

Einfluss von Maltose-modifizierten Polyethylenimin-Nanopartikeln auf mesenchymale Stammzellen und Osteoblasten

Friedrich Stefan Lautenschläger

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Einfluss von Maltose-modifizierten
Polyethylenimin-Nanopartikeln auf mesenchymale
Stammzellen und Osteoblasten

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität
Gießen

vorgelegt von

Friedrich Stefan Lautenschläger

aus Gießen

Gießen 2016

aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Christian Heiß

Gutachter: Prof. Dr. Katrin S. Lips

Gutachter: Prof. Dr. Klaudia Giehl

Tag der Disputation: 25.4.2017

INHALTSVERZEICHNIS

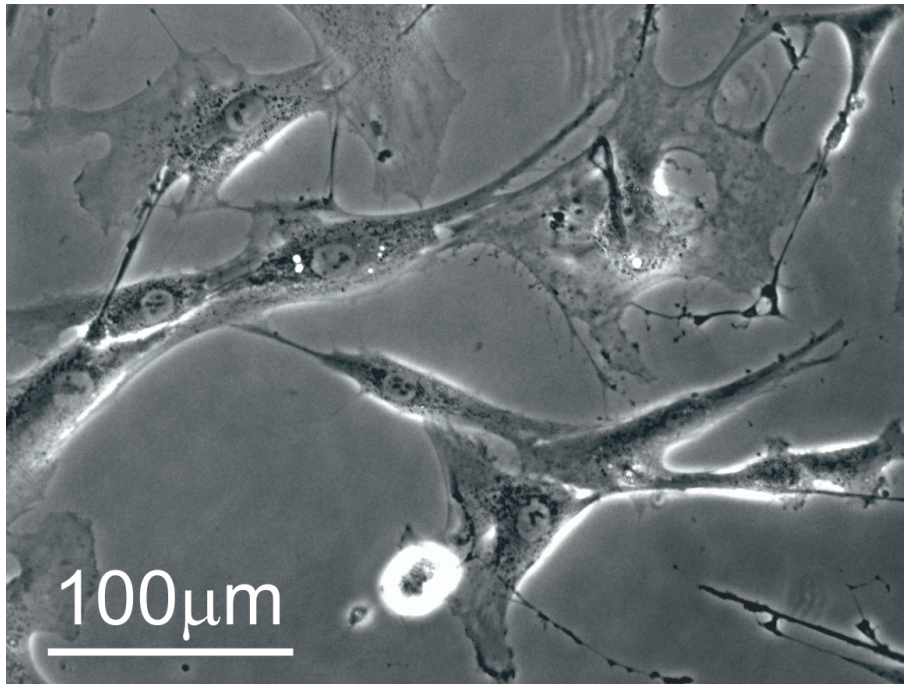
1. EINLEITUNG	1
a. Mesenchymale Stammzellen aus Bohrmehl (rdMSC)	2
b. Osteoblasten sowie osteogene Differenzierung	4
c. Nanopartikel in der Medizin	7
d. Zielsetzung und Fragestellung	10
2. MATERIAL, METHODEN & EXPERIMENTE	11
2.1. Polyethylenimin - Nanopartikel	11
2.2. Mesenchymale-Stamm-Zellkulturen aus Bohrmehl	12
2.3. Durchgeführte Untersuchungen	14
a. Toxizitätsuntersuchungen - Lactat-Dehydrogenase-Assay	14
b. Zellzahl und Proliferationsuntersuchungen - DC-Protein-Assay	16
c. Differenzierung der MSC zu Osteoblasten - Alkalische-Phosphatase-Assay und Von-Kossa-Färbung	18
d. Konventionelle Lichtmikroskopie	21
e. Transmissionselektronenmikroskopie	21
f. Fluoreszenzmikroskopie	23
g. Statistische Methoden	24
3. ERGEBNISSE	25
3.1. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Rhodamin B markierten Nanopartikeln und rdMSC Kulturen, Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen	25
3.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	28

3.3.	Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtungen sowie Einfluss der Nanopartikel auf das Wachstum der rdMSC	33
3.4.	Ergebnisse des Lactat-Dehydrogenase-Assays	43
3.5.	Spenderabhängige Variabilität der LDH Freisetzung	43
3.6.	Osteogene Differenzierung - Resultate des ALP Assays, Quantifizierung der Zellzahl mittels DC Protein Assay sowie Von-Kossa-Färbung und histomorphometrische Auswertung der Mineralisation	46
4.	DISKUSSION	53
4.1.	Diskussion der verwendeten Untersuchungsmethoden	53
4.2.	Endozytose und Verteilung der OM-PEI Nanopartikel	57
4.3.	Toxizität sowie Hemmung des Wachstums durch OM-PEI Nanopartikel	58
4.4.	Differenzierungseigenschaften der rdMSC unter dem Einfluss der OM-PEI Nanopartikel	62
4.5.	Resümee und Ausblick	64
5.	ZUSAMMENFASSUNG	65
6.	SUMMARY	67
	Abbildungsverzeichnis	71
	Tabellenverzeichnis	73
	Literaturverzeichnis	74

1. EINLEITUNG

Die Entwicklung neuartiger Materialien zur effektiveren Behandlung von Erkrankungen des Skelettsystems ist eine der Herausforderungen an Materialwissenschaft und Pharmazie in den nächsten Jahren. Hochkomplexe Interaktionen von Materialien und Zellen des Knochenstoffwechsels müssen hierbei berücksichtigt werden. Zwei beziehungsweise drei wesentliche Zellfamilien spielen im Knochenstoffwechsel eine entscheidende Rolle, die osteogene Zellfamilie, welche sich aus mesenchymalen Stammzellen ableitet und die osteoklastäre Zellfamilie welche, ihren Ursprung im monozytären System hat sowie ebenfalls noch die chondrogene Zellreihe. Mesenchymale Stammzellen sind eine Vorläuferstufe von unterschiedlichen Gewebszellen im menschlichen Körper und vielversprechende Kandidaten für Anwendungen in der regenerativen Medizin. Aus ihnen differenzieren sich zum Beispiel Zellen des Knochen und Knorpels (Caplan 1991, Pittenger et al. 1999), Zellen des Fettstoffwechsels (Caplan 1991, Pittenger et al. 1999) aber auch Zellen des Nervensystems (Wenisch et al. 2005). Für den Knochenaufbau ist primär die osteogene Zelllinie mit ihren multipotenten Progenitorzellen, den mesenchymalen Stammzellen sowie ihren differenzierten Endprodukten Osteoblasten und Osteozyten verantwortlich.

a. Mesenchymale Stammzellen aus Bohrmehl (rdMSC)

**Abbildung 1.1.**

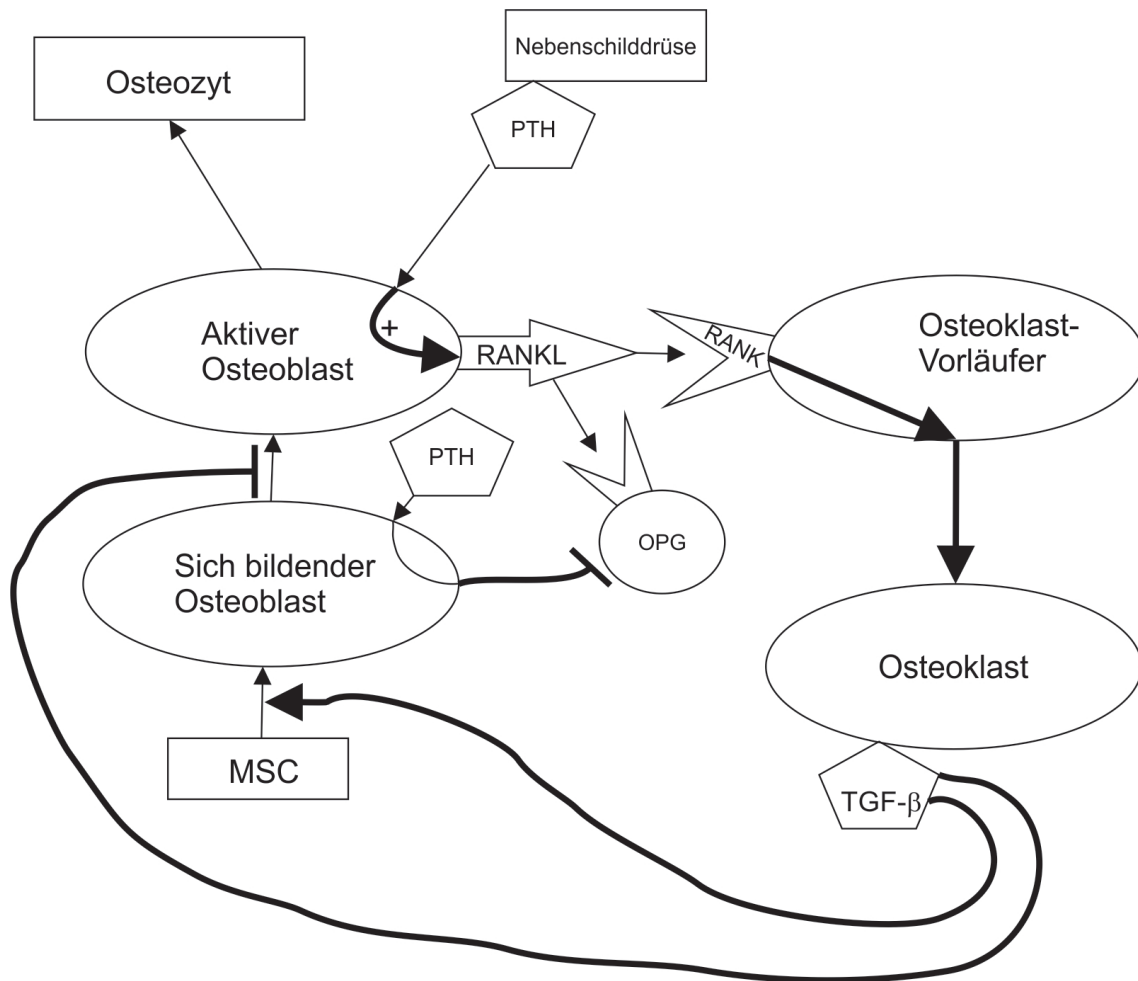
Aus Bohrmehl gewonnene mesenchymale Stammzellkultur. Die charakteristische langgezogene Zellform ist deutlich zu erkennen, die Zellen wachsen adhären auf Kunststoff auf.

Insbesondere Osteoblasten produzieren die mineralisierte Knochenmatrix und bilden damit die tragfähige Struktur des Knochens. Um Wirkungen von Materialien auf die Entwicklung des Knochens zu untersuchen, sind noch vor Experimenten am Tiermodell, Versuche entlang der Reihe osteogener Zellen, beginnend bei den mesenchymalen Stammzellen und ebenfalls bei den Osteoblasten, durchzuführen. Minimal-kriterien um Zellen als mesenchymale Stammzellen charakterisieren zu können, wurden von Dominici et al. vorgeschlagen. MSC sollen Positivität für die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 besitzen, adhären auf Kunststoff anwachsen und sich unter geeigneten Wachstumsbedingungen in Osteoblasten, Chondroblasten oder Adipozyten differenzieren lassen (Dominici et al. 2006). Vitale Stammzellen können entweder direkt embryonal (ESC) gewonnen werden (Caplan 1991) oder aber am adulten Menschen, zum Beispiel aus Knochenmark, isoliert werden (MSC) (Pittenger et al. 1999). Die so gewonnenen humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zeigen im Oberflächenmarkerspektrum keine Hinweise auf charakteristische Marker für lymphopoetische oder hämatopoetische Stammzellen (Caplan 1991). Ferner sind die Zellen lichtmikroskopisch von langgestrecktem, spindelförmigen Aussehen und eher flach (Bruder et al. 1997) (siehe Grafik 1.1). Mesenchymale Stammzellen lassen sich ebenfalls direkt aus Knochenmaterialien, welche bei unfallchirurgischen oder

orthopädischen Operationen anfallen, gewinnen. So gelang es hMSC direkt aus Femurköpfen die bei Implantation einer Totalen-Hüft-Endoprothese entfernt wurden (Tuli et al. 2003) sowie aus Bohrmehl, welches im Rahmen anderer Eingriffe anfiel (Wenisch et al. 2005) zu isolieren. Beim hier verwendeten Bohrmehl handelt es sich um die fest in die größeren Windungen der Bohrwelle gepressten Anteile des Knochens. Auf diese Weise soll sichergestellt werden, dass keine Anteile von kortikalisnaher Spongiosa des Knochens in die Proben mit eingehen (Trinkaus et al. 2005). Das so gewonnene Material besitzt osteoinduktive Eigenschaften (Frölke 2006) und ist Quelle vitaler Zellen (Wenisch et al. 2005, Trinkaus et al. 2005). Mittels geeigneter Inkubation bei 37°C , $5\% \text{CO}_2$ sowie einem Kulturmedium bestehend aus F12K, 10% fetalem Kälberserum, 1% Penicillin und Streptomycin wachsen Zellen aus dem in die Kulturschale eingebrachten Bohrmehl aus. Die auf letztere Weise gewonnenen mesenchymalen Stammzellen werden auch als reaming-debris MSC (rdMSC) bezeichnet. In rdMSC Kulturen existieren ebenfalls noch kleinere Anteile sogenannter RS1 und RS2 Zellen, welche adhärent wachsen oder sich in Suspension befinden, von runder Gestalt (RS1) beziehungsweise spindelförmig (RS2) sind und wenig Zytoplasma besitzen. Vermutlicherweise handelt es sich bei den RS-Zellen ebenfalls um MSC, da sie ebenfalls Differenzierungsfähigkeiten besitzen (Trinkaus et al. 2006b). Trinkaus et al. postulieren, dass es sich bei den RS-Zellen um mitotische Zellen handeln kann (Trinkaus et al. 2005). Mesenchymale Stammzellkulturen aus Bohrmehl weisen einen Anteil von circa $50\% - 75\%$ CD105 beziehungsweise CD73 positiven mesenchymalen Stammzellen auf (Lautenschläger et al. 2015) und eignen sich als realistisches in-vitro Versuchsmodell in der Zellkultur zur Verwendung in einer Vielzahl von Versuchsszenarien (Kokesch-Himmelreich et al. 2013, Pauksch et al. 2014, Lautenschläger et al. 2015, Lorenzetti et al. 2015, Charyeva et al. 2015). Eine osteogene Differenzierung der Stammzellen zu Osteoblasten ist durch Wahl eines geeigneten Kulturmediums möglich (Trinkaus et al. 2006b). Weiterhin sind chondrogene oder adipogene Differenzierungen möglich (Trinkaus et al. 2006a). Eine osteogene Differenzierung zu Osteoblasten kann durch Inkubation in Kulturmedium bestehend aus DMEM low Glucose mit L-Glutamin, $0,1 \mu\text{M}$ Dexamethason, $0,05 \text{mM}$ Ascorbinsäure, sowie 10mM β -Glycerolphosphat erreicht werden (Trinkaus et al. 2005).

Mesenchymale Stammzellen von verschiedenen Spendern besitzen ferner eine donorspezifische Variabilität in der Ausprägung ihrer Eigenschaften (Phinney et al. 1999, Schop et al. 2009). Unterschiede hinsichtlich der Proliferationsraten (Phinney et al. 1999) oder der Reaktion auf Wachstumsinhibitoren (Schop et al. 2009) werden berichtet. Die Verwendung von rdMSC von mehreren Spendern ermöglicht es also, eventuelle spenderabhängige Effekte in der Reaktion der Zellen auf die Versuchsbedingungen zu erkennen.

b. Osteoblasten sowie osteogene Differenzierung

**Abbildung 1.2.**

Modell des Zusammenspiels von Osteoblasten und Osteoklasten, Grafik nach (Lemaire et al. 2004)

Osteoblasten sind die anabol arbeitenden Zellen im Knochenstoffwechsel und sind für den Aufbau des Knochens verantwortlich. Sie stehen in enger Beziehung zu den katabolen Zellen des Knochenstoffwechsels, den Osteoklasten. Im adulten Organismus differenzieren sie sich unter anderem aus mesenchymalen Stammzellen unter dem Einfluß verschiedener Transkriptionsfaktoren (Karsenty 2008, Nakashima et al. 2002). Grafik 1.3 stellt die entsprechende Kaskade der aktivierenden Transkriptionsfaktoren vereinfacht nach Karsenty et al. (Karsenty 2008) dar. Diese Haupteinflussfaktoren (Osterix - *Osx*, Runt-related transcription factor 2 - *Runx2* sowie *SOX-9*) auf die osteogene Differenzierung werden ihrerseits wieder von weiteren Einflussfaktoren gehemmt oder induziert (Karsenty 2008). In-vitro kann eine Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten durch geeignete Kulturmedien induziert werden. Entscheidende Bestandteile hier sind Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM) low glucose, $0,005 \mu\text{M}$ Ascorbinsäure-Phosphat, $0,1 \mu\text{M}$ Dexa-

methason sowie 10mM β -Glycerolphosphat (Trinkaus et al. 2006b, Pittenger et al. 1999, Jaiswal et al. 1997). Ascorbinsäure, beziehungsweise ihr unter Inkubationsbedingungen stabileres Phosphat, ist hierbei für die Bildung von kollagener sowie nicht-kollagener Matrix essentiell (Schwarz 1985, Aronow et al. 1990, Jaiswal et al. 1997). Dexamethason in seiner hier verwendeten Konzentration induziert eine erhöhte Expression von osteoblastären Hormonen wie zum Beispiel Osteocalcin und Osteopontin (Shalhoub et al. 1992). Untersuchungen von Jaiswal et al. (Jaiswal et al. 1997) zeigten, dass nur die Kombination der vorgenannten Substanzen eine osteogene Differenzierung von hMSC zu Osteoblasten verlässlich ermöglicht.

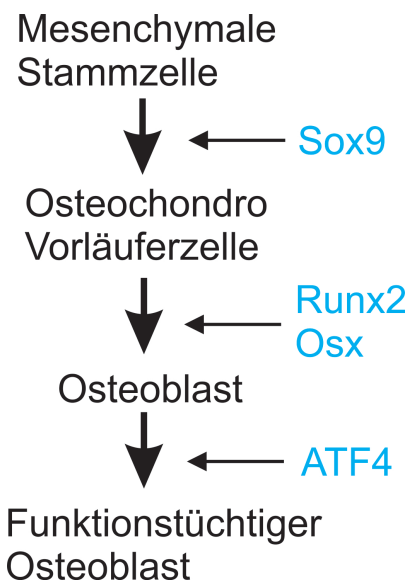


Abbildung 1.3.

Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten. Die wichtigsten Differenzierungsfaktoren sind hier SOX9, Runx2 sowie Osterix (Osx). Die Expression von ATF4 ist für die Funktionalität der Osteoblasten entscheidend. Identifikation der Faktoren und Grafik nach (Karsenty 2008).

Osteoblasten bilden Osteoid, die noch unmineralisierte Vorstufe der organischen Matrix (überwiegend Kollagen Typ I) des Knochens und sind im weiteren Verlauf ebenfalls für die Mineralisierung der organischen Matrix durch Kalziumhydroxylapatit $Ca_5(PO_4)_3OH$ verantwortlich. Sie bilden des Weiteren Alkalische-Phosphatase und exprimieren Osteocalcin (Orimo 2010). Die Alkalische-Phosphatase ist im Knochenstoffwechsel essentiell für die Bildung von extrazellulärer, anorganischer Knochenmatrix. Diese besteht aus Hydroxylapatit $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ und wird letztendlich unter Verwendung von durch die Alkalische-Phosphatase bereitgestelltem anorganischen Phosphat, in den von Osteoblasten abgeschnürten Matrixvesikeln gebildet.

Hierzu wird zuerst in diesen Matrixvesikeln solange $CaPO_4$ gebildet bis der Löslichkeitspunkt überschritten ist und solides Mineral ausfällt. Dieses wird aus dem Matrixvesikel heraus transportiert und im Extrazellularraum entsprechend weiter zu Hydroxylapatit kristallisiert. Das hierfür nötige Phosphat stellt die Alkalische-Phosphatase bereit (Orimo 2010). Im Mineralisationsprozess herrscht ein Gleichgewicht zwischen Pyrophosphaten (PPI), welche die Bildung von Hydroxylapatit hemmen, sowie anorganischem Phosphat, welches für seine Bildung nötig ist. Die Alkalische-Phosphatase hydrolisiert PPI zu anorganischem Phosphat und steigert so die Bildung von anorganischer Knochenmatrix. Die alkalische Phosphatase kommt

in vier Subtypen vor. Im Knochenstoffwechsel ist die gewebsspezifische ALP, welche unter anderem in Leber und Niere, aber auch im Knochen zu finden ist, aktiv. Sie ist ein membranständiges Enzym, sowohl im Osteoblasten als auch in den von den Osteoblasten abgeschnürten Matrixvesikeln (Orimo 2010). Der Nachweis des Vorhandenseins von Osteoblasten gelingt unter anderem durch Nachweis der Alkalischen-Phosphatase mittels eines quantitativen Assays, immunhistochemischer Färbung von Osteocalcin exprimierenden Zellen oder der Anfärbung der gebildeten mineralisierten Matrix mittels zum Beispiel der Von-Kossa-Färbung (Trinkaus et al. 2006b).

c. Nanopartikel in der Medizin

Neuartige Materialien wie zum Beispiel Nanopartikel eröffnen eine Vielzahl von Möglichkeiten im Bereich der Medizin. Nanopartikel sind eine heterogene Gruppe verschiedener Materialsysteme. Organische sowie anorganische Strukturen wurden als mögliche Kandidaten für einen Einsatz in der Medizin evaluiert. Hauptziele der Verwendung von nanopartikulären Systemen sind eine bessere Verfügbarkeit der Wirkstoffe am Wirkort, Schutz vor vorzeitigem Abbau, Einschleusen von Wirkstoffen, Botenstoffen oder Nukleinsäurefragmenten in die Zelle oder aber eine direkte Wirkung der Nanopartikel. Einige der Strukturen sind bereits im klinischen Alltag in Verwendung. So werden Polyethylenglycolmodifikationen (PEG) für die Umhüllung von Wirkstoffen wie zum Beispiel Interferon- α (Flink et al. 2006) (Therapie einer Hepatitis C), L-Asparaginase (Alconcel et al. 2011) (Therapie einer akuten lymphatischen Leukämie) oder Granulozyten-Colony-stimuliertendem-Faktor (G-CSF) (Musto et al. 2007) (Behandlung einer Neutropenie) eingesetzt. Die PEGylierung verhindert einen vorzeitigen Abbau der Wirkstoffe. Liposomale Carriersysteme sind in der Lage, hydrophile Wirkstoffe zu umkapseln und durch Zellmembranen zu transportieren, eine potentielle Toxizität der umkapselten Wirkstoffe soll gemindert werden. Liposomal umkapseltes Amphotericin B wird bei Pilzinfektionen eingesetzt und besitzt in dieser Form eine verminderte Nephrotoxizität (Coukell und Brogden 1998). Im Bereich der anorganischen Nanopartikel sind beispielsweise in der Zahnheilkunde und Implantologie Knochenzemente mit nanopartikulärem Hydroxylapatit im Handel (Ostim und Nanobone) (Strietzel et al. 2007, Abshagen et al. 2009). Des Weiteren sind mittlerweile Zahnpasten mit Hydroxylapatit-Nanopartikeln als aktive Substanzen im Handel, der Nutzen dieser Pasten wird kontrovers diskutiert (Grunau et al.). Im Bereich der Behandlung solider oder hämatologischer maligner Erkrankungen sind zahlreiche weitere, auf Polymer- oder Liposomverbindungen basierende Wirkstoff-Nanopartikel Kombinationen derzeit Gegenstand klinischer und präklinischer Forschung (Wang et al. 2012). Superparamagnetische Nanopartikel werden zur lokalen Induktion von Hyperthermie in Tumorgewebe verwendet (Jordan et al. 1999). Silber-Nanopartikel, als weitere anorganische Vertreter, wurden hinsichtlich ihrer antibakteriellen Eigenschaften in-vitro (Pauksch et al. 2014) sowie in-vivo (Murphy et al. 2015) evaluiert. Die in dieser Arbeit untersuchten Polyethyleniminnanopartikel sind eine Untergruppe der Dendritischen Polymere, ebenfalls aktueller Gegenstand präklinischer Forschung. Dendritische Polymere sind chemische Verbindungen, welche in einer hochverzweigten Struktur vorliegen. Es gibt verschiedene Grundstrukturen aus welchen sich dendritische Polymere aufbauen lassen. Polyamidoamine, Polyamine, Polypeptide, Polyester oder Polyethylenimin sind einige Beispiele hierfür (Lee et al. 2005). Neben den in einem Schritt synthetisierba-

ren dendritischen Polymeren existieren Dendrimere, welche eine höhere Regularität und Ordnung aufweisen. Ihre Synthese ist deutlich komplexer, die Eigenschaften von Dendrimeren und dendritischen Polymeren sind oftmals ähnlich (Zieringer und Haag 2013). Dendritische Polymere eignen sich für eine große Bandbreite an Anwendungen im biomedizinischen Bereich. Die dendritischen Verbindungen lassen sich zum Beispiel als Träger für Pharmaka einsetzen und können hier unter anderem eine bessere Verträglichkeit gewährleisten. Die in-vivo Toxizität im Mausmodell von PAMAM-Platin Komplexen war bei vergleichbarer zytostatischer Wirkung auf den Tumor verglichen mit herkömmlichem Cisplatin verringert (Malik et al. 1999). Weiterhin sind Dendrimere sowie dendritische Moleküle im Bereich der Gentherapie-Forschung von Interesse, sie lassen sich nutzen, um DNA- und si-RNA-Fragmente intrazellulär und intranukleär zu transportieren (Bielinska et al. 1999, Lee et al. 2005, Werth et al. 2006, Fischer et al. 1999, Blessing et al. 2001, Godbey et al. 1999). Einige dendritische Moleküle besitzen ferner intrinsische antivirale und antibakterielle Eigenschaften. Naphthylsulfonat-modifizierte Poly(Lysin) Dendrimere sowie Naphthylsulfonat modifizierte PAMAM Dendrimere inhibieren die Adsorption sowie die Reverse-Transkriptase- und Integrase-Aktivität des HI-Virus (Svenson und Tomalia 2005). Antibakterielle Eigenschaften finden sich beispielsweise bei Alkylammonium-modifizierten PPI Dendrimeren, Wirkmechanismus scheint eine Beschädigung der bakteriellen Membran zu sein (Svenson und Tomalia 2005).

Polyethylenimin-Nanopartikel im Speziellen zeichnen sich, verglichen mit anderen dendritischen Polymeren, durch eine gute Synthetisierbarkeit (Fischer et al. 1999, Appelhans et al. 2009) sowie gute Modifikationsmöglichkeiten (Appelhans et al. 2009, Appelhans et al. 2015, Calarco et al. 2013, Blessing et al. 2001) aus. Ebenfalls besitzen sie hohe Transfektionsraten als non-virale Vektoren für DNA oder si-RNA für den Transport in die Zelle (Höbel et al. 2011). Wirkstoffmoleküle wie beispielsweise Bortezomib (Einsatz beim multiplen Myelom) lassen sich mit ihnen komplexieren und so hinsichtlich ihres Verhaltens nach Applikation modifizieren (Striegler et al. 2015). Leider zeigen unmodifizierte dendritische PEI-Polymere eine in-vitro und in-vivo Toxizität, welche hauptsächlich von positiven Ladungen (Lee et al. 2005, Fischer et al. 1999) sowie einer Interkalation mit der DNA (Godbey et al. 1999) in der Zelle ausgelöst wird. Durch Substitution von kationischen Gruppen durch neutrale Gruppen lässt sich die Toxizität deutlich reduzieren (Appelhans et al. 2009, Appelhans et al. 2015, Höbel et al. 2011). Verschiedene Substituenten wie zum Beispiel Polyglutamatketten (Wen et al. 2009), Oligosachharid-Einheiten beziehungsweise Maltoseketten (Appelhans et al. 2009, Höbel et al. 2011) oder verschiedene weitere Modifikationen (Zintchenko et al. 2008, Qiu und Bae 2007) wurden zur Reduktion der positiven Ladungen der unmodifizierten Polyethyleniminpartikel eingeführt. Allerdings sinkt hierdurch ebenfalls die DNA-Transfektionsrate der Nanopartikel

(Höbel et al. 2011). Durch unterschiedliche Modifikation im Bereich der substituierten Maltoseketten läßt sich der Aufnahmemechanismus der OM-PEI Nanopartikel selektiv steuern. Unmodifizierte PEI Nanopartikel sowie Maltose modifizierte PEI Partikel werden präferentiell über Clathrin medierte Endozytose aufgenommen. Maltotriose modifizierte Partikel hingegen werden über Clathrin unabhängige Endozytose aufgenommen (Höbel et al. 2011). Ferner gelingt eine selektive Aufnahme der modifizierten PEI Moleküle in einzelne Gewebetypen wie zum Beispiel Leber, Niere, Milz und Lunge (Höbel et al. 2011). Während unmodifizierte PEI Partikel zum Großteil im Leber-, Nieren- und Lungengewebe aufgenommen werden, werden Maltose und Maltotriose modifizierte PEI Partikel fast nicht in Leber-, abhängig vom Grad der Substitution und vom Substituenten, aber zum Beispiel präferentiell in Milz- oder Muskelgewebe aufgenommen (Höbel et al. 2011). Die meisten der für Maltose und Maltotriose modifizierten Polyethylenanopartikel existierenden Untersuchungen hinsichtlich ihrer Toxizität nutzen Inkubationszeiträume von nicht mehr als 72 Stunden (Calarco et al. 2013, Wen et al. 2009, Höbel et al. 2011, Florea et al. 2002, Malek et al. 2009). Experimente mit längeren Untersuchungszeiträumen und der Verwendung von rdMSC als Testsubjekte existieren, neben den dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen, nach unserem Wissen nicht.

d. Zielsetzung und Fragestellung

Zielsetzung dieser Arbeit war es die zelluläre Aufnahme und den Einfluss von Maltose-modifizierten Polyethylenanopartikeln auf rdMSC von verschiedenen humanen Donoren, insbesondere im Hinblick auf potentielle toxische oder differenzierungshemmende Effekte, zu untersuchen. Hierbei sollten, wie in der Literatur mit beschriebenen Vorversuchen häufig, nicht nur Untersuchungszeiträume im Bereich von einigen Tagen, sondern bis hin zu vier Wochen untersucht werden. Des Weiteren wurden primäre Zellen von unterschiedlichen Spendern verwendet. Andere in-vitro Untersuchungen nutzen zumeist nur eine Zelllinie, oftmals maligne entarteten Ursprungs, so dass sich Donor-spezifische Varianzen hier nicht untersuchen lassen. Die Ergebnisse sollten sowohl dosisabhängige als auch Nanopartikel-strukturabhängige Effekte aufzeigen. Die Hauptfragestellungen waren folgende:

1. Werden die zwei verschiedenen modifizierten Polyethylenanopartikel in die rdMSC aufgenommen?
2. Sind toxische Effekte vorhanden? Auf welcher mikroskopischen Ebene sind toxische Effekte sichtbar? Sind die Effekte in funktionellen Assays nachweisbar?
3. Existieren Unterschiede im Ansprechen der rdMSC von verschiedenen Spendern auf die Nanopartikel?
4. Nach welcher Inkubationszeit sind die Effekte nachweisbar?
5. Wird die Differenzierung der rdMSC zu Osteoblasten durch die Nanopartikel beeinflusst?
6. Beeinflussen die Nanopartikel die Bildung von Knochenmatrix?

