des durch EDC/NHS kovalent gekoppelten Aptamers an PLGA-ummantelten β -TCP Oberflächen anhand des Quantifluo-ss-DNA-Assays.	71
Abbildung 33: Adhäsionsassay auf 3D β -Trikalziumphosphat-Konstrukten	72
Abbildung 34: Metabolischer Proliferationsassay der auf dreidimensionalen β -TCP Konstrukten wachsenden Kieferperiostzellen, die für 3, 7 und 10 Tage auf unbeschichteten, PLGA-, PLGA + Aptamer, PLGA + Oligonukleotid-Bibliothek beschichteten Konstrukten kultiviert wurden.	73

Abbildung 35: *Fluoreszenzmikroskopische Detektion der CaP-Präzipitate auf den 3D β -TCP Konstrukten (unbeschichtet, PLGA, PLGA + Aptamer, PLGA + Oligonukleotid-Bibliothek)..... 73*

Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomic Force Microscopy, Rasterkraftmikroskopie
ATR-FTIR	(attenuated total reflection) Infrarotspektroskopie
CaP	Kalziumphosphat
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
GO	Graphenoxid
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPLC	high pressure liquid chromatography
JPC	Jaw periosteal cells, Kieferperiostzellen
LA	Lactic Acid, Milchsäure
Min.	Minute
MSC	mesenchymal stem cell, mesenchymale Stammzellen
NaOH	Natronlauge
NHS	N-Hydroxy-Succinimid
PLGA	polylactic-polyglycolide acid, Polylaktik-Polyglykolid Säure
PLL	Poly-L-Lysin
RGD	Peptidsequenz: Asparagin-Glycin-Asparaginsäure
rpm	rotations per Minute
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunde
SELEX	Systematic Evolution of Exponential Enrichment
SPDP	N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate
β-TCP	β-Trikalziumphosphat

Einleitung

Der Goldstandard der Knochenregeneration von kritischen Defektgrößen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie besteht immer noch in der Verwendung von autologem Knochen, was zu erheblichen Donormorbiditäten führen kann [1]. Die Bedarfszahlen für Knochenmaterial für kritische Defektgrößen sind im Zuge der alternden Bevölkerung steigend und belaufen sich zurzeit auf 71.000 autologe Knochentransplantationen. Darüber hinaus erkranken jährlich ca. 10.000 Patienten neu an Mundhöhlenkarzinomen [5, 6].

Große Knochendefekte im Kieferbereich wirken sich auf den Kauprozess und die Sprachfunktion der betroffenen Patienten aus und vermindern demnach die Lebensqualität beträchtlich. Diese Kontinuitätsdefekte stellen immer noch eine therapeutische Herausforderung dar, besonders im vaskulär kompromittierten Gefäßlager. Dies ist bei dem betroffenen Patientenkontinuum aufgrund häufiger Vorbestrahlungen und operativer Eingriffe oft gegeben. Die Rekonstruktion des Kiefers bei Defekten über 5 cm wird derzeit mit einem mikrochirurgischen Gewebettransfer in verschiedenen Modifikationen und aus verschiedenen Donorarealen wie z. B. dem Beckenkamm, der Fibula oder der Skapula durchgeführt und stellt immer noch den Goldstandard dar [1]. Die Therapieentscheidung ist vom Allgemeinzustand, von der Gefäßsituation des Patienten und dem jeweiligen Gewebebedarf abhängig. Die erhebliche Entnahmemorbidität muss bei der Operationsindikation berücksichtigt werden. Umfangreiche Knochendefekte in diesem Bereich entstehen v.a. nach Tumorsektionen, Entfernungen von großen Knochenzysten oder durch starke Kieferatrophien.

Tissue Engineering

Ein viel versprechender Ansatz für die oben genannte interdisziplinäre Problematik der kritischen Knochendefektgrößen ist das Tissue Engineering, bei dem *in-vitro* ein mit geeigneten Zellen besiedeltes, formgebendes Konstrukt generiert wird. Implantiert man dieses *in-vivo*, regeneriert es das Gewebe in den defekten Arealen [2, 7]. Optimalerweise resorbiert die Trägermatrix genau in diesem Zeitraum, in dem die neue Knochenmatrix von den besiedelten und umliegenden Zellen aus dem Gewebe synthetisiert wird. Um geeignete Lösungen zu finden, vereint das Tissue Engineering

Einleitung

diverse Felder: Prinzipien der Biochemie, Zellbiologie, Technik und Materialwissenschaften werden hierbei miteinander verbunden. Es handelt sich dabei um ein zellbiologisches Verfahren zur Regeneration von Gewebedefekten, das die eingeschränkte Funktionalität des Organs wiederherstellen soll.

Die Grundpfeiler des Tissue Engineerings setzen sich aus mindestens 3 Prozessen zusammen:

- der Entnahme von lebenden Stammzellen eines Donororganismus, die das defekte Gewebe regenerieren sollen,
- einer geeigneten Trägermatrix, die die Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung der Stammzellen fördert und
- der Zugabe von Differenzierungsstimuli, die die gewünschte Funktion in den Stammzellen anregen.

Nach der Entnahme der Zellen werden diese auf zweidimensionaler Kultivierungsebene *in vitro* expandiert, bevor die Trägermatrizen mit diesen Zellen besiedelt werden. Nach der Besiedelung werden die Konstrukte auf dreidimensionaler Ebene unter Zugabe eines Mediums kultiviert, das Wachstumsfaktoren, kleine Moleküle oder Nanopartikel enthalten kann oder die auf der Matrix bereits immobilisiert sein können [8]. Somit wird das Gewebe bereits vor der Implantation *in-vitro* generiert und vitalisiert (Abbildung 1).

sich synthetischer Materialien wie z.B. Kalziumphosphate. Diese Materialien liegen in granulärer Form als auch als Formteile vor und können mit patienteneigenem Blut gemischt in den Defekt eingebracht werden. Sie integrieren sich in der Regel komplikationslos, werden je nach Substanz früher oder später resorbiert und durch körpereigenen Knochen ersetzt.

Mesenchymale Stammzellen

Eine geeignete und immer häufiger verwendete Zellquelle für das Knochen Tissue Engineering Verfahren sind mesenchymale Stammzellen, die ein hohes Proliferationspotenzial besitzen. Sie können in Knochen, Knorpel, Muskel, Endothel und Nervengewebe ausdifferenzieren [20], aus welchem Grund sie als multipotent bezeichnet werden.

Adulte mesenchymale Stammzellen können aus verschiedenen Quellen gewonnen werden – die am häufigsten verwendete und am besten charakterisierte Quelle ist das Knochenmark [21-24]. Darüber hinaus können diese MSCs aus Blut, Menstrualblut, Nabelschnurblut, Synovia, Haut, Pulpa, Periost, Fett, Plazenta, Haarfollikeln und vielen weiteren Donorgeweben gewonnen werden [25].

Es konnte festgestellt werden, dass die Differenzierbarkeit der Zellen der verschiedenen Quellen variieren kann. Perioststammzellen differenzieren beispielsweise sehr gut zu Knochen, jedoch nur schwächer zu Fettzellen [26-29]. Es wird davon ausgegangen, dass die Stammzellen je nach ihrem Herkunftsort für deren Nische vorgeprägt sind. Aus diesem Grund kann es von Vorteil sein, wenn die Stammzellen optimalerweise aus der gleichen Nische wie das spätere Applikationsgebiet stammen.

Ein großer Trend in der Stammzellforschung weltweit geht derzeit hin zu den induzierten pluripotenten Stammzellen, was erstmals von Yamanaka et al. 2006 publiziert wurde [30]. Hierbei wurden Mausfibroblasten durch Transduktion der Zellen mit den Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und c-myc zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert. Der therapeutische Einsatz dieser reprogrammierten Zellen ist derzeit noch fragwürdig, da diese Zellen ein erhöhtes Risiko der Teratombildung darstellen [31].

Einleitung

Speziell für das Knochen Tissue Engineering wurden bisher embryonale, Knochenmark-, Muskel-, Pulpa- und Perioststammzellen bevorzugt verwendet [32-34].

Durch die Zugabe verschiedener Stimulanzen wie

- Ascorbinsäure (Proliferationsstimulus und essentiell für die Kollagen I Bildung [35, 36]),
- Dexamethason (Stimulation der Osteogenese durch einen weitgehend ungeklärten Mechanismus [37]) und
- β -Glycerolphosphat (Phosphationen-Quelle für die Kalziumphosphatbildung)

werden die MSCs zur osteogenen Differenzierung aktiviert.

Die Osteogenese durchläuft drei Phasen, die durch die Expression verschiedener Markergene gekennzeichnet sind. Frühe Osteogenese-assoziierte Gene sind beispielsweise die alkalische Phosphatase (AP), Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), Kollagen 1 (Coll1), Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2) und Osterix (Osx). Osteopontin und Osteocalcin hingegen gelten als späte Osteogenesemarker.

In der ersten Phase der Osteogenese proliferieren die Zellen stark und beginnen mit der Differenzierung erst, nachdem enge Zell-Zell-Kontakte ausgebildet werden. Anschließend sezernieren die Zellen Bestandteile der extrazellulären Knochenmatrix und mineralisieren im letzten Schritt.

Mesenchymale Stammzellen aus dem Periostgewebe

Das Periostgewebe ist im Gegensatz zum Knochengewebe schmerzempfindlich und dient als Ansatzpunkt für Bänder und Sehnen. Es besteht aus zwei verschiedenen Schichten – dem Stratum osteogenicum und dem Stratum fibrosum.

Das Stratum osteogenicum - oder auch Kambiumschicht genannt - enthält die mesenchymalen Stammzellen, ist sehr dünn, mit Blutgefäßen durchzogen und innerviert. Das Stratum fibrosum hingegen ist eine elastische, dickere Schicht aus Gewebsfibroblasten und kollagenösen Bestandteilen [33, 38, 39].

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie können Kieferperiostzellen in Routineoperationen relativ problemlos entnommen werden. Dieser Zelltyp wurde von unserer Arbeitsgruppe eingehend charakterisiert [40-42]. Im Gegensatz zu Knochenmarkstammzellen nimmt das osteogene Differenzierungspotential von Periostzellen in Abhängigkeit vom Patientenalter nicht ab [39]. Weitere Vorteile dieser Stammzellquelle für das Tissue Engineering im Gebiet der Mund-, Kiefer- und

Gesichtschirurgie liegen zum einen darin, dass sie aus der Zellenische des späteren Implantationsbereichs stammen. Zum anderen ist die Entnahme deutlich schmerzärmer als eine Knochenmarkspunktion.

Trägermaterialien für das Knochen Tissue Engineering

Es gibt bisher viele verschiedene Biomaterialien auf dem Markt, die sich allgemein in 3 Gruppen einteilen lassen. 1. **biologische Materialien**, die entweder autolog, allogon oder xenogen gewonnen werden, 2. **synthetisch hergestellte Materialien** und 3. **Kompositmaterialien** die aus dem Verbund verschiedener Materialien hergestellt werden.

Folgende physikalischen und biologischen Eigenschaften sollte eine Trägermatrix vereinen [43]:

- mechanische Stabilität in der betroffenen Region gewähren
- ein geeignetes Substrat für osteoide Ablagerung darstellen
- die Zellen dazu aktivieren, in das Innere der Matrix zu migrieren
- eine poröse Struktur aufweisen, die die Nährstoffversorgung sowie Neovaskularisierung zulässt
- den Prozess der Osteogenese fördern (osteoinduktiv sein)
- eine kontrollierte Degradierung der Matrix aufweisen
- die Entstehung toxischer Degradierungsprodukte vermeiden
- keine Entzündungsreaktion verursachen
- die Sterilisierbarkeit ohne Verlust der Bioaktivität zulassen
- eine kontrollierte Freisetzung der Faktoren bewirken, die für die Biofunktionalisierung der Materialien verwendet wurden.

Kommerziell erwerbliche Trägermaterialien

Eine übersichtliche Zusammenfassung der in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie verwendeten Materialien gibt der Reviewartikel von Smeets und Kolk – im Folgenden werden einige Vertreter kurz beschrieben [16].

Eine allogene (aus humanen Lebendspendern gewonnene), mineralisierte Matrix wird von biotiss Dental in Block und Granulatform vertrieben und heißt *Maxgraft*. Ähnliche

Einleitung

Produkte sind von der Firma Zimmer Dental erhältlich und haben den Handelsnamen *Puros / Tutoplast*.

Demineralisierte, humane Knochenmatrizen in Form von Pasten, Blöcken oder flexiblen Materialien werden von der Firma BioHorizon (*Grafton*) angeboten. Diese sind aus schwammartig angeordnetem Kollagen zusammengesetzt und gelten als osteoinduktiv. Ein Vorteil wird bei diesen Materialien darin gesehen, dass durch die Dekalzifizierung die Verfügbarkeit der Wachstumsfaktoren erhöht ist.

Xenogene Produkte werden aus Meeresalgen, Korallen und tierischen Knochen gewonnen. Hydroxylapatit ist das bisher am besten etablierte Material und wird von Biotiss Dental vertrieben und ist unter dem Handelsnamen *Cerabone* aus bovinem Ursprung auf dem Markt. Die Firma Geistlich hat das Produkt *BioOss* aus ebenfalls boviner Herkunft in ihrem Produktportfolio. Das Material wird bei Sinusaugmentationen eingesetzt und stellt das am häufigsten verwendete Knochenersatzmaterial in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie dar.

Ein biofunktionalisiertes xenogenes Produkt der Firma Stryker mit osteoinduktiver Wirkung ist das Material *Osigraft*, das aus bovinem Kollagen Typ 1 besteht und mit BMP7 modifiziert ist. Für das Produkt *Inductos / infuse* der Firma Medtronic wurde BMP2 in ein Kollagenfließ eingearbeitet. Die Firma Dentsply Friadent inkorporierte das Peptid P-15 in ihr bovines Produkt *PepGen*, das eine bestimmte Sequenz des Kollagen-1 Proteins darstellt. Ein weiteres Produkt dieser Firma heißt *Algipore*, besteht aus Kalziumphosphat und wird aus Meeresalgen gewonnen.

Synthetische Matrizen werden aus Keramiken, Biogläsern, Kalziumphosphaten, Trikalziumphosphaten (TCP), Hydroxylapatiten, Glasionomeren, Metallen und unzähligen Polymeren (unter anderem Polylaktid, Polyglykolid und Kombinationen daraus, Co-Polymere, Polyurethan, Polymethacrylat, Polycaprolacton, usw.) hergestellt.

Ein aus 60 % Hydroxylapatit und 40 % β -TCP bestehendes Material mit interkonnektierenden Poren zwischen 200-800 μm ist in Zylinder- und Granulatform von der Ceramisys Ltd. unter dem Namen *Maxresorb* erhältlich. Ein pastöses Produkt aus phasenreinem Hydroxylapatit von der Firma aap Biomaterials GmbH namens *Ostim* ist auf dem Markt. Weitere Produkte unterscheiden sich meist in ihrer Porosität,

Einleitung

Zusammensetzung und Struktur (*Nanobone* / Artoss, *PerOssal* / aap Biomaterials GmbH).

Trikalziumphosphate werden von der Firma Biovision GmbH in Form eines alpha-Trikalziumphosphats namens *Biobase* produziert. Die Firma Curasan stellt beta-Trikalziumphosphat mit dem Handelsnamen *Cerasorb* in Granulat-, Zylinder- und Blockform her, die interkonnektierenden Poren mit einem Porendurchmesser zwischen 50-500 μm aufweisen. Die Trikalziumphosphate sind biokompatibel und osteokonduktiv und werden innerhalb einiger Monate resorbiert.

Weitere Knochenersatzmaterialien beinhalten Biogläser wie Phosphorpentoxid, Siliziumdioxid oder basische Oxide wie Kalziumoxid, Magnesiumoxid oder Zinkoxid. Ein Beispiel hierfür ist *Biogran* der Firma Biomet. Kalziumphosphatzemente kommen ebenfalls häufig zur Anwendung. Dafür wurden Zwei- und Dreikomponentensysteme bestehend aus Zementpulver, Wasser und weiteren Komponenten entwickelt, um die Applikation zu erleichtern bzw. das Material in situ aushärten zu lassen. Vertreter davon gibt es von der Firma Synthes und Stryker (*CRS / SRS* und *BoneSource*).

Eine weitere große Familie der synthetischen Materialien stellen die Polymere dar, beispielsweise Poly-L-Laktid, Poly-D, L-Laktid, Polyglykoxide, Polycaprolactone oder Komposite aus den verschiedenen Materialien. Je nach Zusammensetzung der Materialien resultieren daraus verschiedene Resorptionszeiten. Ein Nachteil dieser Materialien sind jedoch die pH-Wert Verschiebungen, die während der Degradierung der Matrizen durch die sauren Abbauprodukte entstehen. Der saure pH-Wert wirkt der Knochenbildung und der Biokompatibilität entgegen [16, 44]. Daher besteht im Moment das Bestreben, die Polylaktide als Hauptkomponenten eines Biomaterials durch andere Materialien zu ersetzen.

Eine weitere Materialgruppe bilden die Kompositmaterialien, bei denen Kombinationen von verschiedenen Trägermaterialien miteinander kombiniert werden. Die Firma Artoss GmbH vertreibt *NanoBone*, das aus Hydroxylapatit und Siliziumdioxid besteht, eine tannenzapfenartige Struktur aufweist und sehr bruchfest ist. Bei einem weiteren Produkt - *Fortoss Vital* - wird Kalziumphosphat und Kalziumsulfat miteinander kombiniert und resultiert in einer pastösen, formbaren Masse. Ein aus β -TCP und Hydroxylapatit hergestelltes Material ist *Easy Graft* des Herstellers Sunstar.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die bisher kommerziell erwerblichen Produkte hinsichtlich deren mechanischen, biokompatiblen und osteokonduktiven

sowie -induktiven Eigenschaften laufend verbessert werden. Ein weiterer sehr wichtiger Faktor ist die Gefäßbildung, die durch die Matrix zugelassen und gefördert werden muss. Ein geeignetes Produkt, das all die genannten Eigenschaften vereint, ist bisher noch nicht entwickelt worden.

Es ist bekannt, dass sowohl die Zusammensetzung als auch die Oberflächenbeschaffenheit, die Steifigkeit und der Porendurchmesser des Trägermaterials die Differenzierung der Stammzellen beeinflussen kann. Somit ist für die Knochenregeneration ein Material sehr geeignet, das relativ steif ist und einen Porendurchmesser zwischen 100 und 500 μm aufweist, wohingegen weichere Matrizen für diese Anwendung keine Vorteile aufweisen [45-47].

In bisherigen Arbeiten dieses Forschungslabors stellte sich Polylaktid als geeignetes Biomaterial für die Kultivierung von humanen Kieferperiostzellen heraus [3, 48]. Da das PLGA jedoch die oben genannte Verschiebung des pH-Wertes verursacht, wurde in der vorliegenden Arbeit nach weiteren Alternativen gesucht und auf β -TCP als Kernmatrix gewechselt, die nur geringe Polylaktid-Anteile in der Ummantelung enthielt.

β -Trikalziumphosphat als Trägermaterial für das Knochen Tissue Engineering

Das β -Trikalziumphosphat gehört zu den Phosphaten - es handelt sich dabei um ein festes Kalziumsalz der ortho-Phosphorsäure. Die Verwendung von TCP als Knochenersatzmaterial hat stark zugenommen in den letzten Jahren. Alpha- und beta-TCP besitzen exzellente Resorptionsfähigkeiten, die der natürlichen Knochenneusynthese nahe kommt [49]. β -TCP besitzt nachweislich eine gute Biokompatibilität und Osteokonduktivität, wie in Tierversuchen und klinischen Studien gezeigt werden konnte. In klinischen Studien wurde TCP sowohl bei der Therapie von marginalen, periapikalen und periodontalen Defekten als auch bei Alveolar-knochendefekten eingesetzt [50, 51].

Die Mechanismen, die der Resorption von β -TCP zugrunde liegen, werden kontrovers diskutiert. Die eine Hypothese basiert auf der Resorption durch interstitielle Flüssigkeit in Absenz von Osteoklasten. Der andere Mechanismus basiert auf der zellgesteuerten

Einleitung

Zersetzung von Matrizen basierend darauf, dass Osteoklasten in der Defektregion detektiert werden konnten [52-54].

β -TCP Matrizen werden über einen sehr aufwändigen Prozess der mehrmaligen Sinterung bei 1500°C hergestellt. Daher ist bei einer möglichen Biofunktionalisierung der Matrix das Einbringen von Molekülen, Proteinen, Wachstumsfaktoren, Peptiden o.ä. in den Herstellungsprozess nur sehr schwer möglich und muss aus diesem Grund nach dem Herstellungsprozess erfolgen. Da es sich bei β -TCP um ein anorganisches Material ohne funktionelle Gruppen handelt, ist eine kovalente Kopplung von Molekülen an das Material im Vergleich zu der einfachen physikalischen Adsorption problematisch [55]. Durch eine entsprechende Ummantelung oder Beimischung von Materialien mit funktionellen Gruppen in die Matrix ist jedoch eine kovalente Kopplung möglich.

Die kommerziell erwerbliche *Cerasorb*-Matrix (Fa. Curasan) ist eine synthetische β -TCP Matrix mit speziellen micro-, meso- und makro-Poren, deren Struktur eine erhebliche Oberflächenvergrößerung für die Anheftung von Proteinen oder anderen Molekülen darstellt. Um die notwendigen reaktiven Gruppen zu erzeugen, wurde in diesem Projekt die Matrix *Cerasorb* mit einer PLGA-Schicht und vergleichend dazu mit einer Graphenoxidschicht ummantelt, die beide jeweils reaktive Gruppen für eine Biofunktionalisierung aufweisen. An diese funktionellen Gruppen können sowohl Peptide als auch Aptamere kovalent gekoppelt werden.

Biofunktionalisierung von Trägermaterialien

Im Laufe ihrer Entwicklung hat die Implantatforschung drei Generationen durchlaufen. In der ersten Generation dienten die Implantate lediglich als mechanische Stütze bzw. Schiene für das fehlende Gewebe. Hierbei kamen hauptsächlich Metalle bzw. Titan zum Einsatz, beispielsweise bei Hüftprothesen. Implantate der zweiten Generation wurden daraufhin entwickelt, dass sie nicht nur die mechanische Stabilität des fehlenden Gewebes übernehmen, sondern sich auch in das umliegende Gewebe gut einfügen (osteokonduktiv) und biodegradierbar sind. In jüngerer Vergangenheit wurde die dritte Generation von Biomaterialien entwickelt. Diese neuartigen Materialien übernehmen nicht nur die mechanische Funktion und sind bioresorbierbar, sondern

beeinflussen aktiv Zellfunktionen wie die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung und wirken somit auch osteoinduktiv.

Weitere Modifikationen wie z.B. die Inkorporation von chemotaktischen (zell-anziehenden) Faktoren oder Zelladhäsionsmolekülen [56, 57], die die Zellanheftung stimulieren, das Einbringen von Wachstumsfaktoren [58-61] oder die Immobilisierung mit diversen Fängermolekülen, die bestimmte Zelltypen spezifisch anziehen sollen, wurden entwickelt [62, 63]. Die oben genannten Ansätze zur Verbesserung der Biomaterialien beinhalten die Reduktion unspezifischer-, sowie die Förderung spezifischer Proteinadsorption durch Immobilisierungen von Zell-Erkennungsmotiven/-Faktoren, um die Zell-Substrat-Interaktion zu kontrollieren und zu verstärken [64]. Zahlreiche Varianten der möglichen Biofunktionalisierung von Biomaterialien sind in dem Review-Artikel von Maia und Ko-Autoren zusammengefasst [65].

Kovalente Immobilisierung von Molekülen an Trägermatrizen

Moleküle und Proteine, u.a. auch die hier verwendeten RGD-Peptide und Aptamere, haben das Potential, durch Adsorption an Oberflächen anzuheften. Eine stabile kovalente Bindung der Peptide an das Material ist jedoch notwendig, um nicht wie in der gelösten Form die Integrin-Rezeptoren abzusättigen und somit zu blockieren, sondern vielmehr um eine Zelladhäsion unterstützen zu können. Weiterhin kann eine fokale Adhäsion nur dann stattfinden, wenn der Ligand den kontraktilen Kräften widersteht – ist das nicht der Fall, so entsteht nur eine schwächere, fibrilläre Adhäsion [57, 66]. Außerdem können die Zellen die Integrin-Liganden (in diesem Fall die gelösten Peptide) durch Internalisierung entfernen [67].

Reaktive Gruppen für die kovalente Bindung von Peptiden oder anderen Molekülen sind beispielsweise Hydroxyl-, Amino- und Carboxylgruppen. Diese können durch Methoden wie „Blending“ (kovalente Kopplung der Moleküle an andere Moleküle wie z.B. PLL oder PEG und der anschließenden Immobilisierung des Konstruktes durch Adsorption), Co-Polymerisierung, physikalische Behandlung, alkalische Hydrolyse, Reduktion, Oxidation und Plasmabehandlung generiert werden [57].

In vielen Studien werden die RGD-Peptide und andere Moleküle über stabile Amidbindungen gekoppelt. Dazu wird auf der Oberfläche des Trägermaterials eine Carboxylgruppe erzeugt, die mit dem nukleophilen N-Terminus des Peptids bzw. dem

Einleitung

zugänglichen N-Atom des zu immobilisierenden Moleküls reagiert. Für diese Reaktion können verschiedene Crosslinker verwendet werden wie z.B. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC, wasserlöslicher Crosslinker), Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, lösungsmittellöslicher Crosslinker) oder Carbonyl-Diimidazol (DCI, wasserlöslich). Ein Problem bei dieser Methode liegt darin, dass die Peptide verschiedene funktionelle Gruppen aufweisen, wodurch die Richtung der aufgetragenen Moleküle nicht steuerbar ist. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die reaktiven Gruppen durch Hydrolyse schnell deaktiviert werden [57].

Um diese Probleme zu umgehen, können Schutzgruppen an die Peptide angebracht werden. Dieser Prozess erfordert jedoch eine zeitaufwändige Behandlung der Peptide mit Trifluoressigsäure (TFA). Ein zweiseitiger Prozess der Kopplung beinhaltet die Aktivierung der Carboxylgruppe mit anschließender Hydrolyse (mittels N-Hydroxysuccinimid-Esters) im ersten Schritt und der Peptidkopplung in wässriger Lösung im zweiten Schritt. Die Carboxylgruppe der Aspartat-Seitenkette wird durch diese Methode nicht aktiviert. Durch die Pronierung in Wasser wird die Nucleophilität der Arginin-Seitengruppe fast eliminiert. Die Effizienz kann durch Peptidexzess und Veränderungen des pH-Wertes, der Temperatur und der Inkubationszeit gesteigert werden [57].

Testsysteme zum Nachweis der immobilisierten Peptide

Die Analytik der immobilisierten Peptide bzw. Moleküle kann durch verschiedene Testsysteme erfolgen.

Durch Röntgen-Photonen-Spektroskopie kann eine zerstörungsfreie Elementanalyse zur Detektion der Anreicherung von Kohlenstoff- und Stickstoffatomen durchgeführt werden, anhand welcher Rückschlüsse auf die Peptidmenge gezogen werden können. Die Elektronen werden hierbei angeregt und eine Photoionisation findet statt, wodurch diese aus den inneren Atomorbitalen abgespalten werden. Die Bindungsenergien der Elektronen sind elementspezifisch, wodurch man von der Messung auf die Elemente schließen kann. Markiert man die Peptide zusätzlich mit Fluor oder Jod, so kann neben dem qualitativen Nachweis der Elemente auch eine Quantifizierung durchgeführt werden [57].

Zur genauen Quantifizierung der immobilisierten Peptide wird die Aminosäureanalyse nach kompletter Hydrolyse der Konstrukte durchgeführt. Alternativ kann das

Einleitung

Hydrolysat in einem Ninhydrin-Test quantifiziert werden, in dem die UV-Absorption gemessen und mit kalibrierten Kontrollen verglichen wird.

Sehr geringe Mengen an Peptid können durch eine radioaktive Markierung spektroskopisch detektiert werden. Durch einen Gamma-Zähler kann die Dichte der Peptide auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Der Nachweis der nicht gekoppelten Peptide mittels HPLC kann ebenfalls quantifiziert werden, jedoch ist diese indirekte Messung weniger verlässlich als die anderen Methoden.

Weitere Nachweismethoden beinhalten den Sakaguchi-Assay, bei dem durch eine Quantifizierung die Arginin-Gruppen der Peptide detektiert werden und den Bichinonsäure Assay (BCA), bei welchem komplette Proteine quantifiziert werden [57].

In diesem Projekt werden neben den Peptiden auch Oligonukleotide wie Aptamere auf den Oberflächen immobilisiert. Eine Methode zur Quantifizierung von Oligonukleotiden stellt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dar [68].

Eine weitere Methode zur Quantifizierung von Aptameren stellt der Quanti-Fluor-Assay dar, bei dem sowohl ss- (einzelsträngige) als auch ds- (doppelsträngige) DNA nachgewiesen werden können. Er basiert auf der Bindung eines Fluoreszenzfarbstoffes an die DNA.

Mithilfe der Atomic-Force-Microskopie kann die Verteilung der Moleküle auf der Oberfläche detektiert werden [57, 69, 70].

Kontaktwinkelanalyse zur Oberflächencharakterisierung von Feststoffen

Durch die Analyse der Kontaktwinkel zwischen einem Prüfkörper und einer Testflüssigkeit können die Oberflächeneigenschaften von Materialien charakterisiert werden. Hierbei wird ein flüssiges Medium auf den zu prüfenden Feststoff getropft und der Grenzflächenkontakt der Medien mit einer Kamera detektiert (Abbildung 15). Durch das Anlegen einer Tangente an dem Berührungspunkt des Tropfens mit dem Feststoff kann der Kontaktwinkel bestimmt werden. Beträgt dieser weniger als 90° bei der Verwendung von Wasser als Testflüssigkeit, handelt es sich um hydrophile Oberflächen und der Prüfkörper wird als benetzbar bezeichnet. Beträgt dieser mehr als 90° , so wird die Oberfläche als hydrophob und nicht benetzbar bezeichnet. Erreichen die Kontaktwinkel $160-180^\circ$, so werden diese Oberflächen als

ultrahydrophob bezeichnet und man spricht vom Lotus-Effekt. Durch die Anwendung verschiedener Testflüssigkeiten können anhand dieser Technik ebenfalls Aussagen über die freie Oberflächenenergie der Feststoffe getroffen werden.

Graphenoxid und seine Anwendungen

Kohlenstoffatome stellen die molekulare Grundlage aller Prozesse des Lebens dar und können in der reinen Form vorliegen, wie in Diamant und Graphit. Darüber hinaus kommen sie auch in der gebundenen Form von Carbonaten, Kohlenstoffdioxid, Kohle, Erdgas und Erdöl vor und sind dazu in der Lage, hochkomplexe Verbindungen einzugehen.

Durch die Atomorbitaltheorie können die verschiedenen Erscheinungsformen des Kohlenstoffs erklärt werden. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen, die in verschiedenen Schalen um den Atomkern rotieren, lassen sich anhand von Orbitalen bestimmen, was durch Rutherford und Bohr anfang des 20. Jahrhunderts definiert wurde [71]. Sie unterscheiden zwischen verschiedene Orbitalen (s, p, d, f), wobei die erste Hauptschale nur ein s-Orbital aufnehmen kann und die zweite Schale ein s- und drei p-Orbitale. Je weiter außen sich die Schale befindet, desto mehr Orbitale können aufgenommen werden und das Energieniveau steigt.

Abhängig von der Zahl und der Art der Orbitale können unterschiedliche Hybridorbitale entstehen, die Kombinationen aus den einzelnen Atomorbitalen darstellen. Das Atom Kohlenstoff besitzt lediglich s- und p- Orbitale, wodurch 2 verschiedene Hybridisierungen möglich sind. Die sp^3 - Hybridisierung stellt die Grundlage der Diamantsstruktur dar, wohingegen die sp^2 - Hybridisierung die Basis der Graphitstruktur ist.

Bei Graphen und Graphen-basierten Kompositen handelt es sich um eine Einzelschicht aus Kohlenstoff, die im Forschungsbereich der Nanowissenschaften immer mehr an Bedeutung gewinnt. Zum einen kommt das Graphit zur Anwendung, die eine dicht gepackte Matrix darstellen und zum anderen das Graphenoxid, das eine hexagonale Gitterstruktur aufweist (Abbildung 2).

Einleitung



Abbildung 2: Darstellung verschiedener Graphenstrukturen.

Aus: Fibronectin-tethered graphene oxide as an artificial matrix for osteogenesis [72].

Die Kohlenstoffatome besitzen verschiedene reaktive Gruppen wie Hydroxyl- und Epoxidgruppen auf der Schicht. An den Enden befinden sich Carboxyl- und Carbonylgruppen, die zur Kopplung von Biomolekülen verwendet werden können [73] (Abbildung 3).

