

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen auf biofunktionalisierten Copolymer- Trägern

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Michel Krier

aus

Luxemburg

Göttingen 2022

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent:	Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. F. Böhrnsen
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. A. Schilling
Drittreferent/in:
Tag der mündlichen Prüfung:	Donnerstag, den 23. Februar 2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen auf biofunktionalisierten Copolymer-Trägern“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 23.02.2023

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Böhrsen F, Krier M, Grohmann S, Hauptmann N, Liefeith K, Schliephake H (2019): MSC differentiation on two-photon polymerized, stiffness and BMP2 modified biological copolymers. *Biomed Mater* 14, 035001

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Anforderungen an die Trägergestaltung.....	4
1.2 Auswahl eines Trägermaterials	4
1.3 Verfahrenstechniken für die Gerütherstellung.....	6
1.4 Biofunktionalisierung der Träger durch Oberflächenmodifikationen	7
1.4.1 Biofunktionalisierung durch topografische Modifikation	8
1.4.2 Biofunktionalisierung durch Wachstumsfaktoren	8
1.4.3 Biofunktionalisierung durch Manipulation der mechanischen Filmsteifigkeit.....	10
1.5 Humane mesenchymale Stromazellen (hMSC).....	10
1.6 Zielsetzung.....	11
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Standardbedingungen	13
2.2 Materialien und Geräte	13
2.3 LCM3 und UDMA.....	16
2.4 Synthese des (D,L)-Lactid-co-ε-Caprolacton-dimethacrylat (LCM3)	16
2.5 3D-Probekörper-Herstellung und deren Biofunktionalisierung	17
2.6 2D-Probekörper-Herstellung	19
2.6.1 Biofunktionalisierung durch die PEM-Beschichtung.....	19
2.6.2 Biofunktionalisierung durch die BMP-2-Modifizierung.....	20
2.6.3 Biofunktionalisierung durch die PGA-Modifizierung.....	20
2.7 Humane mesenchymale Stromazellen (hMSC).....	21
2.8 Allgemeine Zellkulturarbeiten	21
2.8.1 Auftauen der kryokonservierten Lonza-hMSC.....	21
2.8.2 Anzucht von hMSC.....	22
2.8.3 Subkultivierung der hMSC im Verfahren der Anzucht	23
2.8.4 Kryokonservierung der hMSC.....	24

2.9	Spezielle Kultivierung der hMSC auf den 3D- und 2D-Probekörpern	24
2.10	Immunhistologie.....	25
2.10.1	Immunfluoreszenzmarkierungen.....	26
2.10.2	Immunhistochemische Markierungen	28
2.11	Statistische Analyse.....	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Proliferation und Vimentin-Expression von hMSC auf 3D-Probekörpern	32
3.2	Proliferation und Differenzierung von hMSC auf biomimetischen EZM-analogen Polymerbeschichteten 2D-Probekörpern	37
3.3	Proliferation und Differenzierung von hMSC auf steifigkeitsmodifizierten 2D-Probekörpern	40
3.4	Proliferation und Differenzierung von hMSC auf BMP-2-modifizierten 2D-Probekörpern	42
4	Diskussion	47
4.1	Trägermaterialien.....	47
4.2	Oberflächenmodifikation durch Mikrostrukturierung.....	48
4.3	Biofunktionalisierung durch PEM-Beschichtung und deren Steifigkeitsmodifikation.....	49
4.4	Biofunktionalisierung durch die Kombination von PEM und Wachstumsfaktor BMP-2	50
4.5	Ausblick	51
5	Zusammenfassung	53
6	Literaturverzeichnis.....	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozess der tissue engineering-Methode modifiziert nach Dvir et al. (2011).....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung des 2PP-Prozesses modifiziert nach Felfel et al. (2016).....	7
Abbildung 3: humane mesenchymale Stromazellen (hMSC) in Kultur	11
Abbildung 4: Strukturformel des (D,L)-Lactid-co-ε-Caprolacton-dimethacrylat.....	16
Abbildung 5: Strukturformel des Urethan-dimethacrylat.....	16
Abbildung 6: schematische Darstellung eines TOPO-Chip-Probekörpers	18
Abbildung 7: steigende Konfluenzstadien der hMSC.....	23
Abbildung 8: Darstellung der direkten und indirekten Methode der Fluoreszenzmarkierung.....	26
Abbildung 9: Darstellung der indirekten Methode der immunhistochemischen Markierung	29
Abbildung 10: rel. Proliferation der hMSC auf verschiedenen Porengrößen (LCM3).....	32
Abbildung 11: rel. Proliferation der hMSC auf einzelnen Porengrößen (LCM3).	33
Abbildung 12: rel. Proliferation der hMSC auf verschiedenen Porengrößen (UDMA).	34
Abbildung 13: rel. Proliferation der hMSC auf einzelnen Porengrößen (UDMA).....	35
Abbildung 14: rel. Proteinexpression auf verschiedenen Porengrößen (LCM3).	36
Abbildung 15: rel. Proteinexpression auf verschiedenen Porengrößen (UDMA).	36
Abbildung 16: rel. Proliferation der hMSC auf (PLL-CS) ₂₀ -Oberflächen.	38
Abbildung 17: rel. Proteinexpression der hMSC auf (PLL-CS) ₂₀ -Oberflächen.....	39
Abbildung 18: rel. Proliferation der hMSC auf (PLL-CS) ₂₀ +PGA-Oberflächen.....	40
Abbildung 19: rel. Proteinexpression der hMSC auf (PLL-CS) ₂₀ +PGA-Oberflächen.	41
Abbildung 20: rel. Proliferation der hMSC auf BMP-2-modifizierten (PLL-CS) ₂₀ -Oberflächen.	43
Abbildung 21: rel. Proteinexpression der hMSC auf BMP-2-modifizierten (PLL-CS) ₂₀ -Oberflächen.....	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften von verschiedenen Knochentransplantaten und -ersatzmaterialien.....	2
Tabelle 2: Übersicht der meistverwendeten Polymere im BTE.....	5
Tabelle 3: Materialien und Geräte.....	13
Tabelle 4: Inhalt zur Herstellung des Vorläufers durch die IBA.....	17
Tabelle 5: Schreibparameter der 2PP der LCM3- und UDMA-Vorläufer.....	18
Tabelle 6: Parameter einer TOPO-Chip-Einheit.....	18
Tabelle 7: Lösungen und Chemikalien für die PEM-Beschichtung.....	20
Tabelle 8: Lösungen und Chemikalien für die BMP-2-Beschichtung.....	20
Tabelle 9: Lösungen und Chemikalien für die PGA-Beschichtung.....	20
Tabelle 10: Humane mesenchymale Stromazellen der Firma Lonza.....	21
Tabelle 11: Inhalt des Anzuchtmediums.....	22
Tabelle 12: Allgemeine Lösungen und Chemikalien.....	23
Tabelle 13: Allgemeine Lösungen und Chemikalien.....	23
Tabelle 14: Inhalt u. a. des Einfriermediums.....	24
Tabelle 15: Inhalt des Kultivierungsmedium.....	24
Tabelle 16: Inhalt der Methanol-Aceton-Lösung.....	25
Tabelle 17: Inhalt der 7,5%-BSA-Lösung.....	26
Tabelle 18: Verwendete Antikörper für die IF.....	28
Tabelle 19: 4',6-Diamidion-2-phenylindol (DAPI).....	28
Tabelle 20: Allgemeine Lösungen und Chemikalien für die IF.....	28
Tabelle 21: Allgemeine Lösungen und Chemikalien für die IHC.....	30
Tabelle 22: Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS-T (1x)).....	30
Tabelle 23: Tris-buffered saline (TBS (20x)).....	30
Tabelle 24: Verwendete Antikörper für die IHC.....	31
Tabelle 25: DAB Substrate-Chromogen System.....	31

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
2PP	Zwei-Photonen-Polymerisation
3D	dreidimensional
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMP-2	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , "Fraction V"
BTE	<i>bone tissue engineering</i>
CAD	<i>computer-aided-design</i>
CAM	<i>computer-aided-manufacturing</i>
CS	Chondrotinsulfat
CSD	<i>critical size defects</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phospholite Buffered Saline</i>
FCS, FKS, FBS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum, fetales bovines Serum
hMSC	<i>human mesenchymal stem cells</i> , <i>human mesenchymal stromal cells</i> , humane mesenchymale Stromazellen
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
LbL	<i>Layer-by-Layer</i> , Schicht für Schicht
LCM3	(D,L)-Lactid-co- ϵ -Caprolacton-dimethacrylat (Version 3)
ON	Osteonectin
PEM	<i>polyelectrolyte multilayer</i> , Polyelektrolyt-Multilayer
PGA	<i>poly-L-glutamic acid</i> , Poly-L-Glutaminsäure
PLA	Poly-(D,L)-Lactide
PLL	Poly-L-Lysin
PSA	<i>pore size area</i> , TOPO-Chip-Gruppierung
rhBMP-2	<i>recombinant human bone morphogenetic protein 2</i>
RT	Raumtemperatur (25 °C)
SU	<i>scaffold unit</i> , TOPO-Chip-Einheit
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , TBS-Puffer
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i> , TBS-T-Puffer
UDMA	Urethan-dimethacrylat

1 Einleitung

Zu den Aufgaben von Ärzten und Zahnärzten gehört u. a. die Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit des knöchernen orofazialen Systems. Klinisch zeigt sich jedoch, durch den zunehmend alternden demographischen Wandel, eine vermehrte Anzahl an muskuloskelettaler Erkrankungen, wie z. B. Frakturen, Osteoporose und Knochenpathologien (Agarwal und Garcia 2015; Holzapfel et al. 2017). Weitere Ursachen pathologischer Knochendefekte können Entzündungen, Tumoren, Traumata sowie Fehlbildungen und Nichtanlagen sein (Rentsch et al. 2012). Das große Regenerationspotential des menschlichen Knochengewebes stößt bei ausgedehnten Defekten, sogenannten *critical size defects* (CSD), an seine Grenzen, sodass trotz der steigenden Präventionsmaßnahmen häufig auf eine rekonstruktive Therapie zurückgegriffen werden muss. Um eine adäquate Rekonstruktion von CSD, im besten Fall eine *restitutio ad integrum*, sicherzustellen, ist der Gebrauch von Transplantations- oder Implantationsmaterialien eine häufig eingesetzte Methode. Heutige Knochentransplantate, -ersatzmaterialien und bioaktive Stoffe bieten die Gelegenheit den Heilungsprozess, im Fall einer ossären Rekonstruktion, durch osteokonduktive, osteogene oder osteoinduktive Mechanismen zu fördern. Fungieren die Transplantate als künstliche extrazelluläre Matrix (EZM), um die Neogenese des eigenen Knochens zu unterstützen und den Defektraum zu stabilisieren, so definiert dies den osteokonduktiven Mechanismus. Der osteogene Mechanismus hingegen, beschreibt die stimulierende Wirkung der Transplantate auf die osteogenen Zellen, die die Neubildung des Knochens aus sich heraus fördert. Der Mechanismus der Osteoinduktion ermöglicht eine Knochenneubildung durch die Transplantate, dort wo spontan keine zu erwarten wäre. Nach der biologischen Herkunft des verpflanzten Gewebes oder implantierten Fremdmaterials unterscheidet man autogene, allogene, xenogene Transplantate oder alloplastische Implantate (Schwenzer und Ehrenfeld 2011).

Allogene Transplantate sind definiert als Gewebe, welches von einem Organismus auf einen anderen Organismus der gleichen Spezies übertragen wird (Tabelle 1). Im Vergleich zu autogenen Transplantaten stehen sie in größeren Mengen zur Verfügung, jedoch ist die Integration langsamer und geringer (Ehrler und Vaccaro 2000; Starch-Jensen et al. 2020). Früher konnten nicht-konservierte allogene Knochentransplantate (*fresh frozen bone*) von Knochenbanken bezogen werden, welche heutzutage jedoch kaum noch Verwendung finden. Zum einen durch die Problematik bestimmter übertragbarer Virus- und Prionerkrankungen (HIV, BSE bzw. Creutzfeld-Jacob-Krankheit), wie auch die Gefahr einer immunologischen Abstoßungsreaktion (Vogeler et al. 2010). Als mögliche Alternative sind konservierte (gefriergetrocknete) allogene Transplantate möglich. Sie haben den Anspruch, frei von einem potenziellen Infektionsrisiko und von allergisierenden Bestandteilen zu sein. Sie sind als mineralisierte und demineralisierte Knochentransplantate erhältlich und weisen gute klinische Ergebnisse in Studien auf (Wang und Yeung 2017). Die bei der Demineralisierung deblockierten Wachstumsfaktoren können so pluripotente Stromazellen osteoinduktiv stimulieren. Jedoch sollte die mögliche Übertragung

von Infektionskrankheiten nicht unerwähnt bleiben. Das Risiko einer HIV-Übertragung wird bei ordnungsgemäßer Transplantatvorbereitung mit 1:2,8 Mio. angegeben (Vogeler et al. 2010).

Die xenogenen Knochentransplantate, die definiert sind als transplantiertes Gewebe von einer Spezies auf eine andere Spezies, sind ausreichend verfügbar (Oryan et al. 2014). Jedoch besteht die Problematik einer immunologischen Abstoßungsreaktion, weshalb xenogener Knochen nur verwendet werden soll, wenn er immunologisch nicht als Antigen wirken kann. Dazu werden die Zellen und das Weichgewebe vollständig aus dem Knochen entfernt. Es resultiert ein mineralisches Knochengerüst, welches im Rahmen des Knochenersatzes nur osteokonduktiv dienen kann. Auch die Übertragung von Virus- und Prionenerkrankungen sind beim xenogenen Knochen möglich, sodass er diesbezüglich vorbehandelt werden muss (Amid et al. 2020). Aktuell werden xenogene Knochentransplantate vor allem für die Implantologie und Parodontologie sowie zur Füllung von kleineren Knochendefekten empfohlen. Es sollte jedoch drauf hingewiesen werden, dass aus kulturellen bzw. religiösen Anlässen, bestimmte xenogene Transplantate eine Ablehnung zur Folge haben können.

Die alloplastischen Implantate werden durch das Einbringen von synthetischen Materialien in einen Organismus definiert. Sie dienen zum Ersatz von Stützgewebe, wie auch zum Auffüllen bei Weichgewebsdefekten. Sie dienen aktuell als Defektfüller und sollten bei einer biologisch gewünschten knöchernen Regeneration nur zurückhaltend zum Einsatz kommen. Hier sind lediglich osteokonduktive Eigenschaften beschrieben (Holzapfel et al. 2017; Vogeler et al. 2010). Jedoch kommt es zwischen Titan- sowie Keramikimplantaten und Knochen zu einer Osseointegration (Buser et al. 2017).

Tabelle 1: Eigenschaften von verschiedenen Knochentransplantaten und -ersatzmaterialien

	Mechanismen		
	osteoinduktiv	osteokonduktiv	osteogen
Autogene Transplantate	+	+	+
Allogene Transplantate	+/-	+/-	-
Xenogene Transplantate	-	+	-
Alloplastische Implantate	-	+	-

Dennoch ist keine der Möglichkeiten der knöchernen Rekonstruktion in der Lage eine Regeneration entsprechend dem „Goldstandard“ des autogenen Transplantates zu erfüllen. Durch eine autogene Knochentransplantation erhält man eine vollständige Histokompatibilität mit osteoinduktivem, osteokonduktivem und osteogenem Heilungspotenzial (Baldwin et al. 2019). Da autologer Knochen jedoch in einem Operationsprozess gehoben werden muss, gibt es mögliche klinische Einschränkungen wie Schmerzen in der Spenderregion, erhöhter Blutverlust, erhöhter Operationsaufwand und das Infektionspotenzial der Spenderregion (Elena et al. 2015; Khan et al. 2005; Lu et al. 2011). Zudem besteht ein limitiertes Angebot an Transplantatvolumen. Die

Umgehung dieser Limitationen erfordert die Entwicklung eines Knochenersatzmaterials, welches osteokonduktive, osteoinduktive und osteogene Mechanismen besitzt.

Ein durch *tissue engineering* (TE) hergestelltes Knochenimplantat könnte die Limitationen von Knochenersatzmaterialien beheben und der schnelleren Knochenformation sowie -regeneration dienen. Es vereint die positiven Eigenschaften der autologen Osteoinduktion, ohne dabei die Nachteile der operativ gewonnenen, autologen Transplantate nach sich zu ziehen (Holzapfel et al. 2013). Um diese Geweberegeneration zu ermöglichen gibt es zellbasierte Therapien, gewebeinduzierende Faktoren und biokompatible Träger, die entweder einzeln oder in Kombination angewendet werden können (Holzapfel et al. 2017; Leistner et al. 2013).

Im Prozess des TE wird zunächst ein künstlich hergestelltes Implantat, bestehend aus der Kombination von Zellen und einem dreidimensionalen (3D) porösen Trägergerüst (*scaffold*) *in vitro* hergestellt (Abbildung 1). Der Träger soll als temporäre Matrix für die Zellproliferation und die extrazelluläre Matrixablage dienen sowie im Anschluss den Blutgefäßeinwuchs fördern. In Bezug auf das *bone tissue engineering* (BTE) können, zur Differenzierung u. a. mesenchymale Stromazellen (MSC) in die osteogene Zelllinie, zusätzlich Wachstumsfaktoren in die Träger ein- oder aufgebracht werden (Diomedea et al. 2020; Langer und Vacanti 1993).