Im Vorfeld zu in-vivo Untersuchungen am Tiermodell ist die Klärung der hier formulierten Fragen essentiell. Insbesondere die Klärung von potentiellen toxischen Effekten sowie erste in-vitro Dosisfindungen von subtoxischen Konzentrationen waren hier vorrangig. Ebenfalls war die Klärung des Einflusses der Nanopartikel auf Differenzierungs- und Knochenbildungseigenschaften der rdMSC ein wichtiger Punkt, um eine Einsetzbarkeit im Umfeld des Knochenstoffwechsels und der Frakturheilung zu prüfen.

Die Experimente und Versuche die dieser Arbeit zu Grunde liegen wurden durch die Ethikkommission des Fachbereichs 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt (AZ:74/09).

2. MATERIAL, METHODEN & EXPERIMENTE

2.1. Polyethylenimin - Nanopartikel

Die von uns eingesetzten modifizierten Polyethylenimin-Nanopartikel (PEI) wurden uns von der Arbeitsgruppe um Dr. Appelhaus, Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden, zur Verfügung gestellt. Prinzipiell bestehen die Partikel aus einem verzweigten Polytethylenimin-Kern sowie einer Maltose-Schale. Hierbei wurden die Maltose-Modifikationen hauptsächlich aufgrund der verringerten Zytotoxizität im Vergleich zu unmodifizierten Nanopartikeln vorgenommen (Höbel et al. 2011, Appelhaus et al. 2009). Wir untersuchten zwei unterschiedliche, Maltose-modifizierte PEI-Nanopartikel. STP2755, hierbei handelt es sich um einen PEI-Kern mit einem Molekulargewicht von $5000 \frac{g}{mol}$, sowie STP2508, welcher aus einem PEI-Kern mit einem Molekulargewicht von $25000 \frac{g}{mol}$ besteht. Die Kern-Partikel sind kommerziell erhältlich (STP2755 - Lupasol WF, STP2508 - Lupasol G100, BASF Ludwigshafen). Die Maltose-Modifikation ist bei beiden Materialien identisch, es werden die terminalen Ketten des PEI-Moleküls, mittels reduktiver Aminierung substituiert (Appelhaus et al. 2009, Appelhaus et al. 2015). Das Verhältnis von verbleibenden Amino-Gruppen des PEI Moleküls und den eingebauten Maltose Molekülen beträgt 2:1. Es verbleiben keine primären Aminogruppen im resultierenden Molekül sondern je nach Substitutionsgrad sekundäre oder tertiäre Aminogruppen. Die positive Ladungsdichte der so hergestellten Maltose-modifizierten-PEI-Nanopartikel ist deutlich geringer als die Ladungsdichte der unmodifizierten PEI-Nanopartikel (Appelhaus et al. 2009, Höbel et al. 2011, Gutsch et al. 2013, Thünemann et al. 2012). Vorgenannte Arbeiten geben die Größe der Nanopartikel mit 4 nm für STP2755 und 14 nm für STP2508 an. Detailliert ist die Herstellung der PEI-Nanopartikel in (Appelhaus et al. 2009) beschrieben, die Gesamt-Molekulargewichte der modifizierten Nanopartikeln ändern sich, nach Maltose-Modifikation, zu circa $18000 \frac{g}{mol}$ für STP2755 sowie $38100 \frac{g}{mol}$ für STP2508. Abbildung 2.1 (aus (Lautenschläger et al. 2015)) zeigt den Aufbau der untersuchten Nanopartikel. Laut Untersuchungen von Thünemann et al. (Thünemann et al. 2012) sind die Nanopartikel über einen pH-Bereich von 1 - 10 sowie im Temperaturbereich zwischen 5°C und 80°C stabil. Unsere eigenen Untersuchungen ergaben, dass die Osmolariät des Zellkulturmediums durch Zugabe der PEI-Nanopartikeln in Konzentrationen bis $1 \frac{mg}{ml}$ nicht beeinflusst wird. Zusätzlich

wurden uns zwei mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B markierte Nanopartikel zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um die Partikel STP2818, welcher vom restlichen Aufbau in etwa STP2755 entsprach, sowie STP2819 welcher ähnlich dem bereits beschriebenen STP2508 war.

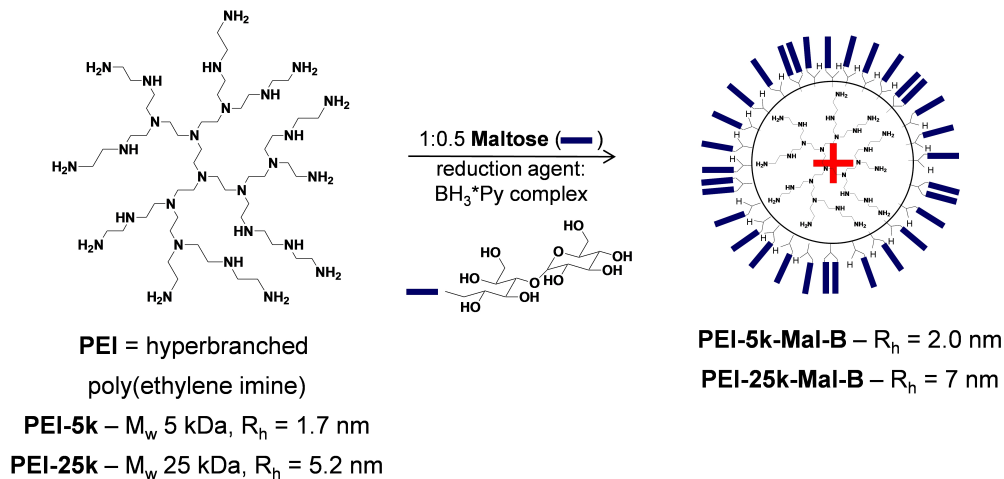


Abbildung 2.1.

Aufbau und Modifikation der eingesetzten OM-PEI-Nanopartikel, Abbildung aus (Lautenschläger et al. 2015)

2.2. Mesenchymale-Stamm-Zellkulturen aus Bohrmehl

Die verwendeten mesenchymalen Stammzellen (rdMSC) wurden aus Bohrmehl, welches bei unfallchirurgischen Eingriffen angefallen ist, gewonnen. Abbildung 2.2 zeigt entsprechendes Bohrmehl, welches unmittelbar nach Entnahme in einer Zellkulturschale weiter kultiviert wurde. Zur Aufzucht der entsprechenden rdMSC Linien orientierten wir uns an den bereits publizierten Vorgehensweisen von Trinkaus et al. (Trinkaus et al. 2005) sowie Wenisch et al. (Wenisch et al. 2005). Die Umgebungsbedingungen im Brutschrank wurden dauerhaft auf 37°C sowie 5% CO_2 Gehalt eingestellt. Als Kulturmedium fand

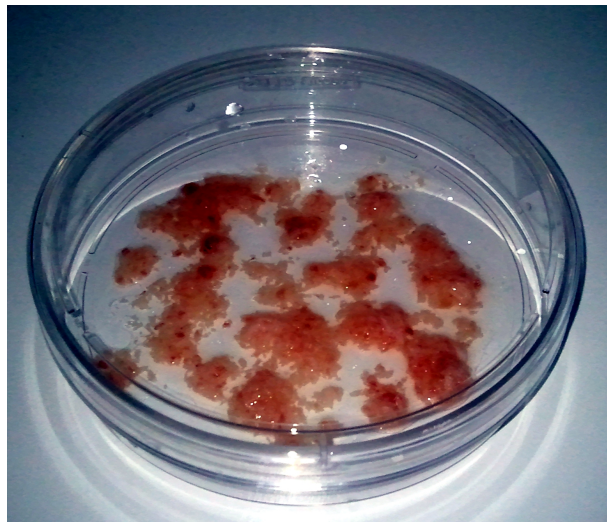


Abbildung 2.2.

Bohrmehl in einer Zellkulturschale direkt nach der Entnahme aus dem menschlichen Knochen

eine Mischung aus F12K (Gibco, Life Technologies), 20% fetalem Kälberserum (FKS) (PAN Sera ES, PAN Biotech) sowie 1% Penicillin + Streptomycin (PS) Verwendung (Trinkaus et al. 2005). Die erwünschten mesenchymalen Stammzellen wuchsen aus dem sich im Bohrmehl befindlichen Knochenmaterial aus und konnten im Verlauf aus der Kulturschale durch Hinzugabe von 0,05% Trypsin (Gibco, Life Technologies) entfernt werden. Nach dem Splitten der Zellen wurde das Trypsin durch FKS inaktiviert sowie die Zellsuspension zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet erneut in frischem Medium gelöst und das Suspensat auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Die weitere Kultivierung erfolgte dann in Zellkulturflaschen (CellStar, Greiner Bio-One GmbH) ebenfalls mit oben genanntem Medium. In Vorbereitung auf die folgenden Experimente wurden die Zellkulturen, wenn ca. 80% Konfluenz erreicht ist, erneut passagiert. Im Durchschnitt erreichten die Zellkulturen diesen Zustand nach 14 - 21 Tagen. Das Nährmedium wurde alle fünf - sieben Tage gewechselt. Zur späteren Verwendung wurden ebenfalls direkt aus der Zellkulturschale gewonnene Zellen (Passage 1) in geeignetem Medium bei $< 77\text{ K}$ eingefroren. Entsprechend wieder aufgetaute Zellkulturen wurden vor dem Einsatz im Experiment mindestens zweimalig, jedoch höchstens dreimalig passagiert. Dies führte dazu, dass sämtliche ZKs die in dieser Arbeit eingesetzt wurden eine Passagezahl ≤ 5 hatten. Die Zell-Oberflächenmarker CD73 und CD105 wurden in der Literatur als Marker für mesenchymale Stammzellen beschrieben (Hung et al. 2002, Delorme et al. 2008). Der Stammzellanteil in unseren rdMSC Kulturen betrug laut durchflusszytometrischen Untersuchungen zwischen 45% und 76%. Es wurde eine Positivität für die Oberflächenmarker CD73 und CD105 als Stammzell-Identifizierungsmerkmal verwendet (Delorme et al. 2008). Für zwei der vier eingesetzten Zellkulturen waren hierzu Daten vorhanden. Für die Versuche die dieser Arbeit zugrunde liegen wurden Zellkulturen von vier männlichen Spendern eingesetzt. Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die verwendeten Zellkulturen.

Tabelle 2.1.: Übersicht der verwendeten Zellkulturen

ID	Geschlecht des Spenders	Geburtsjahr	Verletzung	Bekannte Vorerkrankungen	CD73 und CD105
ZK46	männlich	1981	Pseudarthrose Unterschenkel li.	keine	-
ZK47	männlich	1948	Pseudarthrose Schenkelhals	keine	46%
ZK51	männlich	1967	subtrochantäre Femurfraktur li.	infantiler hypoxischer Hirnschaden	45%
ZK67	männlich	1952	Femurschaftfraktur li.	Diabetes, Hyperlipoproteinämie, Epilepsie, KHK, paVK	-

Bei Erreichen der entsprechenden Passage und Konfluenz wurden die Zellen jeweils in Konzentrationen von $10000 \frac{1}{\text{cm}^2}$ in 24-Well- Zellkulturplatten (Falcon Multiwell, Becton Dickinson) oder Chamber-Slides (Lab-Tek Chamber Slide, Nunc) ausgesät. Die Zellzahl wurde automatisiert mittels eines Casy TT (Roche-Innovatis) bestimmt. Der Casy TT basiert auf dem Coulter-Prinzip, einem durchflusszytometrischen Verfahren. Hierbei verursachen die Zellen eine Widerstandsänderung innerhalb einer Messkammer welche proportional zur Zellgröße ist (DeBlois und Bean 1970). Die einzelnen Widerstandsänderungen werden dann hinsichtlich ihrer Häufigkeit sowie Größe ausgewertet. So wird Zellzahl sowie Zellgröße bestimmt. Für sämtliche Arbeiten kamen sterile Materialien und Substanzen bzw. steril filtrierte Substanzen zur Anwendung. Einzig die Nanopartikel ließen sich vor Verwendung nicht steril filtrieren. Offene Arbeiten wie beispielsweise Mediumwechsel, wurden ausschließlich unter einer Laminar-Flow-Box durchgeführt.

2.3. Durchgeführte Untersuchungen

Zur Klärung der jeweiligen spezifischen Fragestellungen wurden bildgebende Techniken, wie konventionelle Lichtmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie sowie Transmissionselektronenmikroskopie verwendet, außerdem kamen verschiedene funktionelle Assays zur Anwendung. Eventuelle toxische Effekte wurden mittels des Lactat-Dehydrogenase-Assays (LDH-Assay) und Einflüsse auf die Zellzahl bzw. die Proliferation mittels des DC-Protein-Assays untersucht. Die Konzentration der Alkalischen Phosphatase (ALP) wurde im Hinblick auf die osteogene Differenzierung der MSC hin zu Osteoblasten mittels des ALP-Assays betrachtet. Spezialfärbungen (Von-Kossa und Fluoreszenzfärbungen) wurden für einige Experimente ebenfalls angefertigt.

a. Toxizitätsuntersuchungen - Lactat-Dehydrogenase-Assay

Zellschäden können mittels verschiedener Methoden sichtbar gemacht werden. Der hier verwendete CytoTox96 Assay (Promega, USA) erlaubt es die Konzentration des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) quantitativ zu bestimmen. Diese ist prinzipiell ein intrazellulär, zytosolisch vorliegendes Enzym. In unserem Fall bedeutete dies, dass LDH bei intakten Zellen nur in geringen Mengen im Kulturmedium nachweisbar sein soll. Für den Fall, dass Zellschäden, insbesondere im Bereich der Zellmembran, auftreten, wird die Konzentration der LDH im Medium zunehmen. Das Funktionsprinzip des CytoTox96- Assays (Promega) beruht auf einer Reduktion von $NAD^+ + \text{Laktat} \rightarrow \text{Pyruvat} + NADH$.

Diese Reaktion wird durch die LDH katalysiert. In einem zweiten Schritt erfolgt nun folgende Reaktion:



INT bezeichnet hier 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium, ein Tetrazolium-Salz welches zu Formazan, einem roten Farbstoff, reduziert wird (siehe Abbildung 2.3).

Die Absorption kann im Spektrometer oder im Elisa-Reader bei 490 nm gemessen werden, sie ist über einen weiten Bereich hin linear zur LDH-Konzentration in der Probe. Neben dem Nachweises der LDH im asservierten Medium ist es ebenfalls möglich, die LDH-Aktivität in Zellysaten zu bestimmen. Hierzu werden die Zellen entweder osmotisch, zum Beispiel mittels Triton-X100 (Merck, Darmstadt) oder aber durch Gefrieren bei -80 °C und Auftauen, gegebenenfalls auch durch eine Kombination beider Möglichkeiten, lysiert. Dieses Vorgehen ermöglicht bei intakten Zellen, eine zur Zellzahlbestimmung nötige intrazelluläre LDH-Menge zu bestimmen. Im Falle der Zytotoxizitätsuntersuchung ist es ebenfalls nötig zusätzlich zur LDH-Aktivität im Medium den intrazellulären LDH-Gehalt zu bestimmen, um einen für das Bilden des Quotienten nötigen Gesamt-LDH-Gehalt ermitteln zu können.

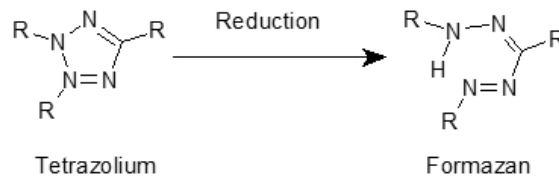


Abbildung 2.3.

Reduktion von INT zu Formazan, dem aktiven Farbstoff im CytoTox96 Assay, Abbildung Public Domain (Vickers 2008)

Entsprechend des von Promega für den CytoTox96 zur Verfügung gestellten Protokolls (Promega) wurde für unsere Zytotoxizitätsuntersuchungen wie folgt verfahren:

1. Aussähen der Zellen in 24 Well Platten, 24 Stunden (h) inkubieren in Standardmedium
2. Ansetzen des Zellkulturmediums: Mischen der Nanopartikel STP2508 sowie STP2755 in Konzentrationen von $1 \frac{mg}{ml}$ und $50 \frac{\mu g}{ml}$ mit dem vorbereiteten Medium. Zugabe von jeweils 1 ml Medium pro Well, jeweils 2 Wells werden auf gleiche Art und Weise behandelt
3. Endpunkte: 24 h und 72 h
4. Beim Erreichen der Endpunkte: Lichtmikroskopisches fotografieren der Wells, entfernen des Mediums, 2 x waschen der Wells mit 10% PBS Lösung
5. Einfrieren der Well-Platten bei -80 °C für mindestens 24 h

6. Auftauen der Well-Platen auf Eis, Zugabe von 1 ml 1% Triton-X Lösung, lysieren der Zellen
7. Nach 30 Minuten, Überführen der Lysate in 1,5 ml Epis, anschließend zentrifugieren bei 1800 g
8. Pipetieren von je 50 μl des Überstandes sowie von Positivkontrolle und Blank/Negativ-Kontrolle in ein Well einer 96-Well-Platte, Zugabe von 50 μl reconstituted Substrate Mix
9. Unter Lichtabschluß 30 Minuten inkubieren bei Raumtemperatur
10. 50 μl Stop-Lösung zu jedem Well hinzufügen, anschließend Absorption bei 490 nm im Elisa-Reader messen

Um eine Aussage über das Ausmaß einer Zellschädigung zu treffen wurde der Quotient aus LDH im Medium und Gesamt-LDH gebildet. Die Gesamt-LDH wiederum setzt sich aus der LDH im Medium addiert mit der LDH im Zelllysat zusammen.

$$\text{Zellschädigung} = \frac{LDH_{\text{Medium}}}{LDH_{\text{Medium}} + LDH_{\text{Zelllysat}}}$$

b. Zellzahl und Proliferationsuntersuchungen - DC-Protein-Assay

Um die Proliferation einer definierten ausgesähten Menge an Zellen, in unserem Falle 10000 $\frac{1}{\text{cm}^2}$, zu untersuchen ist es nötig die Zellzahl jeweils zum gewählten Endpunkt bestimmen zu können. Prinzipiell gibt es verschiedene funktionelle Assays die in der Lage sind diese Anforderung zu erfüllen. Zum einen erfüllen Nachweismethoden für doppelsträngige DNA (dsDNA), wie beispielsweise der Picogreen-Assay diese Aufgabe. Da die von uns verwendeten Nanopartikel ebenfalls an dsDNA binden, ist ein Einsatz des Picogreen-Assays nicht möglich. Eine andere Methode, die verwendet werden kann, ist die Bestimmung des Gesamt-Proteins (Oyama und Eagle 1956) in einer Zelle, dies wird in unserem Falle durch den DC-Protein-Assay erreicht. Beide Assays basieren auf einer colorimetrischen Methode, also einer bestimmten Färbung und daraus resultierenden Absorption in einem dedizierten Spektralbereich. Der DC-Protein-Assay (BIO-RAD, Hercules California, USA) verwendet ein, dem von Lowry et al. bereits 1951 (Lowry et al. 1951) publizierten Verfahren zur Proteinbestimmung, ähnliches Verfahren. Endpunkt ist die Reduktion von Molybdato-phosphorsäure bzw. Wolframatophosphorsäure zu Farbstoffen mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm. Die Säuren werden durch Cu(I) reduziert. Cu(I) wird durch vorherige Reduktion aus Cu(II), welches als Kupfer-Tartat (Salz der Weinsäure) vorliegt und seiner Bindung an das nachzuweisende Protein erhalten. 90% des Absorptionsmaximums

des Prozesses sind bei diesem Verfahren bereits nach 15 Minuten erreicht, Innerhalb einer weiteren Stunde schwankt die Absorption lediglich um 5%. Wir haben die Messungen der Absorption bei 750 nm nach 30 minütiger Wartezeit im ELISA-Reader vorgenommen. Der Assay wurde entsprechend folgendem Protokoll durchgeführt (BIO-RAD).

1. Aussähen der Zellen in 24 Well Platten, 24 h inkubieren in Standardmedium
2. Mischen der Nanopartikel STP2508 sowie STP2755 in Konzentrationen von $1 \frac{mg}{ml}$ und $50 \frac{\mu g}{ml}$ mit dem unmodifizierten Medium. Zugabe von jeweils 1 ml Medium pro Well, jeweils 2 Wells werden auf gleiche Art und Weise behandelt, Kontrollen mit unmodifiziertem Medium werden ebenfalls inkubiert
3. Endpunkte: 7 Tage, 21 Tage und 28 Tage
4. Wechsel des Mediums: Alle 5 Tage
5. Alle 5 - 7 Tage sowie beim Erreichen der Endpunkte: Lichtmikroskopische Kontrolle bzw. Lichtmikroskopisches Fotografieren der Wells, Entfernen des Mediums
6. Beim Erreichen des Endpunktes: Entfernen des Mediums, 2 x Waschen der Wells mit 10% PBS Lösung
7. Zugabe von $250 \mu l$ 1% Triton-X Lösung, lysieren der Zellen für 30 Minuten
8. Nach 30 Minuten, Überführen der Lysate in 1,5 ml Epis, anschließend zentrifugieren bei 1800 g
9. Pipetieren von je $10 \mu l$ des Überstandes sowie von Positivkontrolle und Blank/Negativ-Kontrolle in ein Well einer 96-Well-Platte, Zugabe von $25 \mu l$ Reagenz A', Zugabe von $200 \mu l$ Reagenz B
10. 5 Sekunden schütteln im Reader, 15 Minuten inkubieren bei Raumtemperatur ohne Licht
11. Anschließend Absorption bei 750 nm im Elisa-Reader messen

Zur Umrechnung der Absorptionswerte in Zellzahlen wurden Standard-Eich-Geraden für alle verwendeten ZK-Linien erstellt, gemäß der Formel

$$Absorption = m * Zellzahl + b$$

Die Werte für Steigung und Achsenabschnitt für die verschiedenen Zellkultur-Linien finden sich in der folgenden Tabelle 2.2.

Tabelle 2.2.: Parameter der Eichgeraden zur Zellzahlbestimmung

Zellkultur	Steigung m	Achsenabschnitt b
ZK46	$1,31 \times 10^{-6}$	$-7,39 \times 10^{-4}$
ZK47	$1,62 \times 10^{-6}$	$6,73 \times 10^{-3}$
ZK51	$1,15 \times 10^{-6}$	$-2,23 \times 10^{-3}$
ZK67	$1,25 \times 10^{-6}$	$8,36 \times 10^{-3}$

c. Differenzierung der MSC zu Osteoblasten -

Alkalische-Phosphatase-Assay und Von-Kossa-Färbung

Eine osteogene Differenzierung der hier verwendeten MSC- Linien sollte zur Untersuchung eines potentiellen Einflusses der Nanopartikel auf die Differenzierungsmöglichkeiten unserer rdMSC erfolgen. Um eine osteogene Differenzierung der Zellen zu Osteoblasten zu erreichen, wurden die Zellen zuerst wie oben beschrieben kultiviert. Nach dem Aussähen der rdMSC in 24 Well Platten in einer Konzentration von $10000 \frac{1}{cm^2}$ und einer eintägigen Anwachsphase wurde das Kulturmedium gewechselt. Die Differenzierung wurde erreicht, indem die Zellen in Medium bestehend aus Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM) low glucose (Gibco, Life Technologies), $0,005 \mu M$ Ascorbinsäure, $0,1 \mu M$ Dexamethason, $10mM$ β -Glycerolphosphat, 10% FKS sowie 1% PS inkubiert wurden (Trinkaus et al. 2006b). Das Medium wurde im Verlauf der Experimente alle 5 Tage gewechselt. Die externen Wachstumsbedingungen ($37^\circ C$, 5% CO) wurden nicht verändert. Die Experimente wurden mit Endpunkten von 7, 21 und 28 Tagen durchgeführt. Die entsprechende Methodik zur osteogenen Differenzierung wurde ebenfalls detailliert von Trinkaus et al. (Trinkaus et al. 2006b) beschrieben.

Alkalische-Phosphatase-Assay

Die Alkalische-Phosphatase ist eines der Hauptstoffwechsellzyme des Knochenstoffwechsels. Ihre Konzentration in der Zelle ist in osteogen differenzierten Zellen deutlich höher als in nicht differenzierten mesenchymalen Stammzellen. Zum Nachweis der Alkalischen-Phosphatase wurde der Sensolyte pnPP ALP-Assay (AnaSpec, Fremont, USA) eingesetzt. Dieser funktionelle Assay beruht auf Umsetzung des Substrates Para-Nitrophenylphosphat (pnPP) zu p-Nitrophenol (pNP). Die Reaktion wird durch eine Phosphatase katalysiert und dient hier zum Nachweis der

Alkalischen-Phosphatase in Zell-Lysaten.



Die Lösung wird durch das entstehende pnP gelb gefärbt, die Absorption kann bei 405nm im ELISA Reader gemessen werden und ist über einen weiten Wertebereich linear zur ALP Konzentration im Lysat.

Der pnPP- ALP- Assay wurde entsprechend des folgenden Protokolls durchgeführt:

1. Aussähen der Zellen in 24 Well Platten, 24 h inkubieren in Standardmedium
2. Mischen der Nanopartikel STP2508 sowie STP2755 in Konzentrationen von $1 \frac{\mu g}{ml}$, $20 \frac{\mu g}{ml}$ und $50 \frac{\mu g}{ml}$ mit osteogenem Medium. Zugabe von jeweils 1 ml Medium pro Well, jeweils 2 Wells werden auf gleiche Art und Weise behandelt, Kontrollen mit unmodifiziertem osteogenen Medium werden ebenfalls inkubiert
3. Endpunkte: 7 Tage, 21 Tage und 28 Tage
4. Wechsel des Mediums: Alle 5 Tage
5. Alle 5 - 7 Tage sowie beim Erreichen der Endpunkte: Lichtmikroskopische Kontrolle bzw. Lichtmikroskopisches Fotografieren der Wells, Entfernen des Mediums
6. Beim Erreichen des Endpunktes: Entfernen des Mediums, 2 x Waschen der Wells mit 10% PBS Lösung
7. Zugabe von 250 μl 1% Triton-X Lösung, Lysieren der Zellen für 30 Minuten
8. Nach 30 Minuten, Überführen der Lysate in 1,5 ml Epis, anschließend zentrifugieren bei 3000g und 4 °C
9. Jeweils 40 μl Dilution Buffer (nach Protokoll) in eine 96-Well Platte vorlegen.
10. Pipetieren von je 10 μl des Überstandes sowie von Positivkontrolle und Blank/Negativ-Kontrolle in ein vorbereitetes Well einer 96-Well-Platte
11. Jeweils 50 μl pnPP - Substrat hinzugeben
12. 5 Sekunden schütteln im Reader, 45 Minuten inkubieren bei 37 °C, ohne Licht
13. Anschließend Absorption bei 405 nm im Elisa-Reader messen

Von-Kossa-Färbung

Das von Von-Kossa 1901 (Kossa 1901) erstmals beschriebene Prinzip der nach ihm benannten Färbemethode beruht auf einer Bindung von Silberionen an Phosphate in der Knochenmatrix und einer anschließenden Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber. Dieses elementare Silber stellt sich im Lichtmikroskop schwarz dar und ermöglicht so eine Identifikation von produzierter Knochenmatrix. Aktuelle Ansätze folgen zum Beispiel der von Clark 1981 (Clark 1981) beschriebenen Methodik. Zur statistischen Evaluierung eines möglichen Effektes der Nanopartikel wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Aussähen der MSC in Chamber-Slides mit einer Dichte von $10000 \frac{1}{cm^2}$, 24 h inkubieren in Standardmedium
2. Mischen der Nanopartikel STP2508 sowie STP2755 in Konzentrationen von $1 \frac{\mu g}{ml}$, $20 \frac{\mu g}{ml}$ und $50 \frac{\mu g}{ml}$ mit osteogenem Medium. Zugabe von jeweils 1 ml Medium pro Well, jeweils 2 Wells werden auf gleiche Art und Weise behandelt, Kontrollen mit unmodifiziertem osteogenen Medium werden ebenfalls inkubiert
3. Endpunkt 21 Tage
4. Wechsel des Mediums: Alle 5 Tage
5. Alle 5 - 7 Tage sowie beim Erreichen der Endpunkte: Lichtmikroskopische Kontrolle bzw. Lichtmikroskopisches Fotografieren der Wells, Entfernen des Mediums
6. Beim Erreichen des Endpunktes: Entfernen des Mediums, mehrmaliges Waschen der Wells mit 10% PBS Lösung bei $4^\circ C$
7. Zugabe von 2% PFA für eine Dauer von 10 Minuten zur Fixierung
8. Mehrmaliges Waschen mit sterilem Wasser
9. Nach Zugabe von 5% Silbernitratlösung für 60 Minuten lichtgeschützt inkubieren
10. Erneutes Waschen
11. Ausfällung des elementaren Silbers durch Zugabe von 5% Natriumcarbonatlösung, erneutes lichtgeschütztes Inkubieren für 7 Minuten
12. Mehrmaliges Waschen mit sterilem Wasser, Färbung mit Kernechtrot sowie Abdeckung der Präparate mit Glyceringelantine

Die statistische, histomorphometrische Auswertung erfolgte semi-automatisch mittels des frei verfügbaren Programms Image-J (Egan et al. 2012). Für jedes Präparat wurden fünf Bereiche mit den Kantenlängen $1,1\text{ mm} \times 1,5\text{ mm}$ ausgewählt. Nach Konvertierung der Bilder ins schwarz-weiß Format wurde der Detektionsschwellenwert eingestellt und die Von-Kossa gefärbte Fläche jeweils ausgewertet. Die gewonnenen Daten wurden auf Werte von rein osteogenen, ohne Nanopartikel inkubierten, Zellen normiert. Die statistische Auswertung erfolgt mittels SPSS V.21.

d. Konventionelle Lichtmikroskopie

Die konventionelle Lichtmikroskopie wurde mittels eines Leica 090-135.002 Lichtmikroskopes mit integrierter Nikon-DS-Fi1 Kamera durchgeführt. Es standen Objektive mit 4-, 10-, 20- sowie 40-facher Vergrößerung zur Verfügung. Die Aufnahmen in 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung erfolgten unter Zuhilfenahme eines Polarisationsfilters. Die Bildverarbeitung erfolgte mittels eines Computersystems, die Dateien wurden im TIFF Format, nicht komprimiert, 24 Bit Farbtiefe, mit einer Auflösung von 5 Megapixeln sowie einer Pixeldichte von 96 dpi aufgenommen. Die Bilddateien wurden in Graustufen umgewandelt, eine weitere Bearbeitung, bis auf etwaige Änderungen des Bildausschnittes, erfolgte nicht.

e. Transmissionselektronenmikroskopie

Das optische Auflösungsvermögen liegt für herkömmliche Lichtmikroskope im Bereich der halben Wellenlänge des sichtbaren Lichtes, also bei ca. $200\text{ nm} - 300\text{ nm}$. Diese Tatsache limitiert die Möglichkeiten mittels eines Lichtmikroskops die zelluläre Feinstruktur bzw. die Bestandteile der Zelle im einzelnen zu untersuchen. Insbesondere kleinere Bauteile der Zelle, wie beispielsweise Ribosomen, vesikuläre Strukturen, Zellmembranen, mitochondriale Membranen und Weitere lassen sich nicht auflösen. Abhilfe schafft hier die Methode der Transmissionselektronenmikroskopie. Sie wurde Anfang der 1930er Jahre von Ernst Ruska (Nobelpreis 1986 (Ruska 1987)) entwickelt. Ruska ließ hierzu einen beschleunigten Elektronenstrahl, welcher zum Beispiel mittels einer Glühemission- oder einer Feldemissionskathode erzeugt werden kann, durch eine magnetische Linse auf das zu untersuchende Objekt treffen. Abhängig von Kernladungszahl Z des getroffenen Elements werden die Elektronen mehr oder weniger stark gestreut. Weitere magnetische Linsen fokussieren und bilden das Elektronenbild auf einem Schirm ab. Das erreichbare Auflösungsvermögen des Transmissions-Elektronen-Mikroskopes läßt sich mittels der Materie-Wellen-Theorie von De Broglie (De Broglie 1924) beschreiben. Hierbei wird postuliert dass jedes Objekt bzw. Teilchen ebenfalls Wellencharakter besitzt und somit eine Wellenlänge besitzt. So ist die DeBroglie-Wellenlänge der beschleunigten Elektronen

$\lambda = \frac{\text{Plancksches Wirkungsquantum } h}{\text{Impuls } p}$ für Elektronen welche mittels einer Beschleunigungsspannung von 100 kV beschleunigt wurden ca. $\lambda = 3,7 * 10^{-12} \text{ m} = 3,7 * 10^{-3} \text{ nm}$. Dies ist ca. fünf Größenordnungen kleiner als die maximale Auflösung eines optischen Mikroskops welche, limitiert durch den Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichtes, bei ca. 200 nm - 300 nm liegt. Die Elektronenmikroskopie ermöglicht also Einblicke in die Mikrostruktur von biologischen Einheiten wie zum Beispiel einzelnen Zellen. Proben-präparativ ist hierzu zu beachten, dass um ausreichend gute Bedingungen für die Elektronenmikroskopie zu ermöglichen die zu untersuchenden Proben in unserem Falle eine Dicke von ca. 80 nm - 100 nm aufweisen dürfen.