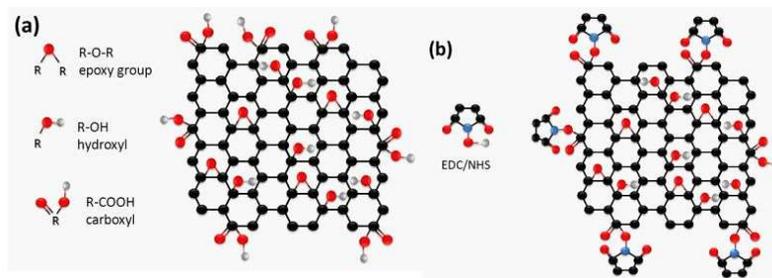


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Graphenoxid mit den funktionellen Gruppen zur kovalenten Kopplung von Molekülen.

Aus: Preparation of graphene oxide-based surface plasmon resonance biosensor with Au bipyramid nanoparticles as sensitivity enhancer [74].

Das Graphenoxid besitzt einige einzigartige Eigenschaften wie z.B.

- den Quanten-Hall-Effekt (bei tiefen Temperaturen und sehr starken Magnetfeldern steigt die Spannung nicht linear sondern in Stufen an),
- eine hohe Träger-Mobilität schon bei Raumtemperatur (hohe Mobilität der Elektronen),
- eine große Oberfläche,
- eine gute optische Transparenz,
- ein hohes Elastizitätsmodul (beschreibt den Zusammenhang zwischen Spannung und Dehnung bei der Verformung eines Festkörpers) und
- eine sehr gute Leitfähigkeit.

Einleitung

Nach der Entdeckung der interessanten Eigenschaften des Graphens begannen zahlreiche interdisziplinäre Studien, die von Anwendungen in der Elektronik bis hin zur Biomedizin reichten. Graphen-Applikationen sind sowohl in der Nanoelektronik, Nanophotonik, Biosensorik als auch in der Generierung von Nanokompositen denkbar. Im letzten Jahrzehnt wurden Graphen-enthaltende Materialien wie Graphenoxid, Kohlenstoff-Nanotubes, aktivierte Kohlenstoffkomposite, fluorinierte Graphene und dreidimensionale Graphen-Schäume entwickelt. Die Anwendungen für diese Materialien lagen hauptsächlich im Bereich Biosensorik und Theranostik oder in der Analyse von Zell-Substrat-Verbindungen.

Im Bereich der regenerativen Medizin und dem Tissue Engineering wurden bisher verhältnismäßig wenige Versuche unternommen, um die Kohlenstoff-Nanotechnologie zur Anwendung zu bringen [75]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Graphen-basierte Nanomaterialien wie Graphen, Graphenoxid und Kohlenstoff-Nanotubes die Stammzelladhäsion, -proliferation und -differenzierung steuern können [76].

Beispielsweise wurde in einer Studie Graphenoxid als Oberflächenbeschichtung von Titan-Implantaten verwendet, um BMP-2 und Substanz P über eine zeitabhängige Freisetzungskinetik abzugeben. Substanz P ist ein Neuropeptid, das als Neurotransmitter an Schmerzrezeptoren fungiert, spielt eine Rolle bei entzündlichen Prozessen und bewirkt eine Weitstellung der Gefäße (Vasodilatation). In dieser Studie resultierte die Faktorfreisetzung in einer erhöhten Aktivität der alkalischen Phosphatase und unterstützte die Knochen-Neubildung [77].

In einer weiteren Studie wurde eine Matrix aus Graphenoxid- (GO-) durchsetzten, elektrogenesponnenem Polylaktid-Poly-Glykolid (PLGA) generiert, die durch die GO-Anteile hydrophiler wurde, und die nachweislich die Knochenregeneration förderte [78].

Die Arbeitsgruppe Park und Ko-Autoren generierte eine Titan-Beschichtung, die aus Fibronectin und Graphenoxid bestand, die die osteogene Differenzierung von Präosteoblasten und deren Mineralisation verstärkte [72].

Eine jedoch bisher weitgehend ungeklärte Komponente in der Anwendung der Kohlenstoff-Materialien ist die Toxizität des Materials. In-vitro zeigte das Material eine sehr gute Zellkompatibilität, allerdings wird das Potential der Nanozytotoxizität kontrovers diskutiert [79].

Einleitung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass über Graphenoxid im Bereich des Tissue Engineerings noch nicht ausreichend viel bekannt ist und dass es interdisziplinär ein sehr vielversprechendes Material mit besonderen Eigenschaften darstellt. Es besitzt ein hohes Potential im Bereich der Nanokompositmaterialien oder Biomaterial-Biofunktionalisierung zur Anwendung zu kommen. Die Prozesse der Degradierung und Nanotoxizität müssen jedoch genau analysiert werden, um potentielle Gefahrenquellen für die klinischen Anwendungen auszuschließen.

Polylaktid-Polyglykolid (PLGA) und seine Anwendungen

Bei Polylaktid-Poly-Glykolid handelt es sich um eine Mischung aus Polylaktid und Polyglykolid, die zu verschiedenen Anteilen miteinander kombiniert werden können. Die Materialien basieren auf der organischen Substanz Milchsäure und werden bisher routinemäßig in der Klinik als resorbierendes Nahtmaterial angewendet.

Die Strukturformel des Polymers ist im Folgenden dargestellt:

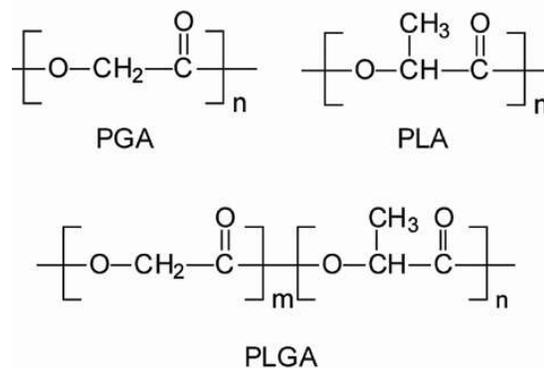


Abbildung 4: Strukturformel Polylaktid-Polyglykolid

Aus: <http://drug-dev.com/uploads/public/images/media/PublicationsArticle/001446.jpg>

Im Tissue Engineering werden als synthetische Polymere am häufigsten gesättigte Poly-alpha-Hydroxy-Ester verwendet, zu denen Polylaktide und Polyglykoxide und deren Ko-Polymere gehören. Die chemischen Eigenschaften und die jeweilige anteilige Zusammensetzung legen die Degradierungsgeschwindigkeit fest.

Diese basiert auf der hydrolytischen Degradierung durch eine Esterspaltung, dessen monomere Komponenten durch natürliche Abbauege eliminiert werden. PGA ist ein hydrophiles und hochkristallines Polymer, das schnelle Degradierungsraten zeigt und zu Metaboliten konvertiert wird. PLA wird durch den Zitronensäurezyklus abgebaut.

Einleitung

Trotz der chemischen Ähnlichkeit mit PLA besitzt PGA sehr unterschiedliche chemische, physikalische und mechanische Eigenschaften, die auf die Methylgruppe am alpha-Kohlenstoff zurückzuführen sind. Für das Knochen Tissue Engineering ist die biokompatible Kombination von Polylactid-Polyglykolid vorteilhafter aufgrund der Tatsache, dass die Degradierungsgeschwindigkeit durch die Kristallinität, durch die Komposition der Seitenketten und wegen der Balance zwischen Hydrophilie und Hydrophobie besser kontrollierbar ist [80].

Die Degradierung der Einzelkomponenten (PGA oder PLA) findet in 4 Schritten statt: Zunächst findet eine Hydratation statt, bei der Wasser die amorphen Regionen penetriert, und sowohl die van der Waals Kräfte als auch die Wasserstoffbrückenbindungen gespalten werden. Danach kommt die initiale Degradierung, bei der kovalente Bindungen gespalten werden und das Molekulargewicht sich verringert. Darauf folgt die konstante Degradierung, bei der die Carboxylgruppen durch Autokatalyse den Degradierungsprozess triggern. Der Massenverlust erfolgt hauptsächlich durch die Spaltung der kovalenten Bindungen des Rückgrats, die einen Integritätsverlust hervorrufen. Der letzte Schritt ist die Solubilisierung der löslichen Moleküle im wässrigen Milieu [81].

Dagegen PLGA ist nicht wasserlöslich, sondern in verschiedenen Lösungsmitteln wie Tetrahydrofuran, Aceton oder Ethylacetat löslich.

Die Degradationsgeschwindigkeit ist von verschiedenen Parametern abhängig: zunächst determiniert das Molekulargewicht die Degradierungsrate - je höher das Molekulargewicht, desto länger die Degradierungskinetik. Eine weitere Determinante ist die Zusammensetzung von Laktiden zu Glykoliden – die Laktide sind aufgrund der Methylketten weniger hydrophil, absorbieren weniger Wasser und degradieren dadurch langsamer. Des Weiteren spielen sowohl die Stereochemie als auch die Endgruppenfunktionalisierung eine Rolle. Polymere, die einen Ester als Endgruppe und somit auch eine freie Carboxylgruppe aufweisen, haben eine längere Halbwertszeit. Aufgrund der Zugänglichkeit für Wassermoleküle hat die äußere Form der Trägermatrizen und das Milieu, in dem sich die Matrizen befinden ebenfalls einen Einfluss auf die Degradationszeit [82].

Trotz gewisser Vorteile bei der Verwendung von PLGA im Vergleich zu seinen Einzelkomponenten, liegen die Limitationen der PLGA-Kombination darin, dass die Osteokonduktivität nicht optimal ist, die mechanischen Eigenschaften

Einleitung

verbesserungswürdig und die sauren Abbauprodukte bei der Degradation nachteilig sind. Daher wird PLGA meist in Kombination mit anderen Keramiken, Biogläsern und weiteren Materialien angewandt.

Bisher werden Polymere in verschiedenen Ausgangsformen wie Schwämme, Pulver und Formkörper angewendet.

PLGA ist im Knochen Tissue Engineering ein beliebtes Material, da es wie oben erwähnt, zellkompatibel ist und die Degradierung kontrolliert ablaufen kann [83]. Das Material wird derzeit als komplette Trägermatrix verwendet, die mit Wachstumsfaktoren oder Molekülen funktionalisiert werden kann [84, 85].

Eine weitere Anwendung ist die Verpackung von Molekülen in PLGA Nanopartikeln, die über eine gesteuerte Freisetzungskinetik den Wirkstoff abgeben [86].

RGD-Peptide

Die extrazelluläre Matrix besteht aus zahlreichen Proteinen wie z. B. aus Kollagen, Osteopontin, Vitronektin, Tenascin, von Willebrand-Faktor, Bone Sialoprotein, Fibronektin, Fibrinogen, Laminin usw. [57]. Die meisten extrazellulären Matrixproteine besitzen eine gemeinsame konservierte Bindungsdomäne, die als RGD-Peptid oder RGD-Motiv bezeichnet wird. Über die RGD-Motive (bestehend aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure) binden Proteine der Extrazellulärmatrix an Integrinrezeptoren der Zelle und aktivieren bestimmte Zellfunktionen wie die Zelladhäsion, das Zellwachstum und die Differenzierung [84, 87-89]. Die Integrine bestehen aus zwei Transmembraneinheiten: der alpha- und beta-Untereinheit. Diese Untereinheiten werden beliebig miteinander kombiniert und legen die Ligandenspezifität fest. Die RGD-Bindungsdomäne ist nicht spezifisch und bindet an mindestens die Hälfte der bisher 24 entdeckten Integrineinheiten [90, 91]. Somit können sie verschiedene Zellfunktionen steuern und haben zugleich einen positiven Einfluss auf das endotheliale System [92]. Ebenfalls belegt ist der Einfluss der RGD-Peptide auf den Knochen-Umbau, weshalb sie sich für die Biofunktionalisierung von Trägermaterialien im Bereich Knochen Tissue Engineering sehr gut eignen [93]. Wichtig bei der Biofunktionalisierung mit diesen Peptiden ist jedoch die kovalente Kopplung der Peptide, da diese in löslicher Form die Integrinrezeptoren blockieren und somit die Zelladhäsion verhindern [57].

Einleitung

RGD-Peptide gibt es in der linearen oder in der zyklischen Form (RGDfK), die laut Literatur die stabilere Form ist. Es ist beschrieben, dass für die zyklischen Peptide einen stärkeren Effekt auf den Prozess der Osteogenese haben [88, 94], jedoch konnte dies in eigenen Vorarbeiten mit humanen Kieferperiostzellen nicht bestätigt werden [84]. Weiterhin ist bekannt, dass die flankierenden Aminosäuren ebenfalls einen Einfluss auf die Zellantwort haben [57].

Zahlreiche Studien berichten über die Einbringung von RGD-Peptiden in bzw. auf Matrizen [57]. Die Verwendung eines Platzhalters (Spacer) zwischen Biomaterial und Peptid führt zur Bildung einer erhöhten Anzahl an Bindestellen für die Peptide und erhöht somit auch die Zugänglichkeit der Peptide für die Zellen [95, 96]. Es wurde gezeigt, dass ein Minimum an Platz zwischen Trägermaterial und RGD vorhanden sein muss, um die Zelladhäsion zu gewährleisten [97]. An das Peptid können bis zu 13 Glycin-Moleküle an den N-Terminus synthetisiert werden ohne die Bindung zu beeinträchtigen. Die Länge des Spacers muss jedoch limitiert sein, da die Zellen eine enge Bindung zur Oberfläche bevorzugen [98, 99]. Als Spacer können u.a. Moleküle wie Poly-L-Lysin (PLL) oder Polyethylenglykol (PEG) dienen.

Der Vorteil der Peptidimmobilisierung anstelle der Immobilisierung kompletter Matrixproteine liegt darin, dass diese dichter gepackt aufgebracht werden können. Die eigentliche Domäne, die die Zelladhäsion triggert, ist beim RGD-Peptid als separate Bindungsdomäne besser zugänglich für die Zellen als im Protein integriert [89]. Außerdem bleibt die Funktionalität der Peptide beim Prozessieren der Trägermaterialien eher erhalten als die Proteine, deren Bioaktivität eher beeinträchtigt wird.

Diese Technik kam in diesem Projekt zur Anwendung, da eigene Vorarbeiten zeigten, dass für die humanen Kieferperiostzellen die Verwendung eines PLL-Spacers in Kombination mit dem linearen CGRGDS Peptid förderlich ist [84].

Aptamere

Aptamere sind einzelsträngige RNA- oder DNA- Oligonukleotide, die anhand ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur ihr Target in einer ähnlichen Weise wie Antikörper erkennen und binden [100, 101]. Es gibt viele Anwendungsbereiche für Aptamere, die im Folgenden dargestellt sind [102].

Einleitung

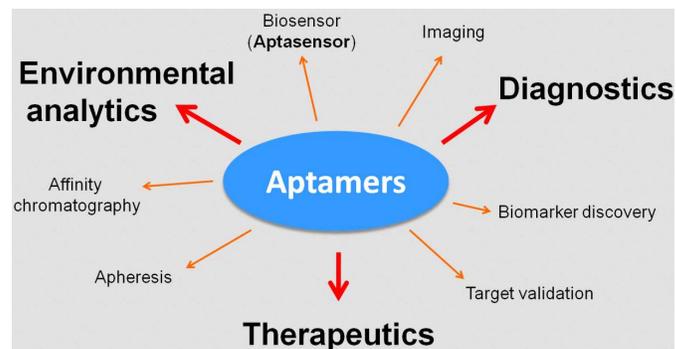


Abbildung 5: Applikationsbereiche von Aptameren.

Aus: <http://www.rna-network.com/aptamere/technology/index.html>

Natürlicherweise existieren Aptamere als sogenannte „*Riboswitches*“ und agieren als Nukleinsäure-basierte regulatorische Elemente. Sie stammen aus Regionen der mRNA, die nicht translatiert werden, und können aufgrund ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur Gen-regulatorisch wirken.

Durch ihre Oligonukleotidstruktur haben sie gegenüber Antikörpern einige Vorteile:

- geringere Herstellungskosten,
- schnellere und reproduzierbarere Synthese,
- Zugänglichkeit für chemische Modifikationen und
- hohe Langzeitstabilität,
- Möglichkeit der Markierung mit fluoreszierenden Molekülen und der daraus resultierenden Eignung für die Entwicklung von Biosensoren,
- physikalisch Stabilität, sowohl bei hohen Temperaturen als auch variierenden pH-Werten,
- theoretisch gegen jedes Target generierbar - sowohl Moleküle, Proteine und Zellen [102-104].

Aptamere wurden bisher als Fängermoleküle für verschiedene Zelltypen wie mesenchymale Stammzellen [4, 105], Osteoblasten [106], Lymphoblasten [107], dendritische Zellen [108] und Tumorzellen [109] verwendet.

Die Generierung von Aptameren erfolgt normalerweise durch den SELEX Prozess (Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), der erstmals von Ellington, Szostak und Gold 1990 beschrieben wurde [104]. Hierbei handelt es sich um eine kombinatorische chemisch-biologische in vitro Methodik. Diese zeitaufwändige

Einleitung

Prozedur wurde anfangs manuell durchgeführt, inzwischen läuft sie zum Teil automatisiert ab.

Das Prinzip der Aptamergenerierung basiert darauf, dass ein Oligonukleotidpool von 10^{15} verschiedenen Sequenzen mit dem gewünschten Target inkubiert wird. Im Folgenden wird die Spezifität gegenüber dem Target in jeder Runde erhöht, indem eine negative Gegenselektion durchgeführt wird mit einem Target an das das Aptamer nicht binden soll. Dieser Prozess wird je nach Anreicherungseffizienz zwischen 10 und 20 Mal wiederholt, bevor die Aptamere zur Identifikation durch Sequenzierung kloniert werden können. Nach der Sequenz-Identifikation können die Aptamere in beliebigen Mengen und mit sämtlichen Modifikationen synthetisiert werden [104].

Das Aptamer, das in dem vorliegenden Projekt immobilisiert wurde, wurde in einer früheren Studie in unserem Labor in einer Kooperation mit der Herz- Thorax- und Gefäßchirurgie als Fängermolekül für osteogene Progenitorzellen aus dem Gesamtzellverband der humanen Kieferperiostzellen in einem SELEX-Prozess über 17 Runden generiert (Abbildung 6). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das identifizierte Aptamer 74 eine gesteigerte Bindungsaffinität gegen osteogen andifferenzierte mesenchymale Stammzellen zeigte, und weniger gegen andere Zelltypen oder Zelllinien. Außerdem erfolgte mithilfe des Aptamers eine durchflußzytometrische Zellsortierung, bei der gezeigt werden konnte, dass die Aptamer-positiven Kieferperiostzellen ein tendenziell stärkeres Mineralisationspotential aufwiesen. Nach dem Aufbringen der Aptamer-positiven Zellen auf 3D Trägermatrizen aus Polylaktid, wurden in diesen vermehrt Präzipitate bis in den Kern der Materialien detektiert, im Vergleich zu den Konstrukten, die mit den Aptamer-negativen Zellen besiedelt wurden [4].

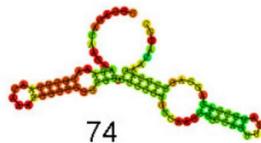


Abbildung 6: Struktur des generierten Aptamer 74 gegen humane Kieferperiostzellen.

Trotz der Prozess-Automatisierung existieren derzeit verhältnismässig nur wenige diagnostische und therapeutische Aptamere auf dem Markt. Das einzige FDA- (Food and Drug Administration) zugelassene therapeutische Aptamer ist Makugen, ein

Einleitung

Aptamer, das an den VEGF-Rezeptor bindet und bei der altersbedingten Makuladegeneration verabreicht wird [111]. In junger Vergangenheit publizierten Gold und Ko-Autoren eine Studie über einen Multiplex-Aptamer-basierten Array zu Diagnostikzwecken, bei dem 813 verschiedene Proteine durch die generierten Oligonukleotide detektiert werden können [112].

Bei der Applikation von Aptameren muss jedoch bedacht werden, dass sie von ubiquitären intrazellulären und im Blut zirkulierenden Nukleasen gespalten werden können. Zur Aptamer-Stabilisierung können wie bereits oben erwähnt Modifikationen durchgeführt werden. Allerdings sollten diese Modifikationen bereits vor, anstatt nach der Selektion durchgeführt werden, da diese die Bindungskapazität stark verändern können. Hierzu gehören Modifikationen mit Polyethylenglykol, Nukleotid-Verlängerungen oder das Einführen von Phosphothioat-Bindungen [113].

Aptamer-Analytik: Rasterkraft-Spektroskopie

(Atomic Force Microscopy - AFM Spektroskopie)

Eine Methode, mit der Oberflächeneigenschaften von Materialien charakterisiert werden können, bietet das Rasterkraftmikroskop. Dabei werden die zu untersuchenden Oberflächen durch einen sogenannten Cantilever (Blattfeder) abgerastert und mechanisch abgetastet. Weiterhin können mithilfe dieser Methode Molekül-Molekül-, Zell-Molekül- oder Zell-Zell-Interaktionen analysiert werden. Hierbei werden die Kräfte detektiert, die benötigt werden, um die vorhandene Bindung zu zerreißen.

Während der Rauigkeitsmessung wandert der Cantilever über die Oberfläche, und je nach vorhandener Struktur wird die unterschiedlich starke Biegung des Cantilevers über optische Sensoren detektiert (Abbildung 7).

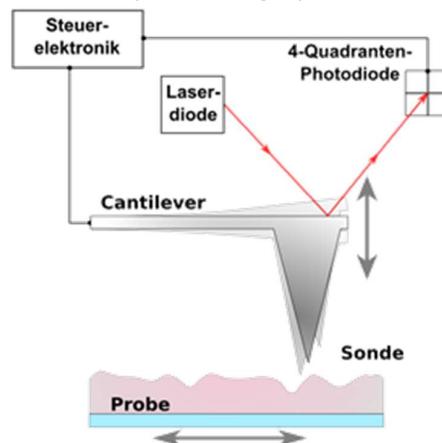


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Prinzips von Rasterkraft-Messungen.

Aus: <http://www.xs-optics.com/content/vergleich-der-verschiedenen-messverfahren>

Außer der Anwendungsmöglichkeit zur Messung der Oberflächenrauigkeit kann die Rasterkraft-Mikroskopie auch für die Messungen der atomaren Kräfte verwendet werden. Dabei können Affinitätskräfte zwischen Biomolekülen detektiert werden, folglich können die Bindungsaffinitäten von Aptameren an ihr Target ebenfalls analysiert werden [114]. Für die Messung der Affinitätskräfte kann das Aptamer an den Cantilever immobilisiert werden und in Interaktion mit den in Kulturschalen ausgesäten Zellen treten. Dazu werden Cantilever verwendet, die eine Spitze (Tip) haben. Untersucht man die Interaktionen mehrerer Moleküle, so verwendet man einen flachen (Flat-Tip) Cantilever, der breiter ist und auf dem viele Moleküle immobilisiert werden können. Die Bewegung des Cantilevers erfolgt bei der Affinitätskraftmessung lediglich in der vertikalen Richtung, im Gegensatz zur Oberflächenrauigkeitsmessung, bei der die Bewegung des Cantilevers auch in der Horizontalen stattfindet. Der Cantilever wird auf die Probe gesenkt und mit einer bestimmten Kraft aufgedrückt, um dann von der Probe entfernt zu werden. Die Kräfte, die dabei auf die Nadel wirken, werden in Form von Stufen im Kraft-Zeit-Diagramm sichtbar. Aus diesen Kurven können Rückschlüsse auf die Adhäsionskräfte und die Zellelastizität gezogen werden. Diese Methode ist kostengünstig und wird aus dem Grund in der Aptamer-Analytik immer häufiger verwendet.

In dem vorliegenden Projekt soll die Bindungsaffinität des in den Vorarbeiten generierten Aptamers zu den humanen Kieferperiozyten durch AFM-Analysen untersucht werden.

Applikationen von Aptameren

In der Diagnostik und der Therapie von Krankheiten gewinnen Aptamere immer mehr an Bedeutung. Eine sehr wichtige Rolle spielen sie im Bereich Biosensorik und Diagnostik, bei denen sie an Oberflächen immobilisiert ihre spezifischen Targets detektieren können.

Weiterhin werden an Nanopartikel gebundene Aptamere in der gezielten Adressierung der Medikamente an ihr spezifisches Target (*targeted drug delivery*) eingesetzt, um

das Medikament oder den Wirkstoff an den Ziel- bzw. Wirkort zu leiten. Diese Biokonjugate haben den Vorteil, dass die Spezifität der Aptamere die gezielte Detektion bzw. die Bindung steuern können [106, 115-117].

Da die Aptamere mit den jeweiligen Modifikationen synthetisiert werden können, ist dies ein deutlicher Vorteil im Hinblick auf den Transfer in die klinische Anwendung. Durch die Kopplung mit verschiedenen Nanomaterial-basierten Amplifikationen kann die Intensität des analytischen Signals verstärkt werden. Bei der Aptamer-Entwicklung muss darauf geachtet werden, die physiochemischen Eigenschaften so zu wählen, dass die unspezifische Bindung reduziert wird und gleichzeitig die aktive Struktur des Aptamers nicht verändert wird, damit die Aptamer-Bindung nicht lediglich auf Adsorption basiert. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Zelltoxizität, die so gering wie möglich gehalten werden sollte [117].

Aptamere im Tissue Engineering

Im Bereich des Tissue Engineerings haben die Aptamere bislang kaum eine Anwendung gefunden, stellen jedoch mit ihren Eigenschaften attraktive Kandidaten für Biofunktionalisierungen von Trägermatrizen dar. Hierbei können sie als Fängermoleküle für einen gewünschten Zelltyp agieren, auf diese Weise eine spezifischere Besiedelung der Biomaterialien und dadurch eine schnellere Geweberegeneration bewirken [62, 63, 118, 119]. Dies wurde bereits mit einem Aptamer gegen Endothelzellen zur Biofunktionalisierung von Gefäßimplantaten (Stents) im Schweinmodell realisiert [63].

Soontornworajit und Ko-Autoren entwickelten kürzlich ein Wirkstoff-Freisetzungssystem, das Aptamer-basiert war. Hierbei wurde das PDGF-bindende Aptamer mit dem Target-Protein in ein Gelatinegel eingebracht. Durch die starke Aptamer-Protein-Bindung konnte die Freisetzung des Wirkstoffes PDGF verlangsamt werden, und die unerwünschte, sehr schnelle Initial-Freisetzung (ohne Aptamer-Bindung) von 70 % auf 10 % reduziert werden [120].

Aptamere können im Bereich des Knochen Tissue Engineerings ebenfalls als Moleküle fungieren, die den Wirkstoff direkt an den Wirkort transportieren und binden (targeted drug delivery), und so die Knochenregeneration verstärken. Im Jahr 2015 publizierten Zhang und Ko-Autoren eine Studie, in der ein Aptamer gegen Osteoblasten generiert wurde. Das Aptamer wurde an Lipid-Nanopartikel immobilisiert, die eine siRNA gegen

Einleitung

Plekho 1 (negativer Regulator der Osteogenese) enthalten. Durch die Aptamer-initiierte, gerichtete Überlieferung von siRNA gezielt an die Osteoblasten, konnte die effektive Herunterregulierung von Plekho-1 erreicht werden, um somit den Vorgang der Osteogenese zu verstärken [106].

Das Aptamer 74 und die Lipid-Nanopartikel mit dem Aptamer gegen Osteoblasten sind derzeit die einzigen uns bekannten Aptamere im Bereich des Knochen Tissue Engineerings.

In dem vorliegenden Projekt wurde das Aptamer 74 auf die Oberfläche von β -TCP-Blöcken immobilisiert. Die Konstrukte wurden zunächst mit einer Polylaktid-Polyglykolid Schicht zur Erzeugung von funktionellen Gruppen ummantelt, und die Aptamere anschließend über geeignete Crosslinker kovalent gekoppelt.

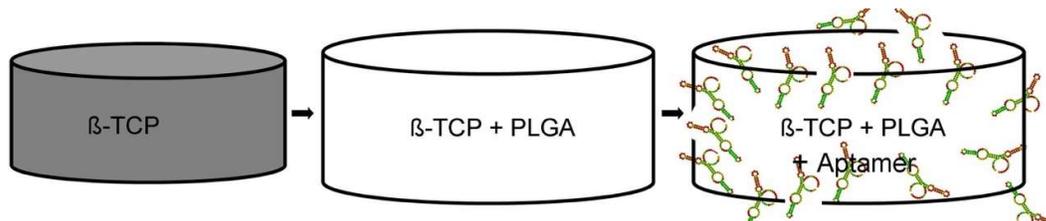


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Aptamerimmobilisierung auf den β -TCP-Blöcken.

Zunächst wurden die β -TCP-Blöcke mit PLGA ummantelt, um einen Donor für funktionelle Gruppen zu erschaffen. Anschließend wurde das Aptamer über die Carboxylgruppen des PLGA kovalent immobilisiert.

Die Verwendung von Aptameren in der regenerativen Medizin ist bisher wie oben erwähnt noch sehr spärlich, obwohl Aptamere geeignete Moleküle als Ersatz für Antikörper für die Oberflächenfunktionalisierungen darstellen. Für die Verwendung von Aptameren im Knochen Tissue Engineering ist es notwendig, Oligonukleotide gegen Moleküle oder Zellen zu generieren, die eine wichtige Rolle bei der Knochenneubildung spielen, um damit im nächsten Schritt die Trägermaterialien zu biofunktionalisieren.

Zielsetzung

Der bisherige Goldstandard bei Kieferrekonstruktionen besteht in der Transplantation autologer (patienteneigener) Knochenteile in den Knochendefekt und ist mit z.T. erheblichem Gewebeverlust des betroffenen Patienten verbunden [1]. Seit geraumer Zeit wird deshalb nach einer weniger invasiven Alternative gesucht. Die Implantation eines Tissue Engineering Konstruktes, dessen Trägermatrize mit autologen Stammzellen besiedelt ist, kann möglicherweise eine solche Alternative darstellen [2]. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte eine innovative und von den Grundeigenschaften vielversprechende Kombination einer resorbierbaren β -Trikalziumphosphat (β -TCP) Trägermatrix generiert werden. Hierbei sollte diese mit bioaktiven Molekülen funktionalisiert werden, die die Osteogenese von Kieferperiostzellen (JPC) unterstützen. Da es sich bei Trikalziumphosphat um ein anorganisches Material handelt, weist es keine funktionellen Gruppen zur kovalenten Kopplung der Moleküle auf. Daher wurde zunächst die Basis gelegt und die Trägermatrix mit Polylaktid-Polyglykolid (PLGA) oder alternativ mit Graphenoxid (GO) als Donor für funktionelle Gruppen ummantelt und die daraus resultierende Oberflächenstruktur vergleichend analysiert, was den ersten Teil der Arbeit darstellte. An die funktionellen Gruppen der PLGA bzw. GO Ummantelung wurden im zweiten Teil der Arbeit RGD-Peptide (Bindungsdomäne vieler Proteine der extrazellulären Matrix) immobilisiert, um die Knochenregeneration zu induzieren und zu fördern. Von den RGD-Peptiden war u.a. aus eigenen Vorarbeiten bekannt, dass diese die Zelladhäsion (Anhaftung), die Proliferation (Wachstum) und die osteogene Differenzierung von Kieferperiostzellen fördern und damit den Knochenheilungsprozess verstärken [3].

In einem weiteren Ansatz sollten die PLGA-ummantelten Konstrukte mit einem Aptamer beschichtet werden, das in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe generiert wurde. Dieses Aptamer wurde gegen Progenitorzellen aus dem Gesamtzellverband des humanen Kieferperiosts generiert und bindet an diese mit höherer Affinität als an andere Zelltypen. Aus diesem Grund könnte es als Fängermolekül für osteogene Progenitorzellen auf der Oberfläche von Biomaterialien fungieren [4].

Gegenstand dieser Dissertation war also die Herstellung der biofunktionalisierten Konstrukte, sowie die anschließende Testung ihrer Effekte auf die Funktionen von Kieferperiostzellen während der *in-vitro* Zellkultur.

Material und Methoden

Zellkultur

Erstellen von Primärkulturen

Das Periostgewebe wurde während Routineinterventionen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie - nach Einverständniserklärung der Patienten - entnommen (Ethikvotum 194/2008BO2). Die ca. 1 cm² großen Gewebestücke wurden in PBS zerkleinert und für 90 Min. mit Kollagenase XI (1500 U/ml, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) verdaut. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit DMEM:F12 Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland), 1 % Fungizone und 1 % Streptomycin kultiviert. Für die folgenden Experimente wurden Zellen von der 3. – 9. Passage verwendet. Bei einer Konfluenz von ca. 95 % wurden die Zellen passagiert, indem sie mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und in frische Zellkulturflaschen überführt wurden.

Besiedelung der Trägermatrizen

Die 3D Matrizen wurden für 60 Min. mit FCS-haltigem Zellkulturmedium vorinkubiert. Die Zellen wurden in dieser Zeit von den Kulturflaschen abtrypsiniert und auf die beschichteten Konstrukte aufpipettiert. Für die zweidimensionale Kultur wurden 2×10^3 Zellen in die 96-Well Platten ausgesät, für die dreidimensionale Kultur wurden 5×10^4 Zellen in einem Volumen von 50 µl auf die Scaffolds pipettiert und für eine Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden 150 µl Kulturmedium hinzugefügt, um ein Gesamtvolumen von 200 µl zu erhalten.