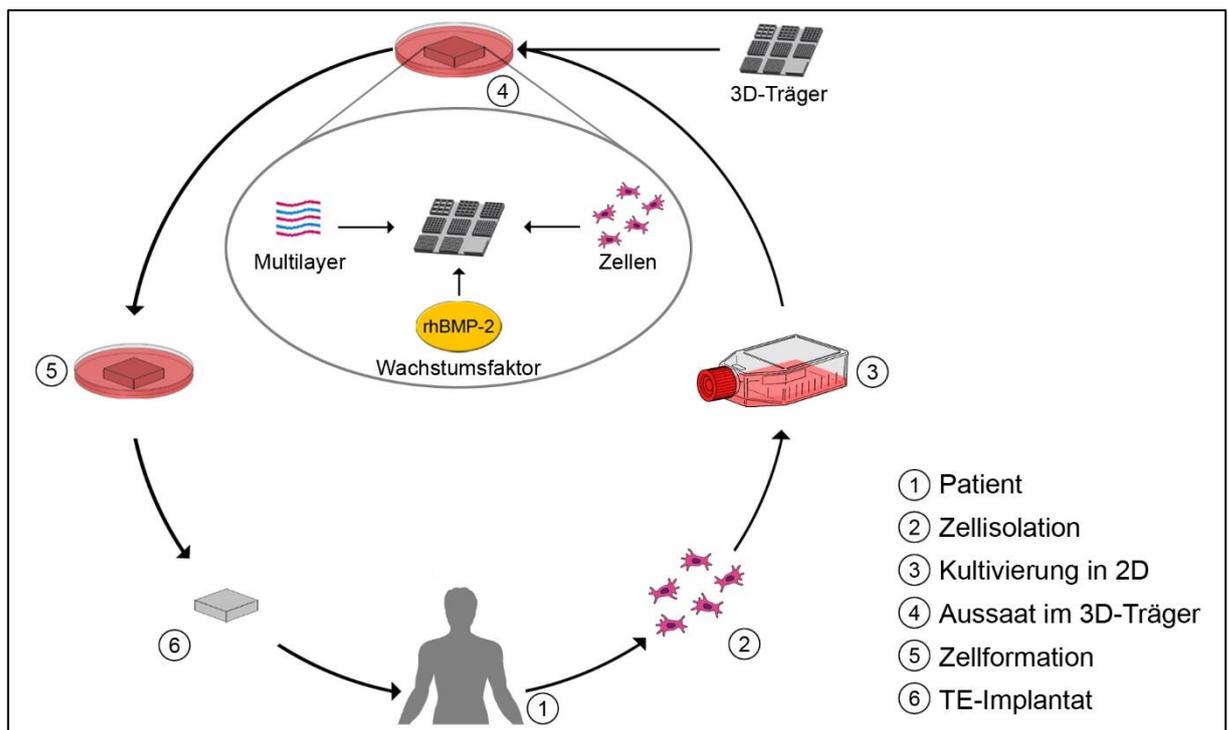


Abbildung 1: Prozess der *tissue engineering*-Methode modifiziert nach Dvir et al. (2011). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature-Verlags.

1.1 Anforderungen an die Trägergestaltung

Ein idealer Träger sollte eine Reihe an chemischen, biochemischen und physikalischen Eigenschaften aufweisen, um spezifische Abläufe auf zellulärer Ebene zu fördern (Causa et al. 2007). Hierzu zählen biomechanische Faktoren, Porengröße und Porosität, Biokompatibilität, Degradationsintervall und Effekte der Degradationsprodukte, wie auch die Oberflächencharakteristiken (Smith und Grande 2015). Der Träger sollte aus biodegradierbaren Materialien bestehen und durch vernetzte Poren einer bestimmten Größe zusammengesetzt sein, um die Geweberegeneration und spätere Vaskularisierung zu ermöglichen. Zudem sollte er adäquate mechanische Eigenschaften aufweisen, um das Knochenwachstum *in vivo* sowie das sich anschließende Knochenremodeling zu stimulieren und zu unterstützen. Die initiale Stärke und geometrische Form des Materials sollten ähnlich der des natürlichen Knochens sein. Während der Knochenreifung ist auf eine Degradationsrate zu achten, die den Halt des Trägers bis zur ausreichenden mechanischen Stabilität des regenerierten Gewebes gewährleistet. Eine angemessene Oberflächenbeschaffenheit fördert nicht nur die Zelladhäsion und -differenzierung, sondern auch deren Proliferation. Weiterhin sollte auf eine wirtschaftliche und ausführbare Herstellung in seiner individuellen Form und Größe geachtet werden (Hutmacher und Cool 2007).

1.2 Auswahl eines Trägermaterials

Im Rahmen des BTE wurden vielzählige Materialforschungen mit Keramiken, Polymer-Kompositen und metallischen Komponenten *in vitro* und *in vivo* durchgeführt (Hutmacher 2000; Khan et al. 2008; Lutolf und Hubbell 2005; Velasco et al. 2015; Vitale-Brovarone et al. 2011). Gloria et al. (2010) berichteten auch von Materialien auf Polymerbasis. Im Gegensatz zu Metallen und Keramiken, deren Herstellung und biologischer Abbau sich als nachteilig herausstellt, glänzen Polymere durch ihre vielfältige Einsatzmöglichkeit (Filippi et al. 2020). Die Materialien, die zur Gerüsterstellung verwendet werden können, können in natürliche oder synthetische Polymere und Hybridmaterialien, eine Kombination aus den beiden zuvor Genannten, unterteilt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht der meistverwendeten Polymere im BTE

	Polymere	Abkürzung
Biologische Polymere	Gelatine	
	Hyaluronsäure-Derivate	
	Chitosane	
	Alginat	
Synthetische Polymere	Poly-(D,L)-Lactide	PLA
	Polyglutaminsäure	PGA
	Poly- ϵ -Caprolactone	PCL
	Polyethylenglycole	PEG
	Polymethylmethacrylate	PMMA
	Poly-L-Lysine	PLL

Die biologischen Polymere stammen aus natürlichen Quellen wie z. B. Tierhäute, Krustentiere oder Algen (Lee und Mooney 2001). Entsprechend wurden diese Biopolymere, wie Kollagen (Gebinoga et al. 2013), Gelatine (Huber et al. 2016), Hyaluronsäure (Qin et al. 2014), Chitosan (Gupta et al. 2011) oder Alginat (Chan et al. 2015) chemisch modifiziert und weiter zu künstlichen 3D-Konstrukten unterschiedlicher Dimensionen und Formen verarbeitet. Die Verwendung der natürlichen Polymeren im TE kann aufgrund der hohen Biokompatibilität, der guten biologischen Abbaubarkeit, der nicht immunogenen Eigenschaften und der Molekülstruktur vorteilhaft sein. Biopolymere bestehen ebenfalls aus nahezu denselben Mikro- und Nanostrukturen, wie die Faserstruktur der nativen EZM (Hutmacher 2010). Die größten Nachteile der Biopolymere sind die schlechten mechanischen Eigenschaften, die Schwankungen von Charge zu Charge, die geringe Reproduzierbarkeit und die komplizierten Isolationsprotokolle. Dies führt zu einem begrenzten Gebrauch (Fang et al. 2014) und so können sie bisher nur limitiert als Trägermaterial dienen.

Die synthetischen Polymere, hergestellt durch Polyreaktionen, zeigen hingegen eine gute Biokompatibilität, regulierbare Steifigkeit und anpassbare Degradationsraten durch Auswahl verschiedener Molekulargewichte und Copolymere (Hauptmann et al. 2019a; Rezwan et al. 2006). Die reinen synthetischen Polymere weisen jedoch geringe Adhäsionsfähigkeiten und Löslichkeiten auf (Hauptmann et al. 2019a). Ihre Resorbierbarkeit beruht auf ihrem enzymatischen oder hydrolytischen Abbau (Macdougall et al. 2020). Die Zusammensetzung und Struktur der synthetischen Polymere können für spezifische Bedürfnisse angepasst werden. Um hervorragende Eigenschaften der Polymere zu erhalten, werden diese oft untereinander kombiniert, die sogenannten Copolymere. Bei der Etablierung synthetischer Polymere für die regenerative Medizin werden Poly-(D,L)-Lactid (PLA) (Li et al. 2020; Melchels et al. 2010; Park und Todo 2011), Poly- ϵ -Caprolacton (PCL) (Dwivedi et al. 2020; Park et al. 2012; Woodruff und Hutmacher

2010; Xue et al. 2017), Polyglutaminsäure (PGA) (K. Perron et al. 2009; Li et al. 2020; Sander et al. 2004), Polyethylenglykol (PEG) (Ovsianikov et al. 2010; Ovsianikov et al. 2011) oder deren Copolymere (Lamichhane et al. 2015; Mitsak et al. 2011) angewandt. Die Verwendung synthetischer Polymere hat den Vorteil, dass sich diese Materialien durch streng definierte biophysikalische und biochemische Eigenschaften auszeichnen. Somit korreliert die mechanische Festigkeit des Materials mit dem Polymerisationsgrad, der Kettenlänge und den intrinsischen Expansion- bzw. Kontraktionseigenschaften. Die Degradationsprodukte dieser Polymere können über natürliche metabolische Zyklen abgebaut werden (Schroeter et al. 2013).

Ein häufig verwendetes Polymer für das BTE ist das PCL aufgrund seiner hervorragenden Biokompatibilität und seiner physikalischen Eigenschaften sowie seiner biologischen Degradation. PCL-Gerüste können einen Anstieg der Revaskularisation auslösen und sich durch osteoinduktive oder osteokonduktive Eigenschaften auszeichnen (Hauptmann et al. 2019a). In mehreren Studien wurden Copolymere aus PCL und einem hydrophileren Polymer verwendet, um deren physikalische und biologische Eigenschaften zu überprüfen (Hoffman 2002; Huang et al. 2004; Vertenten et al. 2009). In der Studie von Vertenten et al. (2009) und Laurent et al. (2018) wurden (D,L)-Lactid- ϵ -Caprolacton-Copolymere synthetisiert und zur Knochenregeneration verwendet. Das Material zeigte eine hervorragende Biokompatibilität und zufriedenstellende osteokonduktive Eigenschaften auf. Zusätzlich zeigte eine andere Studie ein zunehmendes Elastizitätsmodul bei abnehmendem Caprolacton-Gehalt, hierbei waren die Degradationseigenschaften vom Monomergehalt abhängig (Meretoja et al. 2006). Dieses Material kann das Potenzial haben, moderne Implantate und allogene Transplantate zu ersetzen, da sie im Vergleich zu Lactid einen langsameren Abbau und eine bessere Mechanik bieten. Zudem auch den Säureabbau bei der Degradation vermeiden können (Felfel et al. 2016).

1.3 Verfahrenstechniken für die Gerüsterstellung

Eine besondere Herausforderung im TE ist die spezifische Produktion des Gerüsts. Unter den traditionellen Verfahren zur Gerüsterstellung poröser Polymerkonstrukte befinden sich die Gefrierextraktion und -gelierung (Ho et al. 2004), das Elektrosponning (Lannutti et al. 2007), das Schmelzspinning (Brown et al. 2011; Brown et al. 2014) oder Hydrogele (Lutolf und Hubbell 2005; Tsang und Bhatia 2004; Tse und Engler 2010; Zhu 2010). Die Herstellung von segmentierten/hierarchischen 3D-Gerüsten kann für das TE mittels 3D-Druck (Hutmacher 2000), 3D-Plotten (Landers et al. 2002) oder Stereolithographie (Rentsch et al. 2012) erfolgen. Durch Letztgenannte können räumliche Strukturen bis zu 50 μm erreicht werden (Lee et al. 2007; Stampfl et al. 2008). Noch höhere Auflösungen können erzielt werden durch die Verwendung der Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP). In Abbildung 2 ist der 2PP-Prozess schematisch dargestellt.

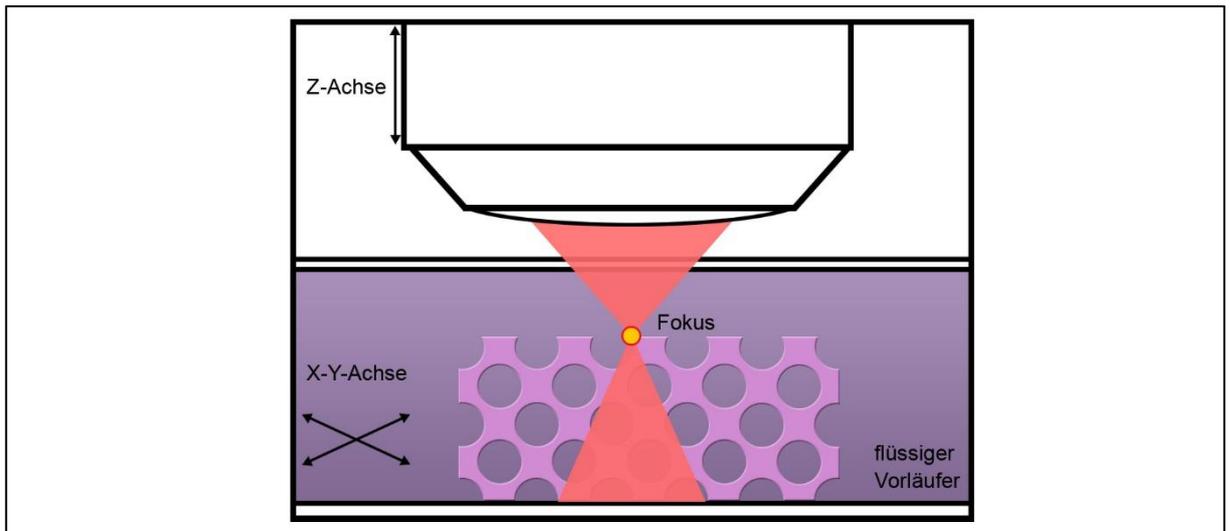


Abbildung 2: Schematische Darstellung des 2PP-Prozesses modifiziert nach Fefel et al. (2016). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des IOP Publishing-Verlags.

Dieses Verfahren stellt eine photolithographische Technik dar, die das direkte und maskenlose 3D-Laserschreiben eines vorher synthetisierten, flüssigen Vorläufers ermöglicht (Skoog et al. 2014). Für den 2PP-Prozess werden ultraschnelle Pulse eines Femtosekundenlasers im Nah-Infrarot (NIR) verwendet, um den erforderlichen Photonenfluss zu erzielen. Diese basiert auf der simultanen Absorption zweier Photonen durch ein Atom oder Molekül, das in einen energetisch angeregten Zustand übergeht. Dies gelingt durch Anregungswellenlängen im NIR in Kombination mit den gepulsten Femtosekundenlasern (Malinauskas et al. 2013; Maruo und Fourkas 2008; Sugioka und Cheng 2014). An diesem fokussierten Punkt findet die Polymerisation des flüssigen Vorläufers zum Endprodukt statt. Durch die Kombination der verschiedenen Bewegungen der Z-Achse des Objektivs mit den X-Y-Translationsstufen können vordefinierte Strukturen in drei Dimensionen konstruiert werden (Acerbi et al. 2015). Das Potenzial der 2PP für biomedizinische Anwendungen mit biokompatiblen Polymeren, wie PLA, PCL, PEG oder der Verwendung von Proteinen als Gerüstmaterial, ist rezent Gegenstand mehrerer Untersuchungen (Claeyssens et al. 2009; Da Sie et al. 2015; Danileviciusa et al. 2015; Fefel et al. 2016; Maciulaitis et al. 2015; Ovsianikov et al. 2011; Turunen et al. 2011).

1.4 Biofunktionalisierung der Träger durch Oberflächenmodifikationen

Eine nicht geringere Bedeutung als das Trägermaterial selbst, hat die Forschung um dessen Oberflächenbeschaffenheit (Castner und Ratner 2002). Die Oberfläche des Materials ist die Schnittstelle zwischen dem implantierten Träger und dem umgebenden Gewebe. Sie ist in der Lage wichtige Prozesse, von der inflammatorischen Reaktion bis hin zum Geweberemodelling, einzuleiten (Gribova et al. 2012). Um die Proliferation und Adhäsion von Zellen auf Biomaterialien zu fördern, ist es erstrebenswert biomimetische Oberflächenbeschichtungen, ähnlich der extrazellulären Matrix, anzufertigen. Die Biofunktionalisierung von Materialoberflächen kann

für eine verbesserte Integration der Materialien im lebenden Gewebe sowie für das Überleben und die Differenzierung von ausgesäten Zellen in den Trägern selbst hilfreich sein (Schliephake 2015).

1.4.1 Biofunktionalisierung durch topografische Modifikation

Unter den geläufigsten Oberflächenmodifizierungen zur biomimetischen Verbesserung der Trägergerüste für das TE befinden sich die topografischen Modifikationen, welche die Oberfläche physikalisch verändern. Die Modifikationen reichen von zufälligen, einfachen und homogenen bis zu hochspezifischen, segmentierten/hierarchischen Veränderungen (Richbourg et al. 2019). So sind die Porosität und Porengröße der Trägergerüste entscheidend für die Bestimmung biologischer Funktionen im TE (Camilo et al. 2017; Dalilottojari et al. 2016; Fujibayashi et al. 2011; Kolan et al. 2012; Shirokova et al. 2017; Song et al. 2018). Dies ist insbesondere von Bedeutung da für das Einwachsen von Knochengewebe und Blutgefäßen eine hohe Porosität und offene Struktur erforderlich sind damit die Sauerstoffversorgung des Knochens gewährleistet ist (Schumacher et al. 2010; Walpole et al. 2009; Zhang et al. 2018). Die minimale Porengröße für bioaktives poröses Material wurde mit ca. 100 μm angegeben, was für die Zellmigration und den Nährstofftransport geeignet war (Zhang et al. 2018). Frühere Studien ergaben auch, dass Poren mit einer Größe über 200 μm die Bildung neuer Knochen und die Vaskularisation fördern können (Walpole et al. 2009). Es wird allgemein angenommen, dass hohe Porositäten ($> 80\%$) für die Regeneration von neuem Knochengewebe optimal sind und Makroporosität mit Porengrößen von 100 – 300 μm für die Abfallentfernung und die Nährstoffversorgung von Vorteil sind (Pei et al. 2017; Wu et al. 2010). In der Literatur wird auch vermutet, dass kleine Poren mit Größen im Bereich von 50 bis 100 μm besser für die Induktion der endochondralen Ossifikation geeignet sind, während größere Poren von 100 – 300 μm die Vaskularisierung erleichtern und eine intramembranöse Ossifikation induzieren (Daugela et al. 2018; Wu et al. 2010). Trotz intensiver Forschung gibt es bisher keine finalen Schlussfolgerungen bezüglich der optimalen Porengröße und Porosität eines BTE-Trägers (Velasco et al. 2015).