Die Transmissionselektronen-mikroskopischen Untersuchungen an von uns verwendeten Zellmaterial wurden mittels eines LEO912 (Carl Zeiss AG, Oberkochen) Elektronenmikroskops durchgeführt. Die Elektronenmikroskopie erfolgt im Hochvakuum. Präparativ wurden die Proben im Vorfeld in Kunstharz (EPON) eingebettet. Die Einbettung erfolgt in mehreren Schritten. Im ersten Schritt werden die in einem Phosphatpuffer (10% PBS in H_2O) gewaschenen Proben mittels einer Phosphatgepufferten Lösung bestend aus 2% Paraformaldehyd, 2% Glutaraldehyd und 0,02% Pikrinsäure für 30 Minuten fixiert. Formaldehyd und Glutaraldehyd wirken hierbei als vernetzendes Fixans, insbesondere Proteine werden hierbei vernetzt und, konzentrationsabhängig, denaturiert. Glutaraldehyd vernetzt zu geringeren Anteilen ebenfalls DNA, Lipide und Kohlenhydrate (Bozzola und Russell 1999). In allen Fixierungsschritten ist eine Pufferung der Lösung nötig, da ohne Pufferung der pH absinken würde und ggf. im späteren Verlauf Artefakte auftreten könnten. Ein zweiter Fixierungsschritt der sich dem ersten anschließt ist die Fixierung der Proben in Osmium-Tetroxid. Osmium-Tetroxid reagiert besonders mit den Lipid-Komponenten der Zelle. Es führt zur deutlichen Kontrastverbesserung der Proben im weiteren Verlauf durch die relativ hohe Kernladungszahl des Osmiums. Zum Fixieren wird eine Cacodylat-gepufferte 1% Osmium-Tetroxid-Lösung für 20 Minuten auf die Proben aufgetragen. Bozzola (Bozzola und Russell 1999) beschreibt die Fixierungsmethoden für die Transmissionselektronenmikroskopie detailliert. In weiteren Schritten erfolgt, durch mehrmaliges Überziehen der Proben mit Lösungen mit wachsender Alkoholkonzentration (30% - 100%, je 10 Minuten - 20 Minuten) sowie abschließend durch Eintauchen in Xylol (3 Schritte, je 2 Minuten) ein vollständiges Entwässern der Proben. Dies ist für die abschließende Einbettung und Auspolymerisierung in EPON Harz nötig. Dieser abschließende Schritt erfolgt idealerweise über Nacht im Temperaturschrank. Nach dem Auspolymerisieren werden Semi-Dünnschnitte zur Beurteilung des Einbettungsergebnisses unter dem Lichtmikroskop angefertigt. Anschließend werden Dünnschnitte (80 nm - 100 nm) angefertigt und die gewonnenen Proben auf leitfähigen Kupfernetzen positioniert. Die Bilder werden mittels einer Szintillator gekoppelten CCD Kamera aufgenommen und mittels eines

gekoppelten Rechners weiter verarbeitet.

f. Fluoreszenzmikroskopie

Zusätzlich zu den beiden Maltose-modifizierten PEI-Nanopartikeln STP2508 und STP2755 wurden zu jedem Partikel ein korrespondierender, farbstoffmarkierter Partikel, STP2818 und STP2819, hergestellt. Die Partikel wurden bereits während des Herstellungsprozesses mittels des Farbstoffs Rhodamin B (Noelting und Dziewoński 1905, Kubin und Fletcher 1982) markiert, der Zellkern wurde mittels 4,6-Diamino-2-phenylindol (DAPI, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) angefärbt. DAPI, erstmals 1971 von Dann et al. synthetisiert (Dann et al. 1971), bindet interkalierend (Kapuściński und Skoczylas 1978) mit der DNA, präferentiell in AT-reichen Regionen (Tanious et al. 1992). Der Bereich des Zytoplasmas wurde mittels Phalloidin gekoppeltem Tetramethylrhodamin (Ph-TR, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) angefärbt. Hierbei bindet das Phalloidin an F-Actin (Cano et al. 1992) und macht so nach entsprechender optischer Anregung die Struktur der Aktinfilamente in der Zelle sichtbar. Die Aufnahmen wurden mit einem TCS SPS Mikroskop (Leica GmbH, Wetzlar) angefertigt. Folgende Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden gewählt. Vor Auswahl der Färbungen wurden die Nanopartikel alleine, nicht inkubiert gemessen, um die optimalen Anregungs- und Aufnahmewellenlängen festzulegen und die anderen Fluoreszenzfarbstoffe auszuwählen für die Kern- sowie Filamentfärbung.

Tabelle 2.3.: Gewählte Anregungs- und Detektionswellenlängen

Farbstoff	Anregung	Detektion
Rhodamin B markierte Nanopartikel	405 <i>nm</i> – 498 <i>nm</i>	520 <i>nm</i>
DAPI	405 <i>nm</i>	460 <i>nm</i>
Ph-TR	561 <i>nm</i>	577 <i>nm</i>

Zur Vorbereitung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden 10000 $\frac{1}{\text{cm}^2}$ Zellen in Chamber-Slides ausgesät. Nach einem Tag wurde das mit den entsprechenden Nanopartikeln versetzte Zellkultur-Medium in einer Konzentration von 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ zugesetzt. Die Zellen wurden für 24 Stunden unter diesen Bedingungen im Brutschrank (37 °C, 4% CO₂) inkubiert. Nach Erreichen der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen mit steriler 10% PBS Lösung mehrfach gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 4% Paraformaldehyd (PFA) bei 4 °C für 10 Minuten. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte, zur Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran, die Zugabe von 0,1% Triton-X100-Lösung für 5 Minuten. Auf erneutes Waschen folgte nun die Zugabe der entsprechenden Farbstoffe (DAPI oder Ph-TR) sowie nach erneutem Waschen in 10% PBS Lösung eine abschließende Schutzdeckung mit ProLong Gold antifade (ThermoFisher scientific, Grand Island NY, USA). Das anschließende Mikroskopieren fand bei Raumtemperatur statt.

g. Statistische Methoden

Die Ergebnisse und Messwerte, die aus den funktionellen Assays resultieren, wurden mittels der Software SPSS V.21 statistisch ausgewertet. Zuerst wurden die Daten mittels einer explorativen Datenanalyse inklusive des Kolmogorov-Smirnov Tests auf das Vorliegen einer Normalverteilung untersucht. Für p-Werte $\geq 0,2$ im Kolmogorov-Smirnov Test wurde eine Normalverteilung angenommen. Für nicht normalverteilte Daten wurde im weiteren Verlauf eine nicht-parametrische ANOVA nach Kruskal-Wallis mit paarweisen Einzeltests durchgeführt. Im Falle einer positiv getesteten Normalverteilung, sowie einer positiv evaluierten Gleichheit der Varianzen, wurde eine ANOVA mit Post-Hoc Tukey Tests berechnet. Als Signifikanzniveau wurde 0,05 sowie als Konfidenzintervall 0,95 festgelegt. Im Folgenden sind die Signifikanzen wie folgt beschrieben: * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Das verwendete statistische Verfahren ist in dieser Arbeit im Folgenden sowohl im Text als auch in den Abbildungen gekennzeichnet. Die Graphen wurden mittels OriginPro Version 8 erstellt. Die Boxbreite entspricht dem Standardfehler (SEM), die Länge der Whisker erstreckt sich über den kompletten Wertebereich.

3. ERGEBNISSE

Potentielle Effekte der verwendeten Nanopartikel auf unsere rdMSC wurden für beide Nanopartikel, STP2755 und STP2508, unseres Experimentes untersucht. Der im Methodenteil beschriebene LDH-Assay sowie mikroskopische Untersuchungen, licht- und elektronenmikroskopisch, wurden durchgeführt. Zwei verschiedene Konzentrationen der Nanopartikel ($1 \frac{mg}{ml}$ sowie $50 \frac{\mu g}{ml}$) mit Inkubationszeiten von 24 h und 72 h wurden untersucht. Zusätzlich wurde lichtmikroskopisch eine Langzeit-Inkubationsreihe mit einer Beobachtungszeit von 7 Tagen bis 21 Tagen ausgewertet. Um potentielle frühe Einflüsse der Nanopartikel, auf Nano- und Mikrometerskala zu detektieren, wurden transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hier wurde eine Konzentration von $1 \frac{mg}{ml}$ sowie Inkubationszeitpunkte von 1 h und 24 h gewählt. Die Experimente wurden für alle möglichen Kombinationen aus Inkubationszeit und Nanopartikel-Konzentration in 2 unabhängigen Wells einer 24-Well-Platte durchgeführt. Zwei Zellkulturen (TEM Aufnahmen) respektive vier Zellkulturen (lichtmikroskopische Aufnahmen und LDH Assay) wurden untersucht. Die Aufnahme der Nanopartikel in die Zelle wurde mittels fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen analysiert. Die Evaluation des Einflusses der Nanopartikel auf die osteogene Differenzierung der rdMSC sowie die Bildung von mineralisierter Matrix wurde abschließend mittels des ALP-Assays sowie der histomorphometrischen Auswertung von von-Kossa gefärbten Proben durchgeführt.

3.1. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Rhodamin B markierten Nanopartikeln und rdMSC Kulturen, Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen

Die Rhodamin B markierten modifizierten Polyethylenimin- Nanopartikel STP2818 sowie STP2819 wurden in einer Konzentration von $0,1 \frac{mg}{ml}$ zu je $10000 \frac{1}{cm}$ Zellen der Zellkultur ZK46 zugegeben. Der Endpunkt der Testung war nach 24 h erreicht. Der Zellkern sowie die intrazellulären Aktinfilamente wurden mit DAPI (blau, Zellkern) beziehungsweise Ph-TR (Rot, Aktin) angefärbt. Abbildung 3.1 A) zeigt eine nicht mit Nanopartikeln behandelte Referenzprobe. Der Zellkern (blau) sowie die Aktinfi-

lamente im Zellplasma (rot) sind deutlich zu erkennen. Die Zellen zeigen das typische längliche Erscheinungsbild von mesenchymalen Stammzellen, die Aktinfilamente in jeder Zelle verlaufen im Wesentlichen parallel zueinander. Die mit STP2818 versetzte Probe, Abbildung 3.1 B), zeigt deutliche Lumineszenzsignalanreicherungen von Rhodamin B (grün) im perinukleären Bereich. Im periphereren zytosolischen Bereich der Zelle sind keine verstärkten Anreicherungen zu erkennen. Letztendlich zeigt sich im Falle von STP2819 (Abbildung 3.1 C) ein ähnliches Bild wie im Falle von STP2818, auch hier sind die Nanopartikel perinukleär lokalisiert. Der Kern wurde bei dieser Probe nicht angefärbt, so dass eine Corona der grün lumineszierenden Nanopartikel den Ort des Zellkernes umgibt.

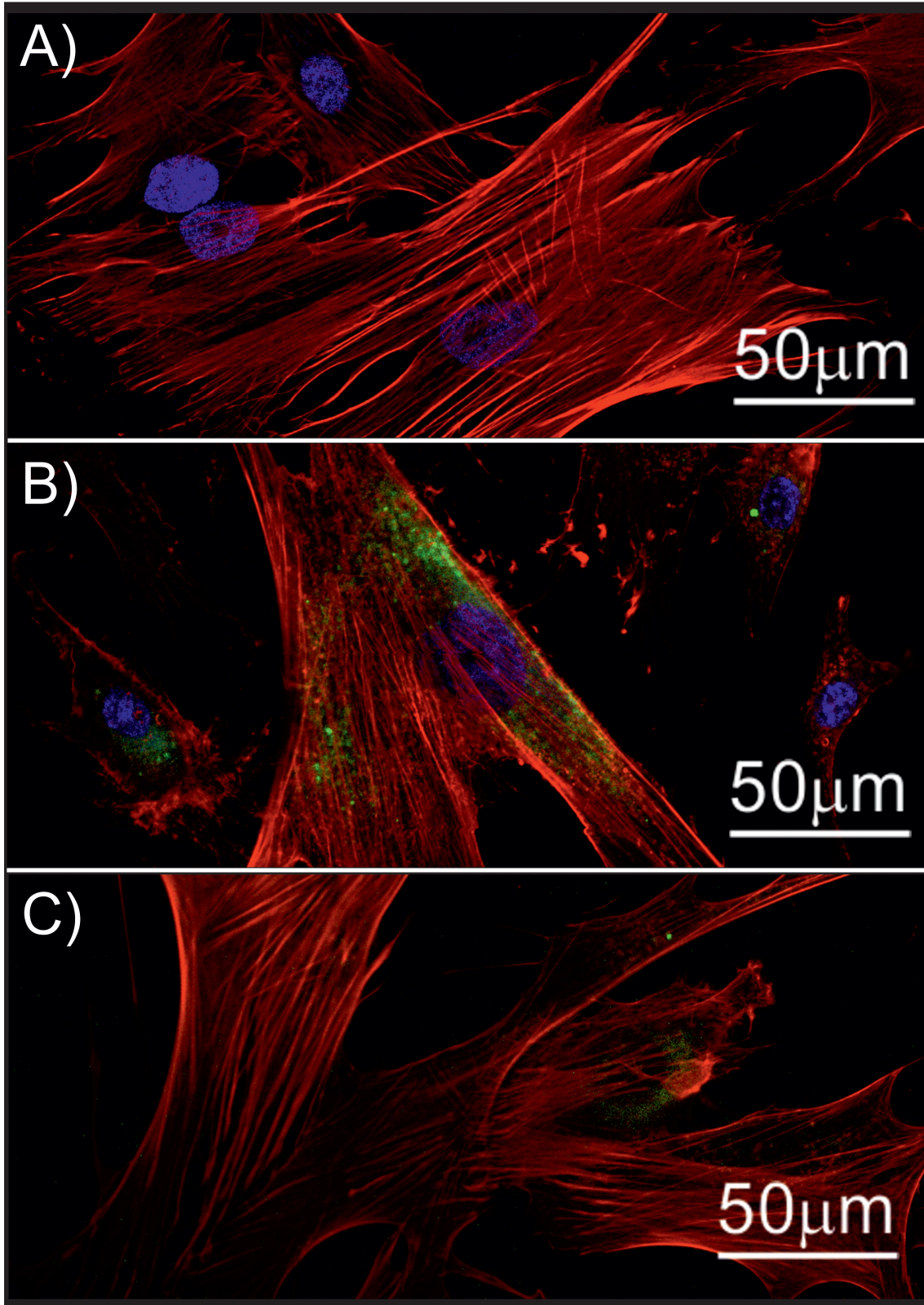


Abbildung 3.1.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Nanopartikelaufnahme, A) Referenzprobe ohne Zugabe von Nanopartikeln, B) Zugabe von STP2818, C) Zugabe von STP2819 ohne Färbung des Zellkerns

3.2. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Frühe toxische Effekte in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten sich bevorzugt für Zellen, welche mit STP2508 inkubiert wurden. Während die unbehandelte Kontroll- Zellkultur (siehe Abbildungen 3.2, 3.3) weder anormale Strukturen noch zelluläre Schäden zeigte, fanden sich im Falle der Zellkulturen welche mit Nanopartikeln behandelt wurden, sowohl für STP2508 als auch für STP2755 nach 60 Minuten vesikuläre Strukturen im Bereich der Zellmembran (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.6). Hier hafteten des Weiteren nanopartikuläre Strukturen auf der Zellmembran an (schwarze Pfeile). Im lysosomalen System der mit STP2508 behandelten Zellen (rote Pfeile, Abbildung 3.4 und 3.5) waren ebenfalls agglomerierte Strukturen zu erkennen, die Ähnlichkeit mit den an der Zellmembran angelagerten Strukturen besitzen. Ein ähnliches Bild zeigte sich für mit STP2755 inkubierte Zellen (Abbildung 3.6). Es befanden sich ebenfalls eine große Anzahl von Vesikeln im Bereich der Zellmembran sowie entsprechende Strukturen im lysosomalen System. Nach einer Inkubationszeit von 24 h finden sich für mit STP2508 behandelte Zellen Schäden im Bereich der Mitochondrien. Die mitochondriale Membran ist beschädigt und in beginnender Auflösung begriffen (Abbildung 3.7). Nach 24 h Inkubation mit STP2508 finden sich ferner an der Zellmembran aggregierte Strukturen (siehe Abbildung 3.8,rote Pfeile) sowie weiterhin eine erhöhte Bildung von Vesikeln (grüne Pfeile). Die Bildung von Aggregaten nach 24 h ist nur für STP2508 relevant, STP2755 bildet keine in den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbaren Aggregate an der Zellmembran.

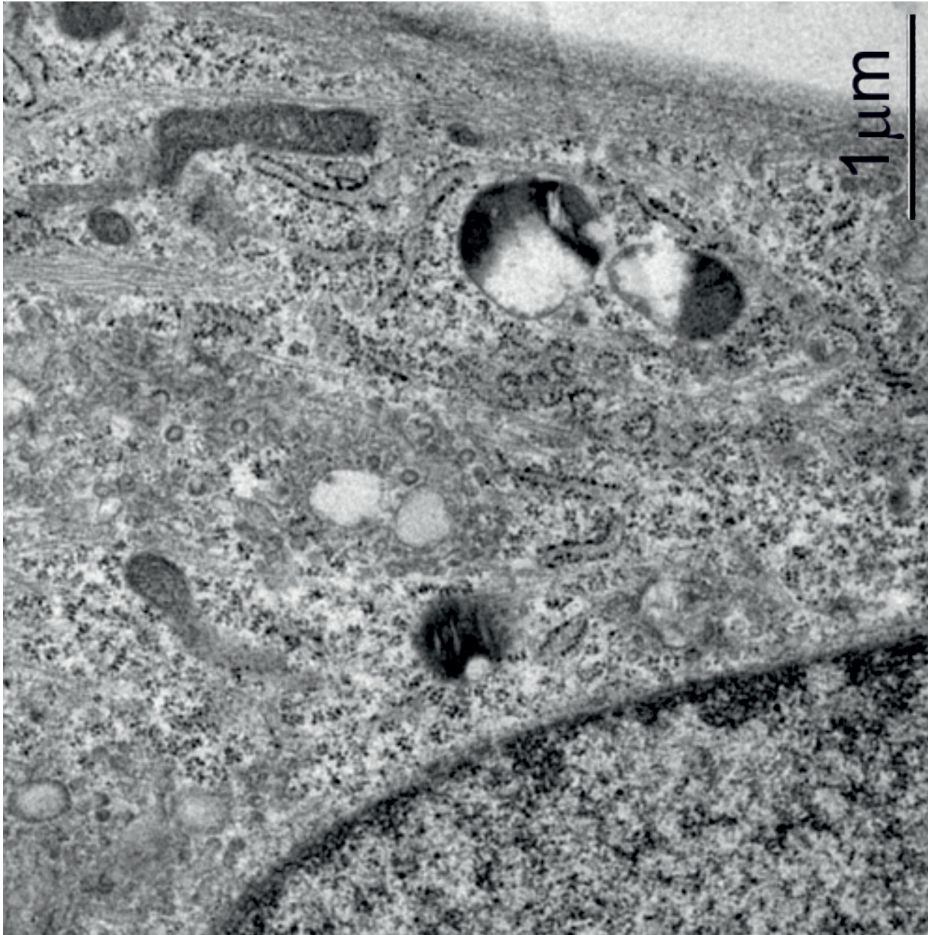


Abbildung 3.3.

Detailvergrößerung einer nicht-behandelten Zellkultur. Auch hier sind keine Schäden zu erkennen.

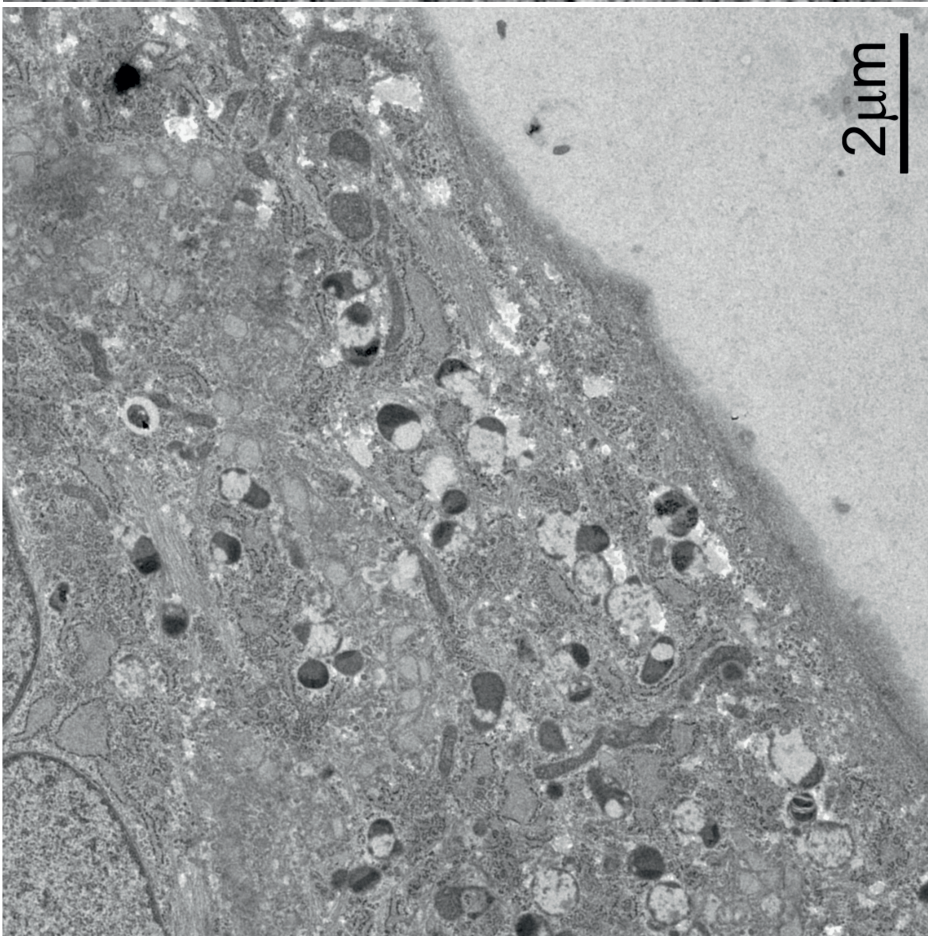


Abbildung 3.2.

TEM Kontrollaufnahme einer nicht mit Nanopartikeln behandelten Zellkultur, die Zellorganellen zeigen keine Schäden, die Zellmembran ist intakt. Es ist keine gesteigerte Vesikelbildung zu erkennen. Abbildung aus (Lautenschläger et al. 2015).

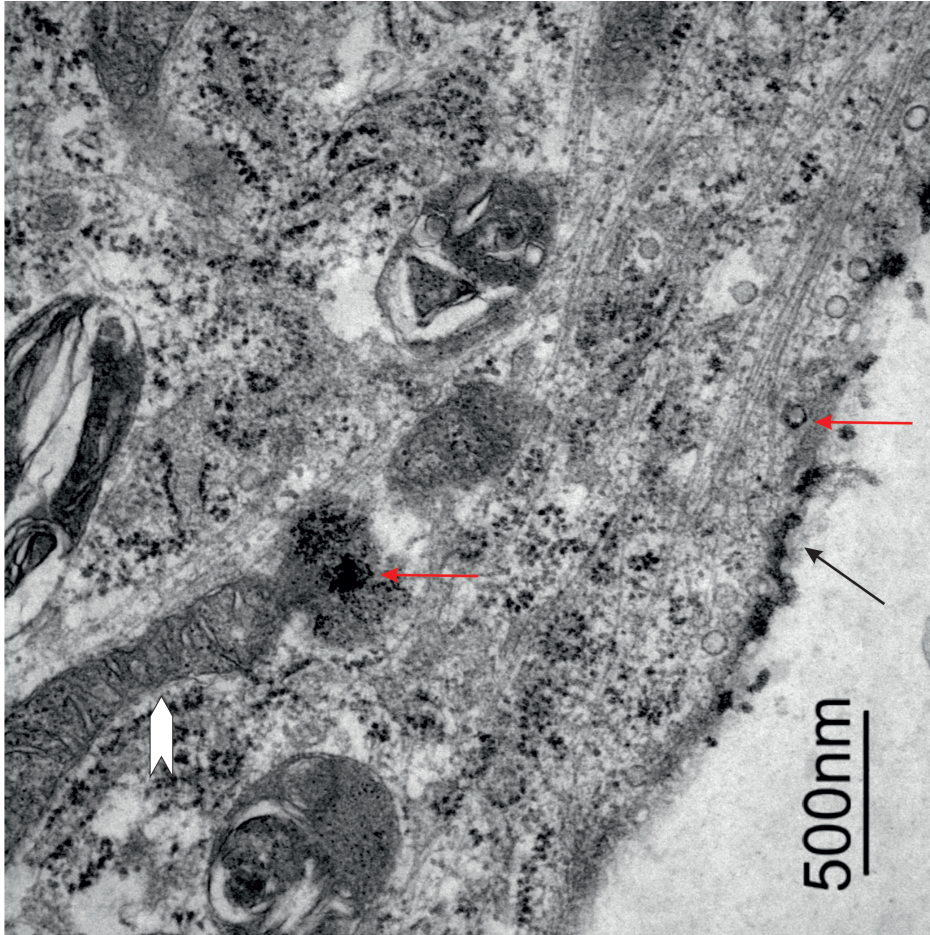


Abbildung 3.5.

Eine Detailvergrößerung an anderer Stelle von der mit STP2508 behandelten Zelle zeigt an der Zellmembran angelagerte Nanopartikel (schwarzer Pfeil) sowie Vesikel und Lyso-somen mit Strukturen im Inneren (rote Pfeile). Zu diesem Zeitpunkt ist das hier angeschnittene Mitochondrium (weißer Pfeil) noch intakt.