Biofunktionalisierung der Trägermatrizen

PLGA Ummantelung

2D PLGA Beschichtung von Zellkulturplatten

Für die zweidimensionale Beschichtung der 96-Well Platten wurden spezielle Kulturplatten aus Polypropylen verwendet, da das Lösungsmittel die herkömmlichen Polystyrenplatten beschädigt. Zunächst wurden verschiedene Lösungsmittel für das

Material und Methoden

Polylaktid-Polyglykolid (Poly(D,L-lactide-co-glycolide, MW 76 – 115000 Da, Sigma-Aldrich, Deutschland) auf ihre Zelltoxizität getestet – Tetrahydrofuran, Dichlormethan, Ethylacetat, DMSO und Azeton. 15 mg PLGA wurden in 3 ml Lösungsmittel aufgelöst und in einer Konzentration von 5 mg/ml in die 96-Well Platten pipettiert. Zur Evaporation des Lösungsmittels wurden die Platten über Nacht unter den Abzug gestellt. Die PLGA-beschichteten Platten wurden für die Sterilisation für 60 Min. UV-bestrahlt.

3D PLGA Beschichtung von β -TCP-Blöcken

Für die dreidimensionalen Konstrukte wurde eine PLGA Konzentration von 25 mg/ml in Ethylacetat verwendet. Dabei wurden zwei verschiedene Ummantelungsvarianten getestet. Zum einen wurden die Matrizen in 200 μ l PLGA-Lösung eingelegt und das Lösungsmittel evaporierte unter dem Abzug. Zur homogenen, beidseitigen Ummantelung wurde dieser Schritt von jeder Seite des Zylinders einmal durchgeführt – diese Variante wurde *“Dry coating”* genannt. Zum anderen wurde eine *“Dip Coating”* Variante durchgeführt, bei der die Konstrukte auf einer Kanüle aufgespießt in die PLGA Lösung eingetaucht und ca. 5-10 Mal in der Lösung gedreht wurden. Die Konstrukte wurden über Nacht getrocknet und zur Sterilisation 60 Min. von jeder Seite mit UV-Licht bestrahlt.

Graphenoxid Ummantelung

2D GO Beschichtung von Zellkulturplatten

Für die Graphenoxidschicht (GO) wurden 50 μ l der Stocklösung (Sigma Aldrich, Deutschland) mit einer Konzentration von 2 mg/ml auf die 96-Well Platte pipettiert und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die GO Lösung abgenommen und die Platten 10 Min. unter den Abzug zur Trocknung gestellt. Die Prozedur wurde 1-5 x wiederholt. Zur Sterilisation wurden die Platten für 60 Min. UV-bestrahlt.

3D GO Beschichtung von β -TCP-Blöcken

Zur Ummantelung der dreidimensionalen Blöcke, wurden die oben beschriebenen *Dip* und *Dry Coating* Varianten durchgeführt. Für die *Dip Coating* Variante wurden die Konstrukte zweimalig in 200 μ l der GO Lösung getaucht. Nach jedem Schritt wurden die Konstrukte für 10 Min. unter den Abzug zur Trocknung gestellt. Die *Dry Coating* Variante wurde mit 200 μ l GO Lösung durchgeführt und auch hier wurde die Lösung unter dem Abzug getrocknet.

Immobilisierung der PLGA-beschichteten/-ummantelten 2D Oberflächen bzw. 3D Trägermatrizen mit RGD-Peptiden

Die Immobilisierung der Peptide erfolgte an Poly-L-Lysin (PLL) als Spacer um die Zelladhäsion zu erleichtern. Somit wurde über die aktivierten Carboxylgruppen der Matrix und den Crosslinker EDC/NHS das PLL durch eine stabile Amidbindung an das PLGA gekoppelt. Im nächsten Schritt wurden die RGD-Peptide an den PLL-Spacer über eine Sulfhydrylbindung und den Crosslinker SPDP gebunden. Im Folgenden werden die gewählten Beschichtungsvarianten genau beschrieben:

Einfache Beschichtung innerhalb der PLGA- Ummantelung: Zunächst wurden die RGD-Peptide über den PLL-Spacer an das PLGA in Pulverform gekoppelt, dieses Material danach in Lösung gebracht und anschließend der β -TCP-Block damit ummantelt, damit die Peptidbeschichtung innerhalb der PLGA-Schicht ist und somit über einen Degradierungsprozess der Schicht langsam freigesetzt wird ("einfach – innerhalb Ummantelung, ursprüngliche Kopplungsmethode"; Abbildung 9A).

Zur Aktivierung der Carboxylgruppen des PLGA Resomers (Resomer 75:25, Evonik, Deutschland) wurde dieses für 30 Min. mit einer 3 M HCl- (2D Oberflächen) oder 0.3 M NaOH- (3D Scaffolds) Lösung bei 60°C anhydrolysiert. Ohne Waschen wurden die Proben in die Crosslinkerlösung gegeben, die sich aus 20 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS - Pierce, USA) und 50 mM EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid Hydrochlorid) in MES-Puffer (0,1 M MES, 0.5 M NaCl, pH 6) zusammensetzte und für 2 h bei RT schüttelnd inkubiert. Die Proben wurden 10 Min. mit MES-Puffer gewaschen und anschließend für 1 h mit einer Poly-L-Lysin (PLL) Lösung (1 mg/ml) als Spacer

Material und Methoden

inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 3 x 5 Min. mit Wasser gewaschen. Die Peptide (CGRGDS - Cys-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser, GenScript, USA) wurden über die Sulfhydrylgruppen des Cysteins durch den Crosslinker SPDP ((Succinimidyl 3-(2-Pyridyldithio)-propionat), Pierce, USA) an das PLL gebunden. Als Negativkontrolle wurde das Peptid mit der Sequenz CGRGES (GenScript, USA), bei dem eine Aminosäure ausgetauscht wurde, verwendet. Der Crosslinker SPDP wurde in DMSO gelöst, um eine Stocklösung mit einer Konzentration von 100 mM in HEPES-Puffer herzustellen. Die Inkubation mit dem Crosslinker erfolgte für 30 Min. leicht schüttelnd bei RT. Anschließend wurden die Proben einmal mit PBS/0,1 % Triton X-100 und zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Peptide in einer Konzentration von 1 mg/ml hinzugegeben und eine Stunde bei RT inkubiert wurden. Das Peptid-immobilisierte PLGA Resomer wurde anschließend durch die Zugabe von Ethylacetat in Lösung gebracht (Konzentration von 25 mg/ml) und für die Beschichtung der 2D Oberflächen bzw. für die Ummantelung der β -TCP Matrizen verwendet.

Einfache Beschichtung der PLGA- Oberfläche: Zusätzlich wurde eine Modifikation etabliert, in dem die β -TCP Matrix zuerst mit PLGA ummantelt wurde und die Peptide danach an die ummantelte Matrixoberfläche gekoppelt wurden.

Nach der Trocknung der PLGA-Schicht wurden hier durch NaOH die reaktiven Carboxylgruppen mobilisiert und eine hydrophile Oberfläche erzeugt, an die das PLL und die RGD-Peptide gebunden wurden. Somit befanden sich die Peptide auf der Oberfläche der Konstrukte ("einfach – Oberfläche" Abbildung 9B). Die einzelnen Kopplungsschritte erfolgten analog der einfachen Beschichtung innerhalb der PLGA-Schicht (siehe oben).

Doppelte Beschichtung innerhalb und auf der PLGA- Oberfläche: Um die Freisetzungskinetik der Peptide durch die Immobilisierung innerhalb der PLGA-Schicht und der gleichzeitigen Aufbringung der Peptide auf der Oberfläche zu verwirklichen, wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem die beiden Varianten miteinander kombiniert wurden. Hierbei wurden die Peptide zunächst an das PLGA gekoppelt, die β -TCP-Konstrukte damit ummantelt und zusätzlich noch die Oberflächen beschichtet – es

Material und Methoden

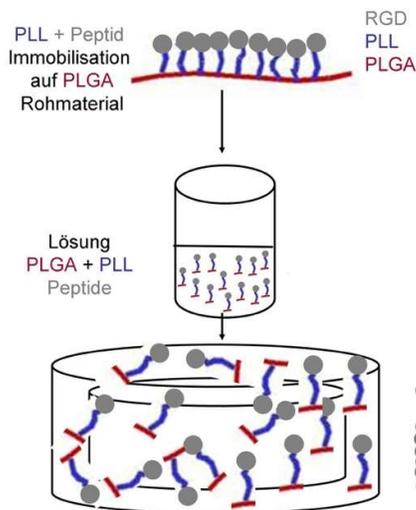
handelt sich dabei um eine doppelte Kopplung („doppelt, innerhalb + auf der Oberfläche“ Abbildung 9C).

Bei der doppelten Beschichtungsvariante wurde zunächst wie oben beschrieben die Peptide an das PLGA-Resomer immobilisiert, anschließend wurde die Prozedur nach der einfachen Beschichtung nochmals wiederholt. Somit befanden sich die Peptide sowohl innerhalb der PLGA-Schicht, als auch nach der zweiten Beschichtungsprozedur auf der Oberfläche der Konstrukte/Oberflächen.

Ursprüngliche Kopplungsmethode:

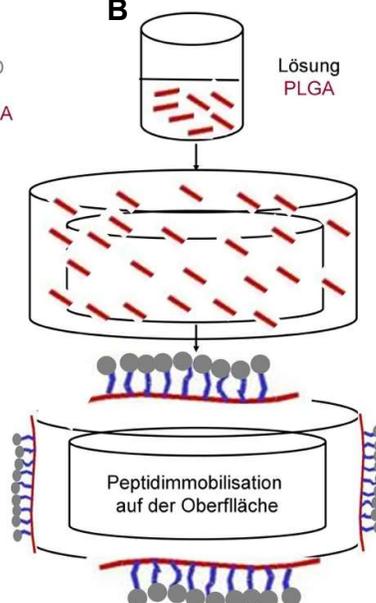
Modifikation:

A



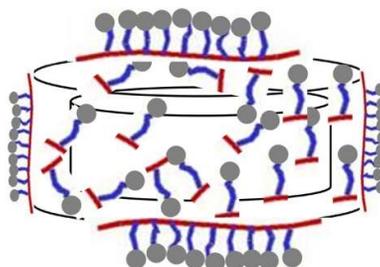
„Einfach - innerhalb Beschichtung“

B



„Einfach - Oberfläche“

C



„Doppelt - innerhalb + Oberfläche“

Abbildung 9: Schematische Darstellung der verschiedenen Peptid-Kopplungsvarianten.

A - einfach – innerhalb der Ummantelung; B - einfach – auf der Oberfläche; C - doppelt gekoppelt – innerhalb + auf der Oberfläche.

Immobilisierung der PLGA-beschichteten/-ummantelten 2D Oberflächen bzw. 3D Trägermatrizen mit Aptameren

Die PLGA-beschichteten/-ummantelten Oberflächen und Konstrukte wurden zur Mobilisierung der reaktiven Carboxylgruppen zunächst 30 Min. in 0.3 M NaOH Lösung bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Matrizen ungewaschen in 200 µl der Crosslinker-Lösung EDC/NHS (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid Hydrochlorid / N-Hydroxy-Succinimid) überführt und eine Stunde leicht schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Oberflächen und Konstrukte wurden 200 µl der Aptamer-Lösung (100 µg/ml) dazu pipettiert, über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend 3 x mit ultrapurem Wasser gewaschen.

Folgende Aptamersequenzen wurden verwendet:

Applikation	Modifikation	Sequenz des synthetisierten Aptamers
Immobilisierung auf PLGA	NH ₂ Gruppe (5' Ende)	5'-NH ₂ -C18-GGGAGACAAGAATAAACGCTCAACAAA TGGGTGGGTGTGGTGGGTGTGAAGGTGCGAGTTGA TTCGACAGGAGGCTCACAAACAGGC – 3'
Immobilisierung auf PLGA (Negativkontrolle)	NH ₂ Gruppe (5' Ende)	5'-NH ₂ -C18-GGGAGACAAGAATAAACGCTCAA-N40- TTCGACAGGAGGCTCACAAACAG GC-3'.
Stabilisierung	2 PTO Bindungen (3' Ende), PEG 11 kDa (5' Ende)	5'-NH ₂ - PEG 11kDa-C18-GGGAGACAAGAATAAACGCTCAACAAA TGGGTGGGTGTGGTGGGTGTGAAGGTGCGAGTTGA TTCGACAGGAGGCTCACAAACAGG*C* – 3'
Stabilisierung	PEG 11 kDa (5' Ende)	5'-NH ₂ - PEG 11kDa-C18-GGGAGACAAGAATAAACGCTCAACAAA TGGGTGGGTGTGGTGGGTGTGAAGGTGCGAGTTGA TTCGACAGGAGGCTCACAAACAGG*C* – 3'
Cantilever- Funktionalisierung	SH Gruppe (5' Ende)	5'-SH- C18 GGGAGACAAGAATAAACGCTCAACAAA TGGGTGGGTGTGGTGGGTGTGAAGGTGCGAGTTGA TTCGACAGGAGGCTCACAAACAGGC – 3'

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Aptamere und deren Modifikationen für die verschiedenen Applikationen.

Quantifizierung der immobilisierten Aptamermenge

Zur Quantifizierung der immobilisierten Aptamere wurde der Quantifluor ssDNA Assay Kit (Promega, Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach der Empfehlung des Herstellers. Dazu wurde der 20 x TE-Puffer mit Wasser zu 1 x TE-Puffer verdünnt. Die Verdünnungsreihe der Standards wurde mit dem NH₂-modifizierten Aptamer durchgeführt. Es ergab sich eine Konzentrationsreihe von 200,

Material und Methoden

100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 pg/µl. Das *Färbereagenz* wurde mit 1 x TE-Puffer 1:1000 verdünnt. Die Proben wurden mit 100 µl 1 x TE-Puffer und 100 µl Färbereagenz versetzt und leicht schüttelnd bei RT für 5 Min. inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte im BioTek Synergy HT Multi-Mode Microplatten-Reader (BioTek, Schweiz) bei 490 nm E_x / 580 nm E_m .

Rasterkraft-Spektroskopie (Atomic Force Microscopy - AFM Spektroskopie) zur Ermittlung der Bindungsaffinität der Aptamere an Kieferperiozyten

Cantilever-Beschichtung

Zur Immobilisierung der Aptamere wurden flache, (mehrere Moleküle berühren gleichzeitig die Zelle) goldbeschichtete Siliziumnitrid-Cantilever verwendet, die eine Federkonstante von 0.03 N/m und eine Resonanzfrequenz von 6 kHz besaßen und von der Firma Nanoworld (Neuchatel, Schweiz) hergestellt wurden. Die Cantilever wurden mit Isopropanol gereinigt und mit Ampuwa gespült, um die Isopropanolreste zu entfernen. Anschließend wurden die Cantilever mit 0.5 M Natriumhydrogencarbonat bedeckt, um die Thiolgruppe zu reduzieren – hierbei wurde die SH-Gruppe zu S⁻ reduziert. Die Aptamere wurden in einer Stoffmengenkonzentration von 1 nM in Wasser verwendet, für 5 Min. bei 95 °C denaturiert und auf Eis für 5 Min. gekühlt. Die Aptamerlösung inkubierte über Nacht bei 4°C. Nach einem erneuten Waschschriff und dem Trocknen waren die Cantilever bereit für die Verwendung der AFM-Spektroskopie.

AFM-Messungen

Die AFM-Spektroskopie wurde mit dem CellHesion® 200 Modul (JPK Instruments AG, Deutschland) bei Raumtemperatur und mit Aptamer-funktionalisierten Cantilevern durchgeführt. Dafür wurden auf 6-Well Platten kultivierte Zellen verwendet.

Folgende Versuchsgruppen wurden durchgeführt:

Material und Methoden

- verschiedene Zeitpunkte der Osteogenese von humanen Kieferperiostzellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen: Tag 3, 5, 7, 15 der osteogenen Induktion
- AFM-Messungen wurden mit Aptamer- versus Startbibliothek-immobilisierten Cantilever durchgeführt
- AFM-Messungen wurden mit Zellen aus 4 verschiedenen Donorpatienten und mit der Zelllinie BICR56 als Negativkontrolle durchgeführt.

Nach dem Einbau des Aptamer-funktionalisierten Cantilevers in das Gerät wurde er in einer Petrischale mit DMEM:F12 Medium ohne Zusätze kalibriert. Der Laser des AFM-Geräts wurde auf die Spitze des Cantilevers justiert und der Boden der mediumgefüllten Petrischale in kleinen 100 – 10 µm Schritten angesteuert. Für die Kalibrierung wurde eine Anlaufs-/Rückzugsgeschwindigkeit von 2 µm/s bei einer Abtastrate (Häufigkeit, mit der der Prüfkörper in einer vorgegebenen Zeit abgetastet wird und in ein zeitdiskretes Signal umgewandelt wird) von 2050 Hz für eine hohe Auflösung während des Kalibriervorgangs gewählt. Dazu wurde die Springkonstante des jeweilig verwendeten Cantilevers definiert und die Kalibrierung gestartet.

Für die Kraftmessungen wurden für jeden Zeitpunkt und jede Behandlung jeweils mindestens 15 Messungen an jeweils mindestens 3 verschiedenen Zellen pro Behandlung und pro Tag durchgeführt. Die Anlaufs-/Rückzugsgeschwindigkeit des Cantilevers wurde auf 2 µm/Sek. bei einer Bindungs-/Kontaktzeit von 35 Sek. und einer Abtastrate von 250 Hz eingestellt. Von einer fixierten Position aus berührte der Cantilever die Zelle und zog sich danach wieder zurück, wobei die Biegung des Cantilevers detektiert wurde, die proportional zur Kraft war. Die Kraftkurven wurden mit der *JPK image processing v. 3* Software (JPK Instruments, Deutschland) prozessiert und anhand einer Gruppierung der detektierten Kräfte in 10 pN Schritten analysiert.

Nachweis der Aptamerstabilität im humanen Plasma

Zur Bestimmung der Plasmastabilität der Aptamere wurden die modifizierten Oligonukleotide (ein 11 kDa PEG-Fragment sowie zwei Phosphothioat-Bindungen wurden am 5' Ende hinzugefügt, in einer Konzentration von 100 µg/ml in Vollblut inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0-, 1-, 2-, 4-, 8-, 12-, 36-, 72h) wurden 50 µl Aliquots für den Nachweis entnommen. Diese wurden mit Probenpuffer versetzt und auf ein 12,5 % Agarosegel des Flash-Gel-Systems (Lonza, Schweiz) aufgetragen und aufgetrennt. Die Banden wurden fotografisch detektiert und mittels der *Image-J* Software quantifiziert.

Kontaktwinkelanalysen zur Oberflächencharakterisierung der beschichteten Konstrukte

Für die Messungen der Kontaktwinkel wurden die Konstrukte wie oben beschrieben ummantelt. Die statischen Kontaktwinkel wurden mit Hilfe der „*Sessile drop*“-Technik (Methode des liegenden Tropfes) durchgeführt, die das „*Drop shape*“ (Tropfenkontur) *Analyse System DSA 10-MK2* (Krüss GmbH, Deutschland) verwendet. Hierbei wurde ein Tropfen hochreines Wasser auf die beschichteten Konstrukte pipettiert. Die Kontaktwinkel wurden innerhalb der ersten 20 Sek. nach dem Initialkontakt der Tropfen mit dem Material gemessen.

Rasterelektronenmikroskopie der 3D-ummantelten β -TCP Blöcke

Die Oberflächenbeschaffenheit und die Topographie der Konstrukte wurden mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) dargestellt. Vor der RE-Mikroskopie wurden die Konstrukte wie oben beschrieben ummantelt. Für die REM-Analysen mussten die Konstrukte bis in den Kern hinein getrocknet sein, wozu sie zunächst unter der Sterilbank luftgetrocknet und anschließend im Exsikator unter Vakuum komplett getrocknet wurden. Um die Oberfläche für die REM-Mikroskopie leitfähig zu machen, wurden die Konstrukte auf eine spezielle Vorrichtung aufgebracht und mit einer Gold-Palladium Schicht besputtert (*Baltec sputter coater SCD 050*). Die RE-Mikroskopie

wurde mithilfe des *Leo 1430 Elektronenmikroskops* der Firma Carl Zeiss (Deutschland) durchgeführt.

Messung der Porengröße der ummantelten Trägermatrizen

Die Porengröße wurde mithilfe der Software GIMP ermittelt. Dazu wurden pro EM-Aufnahme jeweils 10 Poren longitudinal und transversal vermessen und die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

In-vitro Analysen

Adhäsionsassay

Für den Adhäsionsassay wurden die Konstrukte wie oben beschrieben ummantelt und beschichtet. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Konstrukte über Nacht mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) in phosphatgepufferter PBS-Lösung bei 4°C inkubiert. Die für die Adhäsionsassays verwendeten Zellen wurden abtrypsinisiert und in einer Zelldichte von 5×10^4 bzw. 2×10^5 in die 2D Wells bzw. auf die 3D Konstrukte pipettiert. Die Zellpellets wurden in DMEM ohne FCS, jedoch 1x Ionenmix (1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 2,5 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.1 % BSA) enthaltend, resuspendiert. Die Zellen wurden in den 2D Wells für 3 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Die 3D Konstrukte wurden zunächst ohne die Zellen für 1 h in Zellkulturmedium vorinkubiert. Nach Zugabe der Zellen in 50 μl DMEM-Ionen-Mix wurden diese zuerst eine Stunde, und anschließend für zwei weitere Stunden nach der Zugabe von weiteren 150 μl DMEM-Ionenmix inkubiert. Nach der 3-stündigen Inkubation wurden die Konstrukte 3 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 3,7 % Formaldehyd für 15 Min. bei RT fixiert.

Anschließend wurden die Zellen entweder mittels Fluoreszenzmikroskopie oder mittels Kristallviolett färbung detektiert und quantifiziert.

Fluoreszenzfärbungen zur konfokalen Laserscanning Mikroskopie

Die fixierten Konstrukte wurden mit PBS / 0.1 % Triton X zur Permeabilisierung der Zellmembran für 10 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie gewaschen, mit

Material und Methoden

dem Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen, Deutschland) 1:40 in Wasser verdünnt und für 20 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert, um das Zytoskelett anzufärben. Die Kernfärbung wurde mit DAPI (1:1000 in Wasser verdünnt) in den 2D Wells und mit Sytox-Orange (1:1000 in Natriumchlorid, Invitrogen, Deutschland) auf den 3D Konstrukten durchgeführt. Die Detektion der dreidimensionalen Konstrukte erfolgte am konfokalen Laserscanningmikroskop der Firma Leica (*SP5*). Die zweidimensionalen Konstrukte wurden am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Deutschland) analysiert.

Kristallviolettffärbung der adhärennten Zellen

Nach der Fixierung der Zellen wurde eine 0.1 % ige Kristallviolettlösung in die Wells pipettiert und für 15 Min. bei RT inkubiert. Die Zellen wurden 3 x mit Wasser gewaschen, die besiedelten Platten umgedreht, luftgetrocknet und anschließend mikroskopisch detektiert. Zur Quantifizierung der Zelladhäsion wurde der Farbstoff durch 10 %ige Essigsäure für 30 Min. herausgelöst. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des *ELISA Readers ELx800* (BioTek Germany, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 550 nm.

Metabolischer Proliferationsassay

Die Proliferationsmessungen erfolgten anhand eines kolorimetrischen metabolischen Assays der Firma BIOZOL (*EZ4U*, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Deutschland). Das Protokoll wurde nach den Herstellerinstruktionen durchgeführt. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und durch 200 µl frisches Medium ersetzt, bevor 20 µl der Substratlösung hinzugegeben wurde. Für die Messungen der 3D-kultivierten Zellen wurden die Konstrukte am Untersuchungstag in Wells umgesetzt, in denen bereits 200 µl frisches Medium und 20 µl Substratlösung vorgelegt wurden. Nach einer 4-stündigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde die Absorption bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm mit dem *ELx800* (BioTek Germany, Deutschland) detektiert.

Osteogene Differenzierung

Um die MSCs osteogen zu stimulieren, wurden diese mit 4 μ M Dexamethason, 10 μ M Vitamin C und 100 μ M β -Glycerolphosphat als Zusätze im Zellkulturmedium über einen Zeitraum von 20-30 Tagen behandelt. Als Kontrollzellen dienten Zellen, die lediglich mit Zellkulturmedium behandelt wurden. Der Medienwechsel erfolgte 3 Mal wöchentlich.

Alizarinrotfärbung der Kalziumphosphatpräzipitate

Zur Detektion der synthetisierten Kalziumphosphatpräzipitate wurde der Zellmonolayer zunächst mit PBS gewaschen und danach mit eiskaltem Methanol für eine Minute fixiert. Anschließend wurde der Zellrasen mit 40 mM Alizarinlösung S (Sigma-Aldrich, Deutschland) für 20 Min. überdeckt und es folgten drei intensive Waschschrte mit Aqua dest. und PBS. Im letzten Schritt wurden die Zellen mit eiskaltem Ethanol dehydriert und luftgetrocknet. Die Kalziumphosphatpräzipitate erschienen hell- bis dunkelrot.

Zur Quantifizierung der Präzipitate wurden die Alizarinrot-gefärbten Wells mit 10 %iger Essigsäure versetzt, um den Farbstoff wieder in Lösung zu bringen. Der Zellmonolayer wurde mit einem Zellschaber vom Plattenboden abgekratzt. Die Proben wurden in ein Röhrchen überführt, für 30 Sek. stark gevortext und für 10 Min. auf 85°C erhitzt. Daraufhin wurden die Proben für 5 Min. auf Eis inkubiert und bei 20000 g für 20 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit 400 μ l Ammonium-Hydroxidlösung neutralisiert. Zur genauen Quantifizierung wurde eine Standardreihe nach Herstellerangaben (*Osteogenesis Quantitation Kit*, Milipore, Deutschland) aus der Alizarinlösung erstellt. Anhand der Standardreihe, konnten die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Die photometrische Detektion der Triplikate erfolgte bei 405 nm im *Elx800* Photometer (BioTek Germany, Deutschland).

Durchflusszytometrische Messung der Bindungsaffinitäten der stabilisierten Aptamere an Kieferperiostzellen

Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen mit osteogenem Stimulationsmedium andifferenziert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen durch Trypsinisierung abgelöst und pro Probe 2×10^5 Zellen verwendet. Dazu wurden diese zunächst in SELEX-Puffer (DMEM, 0.1% BSA, 3 mM $MgCl_2$) überführt.

Die Aptamere wurden in SELEX-Puffer zu einer Stoffmengenkonzentration von 200 pmol verdünnt, anschließend bei 85°C 10 Min. denaturiert und auf Eis für 10 Min. renaturiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl der Aptamerlösung resuspendiert und leicht über Kopf schüttelnd 45 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert.

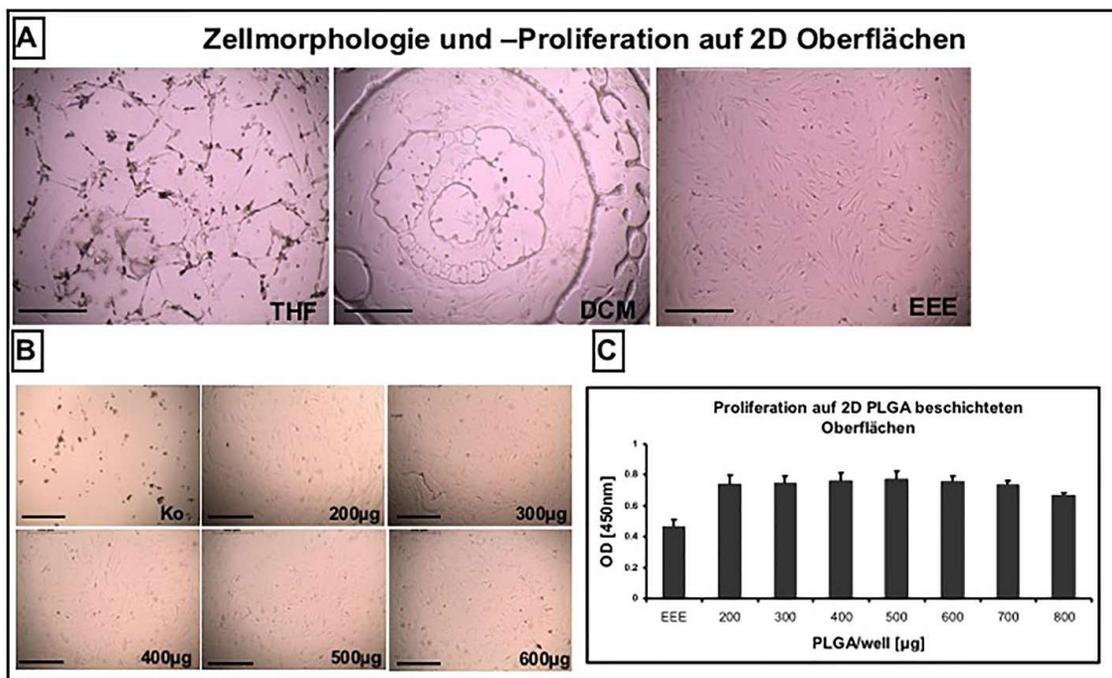
Die gebundenen Aptamere wurden über einen Antikörper gegen Polyethylenglycol (PEG) und einer Fluoreszenzmarkierung über einen Zweitantikörper detektierbar gemacht. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit dem PEG-markiertem und dem PEG-PTO-markiertem Aptamer inkubiert und 2 Mal mit PBS gewaschen. Der Erstantikörper (Kaninchen Antikörper gegen Polyethylenglycol, Abcam (ab 51257) Großbritannien) wurde 1:100 verdünnt in PBS/BSA eingesetzt, eine Stunde mit den Aptamer-markierten Zellen inkubiert und anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen. Der Fluoreszenz-markierte Zweitantikörper (Ziege gegen Kaninchen IgG – PE (Phycoerythrin), Abcam (ab 72465), Großbritannien) wurde 1:40 in PBS verdünnt eingesetzt und ebenfalls eine Stunde mit den Zellen bei RT inkubiert. Nach zwei Waschungen mit PBS wurden die gelabelten Zellen in FACS-Puffer überführt und durchflußzytometrisch am *Guava Flow cytometer EasyCyte* (Merck- Millipore, Deutschland) gemessen. Als Negativkontrollen fungierten die Zweitantikörperkontrolle als auch die unmarkierten Kontrollen, um das Hintergrundsignal des Erstantikörpers zu minimieren. Die Auswertung der Messungen erfolgte mithilfe der *Guava Soft Software (guava InCyte, Merck- Milipore, Deutschland)*.

Ergebnisse

Zellmorphologie und –proliferation auf PLGA- und GO-beschichteten 2D Oberflächen

Um funktionelle Gruppen auf dem anorganischen β -TCP Material zu erzeugen, wurden diese mit PLGA bzw. GO ummantelt. Um die Optimierung der Ummantelung kosteneffizient zu gestalten, wurde sie zunächst auf zweidimensionaler Ebene in einer 96-Well Platte etabliert. Parameter wie Lösungsmittel (Tetrahydrofuran, Dichlormethan, Ethylacetat), PLGA Menge (zwischen 200 und 600 μ g PLGA) und die Auftragsmenge der Suspension auf die Platte (25 – 100 μ l) wurden variiert und optimiert. Die resultierende Schicht wurde mikroskopisch und makroskopisch auf ihre Homogenität getestet. Eine homogene Schicht über die gesamte Platte, die keine konzentrischen Ringe oder Löcher innerhalb der Schicht aufwies, konnte lediglich mit dem Lösungsmittel Ethylacetat (EEE) erreicht werden (Abbildung 10A).

Die Zellkompatibilität wurde durch Adhäsions- und Proliferationsversuche analysiert. Es stellte sich heraus, dass das Lösungsmittel Ethylacetat mit einer PLGA-Menge von 500 μ g pro Well (Abbildung 10B) die stärkste Zelladhäsion zur Folge hatte und von der Handhabung der Suspension durch die erzielte Viskosität optimal war. Auf die Zellproliferation hatte die eingesetzte PLGA-Menge, sowie das gewählte Lösungsmittel keinen wesentlichen Effekt, wie in Abbildung 10C dargestellt ist.



Ergebnisse

Abbildung 10: Optimierung der PLGA-Beschichtung auf zweidimensionaler Kultivierungsebene.

A: Verwendung verschiedener Lösungsmittel für PLGA (Tetrahydrofuran (THF), Dichlormethan (DCM), Ethylacetat (EEE)). B: Variierung der eingesetzten PLGA-Mengen (200, 300, 400, 500, 600 µg) in Ethylacetat und das Zellwachstum darauf nach 3 Tagen der Besiedelung mit Kieferperiostzellen. C: metabolischer Proliferationsassay der Kieferperiostzellen, die in den Wells mit variierender PLGA Menge proliferierten. Maßstabsbalken: 500 µm.