1.4.2 Biofunktionalisierung durch Wachstumsfaktoren

Eine weitere Modifikation der Oberfläche ist durch die Proteinadsorptionstechnik möglich. Diese Behandlungen sind jedoch anfälliger für Degradierungs- und Wascheffekte (Richbourg et al. 2019). Entsprechend wird versucht die Adsorption über Wechselwirkungen zwischen Polyanionen und -kationen zu stabilisieren. Bei diesem elektrostatischen Verfahren können zwei oder mehr Bestandteile nacheinander mit nanometrischer Genauigkeit, so oft wie gewünscht, auf ein Substrat gegeben werden. Es sind auch Beschichtungen auf 3D-Geometrien möglich. Dieses Konzept wird als *Layer-by-Layer (LbL)*-Methode bezeichnet (Costa und Mano 2014; Decher et al. 1992; Iler 1966). Um biomimetische Beschichtungen zu konstruieren können Polyelektrolyte genutzt werden (u. a. Polypeptide, Proteine, Nucleinsäure und Polysaccharide) (Abdelkebir et al. 2011; Bertrand et al. 2000; Boudou et al. 2010; Costa et al. 2011; Criado-

Gonzalez et al. 2021; Decher 1997; Hammond 2011; Tang et al. 2006). Als Polykation kann das Poly-L-Lysin (PLL) verwendet werden. Es zeigt jedoch limitierte mechanische Eigenschaften auf. Um dies auszugleichen kann es mit anderen Polymeren zu Polyelektrolyt-Multilayern (PEM) kombiniert werden (Zheng et al. 2021). Interessante Polyanion-Kandidaten unter den natürlichen Polyelektrolyten spielen die Glykosaminoglykane (GAG) und die sulfatierten Glykosaminoglykane (sGAG). Beide Polysaccharide stellen den Großteil der nichtkollagenen Biomoleküle in der EZM dar (Grohmann et al. 2011). Die sGAG besitzen im Allgemeinen eine Bindungsaffinität zu Wachstumsfaktoren und unterstützen synergistisch deren Bioaktivität (Hudalla und Murphy 2011). Chondroitinsulfat (CS) ist als sGAG eines der ubiquitärsten Polysaccharide der natürlichen EZM und besitzen eine Schlüsselrolle im Gewebemetabolismus (Grohmann et al. 2012). CS unterstützt besonders den Biomineralisationsprozess (Embery et al. 2001; Jiang et al. 2005; Salbach et al. 2012; Schneiders et al. 2008), indem der Mineralisierungsprozess von Kollagenfibrillen unterstützt wird (Bierbaum et al. 2006; Douglas et al. 2008), wodurch die *in vivo*-Mineralisation erleichtert wird.

Darüber hinaus können die Multilayer-Filme können auch als Arzneimittelreservoir fungieren. Wirkstoffe können in die Mehrschichtkonstruktion eingebettet werden, während ihre Bioaktivität erhalten bleibt (Becker et al. 2010; Shiratori und Rubner 2000; Shukla et al. 2010; von Klitzing 2006). Bei einem einfachen Auftragen der Wachstumsfaktoren, ohne Einbettung in Multilayer-Filme, resultiert oft eine explosionsartige Freisetzung (*burst release*) und mindert so deren Erfolgchancen für eine zellspezifische Differenzierung (Pei et al. 2002; Vasita und Katti 2006). Dies ist besonders vor dem Hintergrund geringer Halbwertszeiten, dem Verlust der Bioaktivität, der Diffusion in benachbartes Gewebe oder einem möglichen karzinogenen Effekt bei unkontrolliert höheren Konzentrationen problematisch (Domb und Mikos 2007; Gombotz und Pettit 1995; Langer 2000; Saltzman und Olbricht 2002; Sokolsky-Papkov et al. 2007; Tabata 2005). Besonders im Bezug zum BTE sind primär der *fibroblast growth factor* (FGF), der *insulin-like growth factor* (IGF), der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), der *transforming growth factor β* (TGF- β) und das *bone morphogenetic protein* (BMP) die meistgenutzten Wachstumsfaktoren (Shi et al. 2019). Die BMPs spielen eine wichtige Rolle in der Embryonal-, Muskelentwicklung sowie der Knochen- und Knorpelbildung (Tamai et al. 2005) und sind bereits von der U.S. Food & Drug Administration (FDA) für die spezifische klinische osteoregenerative Anwendung zugelassen (James et al. 2016; Parsa et al. 2020). Jedoch ist eine optimale Leistung des BMP-2 *in vivo* nur dann gewährleistet, wenn eine lokalisierte und kontinuierliche Freigabe des Wachstumsfaktors besteht (Macdonald et al. 2011). Eine Matrix-Immobilisation erlaubt hier eine räumlich-zeitliche Regulation der BMP-2-Konzentration und schützt diese zusätzlich vor degradierenden Proteasen (Discher et al. 2005).

1.4.3 Biofunktionalisierung durch Manipulation der mechanischen Filmsteifigkeit

Viele Zelltypen reagieren sensibel auf die mechanischen Gegebenheiten der unter ihnen liegenden Substrate. Dabei kommt es nach variierender Steifigkeit zu unterschiedlichen zellbiologischen und molekular-biologischen Zellantworten (Discher et al. 2005; Nemir und West 2010; Peyton et al. 2007). Bei der Anwendung der *LbL*-Technik ist die Wahl der Polyelektrolyte entscheidend, da sie die Eigenschaften der generierten Beschichtung stark beeinflussen. PEM, die aus GAG zusammengesetzt sind, haben ein hohes wasserbindendes Potenzial, welches in hoch quellbaren, hydrogelartigen Beschichtungen mit einer geringen Steifigkeit resultiert (Engler et al. 2004; Ren et al. 2008; Schneider et al. 2006). Ein geringes Elastizitätsmodul (E-Modul) korreliert stark mit einer geringen Zelladhäsion und Proliferation von muskuloskelettalen Zellen (Grohmann et al. 2011). Die meisten beschriebenen Technologien, welche PEM-Filme in ihrem E-Modul steigern können, basieren auf der chemischen Modifikation der natürlichen Polyelektrolyte (Chien et al. 2009; Pozos Vázquez et al. 2009; Richert und Boulmedais und et al. 2004; Schneider et al. 2006). Nachteilig bleibt die zeitintensive Vernetzung der Filme sowie die Gefahr zytotoxischer Rückstände. Um PEM-Filme, ohne die nachteiligen Modifikationen zu generieren, zeigten Grohmann et al. (2011) in ihren Versuchen die mechanischen Eigenschaften von PEM-Filmen aus PLL, CS und PGA auf. Es konnte gezeigt werden, dass PEM-Filme aus Polypeptidketten mit einer *random coiled*-Struktur in eher weichen Beschichtungen resultieren. *LbL*-Beschichtungen, die durch PGA in prädefinierten Arealen modifiziert wurden, zeigten hingegen ein hohes Maß an β -Faltblattstrukturen und wiesen ein höheren E-Modul auf (Grohmann et al. 2012). So zeigte sich auf den weicheren (PLL-CS)₂₀-Filmen (E-Modul: ~ 9 kPa) eine reduzierte Proliferation im Gegensatz zum gesteigerten E-Modul nach PGA-Modifikation der (PLL-PGA)₂₀-Filme (E-Modul: ~ 700 kPa). Dies führte zu einer verbesserten Adhäsion, Ausbreitung und Proliferation.

1.5 Humane mesenchymale Stromazellen (hMSC)

In den letzten Jahren konnten zahlreiche Stamm-/Progenitorzellen aus einer Vielzahl von verschiedenen menschlichen Bindegeweben isoliert werden. Man unterscheidet zwischen toti-, pluri- und multipotenten Stromazellen. Ein spezieller Subtyp multipotenter Stromazellen ist die humane mesenchymale Stromazelle (hMSC). Die erste Beschreibung der hMSC erfolgte durch Friedenstein et al. (1966) als *colony-forming unit-fibroblast* (CFU-F). Sie leiten sich aus dem Mesoderm ab und sind morphologisch durch ihre spindelförmige Zellform mit fibroblastenartigen Ausläufern geprägt (Abbildung 3).

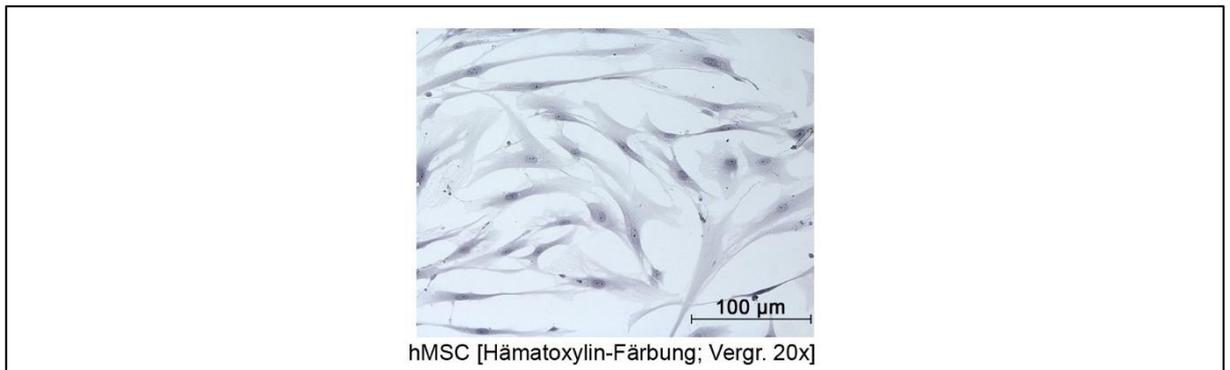


Abbildung 3: humane mesenchymale Stromazellen (hMSC) in Kultur [Hämatoxylin-Färbung; Vergr. 20x]

Die *International Society for Cell Therapy* (ISCT) empfiehlt, aufgrund bisher nicht vorhandener spezifischer immunphänotypischer Oberflächenmarker für die Identifikation von MSC die Anwendung der Minimalkriterien zur Identifizierung von multipotenten mesenchymalen Stromazellen (Dominici et al. 2006):

- Plastikadhärenz unter normalen Kulturbedingungen
- Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern (CD73, CD90 und CD105, wie ein Fehlen von CD11b oder CD14, CD19 oder CD79a, CD45 und HLA-DR)
- Differenzierungspotenzial in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten *in vitro*

Die klinische und biologische Bedeutung von hMSC ist in den letzten drei Dekaden drastisch gestiegen. Dies nicht zuletzt durch ihre ethische Unbedenklichkeit. Im Gegensatz zu den embryonalen Stromazellen, können sie aus dem erwachsenen Menschen gewonnen werden. Hier ist das Knochenmark die häufigste MSC-Quelle beim Menschen (Li et al. 2016; Pittenger et al. 1999). Im Laufe der Zeit wurde eine Reihe anderer Gewebe als alternative Quelle für hMSC identifiziert. Heutzutage können sie aus mehreren Geweben (Ullah et al. 2015) isoliert werden, einschließlich Fettgewebe (Wagner et al. 2005; Zhang et al. 2006), Zahngewebe (Huang et al. 2009), Haut, Speicheldrüse (Rotter et al. 2008) und perinatalen Geweben (Hou et al. 2009; Kita et al. 2010; Raynaud et al. 2012; Wang et al. 2004). Hervorzuhebende Vorteile der hMSC sind neben ihrer leichten Verfügbarkeit und Selbsterneuerung auch ihr multipotentes Differenzierungspotenzial (Chatakun et al. 2014; Colter et al. 2001; Horn et al. 2008; Pittenger et al. 1999). HMSC sind vimentinreich und enthalten kein Keratin (Keeling et al. 2017). Vimentin (VIM) ist somit ein klassischer MSC-Marker (Duarte Campos et al. 2016). Die Differenzierung von MSC über mehrere Linien wurde seit ihrer ersten Entdeckung *in vitro* und *in vivo* eingehend untersucht (Almalki und Agrawal 2016).

1.6 Zielsetzung

Mithilfe des BTE soll ein idealer Träger die Zellproliferation und -differenzierung ermöglichen, indem es die Struktur und die mechanischen Eigenschaften des Knochens nachahmt und Wachstumsfaktoren trägt. Bezüglich der Zellen, erwecken hMSC immer mehr Aufsehen im

BTE, insbesondere durch ihre relativ leichte Verfügbarkeit, das Selbsterneuerung- und multipotentes Differenzierungspotenzial (Chatakun et al. 2014). Um der Herausforderung zu begegnen das strukturierte Milieu der natürlichen EZM nachzuahmen, können Träger aus biokompatiblen LCM3, welches sich durch seine hervorragende Biokompatibilität und zufriedenstellende osteokonduktive Eigenschaften auszeichnet (Laurent et al. 2018), genutzt werden. Trotz intensiver Forschung gibt es bisher keine finalen Schlussfolgerungen bezüglich einer optimalen Porengröße und Porosität solcher BTE-Träger (Velasco et al. 2015). Um eine kontrollierte poröse Architektur mit sehr hoher Auflösung erzielen zu können, kann dies durch die Verwendung der 2PP erfolgen (Felfel et al. 2016).

Für weitere Oberflächenoptimierungen eignen sich mehrlagige PEM. Als Polykation zeigt sich PLL als vorteilhaft, wie auch das CS als Polyanion (Labat et al. 2016; Zheng et al. 2021). Eine weitere Modifikation solcher PEM kann eine Implementierung von Wachstumsfaktoren sein, besonders da BMP-2 *in vivo* nur dann optimale Leistungen gewährleistet, wenn eine lokalisierte und kontinuierliche Freigabe des Wachstumsfaktors besteht (Macdonald et al. 2011). Eine zusätzliche Modifizierung ist die Veränderung der Steifigkeit durch das oberflächliche Auftragen von PGA. Ein solch gesteigerter E-Modul der PEM führt zu einer verbesserten Adhäsion, Ausbreitung und Proliferation der Zellen (Grohmann et al. 2012).

Die grundlegenden wissenschaftlichen Fragestellungen der vorliegenden Arbeit sind daher als *proof of principle*:

- Welchen Einfluss haben unterschiedliche Porengrößen des LCM3-Copolymer-Trägers auf die hMSC im Vergleich zu deren eines Standard-UDMA-Polymers?
- Welchen Einfluss hat eine biomimetische Funktionalisierung des LCM3-Copolymer-Trägers mittels EZM-analoger PEM auf die hMSC?
- Welchen Einfluss hat eine lokalisierte Steifigkeitsmodifikation der EZM-analogen PEM durch PGA auf die hMSC?
- Welchen Einfluss hat eine Wachstumsfaktor-Implementierung, mittels BMP-2, der EZM-analogen PEM auf die hMSC?

2 Material und Methoden

2.1 Standardbedingungen

Für die Arbeit wurden autoklavierte oder sterilisierte Materialien unter antiseptischen und sterilen Bedingungen verwendet. Die genutzten Lösungen und Medien wurden, falls nicht anders angegeben, in ihrer Reinform benutzt, wie auch bei Bedarf steril filtriert oder autoklaviert. Die sterilen Arbeiten fanden unter der keimfreien Werkbank bei Laminarluft statt. Alle Glas- und Kunststoffmaterialien wurden vor Einbringen unter die Werkbank mit 70 % Ethanol abgesprüht und gereinigt. Die Lösungen wurden, wenn gefordert, in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt, bevor sie eine Anwendung bei den Zellen fanden. Die hMSC wurden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und unter 5 % CO₂-Begasung im Inkubator kultiviert. Das Zellwachstum wurde regelmäßig unter einem inversen Mikroskop kontrolliert. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle unsterilen Experimente bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Kontaminierte Materialien wurden entsprechend der Hygienerichtlinien entsorgt oder, falls möglich, nach Gebrauch fachgerecht wiederaufbereitet.