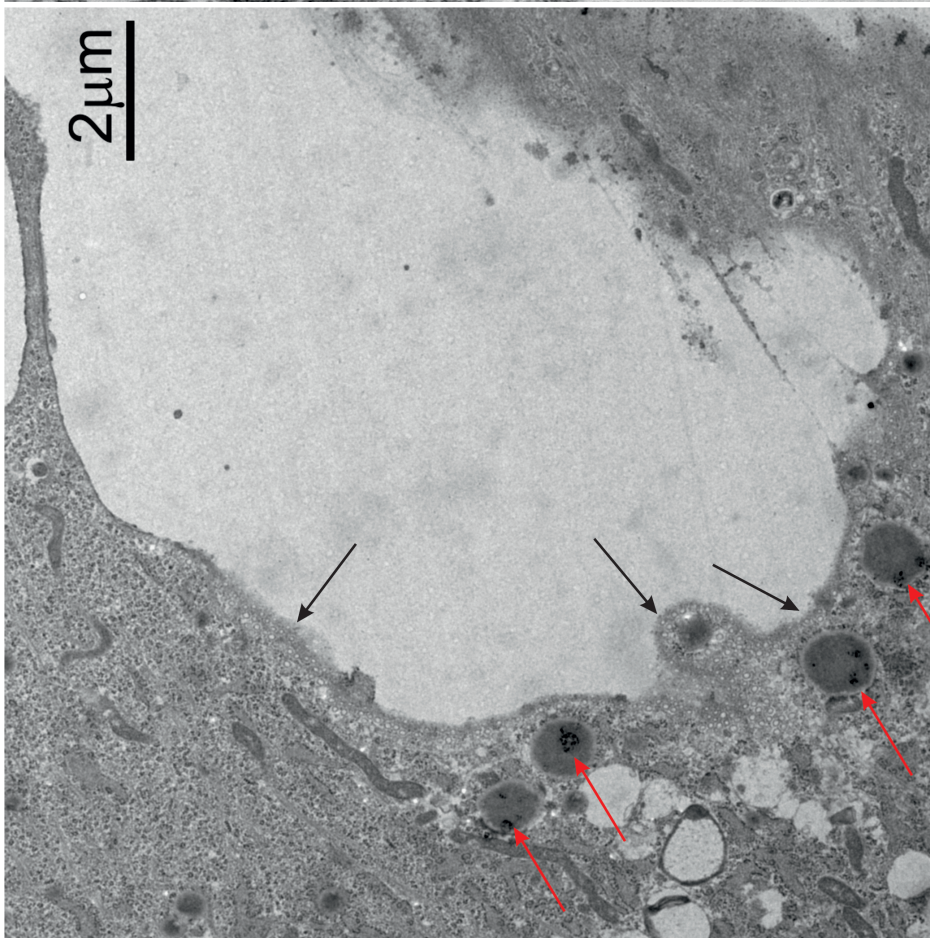


Abbildung 3.4.

60 Minuten nach Hinzufügen der Nanopartikel, hier STP2508, findet sich eine hohe Anzahl an Vesikeln (schwarze Pfeile) im Bereich der Zellmembran, Strukturen in den Lysosomen der Zelle (rote Pfeile) sind zu erkennen.

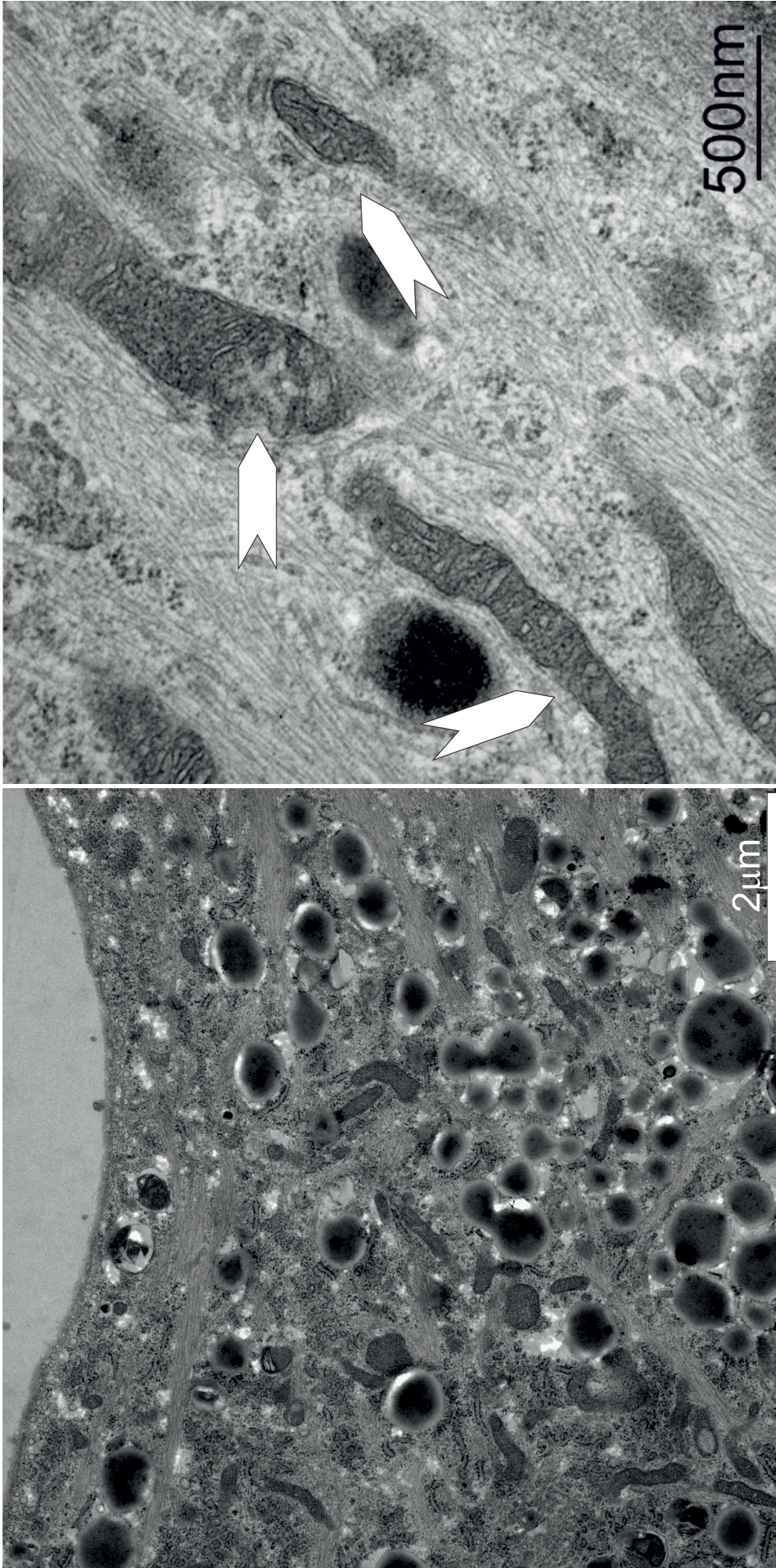


Abbildung 3.6.

Auch bei mit STP2755 behandelten Zellen kommt es innerhalb von 60 Minuten zur Ausbildung einer großen Anzahl von Vesikeln im Bereich der Zellmembran. Innerhalb der Lysosomen finden sich ebenfalls zahlreiche Strukturen.

Abbildung 3.7.

Nach 24 h führt das mit STP2508 versetzte Medium zur Beschädigung von Zellorganellen, hier insbesondere der Mitochondrien (weiße Pfeile), Abbildung aus (Lautenschläger et al. 2015).

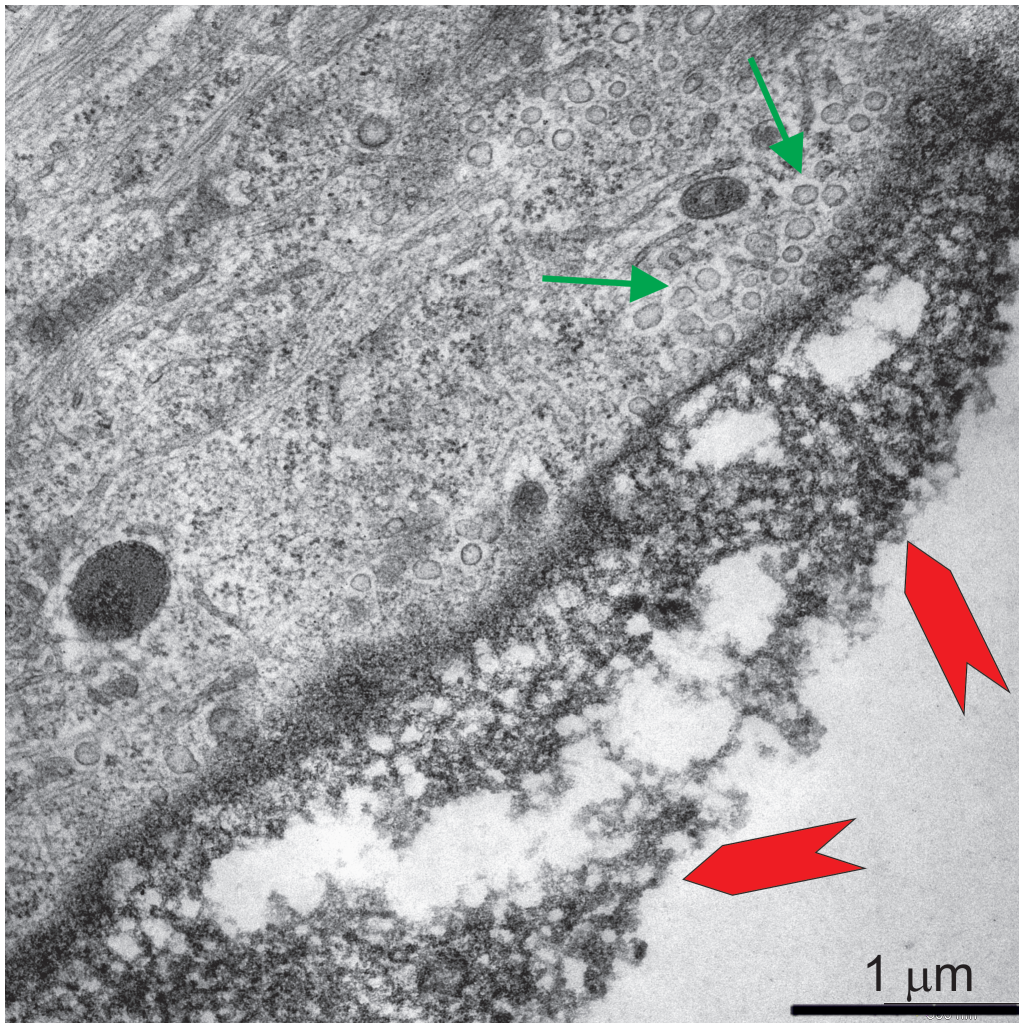


Abbildung 3.8.

Aggregatbildung (rote Pfeile) von Nanopartikeln an der Zellmembran nach einer Inkubationsdauer von 24 h mit STP2508.

3.3. Lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtungen sowie Einfluss der Nanopartikel auf das Wachstum der rdMSC

Um potentielle Effekte der Nanopartikel weiter aufzudecken und um einsetzbare Konzentrationen für unsere Differenzierungsuntersuchungen zu bestimmen, wurde eine Versuchsreihe mit vier unabhängigen rdMSC Zelllinien sowie jeweils zwei Konzentrationen ($1 \frac{mg}{ml}$ sowie $50 \frac{\mu g}{ml}$) und Inkubationszeiten von 24 h und 72 h durchgeführt. Die Auswirkungen der Zellschädigung ließen sich nach 24 h bzw. 72 h lichtmikroskopisch noch nicht sicher nachweisen. Mittels Messung der Freisetzung der Lactat-Dehydrogenase (LDH-Assays) ließen sich negative Effekte ebenfalls erst nach 72 h nachweisen. Abbildung 3.9 zeigt im Falle der mit STP2508 inkubierten Zellen nach 72 h allenfalls eine beginnende Vermehrung der Zelltrümmer beziehungsweise eine Änderung der Struktur der MSC von der typischen langgestreckten Form der MSC hinzu kürzeren Zellen mit erhöhter Kern/Zytoplasma Relation sowie unregelmäßig auslaufenden Zellgrenzen (siehe Markierungen Abbildung 3.9). Lichtmikroskopisch ließen sich für die beiden Endpunkte 24 h und 72 h für beide verwendeten Konzentrationen von STP2755 keine besonderen Auffälligkeiten an den Zellen feststellen, einzig eine verminderte Zelldichte, insbesondere im Falle der höheren verwendeten Konzentration, war auffällig (siehe Abbildung 3.10). Die Aufnahmen der Kontroll-Zellkulturen waren unauffällig, die typisch gestreckte Form der MSC ist deutlich zu erkennen (siehe Aufnahmen der Kontroll-Serie in Abbildung 3.9 sowie 3.10). Lichtmikroskopisch sicher war der Einfluss der Nanopartikel, insbesondere von STP2508, nach einer Inkubationsdauer von 7 Tagen nachzuweisen. Hier war bereits für die niedrigere getestete Konzentration von $50 \frac{\mu g}{ml}$ (Abbildung 3.11) eine deutliche Zunahme der Zelltrümmer im Medium sowie eine Änderung der Zellstruktur und des Zellkerns zu erkennen. Deutlicher wird der schädigende Einfluss der Nanopartikel, insbesondere von STP2508, nach einer Inkubationsdauer von 21 Tagen. Während die Kontroll-Proben durchweg ein dichtes Wachstum ohne Hinweise auf Zellschäden oder Zelluntergang zeigen (Kontrolle in Abbildung 3.12), ist für Zellkulturen inkubiert mit STP2508 eine deutliche Zunahme der Zelltrümmer im Medium (helle Strukturen, siehe Abbildung 3.12) zu erkennen. Eine weitere Detailvergrößerung (Abbildung 3.14) einer rdMSC mit einer zugesetzten Nanopartikelkonzentration von $1 \frac{mg}{ml}$ STP2508 zeigt irregulär geformte Zellen sowie Zellkerne und große Mengen Detritus. Hierzu im Gegensatz fallen mit STP2755 inkubierte Proben auch im Langzeitvergleich nur durch eine reduzierte Zelldichte auf.

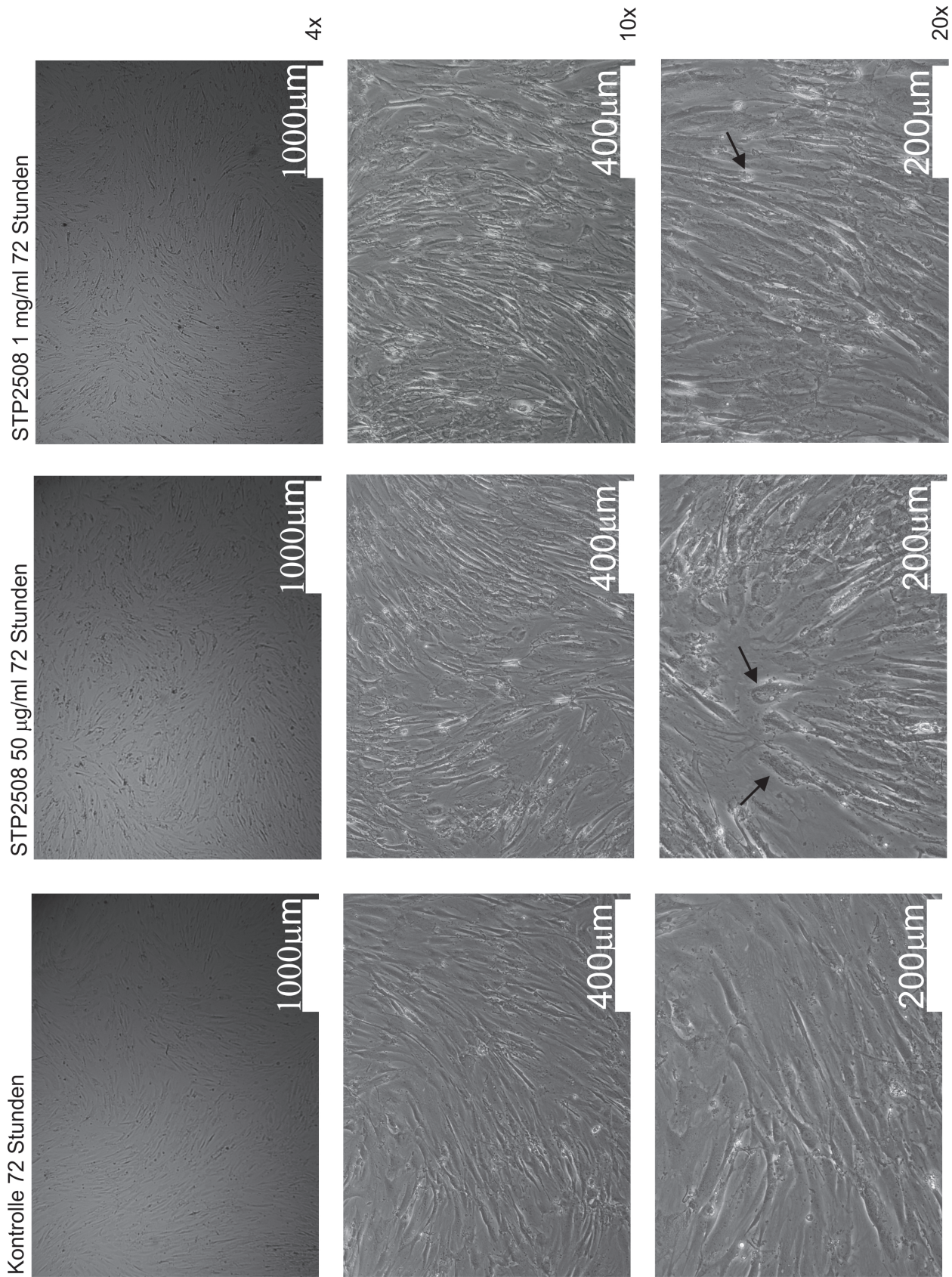


Abbildung 3.9.

Lichtmikroskopische Aufnahmen von für 72 h inkubierten Proben, links befindet sich die unbehandelte Referenzprobe, die beiden anderen Proben wurden unter Zusatz von STP2508 in den Konzentrationen 0,05 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ sowie 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ inkubiert.

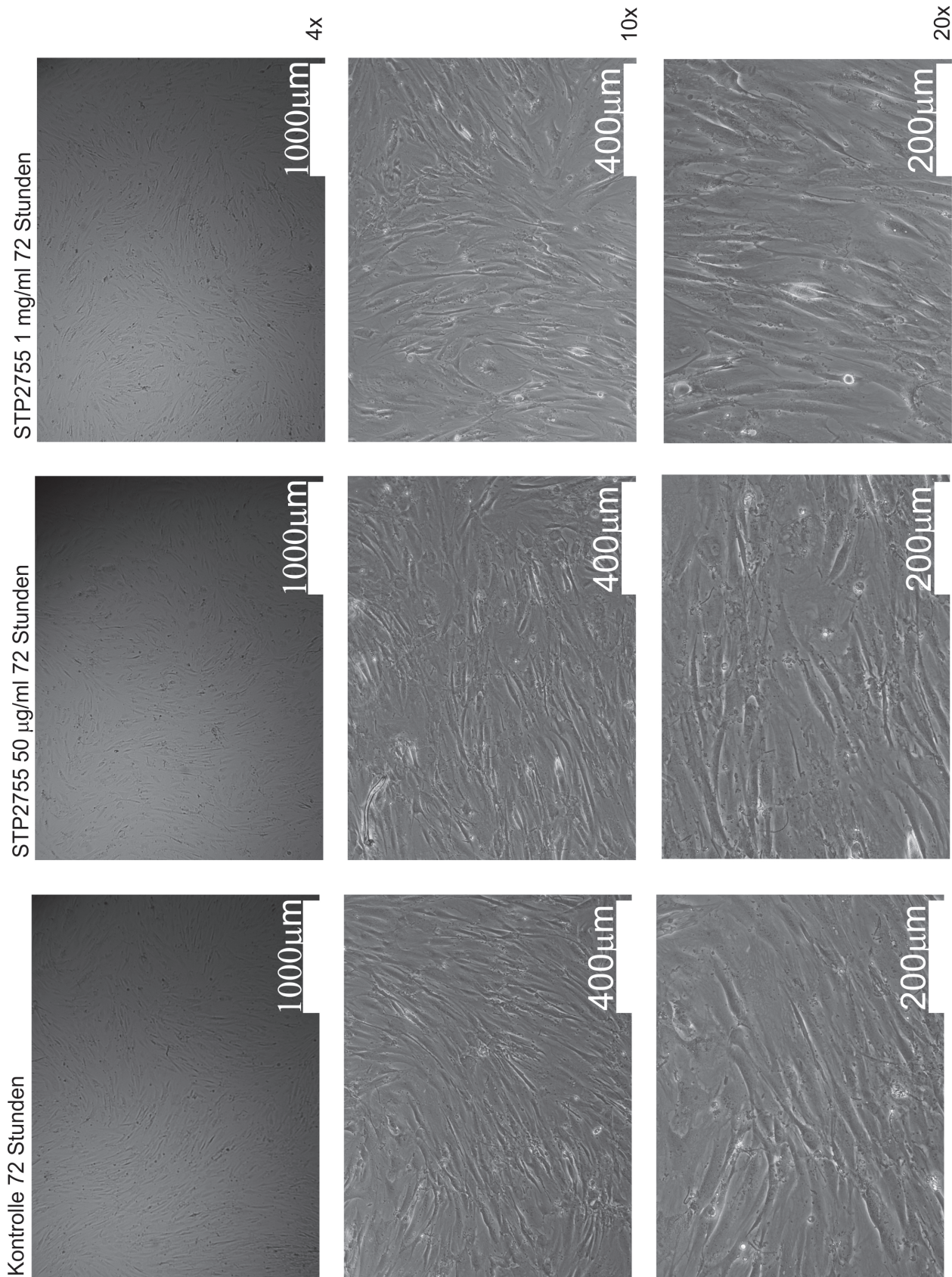


Abbildung 3.10.

Lichtmikroskopische Aufnahmen von für 72 h inkubierten Probe, links befindet sich die unbehandelte Referenzprobe, die beiden anderen Proben wurden unter Zusatz von STP2755 in den Konzentrationen 0,05 $\frac{mg}{ml}$ sowie 1 $\frac{mg}{ml}$ inkubiert.

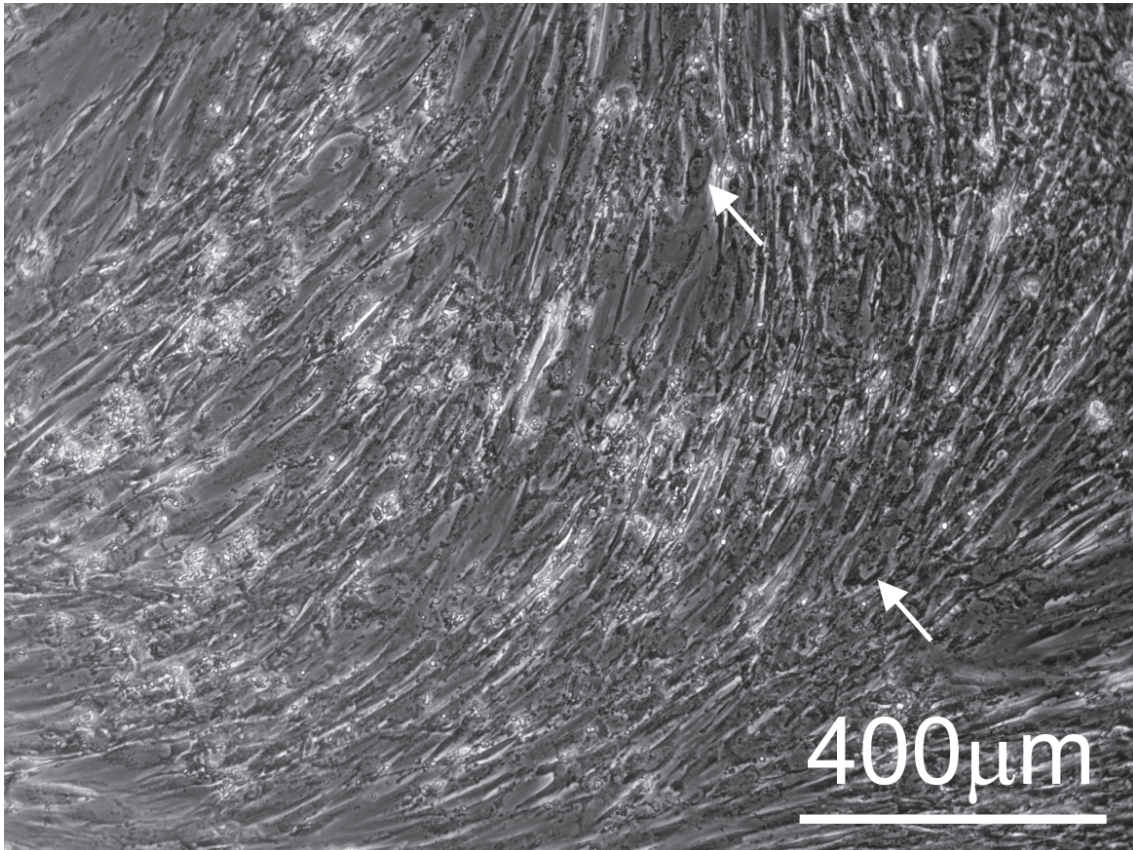


Abbildung 3.11.

Lichtmikroskopische Aufnahme einer für 7 Tage mit einer Konzentration von $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ STP2508 inkubierten rdMSC Probe. Eine Zunahme der flotierenden Zelltrümmer im Medium (helle Strukturen) ist zu erkennen. Einige Zellkerne wirken entrundet (weiße Pfeile).

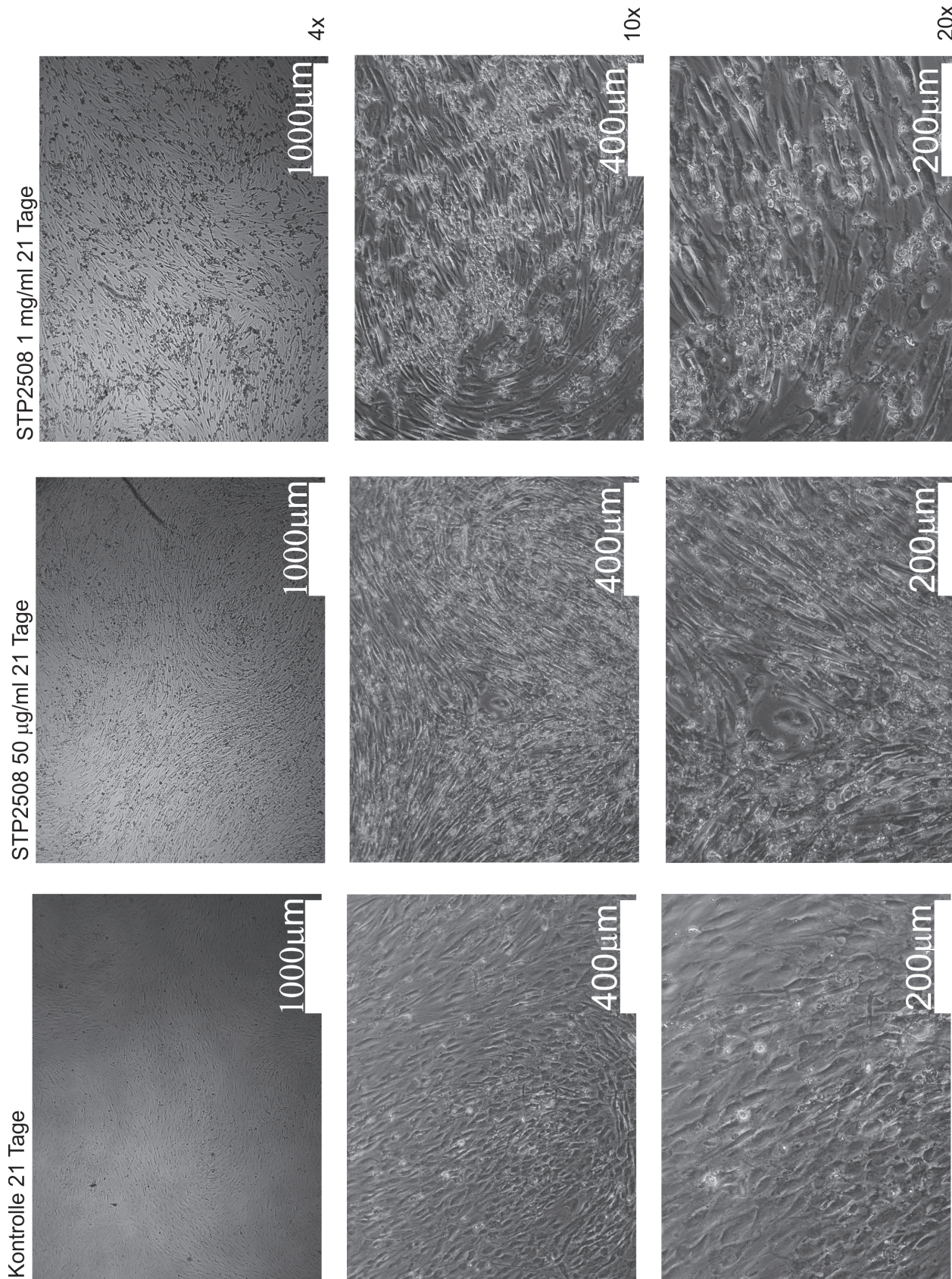


Abbildung 3.12.

Lichtmikroskopische Aufnahmen von für 21 Tage inkubierten Proben, links befindet sich die unbehandelte Referenzprobe, die beiden anderen Proben wurden unter Zusatz von STP2508 in den Konzentrationen 0,05 $\frac{mg}{ml}$ sowie 1 $\frac{mg}{ml}$ sowie 1 $\frac{mg}{ml}$ inkubiert. In allen Vergrößerungen und für beide Konzentrationen des Nanopartikels sind deutliche Zellschäden sowie im Medium flotierende Zelltrümmer zu sehen.