Zusätzlich zur PLGA Beschichtung wurde Graphenoxid als Ummantelungsmaterial in Betracht gezogen und ebenfalls auf zweidimensionaler Ebene in 96-Well Platten in einer Konzentration von 2 mg/ml aufgetragen. Dies erfolgte anhand eines Dip Coatings mit zunächst variierenden Anzahlen an Überschichtungen mit GO. Es stellte sich heraus, dass die Zellen unabhängig von der Überschichtungs-Anzahl adhäririerten und proliferierten und keine Unterschiede zu sehen waren (Abbildung 11).

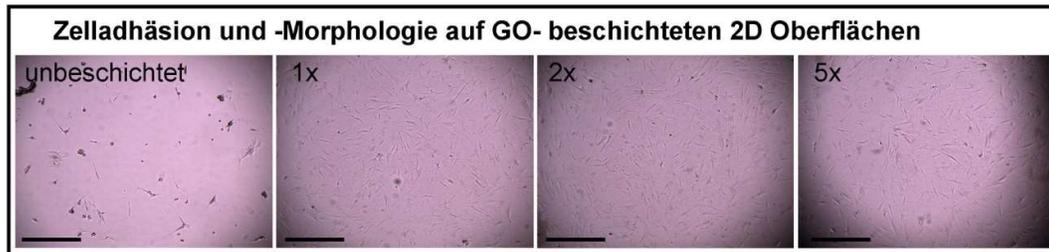


Abbildung 11: Morphologie der Kieferperiostzellen in GO-beschichteten 2D Wells in Abhängigkeit von der Überschichtungs-Anzahl.

Maßstabsbalken: 500 µm.

Zelladhäsion auf PLGA- und GO-beschichteten 2D Oberflächen

Anhand einer fluoreszenzmikroskopischen Färbung wurde die Morphologie der in den beschichteten Wells adhärenen Kieferperiostzellen sichtbar gemacht (Abbildung 12). Die GO-beschichteten Oberflächen zeigten zwar die stärkste Zelladhäsion, jedoch wiesen die Kieferperiostzellen eine Stammzell-untypische Morphologie auf. Die Zellen, die auf PLGA adhäririerten, zeigten eine normale Zellmorphologie, in der eine klare Abgrenzung zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma sichtbar war. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen, die auf GO adhäririerten, eine untypische Expansion von zellulären Ausläufern mit weitgehend nicht sichtbaren Zellkernen.

Ergebnisse

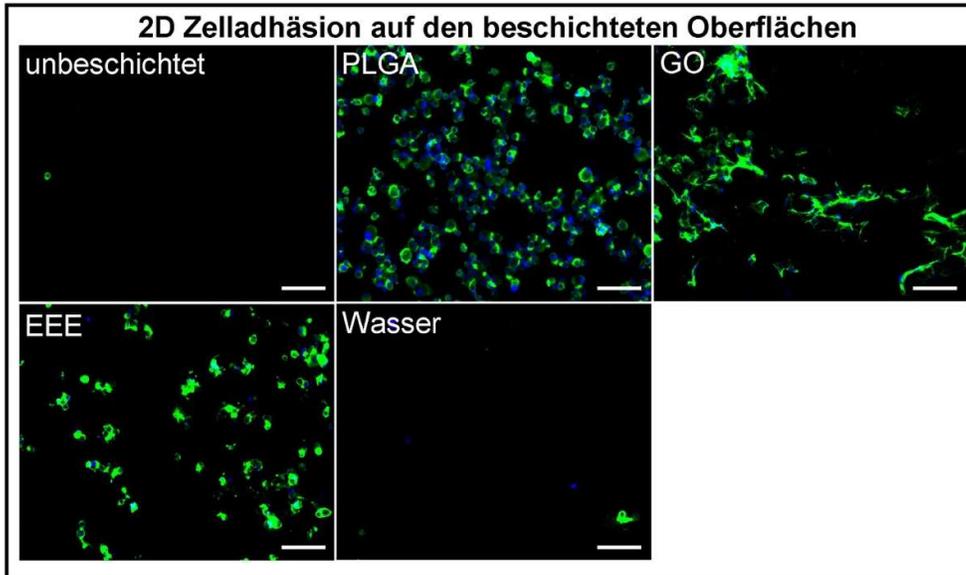


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopischer Zelladhäsionsassay auf den beschichteten Oberflächen auf zweidimensionaler Kultivierungsebene.

Unbeschichtete-, PLGA und GO beschichtete- und mit Ethylacetat (EEE) und Wasser (H₂O) behandelte Wells. Grün: Phalloidin – Zytoskelett, blau: DAPI – Zellkerne.

Maßstabsbalken: 100 µm.

Weiterhin wurde die Zellproliferation in PLGA- und GO- beschichteten Wells nach 3 Tagen der Kultivierung anhand eines metabolischen Assays ermittelt (Abbildung 13). Beide Beschichtungsvarianten wiesen signifikant erhöhte Viabilitätsraten im Vergleich zu deren Kontrollen auf. Die Zellproliferation auf den unbeschichteten Oberflächen wurde als 100 % gesetzt und die optische Dichte der eigentlichen Messungen der Proben in Relation zu dieser Kontrolle errechnet. Zellen, die in Lösungsmittel-behandelten Wells proliferierten, zeigten gesteigerte Viabilitätsraten von $(160 \pm 14) \%$ im Vergleich zu den Zellen, die in unbeschichteten Wells wuchsen. Zellen, die in PLGA und GO-beschichteten Wells proliferierten, wiesen etwa doppelt so hohe Viabilitätsraten auf ($(219 \pm 14) \%$ und $(210 \pm 9) \%$). Die Unterschiede in der Zellproliferation auf beschichteten Oberflächen im Vergleich zu den dazugehörigen Lösungsmittelkontrollen war nur im Fall der GO Beschichtung statistisch signifikant (GO $p < 0.003$, PLGA $p < 0.165$). Die Zellproliferation zeigte keine signifikanten Unterschiede in PLGA- versus GO- beschichteten Wells auf ($p < 0.495$).

Ergebnisse

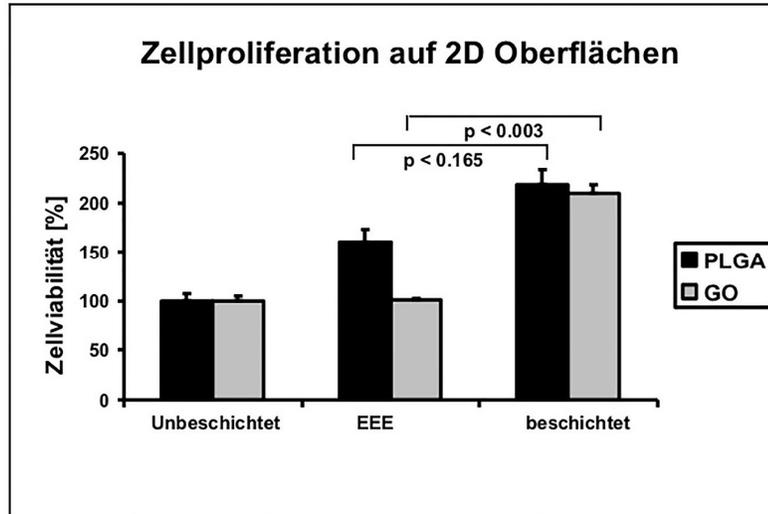


Abbildung 13: Metabolischer Zellproliferationsassay von Kieferperiozstzellen, die 3 Tage auf PLGA- und GO- beschichteten 96-Well Zellkulturplatten proliferierten.

EEE – Lösungsmittelkontrolle, PLGA – Polylaktid-Polyglykolid, GO - Graphenoxid.

3D Ummantelung von β -TCP Blöcken mit PLGA und GO

Nach der Etablierung der Methode auf zweidimensionaler Ebene wurde sie auf die dreidimensionale Ebene übertragen. Dafür wurden Trägermatrizen bestehend aus β -Trikalziumphosphat der Firma Curasan (*Cerasorb M*) verwendet. Es wurden zwei Coating-Varianten getestet: beim „Dip Coating“ wurden die Matrizen mehrmals in die PLGA- bzw. GO-Lösung eingetaucht, rotiert und anschließend getrocknet. Bei der „Dry Coating“ Variante wurden die Trägermatrizen in die Suspension gelegt, anschließend ließ man das Lösungsmittel evaporieren (Abbildung 14). Dieser Prozess wurde von beiden Seiten der zylinderförmigen Matrizen durchgeführt, damit eine homogene, allseitige Ummantelung ermöglicht wird.

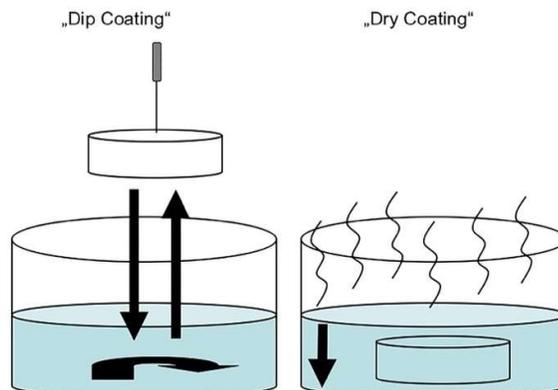


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Dip und Dry Coating Variante.

Ergebnisse

Dip Coating: Eintauchen und rotieren der Matrizen in der Lösung. Dry Coating: Überschichten der Matrizen mit der Lösung und Evaporieren des Lösungsmittels.

Oberflächencharakterisierung der ummantelten 3D β -TCP-Blöcke

Kontaktwinkelanalysen der Oberflächen

Die durch die PLGA- bzw. GO-Beschichtung entstandene Oberfläche der Matrizen wurde mittels Kontaktwinkelanalysen auf ihre Hydrophilizität untersucht. Dafür wurde ein Tropfen Wasser auf die Oberfläche der Konstrukte geträufelt und der Winkel zwischen dem Tropfen und der Oberfläche gemessen.

Per Definition spricht man bei Kontaktwinkeln von bis zu 90 Grad von einer hydrophilen Oberfläche, bei größeren Kontaktwinkeln von einer hydrophoben Oberfläche.

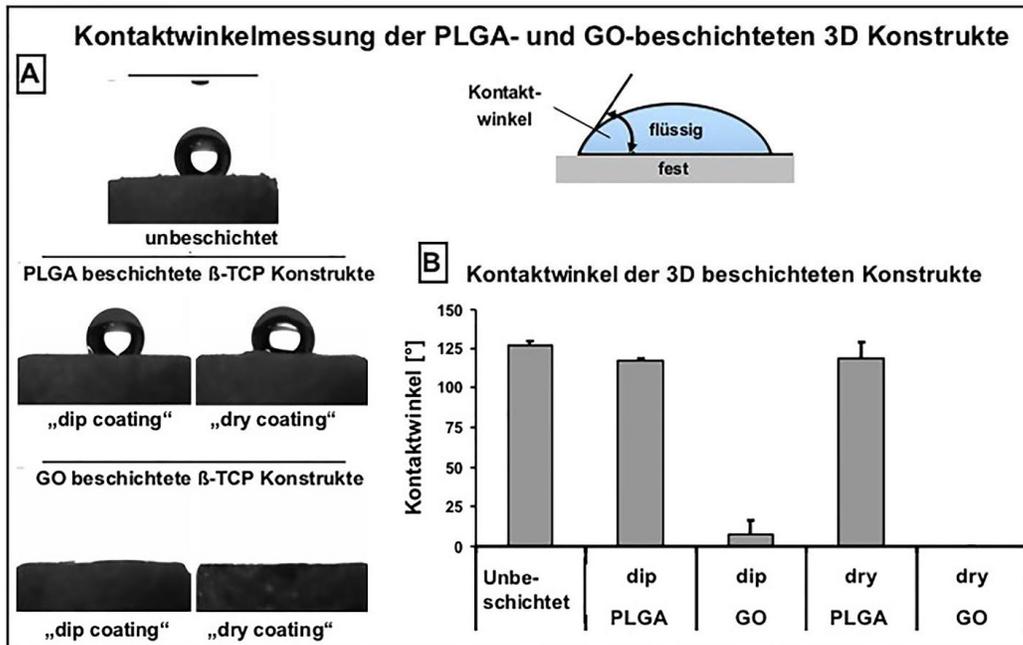


Abbildung 15: Charakterisierung der Trägermaterial-Oberfläche – Test zur Ermittlung der Hydrophilizität mittels Kontaktwinkelanalysen.

A: Darstellung der Wassertropfen auf den beschichteten Oberflächen. B: Messung der Kontaktwinkel.

Nach der GO-Beschichtung wurde eine stark hydrophile Oberfläche (Kontaktwinkel von $0-7.5 \pm 10.6^\circ$) detektiert, im Gegensatz zu der stark hydrophoben Oberfläche nach der PLGA Beschichtung (Kontaktwinkel von $117.6 \pm 1.3^\circ$). Zwischen der Dip- und Dry Coating Variante ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede in den Kontaktwinkeln (Abbildung 15).

Ergebnisse

Um in den später folgenden Versuchen die Biomoleküle an das PLGA koppeln zu können, wurde das PLGA zunächst mittels Salzsäure (3M) anhydrolysiert, um reaktive Gruppen auf dem PLGA zu erzeugen. Die Säure zersetzte jedoch das β -TCP Trägermaterial, deshalb wurde als Alternative Natronlauge (0.3 M) verwendet. In Abbildung 16 sind die Kontaktwinkel der Salzsäure-behandelten Konstrukte vor- bzw. nach der PLGA-Beschichtung, der Peptidimmobilisierung (Einfach – innerhalb der Beschichtung) und der Natronlauge-Behandlung (Doppelt – innerhalb + Oberfläche; Einfach – Oberfläche) abgebildet. Durch die Säure-Behandlung (mit oder ohne Peptidimmobilisierung) blieb die Oberfläche etwa gleich hydrophob wie die unbeschichtete Kontrolle (unbeschichtet: $114.4 \pm 2.5^\circ$, PLGA: $114.0 \pm 2.0^\circ$, Einfach – innerhalb der Beschichtung: $110 \pm 9.5^\circ$), die basische Behandlung führte jedoch zur Bildung einer stark hydrophilen Oberfläche mit Kontaktwinkeln von $0 \pm 0^\circ$ (Doppelt – innerhalb + Oberfläche; Einfach – Oberfläche).

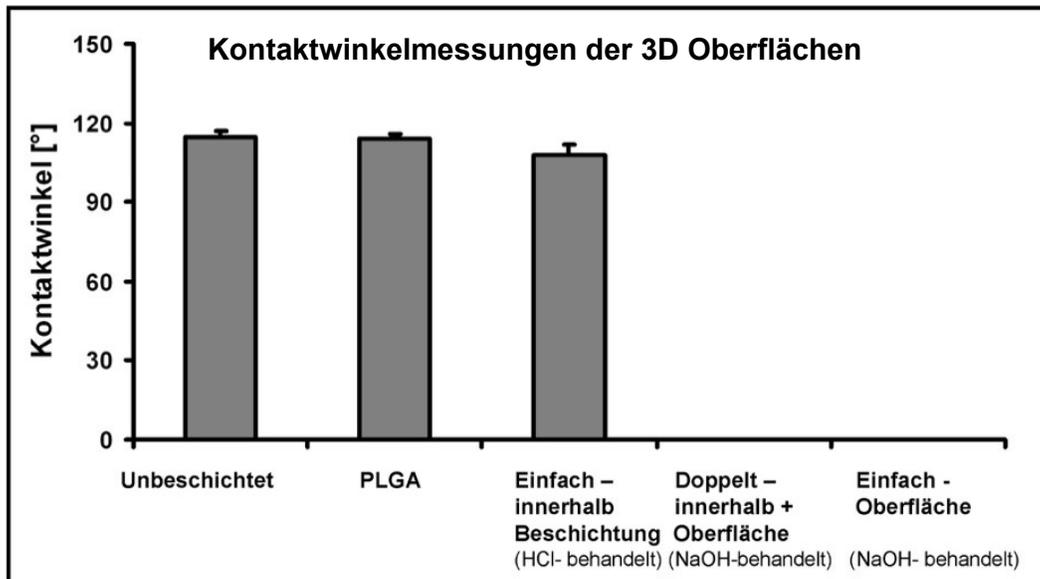
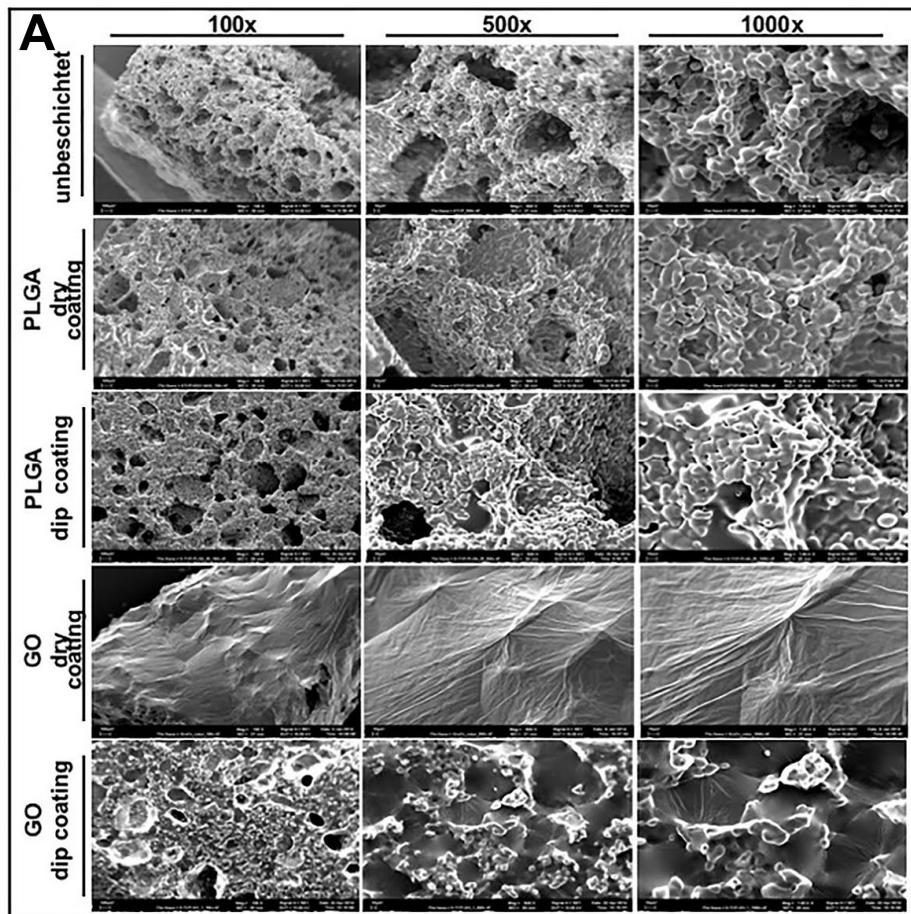


Abbildung 16: Kontaktwinkelmessungen der 3D Oberflächen in Abhängigkeit von der sauren oder basischen Behandlung für die Aktivierung der funktionellen Gruppen.

Rasterelektronenmikroskopie der PLGA- und GO-ummantelten β -TCP Matrizen

Zur Visualisierung der Oberflächentopographie der entstandenen Konstrukte wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen durchgeführt und dabei die Dip- versus der Dry Coating Variante gegenübergestellt.

Die PLGA-Beschichtung resultierte in einer homogenen und porösen Oberfläche, die der Grundstruktur des β -TCP Materials stark ähnelte. Die β -TCP Blöcke wiesen Mikro-, Meso- und Makroporen auf. Vergleicht man die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 17A so wird deutlich, dass die größte Ähnlichkeit zu dem ursprünglichen β -TCP Material das Konstrukt zeigte, bei dem die Dip Coating Variante verwendet worden war.



Ergebnisse

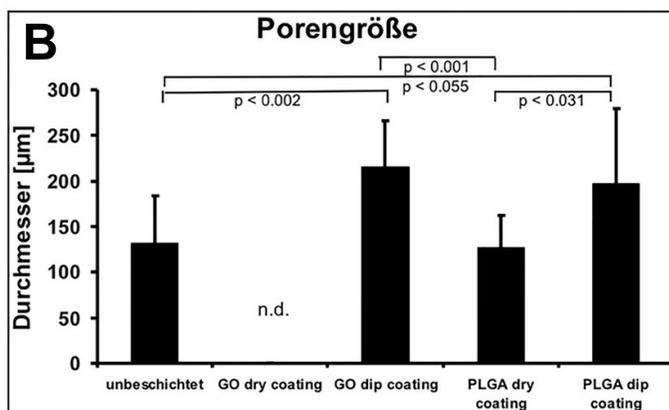


Abbildung 17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der PLGA- und GO- ummantelten 3D β -TCP Konstrukte und der vermessenen Porengröße auf den Oberflächen.

A: Gegenübergestellt sind Dry Coating versus Dip Coating Variante in 100-, 500- und 1000-facher Vergrößerung. B: Porengröße der unbeschichteten, GO- und PLGA-beschichteten Trägermatrizen abhängig von der Dip- versus der Dry Coating Variante.

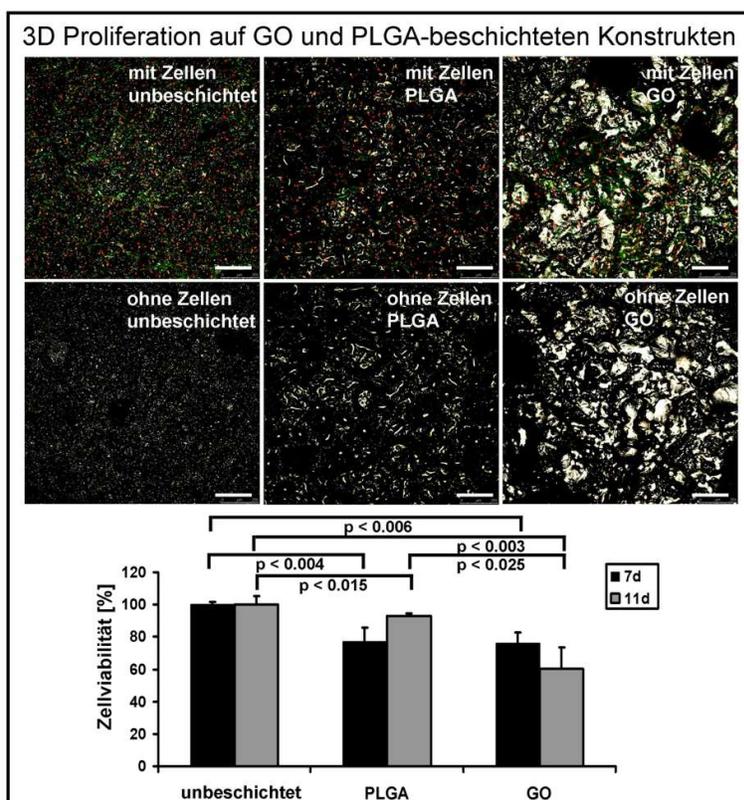
Die Dry Coating Variante der GO-Beschichtung resultierte in einer sehr homogenen Schicht, die eine leicht wellige Oberfläche auf der unterliegenden β -TCP Matrix aufwies. Die Poren wurden durch die Schicht nahezu vollständig verdeckt und verschlossen. Nach der Dip Coating Variante ergab sich eine Oberflächenstruktur, die dem Originalmaterial eher entsprach. Die Poren blieben zum Teil erhalten, wie man in der 100-fachen Vergrößerung erkennen kann. Die Porengröße betrug nach der GO Dip Coating Methode $215 \pm 51 \mu\text{m}$, die Dry Coating Variante zeigte wie oben erwähnt keine messbaren Poren. Nach der Beschichtung durch die PLGA Dry Coating Variante wurden Poren mit der Größe von $127 \pm 35 \mu\text{m}$ gemessen, nach dem Dip Coating Poren mit der Größe von $197 \pm 85 \mu\text{m}$. Im Vergleich dazu wies das unbeschichtete Originalmaterial eine durchschnittliche Porengröße von $132 \pm 52 \mu\text{m}$ auf (Abbildung 17B).

Aufgrund der abnormen Zellmorphologie der Adhäsionsassays und der Ergebnisse der Oberflächentopographie der GO-beschichteten Konstrukte wurde von der weiteren Verwendung dieses Ummantelungsmaterials abgesehen. Die weiteren Analysen wurden lediglich anhand der Dip Coating Variante der PLGA Ummantelung durchgeführt.

3D Proliferation auf PLGA- und GO-ummantelten Konstrukten

Nach 7 Tagen der Kieferperiostzell-Kultivierung wurde die Zellverteilung auf den beschichteten Konstrukten und den unbeschichteten Kontrollen anhand einer Fluoreszenzfärbung visualisiert. Diese zeigte eine homogene Zellverteilung auf allen Trägermatrizen. Der Reflexionsmodus zeigt eine deutlich stärkere Reflexion der GO-beschichteten Oberflächen im Gegensatz zu den PLGA-beschichteten.

Für die Quantifizierung der Zellbesiedlung wurde nach 7 und 11 Tagen der *in-vitro*-Kultivierung die Zellproliferation auf den GO- und PLGA-ummantelten Konstrukten detektiert. Die höchsten Proliferationsraten wurden auf den unbeschichteten β -TCP Blöcken detektiert. Im Vergleich zu diesen detektierten wir auf PLGA- und GO-beschichteten Konstrukten signifikant niedrigere Proliferationsraten nach 7 Tagen der Zellkultivierung ($p < 0.004$ für PLGA, $p < 0.006$ für GO-beschichtete Konstrukte). Auch nach 11 Tagen der Kultivierung ergaben sich signifikante Unterschiede der PLGA- und GO-beschichteten Konstrukte zu den unbeschichteten Kontrollen ($p < 0.015$ für PLGA, $p < 0.003$ für GO). Es wurden ebenfalls signifikant höhere Proliferationsraten auf den PLGA-beschichteten Konstrukten im Vergleich zu den GO-beschichteten Konstrukten detektiert ($p < 0.025$).



Ergebnisse

Abbildung 18: Visualisierung der auf 3D Konstrukten wachsenden Zellen nach 7 Tagen in Kultur mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und Bestimmung der Zellvitalität nach 7 und 11 Tagen auf GO- und PLGA-ummantelten Konstrukten anhand eines metabolischen Assays.

Maßstabsbalken 200 µm.

Immobilisierung der RGD-Peptide

Effizienzbestimmung der Peptid Immobilisierung

Nach Etablierung der drei verschiedenen Kopplungsvarianten für die RGD-Peptide wurde die Effizienz der Immobilisierung untersucht. Dazu wurde die Matrix komplett hydrolysiert und die einzelnen Aminosäuren im Aminosäure-Sequenziergerät detektiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Konstrukte, bei denen sich die Peptide innerhalb der PLGA-Ummantelung befanden, signifikant geringere Peptidmengen aufwiesen als die doppelt gekoppelten Konstrukte (CGRGES: 1.38 ± 0.07 nmol zu 35.85 ± 2.78 nmol, $p < 0.003$; CGRGDS: 2.49 ± 0.48 nmol zu 36.43 nmol, $p < 0.03$). Der Unterschied zu den einfach auf der Oberfläche gekoppelten Konstrukten war ebenfalls sehr hoch, jedoch aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht statistisch signifikant (CGRGES: 1.38 ± 0.07 nmol zu 50.35 ± 28.97 , $p < 0.139$, CGRGDS: 2.49 ± 0.48 nmol zu 26.0 ± 20.71 , $p < 0.252$). Die geringen Mengen auf dem PLGA sind als unspezifisch anzusehen.

Aus der detektierten Aminosäuremenge lässt sich die Immobilisierungseffizienz in Prozent zur ursprünglich eingesetzten Peptidmenge errechnen, die in Abbildung 19 aufgetragen ist.

Immobilisierungseffizienz		
Kopplungsvariante	gekoppeltes Molekül	in %
Einfach - innerhalb der Beschichtung	PLGA	0.12 ± 0.11
	CGRGES	0.55 ± 0.05
	CGRGDS	0.52 ± 0.56
Doppelt - innerhalb + Oberfläche	PLGA	0.48 ± 0.11
	CGRGES	7.55 ± 0.69
	CGRGDS	7.02 ± 1.48
Einfach - Oberfläche	PLGA	0.12 ± 0.08
	CGRGES	7.13 ± 10.07
	CGRGDS	6.65 ± 2.42

Tabelle 2: Errechnete Immobilisierungseffizienzen nach Verwendung der drei verschiedenen Kopplungsvarianten (einfach – innerhalb der Ummantelung; doppelt – innerhalb der Ummantelung und

Ergebnisse

auf der Oberfläche; einfach – auf der Oberfläche) nach der Aminosäureanalyse in Relation zu den ursprünglich eingesetzten Peptidmengen.

Nach den einzelnen Kopplungsvarianten ergaben sich die in Tabelle 2 aufgelisteten Peptid-Immobilisierungseffizienzen (in Relation zu den eingesetzten Peptidmengen). Die maximale Immobilisierungseffizienz betrug 7.55 ± 0.69 % der ursprünglich eingesetzten Peptidmenge und wurde mithilfe der doppelt gekoppelten Immobilisierungsvariante erreicht.

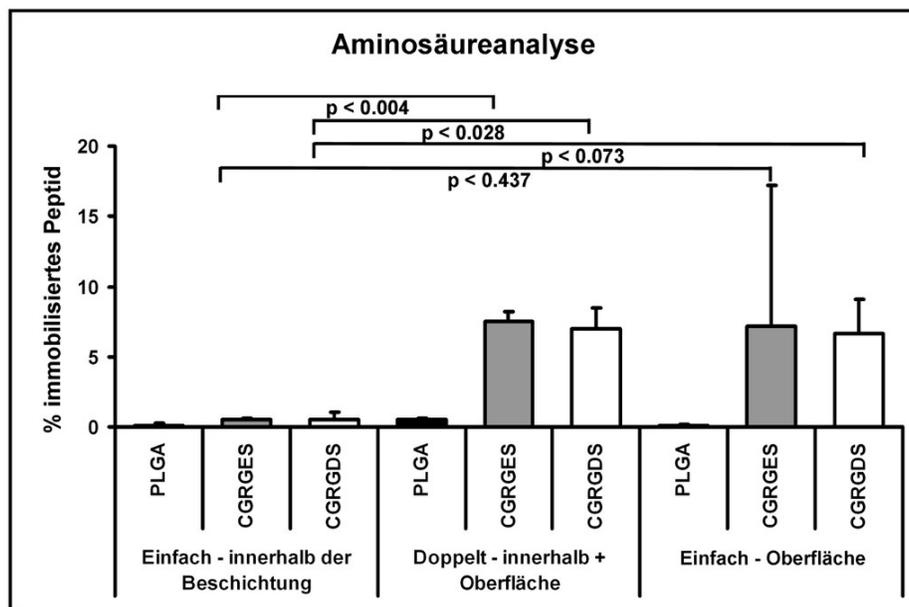


Abbildung 19: Aminosäureanalyse der immobilisierten Konstrukte.

Drei verschiedene Immobilisierungsvarianten wurden verwendet, $p < 0.05$ galt als signifikant. Aufgetragen ist die Immobilisierungseffizienz des auf der Oberfläche immobilisierten Peptids, im Verhältnis zur ursprünglich eingesetzten Peptidmenge in Prozent.

Adhäsion und Proliferation auf Peptid-immobilisierten 2D Oberflächen

Die Zelladhäsion wurde auf zweidimensionaler Kultivierungsebene fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Es zeigten sich gravierende Unterschiede zwischen den Konstrukten. Die geringste Zelladhärenz zeigte sich nach der einfachen Immobilisierungsmethode innerhalb der Ummantelung. Die bei den Proben PLGA-PLL und PLGA-PLL-CGRGES abgebildete Zelladhärenz ist als unspezifisch anzusehen, da die Zellen eine eher kugelige Form aufweisen und lediglich die Kerne, jedoch nicht das Zytoplasma der Zellen sichtbar ist (Abbildung 20). Die Zugabe der RGD-Peptide

Ergebnisse

scheint keinen Unterschied auszumachen. Durch die anderen beiden Beschichtungsvarianten scheinen die RGD-Bindestellen zugänglich zu werden, die Zellen auf diesen Proben zeigen ein deutliches Zytoplasma und eine starke Zelladhärenz. Die Anzahl der adhärenierten Zellen scheint nach der doppelten Immobilisierungsvariante höher zu sein als nach bei der einfachen (auf der Oberfläche). Der RGD-gesteuerte Effekt konnte hier sehr eindrücklich nachgewiesen werden.