2.2 Materialien und Geräte

Die verwendeten Materialien und Geräte sind in Tabelle 3 aufgeführt:

Tabelle 3: Materialien und Geräte

Geräte & Materialien	Produkt	Hersteller
2PP-Vorrichtung	M3DL	LZH, Hannover, Germany
24-Well-Platten	Falcon® Multiwell 24 well	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
48-Well-Platten	Falcon® Multiwell 48 well	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
Schlauchpumpe	REGLO	Ismatec, Wertheim, Germany
Anregungsfilter DAPI	Excitation filter DAPI	Gentix, New Milton, UK
Anregungsfilter Vimentin	Excitation filter VIM	Gentix, New Milton, UK
Anregungsfilter Osteonectin	Excitation filter ON	Gentix, New Milton, UK
CO ₂ -Inkubator	Sanyo MCO-20AIC	Panasonic Healthcare Co., Ltd., Gunma, Japan
Cryovial	CryoPure 1 mL 72.377.992	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Feinwaage	L610D	Sartorius AG, Göttingen, Germany

Geräte & Materialien	Produkt	Hersteller
Gefrierschrank (-80 °C)	Comfort	Liebherr, Biberach an der Riss, Germany
Gewebekulturflaschen mit Belüftung	Tissue Culture Flask 25 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Gewebekulturflaschen mit Belüftung	Tissue Culture Flask 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Gewebekulturflaschen mit Belüftung	Tissue Culture Flask 125 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Handschuhe	Nitril® NextGen® Large 8 – 8,5	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden, Germany
Kryovial-Gefriercontainer	Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Kühlschrank (-20 °C)	Comfort	Liebherr, Biberach an der Riss, Germany
Magnetrührer	RET	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany
Meßgefäß für Casy®-Modelle	CASYCups	OMNI Life Science, Bremen, Germany
Mikroplatteninkubator	Thermostar	BMG Labtech, Ortenberg, Germany
Mikroreaktionsgefäß	Eppi (2 ml)	Qiagen, Venlo, Netherlands
Mikroreaktionsgefäß	Eppi (1,5 ml)	Qiagen, Venlo, Netherlands
Mikroskop	AxioVert 35	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany
Mikroskop	Axioskop 2 plus	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany
Mikroskop-Kamera	Axiocam	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany
Software (Mikroskop)	AxioVision Rel 4.8	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany
Mikrozentrifuge	5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Pipette 0,1 – 2,5 µl	Research® 3123463	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Pipette 0,5 – 10 µl	Research® 4514851	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Pipette 10 – 100 µl	Research® 4522341	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Pipette 100 – 1000 µl	Research® 4615283	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Pipette 2 – 20 µl	Research® 4469010	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Pipette 20 – 200 µl	Research® 2327524	Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Geräte & Materialien	Produkt	Hersteller
Pipettenspitzen 1 – 100 µl	Tip One	Starlab
Pipettenspitzen 10 µl	Surphob Safe Seal	Biozym
Pipettenspitzen 100 – 1000 µl	Quality Pipette tips	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Pipettenspitzen 2 – 200 µl	Filter Tips low Retention	Biosphere
Pipettenspitzen 200 µl	Tip System Box	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Pipettenspitzen 300 µl	Surphob Safe Seal	Biozym
Schalenkörper	Imagin Dish 1.0	zell-kontakt, Nörten-Hardenberg, Germany
Serologische Pipetten 10 ml	Serological Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Serologische Pipetten 20 ml	Serological Pipette 20 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Siliziumdioxid-membranöse Drehsäule	RNeasy spin column	Qiagen, Venlo, Netherlands
Software (Statistik)	GraphPad Prism 7	GraphPad Software Inc., California, USA
Software (Auswertung)	ImageJ	Wayne Rasband, Maryland, USA
Tauchroboter	DR3	Riegler & Kirstein, Germany
Universal-Zentrifuge	Z 400 K	Hermle Labortechnik, Wehingen, Germany
Universal-Zentrifuge	2K 15	Sigma, Osterode am Harz, Germany
Vakuum-UV-Belichtungsgerät	Vacuum-UV-Exposure Box2	proMa
Vorschaltgerät für Fluoreszenzlampe	Ebq 100 isolated - L	LEJ, Jena, Germany
Wasserbad	WB 10	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Germany
Werkbank	Clean Air EN 12469	Mahl KG, Tandelburg, Germany
Zellzählgerät	CASY® Cell Counter + Analyzer	OMNI Life Science, Bremen, Germany
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Falcon® Blue Max™ 15 ml	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Falcon® Blue Max™ 50 ml	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
Objektträger	Menzel Gläser	Thermo Scientific, Braunschweig, Germany

2.3 LCM3 und UDMA

Die genutzten Lactid-Caprolacton-Copolymere, mit adjustierbaren Degradationseigenschaften, Steifigkeit und Hydrophilie, wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Bioprozess- und Analysemesstechnik e.V. (iba) in Heiligenstadt (Deutschland) synthetisiert. Es wurden die Eigenschaften des schnell degradierbaren, hydrophilen Poly-(D,L)-Lactids und des langsam degradierbaren, hydrophoben Poly- ϵ -Caprolactons kombiniert (Fefel et al. 2016). Für die Herstellung der Matrices wurde das lactidreiche (D,L)-Lactid-co- ϵ -Caprolacton-dimethacrylat in seiner dritten Version (LCM3) mit einem LA:CL-Verhältnis von 8:2 für weitere Experimente eingesetzt (Hauptmann et al. 2019a) (Abbildung 4).

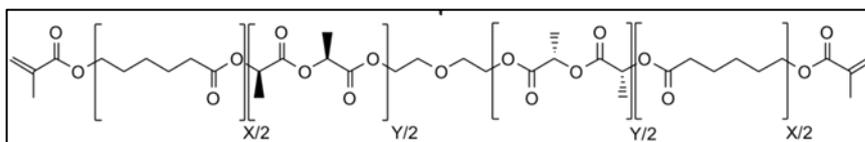


Abbildung 4: Strukturformel des (D,L)-Lactid-co- ϵ -Caprolacton-dimethacrylat

Als Standardvergleich zum LCM3 wurde, das 1974 durch Forster und Walker entwickelte, Urethan-dimethacrylat (UDMA) herangezogen (Abbildung 5), welches bereits gut charakterisierte Eigenschaften besitzt (Kurt et al. 2018; Yoshii 1997) und eine 2PP-Konformität, vergleichbar mit LCM3, besitzt.

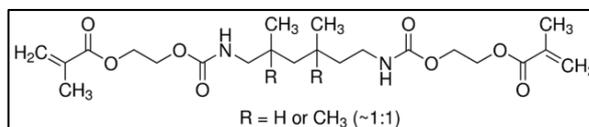


Abbildung 5: Strukturformel des Urethan-dimethacrylat

2.4 Synthese des (D,L)-Lactid-co- ϵ -Caprolacton-dimethacrylat (LCM3)

Um die LCM3-Probekörper herzustellen, musste vorab der Vorläufer synthetisiert werden, indem Mengen von (D,L)-Lactid, ϵ -Caprolacton und Diethylenglycol gerührt und auf 130 °C erhitzt wurden, bis das Lactid geschmolzen war (Tabelle 4). Dann wurde Zinn(II)-ethylhexanoat zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 130 °C unter Vakuum gerührt. Nach dessen abkühlen auf RT und dem Spülen mit Argon, wurden 100 ml Methylenchlorid zugegeben und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. Dann wurde Triethylamin zugegeben und über einen Zeitraum von 3 h wurde das Methacryloylchlorid, gelöst in 75 ml Methylenchlorid, in Tropfenform zugegeben. Später wurde wieder auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Methylenchlorid unter vermindertem Druck abgedampft. Die resultierende viskose Flüssigkeit wurde in 50 ml Ethylacetat gelöst, erneut filtriert und unter Rühren tropfenweise in 500 ml n-Hexan gegeben. Der Niederschlag wurde in Methylenchlorid

aufgenommen und gegen wässrige Salzsäure (3 %, 2×100 ml), gesättigte wässrige Natriumbicarbonatlösung und 200 ml gesättigte wässrige Natriumchloridlösung extrahiert und abschließend über Natriumsulfat getrocknet. Zum Endprodukt wurde als Stabilisator 4-Methoxyphenol (300 ppm) gegeben.

Tabelle 4: Inhalt zur Herstellung des Vorläufers durch die IBA

Inhalt	Eigenschaften	Hersteller
3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione ((D,L)-Lactid)	18,9 g, 131,13 mmol, 7 mol/l	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
ε-Caprolacton (CL, 97 %)	7,65 g, 67,02 mmol, 3,5 mol/l	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Diethylenglycol (DEG, 99 %)	2,00 g, 18,85 mmol, 1 mol/l	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Zinn(II)-ethylhexanoat (95 %)	300 µl, 0,33 mmol	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Methacryloylchlorid (97 %)	4,33 g, 41,42 mmol, 2,2 mol/l	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Triethylamin (99 %)	4,71 g, 46,54 mmol, 2,5 mol/l	Merck, Darmstadt, Germany
UDMA	M _r 471	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Iragcure369™		Ciba AG, Basel, Switzerland
BA740		Organic Chemistry Dep., University Jena, Germany

2.5 3D-Probekörper-Herstellung und deren Biofunktionalisierung

Zur Verarbeitung von LCM3 und UDMA als Vorläufergemisch wurden die Polymere mit 1 % BA740 für das LCM3 oder mit 2 % IRGACURE369 für das UDMA in Aceton gemischt (Tabelle 4). Um eine gute Verteilung und Verdampfung des überschüssigen Lösungsmittels sicherzustellen, wurden die Vorläufergemische bei 60 °C über Nacht gerührt. Die 2PP-Vorrichtung war mit einer Femtosekundenlaserquelle ausgestattet, welche mit einer Wellenlänge von 800 nm und einer Leistung von 3 W, die Bildung von 140 fs-Impulsen mit einer Wiederholungsrate von 80 MHz lieferte. Der Strahl wurde durch eine 63x-Objektivlinse innerhalb des Vorläufers fokussiert. Die Schreibparameter für die TOPO-Chips der verschiedenen Materialien sind in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Schreibparameter der 2PP der LCM3- und UDMA-Vorläufer

Mate- rial	Power [mW]	Geschwindigkeitsachse [$\mu\text{m/s}$]	Schreibrich- tung	Schnitt [μm]	Raster [μm]	T [$^{\circ}\text{C}$]
LCM3	150	8000	X oder Y	10	8	RT
UDMA	180	8000	X oder Y	20	2	RT

Die topographische Gestaltung der einzelnen Poren war reproduzierbar und so bestand ein einzelner TOPO-Chip-Probekörper ($7,5 \times 7,5 \times 0,23 \text{ mm}^3$) aus neun TOPO-Chip-Einheiten (*scaffold unit*, SU) (je $2,5 \times 2,5 \times 0,23 \text{ mm}^3$) mit einer Überlagerung von $25 \mu\text{m}$ (Abbildung 6).

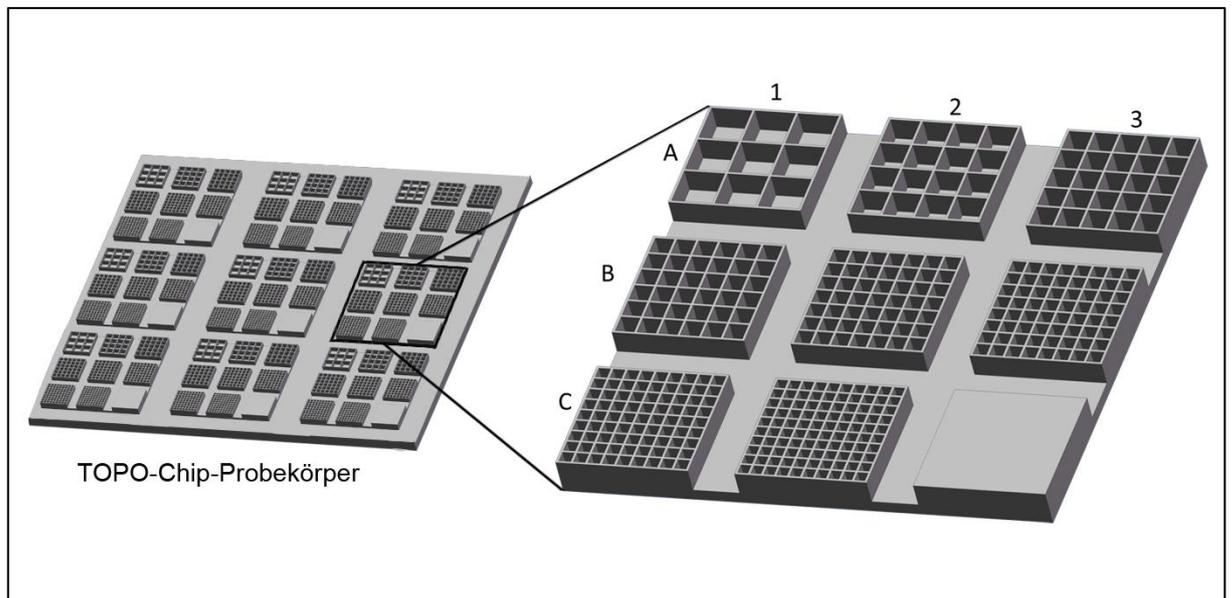


Abbildung 6: schematische Darstellung eines TOPO-Chip-Probekörpers mit einer einzelnen vergrößerten TOPO-Chip-Einheit (SU)

Jede einzelne TOPO-Chip-Einheit (SU) bestanden wieder aus neun TOPO-Chip-Gruppierungen (*pore size area*, PSA). Jede Gruppierung (PSA) bestand aus einer bestimmten Anzahl an Poren, mit prädefinierte Porengröße bestimmter Kantenlänge (Tabelle 6).

Tabelle 6: Parameter einer TOPO-Chip-Einheit

Gruppierung (PSA)	Anordnung	Kantenlänge einer Pore [μm]	Anzahl an Poren	Kantenhöhe [μm]
<i>a</i>	C3	durchgängige Oberfläche	0	230
<i>b</i>	C2	43	100	230
<i>c</i>	C1	49	81	230
<i>d</i>	B3	56	64	230
<i>e</i>	B2	66	49	230
<i>f</i>	B1	78	36	230

Gruppierung (PSA)	Anordnung	Kantenlänge einer Pore [μm]	Anzahl an Poren	Kantenhöhe [μm]
<i>g</i>	A3	96	25	230
<i>b</i>	A2	123	16	230
<i>i</i>	A1	177	9	230

Um die nicht polymerisierten Vorläufer und Photoinitiator zu entfernen, wurden die TOPO-Chips fünf Tage lang mit Aceton gewaschen, wobei das Lösungsmittel täglich gewechselt wurde.

2.6 2D-Probekörper-Herstellung

Die zylindrischen 2D-Probekörperscheiben wurden hergestellt, indem LCM3 oder UDMA einzeln mit Irgacure369TM (0,1 %), gelöst in Aceton (40 mg/ml), gemischt wurden. Dies wurde über Nacht bei 60 °C gerührt zur Sicherstellung einer guten Verteilung, wie auch der Verdampfung von überschüssigem Lösungsmittel. Danach wurde die Vorläufer-Initiator-Mischung in die gewünschten UV-Scheibenformen (\varnothing 14 mm, H: 0,5 mm) gegeben und durch 9 min-UV-Bestrahlung im Vakuum-UV-Belichtungsgerät in eine feste Form gebracht. Die Zylinderscheiben wurden zusätzlich sieben Tage in Aceton, mit täglichem Lösungsmittelwechsel gewaschen, bevor sie in einem Vakuum getrocknet wurden.

2.6.1 Biofunktionalisierung durch die PEM-Beschichtung

Die Oberflächen-Biofunktionalisierung der unterschiedlichen Grundmaterialien wurde durch die *LbL*-Technik erreicht. Die resultierenden PEM wurden aus PLL und CS zusammengesetzt (Tabelle 7). Die Polyelektrolyte wurden in HEPES/NaCl-Puffer in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Der Multilayer-Aufbau wurde automatisch durch die Verwendung eines Tauchroboters, wie zuvor in Grohmann et al. (2011) beschrieben, durchgeführt. Kurz zusammengefasst wurden die gereinigten Substrate in der PLL-Polykationlösung eingeweicht und 5 min zur Adsorption belassen. Anschließend wurden die Proben durch drei HEPES/NaCl-Waschlösungen gespült, um die Oberfläche von ungebundenen Polyelektrolyten zu befreien. Die CS-Polyanion wurde durch eine Inkubation von 5 min adsorbiert, gefolgt von drei Spülschritten mit der Waschlösung. Diese Zyklen wurden nacheinander wiederholt bis die gewünschte Multilayer-Konstellation, mit insgesamt 20 Schichten, erreicht war. Alle Proben wurden in deionisiertem Wasser gespült und in einem leichten Druckluftstrom luftgetrocknet.

Tabelle 7: Lösungen und Chemikalien für die PEM-Beschichtung

Inhalt	Eigenschaften	Hersteller
Poly-L-Lysin (PLL)	30 – 70 kDa	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Chondroitinsulfat (CS)	~63 kDa, aus Haifischknorpel	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
HEPES/NaCl-Puffer	25 mM HEPES, 137 mM NaCl, pH 7,4, 1 mg/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

2.6.2 Biofunktionalisierung durch die BMP-2-Modifizierung

Zur weiteren Biofunktionalisierung der PEM-Oberfläche wurde rekombinant exprimiertes BMP-2 (rhBMP-2) (Tabelle 8), welches in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert wurde, in Natriumacetatpuffer (50 mM, pH 4,5) gelöst und auf Konzentrationen von 0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml und 0,1 mg/ml verdünnt. Eine rhBMP-2-Beschichtung der 2D-Proben wurde durchgeführt, indem die (PLL-CS)₂₀-beschichteten Zylinderscheiben über Nacht mit 300 µl der jeweiligen rhBMP-2-Lösungen mit den verschiedenen Konzentrationen bei 4 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden die beschichteten Proben dreimal mit jeweils sterilem PBS und sterilem deionisiertem Wasser gespült und in einem leichten Druckluftstrom luftgetrocknet.