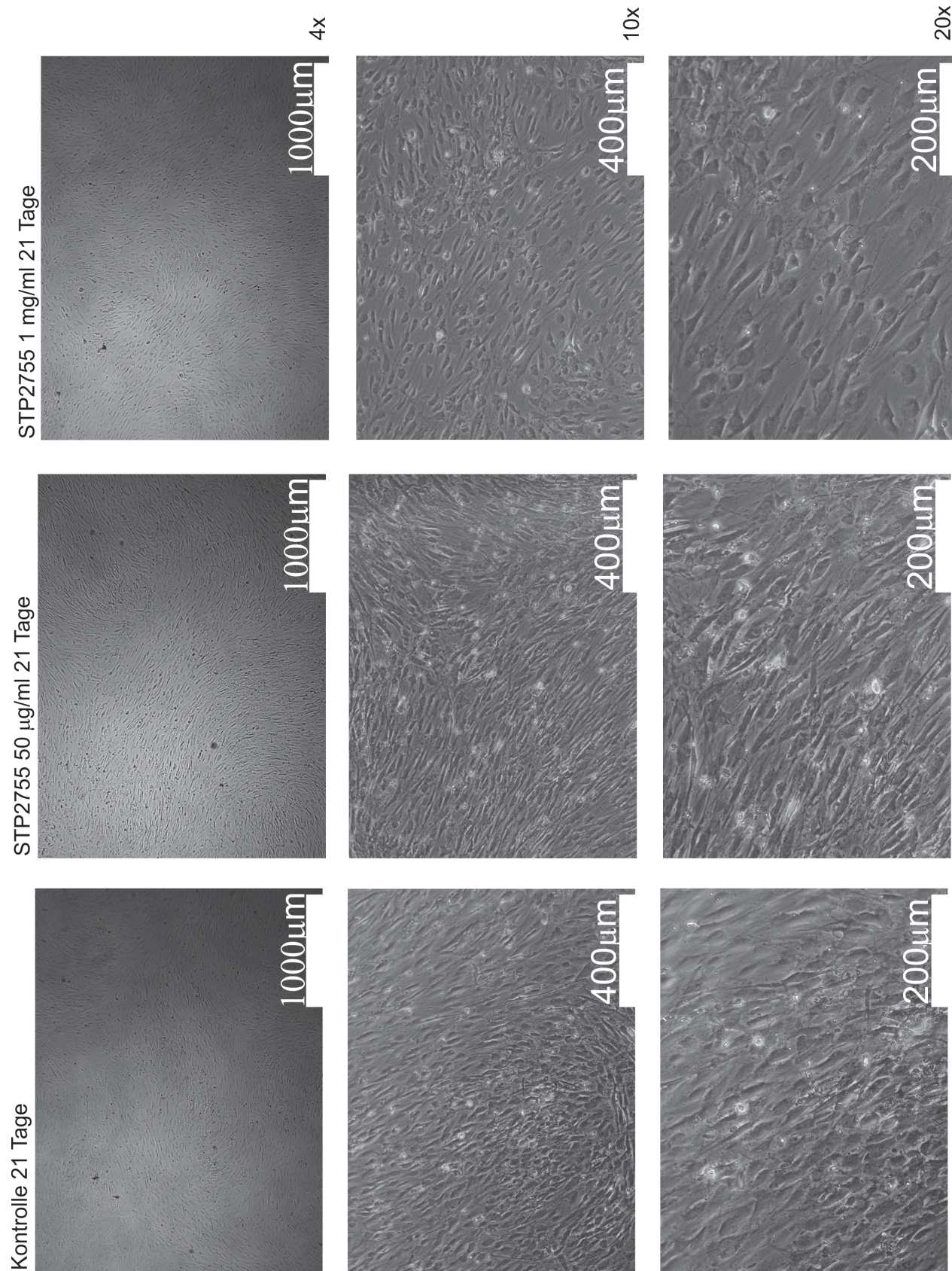


Abbildung 3.13.

Lichtmikroskopische Aufnahmen von für 21 Tage inkubierten Proben, links befindet sich die unbehandelte Referenzprobe, die beiden anderen Proben wurden unter Zusatz von STP2755 in den Konzentrationen 0,05 $\frac{mg}{ml}$ sowie 1 $\frac{mg}{ml}$ inkubiert. Zu erkennen sind lichtmikroskopisch keine größeren Zellschäden, es finden sich keine Zellrümer im Medium.

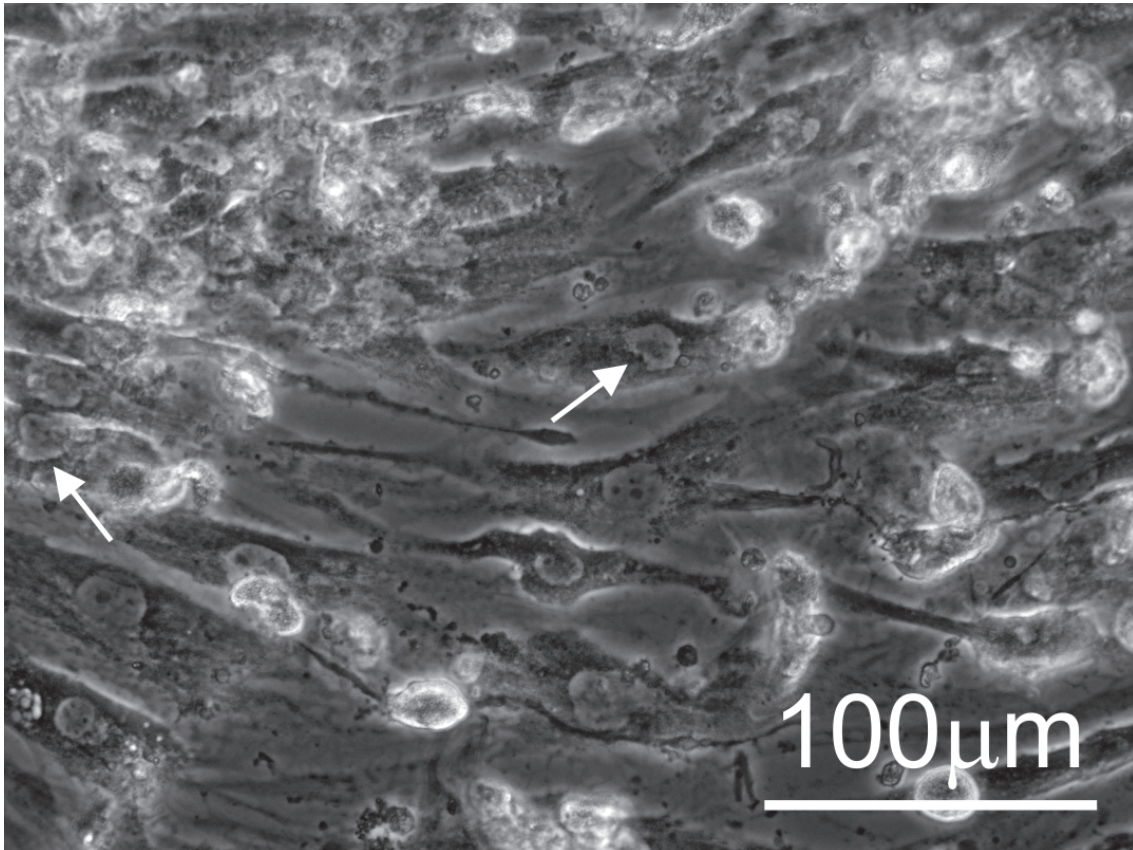


Abbildung 3.14.

Lichtmikroskopische Detailvergrößerung einer für 21 Tage mit einer Konzentration von $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ STP2508 inkubierten rdMSC Probe. Neben einer großen Menge Detritus sind ebenfalls deformierte Zellkerne (weiße Pfeile) sowie irregulär geformte Zellen zu erkennen.

Für die Langzeituntersuchungen von 7 Tagen, 21 Tagen und 28 Tagen wurden für die verschiedenen Wachstumsparameter die jeweilige erreichte Zellzahl am Ende des Inkubationszeitraumes mittels der Messung des Gesamtproteins (DC Protein Assay) und anschließende Regression über zuvor erstellte Eichgeraden bestimmt. Die Wachstumskonstante wurde gemäß $\lambda = \ln(\frac{Z_0}{Z_t})/T$ berechnet. Etwas anschaulicher wurde die Wachstumsgeschwindigkeit pro Tag für die Endpunkte 21 Tage und 28 Tage mittels einer Berechnung gemäß folgender Formel (Zinseszinsformel) genähert.

$$\text{Wachstum in \%} = 100 \cdot \sqrt[T]{\frac{Z_t}{Z_0}} - 1$$

Mit T=Inkubationszeit in Tagen, Z_t über alle 4 ZK gemittelte jeweilige Zellzahl am Ende der Inkubationszeit, $Z_0 = 20000$

Die zu untersuchenden Nanopartikelkonzentrationen wurden zu $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ sowie $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ gewählt. Ebenfalls wurden wiederum lichtmikroskopische Lebendzell-Aufnahmen angefertigt. Die Auswertung des DC Protein-Assays (siehe Abbildung 3.15) für alle 3 Inkubationszeiten zeigte für die kürzeste Zeit von 7 Tagen noch keine signifikanten Ergebnisse, auch wenn die Zellzahl für alle mit Nanopartikeln inkubierten Proben deutlich unterhalb der unbehandelten Kontrollen liegt. Nach 21 Tagen sind die bestimmten Zellzahlen für die Proben, welche mit der höheren Nanopartikelkonzentration von jeweils $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ inkubiert wurden, auf $p < 0.05$ beziehungsweise $p < 0.01$ Niveau signifikant. Im weiteren Verlauf sind nach 28 Tagen die Werte für beide Konzentrationen von STP2508 auf $p \leq 0.05$ beziehungsweise $p < 0.01$ Niveau, und für STP2755 jetzt auf $p < 0.01$ signifikant niedriger als die Werte der ohne Zugabe von Nanopartikeln untersuchten Kontrollen (Statistik: ANOVA mit Tukey Post-Hoc bei Normalverteilung).

Das schon in der Abbildung 3.15 zu sehende Ergebnis wird durch die Berechnung der Wachstumsraten sowie der Wachstumskonstanten bestätigt. Die über alle rdMSC gemittelten Wachstumsraten sind wie erwartet für die unbehandelten Zellkulturen am höchsten und zeigen für die unter Zugabe von Nanopartikeln gewachsenen Zellkulturen einen konzentrationsabhängigen Abfall (Tabelle 3.1 und Abbildung 3.16). Ebenfalls festzustellen ist, dass das Wachstum über 21 Tage und 28 Tage relativ gleichmäßig erfolgt. Auch für den längeren Zeitraum scheinen sich die Zellen noch nicht durch zu dichtes Wachstum gegenseitig zu limitieren.

Die Wachstumsgeschwindigkeiten ließen sich für den Zeitpunkt von 7 Tagen noch nicht sinnvoll auswerten, vermutlich aufgrund von Schwankungen beim Aussähen der Zellen. Nach 21 Tagen und nach 28 Tagen (siehe Abbildung 3.16) ergeben sich für die Kontrollzellkulturen Wachstumsraten pro Tag von 3,16% beziehungsweise 3,25%, also im Wesentlichen gleiche Wachstumsraten. Unter Zugabe von Nanopar-

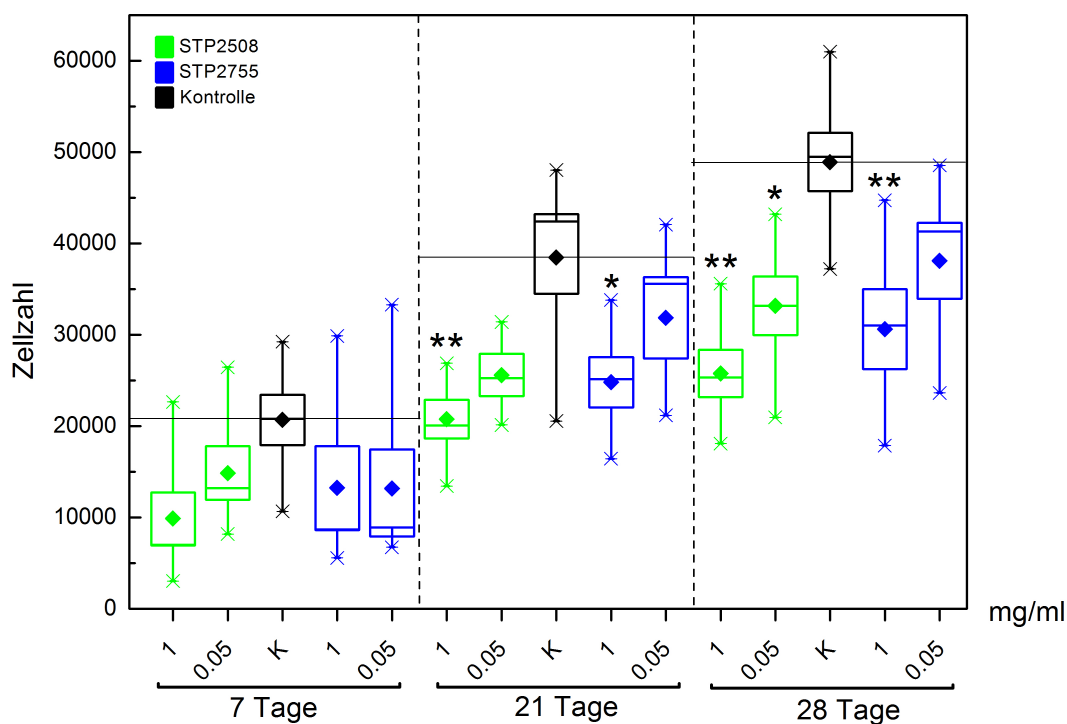


Abbildung 3.15.

Zellzahl nach Inkubationszeiten von 7 Tagen, 21 Tagen und 28 Tagen für rdMSC, $n=4$. Die Zunahme der Zellzahl verhält sich für beide Nanopartikel antiproportional zur jeweiligen Konzentration und ist für STP2508 durchweg niedriger als für STP2755. Abbildung aus (Lautenschläger et al. 2015)

Tabelle 3.1.: Wachstumsraten und Wachstumskonstanten in Abhängigkeit von Konzentration und Nanopartikeltyp

	Wachstum pro Tag in %	Wachstumskonstante [1/Tag]
STP2508 1 $\frac{mg}{ml}$, T=21 Tage	0,18%	0,002
STP2508 0,05 $\frac{mg}{ml}$, T=21 Tage	1,18%	0,012
STP2755 1 $\frac{mg}{ml}$, T=21 Tage	1,03%	0,010
STP2755 0,05 $\frac{mg}{ml}$, T=21 Tage	2,24%	0,022
Kontrolle T=21 Tage	3,16%	0,031
STP2508 1 $\frac{mg}{ml}$, T=28 Tage	0,91%	0,009
STP2508 0,05 $\frac{mg}{ml}$, T=28 Tage	1,83%	0,018
STP2755 1 $\frac{mg}{ml}$, T=28 Tage	1,53%	0,015
STP2755 0,05 $\frac{mg}{ml}$, T=28 Tage	2,33%	0,023
Kontrolle T=28 Tage	3,25%	0,032

Die Wachstumsraten sinken bei Erhöhung der Nanopartikelkonzentration für beide Nanopartikel. STP2508 induziert wieder den größeren Effekt und führt zu den deutlich geringeren Wachstumsraten verglichen mit STP2755.

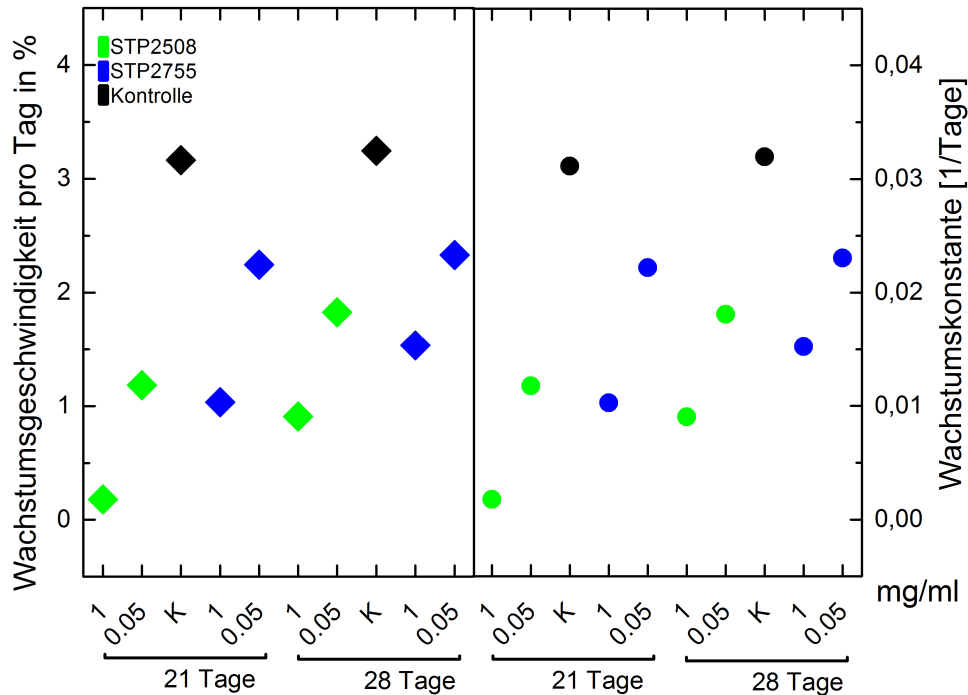


Abbildung 3.16.

Prozentuales Wachstum sowie Wachstumskonstante nach Inkubationszeiten von 21 Tagen und 28 Tagen für rdMSC, $n=4$. Zur näherungsweisen Berechnung der Wachstumsrate wurde eine Zinseszinsformel verwendet. Die Wachstumskonstante λ wurde aus $Z_t = Z_0 e^{\lambda t}$ berechnet. Als Startpunkt wurden 20000 Zellen gewählt. Es wird deutlich, dass die Zugabe von Nanopartikeln das Wachstum der rdMSC konzentrations- und nanopartikelabhängig hemmt.

3.4. Ergebnisse des Lactat-Dehydrogenase-Assays

Die bereits elektronenmikroskopisch sowie in den Langzeitversuchen lichtmikroskopisch beobachtete Zellschädigung durch STP2508 lässt sich ebenfalls im LDH Assay für Proben mit Inkubationszeiten von 24 h und 72 h beobachten (siehe Abbildung 3.17). Proben, welche mit STP2508 inkubiert wurden, führten zu deutlichen Anstiegen des LDH Quotienten. Quotienten größer 0,1 werden als Anhalt für Toxizität gewertet. Für längere Inkubationszeiträume ist die Durchführung des LDH Assays nicht möglich, da das Medium alle 5 Tage gewechselt wurde. Sowohl nach 24 h als auch nach 72 h vermittelt die höhere Konzentration von STP2508 einen auf einem Signifikanzniveau von $< 0,01$ gemessenen Anstieg des freigesetzten LDH und damit einen Hinweis auf eine Toxizität des verwendeten Nanopartikels. Insbesondere die niedrigeren Konzentrationen beider Nanopartikel führten zu keinem statistisch signifikanten Anstieg der LDH Freisetzung relativ zu den Kontrollen. Die höhere Konzentration von STP2755 führte nach 72 h ebenfalls zu einem Anstieg der LDH Freisetzung, dieser Anstieg ist allerdings nicht signifikant. Zur statistischen Auswertung wurde eine nicht parametrische ANOVA nach Kruskal-Wallis mit paarweisen Vergleichen, bei nicht festgestellter Normalverteilung, durchgeführt.

3.5. Spenderabhängige Variabilität der LDH Freisetzung

Die von uns untersuchten verschiedenen rdMSC zeigen eine große Spendervariabilität sowohl hinsichtlich ihrer Wachstumsgeschwindigkeit während 21 Tagen als auch hinsichtlich der durch die verwendeten Nanopartikel induzierten negativen Effekte. Abbildung 3.18 zeigt einen Vergleich von Zellzahl der jeweiligen rdMSC nach 21 Tagen (Startbedingung: $10000 \frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$, keine Nanopartikel im Medium) sowie dem Quotienten aus ins Medium freigesetztem LDH und Gesamt-LDH für Konzentrationen von $1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ für beide Nanopartikel. Die am langsamsten wachsende Zellkultur ZK47 erreicht in 21 Tagen nur eine relative Zellzunahme von circa 21%, während schneller wachsende rdMSC wie ZK51 eine 87% und die beiden am schnellsten proliferierenden rdMSC ZK67 und ZK46 sogar eine Zunahme der Zellzahl um 128% offenbaren. Die LDH Freisetzung ist bei rdMSC mit schnellerem Wachstum deutlich erhöht im Vergleich zu langsam wachsenden Zellkulturen. Am deutlichsten wird der Effekt im Falle von ZK67 und ZK46 nach einer Inkubationszeit von 72 h sowie für den Nanopartikel STP2508. STP2755 liegt in allen Konzentrationen unter dem jeweiligen Toxizitätslevel von STP2508.

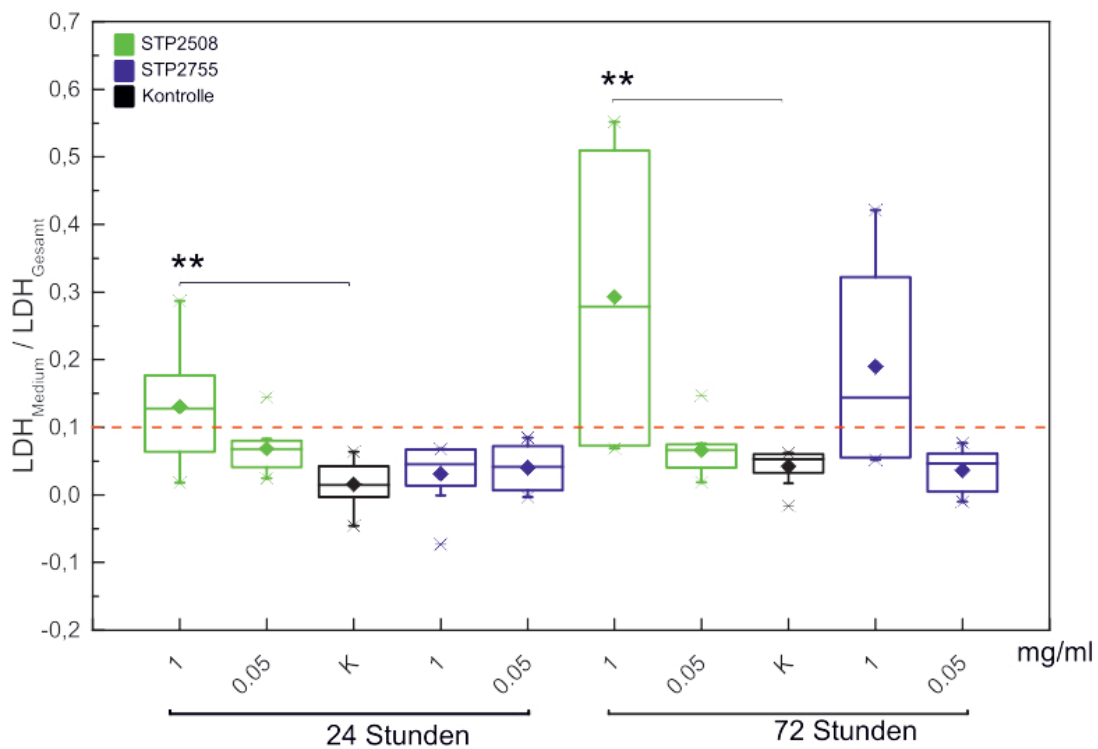


Abbildung 3.17.

Bestimmung der Toxizität der untersuchten Nanopartikel anhand der Freisetzung der Lactatdehydrogenase aus den Zellen relativ zum Gesamtgehalt an Lactatdehydrogenase. Die rote Linie markiert eine Freisetzungsgrenze ins Medium der LDH von 0,1 (10%), eine Freisetzung von $\geq 10\%$ wird als Hinweis auf Toxizität gewertet. Abbildung aus (Lautenschläger et al. 2015).

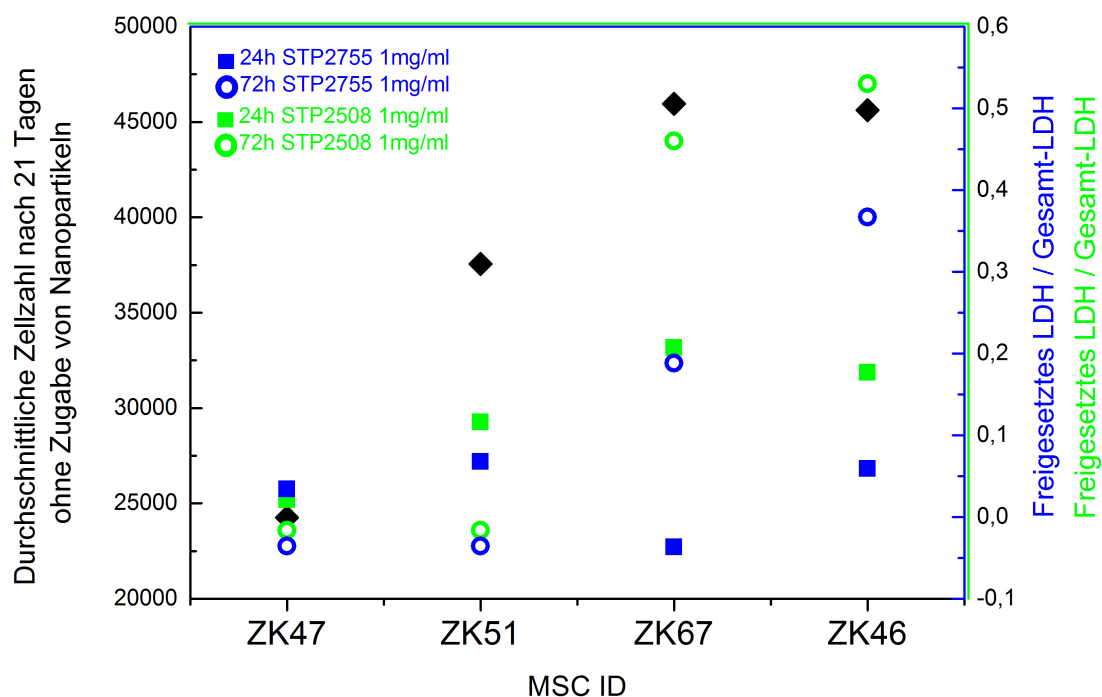


Abbildung 3.18.

Vergleich von Proliferation nach 21 Tagen sowie freigesetztem LDH nach 24 h und 72 h für vier verschiedene rdMSC Kulturen. Die schwarzen Diamanten repräsentieren die jeweilige Zellzahl nach 21 Tagen, die verschiedenen Bedingungen hinsichtlich der Nanopartikel sind blau (STP2755) beziehungsweise grün (STP2508) markiert. Abbildung aus (Lautenschläger et al. 2015).

3.6. Osteogene Differenzierung - Resultate des ALP Assays, Quantifizierung der Zellzahl mittels DC Protein Assay sowie Von-Kossa-Färbung und histomorphometrische Auswertung der Mineralisation

Um einen potentiellen Einfluss der verwendeten Nanopartikel auf die Differenzierungsfähigkeit der rdMSC zu untersuchen, wurden die bereits erwähnten 4 rdMSC Zelllinien osteogen differenziert. Dies erfolgte durch Inkubation in einem entsprechenden osteogenen Medium (siehe Material und Methoden). Die Konzentrationen beider Nanopartikel wurden, nach Auswertung der initialen Untersuchungen zur Toxizität, jeweils $\leq 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ gewählt. Drei Konzentrationen, $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$, $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$, $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$, von STP2508 und STP2755 sowie 3 Inkubationszeiten, 7 Tage, 21 Tage und 28 Tage, wurden untersucht. Die aus dem ALP Assay gewonnene ALP Konzentration wurde mittels der aus den Ergebnissen des DC Protein-Assays gewonnenen Zellzahl auf ALP pro Zelle verrechnet und anschließend auf die Kontrolle normiert. Die Normierung auf die jeweilige Kontrolle war erforderlich, da die verschiedenen rdMSC sehr unterschiedlich stark Alkalische-Phosphatase bildeten und daher ein Auftragen der Absolutwerte jeder rdMSC zu keinen schlüssigen Ergebnissen geführt hätte.

Im DC-Protein Assay (Abbildung 3.19) zeigte sich für die Bestimmung der Zellzahl ein ähnlicher Verlauf wie bei den undifferenzierten MSC. Die Zellzahl war konzentrations- und nanopartikelabhängig niedriger verglichen mit den unbehandelten Kontrollen, nach 28 Tagen Inkubation für die höhere und mittlere Konzentration von STP2508 signifikant mit $p < 0,001$ sowie für STP2755 in der höheren Konzentration mit $p < 0,001$ und in der mittleren Konzentration mit $p < 0,01$. Für die niedrigste Konzentration ($1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) ist, trotz fehlender Signifikanz, ebenfalls ein negativer Einfluss auf die Proliferation wahrscheinlich.

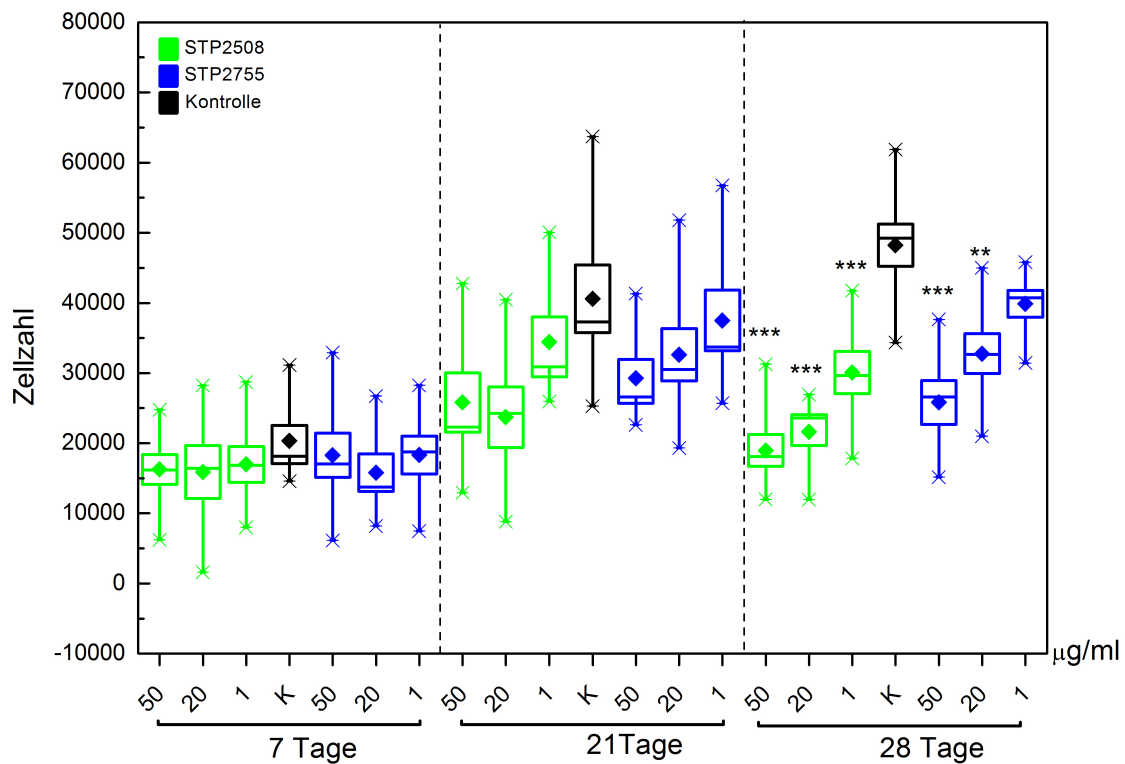


Abbildung 3.19.