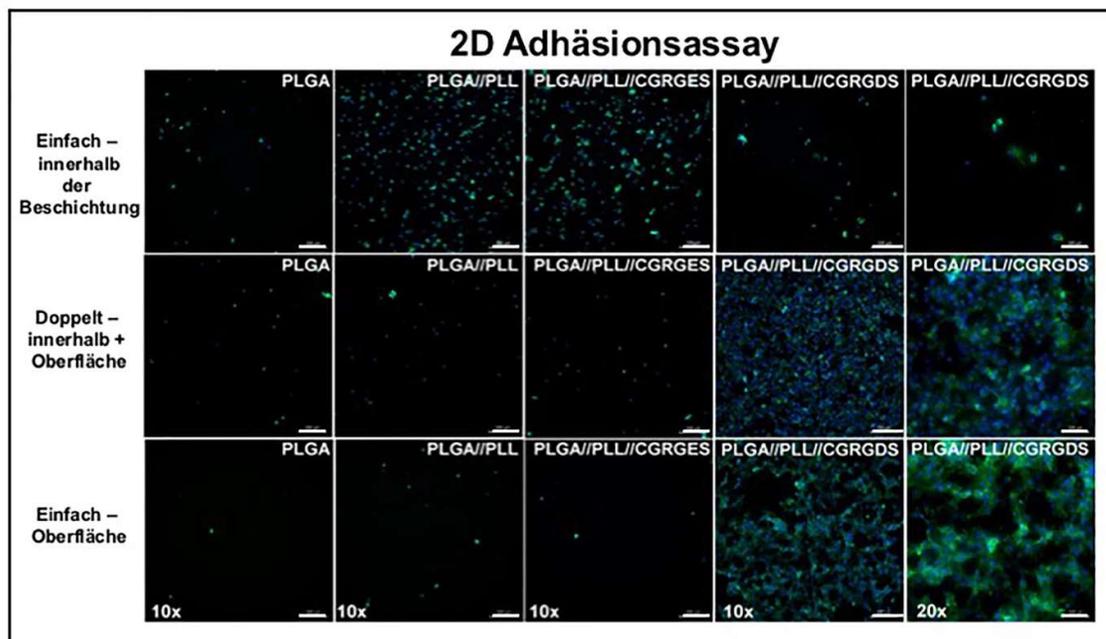


Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopischer Adhäsionsassay auf 2D-beschichteten Oberflächen.

Abgebildet sind die einzelnen Schritte der drei verschiedenen Kopplungsvarianten (einfach – innerhalb Ummantelung; doppelt – innerhalb + Oberfläche; einfach – Oberfläche. (PLGA/PLL – PLGA mit Poly-L-Lysin-Spacer; PLGA/PLL/CGRGES – PLGA mit Poly-L-Lysin-Spacer und Peptid CGRGES; PLGA/PLL/CGRGDS – PLGA mit Poly-L-Lysin-Spacer und Peptid CGRGDS)). Grün: Phalloidin – Zytoskelett, blau: DAPI – Zellkernfärbung. Maßstabsbalken: 200 μ m (10 x Vergrößerung) und 100 μ m (20 x Vergrößerung).

Die 2D Zellproliferation wurde auf den beschichteten Oberflächen anhand eines metabolischen Assays nach 3 und 5 Tagen der Zellkultivierung analysiert. Erneut wurden die drei Kopplungsvarianten gegenübergestellt. Der metabolische Assay zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kopplungsvarianten (einfach und doppelt gekoppelt) bzw. den Einzelschritten der Beschichtung (PLGA, PLGA-PLL, PLGA-PLL-CGRGES und PLGA-PLL-CGRGDS, Abbildung 21).

Ergebnisse

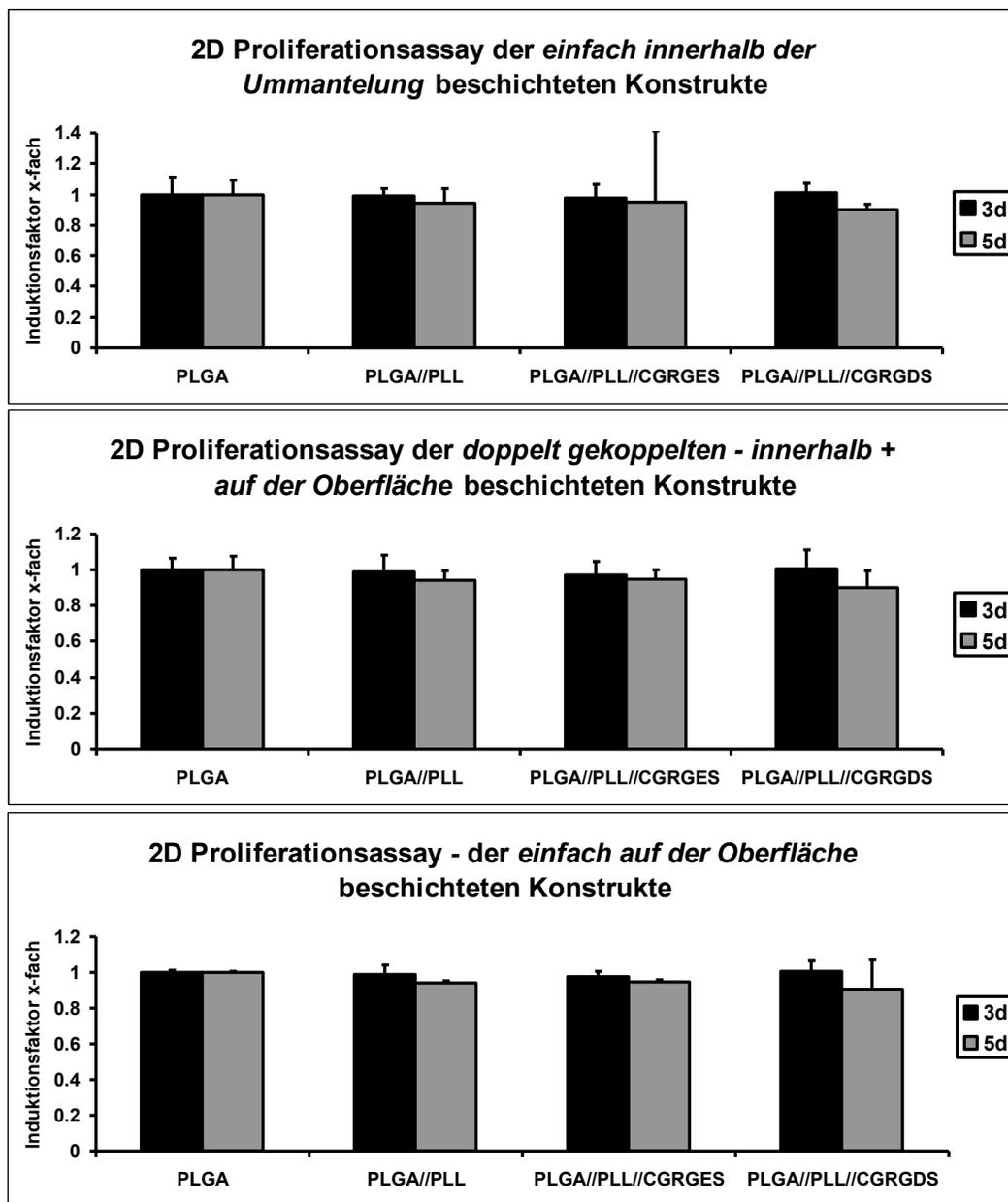


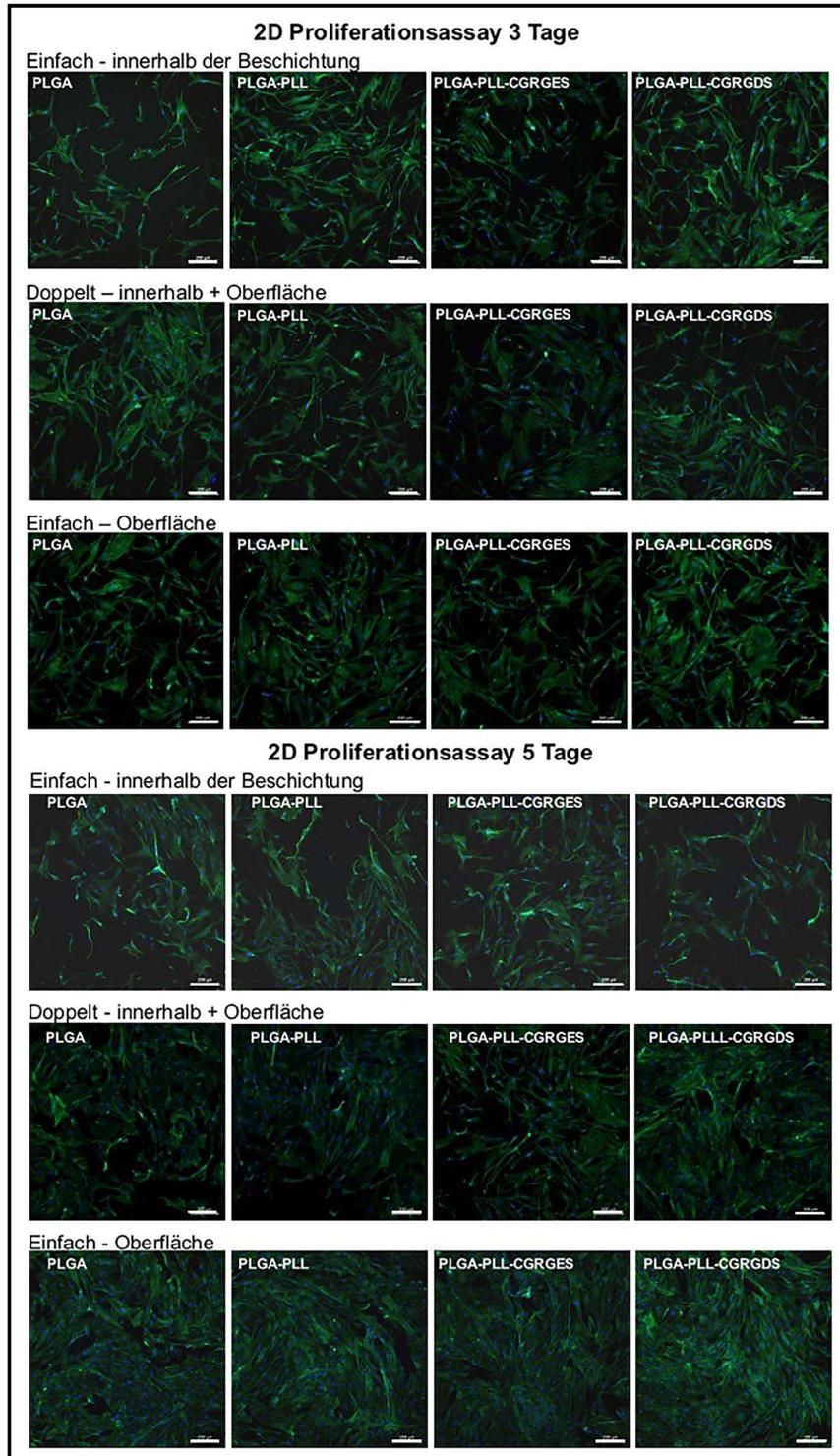
Abbildung 21: Metabolische Bestimmung der Zellproliferation auf den unterschiedlich beschichteten 2D Oberflächen nach 3 und 5 Tagen der Zellkultivierung.

Aufgetragen ist der Induktionsfaktor gegenüber der PLGA-beschichteten Kontrolle. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei den Vergleichen aller Varianten und Einzelproben detektiert.

Um die Zellverteilung auf den beschichteten 2D Oberflächen zu visualisieren, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigten ebenfalls keine gravierenden Unterschiede zwischen den Kopplungsvarianten und Einzelproben (Abbildung 22). Tendenziell wiesen die mit PLGA- bzw. mit PLGA-PLL-CGRGES-beschichteten Wells bei allen Kopplungsvarianten sowohl nach 3 als

Ergebnisse

auch 5 Tagen einen etwas weniger dichten Zellrasen auf als die PLGA-PLL und PLGA-PLL-CGRGDS-beschichteten Konstrukte. Bezogen auf die Zellmorphologie waren keine Unterschiede in den untersuchten Wells sichtbar - die Zellen zeigten eine fibroblastoide Form mit regelmäßigen Zell-Zell Kontakten.



Ergebnisse

Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie/-verteilung auf 2D-beschichteten Oberflächen nach 3 und 5 Tagen der Zellkultivierung.

Grün: Phalloidin – Zytoskelett, blau: DAPI, Zellkern. Maßstabsbalken: 200 µm

Nachweis der osteogenen Differenzierung auf Peptid-immobilisierten 2D Oberflächen

Die Wells für die zweidimensionale Kultivierung wurden mit den humanen Kieferperiostzellen besiedelt und über einen Zeitraum von 30 Tagen osteogen induziert. Als Kontrollzellen dazu dienten die mit Normalmedium behandelten Kieferperiostzellen. Abbildung 23 zeigt, dass auf 2D Ebene keine Unterschiede bezüglich der Präzipitatabbildung auf den unterschiedlich beschichteten Konstrukten und deren Negativkontrollen zu sehen sind. Die PLGA-beschichteten Konstrukte wiesen eine sehr starke Mineralisierung auf, ähnlich wie die PLGA-PLL-beschichteten. Darüber hinaus wiesen die Negativkontrollen PLGA-PLL-CGRGES ebenfalls überraschenderweise eine starke Mineralisierung auf und es konnte keine deutlich verstärkte Mineralisierung durch die RGD-Peptidbeschichtung auf 2D Ebene nachgewiesen werden.

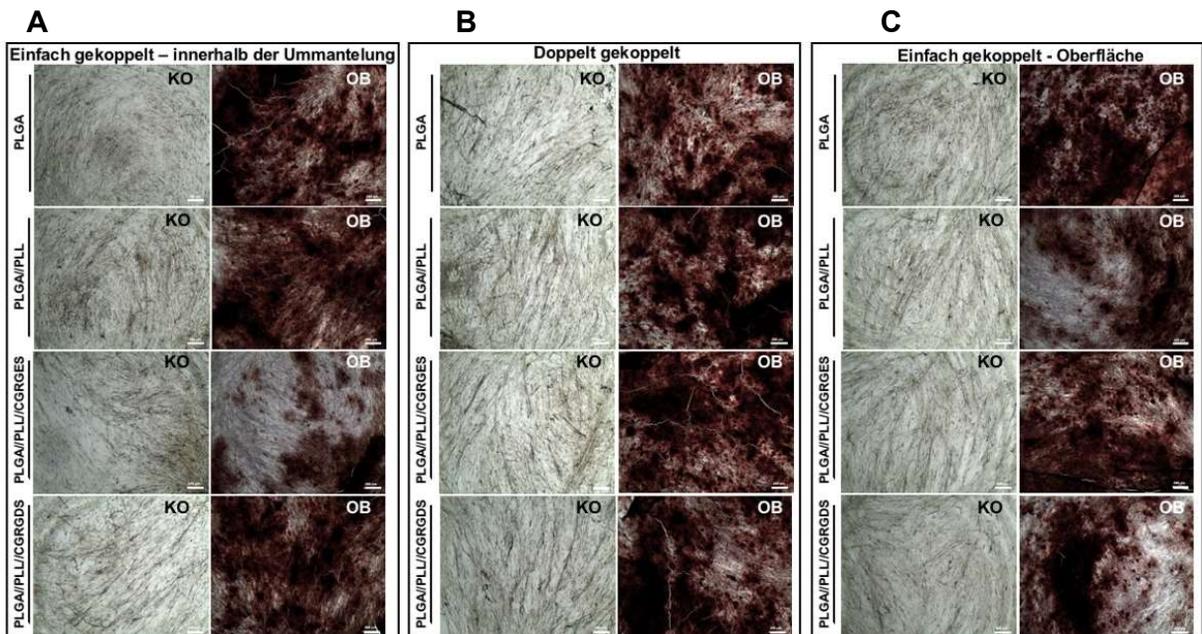


Abbildung 23: Übersichtsaufnahme der Alizarinfärbungen in 2D-beschichteten Wells nach 30 Tagen der osteogenen Differenzierung.

Ergebnisse

Die synthetisierten Kalziumphosphatpräzipitate erscheinen in der Färbung dunkelrot. A: einfache Kopplung der Peptide innerhalb der Ummantelung. B: doppelte Kopplung der Peptide an die Oberfläche und innerhalb der Ummantelung. C: einfache Kopplung der Peptide an die Oberfläche der PLGA-Schicht. Maßstabsbalken: 200 µM.

Adhäsion und Proliferation auf Peptid-immobilisierten 3D Konstrukten

Der Adhäsionsassay auf 3D Kultivierungsebene zeigte eine ähnliche Tendenz wie der 2D Adhäsionsassay (Abbildung 20), jedoch war der Effekt der RGD-Peptide weniger stark ausgeprägt. Auch hier konnte die geringste Zelladhärenz nach der einfachen Kopplungsvariante (einfach – innerhalb der Ummantelung) verzeichnet werden. Bei den doppelt gekoppelten und einfach auf der Oberfläche beschichteten Matrizen zeigte sich ein ähnliches Muster: auf den PLGA- und PLGA-PLL-beschichteten Materialien wurde eine stärkere Zelladhäsion beobachtet als auf den Negativkontrollen (CGRGES-immobilisierten Konstrukten). Die stärkste Adhäsion zeigte sich tendenziell auf den RGD-funktionalisierten Konstrukten (Abbildung 24).

Die Morphologie der Kieferperiostzellen erschien auf allen Konstrukten vergleichbar – die Zellen wiesen einen klar vom Zytoplasma abzugrenzenden Nukleus auf, z. T. war nach der 3-stündigen Inkubation das Zytoplasma sichtbar.

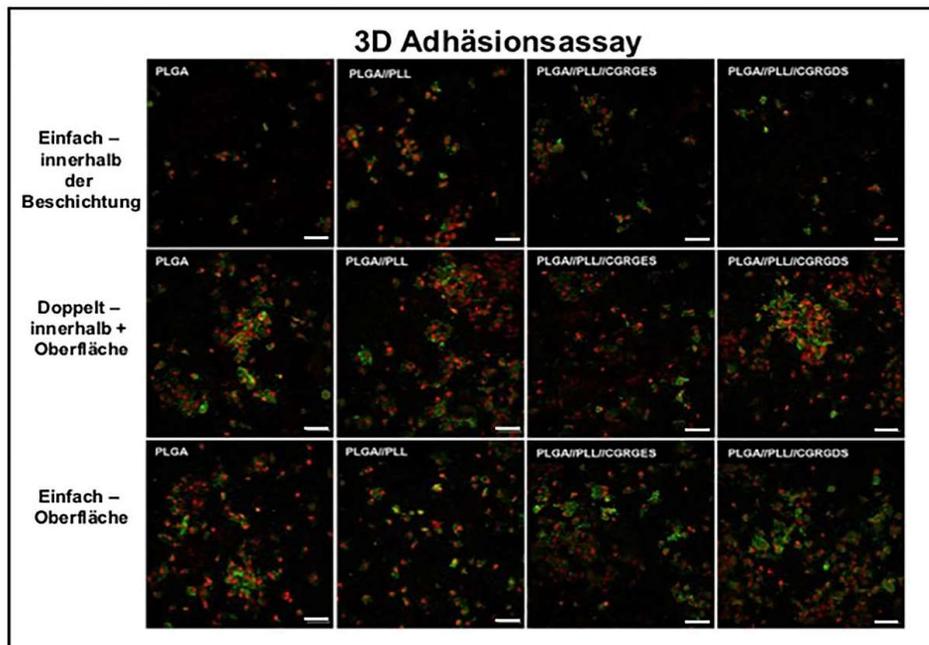


Abbildung 24: Zelladhäsionsassay auf 3D Konstrukten nach 3 h.

Ergebnisse

Gegenüberstellung der drei Kopplungsvarianten und ihrer Einzelschritte. Grün: Phalloidin, rot: Sytox-Orange – Zellkerne. Maßstabsbalken: 75 μm .

Die metabolischen Proliferationsassays auf 3D Ebene wiesen nach 5 Tagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Immobilisierungsvarianten und den verschiedenen Peptidsequenzen auf (Abbildung 25). Aufgetragen sind hier die Viabilitätsraten (Induktionsfaktoren), die zu den lediglich PLGA-beschichteten Kontrollen normalisiert wurden.

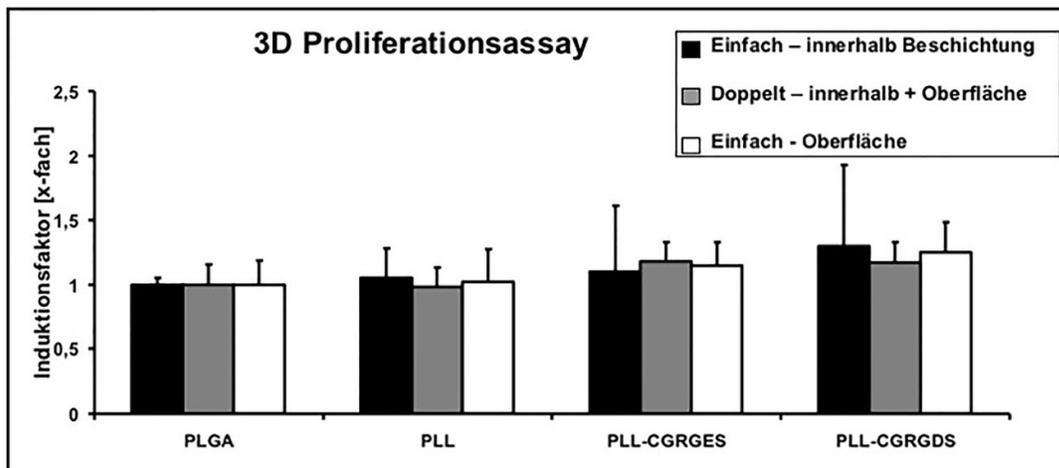


Abbildung 25: Metabolische Bestimmung der Zellproliferation auf den unterschiedlich beschichteten 3D Konstrukten nach 5 Tagen der Zellkultivierung.

Aufgetragen ist der Induktionsfaktor gegenüber der PLGA-beschichteten Kontrolle.

Immobilisierung der Aptamere

Bestimmung der Plasmastabilität und Bindungsaffinität der Aptamere

Vor der Immobilisierung der Aptamere auf den Oberflächen wurde die Stabilität der teils modifizierten Moleküle in Vollblut getestet. Es zeigte sich, dass bei der Verwendung des unmodifizierten Aptamers nach einem Zeitraum von 72 h lediglich $(35 \pm 23) \%$ des Aptamers in Bezug auf die ursprünglich eingesetzte Aptamermenge im Vollblut noch detektierbar waren. Die PEG Modifikation resultierte in einer etwas höheren Stabilität - nach 72 h konnten $(41 \pm 17) \%$ detektiert werden ($p < 0.75$). Bei der stabilisierten Aptamer-Modifikation mit 2 PTO-Bindungen und zusätzlich einem PEG-Anteil konnten im Gegensatz dazu nach 72 h $(89 \pm 19) \%$ ($p < 0.03$) im Vollblut detektiert werden.

Ergebnisse

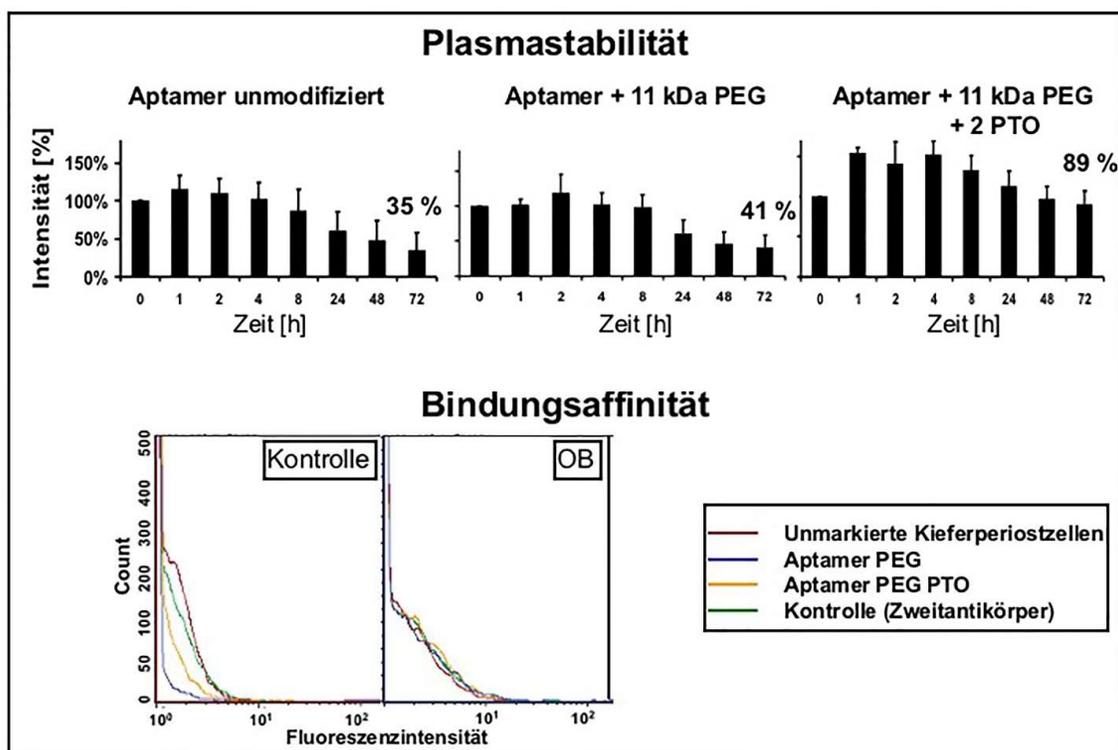


Abbildung 26: Analyse der Plasmastabilität der modifizierten (11 kDa PEG, 11 kDa PEG + 2 PTO) und nicht-modifizierten Aptamere nach Inkubation in Vollblut zu verschiedenen Zeitpunkten.

Ermittlung der Bindungsaffinitäten der modifizierten Aptamere (blau – 11 kDa PEG, gelb - 11 kDa PEG + 2 PTO). Als Kontrollen dienten unmarkierte und mit dem Zweitantikörper markierte Kieferperiostzellen.

Die Bindungsaffinitäten der modifizierten Aptamere wurden durchflusszytometrisch detektiert.

Betrachtete man die Bindungsaffinität der Aptamere an 5 Tage osteogen andifferenzierten Zellen, so zeigte sich bei den unmarkierten Aptameren ein inhomogenes und breites Histogramm, verglichen mit den kontrollbehandelten Zellen. Die Analyse der PEG-Modifizierung der Aptamere erbrachte keine spezifische Bindungsaffinität zu den Kieferperiostzellen (unbehandelt oder osteogen stimuliert), ebenso wie die Modifikationen mit PEG und 2 PTO-Bindungen (Abbildung 26).

Die weiteren Versuche wurden wegen der mangelnden Bindungsaffinität der modifizierten Oligos mit den nicht-modifizierten Aptameren weitergeführt.

AFM-Spektroskopie

Um die Bindung des Aptamers an Kieferperiostzellen genauer zu charakterisieren, wurden Rasterkraftanalysen durchgeführt. Sowohl das Aptamer als auch die Oligonukleotid-Bibliothek wurden auf den Cantilevern immobilisiert. Die Kieferperiostzellen wurden in 6-Well Platten kultiviert. Außerdem wurden unterschiedlich Zeiträume der osteogenen Stimulierung gewählt (3, 5, 7 und 15 Tage). Nach diesen Zeitpunkten wurden Rasterkraftmessungen sowohl mit unbehandelten als auch mit osteogen stimulierten Zellen durchgeführt (Abbildung 27).

Aufgetragen wurde in den Abbildungen die Kraft in Relation zur Häufigkeitsfrequenz. Die gemessenen Kraftereignisse wurden in 10 pN Intervallen zusammengefasst und gruppiert, um eine übersichtliche Darstellung zu erreichen. In den folgenden Abbildungen sind die zusammengefassten Daten von 4 Donor-Patienten zu 4 verschiedenen Zeitpunkten dargestellt.

Betrachtet man alle Grafiken in der Übersicht, so wird deutlich, dass die gemessenen Kräfte bei den osteogen differenzierten Zellen insgesamt stärker sind und es dadurch zu einer Verschiebung der Kraftkurven auf der x-Achse kommt. Betrachtet man die Kontrollmedium-behandelten Zellen, so befinden sich die höchsten Peaks zwischen einer Bindungskraft von 20-30 pN. Bei den osteogen induzierten Zellen wurden die höchsten Peaks bei 50 pN detektiert, der Bereich bis etwa 70 pN war relativ stark vertreten, im Gegensatz zu der unbehandelten Kontrolle. Somit wurden höhere Aptamer-Bindungskräfte zu osteogen induzierten als zu nicht induzierten Kieferperiostzellen detektiert. Weiterhin fiel in der Übersicht auf, dass die gemessenen Kraftkurven bei der Probe Aptamer + osteogen induzierte Zellen (Teil C) stark einheitlich zu beiden detektierten Zeitpunkten (3 und 15 Tage) erschienen, im Gegensatz zu den übrigen 3 Kurven, die ein diffuses Bild zeigten (Abbildung 27A, B, D).

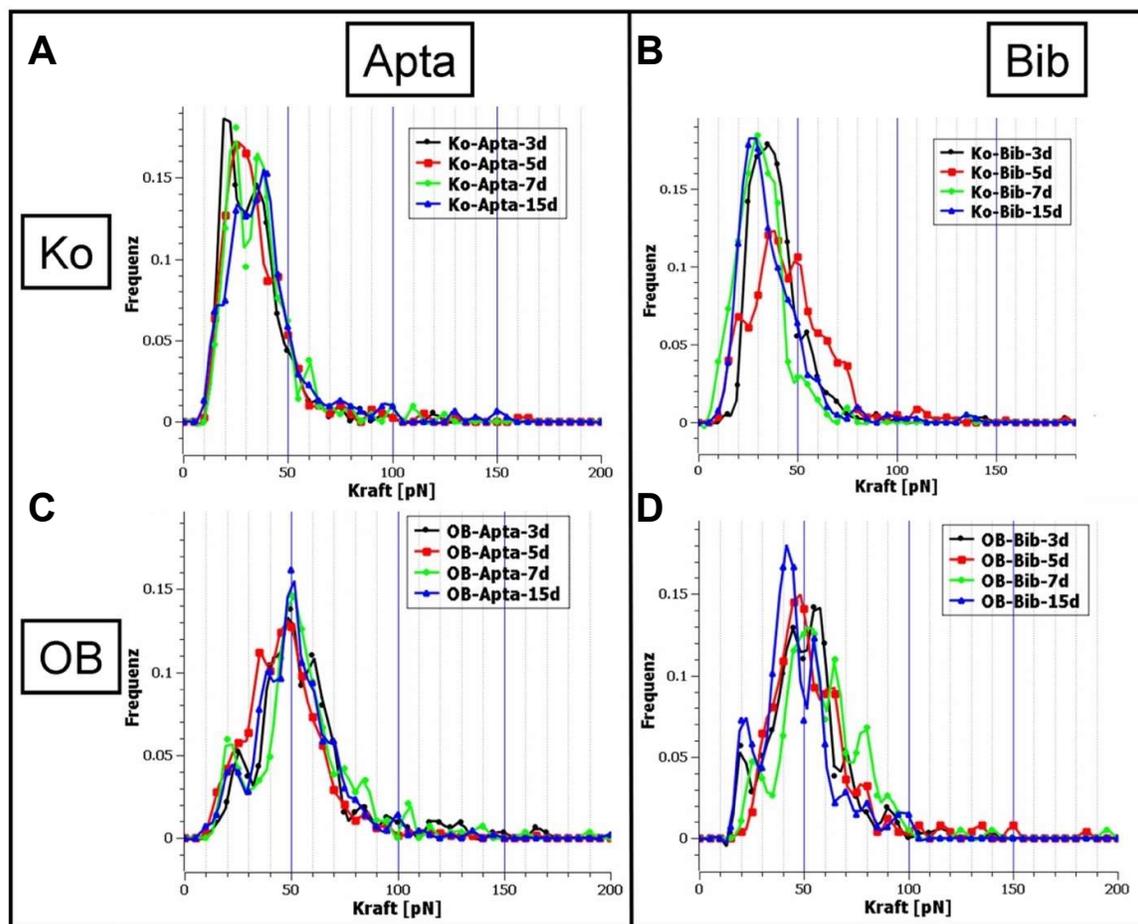


Abbildung 27: Kraftkurven der Rasterkraftmikroskopischen Analysen an osteogen induzierten Kieferperiostzellen (Tag 3, 5, 7 und 15).

Um die Kraftkurven aufzuzeigen, wurden Flat-Tip Cantilever mit dem Aptamer 74 bzw. mit der Oligonukleotid-Bibliothek beschichtet. Dargestellt sind die Messungen an Zellen von 4 Donor-Patienten. Die Messungen von mindestens 3 Zellen wurden jeweils 15-mal wiederholt. Schwarz: 3-, rot: 5-, grün: 7-, blau: 15 Tage der osteogenen Induktion. A: Kontrollmedium-behandelte (Ko) Zellen, Cantilever mit Aptamer beschichtet, B: Kontrollzellen, Cantilever mit Oligonukleotid-Bibliothek beschichtet, C: OB-(osteogen-) induzierte Zellen, Cantilever mit Aptamer beschichtet, D: OB-induzierte Zellen, Cantilever mit Oligonukleotid-Bibliothek funktionalisiert.