Tabelle 8: Lösungen und Chemikalien für die BMP-2-Beschichtung

Inhalt	Eigenschaften	Hersteller
rhBMP-2	<i>E. coli</i>	Iba, Heiligenstadt, Germany
Natriumacetatpuffer	50 mM, pH 4,5	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

2.6.3 Biofunktionalisierung durch die PGA-Modifizierung

Die (PLL-CS)₂₀-Multilayer-Beschichtung wurde in sechs prädefinierte Areale aufgegliedert, indem manuell 5 µl der Poly-L-Glutaminsäure (PGA) (Tabelle 9), gelöst zu 1 mg/ml HEPES/NaCl-Puffer, tropfenweise inkubiert wurden (Grohmann et al. 2011). Wichtig zu beachten ist, dass die Adsorption des negativ geladenen PGA auf ebenfalls negativ geladenem CS-Multilayer (und nicht der positiv geladenem PLL) durchgeführt wurde. Dementsprechend wurde die obere PGA-Schicht, wie zuvor beschrieben, durch Inkubation des Polyanions (PGA) für 5 min durchgeführt. Drei Spülschritte mit HEPES/NaCl folgten anschließend. Alle Proben wurden mit deionisiertem Wasser gespült und in einem leichten Druckluftstrom luftgetrocknet.

Tabelle 9: Lösungen und Chemikalien für die PGA-Beschichtung

Inhalt	Eigenschaften	Hersteller
Poly-L-Glutaminsäure (PGA)	50 – 100 kDa	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Inhalt	Eigenschaften	Hersteller
HEPES/NaCl-Puffer	25 mM HEPES, 137 mM NaCl, pH 7,4, 1 mg/ml	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

2.7 Humane mesenchymale Stromazellen (hMSC)

Die hMSC wurden von der Firma Lonza geordert. Diese Zellen stammen aus humanem Knochenmark, welches durch eine bilaterale Punktur des posterioren Beckenkamms aus erwachsenen Spendern isoliert wurde.

Die Firma Lonza garantiert, dass die so gewonnenen hMSC bei entsprechendem Medium in die adipogene, chondrogene und osteogene Zelllinie differenzieren und den weiteren Kriterien der ISCT entsprechen. Die Zellpräparate waren frei von Mykoplasma, Bakterien, Hefen und Pilzen und die freiwilligen Spender unauffällig hinsichtlich HIV-1, Hepatitis B und C. Die Zellen wurden von der Firma Lonza in der zweiten Passage kryokonserviert zur Verfügung gestellt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Humane mesenchymale Stromazellen der Firma Lonza

Inhalt	Artikel-Nr.	Hersteller
Poietics™ Normal Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells cryo amp	PT-2501 (Lot.-Nr.: 0000446319)	Lonza Walkersville Inc., Maryland, USA

2.8 Allgemeine Zellkulturarbeiten

2.8.1 Auftauen der kryokonservierten Lonza-hMSC

Die hMSC wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Stickstoff gelagert. Die aus dem Stickstoff entnommenen hMSC wurden für den Transport über kurze Zeit auf Trockeneis gelagert, um schnelle Temperaturwechsel und ein dadurch abruptes Aufplatzen des *Cryovials* zu vermeiden. Unter der sterilen Werkbank wurde ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Anzuchtmedium (Tabelle 11) vorbereitet. Nach gründlichem Desinfizieren des Lonza-*Cryovials* mit 70 %-Ethanol, wurde dieses unter der sterilen Werkbank durch Handwärme langsam aufgetaut. Wobei der Verschluss des *Cryovials* zwischendurch aufgedreht wurde, um den entstandenen Überdruck ausströmen zu lassen. Die hMSC wurden in das vorbereitete Anzuchtmedium überführt und das entsprechende *Cryovial* mit 1 ml Anzuchtmedium gespült und verbliebene Zellen so ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Durch sanftes, dreimaliges Überkopfmischen des Zentrifugenröhrchens erfolgte eine gleichmäßige Verteilung.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte über einen CASY®-Cell Counter entsprechend der elektronischen Zellvolumenbestimmung mittels Widerstandsmessung. Für die Zellzahlmessung wurden 100 µl Zellsuspension in 10 ml CASYton im CASYCup aufgenommen und dreimal über Kopf invertiert. Vor der eigentlichen Messung wurde die Messvorrichtung dreimal mit 10 ml reinem CASYton gereinigt. Im Anschluss wurde eine 1:100-Zellverdünnung im CASYCup eingebracht. Durch Ablauf des „Count“-Programmes wurde die Zellzahl automatisch über die elektrische Erfassung der Zellen beim Durchtritt durch eine Messpore ermittelt. Es wurde die Konzentration der lebenden Zellen [Zellen/ml] angegeben. Nach Beendigung des Messvorgangs wurde das Gerät dreimal gereinigt und die Messpore in CASYton bis zur erneuten Verwendung feucht gehalten.

Die restlichen Zellen wurden bei 300 x G für 5 min in der Zentrifuge pelletiert. Anschließend wurde das Anzuchtmedium abgenommen und das entstandene Zellpellet resuspendiert. Die Zellen wurden à 5000 Zellen/cm² in den jeweilig entsprechenden Gewebekulturflaschen ausplattiert und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Tabelle 11: Inhalt des Anzuchtmediums

Inhalt	Artikel-Nr.	Hersteller	Volumen [ml]
Gibco® DMEM (1X) + GlutaMAX™-I + 4,5 g/L D-Glucose + Pyruvate	31966-021 (Lot.-Nr.: 1764754)	Life technologies GmbH, New York, USA	500,00
10 % FKS	S 0115 (Lot.-Nr.: 0735W)	Biochrom GmbH, Berlin, Ger- many	57,50
1 % MEM nEAA (100x)	P08-32100 (Lot.-Nr.: 6350115)	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany	5,75
100 µM β-Mercaptoetha- nol	28625.01 (Lot.-Nr.: 140035)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany	5,75
1 % PenStrep	P06-07050 (Lot.-Nr.: 4700715)	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany	5,75

2.8.2 Anzucht von hMSC

Die mesenchymalen Stromazellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Zellkulturinkubator kultiviert. Der Mediumwechsel mit Anzuchtmedium erfolgte alle 48 h. Unter dem Lichtmikroskop wurde regelmäßig eine Sichtkontrolle der Zellkulturqualität durchgeführt. Mesenchymale Stromazellen zeigen einen fibroblastenähnlichen Zelltyp, welcher eine spindelförmige Form und ein plastikadhärentes Wachstum aufzeigt (Dominici et al. 2006; Friedenstein et al. 1970; Pittenger et al. 1999). Wenn es zum Mediumwechsel kam, wurde das alte Medium unter der

sterilen Werkbank abgesaugt, mit erwärmtem *Dulbecco's Phospholite Buffered Saline* (DPBS) (Tabelle 12) gespült und je nach Fläche der Gewebekulturflaschen temperiertes Anzuchtmedium getauscht oder die Zellen für weitere Kulturbedingungen vorbereitet.

Tabelle 12: Allgemeine Lösungen und Chemikalien

Lösung	Artikel-Nr.	Hersteller
DPBS	P04-36500 (Lot.-Nr.: 2670814)	PAN-Biotech, Eidenbach, Germany

2.8.3 Subkultivierung der hMSC im Verfahren der Anzucht

Um eine Kontaktinhibition zu vermeiden, wurden die Zellen bei einer 80 %-Konfluenz passagiert und in eine weitere Subkultivierung überführt (Abbildung 7).

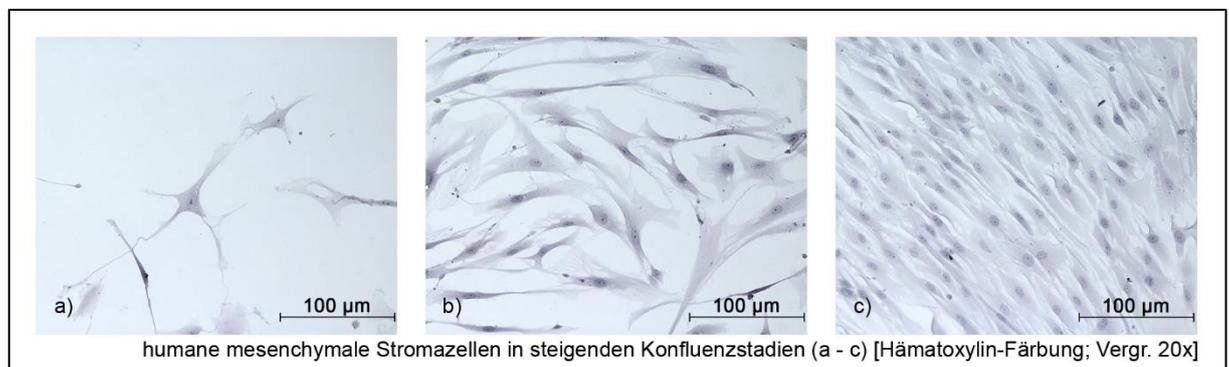


Abbildung 7: steigende Konfluenzstadien der hMSC. Humane mesenchymale Stromazellen in steigenden Konfluenzstadien (a - c) [Hämatoxylin-Färbung; Vergr. 20x]

Für die Trypsinierung wurde das alte Medium entnommen, die Zellen mit sterilem DPBS gespült (Tabelle 13) und das Ablösen der Zellen mit Hilfe von vorgewärmter Trypsin-EDTA-Lösung begonnen. Die Zellen wurden für 3 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und zusätzlich durch das *Shake-off*-Verfahren an der Unterkante der Gewebekulturflasche mit dem Zeigefinger abgeklopft. Nach vollständiger Lösung der Zellen vom Flaschenboden wurde temperiertes Anzuchtmedium zum Stoppen der Trypsin-Reaktion hinzugegeben. Bevor die Zellen erneut bei 300 x G für 5 min bei RT zentrifugiert wurden, erfolgte eine erneute Zellzahlbestimmung mittels des CASY® *Cell Counter*. Im Anschluss wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und das verbliebene Zellpellet in einer Konzentration von 1000 Zellen/µl in neuem Anzuchtmedium für weitere Subkultivierungen, Experimente oder Kryokonservierung vorbereitet.

Tabelle 13: Allgemeine Lösungen und Chemikalien

Lösung	Artikel-Nr.	Hersteller
Trypsin/EDTA	P10-019500 (Lot.-Nr.: 1190415)	PAN-Biotech, Eidenbach, Germany

2.8.4 Kryokonservierung der hMSC

Nach entsprechender Vorbereitung von hMSC (siehe Kapitel 2.8.3) wurden diese, um Trypsin/EDTA-Mediumrückstände zu entfernen, nochmals mit DPBS resuspendiert und erneut bei 300 x G für 5 min zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml, in Einfriermedium resuspendiert (Tabelle 14) und die Zellsuspension wurde in 1 ml-Cryovials überführt. Diese wurden in den Mr. Frosty™ *Freezing Container*, welcher mit Isopropanol (bei RT) gefüllt war, gestellt und bei -80 °C für mindestens 4 h gelagert. So konnten die Zellen gleichmäßig mit 1 °C/min eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Tabelle 14: Inhalt u. a. des Einfriermediums

Inhalt	Artikel-Nr.	Hersteller
10% DMSO	A994.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany

2.9 Spezielle Kultivierung der hMSC auf den 3D- und 2D-Probekörpern

Nach entsprechender Vorbereitung und Zellzahlbestimmung (siehe Kapitel 2.8.3) wurden die abzentrifugierten hMSC in entsprechendem Volumen an Kultivierungsmedium (Tabelle 15) resuspendiert. Die 3D- und 2D-Probekörper befanden sich jeweils in 48- bzw. 24-Well-Mikrotiterplatten. Eine UV-Sterilisation fand vor dem Einbringen unter der sterilen Werkbank statt. 24 h vor der Zellbesiedlung wurden die Matrizes mit Kultivierungsmedium versetzt und dieses erst unmittelbar vor der Besiedlung entfernt, um die Oberflächenspannung zu verringern und den später aufgetragenen Zellen die gleichmäßige Verteilung und Anheftung zu erleichtern. Ein mögliches Monomer-*Leakage* konnte so reduziert werden. Im Anschluss wurden die Matrizes mit der entsprechenden Zellzahl besiedelt. Die 3D-Probekörper erhielten 2500 – 3000 Zellen/cm²/PSA und die 2D-Probekörper 10.000 Zellen/cm². Im Brutschrank erfolgte die weitere Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂.

Nach Ablauf des ersten Kultivierungstages, wurden die Probekörper in neue Mikrotiterplatten umgesetzt, um so eine retrograde Besiedlung der Probekörper durch Zellwachstum vom Mikrotiterplattenboden zu vermeiden. Der regelmäßige Mediumwechsel, sowie die vorhergehende Spülung mit DPBS erfolgte alle 48 h.

Tabelle 15: Inhalt des Kultivierungsmedium

Inhalt	Artikel-Nr.	Hersteller	Volumen [ml]
Gibco® DMEM (1X) + GlutaMAX™-I + 4,5 g/L D-Glucose + Pyruvate	31966-021 (Lot.-Nr.: 1764754)	Life technologies GmbH, New York, USA	500,00

Inhalt	Artikel-Nr.	Hersteller	Volumen [ml]
10 % FKS	S 0115 (Lot.-Nr.: 0735W)	Biochrom GmbH, Berlin, Germany	55,50
1 % Penstrep	P06-07050 (Lot.-Nr.: 4700715)	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany	5,55

2.10 Immunhistologie

Aufgrund von Restspuren des Photoinitiators im endgültigen Produkt zeigt LCM3 eine Autofluoreszenz (Heitz et al. 2017). Um Störungen der Autofluoreszenz mit einer Immunfluoreszenz zum Nachweis zellulärer Proteine bei der Analyse der LCM3-Proben zu vermeiden, erfolgte hier ein chromogener immunhistochemischer Ansatz (IHC). Für das Grundmaterial UDMA konnte eine Immunfluoreszenzmarkierung (IF) durchgeführt werden. Die Analysen der 3D-Probekörper erfolgten am ersten, zweiten, vierten und fünften Tag und die der 2D-Probekörper am siebten, 14 und 21 Tag. Die Fixation der Zellen der 3D- und 2D-Probekörper erfolgte unsteril mit jeweils 500 µl Methanol-Aceton (Tabelle 16) aus dem Gefrierschrank (-20 °C), indem die Zellen für 5 min im Kühlschrank in der Methanol-Aceton-Lösung verblieben. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen insgesamt dreimal mit 500 µl DPBS gespült. Zu jedem Versuch wurden entsprechende Negativkontrollen inkludiert, um zu kontrollieren ob die jeweilige IF- oder IHC-Markierung erfolgreich war.

Tabelle 16: Inhalt der Methanol-Aceton-Lösung

Inhalt	Artikel-Nr.	Hersteller	Volumen [ml]
Methanol	8045 (Lot.-Nr.: 1317907003)	J.T. Baker, Deventer, Netherlands	70
Aceton	2682.2500 (Lot.-Nr.: 1246/10/14)	Chemsolute, Renningen, Germany	30

Da auch spezifische Antikörper, teilweise durch Ladungsverteilung oder Konformation anderer Proteine des Probekörpers oder der Objektträgerfläche, unspezifisch binden und dies zu einer störenden Hintergrundfärbung führt, wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit *bovine serum albumin* (BSA) gesättigt. Hierzu wurde eine 7,5 %-ige BSA-Lösung unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers unsteril hergestellt (Tabelle 17). Die BSA-Lösung wurde, den jeweiligen Probekörper bedeckend, aufgetragen und inkubiert für 30 min im Mikropplatteninkubator bei 37 °C. Nach Ablauf der Zeit wurde die Lösung abgesaugt und zweimal mit DPBS gespült.

Tabelle 17: Inhalt der 7,5%-BSA-Lösung

Inhalt	Artikel-Nr.	Hersteller	Masse [g] o. Volumen [ml]
Albumin-V-Fraktion	8076.2 (Lot.-Nr.: 255230795)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany	7,5
DPBS	P04-36500 (Lot.-Nr.: 2670814)	PAN-Biotech, Eidenbach, Germany	100

2.10.1 Immunfluoreszenzmarkierungen

Für die Immunfluoreszenzfärbungen der UDMA-Trägermaterialien wurden die direkte und indirekte Methode der IF angewandt (Abbildung 8). Bei der direkten Methode war der Primärantikörper direkt mit dem Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt. Bei der indirekten Methode konnte der Primärantikörper durch einen an den Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Die Anregung erfolgte mittels spezifischer Wellenlängen (Tabelle 18).