Zellzahl nach Inkubationszeiten von 7 Tagen, 21 Tagen und 28 Tagen für osteogen differenzierte MSC. Die Zunahme der Zellzahl verhält sich für beide Nanopartikel antiproportional zur jeweiligen Konzentration und ist für STP2508 durchweg niedriger als für STP2755. Abbildung aus (Lautenschläger et al. 2015).

Die alkalische Phosphatase als Leitenzym der Osteoblasten zeigt normiert auf die Zellzahl und die entsprechenden Kontrollen keine Abhängigkeit von Art und Konzentration der verwendeten Nanopartikel. Um eine positive osteogene Differenzierung der rdMSC zu bestätigen, wurden Von-Kossa gefärbte Proben mikroskopiert und histomorphometrisch ausgewertet. Auf Abbildung 3.21 und Abbildung 3.22 ist für jede untersuchte Bedingung deutlich die Produktion von mineralisierter Matrix zu erkennen. Die schwarzen Strukturen repräsentieren die entsprechenden mineralisierten Strukturen. Eine histomorphometrische Auswertung mittels eines Computerprogramms an 5 unterschiedlichen Stellen der jeweiligen Probe wurde durchgeführt. Die ermittelten Werte für die Mineralisierung der Probe wurden auf die Mineralisierung der jeweiligen Kontrolle normiert. Letztendlich ohne statistische Signifikanz (Nichtparametrische ANOVA nach Kruskal-Wallis), aber doch nicht auszuschließen, scheint der bislang hinsichtlich seiner Toxizität unterlegene Nanopartikel STP2508 eventuell einen positiven Einfluss auf die Bildung von mineralisierter Matrix innerhalb der jeweiligen osteogenen Probe zu haben. Ohne eine weitere Reduktion der Toxizität wird hier aber eine Aussage nicht präzisierbar sein. Zumindest ist festzustellen, dass die eingesetzten Nanopartikel keinen negativen Einfluss haben, also die Differenzierung der rdMSC zu Osteoblasten nicht hemmen.

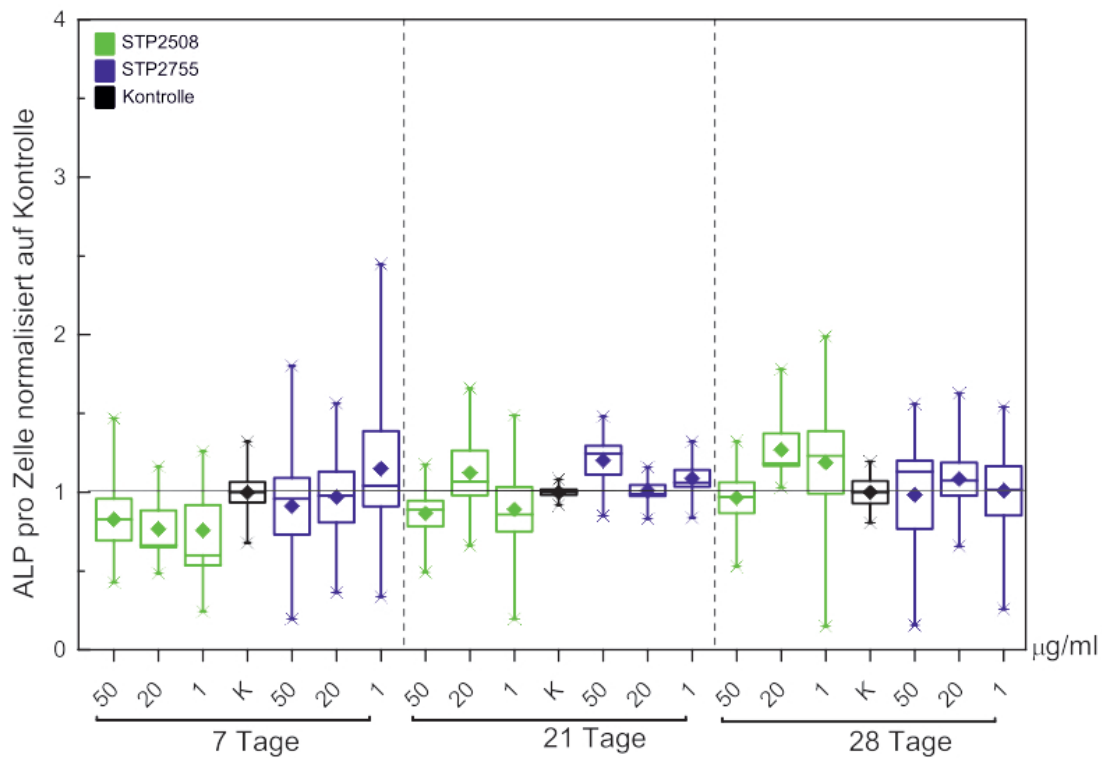
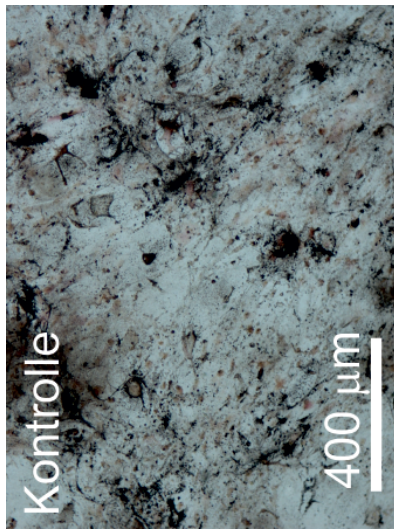
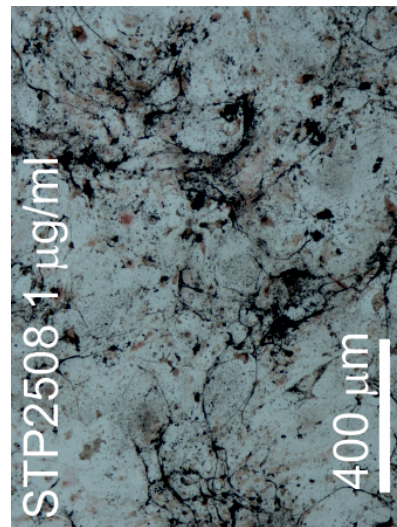


Abbildung 3.20.

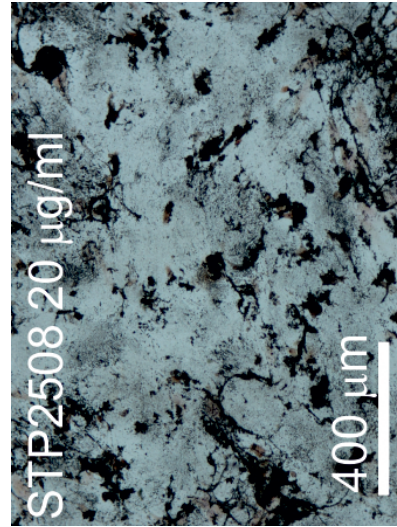
Konzentration des Enzyms Alkalische Phosphatase pro Zelle für osteogen differenzierte MSC. Es konnten keine statistisch signifikanten Änderungen unter Zugabe der verschiedenen Nanopartikel festgestellt werden. Abbildung aus (Lautenschläger et al. 2015).



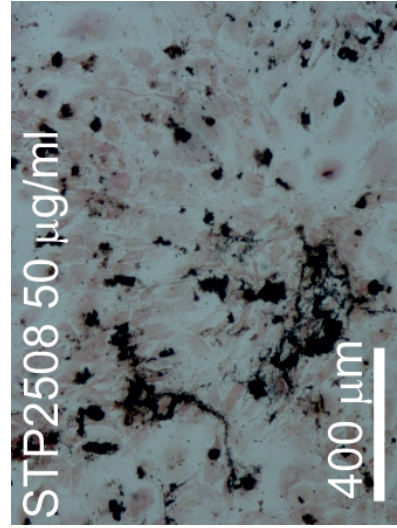
(a) Von-Kossa Färbung einer nicht mit Nanopartikeln behandelten Kontrolle.



(b) Von-Kossa Färbung einer mit $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ STP2508 inkubierten Probe.



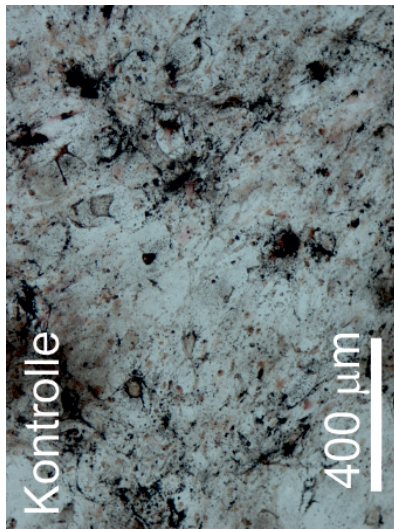
(c) Von-Kossa Färbung einer mit $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ STP2508 inkubierten Probe.



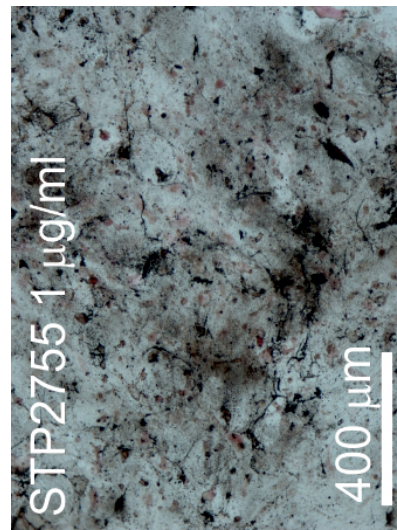
(d) Von-Kossa Färbung einer mit $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ STP2508 inkubierten Probe.

Abbildung 3.21.

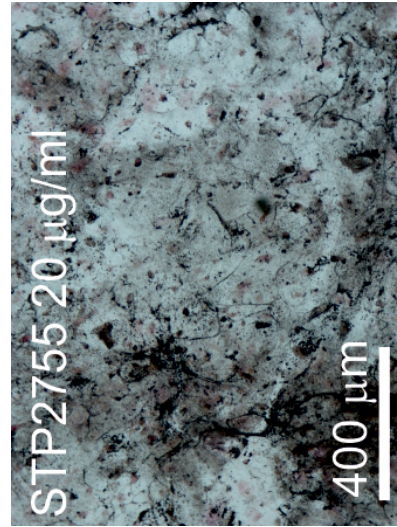
Von-Kossa-Färbung der ohne Nanopartikel inkubierten Probe sowie mit STP2508 in verschiedenen Konzentrationen inkubierten Serien. Die schwarzen Strukturen stellen mineralisierte Matrix dar.



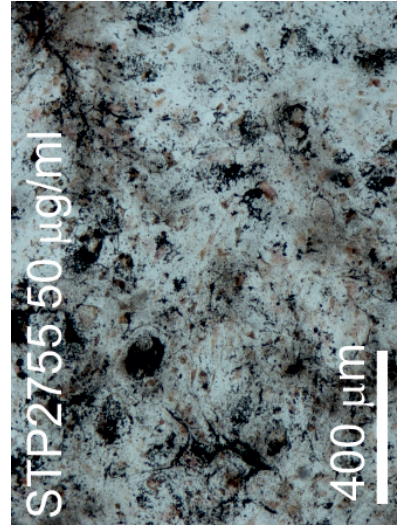
(a) Von-Kossa Färbung einer nicht mit Nanopartikeln behandelten Kontrolle.



(b) Von-Kossa Färbung einer mit $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ STP2755 inkubierten Probe.



(c) Von-Kossa Färbung einer mit $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ STP2755 inkubierten Probe.



(d) Von-Kossa Färbung einer mit $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ STP2755 inkubierten Probe.

Abbildung 3.22.

Von-Kossa-Färbung der ohne Nanopartikel inkubierten Probe sowie mit STP2755 in verschiedenen Konzentrationen inkubierten Serien. Die schwarzen Strukturen stellen mineralisierte Matrix dar.

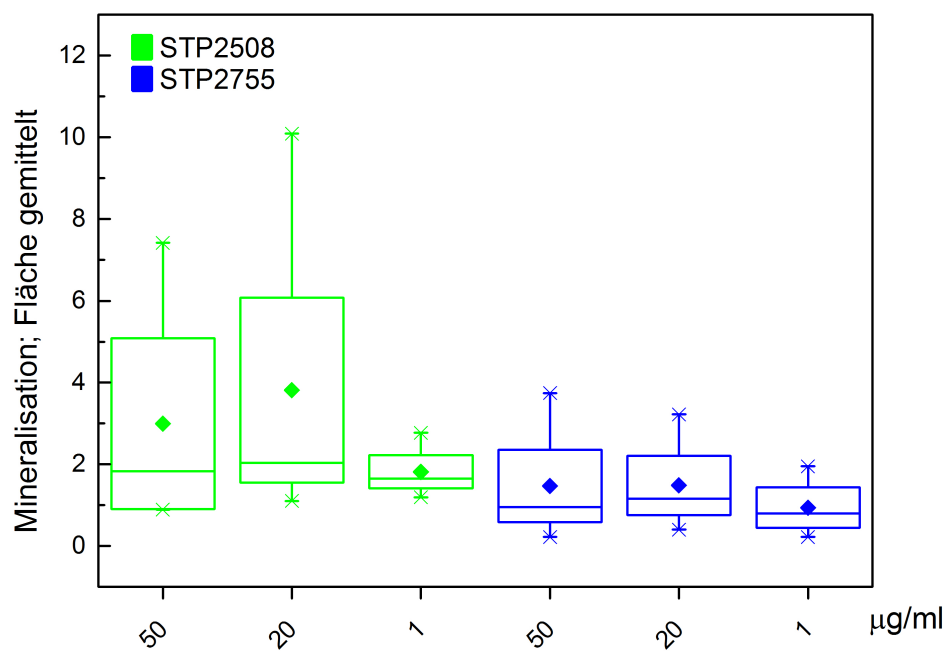


Abbildung 3.23.

Histomorphometrische Auswertung der von-Kossa gefärbten Proben. Es läßt sich keine statistisch signifikante Änderung des Mineralisierungsverhaltens durch Zugabe der Nanopartikel nachweisen. Abbildung aus (Lautenschläger et al. 2015).

4. DISKUSSION

Oligosaccharid-modifizierte Polyethylen-Nanopartikel besitzen eine Reihe möglicher Anwendungen im Bereich der Biologie und Medizin. Sie eignen sich, unter anderem, als Transportsysteme für Pharmaka, nicht-virale Vektoren, eröffnen potentielle Wege für neue Tumorthérapien und sind in der Lage fehlgefaltete Proteine wie zum Beispiel Prionen zu Monomeren aufzubrechen und so ihre fatale Wirkung zu unterbinden (Appelhans et al. 2015). Natürlich müssen, neben diesen erwünschten Wirkungen, mögliche negative Effekte der Nanopartikel sowohl in-vivo als auch in-vitro abgeklärt werden. Insbesondere der in-vitro Untersuchung in der Zellkultur fällt hierbei die Aufgabe der Erstuntersuchung zu um im Vorfeld zu in vivo Experimenten biologische Eigenschaften, potentielle Dosierungen und eventuelle negative Effekte der eingesetzten OM-PEI Nanopartikel aufzudecken.

4.1. Diskussion der verwendeten Untersuchungsmethoden

Um eine potentielle Toxizität der eingesetzten Nanopartikel zu überprüfen haben wir eine Kombination verschiedener Untersuchungsmethoden verwendet. Es kamen lichtmikroskopische Lebendzellbeobachtungen, transmissionselektronische Untersuchungen sowie ein quantitativer Assay (LDH-Assay) zum Einsatz. Lichtmikroskopisch lassen sich insbesondere Veränderungen in der Zelldichte, Zellform, Zellgröße sowie in der Kern- Zytoplasmarelation analysieren. Für die regelmäßigen Lebendzellbeobachtungen wurden keine Färbemethoden angewandt. Dies hätte die folgende Untersuchung mittels quantitativer Assays beeinflusst. Die Toxizität lässt sich durch verschiedene Assays beurteilen, einerseits können toxische Effekte direkt durch die Störung der Zellmembran (zum Beispiel durch den LDH-Assay) gemessen werden, andererseits kann eine Reduktion der Viabilität der Zellen (messbar durch unter anderem den MTT- oder XTT-Assay) im Umkehrschluss als eine Zunahme der Toxizität betrachtet werden. Die Zellviabilität beispielsweise skaliert mit dem Umsatz der Tetrazoliumsalze 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) oder (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) (XTT) durch intrazelluläre Enzyme und NADPH zu dem jeweiligen Formazan (unter Aufspaltung des zentralen Ringes) (Berridge

et al. 2005). Dies führt zu einer Violettfärbung, welche im Absorptionsspektrometer detektiert werden kann. Die Färbung skaliert mit dem Gehalt an NADPH und damit mit am ehesten mit der Glykolyseaktivität der Zelle (Berridge et al. 2005). Die Toxizität ist hier dann als Reduktion der Viabilität zu beurteilen. Neben MTT- oder XTT- Assays existieren noch weitere Viabilitätsassays. Der Umsatz von ATP zu ADP kann benutzt werden, um den ATP Gehalt in den Zellen und damit ebenfalls die Stoffwechselaktivität der Zelle zu bestimmen (Riss und Moravec 2004). Die Konzentration der Lactatdehydrogenase im Medium beziehungsweise im Serum ist sowohl im Labor (Decker und Lohmann-Matthes 1988) als auch im klinischen Alltag ein wichtiger Parameter. Klinisch wird eine Erhöhung im Serum beispielsweise als Marker für Zellschädigung und Zelluntergang verwendet (Dörner 2001). In-vitro wird die Lactatdehydrogenase ebenfalls bei Schädigungen der Zellmembran ins Kulturmedium freigesetzt. Die Schädigung der Zellmembran und damit die Erhöhung der LDH Konzentration im Medium ist hier direkt messbarer Parameter der Toxizität. Die eingesetzten OM-PEI-Nanopartikel beeinflussten die Messung der LDH beziehungsweise die zugrunde liegende Umsatzreaktion, sowohl im Positiv- als auch im Negativtest nicht. Um dies nachzuprüfen haben wir Zellen ohne Zugabe von Nanopartikeln für 7 Tage inkubiert, entsprechend dem Assay-Protokoll des LDH-Assays lysiert und die Messung der LDH-Konzentration im Lysat sowohl unter Zugabe von $1 \frac{mg}{ml}$ des jeweiligen Nanopartikels als auch ohne Nanopartikel gemessen. Der Negativtest wurde mittels Zugabe der entsprechenden Menge an Nanopartikeln zu Lysis-Puffer durchgeführt. In dieser Arbeit wurde die Messung der Lactatdehydrogenase als einer der Parameter für die Beurteilung der Toxizität der untersuchten OM-PEI-Nanopartikel herangezogen. Einerseits durch die Nähe des Parameters zum klinischen Alltag, andererseits durch die entsprechende Nicht-Beeinflussbarkeit durch die Nanopartikel eignete sich der verwendete quantitative LDH-Assay für die Fragestellung. Das Verfahren des Assays, die Bildung des Quotienten aus der LDH-Konzentration im Serum sowie der Gesamt-LDH Konzentration führt zur Bildung eines gegenüber Einflussfaktoren auf den Stoffwechsel der Zelle robusteren Messwertes verglichen mit den Viabilitätsassays. So führen beispielsweise unterschiedliche Konzentrationen von D-Glucose im Medium zu verschiedenen Messwerten im MTT-Test (Vistica et al. 1991).

Um Zellwachstum zu definieren ist die Bestimmung der Zellzahl von Nöten. Dies war insbesondere für unsere Langzeitexperimente mit Inkubationszeiten von 7 Tagen, 21 Tagen sowie 28 Tagen gefordert. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, anfangend bei mikroskopischer Auszählung der Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer, durchflusszytometrischen Verfahren wie beispielsweise dem Coulter-Prinzip (DeBlois und Bean 1970) sowie unterschiedlichen kalibrierten quantitativen Assays. Nachteil der ersten beiden Verfahrensgruppen ist, dass adhärent angewachsenen Zellen zur Un-

tersuchung trypsiniert werden müssen, um der Zählung zugeführt werden zu können. Die Rückführung der sich in Suspension befindlichen Zellen, welche bei den ersten beiden Zählverfahren angefallen sind, beispielsweise durch Zentrifugieren, führte im testweise durchgeführten Experiment zu großen Fehlern. Damit scheiden diese beiden Verfahren zur Zellzahlbestimmung im Rahmen dieser Arbeit aus da unter anderem die Konzentration der Alkalischen-Phosphatase (ALP) simultan zur Zellzahl zu bestimmen war. Diese ALP Bestimmung wurde mittels eines quantitativen Assays durchgeführt. Daher war es zur Minimierung des Fehlers sinnvoll beide Assays, die Bestimmung der Zellzahl sowie die Bestimmung der Alkalischen-Phosphatase aus dem selben Lysat vorzunehmen. Quantitative Assays lassen sich nach Kalibrierung zur Zellzahlbestimmung einsetzen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, prinzipiell ließe sich erneut der LDH-Assay verwenden. Allerdings schien uns der Einsatz des LDH Assays bei den teilweise sehr hohen LDH-Konzentrationen im Medium nicht sinnvoll da im Falle der Langzeitexperimente das Medium alle 3 - 5 Tage gewechselt wurde. Alternativ ist es ebenso möglich das Gesamtprotein innerhalb der Zelle zu messen und nach Kalibrierung in eine Zellzahl umzurechnen (Oyama und Eagle 1956). Dies geschieht wie auch in dieser Arbeit, mit dem DC-Protein-Assay. Natürlich weisen diese Messmethoden ebenfalls Fehlerquellen auf. So ist der Proteingehalt der Zelle nicht konstant und unter anderem vom Zellzyklus abhängig. Statistisch gesehen gingen wir davon aus dass sich im Rahmen der Langzeitexperimente die Zellen nicht synchronisiert hinsichtlich des Durchlaufens des Zellzykluses verhalten und dieser Einfluss daher vernachlässigbar ist. Vergleichsmessungen von Zellzahlbestimmungen des kalibrierten DC-Protein Assays und des Coulter-Prinzips resultierten in vergleichbaren Zellzahlen nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen. Ebenfalls hatten die von uns untersuchten Nanopartikel in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Funktionsweise des Assays. Ein dsDNA nachweisender Assay, wie zum Beispiel der PicoGreen Assay (Singer et al. 1997), konnte nicht verwendet werden da die verwendeten OM-PEI-Nanopartikel den Assay beeinflussten und zu einem Verschwinden des Farbsignals führten.

Ein Einblick in die Mikrostruktur lässt sich mittels der hier verwendeten, alternativen, Transmissionselektronenmikroskopie gewinnen. Durch den komplexen Prozess der Probenvorbereitung können allerdings Artefakte auftreten beziehungsweise Informationen verloren gehen. Wir haben das für Zellkultur oder Gewebeproben als etabliert zu erachtendes Verfahren der Fixierung, Entwässerung sowie Einbettung in EPON-Harz der Proben mit anschließender Präparation von Dünnschnitten angewendet. Hierbei kann es in jedem Schritt zu Fehlern kommen. So führt gegebenenfalls schon die Fixation zu osmotisch bedingten Vorgängen, Schrumpfungen oder Schwellungen können auftreten (Robinson et al. 2013). Die Fixation kann unzureichend sein was im Verlauf zum Auswaschen von Strukturen führt. Im weiteren Verlauf kann es,

je nach Entwässerungsmethode, zu Deformationen der Zellen beziehungsweise ihrer Bestandteile kommen (Robinson et al. 2013).

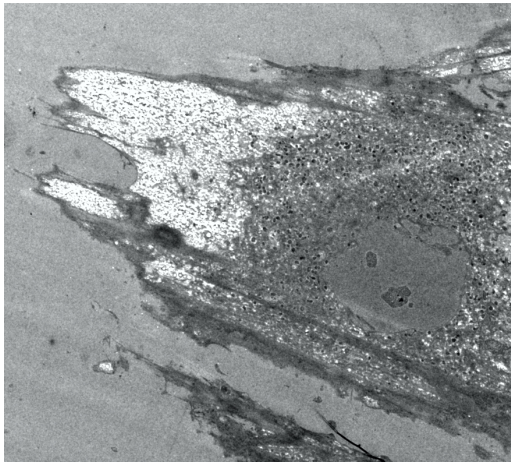


Abbildung 4.1.

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer mesenchymalen Stammzelle. Durch Fehler in der Probenpräparation ist eine aussagekräftige Auswertung des TEM-Bildes nicht möglich. Strukturen in der Zelle sind möglicherweise ausgewaschen beziehungsweise beim Schneiden durch nicht ausreichende Polymerisation des Epon-Harzes verloren gegangen.

anschaulicht die hier angefügte Abbildung 4.1.

Um die osteogene Differenzierung von rdMSC zu Osteoblasten nachzuweisen sind verschiedene indirekte sowie direkte Methoden eine Option. In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus einerseits des quantitativen Nachweises der Alkalischen-Phosphatase als einem der Leitenzyme des Knochenstoffwechsels sowie andererseits der histomorphometrischen Auswertung der Anfärbung von mineralisierter Matrix (Von-Kossa) eingesetzt. Das alleinige Verwenden von nur einer der beiden Methoden ist für sich kein sicherer Nachweis der Bildung von Osteoblasten. Mineralisierte Matrix, welche von-Kossa positiv ist, kann auch unspezifisch als sogenannte dystrophe Mineralisierung entstehen (Bonewald et al. 2003). Zusätzlich zum positiven Nachweis von Mineralisierung sind also weitere Untersuchungsmethoden von Nöten. Die Alkalische-Phosphatase, im Falle des Knochenstoffwechsels die gewebe-unspezifische Variante (TNAP), sitzt auf der Außenseite der osteoblastären Zellmembran beziehungsweise der abgeschnürten Vesikel und wandelt anorganisches Pyrophosphat in anorganisches Phosphat, welches zur Bildung von Hydroxylapatit benötigt wird, um (Orimo 2010). Die alkalische Phosphatase lässt sich sowohl quantitativ über Assays als auch primär qualitativ über Enzymhistochemische Färbemethoden (Stein und

Beim Auspolymerisieren des EPON-Harzes können wiederum Deformationen auftreten, ebenfalls ist eine unzureichende Polymerisation möglich was im Verlauf zu Problemen beim Schneidevorgang und damit zu Rissbildung oder dem Herauslösen von Zellbestandteilen führt (Robinson et al. 2013). Letztendlich ist auch der Mikroskopiervorgang selbst eine Fehlerquelle, selektive Aufladungen können zu Kontrastveränderungen oder aber zu lokalen Temperaturänderungen der Probe, und damit zu Strukturänderungen, führen. Eine sorgfältige Probenvorbereitung und Mikroskopie ist also über den gesamten Prozess hinweg von Nöten. Die Auswirkungen einer mangelhaften Durchführung des Prozesses ver-

Lian 1993) nachweisen. Wir haben uns hier für den direkten quantitativen Nachweis über das bereits im Methoden-Kapitel dieser Arbeit diskutierte Verfahren entschieden, alternativ wäre ebenfalls eine histomorphometrische Auswertung von angefärbten Proben möglich gewesen. Dies wäre hier aber mit einer größeren Ungenauigkeit sowie einem höheren Aufwand ohne zusätzlichen Erkenntnisgewinn verbunden gewesen. Eine alternative Nachweismethode der Differenzierung von rdMSC zu Osteoblasten ist die Untersuchung der Expression verschiedener Proteine, Enzyme oder Hormone, wie beispielsweise Osteocalcin, Osteonectin oder den knochenmorphogenetischen Proteinen (BMP) auf mRNA -Level mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR) (Bilbe et al. 1996). Nachteil dieser Methode ist der fehlende Nachweis der Produkte auf Proteinlevel sowie der immer noch sehr hohe Aufwand im Laboralltag. In unserem Fall war daher einerseits der Nachweis von erhöhten Leveln von Alkalischer-Phosphatase in den osteogen differenzierten Zellkulturen sowie der positive Nachweis von mineralisierter Matrix der sinnvollste Weg, um die gelungene Differenzierung der rdMSC zu Osteoblasten nachzuweisen.

Die Aufnahme der Nanopartikel in die Zelle wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie der Rhodamin-B markierten Nanopartikel untersucht. Neben den Nanopartikeln wurden ebenfalls der Kern (DAPI Färbung, siehe Methoden-Kapitel) sowie Aktin-Filamente (Phalloidin-TRITS, siehe ebenfalls Methoden-Kapitel) angefärbt. Der Nachweis der Nanopartikel kann sich hier durch Überlagerung der Lumineszenzen der verschiedenen Farbstoffe erschweren. Durch entsprechende Selektion der Farbstoffe hinsichtlich der Anregungs- sowie insbesondere Detektionswellenlängen wurde versucht, dies zu minimieren. Ebenfalls wurden die Nanopartikel im Vorfeld alleine mikroskopiert, um die optimalen Anregungs- und Detektionsbedingungen, zu evaluieren.