Um genauere Unterschiede zwischen Zellen herauszuarbeiten, die unterschiedlich lang osteogen induziert sind, wurden die Kraftkurven der 3 und 15 Tage induzierten Zellen separat von den anderen Zeitpunkten betrachtet. Sowohl in dem oberen als auch in dem unteren Teil der Abbildung 28 wird deutlich, dass maximale Frequenzen zwischen Aptameren und osteogen induzierten Kieferperiostzellen bei einer Kraft von 62.63 ± 44.6 pN (nach 3 Tagen) und bei 54.99 ± 22.38 pN (nach 15 Tagen) detektiert wurden (Abbildung 28A, C). Die gemessenen Kräfte zwischen der Oligonukleotid-Bibliothek und den Kieferperiostzellen lagen etwas niedriger, waren jedoch aufgrund

Ergebnisse

der hohen Standardabweichungen nicht signifikant unterschiedlich (55.36 ± 25.31 nach 3 Tagen, 48.75 ± 17.93 pN nach 15 Tagen; Abbildung 28 B, D). Die Kurvenverläufe zeigten sich auch unterschiedlich, wie bereits oben erwähnt. Das Aptamer und die Oligonukleotid-Bibliothek zeigten ähnliche durchschnittliche Bindungsaffinitäten an unbehandelten Kontrollzellen (Aptamer - 3d: 36.17 ± 15.58 pN, 15d: 42.44 ± 24.11 pN; Bibliothek - 3d: 42.46 ± 16.57 pN, 15d: 39.86 ± 24.13 pN, Abbildung 28D).

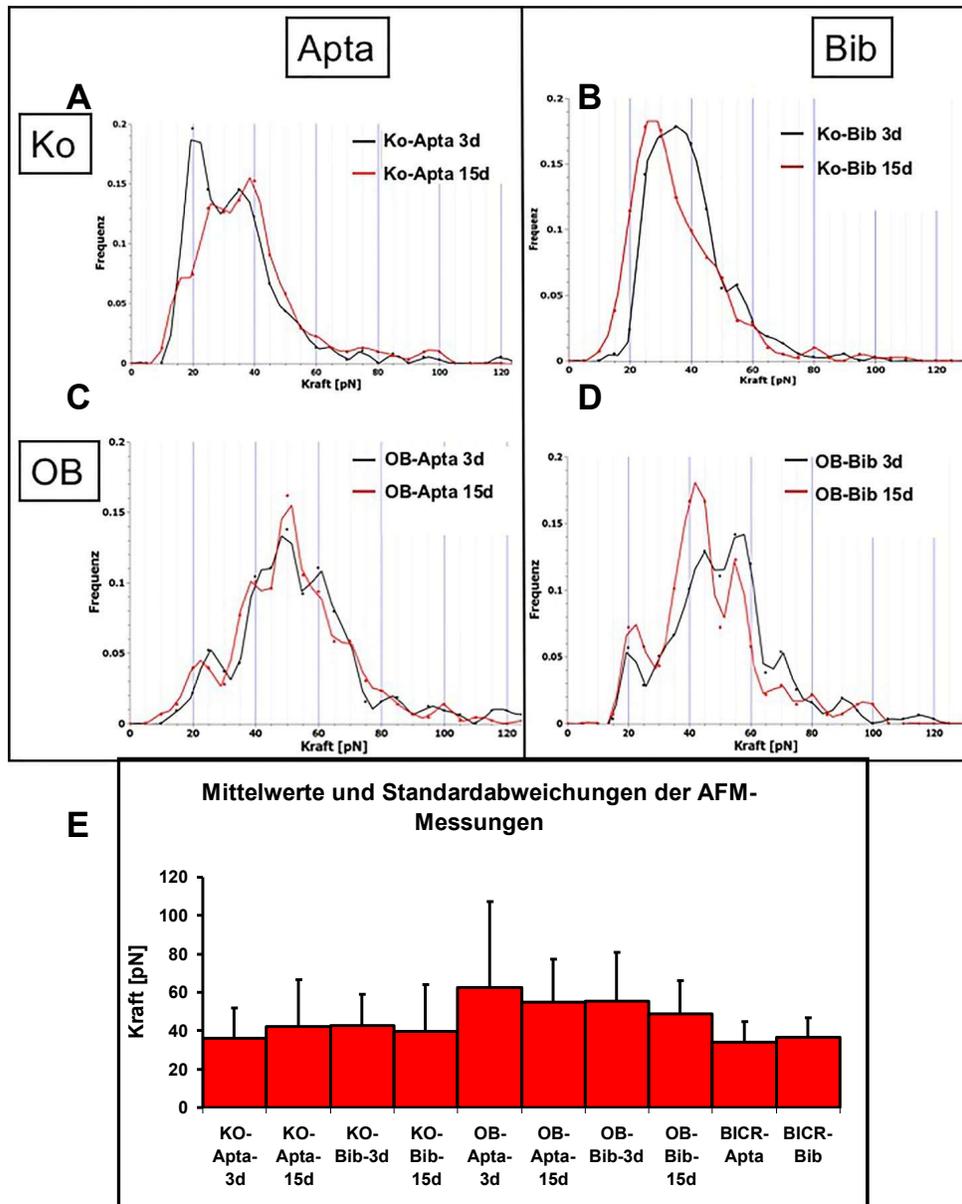


Abbildung 28: Kraftkurven der Rasterkraftmikroskopischen Analysen zu Beginn (Tag 3) und zum späteren Zeitpunkt der Osteogenese (Tag 15).

Schwarz: 3 Tage, rot: 15 Tage der osteogenen Induktion. A: Kontrollmedium-behandelte Zellen, Cantilever mit Aptamer funktionalisiert, B: Kontrollzellen, Cantilever mit Bibliothek funktionalisiert, C:

Ergebnisse

OB-induzierte Zellen, Cantilever mit Aptamer funktionalisiert, D: OB-induzierte Zellen, Cantilever mit Bibliothek funktionalisiert. E: Zusammenfassung der durchschnittlichen gemessenen Kräfte (mit den Standardabweichungen) zwischen den Aptameren/Oligonukleotiden und den unterschiedlichen Zellgruppen (Kieferperiostzellen und BICR56-Zellen). 3d und 15d stellen die analysierten Zeitpunkte der osteogenen Induktion dar.

Als Negativkontrolle wurde die Zelllinie BICR 56 verwendet. Diese Zelllinie zeigte in Vorarbeiten keine Bindungsaffinität an das Aptamer. Die Rasterkraftmessungen bestätigten diese Beobachtung insofern, dass eine geringere durchschnittliche Bindungskraft zwischen dem Aptamer und den BICR-Zellen detektiert werden konnte 33.88 ± 10.96 pN, ebenso wie bei der Bibliothek und den BICR Zellen (36.55 ± 10.00 pN, Abbildung 28D).

2D Adhäsion auf Aptamer-immobilisierten Oberflächen

Die Adhäsion auf Aptamer- beschichteten Oberflächen wurde auf zweidimensionaler Kultivierungsebene anhand der Kristallviolettffärbung zur genauen Quantifizierung analysiert. Anhand einer Fluoreszenzfärbung wurde die Zellmorphologie/Zelldichte beurteilt (Abbildung 29). Die stärkste Zelladhäsion zeigte sich auf PLGA-beschichteten Oberflächen mit einer optischen Dichte von ($OD\ 0.132 \pm 0.047$). Der Unterschied zu den Aptamer-beschichteten Oberflächen ($OD\ 0.088 \pm 0.022$) war jedoch nicht signifikant ($p < 0.133$). Im Vergleich zu den unbeschichteten Wells ($OD\ 0.033 \pm 0.003$) wiesen die Aptamer-beschichteten Wells einen signifikanten Unterschied auf ($p < 0.022$). Die Zelladhäsion auf den PLGA-beschichteten Oberflächen war gegenüber den unbeschichteten Wells ebenfalls signifikant höher ($p < 0.005$).

Betrachtet man die unten abgebildete fluoreszenzmikroskopische Färbung, so bestätigen sich die Ergebnisse der Kristallviolettffärbung. Die höchste Zelldichte weisen die PLGA-beschichteten Oberflächen auf, während die Lösungsmittel-behandelten bzw. die PLGA/Aptamer-beschichteten Oberflächen etwa gleich viele Zellen zeigen. In den ersteren sind vermutlich mehr apoptotische Zellen oder Zellen mit abnormem Zytoplasma (unregelmäßige, z.T. punktuelle Färbung des Zytoplasmas) zu finden (Abbildung 29C).

Ergebnisse

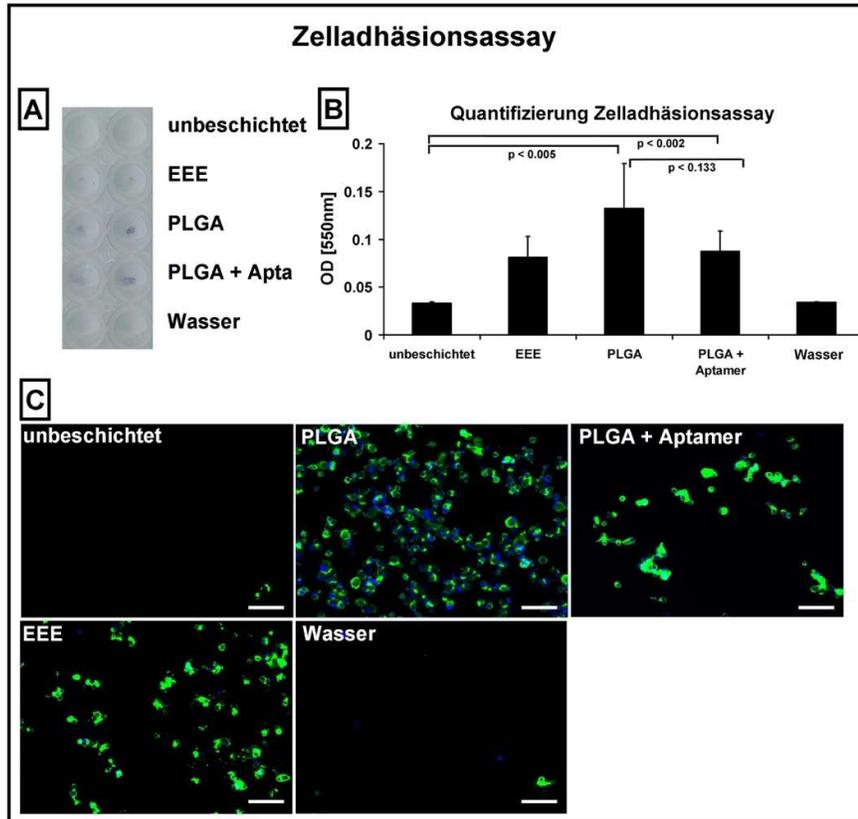


Abbildung 29: Zelladhäsionsassay auf zweidimensionaler Ebene anhand der Kristallviolett- und der Fluoreszenzfärbung.

A: Kristallviolett-Übersichtsfärbung von Zellen, die auf unbeschichteten, Lösungsmittel-behandelten (EEE), PLGA-, PLGA + Aptamer-funktionalisierten und nur mit Wasser behandelten Oberflächen adhärten B: Quantifizierung der Kristallviolett-färbung. Signifikant verstärkte Zelladhäsion auf Aptamer-beschichteten Oberflächen verglichen zu unbeschichteten Wells ($p < 0.002$) und zwischen PLGA und unbeschichteten Platten ($p < 0.005$). Kein signifikanter Unterschied zwischen PLGA und PLGA + Aptamer beschichteten Oberflächen ($p < 0.133$). Fluoreszenzfärbung der Zelladhäsion. Grün: Phalloidin – Zytoskelett, blau: DAPI – Kernfärbung. Maßstabsbalken: 200 μm .

2D Proliferation auf Aptamer-immobilisierten Oberflächen

Die Übersichtsaufnahmen der für 3 und 7 Tage proliferierten Kieferperiostzellen wurden auf unbeschichteten, PLGA- und PLGA + Aptamer beschichteten Oberflächen fluoreszenzmikroskopisch durchgeführt. Im Gegensatz zu den Adhäsionsassays wiesen die Kieferperiostzellen in PLGA- sowie auf PLGA + Aptamer-beschichteten Wells an beiden analysierten Zeitpunkten eine normale Zellmorphologie mit Zell-Zell Kontakten und eine vergleichbare Zellzahl auf.

Ergebnisse

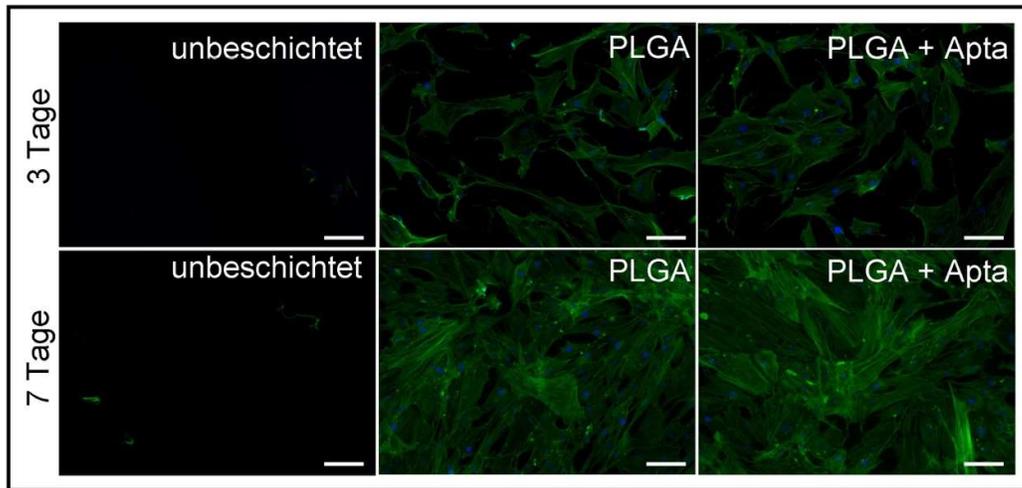


Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der auf zweidimensionaler Kultivierungsebene wachsenden Kieferperiostzellen.

Das Zytoskelett wurde mit Phalloidin Alexa-Fluor 488 (grün), die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstabsbalken 50 μm .

Osteogene Differenzierung auf Aptamer-immobilisierten 2D Oberflächen

Für die Quantifizierung der Zellmineralisation wurden die Kieferperiostzellen auf unbeschichtete, PLGA-, Lösungsmittel-behandelte- und PLGA + Aptamer beschichtete Wells ausplattiert und über einen Zeitraum von 30 Tagen osteogen stimuliert.

In allen unbehandelten Kontrollen wurde keine Färbung detektiert, was zu erwarten war, da die Zellen nicht osteogen induziert wurden (Abbildung 31). Die stärkste Färbung und somit die meisten Präzipitate konnten in den Aptamer-beschichteten Wells detektiert werden ($135.7 \pm 44.7 \mu\text{M}$), gefolgt von den PLGA-beschichteten Wells ($98.59 \pm 44.7 \mu\text{M}$, $p < 0.573$ bei Aptamer vs. PLGA). Die Kalziumkonzentration in den unbeschichteten Wells lag bei $2.27 \pm 0.05 \mu\text{M}$, in den lösungsmittelbehandelten Wells (EEE) wurde eine Konzentration von $29.2 \pm 6.48 \mu\text{M}$ errechnet. Die Unterschiede in der Kalziumkonzentration zwischen den PLGA + Aptamer-beschichteten und den unbeschichteten bzw. EEE-behandelten Wells waren signifikant ($p < 0.009$ und $p < 0.022$), nicht jedoch zwischen den PLGA- und PLGA + Aptamer-beschichteten Wells.

Ergebnisse

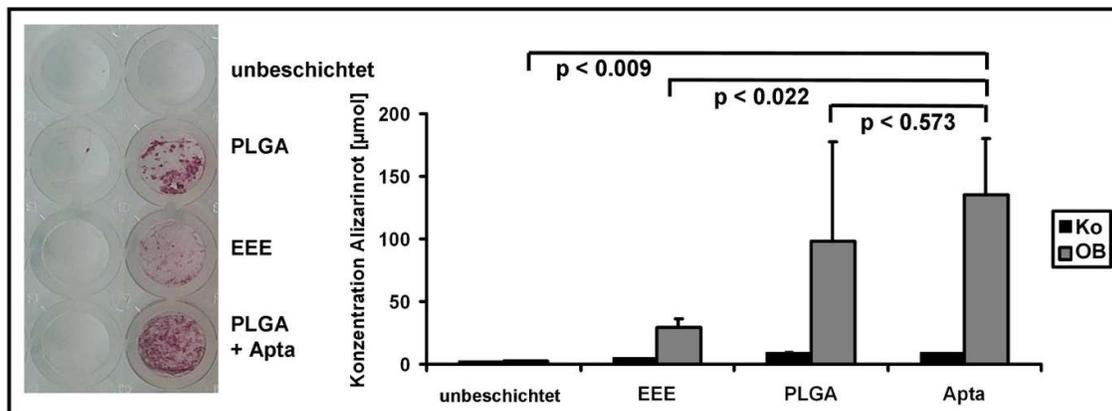


Abbildung 31: Nachweis der Kalziumphosphatpräzipitate in Kieferperiostzellen, die für 30 Tage osteogen induziert wurden anhand der Alizarinfärbung.

Links: Übersicht der gefärbten Wells. Rechts: Quantifizierung der Alizarinrotfärbung. Ko: unbehandelte Zellen. OB: osteogen stimulierte Zellen. Signifikant erhöhte Kalziumkonzentration in Aptamer-beschichteten Wells versus Lösungsmittelkontrollen (EEE, $p < 0.022$) bzw. unbeschichteten Wells ($p < 0.009$). Kein signifikanter Unterschied zwischen den PLGA- und PLGA + Aptamer-beschichteten Oberflächen ($p < 0.573$).

Effizienzbestimmung der Aptamer Immobilisierung

Nach der Aptamer Kopplung wurde die Immobilisierungseffizienz auf β -TCP-Konstrukten mithilfe des *Quantifluor ssDNA Assays* bestimmt. Der Assay zeigte, dass eine Konzentration von 13.57 ± 2.38 pg/ μ l Aptamer auf PLGA-ummantelten Oberflächen immobilisiert werden konnte. Als Negativkontrolle wurde die Start-Bibliothek verwendet, die einen Pool aus 10^{15} verschiedenen 80 bp langen Oligonukleotiden darstellt. Der Oligonukleotid-Pool konnte mit einer signifikant niedrigeren Effizienz (4.97 ± 1.91 pg/ μ l, $p < 0.00008$) auf die PLGA-ummantelten β -TCP Konstrukte aufgebracht werden. Unbeschichtete sowie PLGA-beschichtete β -TCP Oberflächen ergaben unspezifische Konzentrationen zwischen 1.8 ± 1.2 pg/ μ l und 1.77 ± 1.09 pg/ μ l (Abbildung 32).

Bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Aptamer Konzentration von 1000 pg/ μ l ergaben sich geringe Immobilisierungseffizienzen von 1.3 % für das Aptamer und 0.5 % für die Oligonukleotid Kontrolle.

Ergebnisse

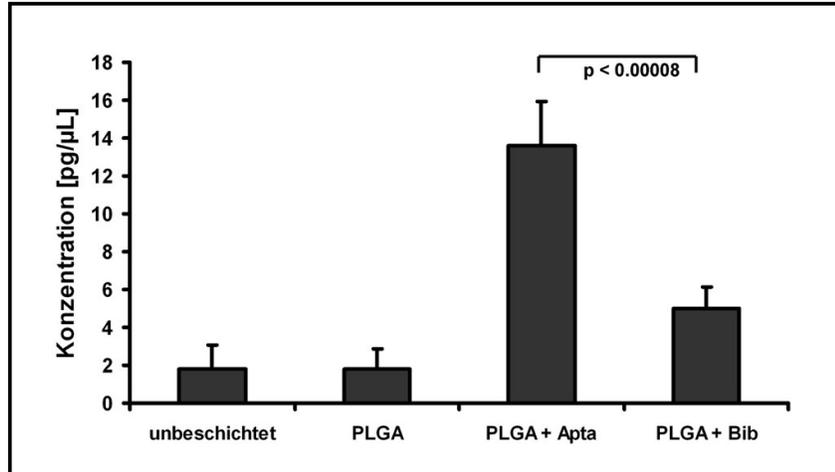


Abbildung 32: Quantifizierung des durch EDC/NHS kovalent gekoppelten Aptamers an PLGA-ummantelten β -TCP Oberflächen anhand des Quantifluo-ss-DNA-Assays.

Signifikant höhere Menge an immobilisierten Aptameren (13.57 ± 2.38 pg/ μ l) als an immobilisierten Oligonukleotiden der Startbibliothek (4.97 ± 1.91 pg/ μ l, $p < 0.00008$) wurden detektiert.

3D Adhäsion auf Aptamer-immobilisierten Konstrukten

3D β -Trikalziumphosphatkonstrukte wurden mit dem Aptamer 74 immobilisiert und die Zelladhäsion fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Getestet wurde die Zelladhäsion von jeweils 3 Patienten auf unbeschichteten-, PLGA-, PLGA + Aptamer- und PLGA + Oligonukleotid-Bibliothek-beschichteten Konstrukten.

Die unbeschichteten als auch die PLGA-beschichteten Konstrukte wiesen eine relativ starke Zelladhäsion auf, ebenso die Aptamer-beschichteten Materialien. Die Adhärenz auf Aptamer-beschichteten Konstrukten fiel tendenziell bei den Zellen der ersten 2 Patienten am stärksten aus. Betrachtete man die Bibliothek-beschichteten Konstrukte und verglich die verschiedenen Patienten, so zeigte sich ein inhomogenes Bild. Bei zwei Patienten wiesen die Bibliothek-beschichteten Konstrukte nahezu keine Zelladhäsion auf, wohingegen die Zellen des dritten Patienten eine starke Adhärenz erkennen ließen. Auch nach mehrmaliger Wiederholung des Versuchsansatzes zeigte sich ein ähnliches Muster (Abbildung 33, untere Reihe).

Ergebnisse

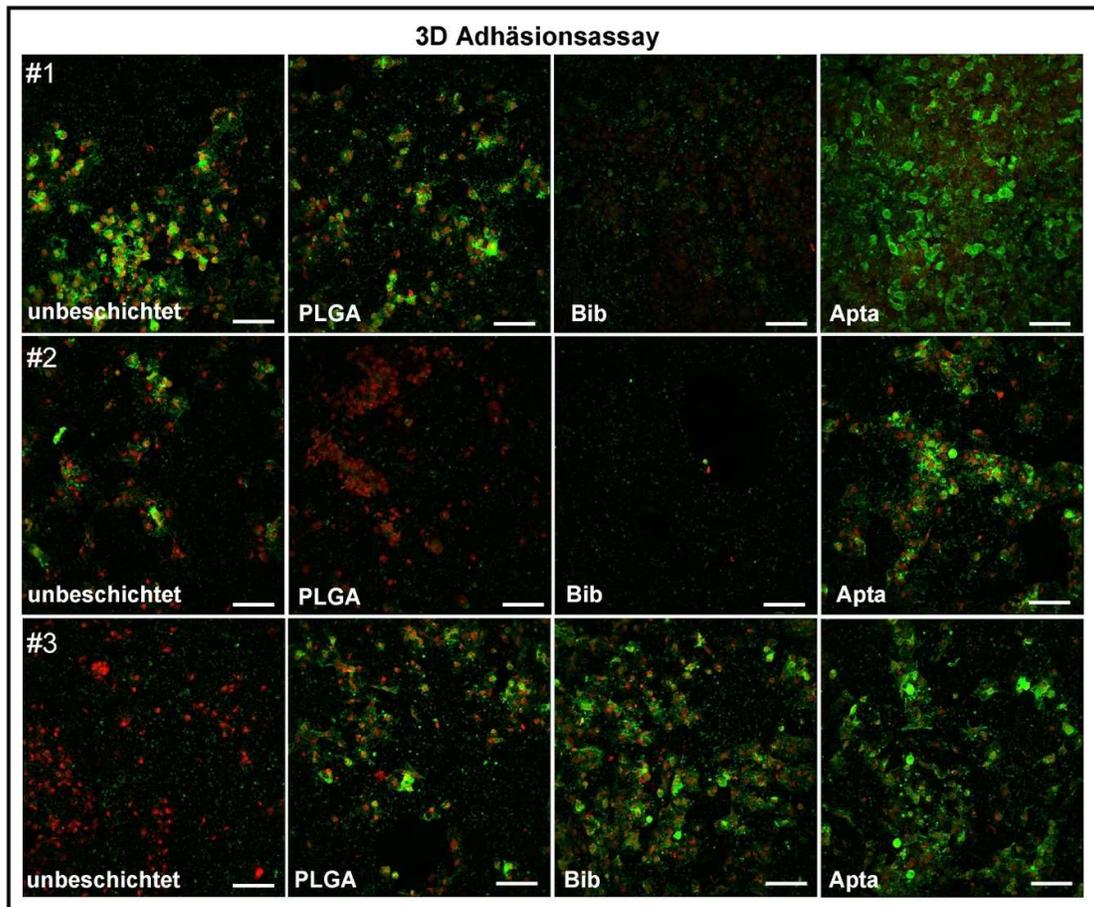


Abbildung 33: Adhäsionsassay auf 3D β -Trikalziumphosphat-Konstrukten

Konfokale Laserscanningmikroskopie der Konstrukte – grün: Phalloidin – Zytoskelett, rot: Sytox-Orange - Kernfärbung. Dargestellt ist die Adhäsion von Kieferperiostzellen von drei Donor-Patienten auf unbeschichteten, PLGA-, Oligonukleotid-Bibliothek- und Aptamer-beschichteten Konstrukten. Maßstabsbalken 75 μ m.

3D Proliferation auf Aptamer-immobilisierten Konstrukten

Neben der Adhäsion wurde ebenfalls die Zellproliferation auf den beschichteten 3D Konstrukten zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung (3-, 7-, 10 Tage) anhand eines metabolischen Assays detektiert. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede und Tendenzen einer verstärkten Zellproliferation in den unterschiedlich beschichteten Wells detektiert werden (Abbildung 34).

Ergebnisse

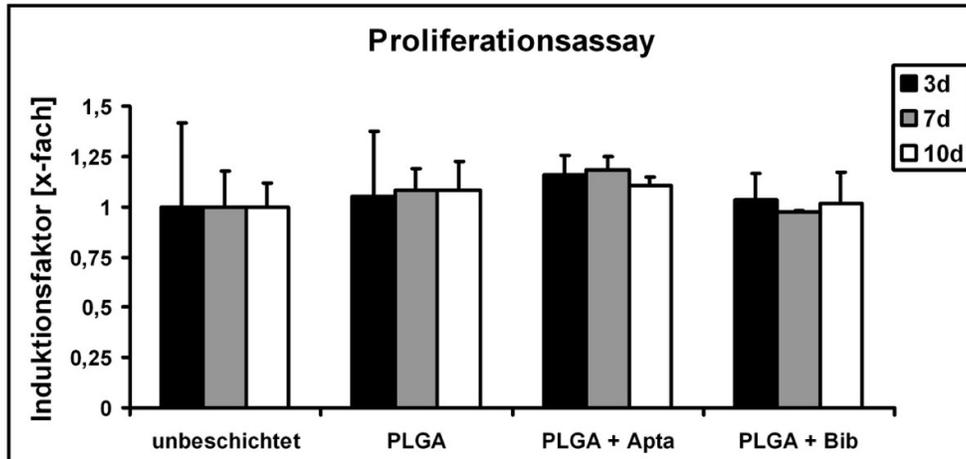


Abbildung 34: Metabolischer Proliferationsassay der auf dreidimensionalen β -TCP Konstrukten wachsenden Kieferperiostzellen, die für 3, 7 und 10 Tage auf unbeschichteten, PLGA-, PLGA + Aptamer, PLGA + Oligonukleotid-Bibliothek beschichteten Konstrukten kultiviert wurden.

Dargestellt ist der Induktionsfaktor bezogen auf die unbeschichtete Kontrolle.

Osteogene Differenzierung auf Aptamer-immobilisierten 3D Konstrukten

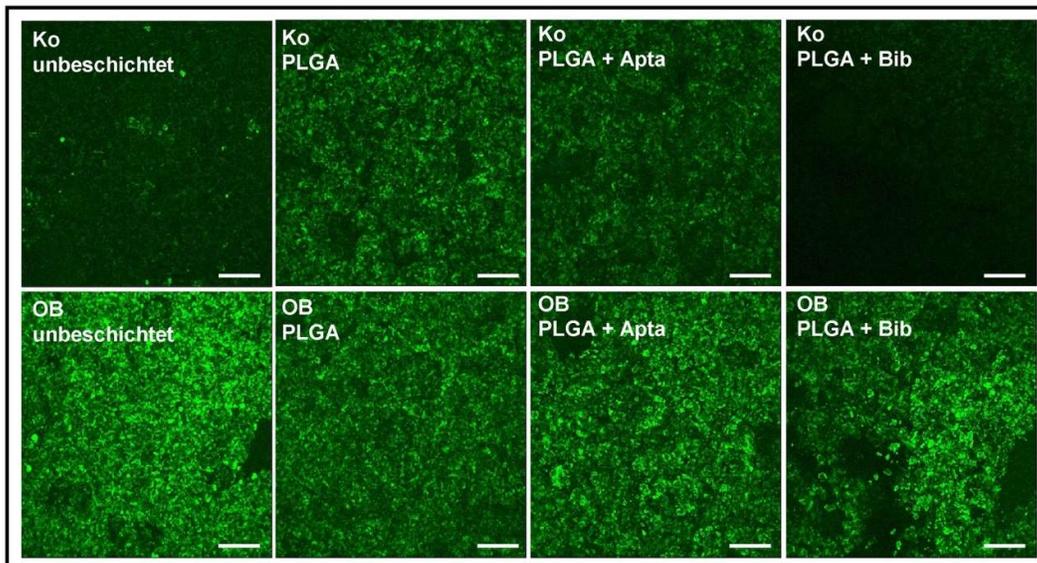


Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskopische Detektion der CaP-Präzipitate auf den 3D β -TCP Konstrukten (unbeschichtet, PLGA, PLGA + Aptamer, PLGA + Oligonukleotid-Bibliothek).

Ko: Kontrollmedium behandelte Kieferperiostzellen, OB: mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium (für 30 Tage) behandelte Kieferperiostzellen. Färbung der CaP-Präzipitate mittels *OsteoImage*-Färbung und Detektion im konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Maßstabsbalken: 75 μ M.

Ergebnisse

Das osteogene Potential wurde durch die Analyse der CaP-Präzipitatbildung der Kieferperiostzellen auf den funktionalisierten 3D Konstrukten anhand konfokaler Laserscanningmikroskopie evaluiert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen osteogen induziert.

Die Aufnahmen zeigten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Differenzierungsmedium behandelten Konstrukten (OB) – die Fluoreszenzfärbung erschien intensiver als in den nicht-induzierten Konstrukten (Abbildung 35). Dabei waren die Unterschiede bei den unbeschichteten bzw. den PLGA + Bibliothek-beschichteten Konstrukten am deutlichsten. Besonders bei den PLGA- bzw. PLGA + Aptamer-beschichteten Konstrukten fiel die Hintergrundfärbung relativ stark aus. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den unbeschichteten und den PLGA-, PLGA-Aptamer- und PLGA-Bibliothek-funktionalisierten und osteogen stimulierten Zell-Konstrukten detektiert werden. Im Gegenteil, die Fluoreszenzintensität erschien auf den unbeschichteten Konstrukten am intensivsten.

Diskussion

Ummantelung der Matrizen mit GO und PLGA:

In dieser Studie war das Ziel, eine passende Immobilisierungsstrategie für die Kopplung von bioaktiven Peptiden und/oder Aptameren auf β -TCP Konstrukten zu etablieren. Die Biofunktionalisierung der Konstrukte sollte Stammzellfunktionen wie die Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung verstärken, um die Konstrukte für Tissue Engineering Applikationen zu optimieren. Hierfür wurden einerseits RGD-Peptide immobilisiert, die in der Literatur als Osteogenese-fördernd beschrieben sind und die die Neovaskularisierung unterstützen [57, 89, 121-124]. Weiterhin wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe das Aptamer 74 gegen Zellen aus dem Kieferperiost generiert, das vergleichend zu den RGD-Peptiden ebenfalls auf die Matrizen aufgebracht werden sollte [4].

β -TCP ist ein anorganisches Material, das die natürliche Knochenstruktur imitiert und osteokonduktiv, jedoch nicht osteoinduktiv ist. Neben dem Vorhandensein einer Trägermatrix und der mechanischen Stabilität sind osteoinduktive Faktoren nicht weniger wichtig beim Tissue Engineering von Knochen. Diese Faktoren können entweder in das Material bereits während des Herstellungsprozesses eingebracht werden, oder nach der Herstellung auf die Oberfläche aufgebracht werden. Da bei der Herstellung von β -TCP jedoch sehr hohe Sintertemperaturen (bis zu 1500 °C) notwendig sind, ist es nahezu unmöglich, osteoinduktive Faktoren während der Produktion mit einzubringen. Aus diesem Grund sind in dieser Studie die bioaktiven Faktoren (RGD-Peptide und Aptamere) auf der Oberfläche der Matrizen aufgebracht worden [122, 126, 127]. Weiterhin denkbar wäre, die Faktoren in eine Art Paste einzubringen, die nach der Implantation aushärtet [125].

β -TCP besitzt als anorganisches Material an sich keine funktionellen Gruppen, an die Moleküle kovalent gebunden werden können [49, 128]. Um das Ziel der Biofunktionalisierung zu realisieren, wurde die PLGA- und GO-Oberflächen-ummantelung der TCP Trägermatrizen etabliert. Durch die modifizierte Oberfläche tragen die Matrizen nun funktionelle Gruppen, über die eine Peptid- oder Aptamerkopplung möglich ist.