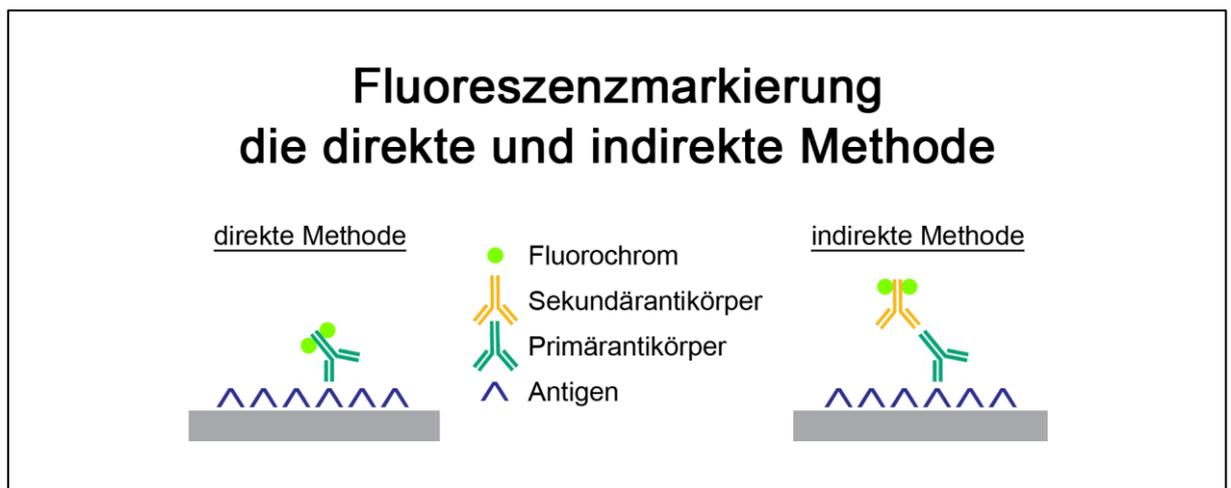


Abbildung 8: Darstellung der direkten und indirekten Methode der Fluoreszenzmarkierung

Für die 3D-UDMA-Probekörper wurde die direkte Methode der Immunfluoreszenzmarkierung gewählt. Die Anti-Vimentin-Antikörper waren jeweils direkt mit einem Fluorochrom (AlexaFluor® 594) gekoppelt (Tabelle 18). Eine unsterile 1:100-Verdünnung erfolgte im Vorfeld mit der 7,5 %-BSA-Lösung. Jeweils 300 µl der Antikörperlösung wurden auf die 3D-Probekörper gegeben und für eine Stunde im Mikroplatteninkubator bei 37 °C inkubiert. Die Negativkontrolle wurde nur mit der 7,5 %-BSA-Lösung benetzt, nicht mit dem Primärantikörper. Die Lösung wurde abgesaugt und dreimal mit je 600 µl DPBS gespült. Für die 2D-UDMA-Probekörper wurde für die Immunfluoreszenzmarkierung die indirekte Methode gewählt. Der Osteonectin-Primärantikörper wurde auf eine 1:20-Verdünnung mit der 7,5 %-BSA-Lösung angesetzt (Tabelle 18). Jeweils 50 µl der Primärantikörperlösung wurden auf die 2D-Probekörper gegeben

und für eine Stunde im Mikroplatteninkubator bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und dreimal mit je 100 µl DPBS gespült. Als Sekundärantikörper fungierte der mit AlexaFluor® 546 konjugierte Ziegen anti-Maus IgG1-Antikörper (Tabelle 18). Eine 1:200-Verdünnung erfolgte im Vorfeld mit der 7,5 %-BSA-Lösung. Jeweils 50 µl der Sekundärantikörperlösung wurden auf die 2D-Probekörper gegeben und für eine Stunde im Mikroplatteninkubator bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und dreimal mit je 100 µl DPBS gespült. Die Markierung des Zellkerns erfolgte für alle Proben mittels 4',6-Diamidion-2-phenylindol (DAPI) (Tabelle 19). Hierfür wurde eine 1:500-Verdünnung mit der 7,5 %-BSA-Lösung angesetzt und jeweils 300 µl für die 3D-Probekörper und 50 µl für die 2D-Probekörper der DAPI-Verdünnung wurden für 15 min im Mikroplatteninkubator bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und dreimal mit je 600 µl DPBS gespült. Beide Probekörpervarianten wurden mit einigen Tropfen *FluorPreserve™ Reagent* eingedeckt (Tabelle 20).

Tabelle 18: Verwendete Antikörper für die IF

Antikörper	Artikel-Nr.	Hersteller	Konzentration [mg/ml]	Ex. [nm]	Em. [nm]	Konjugation	Verdünnung
Anti-Vimentin antibody (AlexaFluor® 594)	Ab154207 (Lot.-Nr.: GR158071-1)	abcam®, Cambridge, UK	0,20	590	617	AlexaFluor® 594	1:100
Anti-Osteonectin antibody	AON-1-s (Lot.-Nr.: 1ea4/15/10)	DSHB, Maryland, USA	0,029	/	/	/	1:20
AlexaFluor® 546	A21123 (Lot.-Nr.: 1081920)	Invitrogen, Darmstadt, Germany	2,00	556	573	AlexaFluor® 546	1:200

Tabelle 19: 4',6-Diamidion-2-phenylindol (DAPI)

Inhalt	Artikel-Nr.	Hersteller	Konzentration [mg/ml]	Ex. [nm]	Em. [nm]
4',6-Diamidion-2-phenylindoldihydrochloride	D9564 (Lot.-Nr.: 042V)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA	20	364	454

Tabelle 20: Allgemeine Lösungen und Chemikalien für die IF

Lösung	Artikel-Nr.	Hersteller
FluorPreserve™ Reagent	345787 (Lot.-Nr.: D00155301)	Merck Millipore, Darmstadt, Germany

2.10.2 Immunhistochemische Markierungen

Für die immunhistochemische Markierung wurden die Zellen bezüglich der IHC mit Hilfe des EnVision™ Detektionssystems markiert. Durch die Zugabe des spezifischen Sekundärantikörpers, an den ein mit *horse radish peroxidase* (HRP)-markiertes Polymer gebunden ist, kommt es zur Kopplung an den Primärantikörper (Abbildung 9). Schließlich wird das Substratchromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) hinzugegeben. Dieses reagiert durch Wasserstoffperoxid mit der HRP. Ein bräunlicher Niederschlag wird sichtbar.

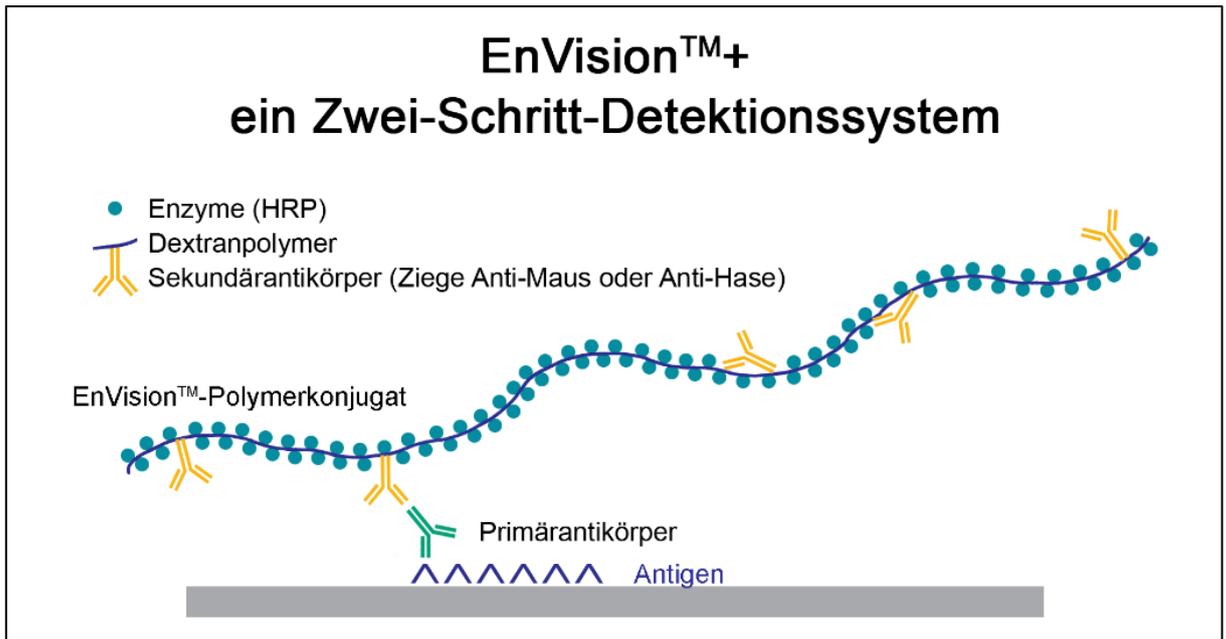


Abbildung 9: Darstellung der indirekten Methode der immunhistochemischen Markierung Darstellung des Envision™-Detektionssystems modifiziert nach Wiedorn et al. (2001) Nach erfolgtem Blockieren der unspezifischen Bindungen mithilfe der 7,5 %-BSA-Lösung, wurde jedes Präparat der 3D- und 2D-LCM3-Probekörper mit 300 µl *Peroxidase-Blocking-Solution* (Tabelle 21) für 5 min bei RT benetzt. Danach wurden die Proben zweimal mit je 600 µl *Tris-buffered saline with Tween 20* (TBS-T (1x)) gespült (Tabelle 22). Der Vimentin-Antikörper erhielt im Vorfeld eine 1:200-Verdünnung mit dem *Dako Antibody Diluent* (Tabelle 21), der Osteonectin-Antikörper wurde im Verhältnis 1:20 angesetzt (Tabelle 24). Jeweils 300 µl der Antikörperlösung wurden auf die Probekörper gegeben und für 1 h im Mikroplatteninkubator bei 37 °C inkubiert. Die Negativkontrolle wurde nur mit dem *Dako Antibody Diluent* benetzt, nicht mit dem Primärantikörper. Die Lösung wurde abgesaugt und dreimal mit je 600 µl TBS-T (1x) gespült. Als Sekundärantikörper fungierte das *DAKO EnVision™+Dual Link System-HRP* (Tabelle 24). Dieses wurde jeweils zu 300 µl auf eine Probe gegeben und für 30 min im Mikroplatteninkubator bei 37 °C inkubiert. Die Probekörper wurden zweimal mit je 600 µl TBS-T (1x) gewaschen. Es folgte die Substrat-Chromogen-Lösung, welche im Vorfeld mit 6 ml Substrat und 120 µl DAB-Chromogen angesetzt wurde, à 300 µl je Probekörper (Tabelle 25). Inkubiert wurden die Probekörper für 5 min bei RT. Es folgten drei Spülungen mit je 600 µl *aqua destillata*. Schlussendlich erfolgte die Hämatoxylin-Gegenfärbung, indem 100 µl Hämatoxylin für 10 s auf je einer Probe verblieben und direkt mit Leitungswasser abgespült wurde (Tabelle 21). Die 3D- und 2D-Probekörper wurden mithilfe einer Pinzette und einem Tropfen *Ultramount* auf einem Objektträger eingedeckt (Tabelle 21). Und für 30 min bei 70 °C fixiert.

Tabelle 21: Allgemeine Lösungen und Chemikalien für die IHC

Lösung	Artikel-Nr.	Hersteller
Peroxidase-Blocking Solution	S2023 (Lot.-Nr.: 20008314)	DAKO REAL™, Hamburg, Germany
Antibody Diluent with background reducing components	S3022 (Lot.-Nr.: 10090973)	DAKO, Hamburg, Germany
Hämatoxylin	1092490500 (Lot.-Nr.: HX43078349)	Merck Millipore, Darmstadt, Germany
Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium	S1964 (Lot.-Nr.: 125043)	DAKO, Hamburg, Germany

Tabelle 22: Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS-T (1x))

Inhalt	Artikel-Nr.	Hersteller	Volumen [ml]
TBS (20x)	siehe Tabelle 23		100
Aqua destillata			1900
Tween® 20	P9416 (Lot.-Nr.: 10080861)	Sigma- Aldrich, Missouri, USA	0,5

Tabelle 23: Tris-buffered saline (TBS (20x))

Inhalt	Artikel-Nr.	Hersteller	Masse [g] o. Volumen [ml]
Tris Pufferan®	AE15.2 (Lot.-Nr.: 094211368)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany	242
Natriumchlorid (NaCl)	3957.1 (Lot.-Nr.: 094209577)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany	360
Aqua destillata			2000
Salzsäure 37 % (HCl)	9277.1 (Lot.-Nr.: 263200813)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany	n.B. bis pH 7,6

Tabelle 24: Verwendete Antikörper für die IHC

Antikörper	Artikel-Nr.	Hersteller	Konzentration [mg/ml]	Verdünnung	Konjugation
Anti-Osteonectin antibody	AON-1-s (Lot.-Nr.: 1ea4/15/10)	DSHB, Maryland, USA	0,029	1:200	/
Invitrogen Vimentin Antibody SP20	MA5-14564 (Lot.-Nr.: RE2203171A)	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA	/	1:20	/
EnVision™+Dual Link System-HRP	K4063 (Lot.-Nr.: 10049428)	DAKO, Hamburg, Germany	/	1:1	HRP

Tabelle 25: DAB Substrate-Chromogen System

Inhalt	Artikel-Nr.	Hersteller	Volumen [ml]
DAB+ Substrate buffer	K3468 (Lot.-Nr.: 10090881)	DAKO, Hamburg, Germany	110
DAB+ Chromogen	K3468 (Lot.-Nr.: 10090881)	DAKO, Hamburg, Germany	5

2.11 Statistische Analyse

Die Berechnung der Prüfgrößen und das Ermitteln des p-Werts der wiederholten Experimente (mind. $n = 3$) erfolgte mithilfe des Programms *GraphPad Prism 5.0*. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ festgesetzt. Die digitale Photographie der markierten Präparate erfolgte mithilfe der Software *AxioVision (Release 4.8)* über das Mikroskop *AxioSkop 2 plus*. Die Aufnahmen erfolgten mit 10x und 20x Objektiven, standardisiert über alle Probengruppen. Mindestens sechs repräsentative Aufnahmen wurden jeweils pro Gruppierung pro Versuchsdruckgang und Differenzierungsareal getätigt. Die quantitative Auswertung erfolgte durch die Software *Image J*.

Um Zellzahlvarianzen während der Kultivierung auszuschließen, wurde die Zellzahl auf die in die Probekörper integrierte Standardoberfläche normalisiert. Die Berechnung der statistischen Signifikanzen erfolgte mithilfe der *ordinary two-way ANOVA* und des *Turkey's multiple comparisons test*, sowie anhand der *Kruskal-Wallis-Analyse* und dem *Dunn's test*. Durch die Bonferroni-Korrektur wurde die Alphafehler-Kumulierung neutralisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Proliferation und Vimentin-Expression von hMSC auf 3D-Probekörpern

Die Analyse der Proliferation und Differenzierung von hMSC erfolgte auf LCM3- und UDMA-TOPO-Chip-Probekörpern. Bei den Porengrößen 43 μm und 49 μm gelangten die Zellen nicht in die porösen Strukturen der LCM3- oder UDMA-TOPO-Chip-Probekörper sondern breiteten sich im Sinne einer Monolayerstruktur aus. Diese Porengrößen wurden daher von weiteren Analysen ausgeschlossen. Die hMSC zeigten auf den LCM3-TOPO-Chip-Probekörpern eine stabile und kontinuierliche Proliferation innerhalb der Porengrößen. Hier erreichten die hMSC in den Porengrößen von 56 μm bis zu 123 μm einen signifikanten bis höchst signifikanten zellulären Proliferationsanstieg vom ersten bis zum fünften Tag (56 μm : $p = 0,0008$; 66 μm : $p \leq 0,0001$; 78 μm : $p = 0,0496$; 96 μm : $p = 0,0004$; 123 μm : $p = 0,0010$) (Abbildung 10).

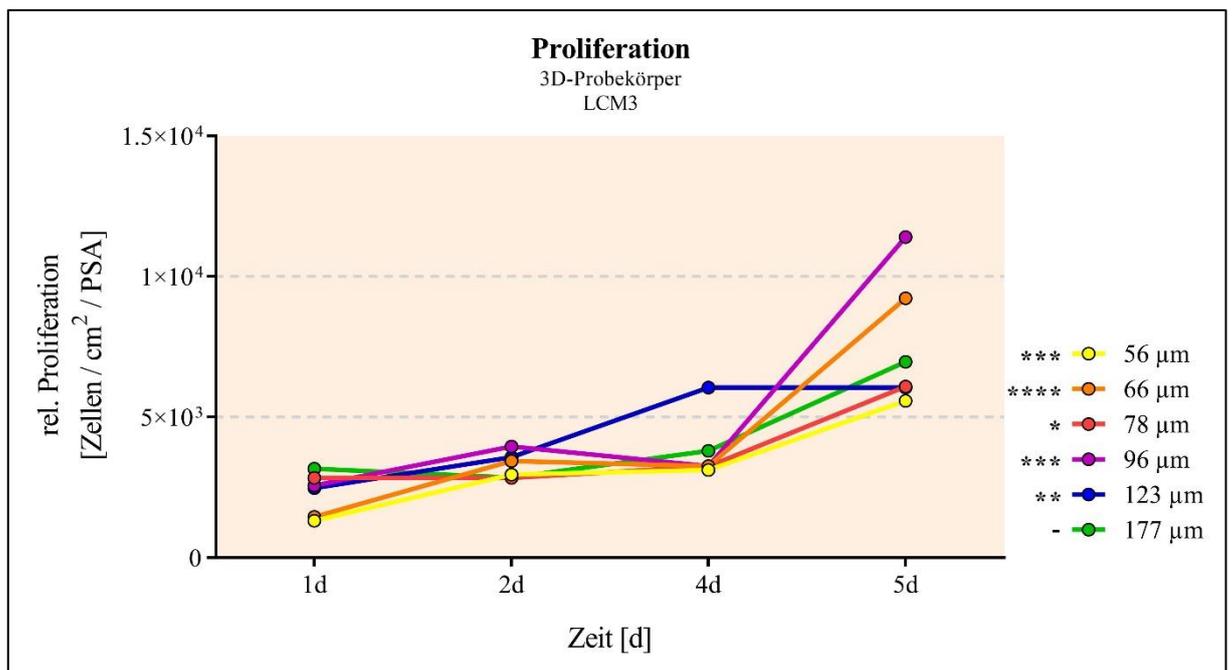


Abbildung 10: rel. Proliferation der hMSC auf verschiedenen Porengrößen (LCM3). Medianwerte der rel. Proliferation der hMSC auf verschiedenen Porengrößen (LCM3) an definierten Zeitpunkten (1d, 2d, 4d, 5d) (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$)

Am fünften Tag zeigten die Poren mit der Kantenlänge von 66 μm hochsignifikante ($p \leq 0,0001$) Veränderungen der zellulären Proliferation, während der höchste Anstieg der Zellzahl bei der Porengröße von 96 μm ($p = 0,0004$) gefunden wurde. Im Vergleich hierzu zeigt die Proliferation der Porengröße von 56 μm eine geringere ($p = 0,0008$) Veränderung (Abbildung 11).