Tabelle 4.1.: Gewählte Anregungs- und Detektionswellenlängen

Farbstoff	Anregung	Detektion
Rhodamin B markierte Nanopartikel	405nm – 498nm	520nm
DAPI	405nm	460nm
Ph-TR	561nm	577nm

4.2. Endozytose und Verteilung der OM-PEI Nanopartikel

Die Aufnahme der OM-PEI Nanopartikel in die Zelle wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie sowie Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Nach 24 Stunden Inkubationszeit war es möglich, von beiden modifizierten Nanopartikeln Fluoreszenzsignale aus entsprechend präparierten und mit einer Konzentration von $1 \frac{mg}{ml}$

inkubierten Proben zu erhalten. Die Fluoreszenzsignale entstanden im Wesentlichen in einer perinukleär gelegenen Region. Die Nanopartikel schienen dort zu akkumulieren. Bieber et al. (Bieber et al. 2002) berichten ebenfalls über eine überwiegend perinukleäre Lokalisation ihrer PEI-DNA Komplexe. Der Aufnahmemechanismus von auf PEI basierenden Nanopartikeln ist bislang nicht abschließend geklärt. Wie in den TEM Aufnahmen der mit OM-PEI Nanopartikeln inkubierten Zellen zu sehen, erfolgt die Aufnahme der Nanopartikel für unser Experiment unter anderem durch eine forcierte Vesikelbildung an der Zellmembran. In der Literatur wird hierfür sowohl ein Clathrin- (Rejman et al. 2005, Khalil et al. 2006) als auch ein Caveolae (Rejman et al. 2005) vermittelter Prozess vorgeschlagen. Für die hier verwendeten Maltose modifizierten PEI Nanopartikel wurde an anderer Stelle über eine Clathrin unabhängige Endozytose berichtet (Höbel et al. 2011). Beide Wege führen im Endpunkt zur Bildung von Lysosomen. Auf PEI basierende Nanopartikel sind in der Lage aus dem Endosomalen/Lysosomalen System zu entkommen. Dies wird in der Literatur auf einen den Effekt eines sogenannten Protonenschwamms zurück geführt (Akinc et al. 2005). Die Wirkungsweise beruht auf einer zunehmenden Protonierung der PEI Partikel in der saurer werdenden Umgebung des späten Endosomes. Dem hierdurch folgenden Einstrom von Cl^- -Ionen folgt ein Wassereinstrom und schließlich ein Aufplatzen des Endosomes mit Freisetzung der PEI Nanopartikel ins Zytosol (Khalil et al. 2006). Der Prozess der Clathrin-gesteuerten Endozytose scheint nur für nicht aggregierte Nanopartikel zu gelten. Im Falle von aggregierten Nanopartikeln wäre nur noch eine Phagozytose möglich (Khalil et al. 2006), welche für rdMSC aber als eher unwahrscheinlich anzusehen ist. Für eine Inkubationsdauer von 24 Stunden finden sich in unseren Experimenten in den TEM Aufnahmen Aggregate von STP2508 an der Zellmembran. Es werden aber weiterhin Endozytose Vesikel gebildet, daher ist davon auszugehen, dass nicht alle Nanopartikel aggregieren beziehungsweise der Zustand zumindest teilweise reversibel ist.

4.3. Toxizität sowie Hemmung des Wachstums durch OM-PEI Nanopartikel

In der Literatur wird der Ursprung der Toxizität von OM-PEI Nanopartikeln verschiedenen Mechanismen zugeordnet. Sowohl die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Calarco et al. 2013, Appelhans et al. 2015) als auch eine Änderung des mitochondrialen Membranpotentials (Appelhans et al. 2015) können die Zelle in die Apoptose führen. Schlussendlich kann eine direkte negative Wirkung auf die DNA ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, Berichte über eine Genotoxizität

liegen allerdings bislang eher für unmodifizierte PEI-Partikel vor (Appelhans et al. 2015). Insbesondere die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies wurde ebenfalls für andere dendritische Strukturen als Hauptfaktor ihrer toxischen Wirkung angesehen. So berichten Kuo et al. (Kuo et al. 2007) über den Einfluss von kationischen PPI auf die Generation von ROS in Makrophagen. Die Autoren finden eine Erhöhung der Erzeugung von ROS durch die Zugabe von PPI und eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen ROS Erzeugung und Entgiftung. Entsprechende Hinweise auf eine Störung der Integrität der Mitochondrien in unseren rdMSC durch STP2508 finden sich zum Beispiel in Abbildung 3.7. Janaszewska et al. (Janaszewska et al. 2012) untersuchten in ihrem Experiment sowohl unmodifizierte als auch Maltotriose-modifizierte PPI. Ebenfalls wurden PAMAM Nanopartikel untersucht. Hier wurde eine reduzierte Toxizität für die modifizierten Nanopartikel festgestellt, beobachtete toxische Effekte wurden aber ebenfalls auf die Erzeugung von ROS zurückgeführt. Für primäre rdMSC von unterschiedlichen Spendern wird in der Literatur eine große Variabilität hinsichtlich ihrer Reaktionen auf äußere Stimuli beschrieben. So variieren beispielsweise die Proliferationsgeschwindigkeit (Phinney et al. 1999), die Reaktion auf inflammatorische Stimuli (Zhukareva et al. 2010) oder der Einfluss von Wachstumsinhibitoren wie Lactat oder Ammoniak (Schop et al. 2009) auf die rdMSC. Unsere rdMSC zeigten hinsichtlich ihrer Wachstumsgeschwindigkeit ebenfalls eine große Spenderabhängigkeit, sowohl für unbehandelte als auch für mit verschiedenen Nanopartikelkonzentrationen inkubierten Zellkulturen. Des Weiteren offenbarte sich hier ein möglicher Zusammenhang zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit sowie der beobachteten Toxizität der Nanopartikel im LDH-Assay. Signifikante toxische Effekte zeigten sich im Beobachtungszeitraum nur für den größeren der beiden Partikel, STP2508, für die höhere der getesteten Konzentrationen ($1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$). Die Abhängigkeit der Toxizität vom Molekulargewicht der untersuchten OM-PEI Strukturen wird in der Literatur ebenfalls berichtet (Fischer et al. 1999, Gutsch et al. 2013, Höbel et al. 2011). Sie steigt proportional zur molekularen Masse an. Speziell im Vergleich der beiden Nanopartikel STP2508 sowie STP2755 findet sich ebenfalls eine deutlich bessere Biokompatibilität für den leichteren STP2755 verglichen mit dem schwereren STP2508, sowohl in-vivo (Gutsch et al. 2013) als auch in-vitro (Höbel et al. 2011). Hinsichtlich der spenderabhängigen Reaktion der rdMSC auf die Zugabe der Nanopartikel war die Freisetzung der LDH ins Serum für schnell wachsende rdMSC wie ZK67 und ZK46 nach 72 Stunden deutlich höher als für die eher langsam proliferierende ZK47. ZK51, welche eine mittlere Wachstumsrate besitzt, lag auch in der LDH Freisetzung im mittleren Bereich (siehe 3.18). In Zusammenschau mit den bisherigen Berichten aus der Literatur waren unsere TEM Aufnahmen (3.7) auch dahingehend zu interpretieren, dass die Beschädigung der Mitochondrien eine Rolle für die Toxizität der Nanopartikel spielt. Dieser mit-

ochondriale Schaden ist am ehesten durch die Generierung von ROS verursacht und ist in diesem Ausmaß nur für STP2508 festzustellen. STP2755 ist auch hier auf mikrostruktureller Ebene hinsichtlich der Toxizität dem schwereren OM-PEI Partikel STP2508 überlegen.

Bislang beschränkten sich die meisten in-vitro Untersuchungen mit OM-PEI Nanopartikeln auf Inkubationszeiten zwischen 24 Stunden und 72 Stunden (Calarco et al. 2013, Wen et al. 2009, Höbel et al. 2011, Florea et al. 2002). Des Weiteren wurden häufig maligne entartete Zelllinien wie beispielsweise Calu-3 (Adenokarzinom der Lunge)(Florea et al. 2002), SKOV-3 (Ovarial-Karzinom) (Höbel et al. 2011), HeLa (Cervix-Karzinom) (Wen et al. 2009) oder HepG2 (Hepatoblastom) (Wen et al. 2009) verwendet. Durch ihr abnormes Teilungsverhalten sowie die häufige Mutation von Apoptose induzierenden Strukturen wie zum Beispiel p53, K-Ras oder in der Bcl2-Familie stellen sie, im Gegensatz zu rdMSC, keine geeignete in-vitro Test-Plattform für anschließende in-vivo Versuche dar. Ebenfalls zu beachten ist unter diesem Gesichtspunkt, dass in der Literatur teilweise von einer erhöhten Toxizität von OM-PEI-Nanopartikeln in entarteten Zellen verglichen zu gesunden humanen Zellen berichtet wird (Appelhans et al. 2015). Spenderabhängige Effekte konnten mit diesen Zellkulturen ebenfalls nicht untersucht werden. Nach unseren Ergebnissen waren toxische Effekte sowohl bildgebend in transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen nach 24 Stunden, als auch mittels des quantitativen LDH Assays nach 72 Stunden aufdeckbar. Lichtmikroskopisch sicher ließen sich Veränderungen durch die Nanopartikel, insbesondere durch STP2508, erst nach einer Mindest-Inkubationsdauer von 7 Tagen aufdecken. Für, im Vergleich zu vielen der entarteten Zelllinien, langsam wachsende rdMSC ist es daher essentiell, die Inkubationszeiten auf Zeiträume von 21 Tagen bis 28 Tagen zu erweitern um entsprechende toxische Effekte ebenfalls lichtmikroskopisch sichtbar zu machen. Aufgrund der in diesen Inkubationszeiträumen mehrfach nötigen Wechsel des Kulturmediums lässt sich der LDH Assay nicht mehr zur Bestimmung der Toxizität der Nanopartikel einsetzen. Stattdessen wurde die Zellzahl mittels einer Bestimmung des Gesamtproteins rekursiv berechnet. Quantitative Assays zur Zellzahlbestimmung, welche auf dem Nachweis von dsDNA beruhen, wie beispielsweise der Picogreen Assay, ließen sich nicht einsetzen aufgrund einer Interaktion der Nanopartikel und des Assays. Nach 21 und nach 28 Tagen resultieren in mit einem der beiden Nanopartikel behandelten Zellkulturen reduzierte Zellzahlen, statistisch signifikant nach 21 Tagen für die jeweils höhere Konzentration, nach 28 Tagen im Falle von STP2508 auch für die niedrigere Konzentration. Lichtmikroskopisch zeigen sich für mit STP2508 inkubierte Zellen für beide Konzentrationen nach 21 und 28 Tagen deutlich negative Auswirkungen auf die Zellen. Eine große Anzahl an Zelltrümmern ist im Medium frei flotierend zu sehen. Wir nehmen auch hier eine Steigerung der Apoptose durch Generation von

reaktiven Sauerstoffspezies als Mechanismus der Zellschädigung an. Im Zeitraum zwischen 21 Tagen und 28 Tagen ändern sich die Auswirkungen nicht weiter, eine Art stabiler Zustand der Schädigung scheint erreicht. Daher sind 21 Tage unserer Ansicht nach die Mindestinkubationsdauer, um potentielle Effekte der Nanopartikel beurteilen zu können. Die bei beiden Nanopartikeln identische Modifikation der Hülle durch Maltose-Moleküle ist im Falle des schwereren Partikels offenbar nicht in der Lage, die positiven Ladungen des PEI-Kernes ausreichend abzuschirmen. Dies erklärt die deutlich größeren Schädigungen von STP2508 im Vergleich zum identisch modifizierten, leichteren STP2755. Entsprechend gehen unsere Ergebnisse konform mit weiteren Studien an anderen Zelltypen (Appelhans et al. 2009, Höbel et al. 2011) beziehungsweise in-vivo (Gutsch et al. 2013) Studien, welche hinsichtlich der deutlich niedrigeren Toxizität ebenfalls STP2755 dem schwereren STP2508 als überlegen sehen. Wenn auch bei den beiden hier angesprochenen in-vitro Studien insbesondere die bereits erwähnte potentielle Problematik mit maligne entarteten Zellen sowie maximal 72 Stunden dauernde Inkubationszeiten bestehen bleibt.

4.4. Differenzierungseigenschaften der rdMSC unter dem Einfluss der OM-PEI Nanopartikel

Untersuchungen zum Differenzierungsverhalten von rdMSC unter Einfluss von OM-PEI-Nanopartikeln existieren in der Literatur bislang nicht. In der Literatur existieren allerdings Berichte über den Einfluss von eingesetzten Materialien auf die Differenzierungseigenschaften von MSC. Dalby et al. (Dalby et al. 2007) berichten über einen positiven Einfluss auf die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten von chaotisch angeordneten Oberflächenstrukturen, welche durch lithographische Strukturierung von Polymethylmethacrylat (PMMA) erzielt wurde. Einen anderen Ansatz verfolgen Oh et al. (Oh et al. 2009). Hier werden verschiedene strukturierte Titan-Nanoröhren eingesetzt, die verwendete Struktur hat großen Einfluss auf die Differenzierung der MSC. Für die chondrogene Differenzierung von MSC zu Knorpelzellen schließlich scheint bei Verwendung von Kollagen-Matrizen nur für Kollagen Typ II Matrizen eine chondrogene Differenzierung zu erfolgen (Bosnakovski et al. 2006). Die entsprechenden Untersuchungen von Dalby et al. und Oh et al. wurden für den Fall der osteogenen Differenzierung ohne osteogenes Medium durchgeführt. Neben dem Einfluss der Matrix auf welcher die MSC aufwachsen, spielen ebenfalls in die Zelle aufgenommene Nanopartikel einen Einfluss auf die Differenzierungseigenschaften der MSC. Gold Nanopartikel haben, einmal in die Zelle aufgenommen, einen aktivierenden Einfluss auf den p38 MAPK Signalweg und führen so zur verbesserten osteogenen Differenzierung der MSC (Yi et al. 2010). Für Silbernanopartikel in subtoxischen Konzentrationen wurde in einer anderen Studie kein Einfluss auf die Differenzierungseigenschaften gefunden (Pauksch et al. 2014). Die Studien von Yi et al. sowie von Pauksch et al. wurden beide unter Inkubation in osteogenem Medium durchgeführt. Der Einsatz von verschiedenen Materialien kann also durchaus einen Einfluss auf die Differenzierungseigenschaften der MSC haben, entweder osteoinduktiv ohne das klassische osteogene Medium wie im Falle der verschiedenen Matrices (Dalby et al. 2007, Oh et al. 2009, Bosnakovski et al. 2006) oder aber verstärkend hinsichtlich der osteogenen Differenzierung wie von Yi et al. berichtet.

Da wir für unsere rdMSC und die verwendeten OM-PEI Nanopartikel keine intrinsische Aktivierung der osteogenen Differenzierung feststellen konnten, weder morphologisch noch im ALP Assay, haben wir die Experimente unter Verwendung von osteogenem Medium durchgeführt. Wir untersuchten sowohl das Wachstumsverhalten der aus rdMSC differenzierten Osteoblasten unter dem Einfluss der Nanopartikel als auch die Expression der Alkalischen-Phosphatase als Leitenzym des Knochenstoffwechsels und die Bildung von mineralisierter Matrix. Die Konzentrationen der Nanopartikel im Medium wurden nach sorgfältiger Evaluation der Vorversuche angepasst. Es wurden folgende Konzentrationen von STP2508 respektive STP2755 verwendet:

1 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$, 20 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ sowie 50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$. Die Nanopartikel führten, wie schon im Falle der undifferenzierten rdMSC, auch hier zu reduzierten Zellzahlen und Wachstumsgeschwindigkeiten. Lichtmikroskopisch lassen sich insbesondere für die höhere und mittlere Konzentration von STP2508 nach 7 Tagen Zelltrümmer im Medium nachweisen. Dieses Verhalten war ebenfalls wieder konzentrations- und nanopartikelabhängig und für den schwereren STP2508 ausgeprägter. Die Konzentration der Alkalischen-Phosphatase pro Zelle hingegen wurde von den Nanopartikeln nicht beeinflusst. Die histomorphometrischen Auswertungen der von-Kossa gefärbten Aufnahmen führten zu keinem statistisch signifikanten Ergebniss, allerdings läßt sich ein eventueller positiver Einfluss auf die Bildung von mineralisierter Matrix durch STP2508 mutmaßen (siehe Grafik 3.23). Gegebenenfalls findet eine direkte Interaktion der Nanopartikel mit intrazellulär befindlichen Signalkaskaden oder aber ebenfalls eine Beeinflussung des p38 Signalwegs (Yi et al. 2010) durch die Generierung von ROS, welche von Ito et al. (Ito et al. 2006) für Experimente mit Hepatozyten als möglich angesehen wird, statt. Durch die bessere Abschirmung positiver Ladungen des leichteren STP2755 ist diese Interaktion möglicherweise unterdrückt. Allerdings ist ohne weitere Reduktion der Toxizität des Nanopartikels STP2508 keine endgültige Aussage möglich, da toxische Effekten gegenüber den positiven Effekte auf die Differenzierung überwiegen beziehungsweise diese maskieren. Beim gegenwärtigen Stand unserer Experimente ist nach Evaluation der ALP Assays und der histomorphometrischen Auswertungen keiner der beiden Nanopartikel, STP2508 oder STP2755, in den von uns getesteten Konzentrationen, den Differenzierungseigenschaften der rdMSC zu Osteoblasten abträglich. Unter Zusammenschau der durchgeführten Experimente, des ALP Assays, der Von-Kossa-Färbung mit histomorphometrischer Auswertung, des DC-Protein Assays sowie der lichtmikroskopischen Aufnahmen lässt sich in Summe wieder eine Überlegenheit von STP2755 gegenüber STP2508 feststellen. Die Differenzierungseigenschaften werden durch STP2755 nicht vermindert und die Toxizität ist deutlich reduziert gegenüber STP2508. Gegebenenfalls ist STP2755 daher als geeigneter Kandidat für einen Medikamententransport beziehungsweise als Vektor für die Gentherapie im Knochenstoffwechsel geeignet.

4.5. Resümee und Ausblick

Beide von uns untersuchten Nanopartikel, STP2508 mit einem Molekulargewicht des PEI Kerns von $25000 \frac{g}{mol}$ sowie STP2755 mit $5000 \frac{g}{mol}$, werden gut in mesenchymale Stammzellen aus Bohrmehl aufgenommen. Auf die Differenzierung der rdMSC zu Osteoblasten haben beide Partikel keinen negativen Einfluss, STP2508 scheint die Differenzierung eventuell sogar positiv zu beeinflussen. Dies kann aus den histomorphometrischen Auswertungen der von-Kossa gefärbten Proben geschlossen werden, allerdings noch nicht statistisch signifikant.

Beide Nanopartikel üben sowohl auf rdMSC als auch auf Osteoblasten einen proliferationshemmenden Einfluss aus. Dieser ist konzentrationsabhängig für beide Partikel und für den größeren der Beiden, STP2508, stärker ausgeprägt. Neben dem wachstumshemmenden Einfluss besitzt insbesondere STP2508 ferner eine direkte toxische Wirkung auf die rdMSC und Osteoblasten. Diese Wirkung kann als Störung der mitochondrialen Integrität im TEM nach 24 Stunden, lichtmikroskopisch nach 7 Tagen sowie im quantitativen LDH Assay nach 24 Stunden bzw. nach 72 Stunden nachgewiesen werden. Weiteres wichtiges Ergebnis ist die spenderabhängige Variabilität in der Reaktion der rdMSC auf die verwendeten Nanopartikel. Dies ist insbesondere dahingehend wichtig, da bisherige Experimente mit den hier untersuchten OM-PEI Nanopartikeln diese Variabilität nicht berücksichtigt haben (Appelhans et al. 2009, Höbel et al. 2011). Zusammenfassend über alle Experimente hinweg geht STP2755 als der, für weitere Untersuchungen, insbesondere in-vivo, geeignetere OM-PEI Nanopartikel hervor. Direkte Zellschädigungen wie von STP2508 ausgelöst konnten bei ihm nicht beobachtet werden.

Zukünftige Studien sollten den Einfluss, insbesondere von STP2508, auf die Differenzierung der rdMSC weiter untersuchen. Neben der durchgeführten Untersuchungen könnten hier realtime-PCR Untersuchungen auf beispielsweise RUNX2 oder ALP (Matsubara et al. 2008) weitere Erkenntnisse liefern. Ebenfalls wäre es interessant, einen potentiellen genotoxischen Effekt aufzuklären. Materialtechnisch kann versucht werden, die Biokompatibilität der Nanopartikel durch Einbringen neuer funktioneller Gruppen zu verbessern.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In unserer alternden Gesellschaft wird die effektive Behandlung von Erkrankungen des Skelettsystems eine zunehmend komplexere Aufgabe. Beim lokalen oder systemischen Einsatz von neuartigen Materialien, wie beispielsweise Nanopartikeln, sind komplexe Interaktionen und Auswirkungen ihres Einsatzes zu berücksichtigen. Mesenchymale Stammzellen sind mit ihrer Differenzierungskapazität in die verschiedenen osteogenen sowie chondrogenen Zelllinien geeignetes Untersuchungssystem im Bereich des Knochenstoffwechsels, um neuartige nanopartikuläre Funktionsmaterialien einem ersten in-vitro Test zu unterziehen. Eine Quelle für vitale MSC ist Bohrmehl, welches bei unfallchirurgischen Eingriffen anfällt. Aus ihm lassen sich, durch geeignete Wahl des Kulturmediums, vitale, differenzierungsfähige MSC gewinnen. Ein Vorteil der direkten Gewinnung aus Spendermaterial ist die Verfügbarkeit von Zellen verschiedener Individuen. Spenderabhängige Variabilitäten der Auswirkungen der getesteten Materialien lassen sich so besser darstellen als bei Verwendung nur einer Zelllinie. Im Vorfeld zu in-vivo Untersuchungen müssen diese Materialien umfassend in-vitro untersucht werden, um potentiell erwünschte sowie unerwünschte Effekte frühzeitig zu erkennen. Dendritische Moleküle wie beispielsweise Polyethylenimin sind interessante Kandidaten für die systemische sowie lokale Anwendung im lebenden Organismus. Sie sind relativ einfach und in großen Mengen synthetisierbar und werden gut in die Zelle aufgenommen. Modifikationsmöglichkeiten ergeben sich insbesondere durch Substitution der endständigen Amino-Gruppen beispielsweise durch verschiedene Zucker oder aber durch Größen- und Verzweigungsvariation des PEI-Kerns. Sie sind geeignete nicht-virale Vektoren, um beispielsweise DNA oder siRNA in die Zelle zu transportieren. Im unmodifizierten Zustand weisen die PEI Moleküle eine relativ hohe Toxizität gegenüber Zellen auf, hauptsächlich durch positive Ladungen verursacht. Zuckersubstituenden wie beispielsweise im hier untersuchten Fall Maltose, reduzieren die Toxizität durch Reduktion der positiven Gesamtladung deutlich. Wir untersuchten den Einfluss von zwei PEI Nanopartikeln mit unterschiedlichem PEI-Kern ($25000 \frac{mg}{mol}$ sowie $5000 \frac{mg}{mol}$) auf vier MSC von unterschiedlichen Spendern welche bei unfallchirurgischen Eingriffen gewonnen wurden. Die Aufnahme der Nanopartikel in die Zelle wurde mittels Transmissions- sowie Fluoreszenzmikroskopie entsprechend markierter Partikel untersucht. In den gewählten Untersuchungszeiträumen von 1 h bis 24 h konnte eine Aufnahme der

Partikel in die Zelle gezeigt werden, lokalisiert waren die Nanopartikel nach 24 h insbesondere perinukleär. Untersuchungen zur Toxizität, durchgeführt mittels funktioneller Assays (LDH), TEM sowie optischer Mikroskopie, mit Inkubationszeiten von 24 h, 72 h und 7 Tagen offenbarten eine deutliche Abhängigkeit negativer Effekte vom Molekulargewicht des applizierten modifizierten PEI Partikels. Für STP2508 ($25000 \frac{mg}{mol}$) war die Toxizität in allen Untersuchungen im Vergleich zur Kontrolle und MSC inkubiert mit STP2755 ($5000 \frac{mg}{mol}$) deutlich erhöht. Elektronenmikroskopisch ließ sich der Effekt nach 24 h bereits nachweisen, insbesondere durch Affektion der Mitochondrien. Mittels des LDH-Assays war nach 72 h ein statistisch signifikanter Einfluss nachweisbar, lichtmikroskopisch ebenfalls beginnend nach 72h, deutlich ausgeprägter allerdings erst nach 7 Tagen. Der toxische Response der Zellen war ebenfalls abhängig von der Konzentration der Nanopartikel im Kulturmedium und für Konzentrationen von $1 \frac{mg}{ml}$ deutlich höher als für $50 \frac{\mu g}{ml}$. Ferner existierte eine ausgeprägte spenderabhängige Variabilität bezüglich der ausgelösten Toxizität durch die Nanopartikel. Langsamer proliferierende MSC waren unempfindlicher als schneller wachsende.

Langzeituntersuchungen von 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen zeigten ebenfalls einen wachstumshemmenden Einfluss der Nanopartikel auf die MSC. Mittels des entsprechend kalibrierten DC-Protein-Assays wurde statistisch signifikant ein wachstumshemmender Effekt für beide Nanopartikel nach 14 Tagen beziehungsweise nach 21 Tagen gefunden.

Experimente zum Einfluss der OM-PEI-Nanopartikel auf die osteogene Differenzierung der MSC wurden mit reduzierten Konzentrationen der Nanopartikel im osteogenen Medium durchgeführt. $1 \frac{\mu g}{ml}$, $20 \frac{\mu g}{ml}$ sowie $50 \frac{\mu g}{ml}$ wurden gewählt. Im durchgeführten ALP Assay waren keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Bildung des Enzyms Alkalische-Phosphatase normiert auf die Zellzahl zu erkennen, allenfalls ein Trend nach 21 Tagen beziehungsweise 28 Tagen zu einer erhöhten Bildung der ALP nach Inkubation mit $20 \frac{\mu g}{ml}$ von STP2508. Die histomorphometrische Auswertung der durchgeführten Von-Kossa-Färbungen offenbarte ebenfalls kein signifikantes Ergebnis, allerdings war ein Trend zu einer besseren Mineralisierung der mit dem schwereren, toxischeren STP2508 behandelten Zellen zu erkennen. Ebenfalls für die mittlere Konzentration von $20 \frac{\mu g}{ml}$.

Als Schlussfolgerung ergeben sich folgende Aussagen. Eine Toxizität konnte für den Nanopartikel mit dem höheren Molekulargewicht STP2508 mittels verschiedene Methoden für Konzentrationen von $1 \frac{mg}{ml}$ sowie $50 \frac{\mu g}{ml}$ nachgewiesen werden. Proliferationshemmende Effekte werden von beiden Nanopartikeln verursacht. Signifikante Einflüsse auf die Osteoblastogenese sowie die Mineralisierung konnten nicht nachgewiesen werden.

6. SUMMARY

The development of effective treatments of diseases of the musculo-skeletal system is one major task for future research. The application of novel materials, like nanoparticles for example, requires intensive investigations of interactions and effects. Mesenchymal Stemcells are capable to differentiate in different cells like osteoblasts, chondroblasts or adipocytes. They are suitable to investigate novel nanoparticulate materials regarding their influence on the bone metabolism. A source of vital MSC is remaining debris, harvested during trauma surgery. Harvested from different donors, they are capable to reveal donor-to-donor variabilities in the cellular reactions on administered materials and pharmaceuticals. Preliminary to in-vivo experiments, in-vitro tests are necessary for the early detection of adverse effects.

Dendritic molecules, like Polyethylenimine for example, are promising candidates for the systemic or local application in living organisms. They feature easy synthesis and a good cellular uptake. They can be modified by changing the PEI core or by substitution of their Amino-groups with different other groups. PEI nanoparticles are efficient non-viral vectors for the DNA and si-RNA transfection of cells. Unmodified PEI features a relative high toxicity, mainly due to positive charges of the Amino-groups. By substitution of Amino-groups with Maltose as an example the positive charge can be reduced, enhancing the biocompatibility. We investigated the influence of two different, Maltose modified PEI nanoparticles, with different weights of the PEI core (STP2508 25000 $\frac{mg}{mol}$ and STP2755 5000 $\frac{mg}{mol}$) and the same Maltose modification on four different MSC, harvested from individual donors in trauma surgery. The uptake of the nanoparticles has been monitored by TEM and Fluorescence Microscopy for incubation times of 1h to 24 h. After 24 h the incorporated nanoparticles feature a perinuclear distribution. The toxicity has been investigated by TEM, optical microscopy and functional assays (LDH- assay) for incubation times of 24 h and 72 h. The observed toxicity was strongly dependent on the nanoparticle concentration, 1 $\frac{mg}{ml}$ and 50 $\frac{\mu g}{ml}$ have been used, and the weight of the PEI core particle. Exclusively the heavier particle resulted in an increased toxic response from most, pronounced for the fast proliferating MSC. Negative influences from the nanoparticles in optical microscopy could be impressively detected after prolonged incubation times of one week. To determine the total cell count the DC protein assay has been calibrated. Long term investigations of 7 days, 21 days and

28 days yielded in a concentration dependent reduction of cellular proliferation for both nanoparticles, statistically significant after 21 days, respective 28 days.

To check if the medium containing nanoparticles has an influence on the osteogenic differentiation a series of trials with nanoparticle concentrations of $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$, $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ and $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ for both nanoparticles and incubation times of 7 days, 21 days and 28 days have been conducted. The normalized Alkaline Phosphatase activity per cell has been measured and histomorphometric evaluation of von-Kossa stained samples has been undertaken. Despite a certain trend towards an increase in as well ALP activity as mineralization for osteogenic medium containing $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ of STP2508 no statistically significant result could be reached. While not certainly osteoinductive, the nanoparticles tested here are no obstacle for the osteogenic differentiation at all. In conclusion the heavier nanoparticle STP2508 possesses a certain toxicity for both tested concentrations. Both nanoparticles slow down cellular growth. The osteogenesis is not negatively influenced by addition of the nanoparticles.