Diskussion

Graphenoxid wurde bisher schon als Komponente von Biosensoren verwendet, um Zell-Substrat Übergänge zu kontrollieren [129, 130]. Außerdem kommt Graphenoxid im Bereich Theranostik, die Therapie und Diagnostik für Anwendungen in der personalisierten Medizin zusammenführt, zur Anwendung. Weiterhin bekommen Nanomaterialien aus Graphenoxid im Bereich der Geweberegeneration und Generierung von Organimplantaten eine wachsende Bedeutung [76, 78, 79, 131]. GO wurde beispielsweise für die Beschichtung von Titanimplantaten zur BMP2 (Protein) und Substanz P (Peptid) Freisetzung verwendet, um die Zelladhäsion, -Proliferation und -Differenzierung zu Osteoblasten und Adipozyten zu verstärken, und beeinflusst nachweislich die oben genannten Zellfunktionen [76, 77, 130]. Das Peptid Substanz P fungiert als Neurotransmitter bei Entzündungs- und Schmerzübertragungsprozessen und spielt bei den Mechanismen der Vasodilatation eine Rolle, während BMP2 bei der Osteogenese einen sehr wichtigen Faktor darstellt. Jedoch sind die Nanotoxizität bzw. -kompatibilität, sowie die Konsequenzen der unkontrollierten Nanobiodegradierbarkeit von GO noch nicht ausreichend untersucht.

Für die PLGA- bzw. GO-Ummantelung wurden die Trägermaterialien einmalig oder mehrmalig in die Materiallösung getaucht. Je nach Häufigkeit der Eintauchvorgänge entstand eine homogene Schicht mit variabler Dicke auf der Konstruktoberfläche. Diese Methodik wurde Dip Coating genannt. Verglichen dazu wurde die Bezeichnung Dry Coating für das Lufttrocknen der Ummantelungsschicht auf den TCP Blöcken verwendet. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die beiden Varianten – sowohl Dip- als auch Dry Coating - bei der Ummantelung mit PLGA keinen großen Einfluss auf die Kontaktwinkel oder auch auf die Oberflächentopographie aufwiesen. Da die Makroporen bei der Dip Coating Variante erhalten blieben, wurde diese für die weiteren Experimente verwendet.

Im Gegensatz dazu resultierte die GO-Ummantelung der Konstrukte in einen einheitlichen Film, der die Struktur der β -TCP Konstrukte komplett überzog und die in dem Material vorhandenen Poren vollständig verschloss.

Da bereits nachgewiesen werden konnte, dass die ideale Porengröße eines Materials für den Prozess der Osteogenese zwischen 100 und 500 μm liegen sollte, ist der Verschluß der Poren hier kontraproduktiv [45, 46].

Diskussion

Generell bevorzugen Zellen hydrophile Oberflächen [132]. Die in dieser Studie durchgeführten Kontaktwinkelanalysen wiesen die Entstehung einer stark hydrophilen Oberfläche nach der GO-Ummantelung auf, und einer eher hydrophoben Oberfläche nach der PLGA Ummantelung ohne basische Vorbehandlung. Die Zellzahl auf den GO-beschichteten Konstrukten war zwar höher, jedoch zeigten die Zellen, die auf PLGA adhärten und proliferierten, fluoreszenzmikroskopisch eine normale, fibroblastoide Zellmorphologie. Auch auf dreidimensionaler Ebene ließ sich eine höhere Anzahl an adhären Zellen auf den GO-ummantelten Konstrukten detektieren.

Im Gegensatz dazu zeigte der Proliferationsassay geringere Wachstumsraten auf den GO-beschichteten Oberflächen. Die höhere Hydrophilizität der Konstrukte ist vermutlich dafür zuständig, dass in den ersten Stunden zwar mehr Zellen adhären, aber dennoch das PLGA Material für die Langzeitproliferation als Substratunterlage für Kieferperiostzellen attraktiver erscheint. Zu Beginn der Studie wurde die PLGA-Oberfläche zur Mobilisierung der reaktiven Gruppen mit Salzsäure behandelt. Die Oberfläche wurde im Zuge der Optimierung der Beschichtungsvarianten mit NaOH anstelle der Salzsäure behandelt, als festgestellt wurde, dass die Säurebehandlung das β -TCP massgeblich zerstörte. Die basische Behandlung der Konstruktoberfläche resultierte in einer stark hydrophilen Struktur des PLGA [86,46,79,132]. Die weitere Biofunktionalisierung wurde aus diesem Grund nach der basischen Vorbehandlung der Oberfläche durchgeführt.

Eine analytische Limitation der in dieser Studie beschriebenen Beschichtungsstrategie besteht darin, dass die entstandene Schichtdicke aus technischen Gründen nicht bestimmt und justiert werden konnte.

Zusammenfassend zeigten die Resultate der Etablierung der Ummantelung, dass die PLGA-Beschichtung die geeignetere Oberfläche für die angestrebte Applikation darstellt. Diese Ummantelung beeinflusst die Zellfunktionen positiv und verfügt nach basischer Behandlung über eine hydrophile Oberfläche und über reaktive Gruppen, die für die weitere Funktionalisierung notwendig sind.

RGD-Peptid Immobilisierung

Die Effizienzen der RGD Peptid-Immobilisierung zeigten starke Varianzen zwischen den untersuchten Kopplungsvarianten. Die einfach gekoppelten Konstrukte (Peptide befinden sich innerhalb der PLGA-Schicht) wiesen sehr geringe Peptidmengen laut Aminosäureanalyse auf, die signifikant geringer waren, als die doppelt gekoppelten Konstrukte (innerhalb Ummantelung + Oberfläche). Ein Grund für die signifikanten Unterschiede könnte darin begründet sein, dass die einfach (innerhalb der Beschichtung) gekoppelten Konstrukte nach der Beschichtung der β -TCP Matrizen mit der PLGA- PLL- CGRD/ES- Lösung zur Sterilisation eine Stunde UV-bestrahlt wurden. Aminosäuren und Peptidbindungen sind individuell verschieden sensibel gegenüber UV- Strahlung. Die Unterschiede in der Immobilisierungseffizienz zur einfachen Oberflächenkopplung waren ebenfalls sehr hoch, jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant. Die oberflächenbeschichteten Konstrukte (einfach - Oberfläche) wurden nach der PLGA-Ummantelung und vor der Peptidkopplung, die in einem zweiten Schritt stattfand, mit UV-Licht bestrahlt. Es ist möglich, dass eine Radikalbildung durch die UV-Strahlung zur Zerstörung der Peptide bzw. der Peptidbindungen führt und sich auf die Kopplungseffizienzen auswirkt.

Unabhängig davon waren die Kopplungseffizienzen bei allen Konstrukten sehr niedrig. Dies kann an dem wasserlöslichen Crosslinker-System EDC-NHS liegen, das die Struktur der Trägermatrix zwar nicht verändert, jedoch weniger effizient für Immobilisierungen ist als die lösungsmittellösliche Variante DCC/NHS, wie in eigenen Vorarbeiten gezeigt werden konnte. Um jedoch die Matrixstruktur durch die Chemikalien nicht zu stark zu verändern, wurde dieses System trotzdem verwendet. Für zukünftige Studien könnten jedoch weitere Kopplungsmethoden über die Klick-Chemie oder Kopplungen über Maleimid-Systeme in Erwägung gezogen werden, um die Immobilisierungseffizienz zu steigern [133, 134].

Um die Peptide für die Zellen zugänglich zu machen, ist es wichtig, dass ein Abstand zwischen Zelle und Matrix vorhanden ist [57, 89, 95, 96], daher wurde wie bereits in Vorarbeiten ein PLL-Spacer verwendet [84]. Das PLL kann in geringen Dosen die Zelladhäsion verstärken und wird bei Adhäsionsassays angewandt. Unter Verwendung von hohen Konzentrationen kann PLL jedoch auch toxisch wirken. Die für die Periostzellen geeignete Konzentration wurde bereits in Vorarbeiten getestet [84].

Diskussion

Die Vorarbeiten basierten auf der Immobilisierung von RGD-Peptiden auf PLGA-Matrizen. Das von dem PLGA-Material abgesehen wurde beruht auf der Tatsache, dass die Resorption dieses Materials zu einem saueren pH-Wert führen kann und somit der Knochenbildung entgegen wirkt [16, 81, 135]. Aufgrund der Pufferkapazität des Hauptmaterials wurde daher in der vorliegenden Studie eine dünne PLGA-Schicht in Kombination mit einem β -TCP-Kern bevorzugt.

Immobilisierte man die Peptide auf der Oberfläche der Matrizen, so konnte auf zweidimensionaler Ebene einen klaren Effekt der verstärkten Zelladhäsion detektiert werden. Auf den einfach oberflächlich- als auch den doppelt RGD-gekoppelten Konstrukten wurde eine deutlich verstärkte Adhäsion im Gegensatz zu den mitgeführten unbeschichteten- und negativ-Kontrollen verzeichnet (Abbildung 20).

Auf dreidimensionaler Kultivierungsebene hingegen konnte dieser starke Effekt nicht beobachtet werden (Abbildung 24). Hierbei ergaben sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Kopplungsvarianten und den Kontrollen, was zunächst unerwartet erschien. Jedoch ist die Materialbeschaffenheit mit den Mikro-, Meso- und Makroporen, der Oberflächentopographie [45] und der Steifigkeit nahezu genauso entscheidend für die Zellantwort wie bioaktive Faktoren [122, 136-138]. Da durch die dreidimensionale Kultivierung auf den Matrizen die Grundstruktur der zu besiedelnden Oberflächen sich deutlich von den zweidimensionalen Oberflächen unterscheidet, kann sich dies auf die Zellen bezüglich des Adhäsionsverhaltens aktivierend auswirken und kompensiert somit die Effekte, die von den verschiedenen Peptidbeschichtungen ausgehen könnten [89].

Vorhandene oder beobachtete Unterschiede im Adhäsionsverhalten wirkten sich in der vorliegenden Studie nicht auf das Proliferationsverhalten der Kieferperiostzellen innerhalb der beschichteten Konstrukte aus. Dies wurde in Vorarbeiten ebenso festgestellt, allerdings wurde in diesen Studien mit Polylaktid Konstrukten als Trägermatrix gearbeitet. Die Peptidbeschichtung zeigte hier einen positiven Einfluß auf die osteogene Differenzierung in der zweidimensionalen Kultivierungsebene. Ausgehend von diesem Ergebnis konnte angenommen werden, dass die verwendeten Peptide funktionell aktiv waren [84].

Im Gegensatz zu den Vorarbeiten konnte eine Aktivierung der Osteogenese auf den RGD-beschichteten β -TCP Konstrukten nicht beobachtet werden. Dieses negative

Diskussion

Ergebnis kann an der Kombination von PLGA und β -TCP liegen, die eventuell schon ohne Peptidbeschichtung dafür geeignet sind, die Osteogenese aufgrund ihrer Zusammensetzung und Oberflächentopographie zu verstärken. Dadurch könnten die Effekte die von den Peptiden ausgehen könnten, maskiert sein.

Trägt man die Erkenntnisse der Peptidbeschichtung dieser Studie zusammen, so lässt sich feststellen, dass die Peptide erfolgreich, aber mit einer geringen Effizienz auf die Matrizen aufgebracht werden konnten und diese bezüglich des Adhäsionsverhaltens deutliche Unterschiede zeigten. Die Peptidbeschichtung der Konstrukte wirkte sich jedoch nicht auf das Mineralisierungspotential der Kieferperiostzellen innerhalb der β -TCP Konstrukte aus. Limitierend ist in der vorliegenden Arbeit jedoch auch die Nachweismethode für die gebildeten Präzipitate. Während der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff genauso an das verwendete β -TCP Material binden müsste, ist die Eignung dieser Nachweismethode der Kalziumphosphatpräzipitate fraglich. Auch eine Mikro-CT- oder Nano-CT- Analyse ist aufgrund des Kalziumphosphatkerns nicht zielführend. Ebenfalls fraglich oder unbekannt ist der Einfluß des osteogenen Mediums auf die Struktur des β -TCP Materials aufgrund der Ascorbinsäure, die evtl. die Oberflächenstruktur des Materials angreifen könnte. Diese Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und sollte in zukünftigen Studien analysiert werden. Weitere Gen- und Proteinuntersuchungen in Abhängigkeit der verschiedenen Kopplungsvarianten sollten zusätzlich durchgeführt werden. Jedoch ist der Nutzen der Peptidbeschichtung fragwürdig, da sich auf dreidimensionaler Kultivierungsebene bezüglich der getesteten Parameter bereits ohne aufwändige Peptidbeschichtung ähnliche Ergebnisse erzielen lassen.

Aptamer Immobilisierung

Das in Vorarbeiten identifizierte Aptamer 74 wurde über den sogenannten Zell-SELEX-Prozess generiert, und wies eine verstärkte Affinität an humane Kieferperiostzellen auf. Es konnte gezeigt werden, dass die mit Aptamer-positiven Zellen besiedelten PLGA-Matrizen stärker mineralisierten als die mit Aptamer-negativen Zellen kultivierten. Die genaue Zielstruktur des Aptamers auf den Zellen ist bisher jedoch unbekannt [4].

Diskussion

In der vorliegenden Studie sollte eine Methode zur Immobilisierung des Aptamers 74 zunächst auf 2D Ebene etabliert werden, die anschließend ähnlich wie bei den Peptiden auf 3D Ebene transferiert werden sollte. Nach der Herstellung der beschichteten Oberflächen/Konstrukte sollten die Zellfunktionen untersucht werden. Zunächst wurde die Plasmastabilität des Aptamers 74 untersucht, da die Moleküle im Falle einer klinischen Applikation im Blut/Gewebe dauerhaft Nukleasen ausgesetzt sind. Optimalerweise sollten die Aptamere während der SELEX-Prozedur modifiziert und stabilisiert werden, da jede Veränderung des Moleküls auch zu einer veränderten Bindungsaffinität an sein Target führen kann [113]. In dieser Studie wurde jedoch das Aptamer erst nach der SELEX-Prozedur modifiziert und musste aus dem Grund bezüglich der Bindungsaffinität erneut getestet werden. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Aptamere über eine PEGylierung in verschiedenen Größen (11 kDa, 20 kDa, 40 kDa) stabilisiert wurden, wobei sich die 11 kDa als ausreichend stabil gegenüber der Degradierung durch Nukleasen herausgestellt hatte. Darüber hinaus ist bekannt, dass das Ersetzen von Phosphatbindungen durch Phosphothioatbindungen das Molekül stabilisieren kann [113].

Somit wurden für dieses Projekt zwei Stabilisierungen getestet: 1. eine 11 kDa PEG-Modifizierung am 5' Ende und 2. eine Stabilisierung mit einer 11 kDa PEG am 5' Ende und 2 PTO Bindungen am 3' Ende. Die Stabilität wurde in Vollblut zu verschiedenen Zeitpunkten getestet. 89 % der Ausgangsmenge der doppelt modifizierten Aptamere waren nach 72 h detektierbar. Das unmodifizierte Aptamer hingegen wies nach 72 h lediglich eine Restmenge von 35 % im Vollblut auf. Die einfache Modifikation des Aptamers resultierte in einer detektierbaren Restmenge von 41 % nach 72 h. Somit konnte in der vorliegenden Studie eindrücklich gezeigt werden, dass die Plasmastabilität der Aptamere durch die gewählten Modifikationen signifikant verbessert werden konnte. Der Nachteil lag darin, dass die Modifikationen in der Herstellung durch die Firma äußerst schwierig war, zunächst ineffizient und dadurch auch sehr teuer. Parallel dazu wurde die Bindungsaffinität der stabilisierten Aptamere getestet – sowohl an Kontrollmedium-kultivierten, als auch an osteogen andifferenzierten Kieferperiostzellen. Die Detektion erwies sich als extrem schwierig, da durch die durchgeführten Modifikationen von den Firmen aus technischen Gründen kein zusätzliches FAM-Fragment als Fluoreszenzmarkierung für die durchflusszytometrischen Analysen angehängt werden konnte, und die Detektion über einen PEG-Antikörper und einen Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper erfolgen

Diskussion

musste. Dies machte den direkten Vergleich zu vorhergehenden Bindungsaffinitätsassays schwierig. Außerdem war der Zellverlust beim Prozess der Zellmarkierung sehr hoch und der Einsatz der Zellzahl limitiert, aufgrund der extrem teuren modifizierten Aptamere. Dadurch mussten die Versuche mit einer geringen Zellzahl durchgeführt werden, was sich in den Histogrammen widerspiegelte (6).

Da die modifizierten Aptamere die Moleküle zwar stabilisierten, jedoch deren Bindungsaffinität maßgeblich veränderten (es konnte keine Bindungsaffinität mehr durchflußzytometrisch detektiert werden), wurden für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Analysen die unmodifizierten Aptamere verwendet (Abbildung 26).

Um die Interaktion zwischen dem Aptamer und den Kieferperiostzellen besser zu charakterisieren, wurden in dieser Studie Rasterkraftmessungen durchgeführt. Dabei wurde die Bindungsstärke zwischen dem Aptamer und den Kieferperiostzellen gemessen. Die Rasterkraftmikroskopie ist eine gängige Methode zur Analyse der Bindungskräfte zwischen Aptameren und ihren Zielmolekülen [69, 139]. Hierbei erschien es in diesem Kontext nicht sinnvoll, die Bindungsstärke eines Einzelmoleküls zu der Zelle zu messen, da nicht sichergestellt werden konnte, dass das Aptamer während der Messung an nur ein Zielmolekül gebunden hat. Da die Zielstruktur unbekannt ist, kann nicht davon ausgegangen werden, dass das Aptamer nur ein Zielprotein / ein Zielmolekül bindet. Daher wurde für alle durchgeführten Messungen ein Flat-Tip Cantilever verwendet, der mit vielen Aptamer-molekülen beschichtet wurde. Es erschien sinnvoll, unter diesen Voraussetzungen verschiedene Gruppen zu untersuchen (Oligonukleotid-Bibliothek versus Aptamer, unbehandelte gegen osteogen stimulierte Zellen sowie verschiedene Zeitpunkte der Osteogenese – Tag 3, 5, 7 und 15). Es konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den osteogen induzierten Zellen entdeckt werden. Die Bindungskräfte zwischen dem Aptamer oder der Oligonukleotid-Bibliothek und Kontrollzellen lagen im Durchschnitt zwischen ca. 35-50 pN, im Vergleich zu den Bindungskräften zu osteogen induzierten Zellen, die durchschnittlich zwischen ca. 50-62 pN lagen (wie in Abbildung 27 zu sehen). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da in Vorarbeiten die Beobachtung gemacht wurde, dass das Aptamer verstärkt an osteogen andifferenzierte Kieferperiostzellen bindet. Jedoch war die ebenfalls verstärkte Bindungskraft der Oligonukleotid-Bibliothek zu Kieferperiostzellen nicht erklärbar, und zunächst erschien die Bindung aufgrund des Shifts - sowohl bei der Bibliothek als auch beim Aptamer - als unspezifisch. Betrachtete

Diskussion

man jedoch die Kraftkurven genauer, so fiel in Abbildung 28 auf, dass die gemessenen Kurven sich insgesamt unterscheiden: es konnte eine Tendenz zu höheren Bindungskräften zwischen Aptamer/Bibliothek und osteogen induzierten Zellen (Shift der Kurven auf der x-Achse) verzeichnet werden, wie bereits oben erwähnt. Zwischen dem frühen und späten Zeitpunkt (3 und 15 Tage) der osteogenen Induktion waren nur geringe Unterschiede in den Kraftkurven/Frequenzen der Bindungskräfte detektierbar. Die hohe Standardabweichung wurde bei dem Vergleich der verschiedenen Patienten relativiert, da jeder Patient eine ähnliche Tendenz der Bindungskräfte aufzeigte, jedoch die Bindungskräfte zu den Patientenzellen sehr variierten. Interessanterweise zeigten die Rasterkraftanalysen zwischen dem Aptamer und den osteogen induzierten Zellen eine Gruppierung der Abreißkräfte in regelmäßigen Abständen von 12-13 pN (bei 25, 37, 50, 62 pN). Solche hierarchischen Gruppierungen wurden in anderen Studien mit dem Riss von individuellen Rezeptor-Ligand Molekülpaaren assoziiert wie z. B. zwischen Kollagen und Intergrin-Rezeptoren [140]. Die oben genannte Beobachtung gilt jedoch nicht für die übrigen 3 Gruppen. Dies könnte darauf hinweisen, dass der osteogene Differenzierungsprozess die Expression von Oberflächenmolekülen, die an Aptamer 74 binden, aktiviert.

Die Erkenntnisse der Rasterkraftanalysen zeigen somit keine absoluten Zahlen der Bindungsstärke, jedoch ist die Grunderkenntnis die, dass tatsächlich unterschiedliche Bindungskräfte zwischen Aptameren und unbehandelten oder osteogen differenzierten Kieferperiostzellen bestehen. Diese Beobachtung bestätigt die in den Vorarbeiten beschriebenen Hypothesen und Ergebnisse [4].

Wie für die Peptidimmobilisierung wurden PLGA-ummantelte β -TCP Trägermatrizen für die Aptamerkopplung verwendet. Das Aptamer wurde mit Amino-Gruppen modifiziert synthetisiert, um mit den Carboxylgruppen des PLGAs eine kovalente Bindung über das Crosslinker-System EDC/NHS eingehen zu können. Wie bei den Peptiden bereits aufgefallen war, erhielten wir auch mit dem Aptamer geringe Immobilisierungseffizienzen von nur 1.3 %. Auch für diese Anwendung ist bei zukünftigen Studien die Kopplung über die click-Chemie oder über Maleimid in Erwägung zu ziehen. Als Kontrolle wurde die Start-Bibliothek an β -TCP Konstrukte immobilisiert, die eine noch geringere Kopplungseffizienz von 0.5 % aufwies. Die Startbibliothek wurde als Kontrolle gewählt, um die Effekte einer allgemeinen Oligonukleotid-Beschichtung von denen des spezifischen Aptamers 74 differenzieren

Diskussion

zu können. Die Startbibliothek besteht aus 10^{15} verschiedenen Sequenzen. Die Synthese aller Oligos wurde von der Firma Ella Biotech durchgeführt und zeigte tendenziell geringe Effizienzen. Theoretisch wurde an jedes einzelne 80 bp-langes Oligomer eine Amino-Gruppe angehängt, über die die Moleküle anschließend chromatographisch aufgereinigt wurden. Jedoch wurde vonseiten der Firma die Beobachtung gemacht, dass die reaktiven Gruppen nicht zugänglich waren und sich daraus die schlechte Effizienz nach der Aufreinigung ergab. Die Oligos bilden Primär-, Sekundär-, und Tertiärstrukturen, die den Hauptgrund für die Bindung der Aptamere an ihr Target darstellen [141]. Diese Strukturen bilden im Allgemeinen Knoten, Pseudoknoten, Loops und sind in sich verdreht. Übertragen auf diese Studie könnte es dazu geführt haben, dass die Amino-Gruppe am 5'-Ende an der Oberfläche nicht zugänglich war, sondern sich im Inneren der Aptamer-Moleküle befand und sich daraus die schlechte Syntheseeffizienz erklären würde. Geht man von dieser Annahme aus, so ist es durchaus denkbar, dass das oben beschriebene Problem auch die Kopplungsreaktion an Oberflächen beeinflusst, die auf zugängliche funktionelle Amino-Gruppen angewiesen ist.

Weiterhin spielt die sterische Behinderung der Moleküle innerhalb der Lösung eine Rolle und kann ebenfalls die Bindungseffizienz vermindern. Diese Effekte finden sich sowohl beim Aptamer 74 als auch bei der Startbibliothek. Die Bibliothek beinhaltet einen Pool an verschiedenen Sequenzen, bei dem die sterische Behinderung eine noch größere Rolle spielen kann, da hierbei sehr viele verschiedene Primär-, Sekundär- und Tertiärstrukturen von 10^{15} Molekülen aufeinandertreffen, was die noch geringere Immobilisierungseffizienz der Startbibliothek erklären könnte. Daraus ergibt sich auch eine unzuverlässige Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei unterschiedlichen Immobilisierungseffizienzen. Für zukünftige Studien erscheint es sinnvoll, verschiedene Aptamer-mengen auszutitrieren und den Effekt der veränderten Aptamer-menge auf die Zellen zu evaluieren, sowie die Immobilisierungs- und Herstellungseffizienzen zu verbessern. In der vorliegenden Studie wurde bisher lediglich die Menge an Crosslinker-reagenz austitriert.

Nach der Herstellung der Aptamer-beschichteten Konstrukte folgten die Untersuchungen der Zellfunktionen.

Die Adhäsionsassays zeigten eine signifikant höhere Zellzahl auf den PLGA-beschichteten Konstrukten im Vergleich zu den Aptamer-beschichteten Konstrukten

Diskussion

auf 2D Kultivierungsebene. Betrachtete man das Proliferationsverhalten nach 7 und 11 Tagen, so ließ sich eine leichte Tendenz der verstärkten Proliferation auf den Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen erkennen, die jedoch quantifiziert anhand eines metabolischen Assays nicht signifikant war.

Betrachtete man die Adhäsion auf dreidimensionaler Ebene, so zeigte sich auf den Aptamer-beschichteten Konstrukten eine etwas stärkere Adhäsion im Vergleich zu Bibliothek- oder PLGA- beschichteten Matrizen. Dies konnte jedoch nicht bei allen Patienten verifiziert werden. Die in Abbildung 33 dargestellten Patientenzellen (#3), die auf Bibliothek-beschichteten Konstrukten eine starke Adhäsion aufwiesen, wurden ebenso auf ihre Bindungsaffinität zum Aptamer 74 getestet, die auch sehr gering ausfiel. In der früheren Studie konnten ebenfalls starke Abweichungen bzgl. der Aptamer-Bindungsaffinität zwischen den Patienten beobachtet werden [4]. Daher ist es möglich, dass die verschiedenen Funktionalisierungen bei manchen Patienten nicht ersichtlich zum Tragen kommen und aus dem Grund die Adhäsion dieser Patientenzellen auf allen Konstrukten gleich stark zu sein scheint. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die Struktur sowie die Oberflächentopographie der ummantelten 3D Matrizen Zell-adhäsiv wirken, wie bereits oben im Abschnitt der Peptide erwähnt wurde [89].

Die osteogene Differenzierung wurde auf zwei- und dreidimensionaler Kultivierungsebene auf Aptamer-beschichteten Oberflächen/Konstrukten evaluiert. Auf 2D Ebene wurde der Mineralisierungsgrad mithilfe der Alizarinrot-Färbung analysiert, bei der die Kalziumphosphat-Präzipitate rot angefärbt wurden. Hierbei konnte in Aptamer-beschichteten Wells die stärkste Mineralisierung nachgewiesen werden. Auf 3D Ebene konnten die Ergebnisse der Fluoreszenz-Färbung nur schwer interpretiert werden. Insgesamt wurde eine höhere Fluoreszenzintensität auf osteogen behandelten und Aptamer-beschichteten Matrizen detektiert. Dies deutet darauf hin, dass eine solche Anfärbung möglich ist, obwohl der Farbstoff theoretisch auch das Gerüst der Matrize anfärben müsste, wie ebenfalls bereits im oberen Abschnitt über die Peptide erwähnt. Es muss jedoch in Erwägung gezogen werden, dass die Ascorbinsäure (im osteogenen Differenzierungsmedium enthalten) die TCP-Matrix hydrolysieren kann, was eventuell zu einer verstärkten unspezifischen Färbung führen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde eine eventuelle pH-Verschiebung des Mediums nicht getestet, und somit nicht untersucht. Speziell bei Kalziumphosphat

Diskussion

Konstrukten sollte der Einfluß des Mediums in zukünftigen Studien stärker berücksichtigt werden. Darüber hinaus sollten in weiteren Studien die Expression von osteogenen Differenzierungsmarkern während des Osteogeneseprozesses innerhalb der 3D Konstrukte analysiert werden.

Vergleich der beiden immobilisierten bioaktiven Moleküle – RGD- Peptide versus Aptamer 74

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Beschichtungstechnologie etabliert, bei der anhand einer PLGA-Ummantelung des anorganischen β -TCP Materials funktionelle Gruppen geschaffen wurden, um Moleküle kovalent koppeln zu können. Die resultierende Oberfläche der Konstrukte wies relativ unveränderte Mikro-, Meso- und Makroporen auf und zeigte durch die Natriumhydroxid-Behandlung stark hydrophile Eigenschaften.

Sowohl RGD-Peptide als auch Aptamer 74 konnten auf den β -TCP Matrizen immobilisiert werden - allerdings mit einer schwachen Effizienz, die in folgenden Studien durch die Verwendung von weiteren Crosslinkern verbessert werden sollte. Die in-vitro Effekte bezüglich der Zelladhäsion auf zweidimensionaler Kultivierungsebene waren auf RGD-beschichteten Wells deutlich stärker als auf Aptamer-beschichteten Oberflächen. Auf dreidimensionaler Kultivierungsebene wurde dagegen die Adhäsion verbessert. Die Proliferation der verwendeten Kieferperiozyten schien durch keine Biofunktionalisierungsmethode relevant beeinträchtigt zu sein. Bezüglich des osteogenen Differenzierungspotentials konnten auf zweidimensionaler Kultivierungsebene bei der Aptamerbeschichtung signifikante Unterschiede detektiert werden, wobei die RGD- Beschichtung keinen Effekt zeigte. Auf dreidimensionaler Kultivierungsebene ist die Zuverlässigkeit der Nachweismethode fraglich und muss in zukünftigen Studien weiter untersucht und optimiert werden.

Zusammenfassend kann somit keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, welche der beiden etablierten Funktionalisierungen die sinnvollere oder geeignetere Variante für Knochen Tissue Engineering Applikationen im Kieferbereich darstellt. Neben den Optimierungsarbeiten, die anzustreben sind, sollten die in vitro

Diskussion

hergestellten Konstrukte im Tiermodell auf ihre Biokompatibilität und die Regenerationsfähigkeit von Knochendefekten getestet werden, um in Zukunft den Weg in die klinische Applikation zu finden – „*from bench to bedside*“.

Zusammenfassung

Die Rekonstruktion von Knochendefekten in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie bleibt bis zum heutigen Zeitpunkt eine Herausforderung. Der Goldstandard der Knochenregeneration ist bisher immernoch die Verwendung von autologem Knochengewebe, resultiert in Donormorbiditäten und ist in der Anwendung limitiert. Eine Alternative ist das Tissue Engineering, bei dem mit geeigneten Biomaterialien und autologen Stammzellen das defekte Gewebe regeneriert werden soll.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, ein osteoinduktives Biomaterial mit β -Trikalziumphosphat (β -TCP) als Kernmaterial zu generieren. β -TCP weist als Grundmaterial keine funktionellen Gruppen für die Kopplung von bioaktiven Molekülen auf, weswegen eine Ummantelung der Kernmatrix mit Graphenoxid (GO) und Polylaktid-Polyglykolid (PLGA) etabliert wurde. Die Oberflächeneigenschaften der resultierenden 2D Oberflächen und 3D Konstrukte wurde anhand der Rasterelektronenmikroskopie und der Messung der Kontaktwinkel detektiert. Es zeigte sich nach der GO Behandlung eine hydrophile Oberfläche, die die Poren der β -TCP Matrix komplett verdeckte. Um die Porosität des β -TCP Materials beizubehalten wurde deswegen PLGA für weitere Biofunktionalisierungen gewählt. Es wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt.

Ein Ansatz beinhaltete die Immobilisierung von RGD-Peptiden, die über einen Poly-L-Lysin-Platzhalter an die Oberflächen/Konstrukte immobilisiert wurden. Diese Modifikation resultierte in einer verstärkten Adhäsion auf 2D Oberflächen, jedoch nicht in einer verstärkten Proliferation und einer vermehrten Mineralisierung auf 2D oder 3D Kultivierungsebene.

Der zweite Ansatz beinhaltete die Immobilisierung eines in vorherigen Arbeiten generierten Aptamers auf der Oberfläche der PLGA-beschichteten Oberflächen/Konstrukte. Die Versuche der Stabilisierung der Aptamere durch verschiedene Modifikationen scheiterte an der Verminderung der Bindungsaffinität des Aptamers an die humanen Kieferperiostzellen, weswegen mit dem unmodifizierten Molekül fortgefahren wurde. Die Bindungskräfte zwischen dem Aptamer 74 und den humanen Kieferperiostzellen wurde durch die Rasterkraftspektroskopie charakterisiert. Hier zeigten sich stärkere Bindungskräfte an osteogen-induzierte Zellen im Vergleich zu nicht induzierten, unbehandelten Zellen.

Zusammenfassung

In-vitro Analysen der auf den biofunktionalisierten Oberflächen/Konstrukten wachsenden Zellen zeigten eine leicht verstärkte Adhäsion auf der 3D Kultivierungsebene. Bezüglich der Proliferation und der Mineralisierungskapazität konnten keine verstärkenden Effekte beobachtet werden.