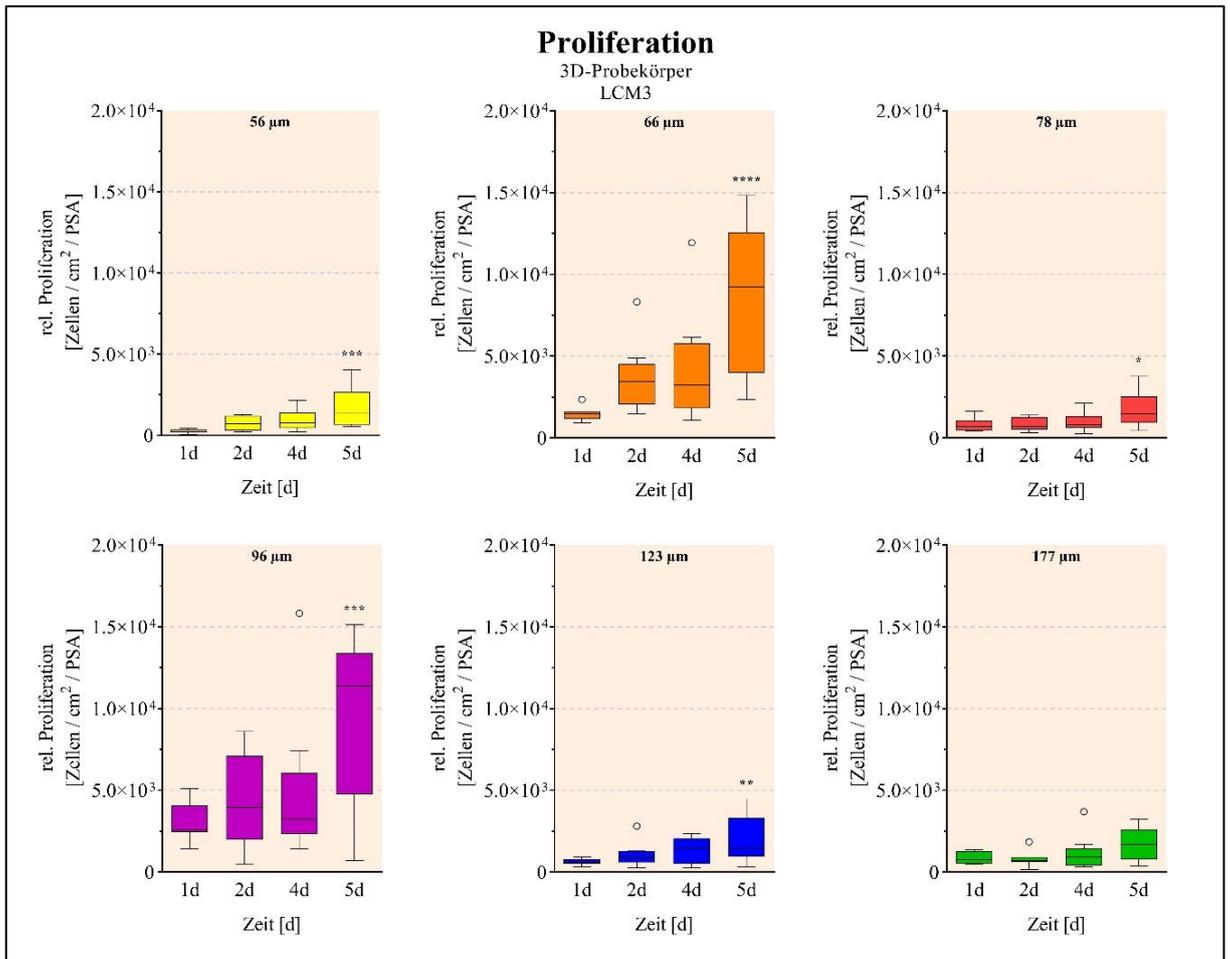


Abbildung 11: rel. Proliferation der hMSC auf einzelnen Porengrößen (LCM3). Rel. Proliferation der hMSC auf den einzelnen LCM3-Porengrößen 56 μm, 66 μm, 78 μm, 96 μm, 123 μm und 177 μm an definierten Zeitpunkten (1d, 2d, 4d, 5d) (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$)

Die hMSC in den UDMA-Poren, welche als Standardvergleich dienten, ergaben keine signifikanten Veränderungen in der Zellproliferation in allen Porengrößen der UDMA-TOPO-Chip-Probekörper über den gesamten Beobachtungszeitraum (Abbildung 12 und Abbildung 13).

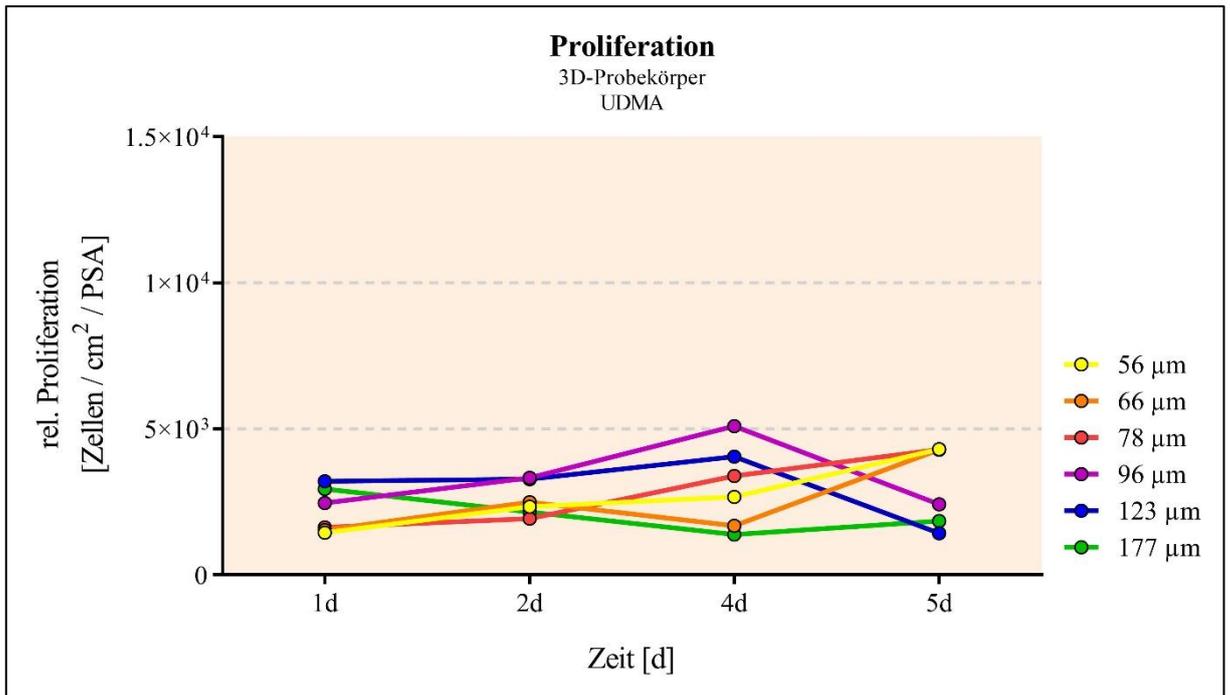


Abbildung 12: rel. Proliferation der hMSC auf verschiedenen Porengrößen (UDMA). Medianwerte der rel. Proliferation der hMSC auf verschiedenen Porengrößen (UDMA) an definierten Zeitpunkten (1d, 2d, 4d, 5d)

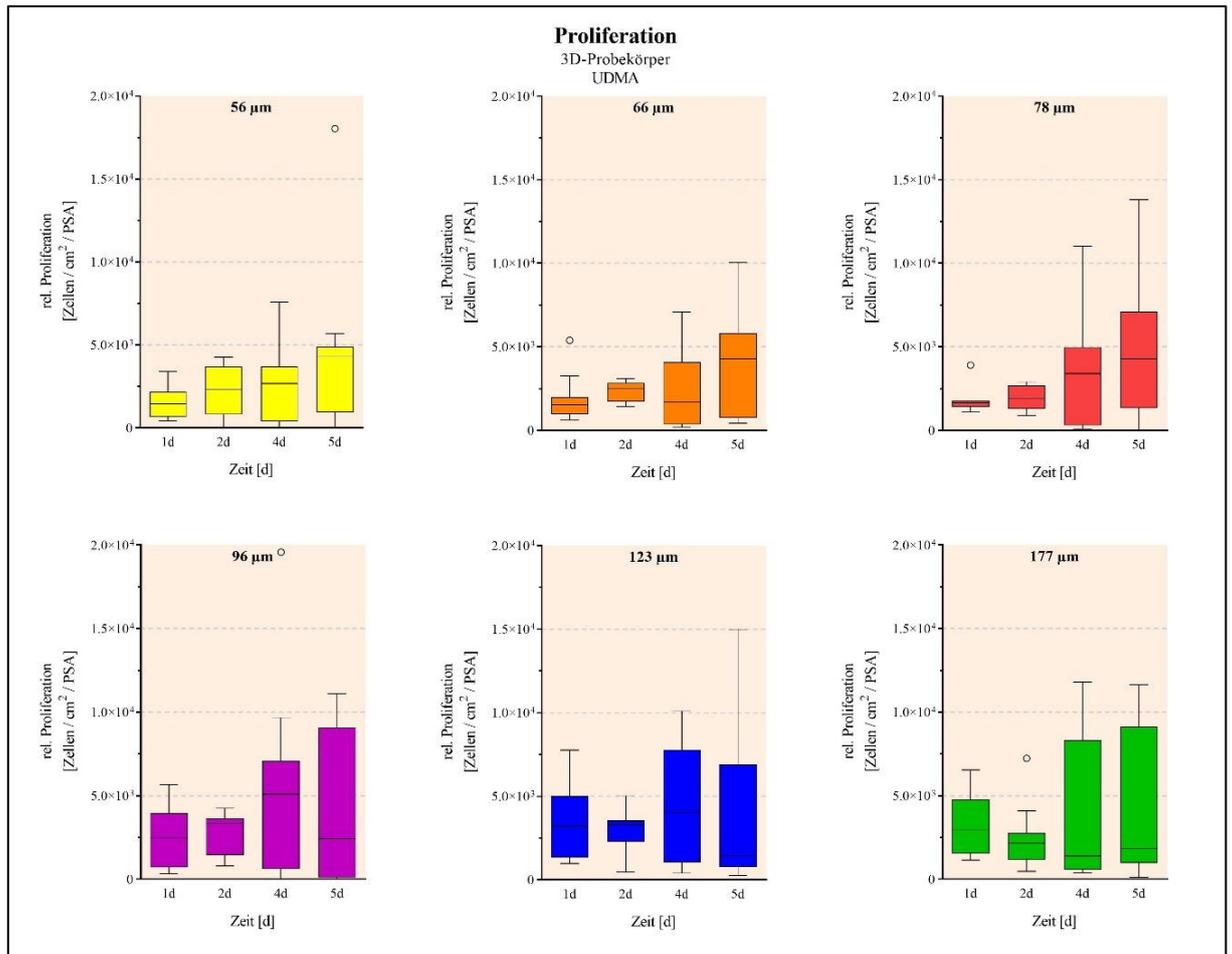


Abbildung 13: rel. Proliferation der hMSC auf einzelnen Porengrößen (UDMA). Rel. Proliferation der hMSC auf den einzelnen UDMA-Porengrößen 56 μm, 66 μm, 78 μm, 96 μm, 123 μm und 177 μm an definierten Zeitpunkten (1d, 2d, 4d, 5d)

Über die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin wurde die Funktionsfähigkeit und Organisation der hMSC in den porösen Strukturen analysiert. Es zeigte sich keine signifikante Abnahme der Vimentin-Expression der hMSC auf den LCM3- und UDMA-TOPO-Chip-Probekörpern. Die relative Vimentin-Expression blieb auf den LCM3-TOPO-Chip-Probekörpern auf einem hohen Niveau. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen verschiedenen Porenkonfigurationen festgestellt (Abbildung 14).

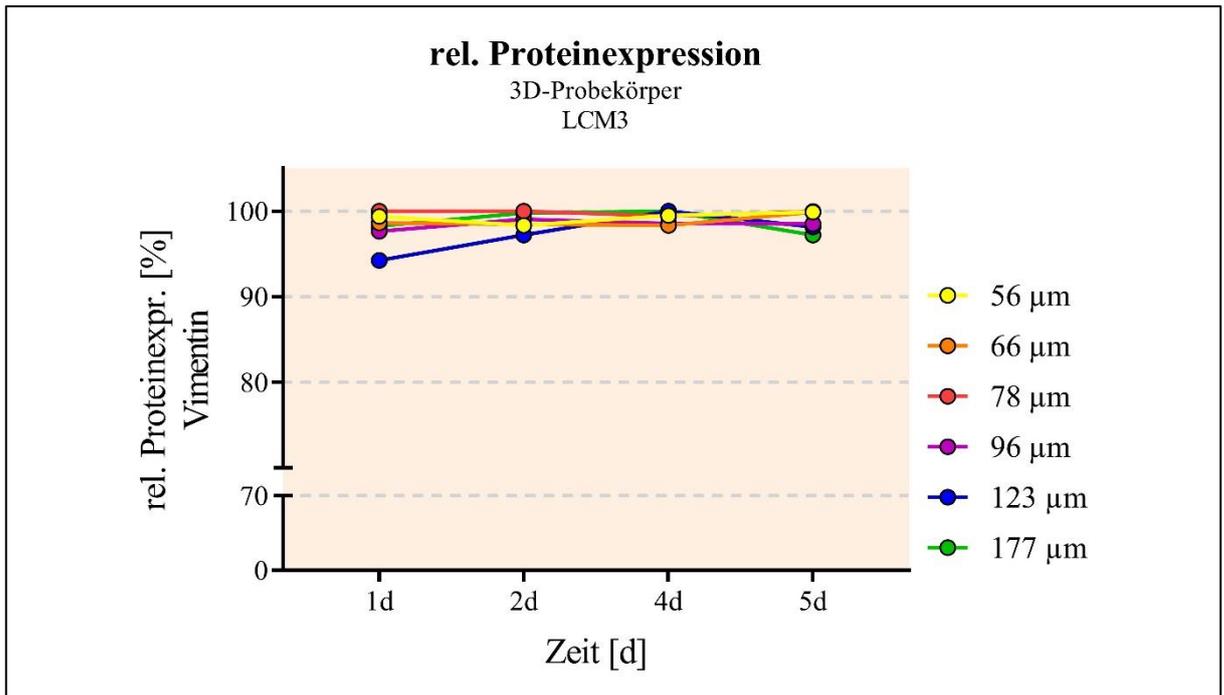


Abbildung 14: rel. Proteinexpression auf verschiedenen Porengrößen (LCM3). Mittelwerte der rel. Proteinexpression der hMSC auf verschiedenen LCM3-Porengrößen an definierten Zeitpunkten (1d, 2d, 4d, 5d)

Bei den UDMA-TOPO-Chip-Probekörpern war die Vimentin-Expression im Vergleich zu LCM3 tendenziell variabler, blieb jedoch während des gesamten Experiments hoch. Es wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen verschiedenen Porenkonfigurationen auf den UDMA-TOPO-Chip-Probekörpern festgestellt (Abbildung 15).

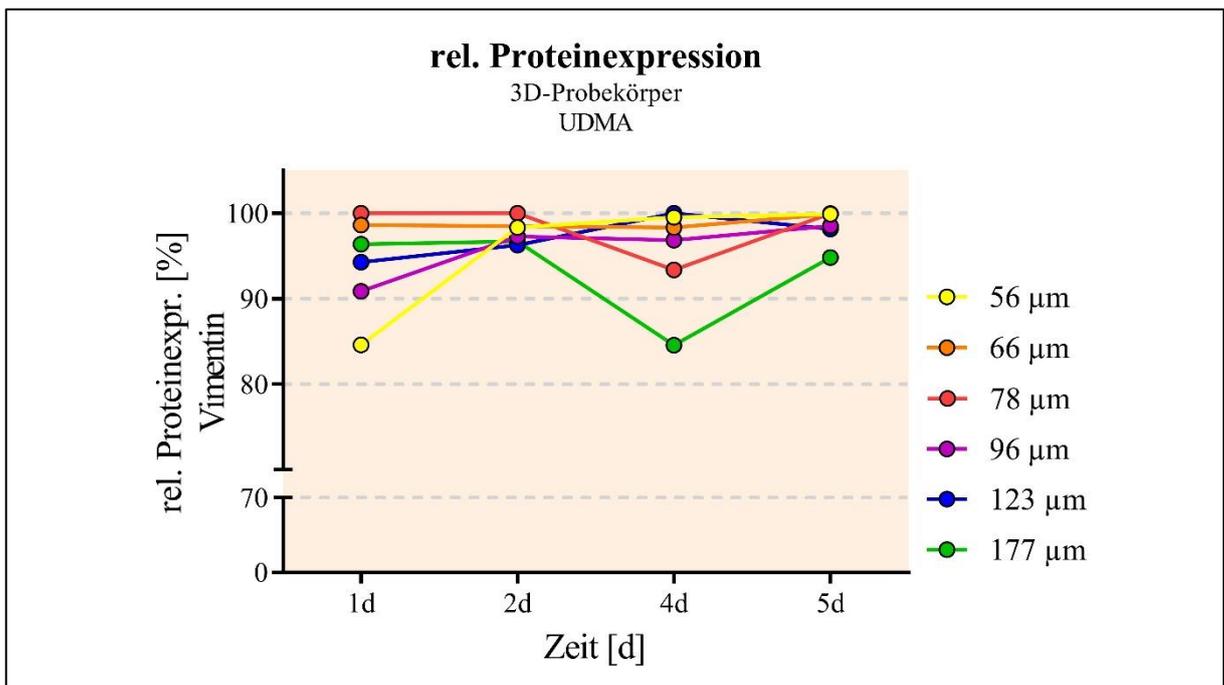


Abbildung 15: rel. Proteinexpression auf verschiedenen Porengrößen (UDMA). Mittelwerte der rel. Proteinexpression der hMSC auf verschiedenen UDMA-Porengrößen an definierten Zeitpunkten (1d, 2d, 4d, 5d)

3.2 Proliferation und Differenzierung von hMSC auf biomimetischen EZM-analogen Polymer-beschichteten 2D-Probekörpern

Die hMSC zeigten eine stabile Proliferation auf dem unbeschichteten Grundmaterial LCM3, wie auch dem (PLL-CS)₂₀-beschichteten LCM3 vom siebten bis zum 21. Tag. Es konnte gezeigt werden, dass das unbeschichtete Grundmaterial LCM3 statistisch signifikant (7d: $p \leq 0,0001$; 14d: $p \leq 0,0001$; 21d: $p \leq 0,0001$) zu einer höheren Proliferation im Gegensatz zu den (PLL-CS)₂₀-Oberflächenmodifikation über alle Beobachtungszeiträume führte (Abbildung 16).