Abkürzungsverzeichnis

2 – (4 – *iodophenyl*) – 3 – (4 – *nitrophenyl*) – 5 – *phenyl* – 2*H* – *tetrazolium* - INT

4,6-Diamino-2-phenylinol - DAPI

Adenosin - A

Adenosindiphosphat - ADP

Adenosintriphosphat - ATP

Alkalische Phosphatase - ALP

Analysis of variance - ANOVA

charge-coupled-device - CCD

Cluster of Differentiation - CD

Detergent - Compatible - DC

Dexoxyribonukleinsäure - DNA

Dots per inch - DPI

Dulbecco modified Eagles medium - DMEM

Embryonale Stammzellen - ESC

Enzyme-linked-immunosorbent-assay - ELISA

Fetales Kälberserum - FKS

Granulozyten Colony stimulierender Factor - G-CSF

Humane mesenchymale Stammzellen - hMSC

Humanes Immundefizienz Virus - HIV

Kohlenstoffdioxid - CO_2

Kupfer - Cu

Lactat-Dehydrogenase - LDH

Mesenchymale Stammzellen - MSC

Mesenchymale Stammzellen aus Bohrmehl - rdMSC

Messenger Ribonukleinsäure - mRNA

Nicotinamidadenindinukleotid [oxidiert/reduziert] - $NAD^+/NADH$

Oligo-Maltose - OM

Osterix - *Osx*

Paraformaldehyd - PFA

Para-Nitrophenylphosphat - pnPP

Phalloidin gekoppeltes Tetramethylrhodamin - Ph-TR

Phosphat gepufferte Salzlösung - PBS

P-Nitrophenol - pNP

Polyamidoamin - PAMAM

Polyethylenglycol - PEG

Polyethylenimin - PEI

Polymerasekettenreaktion - PCR
Polymethylmetacrylat - PMMA
Pyrophosphat - PPI
Reaktive Oxygen species - ROS
Runt-related-transcription factor - Runx2
small-interferring - si
Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase - TNAP
Tyrosin - T
Wasser - H_2O
Zellkultur - ZK

Einheiten

Grad Celcius - °C
Gramm - g
Mikrogramm - μg
Mikroliter - μl
Mikrometer - mm
Milligramm - mg
Milliliter - ml
Millimeter - mm
Minute - min
Nanometer - nm
Sekunde - s
Stunde - h
Tag - d

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1. Aus Bohrmehl gewonnene mesenchymale Stammzellkultur	2
1.2. Modell des Zusammenspiels von Osteoblasten und Osteoklasten . . .	4
1.3. Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten . .	5
2.1. Aufbau und Modifikation der eingesetzten OM-PEI-Nanopartikel, Ab- bildung aus (Lautenschläger et al. 2015)	12
2.2. Bohrmehl in einer Zellkulturschale direkt nach der Entnahme aus dem menschlichen Knochen	12
2.3. Reduktion von INT zu Formazan, dem aktiven Farbstoff im Cyto- Tox96 Assay, Abbildung Public Domain (Vickers 2008)	15
3.1. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Nanopartikelaufnahme .	27
3.2. TEM Kontrollaufnahme einer nicht mit Nanopartikeln behandelten Zellkultur	29
3.3. Detailvergrößerung einer nicht-behandelten Zellkultur	29
3.4. TEM, 60 Minuten nach Hinzufügen von STP2508	30
3.5. TEM- Detailsvergrößerung, 60 Minuten nach Hinzufügen von STP2508	30
3.6. TEM, 60 Minuten nach Hinzufügen von STP2755	31
3.7. Zellschäden in der TEM-Aufnahme, 24 h nach Hinzufügen von STP2508	31
3.8. Aggregatbildung an der Zellmembran durch STP2508 nach 24h	32
3.9. Lichtmikroskopie, Inkubationszeit 72h mit STP2508	34
3.10. Lichtmikroskopie, Inkubationszeit 72 h mit STP2755	35
3.11. Lichtmikroskopie, Inkubationszeit 7 Tage mit STP2508	36
3.12. Lichtmikroskopie, Inkubationszeit 21 Tage mit STP2508	37
3.13. Lichtmikroskopie, Inkubationszeit 21 Tage mit STP2755	38
3.14. Lichtmikroskopie-Detailvergrößerung, Inkubationszeit 21 Tage mit STP2508	39
3.15. Zellzahl nach Inkubationszeiten von 7 Tagen, 21 Tagen und 28 Tagen unter Zugabe von Nanopartikeln	41
3.16. Prozentuales Wachstum sowie Wachstumskonstante nach Inkubati- onszeiten von 21 Tagen und 28 Tagen	42
3.17. Bestimmung der Toxizität der untersuchten Nanopartikel anhand der Freisetzung der Lactatdehydrogenase	44

3.18. Vergleich von Proliferation nach 21 Tagen sowie freigesetztem LDH nach 24 h und 72 h	45
3.19. Zellzahl nach Inkubationszeiten von 7 Tagen, 21 Tagen und 28 Tagen für osteogen differenzierte MSC	47
3.20. Konzentration des Enzyms Alkalische-Phosphatase pro Zelle für os- teogen differenzierte MSC	49
3.21. Von-Kossa Färbung für mit STP2508 inkubierte rdMSC	50
(a). Von-Kossa Färbung einer nicht mit Nanopartikeln behandel- ten Kontrolle.	50
(b). Von-Kossa Färbung einer mit $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ STP2508 inkubierten Probe.	50
(c). Von-Kossa Färbung einer mit $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ STP2508 inkubierten Probe.	50
(d). Von-Kossa Färbung einer mit $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ STP2508 inkubierten Probe.	50
3.22. Von-Kossa Färbung für mit STP2755 inkubierte rdMSC	51
(a). Von-Kossa Färbung einer nicht mit Nanopartikeln behandel- ten Kontrolle.	51
(b). Von-Kossa Färbung einer mit $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ STP2755 inkubierten Probe.	51
(c). Von-Kossa Färbung einer mit $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ STP2755 inkubierten Probe.	51
(d). Von-Kossa Färbung einer mit $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ STP2755 inkubierten Probe.	51
3.23. Histomorphometrische Auswertung der von-Kossa gefärbten Proben	52
4.1. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer mesenchyma- len Stammzelle, fehlerhafte EPON-Einbettung	56

TABELLENVERZEICHNIS

2.1. Übersicht der verwendeten Zellkulturen	13
2.2. Parameter der Eichgeraden zur Zellzahlbestimmung	18
2.3. Gewählte Anregungs- und Detektionswellenlängen	23
3.1. Wachstumsraten und Wachstumskonstanten in Abhängigkeit von Kon- zentration und Nanopartikeltyp	41
4.1. Gewählte Anregungs- und Detektionswellenlängen	57

LITERATURVERZEICHNIS

- Abshagen K, Schrodi I, Gerber T, Vollmar B. 2009. In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute NanoBone®. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91(2):557–566.
- Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R. 2005. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *The journal of gene medicine*, 7(5):657–663.
- Alconcel SN, Baas AS, Maynard HD. 2011. FDA-approved poly (ethylene glycol)–protein conjugate drugs. *Polymer Chemistry*, 2(7):1442–1448.
- Appelhans D, Klajnert-Maculewicz B, Janaszewska A, Lazniewska J, Voit B. 2015. Dendritic glycopolymers based on dendritic polyamine scaffolds: view on their synthetic approaches, characteristics and potential for biomedical applications. *Chemical Society reviews*, (44):3968–3996.
- Appelhans D, Komber H, Quadir MA, Richter S, Schwarz S, van der Vlist, Jereon, Aigner A, Müller M, Loos K, Seidel J, Arndt KF, Haag R, Voit B. 2009. Hyperbranched PEI with Various Oligosaccharide Architectures: Synthesis, Characterization, ATP Complexation, and Cellular Uptake Properties. *Biomacromolecules*, 10(5):1114–1124.
- Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. 1990. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *Journal of cellular physiology*, 143(2):213–221.
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11:127–152.
- Bieber T, Meissner W, Kostin S, Niemann A, Elsasser HP. 2002. Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine–DNA complexes. *Journal of Controlled Release*, 82(2-3):441–454.
- Bielinska AU, Chen C, Johnson J, Baker JR. 1999. DNA complexing with polyamidoamine dendrimers: implications for transfection. *Bioconjugate chemistry*, 10(5):843–850.

-
- Bilbe G, Roberts E, Birch M, Evans D. 1996. PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. *Bone*, 19(5):437–445.
- BIO-RAD. DC Protein Assay Instruction Manual. BIO-RAD, Life Science Research, Education, Process Separations, Food Science 2000 Alfred Nobel Drive Hercules, California 94547 USA.
- Blessing T, Kurasa M, Holzhauser R, Kircheis R, Wagner E. 2001. Different Strategies for Formation of PEGylated EGF-Conjugated PEI/DNA Complexes for Targeted Gene Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 12(4):529–537.
- Bonewald L, Harris S, Rosser J, Dallas M, Dallas S, Camacho N, Boyan B, Boskey A. 2003. von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcified tissue international*, 72(5):537–547.
- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. 2006. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnology and bioengineering*, 93:1152–1163.
- Bozzola JJ, Russell LD. 1999. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. Jones & Bartlett Learning.
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. 1997. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of cellular biochemistry*, 64(2):278–294.
- Calarco A, Bosetti M, Margarucci S, Fusaro L, Nicolì E, Petillo O, Cannas M, Galderisi U, Peluso G. 2013. The genotoxicity of PEI-based nanoparticles is reduced by acetylation of polyethylenimine amines in human primary cells. *Toxicology Letters*, 218(1):10–17.
- Cano ML, Cassimeris L, Joyce M, Zigmond SH. 1992. Characterization of tetramethylrhodaminyl-phalloidin binding to cellular F-actin. Cell motility and the cytoskeleton, 21(2):147–158.
- Caplan AI. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 9(5):641–650.
- Charyeva O, Dakischew O, Sommer U, Heiss C, Schnettler R, Lips KS. 2015. Biocompatibility of magnesium implants in primary human reaming debris-derived cells stem cells in vitro. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*:1–11.

-
- Clark G. 1981. Staining procedures. Vierte Aufl. Baltimore: Published for the Biological Stain Commission by Williams & Wilkins.
- Coukell AJ, Brogden RN. 1998. Liposomal amphotericin B. *Drugs*, 55(4):585–612.
- Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, Wilkinson CDW, Oreffo ROC. 2007. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature materials*, 6(12):997–1003.
- Dann O, Bergen G, Demant E, Volz G. 1971. Trypanocide Diamidine des 2-Phenylbenzofurans, 2-Phenyl-indens und 2-Phenyl-indols. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 749(1):68–89.
- De Broglie L. 1924. Recherches sur la theorie des Quanta. *Physics Migration - universite en cours d'aectation*,.
- DeBlois R, Bean C. 1970. Counting and sizing of submicron particles by the resistive pulse technique. *Review of Scientific Instruments*, 41(7):909–916.
- Decker T, Lohmann-Matthes ML. 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of immunological methods*, 115(1):61–69.
- Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C, Rosset P, Sensebé L, Layrolle P, Häupl T, et al. 2008. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood*, 111(5):2631–2635.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315–317.
- Dörner PK. 2001. *Klinische Chemie und Hämatologie*. Thieme.
- Egan KP, Brennan TA, Pignolo RJ. 2012. Bone histomorphometry using free and commonly available software. *Histopathology*, 61(6):1168–1173.
- Fischer D, Bieber T, Youxin L, Elsässer HP, Kissel T. 1999. A Novel Non-Viral Vector for DNA Delivery Based on Low Molecular Weight, Branched Polyethylenimine: Effect of Molecular Weight on Transfection Efficiency and Cytotoxicity. *Pharmaceutical Research*, (16):1273–1279.

-
- Flink HJ, van Zonneveld M, Hansen BE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. 2006. Treatment with Peg-interferon α -2b for HBeAg-positive chronic hepatitis B: HBsAg loss is associated with HBV genotype. *The American journal of gastroenterology*, 101(2):297–303.
- Florea BI, Meaney C, Junginger HE, Borchard G. 2002. Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *Aaps Pharmsci*, 4(3):1–11.
- Frölke J. 2006. Intramedullary Reaming of Long Bones. In: *Practice of Intramedullary Locked Nails*. Springer, 43–56.
- Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. 1999. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9):5177–5181.
- Grunau O, Ganß C, Schlüter N. Neue Strategien zur Prävention und Therapie von Erosionen. *Zahnmedizin up2date*, 7(01):15–29.
- Gutsch D, Appelhans D, Höbel S, Voit B, Aigner A. 2013. Biocompatibility and Efficacy of Oligomaltose-Grafted Poly(ethylene imine)s (OM-PEIs) for in Vivo Gene Delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 10(12):4666–4675.
- Höbel S, Loos A, Appelhans D, Schwarz S, Seidel J, Voit B, Aigner A. 2011. Maltose- and maltotriose-modified, hyperbranched poly(ethylene imine)s (OM-PEIs): Physicochemical and biological properties of DNA and siRNA complexes. *Journal of Controlled Release*, 149(2):146–158.
- Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH. 2002. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 20(3):249–258.
- Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. 2006. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nature medicine*, 12(4):446–451.
- Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry*, 64(2):295–312.
- Janaszewska A, Maczyńska K, Matuszko G, Appelhans D, Voit B, Klajnert B, Bryszewska M. 2012. Cytotoxicity of PAMAM, PPI and maltose modified PPI

-
- dendrimers in Chinese hamster ovary (CHO) and human ovarian carcinoma (SKOV3) cells. *New Journal of Chemistry*, 36(2):428.
- Jordan A, Scholz R, Wust P, Fähling H, Felix R. 1999. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 201(1):413–419.
- Kapuściński J, Skoczylas B. 1978. Fluorescent complexes of DNA with DAPI 4',6-diamidine-2-phenyl indole 2HCl or DCI 4',6-dicarboxamide-2-phenyl indole. *Nucleic Acids Research*, 5(10):3775–3800.
- Karsenty G. 2008. Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 9:183–196.
- Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H. 2006. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacological reviews*, 58(1):32–45.
- Kokesch-Himmelreich J, Schumacher M, Rohnke M, Gelinsky M, Janek J. 2013. ToF-SIMS analysis of osteoblast-like cells and their mineralized extracellular matrix on strontium enriched bone cements. *Biointerphases*, 8(1):17.
- Kossa Jv. 1901. Über die im Organismus künstlich erzeugbaren Verkalkungen. *Beitr Path Anat*, (29):163–202.
- Kubin RF, Fletcher AN. 1982. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *Journal of Luminescence*, 27(4):455–462.
- Kuo JhS, Jan Ms, Lin Yl. 2007. Interactions between U-937 human macrophages and poly(propyleneimine) dendrimers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 120(1-2):51–59.
- Lautenschläger S, Striegler C, Dakischew O, Schütz I, Szalay G, Schnettler R, Heiß C, Appelhans D, Lips KS. 2015. Effects of dendritic core-shell glycoarchitectures on primary mesenchymal stem cells and osteoblasts obtained from different human donors. *Journal of nanobiotechnology*, 13:65.
- Lee CC, MacKay JA, Fréchet, Jean M J, Szoka FC. 2005. Designing dendrimers for biological applications. *Nature biotechnology*, 23(12):1517–1526.
- Lemaire V, Tobin FL, Greller LD, Cho CR, Suva LJ. 2004. Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling. *Journal of theoretical biology*, 229(3):293–309.

-
- Lorenzetti M, Dakischew O, Trinkaus K, Susanne Lips K, Schnettler R, Kobe S, Novak S. 2015. Enhanced osteogenesis on titanium implants by UVB photofunctionalization of hydrothermally grown TiO₂ coatings. *Journal of Biomaterials Applications*.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, et al. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1):265–275.
- Malek A, Merkel O, Fink L, Czubayko F, Kissel T, Aigner A. 2009. In vivo pharmacokinetics, tissue distribution and underlying mechanisms of various PEI(–PEG)/siRNA complexes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236(1):97–108.
- Malik N, Evagorou EG, Duncan R. 1999. Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anti-cancer drugs*, 10(8):767–776.
- Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T. 2008. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(43):29119–29125.
- Murphy M, Ting K, Zhang X, Soo C, Zheng Z. 2015. Current Development of Silver Nanoparticle Preparation, Investigation, and Application in the Field of Medicine. *Journal of Nanomaterials*, 2015(8433):1–12.
- Musto P, Scalzulli PR, Terruzzi E, Rossini F, Iacopino P, Messina G, Guariglia R, Pietrantuono G, Villani O, DAuria F, et al. 2007. Peg-filgrastim versus filgrastim after autologous stem cell transplantation: case-control study in patients with multiple myeloma and review of the literature. *Leukemia research*, 31(11):1487–1493.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1):17–29.
- Noelting E, Dziewoński K. 1905. Zur Kenntniss der Rhodamine. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 38(3):3516–3527.
- Oh S, Brammer KS, Li YSJ, Teng D, Engler AJ, Chien S, Jin S. 2009. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7):2130–2135.
- Orimo H. 2010. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *Journal of Nippon Medical School*, 77(1):4–12.

-
- Oyama VI, Eagle H. 1956. Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin-Ciocalteu). *Experimental Biology and Medicine*, 91(2):305–307.
- Pauksch L, Hartmann S, Rohnke M, Szalay G, Alt V, Schnettler R, Lips KS. 2014. Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts. *Acta Biomaterialia*, 10(1):439–449.
- Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S. 1999. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, (75):424–436.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, 284(5411):143–147.
- Promega. CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Technical Bulletin.
- Qiu LY, Bae YH. 2007. Self-assembled polyethylenimine-graft-poly(ϵ -caprolactone) micelles as potential dual carriers of genes and anticancer drugs. *Biomaterials*, 28(28):4132–4142.
- Rejman J, Bragonzi A, Conese M. 2005. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 12(3):468–474.
- Riss TL, Moravec RA. 2004. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and drug development technologies*, 2(1):51–62.
- Robinson DG, Ehlers U, Herken R, Herrmann B, Mayer F, Schürmann FW. 2013. *Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie: eine Einführung für Biologen und Mediziner*. Springer-Verlag.
- Ruska E. 1987. The development of the electron microscope and of electron microscopy. *Bioscience reports*, 7(8):607–629.
- Schop D, Janssen FW, van Rijn, Linda D S, Fernandes H, Bloem RM, de Bruijn, Joost D, van Dijkhuizen-Radersma R. 2009. Growth, metabolism, and growth inhibitors of mesenchymal stem cells. *Tissue engineering Part A*, 15(8):1877–1886.
- Schwarz RI. 1985. Procollagen secretion meets the minimum requirements for the rate-controlling step in the ascorbate induction of procollagen synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 260(5):3045–3049.

-
- Shalhoub V, Conlon D, Stein GS, Lian JB, Tassinari M, Quinn C, Partridge N. 1992. Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *Journal of cellular biochemistry*, 50(4):425–440.
- Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP. 1997. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical biochemistry*, 249(2):228–238.
- Stein GS, Lian JB. 1993. Molecular mechanisms mediating developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts. In: *Cellular and molecular biology of bone*. Academic Press San Diego, 48–95.
- Striegler C, Schumacher M, Effenberg C, Müller M, Seckinger A, Schnettler R, Voit B, Hose D, Gelinsky M, Appelhans D. 2015. Dendritic Glycopolymer as Drug Delivery System for Proteasome Inhibitor Bortezomib in a Calcium Phosphate Bone Cement: First Steps Toward a Local Therapy of Osteolytic Bone Lesions. *Macromolecular bioscience*, 15(9):1283–1295.
- Strietzel FP, Reichart PA, Graf HL. 2007. Lateral alveolar ridge augmentation using a synthetic nano-crystalline hydroxyapatite bone substitution material (Ostim®). Preliminary clinical and histological results. *Clinical oral implants research*, 18(6):743–751.
- Svenson S, Tomalia DA. 2005. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Advanced drug delivery reviews*, 57(15):2106–2129.
- Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD. 1992. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: Minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry*, 31(12):3103–3112.
- Thünemann AF, Bienert R, Appelhans D, Voit B. 2012. Core-Shell Structures of Oligosaccharide-Functionalized Hyperbranched Poly(ethylene imines). *Macromolecular Chemistry and Physics*, 213(22):2362–2369.
- Trinkaus K, Wenisch S, Siemers C, Hose D, Schnettler R. 2005. Bohrmehl: Eine Quelle vitaler Zellen! *Der Unfallchirurg*, 108(8):650–656.
- Trinkaus K, Wenisch S, Siemers C, Schnettler R. 2006a. Differentiation Capacity and Characterisation of Cells Growing out of Human Remaining Debris. In: Leung KS, Taglang G, Schnettler R, Alt V, Haarman H, Seidel H, Kempf I, Hrsg. *Practice of Intramedullary Locked Nails*. Springer Berlin Heidelberg, 57–63.

- Trinkaus K, Wenisch S, Siemers C, Schnettler R. 2006b. Practice of Intramedullary Locked Nails: Differentiation Capacity and Characterization of Cells Growing out of Human reaming debris. Springer.
- Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS. 2003. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells*, 21(6):681–693.
- Vickers T. 2008. Reduction of a tetrazolium to a formazan.
- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. 1991. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer research*, 51(10):2515–2520.
- Wang AZ, Langer R, Farokhzad OC. 2012. Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annual review of medicine*, 63:185–198.
- Wen Y, Pan S, Luo X, Zhang X, Zhang W, Feng M. 2009. A Biodegradable Low Molecular Weight Polyethylenimine Derivative as Low Toxicity and Efficient Gene Vector. *Bioconjugate Chemistry*, 20(2):322–332.
- Wenisch S, Trinkaus K, Hild A, Hose D, Herde K, Heiss C, Kilian O, Alt V, Schnettler R. 2005. Human reaming debris: a source of multipotent stem cells. *Bone*, 36(1):74–83.
- Werth S, Urban-Klein B, Dai L, Höbel S, Grzelinski M, Bakowsky U, Czubyko F, Aigner A. 2006. A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes. *Journal of Controlled Release*, 112(2):257–270.
- Yi C, Liu D, Fong CC, Zhang J, Yang M. 2010. Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. *Acs Nano*, 4(11):6439–6448.
- Zhukareva V, Obrocka M, Houle JD, Fischer I, Neuhuber B. 2010. Secretion profile of human bone marrow stromal cells: donor variability and response to inflammatory stimuli. *Cytokine*, 50(3):317–321.
- Zieringer M, Haag R. 2013. *Internet-Lehrbuch der Pharmazie, Kap Dendrimere*. Freie Universität Berlin, Institut für Pharmazie.
- Zintchenko A, Philipp A, Dehshahri A, Wagner E. 2008. Simple Modifications of Branched PEI Lead to Highly Efficient siRNA Carriers with Low Toxicity. *Bioconjugate Chemistry*, 19(7):1448–1455.

Publikationsliste

Im Rahmen dieser Dissertation sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Originalarbeit:

Effects of dendritic core-shell glycoarchitectures on primary mesenchymal stem cells and osteoblasts obtained from different human donors

Stefan Lautenschläger, Christin Striegler, Olga Dakischew, Iris Schuetz, Gabor Szalay, Reinhard Schnettler, Christian Heiss, Dietmar Appelhans and Katrin S Lips

Journal of Nanobiotechnology, 13:65 (2015) DOI 10.1186/s12951-015-0128-y

Posterbeitrag:

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien 2013 (Erlangen), P091, In vitro Zellkultur Untersuchungen mit PEI-Nanopartikeln an multipotenten Stromazellen des Knochens

Stefan Lautenschläger (Gießen), Christin Striegler (Dresden) Gabor Szalay, Christian Heiss, Reinhard Schnettler (Gießen) Dietmar Appelhans (Dresden), Katrin Susanne Lips (Gießen)

Weitere Publikationen von F.S. Lautenschläger

MRS Proceedings Fall 2005 Symposium EE Group I Elements in ZnO B. K. Meyer, J. Sann, N. Volbers, A. Zeuner, S. Lautenschläger, A. Hoffmann, U. Haboek

MRS Proceedings Fall 2005 Symposium EE Photoluminescence Investigations on a native donor in ZnO B. K. Meyer, S. Lautenschläger, J. Sann, S. Graubner, C. Neumann

MRS Proceedings Fall 2006 Somposium K Surface Preparation of Single Crystals for ZnO Homoepitaxy C. Neumann, J. Sann, S. Lautenschläger, S. Graubner, N. Volbers, B.K. Meyer, J. Blasing, A.Krost

MRS Proceedings Fall 2006 Symposium K Growth and Characterization of Homoepitaxial ZnO thin films grown by CVD C. Neumann, J. Sann, S. Lautenschläger, B.K. Meyer, F. Bertram, J. Christen, J. Blasing, A.Krost

Proceedings of SPIE Volume 6474 (2007) Photonic properties of ZnO epilayers M.R. Wagner, U. Haboeck, P. Zimmer, A. Hoffmann, S. Lautenschläger, C. Neumann, J. Sann, B.K. Meyer

Proceedings of SPIE Volume 6474 (2007) Thin film growth of ZnO and its relation to substrate properties S. Lautenschläger, J. Sann, N. Volbers, S. Graubner, C. Neumann, F. Eylert, B.K. Meyer, J. Blasing, A. Krost, F. Bertram, J. Christen

Phys. Stat. sol (b), Volume 244, Issue 5 (2007) Homoepitaxy of ZnO: from the substrates to doping C. Neumann, S. Lautenschläger, S. Graubner, J. Sann, N. Volbers, B.K. Meyer, J. Blasing, A. Krost, F. Bertram, J. Christen

Phys. Rev. B 76, 184120 (2007) Ionized and neutral donor-bound excitons in ZnO B. K. Meyer, J. Sann, S. Lautenschläger, M. R. Wagner, and A. Hoffmann

Proc. SPIE, Vol. 6895, 689502 (2008) Optical and structural properties of homoepitaxial ZnO T. P. Bartel, M. R. Wagner, U. Haboeck, A. Hoffmann, C. Neumann, S. Lautenschläger, J. Sann, and B. K. Meyer

Phys. Rev. B 77, 144108 (2008) Asymmetry in the excitonic recombinations and impurity incorporation of the two polar faces of homoepitaxially grown ZnO films S. Lautenschläger, J. Sann, N. Volbers, B. K. Meyer, A. Hoffmann, U. Haboeck, and M. R. Wagner

Journal of Applied Physics, 103, 123106 (2008) Arsenic doped zinc oxide N. Volbers, S. Lautenschläger, T. Leichtweiss, A. Laufer, S. Graubner, B. K. Meyer, K. Potzger, and Shengqiang Zhou

Physica Status Solidi (b), DOI 44347 (2008) Combinatorial growth of $\text{Zn}_{1-x}\text{Mg}_x\text{O}$ by chemical vapor deposition S. Lautenschläger, J. Sann, B. K. Meyer, M. Piechotka and P. J. Klar

Physica Status Solidi Rapid Research Letters RRL 3, 1, 16-18 (2009) Nitrogen incorporation in homoepitaxial ZnO CVD epilayers S. Lautenschläger, S. Eisermann, B. K. Meyer, G. Callison and A. Hoffmann

Phys. Rev. B 79, 035307 (2009) Influence of substrate polarity on homoepitaxial growth of ZnO layers by chemical vapor deposition Markus R. Wagner, Til P. Bartel, Ronny Kirste, Axel Hoffmann, Joachim Sann, Stefan Lautenschläger, Bruno K. Meyer and Christian Kisielowski

Physica Status Solidi (c) 02/2009; 6(2):542–54 Time-resolved photoluminescence study of mesoporous ZnO nanostructures Michael Schwalm, Swantje Horst, Alexej Chernikov, Wolfgang W. Rühle, Stefan Lautenschläger, Peter J. Klar, Bruno K. Meyer, Thomas Waitz, Michael Tiemann, Sangam Chatterjee

Journal of Crystal Growth 07/2010; 312(14):2078-2082 Morphological, structural and electrical investigations on non-polar a-plane ZnO epilayers Stefan Lautenschläger, Sebastian Eisermann, Michael N. Hofmann, Udo Roemer, Melanie Pinnisch, Andreas Laufer, Bruno K. Meyer, Holger von Wenckstern, Alexander Lajn, Florian Schmidt, Marius Grundmann, Juergen Blaesing, Alois Krost

Physical Review B 09/2010; 82(11):115207 Excited state properties of donor bound excitons in ZnO Bruno K Meyer, Joachim Sann, Sebastian Eisermann, Stefan Lautenschläger, Markus R Wagner, Martin Kaiser, Gordon Callsen, Juan S Reparaz, Axel Hoffmann

Physica Status Solidi (A) Applications and Materials 01/2011 Characterization of ZnO crystals grown by the vertical Bridgman method Sebastian Eisermann, Andreas

Laufer, Swen Graubner, Melanie Pinnisch, Jan Stehr, Stefan Lautenschläger, Detlev M. Hofmann, Bruno K. Meyer, Detlev Klimm, Detlev Schulz

Physica status solidi (b) 05/2011; 248(5):1217-1221 A model for acceptor doping in ZnO based on nitrogen pair formation S. Lautenschlaeger, M. Hofmann, S. Eisermann, G. Haas, M. Pinnisch, A. Laufer, B. K. Meyer

Physical Review B 07/2011; 84(03):035313 Bound excitons in ZnO: Structural defect complexes versus shallow impurity centers M R Wagner, G Callsen, J S Reparaz, J.-H Schulze, R Kirste, M Cobet, I A Ostapenko, S Rodt, C Nenstiel, M Kaiser, A Hoffmann, A V Rodina, M R Phillips, S Lautenschläger, S Eisermann, B K Meyer

Physical Review B 01/2012; 85(3):035201 Phonon-assisted luminescence of polar semiconductors: Fröhlich coupling versus deformation-potential scattering A Chernikov, V Bornwasser, M Koch, S Chatterjee, CN Böttge, T Feldtmann, M Kira, SW Koch, T Wassner, S Lautenschläger, BK Meyer, M Eickhoff

Physica status solidi (a) 03/2012; 209(3):531-536 Copper oxide thin films by chemical vapor deposition: Synthesis, characterization and electrical properties Sebastian Eisermann, Achim Kronenberger, Andreas Laufer, Johannes Bieber, Gunther Haas, Stefan Lautenschläger, Gerd Himm, Peter J. Klar, Bruno K. Meyer

IOP Conference Series Materials Science and Engineering 04/2012 Growth of Cubic Zinc Sulfide on (001) GaP Substrates G Haas, S Lautenschlaeger, U Roemer, S Eisermann, A Laufer, M Pinnisch, B K Meyer

Physical Review B 06/2012; 85(23):235204 Optical signatures of nitrogen acceptors in ZnO S Lautenschlaeger, S Eisermann, G Haas, E A Zolnowski, M N Hofmann, A Laufer, M Pinnisch, B K Meyer, M R Wagner, J S Reparaz, G Callsen, A Hoffmann, A Chernikov, S Chatterjee, V Bornwasser, M Koch

Ehrenwörtliche Erklärung

“Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht-veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehendspezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiats-erkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den

Friedrich Stefan Lautenschläger

Danksagung

D A N K E A N

meine Frau Gothje

meine Eltern

Prof. Dr. Katrin S. Lips

Dr. Dietmar Appelhans (Dresden)

Dr. Katja Trinkaus

Olga Dakischew

Iris Schütz

Ida Oberst

Ivonne Bergen

sowie allen anderen Kollegen aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie

ohne eure Hilfe und Unterstützung wäre das Zustandekommen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6585-0



9 783835 196585 0