In der vorliegenden Studie konnten wir zusammenfassend eine Strategie zur Biofunktionalisierung des anorganischen β -TCP Materials etablieren, ohne die Oberfläche der Kernmatrix maßgeblich zu verändern. In zukünftigen Studien sollten die Immobilisierungseffizienzen optimiert werden, weitere Biomoleküle immobilisiert werden und die Biokompatibilität der in-vitro generierten Konstrukte ermittelt werden.

Summary

Up to present, the reconstruction of bone defects in oral and maxillofacial surgeries still remains a major challenge. The standard method for bone regeneration includes the transfer of autologous tissue resulting in donor morbidities and limited by a restricted availability of sufficient bone material. Alternatively, suitable tissue engineering approaches are required, including biocompatible materials and autologous stem cells.

The aim of the present study was to generate an osteoinductive biomaterial with β -tricalciumphosphate (β -TCP) as a core material. Since the β -TCP material lacks functional groups for the covalent coupling of bioactive molecules, a PLGA- compared to a graphene oxide- (GO) coating procedure was established. Surface properties were analyzed by electron microscopy and contact angle measurements, revealing a rather hydrophilic surface after GO coating and a complete closure of existing pores in the core material. To maintain the porosity of the β -TCP material, PLGA was chosen for further biofunctionalization studies. Therefore, two different immobilization approaches of osteoinductive factors were performed. One approach included the immobilization of RGD peptides using a poly-L-lysine spacer on the surface of PLGA coated wells/constructs, resulting in an enhanced adhesion behaviour on 2D coated dishes, however, not in an enhanced cell proliferation and mineral deposition on 2D or 3D culture level.

The second approach involved the immobilization of the previously identified aptamer 74 on the surface of PLGA coated wells/constructs and the comparison of the resulting osteoconductivities. The attempts to stabilize the aptamers failed, due to the changed binding affinities of the modified molecules. Binding forces of aptamer 74 to jaw periosteal cells (JPC) were characterized by atomic force based spectroscopy showing higher binding forces to osteogenically induced versus untreated cells. In vitro analyses of JPCs growing within the biofunctionalized wells/constructs showed a slightly enhanced adhesion behaviour on 3D culture level. However, no enhancing effects concerning the proliferation and/or mineralization potential were detected.

Taken together, we could successfully establish a biofunctionalization strategy of the anorganic β -TCP material with bioactive molecules, without altering material surface properties. Future studies should aim at optimizing immobilization efficiencies, trying

Summary

different biomolecules, analysing biocompatibilities and regenerative capacities of the in vitro biofunctionalized constructs.

Literaturverzeichnis

1. Miles, B.A., et al., *Mandible reconstruction*. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2010. **18**(4): p. 317-22.
2. Zhang, Z., *Bone regeneration by stem cell and tissue engineering in oral and maxillofacial region*. Front Med, 2011. **5**(4): p. 401-13.
3. Ardjomandi, N., et al., *Indirect coating of RGD peptides using a poly-L-lysine spacer enhances jaw periosteal cell adhesion, proliferation, and differentiation into osteogenic tissue*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2012. **100**(8): p. 2034-44.
4. Ardjomandi, N., et al., *Identification of an aptamer binding to human osteogenic-induced progenitor cells*. Nucleic Acid Ther, 2013. **23**(1): p. 44-61.
5. Jäger M., W.B., Wild A., Krauspe R., *Knochenspanentnahme am Becken*. Der Orthopäde, 2005. **34**: p. 18.
6. Wolff KD., F.M., Nast A., *Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms*. Deutsches Ärzteblatt, 2012. **48**: p. 6.
7. Hutmacher, D.W., et al., *Tissue engineering research: the engineer's role*. Med Device Technol, 2000. **11**(1): p. 33-9.
8. Alexander, D., et al., *ECM remodelling components regulated during jaw periosteal cell osteogenesis*. Cell Biol Int, 2011. **35**(10): p. 973-80.
9. Warnke, P.H., et al., *Man as living bioreactor: Fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible*. Biomaterials, 2006. **27**(17): p. 3163-3167.
10. Lind, B., et al., *Arteriovenous loop grafts for free tissue transfer*. Vasc Endovascular Surg, 2012. **46**(1): p. 30-3.
11. Boos, A.M., et al., *Engineering axially vascularized bone in the sheep arteriovenous-loop model*. J Tissue Eng Regen Med, 2013. **7**(8): p. 654-64.
12. Fishero, B.A., et al., *Current concepts of bone tissue engineering for craniofacial bone defect repair*. Craniomaxillofac Trauma Reconstr, 2015. **8**(1): p. 23-30.
13. Kanczler, J.M. and R.O. Oreffo, *Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone*. Eur Cell Mater, 2008. **15**: p. 100-14.
14. Torroni, A., *Engineered bone grafts and bone flaps for maxillofacial defects: state of the art*. J Oral Maxillofac Surg, 2009. **67**(5): p. 1121-7.
15. Habibovic, P. and K. de Groot, *Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(1): p. 25-32.
16. Smeets, R., Kolk, A., *Osteokonduktive und -induktive Knochenersatzmaterialien*. . <http://www.zmk-aktuell.de/>, 2011.
17. Freed, L.E., et al., *Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering*. Bio-Technology, 1994. **12**(7): p. 689-693.
18. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials, 2000. **21**(24): p. 2529-43.
19. Velasco, M.A., C.A. Narvaez-Tovar, and D.A. Garzon-Alvarado, *Design, Materials, and Mechanobiology of Biodegradable Scaffolds for Bone Tissue Engineering*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 729076.
20. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
21. Battula, V.L., et al., *Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation*. Differentiation, 2007. **75**(4): p. 279-91.

22. Bieback, K., et al., *Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood*. Biomed Mater Eng, 2008. **18**(1 Suppl): p. S71-6.
23. Buhning, H.J., et al., *Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1176**: p. 124-34.
24. Dominici, M., T.J. Hofmann, and E.M. Horwitz, *Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications*. J Biol Regul Homeost Agents, 2001. **15**(1): p. 28-37.
25. Lv, F.J., et al., *Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2014. **32**(6): p. 1408-19.
26. Augello, A., T.B. Kurth, and C. De Bari, *Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches*. Eur Cell Mater, 2010. **20**: p. 121-33.
27. Castrechini, N.M., et al., *Mesenchymal stem cells in human placental chorionic villi reside in a vascular Niche*. Placenta, 2010. **31**(3): p. 203-12.
28. Kfoury, Y. and D.T. Scadden, *Mesenchymal Cell Contributions to the Stem Cell Niche*. Cell Stem Cell, 2015. **16**(3): p. 239-253.
29. Mitsiadis, T.A., et al., *Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury*. Adv Dent Res, 2011. **23**(3): p. 275-9.
30. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
31. Yamanaka, S., *Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors*. Cell Prolif, 2008. **41 Suppl 1**: p. 51-6.
32. Colnot, C., *Cell sources for bone tissue engineering: insights from basic science*. Tissue Eng Part B Rev, 2011. **17**(6): p. 449-57.
33. Hutmacher, D.W. and M. Sitterling, *Periosteal cells in bone tissue engineering*. Tissue Eng, 2003. **9 Suppl 1**: p. S45-64.
34. Seong, J.M., et al., *Stem cells in bone tissue engineering*. Biomed Mater, 2010. **5**(6): p. 062001.
35. Barnes, M.J., *Ascorbic acid and the biosynthesis of collagen and elastin*. Bibl Nutr Dieta, 1969. **13**: p. 86-98.
36. Barnes, M.J., B.J. Constable, and E. Kodicek, *Studies in vivo on the biosynthesis of collagen and elastin in ascorbic acid-deficient guinea pigs*. Biochem J, 1969. **113**(2): p. 387-97.
37. Jorgensen, N.R., et al., *Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts*. Steroids, 2004. **69**(4): p. 219-26.
38. Ringe, J., et al., *Human mastoid periosteum-derived stem cells: promising candidates for skeletal tissue engineering*. J Tissue Eng Regen Med, 2008. **2**(2-3): p. 136-46.
39. Ferretti, C. and M. Mattioli-Belmonte, *Periosteum derived stem cells for regenerative medicine proposals: Boosting current knowledge*. World J Stem Cells, 2014. **6**(3): p. 266-77.
40. Alexander, D., et al., *Selection of osteoprogenitors from the jaw periosteum by a specific animal-free culture medium*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e81674.
41. Alexander, D., et al., *LNGFR induction during osteogenesis of human jaw periosteum-derived cells*. Cell Physiol Biochem, 2009. **24**(3-4): p. 283-90.

Literaturverzeichnis

42. Alexander, D., et al., *MSCA-1/TNAP Selection of Human Jaw Periosteal Cells Improves their Mineralization Capacity*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2010. **26**(6): p. 1073-1080.
43. Romagnoli, C., F. D'Asta, and M.L. Brandi, *Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering*. Clin Cases Miner Bone Metab, 2013. **10**(3): p. 155-61.
44. Gentile, P., et al., *An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering*. International Journal of Molecular Sciences, 2014. **15**(3): p. 3640-3659.
45. Huri, P.Y., et al., *Scaffold pore size modulates in vitro osteogenesis of human adipose-derived stem/stromal cells*. Biomed Mater, 2014. **9**(4): p. 045003.
46. Sicchieri, L.G., et al., *Pore size regulates cell and tissue interactions with PLGA-CaP scaffolds used for bone engineering*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2012. **6**(2): p. 155-162.
47. Bellas, E. and C.S. Chen, *Forms, forces, and stem cell fate*. Curr Opin Cell Biol, 2014. **31**: p. 92-7.
48. Alexander, D., et al., *Analysis of OPLA scaffolds for bone engineering constructs using human jaw periosteal cells*. J Mater Sci Mater Med, 2008. **19**(3): p. 965-74.
49. Liu, B. and D.X. Lun, *Current application of beta-tricalcium phosphate composites in orthopaedics*. Orthop Surg, 2012. **4**(3): p. 139-44.
50. Saini, A., et al., *Assessment of combination techniques in enhancing the regenerative potential of tricalcium phosphate graft in treatment of infrabony periodontal defects*. Indian J Dent Res, 2011. **22**(3): p. 391-5.
51. Demiralp, B., et al., *Treatment of periapical inflammatory lesion with the combination of platelet-rich plasma and tricalcium phosphate: a case report*. J Endod, 2004. **30**(11): p. 796-800.
52. Sculean, A., et al., *Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review*. Periodontol 2000, 2015. **68**(1): p. 182-216.
53. Shue, L., Z. Yufeng, and U. Mony, *Biomaterials for periodontal regeneration: a review of ceramics and polymers*. Biomater, 2012. **2**(4): p. 271-7.
54. Sun, H.H., et al., *Designing biomaterials for in situ periodontal tissue regeneration*. Biotechnol Prog, 2012. **28**(1): p. 3-20.
55. Bose, S. and S. Tarafder, *Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(4): p. 1401-21.
56. Detsch, R., et al., *Biofunctionalization of dispense-plotted hydroxyapatite scaffolds with peptides: quantification and cellular response*. J Biomed Mater Res A, 2010. **92**(2): p. 493-503.
57. Hersel, U., C. Dahmen, and H. Kessler, *RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond*. Biomaterials, 2003. **24**(24): p. 4385-415.
58. Hernandez, A., et al., *In vivo osteogenic response to different ratios of BMP-2 and VEGF released from a biodegradable porous system*. J Biomed Mater Res A, 2012.
59. Mattar, T., P.F. Friedrich, and A.T. Bishop, *Effect of rhBMP-2 and VEGF in a vascularized bone allotransplant experimental model based on surgical neoangiogenesis*. Journal of Orthopaedic Research, 2013. **31**(4): p. 561-566.

60. Carreira, A.C., et al., *Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications*. Arch Biochem Biophys, 2014. **561**: p. 64-73.
61. Guex, A.G., et al., *Covalent immobilisation of VEGF on plasma-coated electrospun scaffolds for tissue engineering applications*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. **123**: p. 724-33.
62. Guo, K.T., et al., *Aptamer-based strategies for stem cell research*. Mini Rev Med Chem, 2007. **7**(7): p. 701-5.
63. Hoffmann, J., et al., *Immobilized DNA aptamers used as potent attractors for porcine endothelial precursor cells*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2008. **84A**(3): p. 614-621.
64. Maia, F.R., et al., *Functionalization of biomaterials with small osteoinductive moieties*. Acta Biomaterialia, 2013. **9**(11): p. 8773-8789.
65. Maia, F.R., et al., *Functionalization of biomaterials with small osteoinductive moieties*. Acta Biomater, 2013. **9**(11): p. 8773-89.
66. Galibert, M., et al., *Application of click-click chemistry to the synthesis of new multivalent RGD conjugates*. Org Biomol Chem, 2010. **8**(22): p. 5133-8.
67. Wangler, C., et al., *Multimerization of cRGD peptides by click chemistry: synthetic strategies, chemical limitations, and influence on biological properties*. ChemBiochem, 2010. **11**(15): p. 2168-81.
68. Avci-Adali, M., et al., *Absolute quantification of cell-bound DNA aptamers during SELEX*. Nucleic Acid Ther, 2013. **23**(2): p. 125-30.
69. Wang, B., et al., *Surface conformations of an anti-ricin aptamer and its affinity for ricin determined by atomic force microscopy and surface plasmon resonance*. Phys Chem Chem Phys, 2015. **17**(1): p. 307-14.
70. Irvine, D.J., et al., *Nanoscale clustering of RGD peptides at surfaces using comb polymers. 2. Surface segregation of comb polymers in polylactide*. Biomacromolecules, 2001. **2**(2): p. 545-56.
71. Bohr, N., *On the constitution of atoms and molecules*. Philosophical Magazine 1913. **26**: p. 1-25.
72. Subbiah, R., et al., *Fibronectin-tethered graphene oxide as an artificial matrix for osteogenesis*. Biomed Mater, 2014. **9**(6): p. 065003.
73. Singh, V., et al., *Graphene based materials: Past, present and future*. Progress in Materials Science, 2011. **56**(8): p. 1178-1271.
74. Zhang, J., et al., *Preparation of graphene oxide-based surface plasmon resonance biosensor with Au bipyramid nanoparticles as sensitivity enhancer*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. **116**: p. 211-8.
75. Pinto, A.M., I.C. Goncalves, and F.D. Magalhaes, *Graphene-based materials biocompatibility: a review*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013. **111**: p. 188-202.
76. Talukdar, Y., et al., *The effects of graphene nanostructures on mesenchymal stem cells*. Biomaterials, 2014. **35**(18): p. 4863-77.
77. La, W.G., et al., *Delivery of bone morphogenetic protein-2 and substance P using graphene oxide for bone regeneration*. Int J Nanomedicine, 2014. **9 Suppl 1**: p. 107-16.
78. Luo, Y., et al., *Enhanced Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Graphene Oxide-Incorporated Electrospun Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanofibrous Mats*. ACS Appl Mater Interfaces, 2015. **7**(11): p. 6331-9.
79. Mena, F., A. Abdelghani, and B. Mena, *Graphene nanomaterials as biocompatible and conductive scaffolds for stem cells: impact for tissue engineering and regenerative medicine*. J Tissue Eng Regen Med, 2014.

80. Gentile, P., et al., *An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(3): p. 3640-59.
81. Houchin, M.L. and E.M. Topp, *Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: a review of reactions and mechanisms*. J Pharm Sci, 2008. **97**(7): p. 2395-404.
82. Danhier, F., et al., *PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications*. J Control Release, 2012. **161**(2): p. 505-22.
83. Asti, A. and L. Gioglio, *Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation*. Int J Artif Organs, 2014. **37**(3): p. 187-205.
84. Ardjomandi, N., et al., *Indirect coating of RGD peptides using a poly-L-lysine spacer enhances jaw periosteal cell adhesion, proliferation, and differentiation into osteogenic tissue*. J Biomed Mater Res A, 2012. **100**(8): p. 2034-44.
85. Pan, H., et al., *Effects of functionalization of PLGA-[Asp-PEG]_n copolymer surfaces with Arg-Gly-Asp peptides, hydroxyapatite nanoparticles, and BMP-2-derived peptides on cell behavior in vitro*. J Biomed Mater Res A, 2014. **102**(12): p. 4526-35.
86. Kapoor, D.N., et al., *PLGA: a unique polymer for drug delivery*. Ther Deliv, 2015. **6**(1): p. 41-58.
87. Kantlehner, M., et al., *Selective RGD-mediated adhesion of osteoblasts at surfaces of implants*. Angewandte Chemie-International Edition, 1999. **38**(4): p. 560-562.
88. Kantlehner, M., et al., *Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation*. Chembiochem, 2000. **1**(2): p. 107-14.
89. Bellis, S.L., *Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials*. Biomaterials, 2011. **32**(18): p. 4205-10.
90. Ruoslahti, E., *RGD and other recognition sequences for integrins*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 697-715.
91. Ruoslahti, E. and M.D. Pierschbacher, *New Perspectives in Cell-Adhesion - Rgd and Integrins*. Science, 1987. **238**(4826): p. 491-497.
92. Lee, T.T., et al., *Light-triggered in vivo activation of adhesive peptides regulates cell adhesion, inflammation and vascularization of biomaterials*. Nat Mater, 2015. **14**(3): p. 352-60.
93. Bosetti, M., et al., *Poly-L-lactide acid-modified scaffolds for osteoinduction and osteoconduction*. J Biomed Mater Res A, 2014. **102**(10): p. 3531-9.
94. Ingram, R.T., et al., *Osteoclast Inhibition Using Cyclic Rgd Peptides - Differential Activities on Alpha-V-Beta-3-Integrin Ligand Interactions*. Journal of Bone and Mineral Research, 1995. **10**: p. S327-S327.
95. Maheshwari, G., et al., *Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 10)**: p. 1677-86.
96. Massia, S.P. and J.A. Hubbell, *An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation*. J Cell Biol, 1991. **114**(5): p. 1089-100.
97. Craig, W.S., et al., *Concept and Progress in the Development of Rgd-Containing Peptide Pharmaceuticals*. Biopolymers, 1995. **37**(2): p. 157-175.
98. Beer, J.H., K.T. Springer, and B.S. Collier, *Immobilized Arg-Gly-Asp (RGD) peptides of varying lengths as structural probes of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor*. Blood, 1992. **79**(1): p. 117-28.

99. Pelham, R.J., Jr. and Y.L. Wang, *Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of the substrate*. Biol Bull, 1998. **194**(3): p. 348-9; discussion 349-50.
100. Ray, P., et al., *Application of aptamers for targeted therapeutics*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013. **61**(4): p. 255-71.
101. Famulok, M. and G. Mayer, *Aptamers and SELEX in Chemistry & Biology*. Chem Biol, 2014. **21**(9): p. 1055-8.
102. Hernandez, L.I., et al., *Aptamers overview: selection, features and applications*. Curr Top Med Chem, 2015. **15**(12): p. 1066-81.
103. Dassie, J.P. and P.H. Giangrande, *Current progress on aptamer-targeted oligonucleotide therapeutics*. Ther Deliv, 2013. **4**(12): p. 1527-46.
104. Stoltenburg, R., C. Reinemann, and B. Strehlitz, *SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands*. Biomol Eng, 2007. **24**(4): p. 381-403.
105. Guo, K.T., et al., *A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers*. Stem Cells, 2006. **24**(10): p. 2220-31.
106. Liang, C., et al., *Aptamer-functionalized lipid nanoparticles targeting osteoblasts as a novel RNA interference-based bone anabolic strategy*. Nat Med, 2015. **21**(3): p. 288-94.
107. Zhao, W., et al., *Bioinspired multivalent DNA network for capture and release of cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(48): p. 19626-31.
108. Ganji, A., A. Varasteh, and M. Sankian, *Aptamers: new arrows to target dendritic cells*. J Drug Target, 2015: p. 1-12.
109. Camorani, S. and L. Cerchia, *Oligonucleotide Aptamers for Glioma Targeting: an Update*. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2015.
110. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-22.
111. Freund, K.B., S. Mrejen, and R. Gallego-Pinazo, *An update on the pharmacotherapy of neovascular age-related macular degeneration*. Expert Opin Pharmacother, 2013. **14**(8): p. 1017-28.
112. Gold, L., et al., *Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15004.
113. Kong, H.Y. and J. Byun, *Nucleic Acid aptamers: new methods for selection, stabilization, and application in biomedical science*. Biomol Ther (Seoul), 2013. **21**(6): p. 423-34.
114. Cai, Y.H. and H. Huang, *Advances in the study of protein-DNA interaction*. Amino Acids, 2012. **43**(3): p. 1141-6.
115. Tang, L., et al., *Targeting Tumor Vasculature with Aptamer-Functionalized Doxorubicin-Polylactide Nanoconjugates for Enhanced Cancer Therapy*. ACS Nano, 2015.
116. Dua, P., et al., *ALPPL2 Aptamer-Mediated Targeted Delivery of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine to Pancreatic Cancer*. Nucleic Acid Ther, 2015.
117. Mathew, A., T. Maekawa, and D. Sakthikumar, *Aptamers in targeted nanotherapy*. Curr Top Med Chem, 2015. **15**(12): p. 1102-14.
118. Guo, K., et al., *Aptamer-based capture molecules as a novel coating strategy to promote cell adhesion*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(3): p. 731-6.
119. Hoffmann, J., et al., *Immobilized DNA-aptamers used as potent attractors for endothelial progenitor cells under flow conditions*. Tissue Engineering, 2006. **12**(4): p. 1007-1008.

120. Soontornworajit, B., P. Srakaew, and P. Naramitpanich, *Aptamer-gelatin composite for a trigger release system mediated by oligonucleotide hybridization*. J Biomater Sci Polym Ed, 2014. **25**(18): p. 2042-52.
121. Eid, K., et al., *Effect of RGD coating on osteocompatibility of PLGA-polymer disks in a rat tibial wound*. J Biomed Mater Res, 2001. **57**(2): p. 224-31.
122. Glass, J., et al., *Cell Attachment and Motility on Materials Modified by Surface-Active Rgd-Containing Peptides*. Biochemical Engineering VIII, 1994. **745**: p. 177-186.
123. Schaffner, P. and M.M. Dard, *Structure and function of RGD peptides involved in bone biology*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003. **60**(1): p. 119-32.
124. Wang, X., D.E. Heath, and S.L. Cooper, *Endothelial cell adhesion and proliferation to PEGylated polymers with covalently linked RGD peptides*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2012. **100**(3): p. 794-801.
125. Su, Y.F., et al., *Osteogenesis and angiogenesis properties of dental pulp cell on novel injectable tricalcium phosphate cement by silica doped*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014. **42**: p. 672-80.
126. Hu, Y., et al., *Porous polymer scaffolds surface-modified with arginine-glycine-aspartic acid enhance bone cell attachment and differentiation in vitro*. J Biomed Mater Res A, 2003. **64**(3): p. 583-90.
127. Massia, S.P. and J.A. Hubbell, *Covalent surface immobilization of Arg-Gly-Asp- and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates*. Anal Biochem, 1990. **187**(2): p. 292-301.
128. Choi, A.H., et al., *Current perspectives: calcium phosphate nanocoatings and nanocomposite coatings in dentistry*. J Dent Res, 2013. **92**(10): p. 853-9.
129. Bitounis, D., et al., *Prospects and challenges of graphene in biomedical applications*. Adv Mater, 2013. **25**(16): p. 2258-68.
130. Das, T.K. and S. Prusty, *Graphene-Based Polymer Composites and Their Applications*. Polymer-Plastics Technology and Engineering, 2013. **52**(4): p. 319-331.
131. Subbiah, R., et al., *Fibronectin-tethered graphene oxide as an artificial matrix for osteogenesis*. Biomedical Materials, 2014. **9**(6).
132. Gittens, R.A., et al., *A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects*. Acta Biomater, 2014. **10**(7): p. 2907-18.
133. Bolley, J., et al., *Carbodiimide versus click chemistry for nanoparticle surface functionalization: a comparative study for the elaboration of multimodal superparamagnetic nanoparticles targeting alphavbeta3 integrins*. Langmuir, 2013. **29**(47): p. 14639-47.
134. Ravi, S., et al., *Maleimide-thiol coupling of a bioactive peptide to an elastin-like protein polymer*. Acta Biomater, 2012. **8**(2): p. 627-35.
135. Zhou, H., J.G. Lawrence, and S.B. Bhaduri, *Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: a review*. Acta Biomater, 2012. **8**(6): p. 1999-2016.
136. Rezanian, A. and K.E. Healy, *Biomimetic peptide surfaces that regulate adhesion, spreading, cytoskeletal organization, and mineralization of the matrix deposited by osteoblast-like cells*. Biotechnology Progress, 1999. **15**(1): p. 19-32.
137. von der Mark, K., et al., *Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 131-53.
138. Yang, X.B., et al., *Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification*. Bone, 2001. **29**(6): p. 523-31.

Literaturverzeichnis

139. Miyachi, Y., et al., *Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy*. Nucleic Acids Research, 2010. **38**(4).
140. Franz, C.M., et al., *Studying integrin-mediated cell adhesion at the single-molecule level using AFM force spectroscopy*. Sci STKE, 2007. **2007**(406): p. pl5.
141. Sun, H. and Y. Zu, *Aptamers and their applications in nanomedicine*. Small, 2015. **11**(20): p. 2352-64.

Erklärung zum Eigenanteil

Die Studie wurde von der Doktorandin Dr. Nina Ardjomandi selbständig in ihrer Tätigkeit als Post-Doc im Labor für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie konzipiert und von der Laborleiterin PD Dr. Dorothea Alexander-Friedrich unterstützt.

Die Doktorarbeit bestand aus 2 Teilprojekten, die sich thematisch an die naturwissenschaftliche Dissertation der Doktorandin anschlossen. In der Tätigkeit als Post-Doc warb die Doktorandin erfolgreich zwei Drittmittelprojekte ein (DfG Nachwuchsakademie Zahnmedizin, Förderung für 12 Monate; Fortüne, Förderung für 18 Monate), durch die Dipl. biol. Annika Henrich und Dipl. biol. Julia Huth im Rahmen einer Anstellung als Wissenschaftler / technische Assistenten mitwirken konnten. Die technische Assistentin Heidi Munz erstellte die Primärkulturen aus dem humanen Kieferperiostgewebe.

Die Versuche bezüglich der RGD- Peptide wurden von Annika Henrich und der Doktorandin durchgeführt; die Versuche bezüglich der Aptamere durch Julia Huth und der Doktorandin.

Die eigentliche Datenrecherche bezüglich der Projekte hat die Doktorandin Dr. Nina Ardjomandi erstellt und wurde durch Fr. Henrich und Fr. Huth ergänzt und erweitert. Die endgültige Auswertung, die Zusammenstellung der Daten und Abbildungen für die Publikationen und die Dissertation erfolgte durch die Doktorandin.

Betreut und korrigiert wurde die Arbeit durch die Laborleiterin PD Dr. Dorothea Alexander-Friedrich und Prof. Dr. Dr. Siegmart Reinert.

Die aus der Arbeit entstandenen Publikationen wurde von der Doktorandin Dr. Nina Ardjomandi selbständig verfasst und durch Fr. PD Dr. Dorothea Alexander und Prof. Dr. Dr. Siegmart Reinert korrigiert.

Im Rahmen der Arbeit entstandene Publikationen:

„Ardjomandi, N, Henrich, A, Huth J, Klein C, Schweizer E, Rupp F, Reinert, S, Alexander D. **Coating of β -tricalcium phosphate scaffolds – a comparison between graphene oxide and poly-lactic-co-glycolic acid.** Biomed Mater. 2015 Aug 4;10(4):045018. doi: 10.1088/1748-6041/10/4/045018.“

Ardjomandi N, Huth J, Stamov D, Henrich A, Klein C, Wendel HP, Reinert S, Alexander D. **Surface Biofunctionalization of β -TCP Blocks using Aptamer 74 for Bone Tissue Engineering.** Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2016 Oct 1;67:267-75. doi: 10.1016/j.msec.2016.05.002. Epub 2016 May 13.

Danksagung

Mein größter Dank geht an den ärztlichen Direktor der Klinik- und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie - Herrn Prof. Dr. Dr. Siegm. Reinert, der mir das Medizinstudium ermöglichte, zusätzlich die Möglichkeit gab, als Wissenschaftler in seinem Labor tätig zu sein, Untersuchungen durchzuführen, Drittmittel dafür einzuwerben und meine naturwissenschaftliche- und medizinische Dissertation dort zu schreiben. Er unterstützte und förderte mich sehr sowohl in meiner Position im Labor als auch im Medizinstudium, hat immer an mich geglaubt und stand mir jederzeit in sämtlichen Belangen mit Rat und Tat zur Seite.

Mein großer Dank gilt PD. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich, die es mir ermöglichte, in diesem Labor zu arbeiten, meine Dissertation durchzuführen und die mich in jeder Hinsicht bei Drittmittelinwerbungen, Publikationen und methodischen Fragen unterstützte.

Ein besonderer Dank gilt auch Dipl. biol. Annika Henrich, die das DfG-geförderte Nachwuchsakademie Zahnmedizin- Projekt mit der Thematik der RGD-Peptidbeschichtung bearbeitete. Mit ihrer sehr präzisen, wissenschaftlichen- und zielstrebigem Arbeitsweise hat sie äußerst vorbildlich im Projekt mitgearbeitet, hat es maßgeblich vorangetrieben und hat darüber hinaus mit ihrer lebensfrohen, erfrischenden Art für eine gute Atmosphäre im Labor gesorgt.

Weiterhin möchte ich Dipl. biol. Julia Huth danken, die das fortüne- geförderte Aptamerprojekt bearbeitete. Mit ihrem technischen Verständnis und mit ihrem analytischen Denken bereicherte sie die Arbeitsgruppe und trieb das Projekt maßgeblich voran, entwickelte es weiter und etablierte Methoden. Mit großem Elan und überdurchschnittlichem, vorbildlichem Einsatz arbeitete sie sich in die Rasterkraftanalysen ein und führte sie durch.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Christian Klein bedanken, der in seiner Freizeit in vielen Arbeitsstunden in der Dunkelkammer mit mir gemeinsam fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht hat. Er hat mir nicht nur bei jedem

Danksagung

EDV-technischen Notfall sofort zur Seite stand und mich softwaretechnisch stets auf den neuesten Stand gebracht, sondern mir auch immer wieder auf das Neue zu einem strahlenden Lächeln verholfen.

Bei Melanie Rieger möchte ich mich für die vorbildliche Labororganisation, ihre sehr gute und präzise Arbeitsweise, ihre Hilfsbereitschaft und die gute Stimmung, für die sie gesorgt hat, bedanken. Darüber hinaus hatte sie stets ein offenes Ohr für meine privaten und laborbezogenen Belange die mir sehr weitergeholfen haben.

Adelheid Munz danke ich dafür, dass sie mich mit Zellmaterial versorgte und mir in Sachen Labormanagement und Literaturbeschaffung stets weiterhelfen konnte.

Herrn PD. Dr. Wendel danke ich für das Know-how, die Beratung und die stets sehr wertvollen Denkanstöße für mein Aptamerprojekt und in Drittmittelangelegenheiten. Danke auch dafür, dass ich zu jeder Zeit mit einer Selbstverständlichkeit die Ressourcen der THG-Chirurgie für meine Projekte nutzen durfte.

Ernst Schweizer aus der AG Werkstoffkunde in der Zahnklinik möchte ich ganz herzlich danken für seine Hilfsbereitschaft und die vielen Stunden die er mir und dem Rasterelektronenmikroskop jederzeit mit großer Geduld und großem Enthusiasmus geopfert hat.

Dr. Frank Rupp und Dr. Lutz Scheideler möchte ich herzlich dafür danken, dass sie uns die Kontaktwinkelanalysen ermöglichten, jederzeit sehr kooperativ waren und uns sehr unterstützt haben mit ihren Ideen und Vorschlägen

PD. Dr. Hubert Kalbacher und Dr. Andreas Maurer aus der AG Kalbacher danke ich ganz herzlich für die Unterstützung bei sämtlichen biochemischen Fragestellungen und für die Begeisterung für unsere Projekte.

Ein großer Dank gilt meiner Freundin Miriam Thierer, die mir stets mit seelischer und moralischer Unterstützung beistand, stets eine perfekte Begleitung auf Reisen und Zuhause war und in großer Not meine Softwareprobleme beseitigte. Ebenso möchte

Danksagung

ich mich bei Ana Pohlmann, Sarah Friedrich und Stefan Kinzy für das stets offene Ohr in allen Belangen und die schöne gemeinsame Zeit miteinander bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinem Freund Rainer Berger, der mich in der Endphase sehr unterstützt hat, immer Verständnis dafür hatte, wenn ich das Schreiben gemeinsamen Ausflügen vorgezogen habe bzw. mich in Drill- Instructor-Manier dazu verdonnert hat, weiter zu arbeiten, wenn ich doch einmal gern die Freizeit vorgezogen hätte.

Und zuletzt möchte ich mich bei den Allerwichtigsten bedanken - meiner Familie, vor allem meiner Mama, meiner Oma, meinem Bruder Cyrus und meinem Cousin Felix, die immer an mich glaubten und zu jeder Zeit - vor Ort oder auch aus der Ferne - in Gedanken für mich da waren, stets aufmunternde Worte hatten und immer uneingeschränkt zu mir standen und stehen – egal in welcher Situation.