Das Grundmaterial UDMA, wie auch dessen (PLL-CS)₂₀-beschichtete Proben, wiesen ebenfalls eine gute Proliferation auf. Auch hier konnte gezeigt werden, dass das unbeschichtete Grundmaterial UDMA statistisch höchst signifikant (7d: $p \leq 0,0001$; 14d: $p \leq 0,0001$; 21d: $p \leq 0,0001$) zu einer höheren Proliferation im Gegensatz zu den (PLL-CS)₂₀-Oberflächenmodifikation über alle Beobachtungszeiträume führte.

Hingegen zeigte sich die Proliferation im Vergleich von LCM3 und UDMA am 14. Tag signifikant besser auf den LCM3-Oberflächen ($p = 0,0341$). Dieser Unterschied war nach 21 Tagen nicht mehr zu finden. Nach erfolgreicher (PLL-CS)₂₀-Beschichtung waren keine signifikanten Unterschiede zwischen LCM3 und UDMA mehr nachzuweisen.

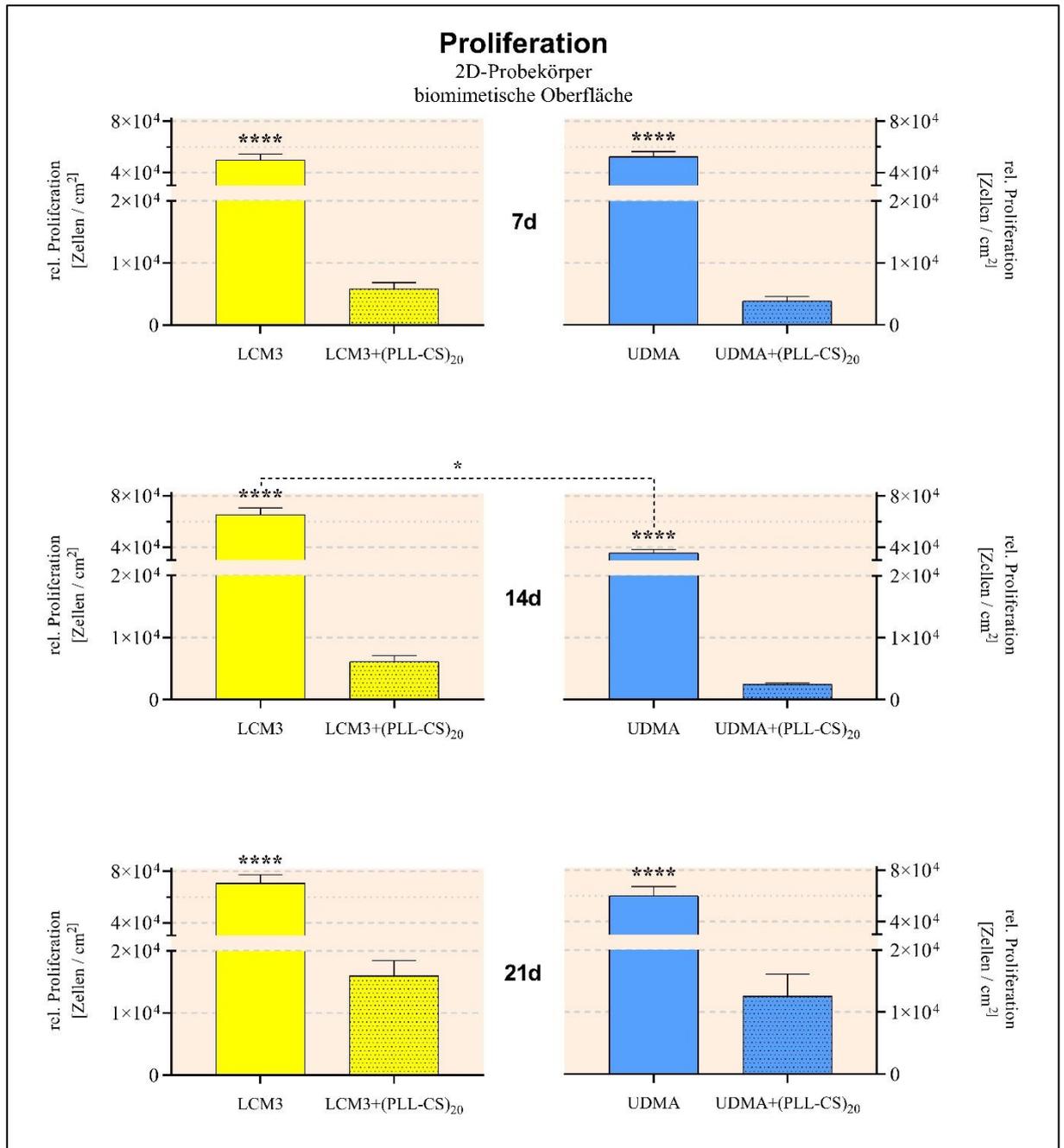


Abbildung 16: rel. Proliferation der hMSC auf (PLL-CS)₂₀-Oberflächen. Mittelwerte \pm SEM der rel. Proliferation der hMSC auf LCM3- und UDMA-2D-Probekörper mit (PLL-CS)₂₀-Oberflächen über die Beobachtungszeiträume 7d, 14d und 21d (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$)

Die hMSC zeigten auf dem nicht beschichteten LCM3 eine gleichbleibende ON-Expression. Das (PLL-CS)₂₀-beschichtete LCM3 zeigte ebenfalls eine stabile, jedoch signifikant verbesserte ON-Expression (Abbildung 17). So zeigte sich die ON-Expression am siebten ($p = 0,0048$) und 21. Tag ($p = 0,0137$) signifikant verbessert.

Auf dem (PLL-CS)₂₀-beschichteten UDMA kam es tendenziell zu einer verbesserten ON-Expression gegenüber dem unbeschichteten UDMA. Jedoch zeigte sich dies nicht signifikant.

Unterschiede in der ON-Expression zwischen dem unbeschichteten LCM3 und UDMA konnte nicht nachgewiesen werden. Hingegen zeigten sich signifikante Unterschiede der ON-Expression zwischen den (PLL-CS)₂₀-modifizierten LCM3- und UDMA-Oberflächen am siebten und 21. Tag (7d: $p = 0,0199$; 21d: $p \leq 0,0001$).

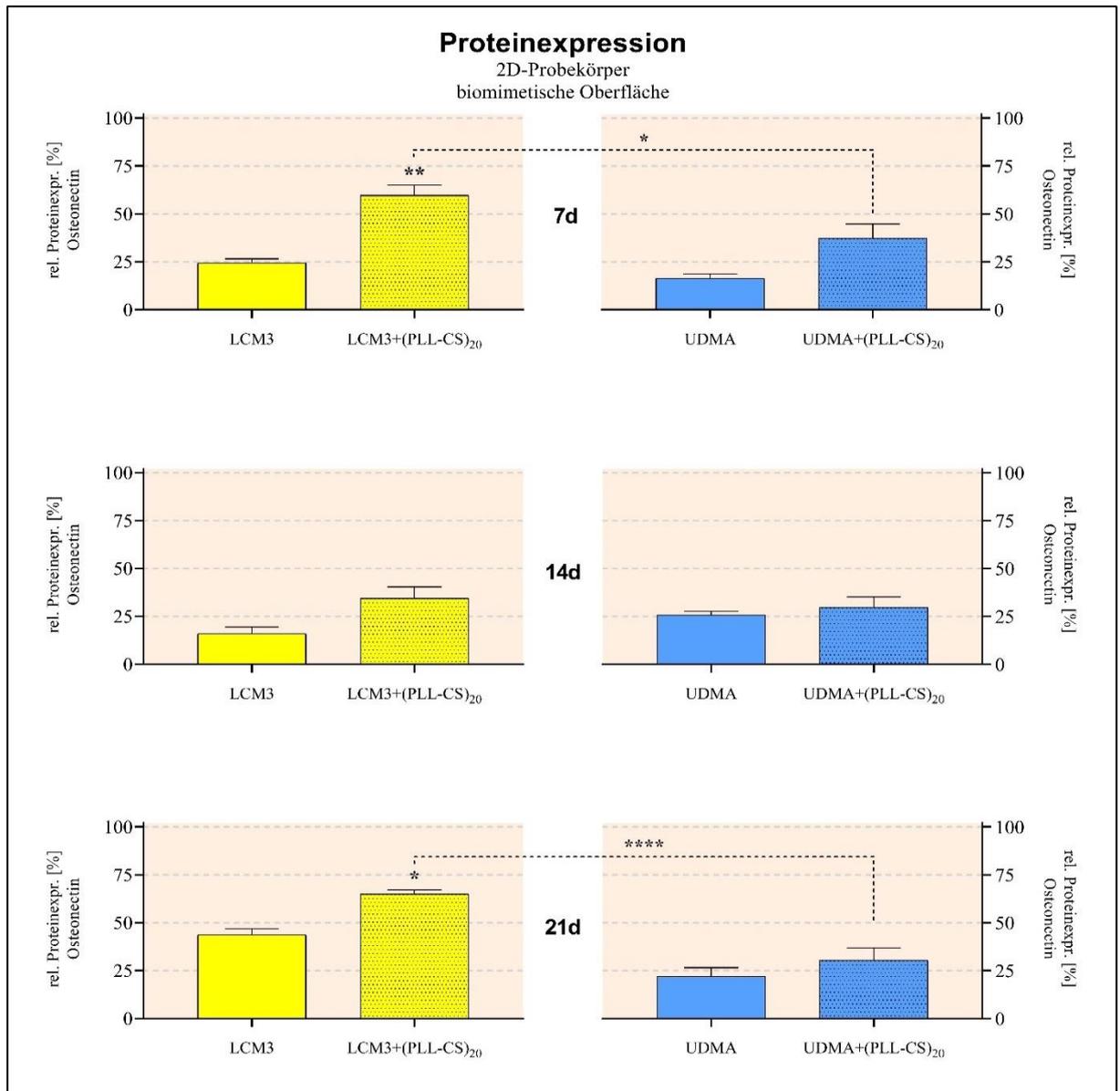


Abbildung 17: rel. Proteinexpression der hMSC auf (PLL-CS)₂₀-Oberflächen. Mittelwerte \pm SEM der rel. ON-Expression der hMSC auf LCM3- und UDMA-2D-Probekörper mit (PLL-CS)₂₀-Oberflächen über die Beobachtungszeiträume 7d, 14d und 21d (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$)

3.3 Proliferation und Differenzierung von hMSC auf steifigkeitsmodifizierten 2D-Probekörpern

Die hMSC zeigten eine stabile Proliferation auf der (PLL-CS)₂₀- und PGA-modifizierten LCM3-Oberflächen. Nach PGA-Modifikation zeigte sich am siebten und 21. Tag eine signifikant verbesserte Proliferation (7d: $p \leq 0,0001$; 21d: $p = 0,0004$) (Abbildung 18).

Ebenfalls auf den (PLL-CS)₂₀- und PGA-modifiziert UDMA-Oberflächen zeigte sich eine stabile Proliferation. Auch hier kommt es nach Steifigkeitsveränderung durch PGA zu einer signifikanten Proliferationsverbesserung am 21. Tag ($p = 0,036$).

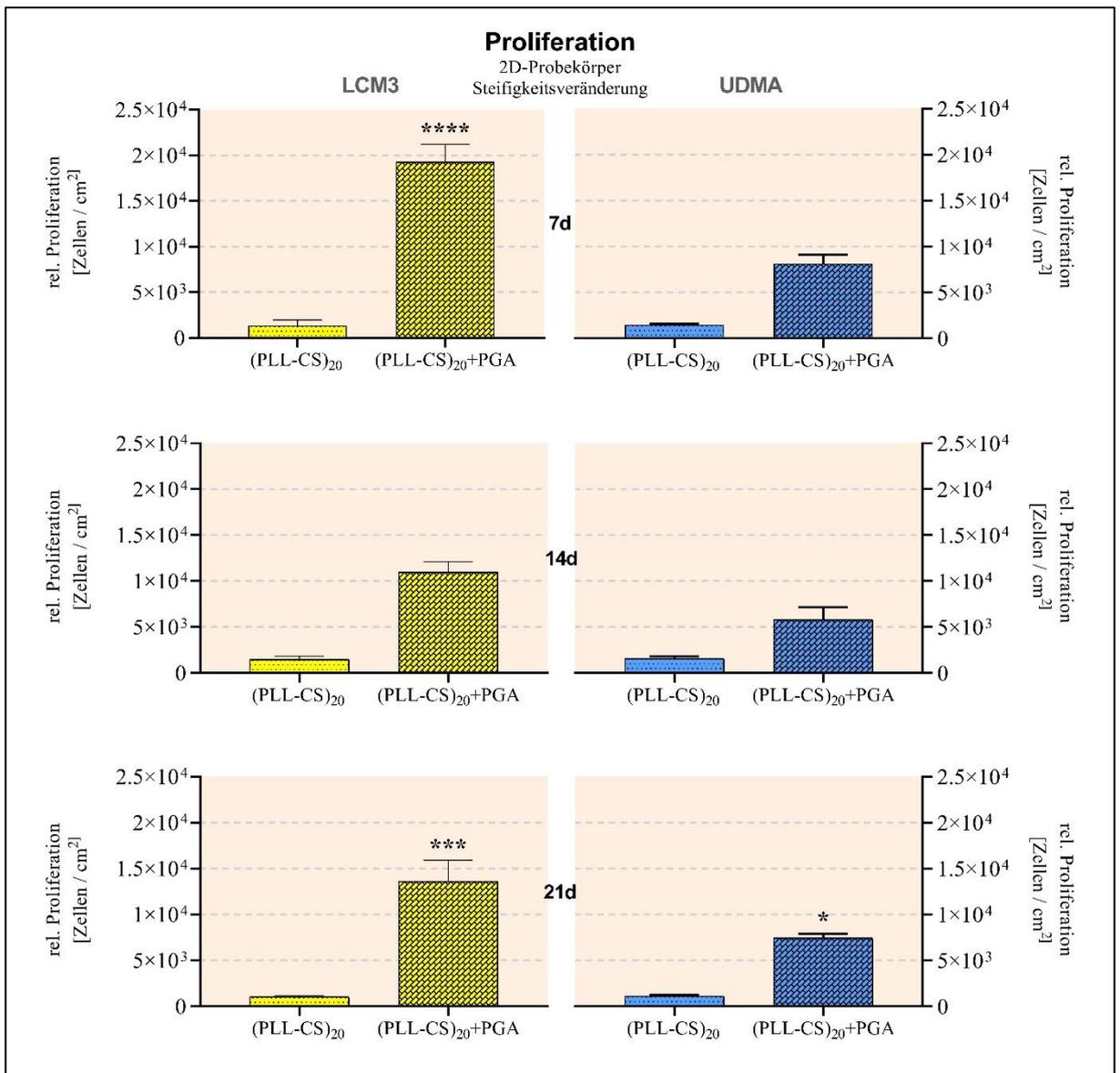


Abbildung 18: rel. Proliferation der hMSC auf (PLL-CS)₂₀+PGA-Oberflächen. Mittelwerte \pm SEM der rel. Proliferation der hMSC auf LCM3- und UDMA-2D-Probekörper mit (PLL-CS)₂₀- und (PLL-CS)₂₀+PGA-Oberflächen über die Beobachtungszeiträume 7d, 14d und 21d (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$)

Die hMSC zeigten sowohl auf (PLL-CS)₂₀- und PGA-modifiziertem LCM3 und UDMA eine stabile ON-Expression (Abbildung 19). Jedoch kam es nach sieben Tagen zu signifikanten Unterschieden. Auf (PLL-CS)₂₀- ($p = 0,0014$) und (PLL-CS)₂₀+PGA-modifizierten ($p = 0,0005$) LCM3-Oberflächen kam es im Vergleich zu unbeschichteten LCM3-Oberflächen zu einer verbesserten ON-Expression.

Das (PLL-CS)₂₀+PGA-modifizierte UDMA zeigte zum unbeschichteten UDMA am siebten Tag eine signifikante ($p = 0,0092$) Veränderung auf. Ab dem 14. Tag zeigte das PGA-modifizierte (PLL-CS)₂₀-UDMA im Vergleich zum (PLL-CS)₂₀-modifiziertem UDMA eine signifikant (14d: $p = 0,0363$; 21d: $p = 0,0221$) höhere ON-Expression.

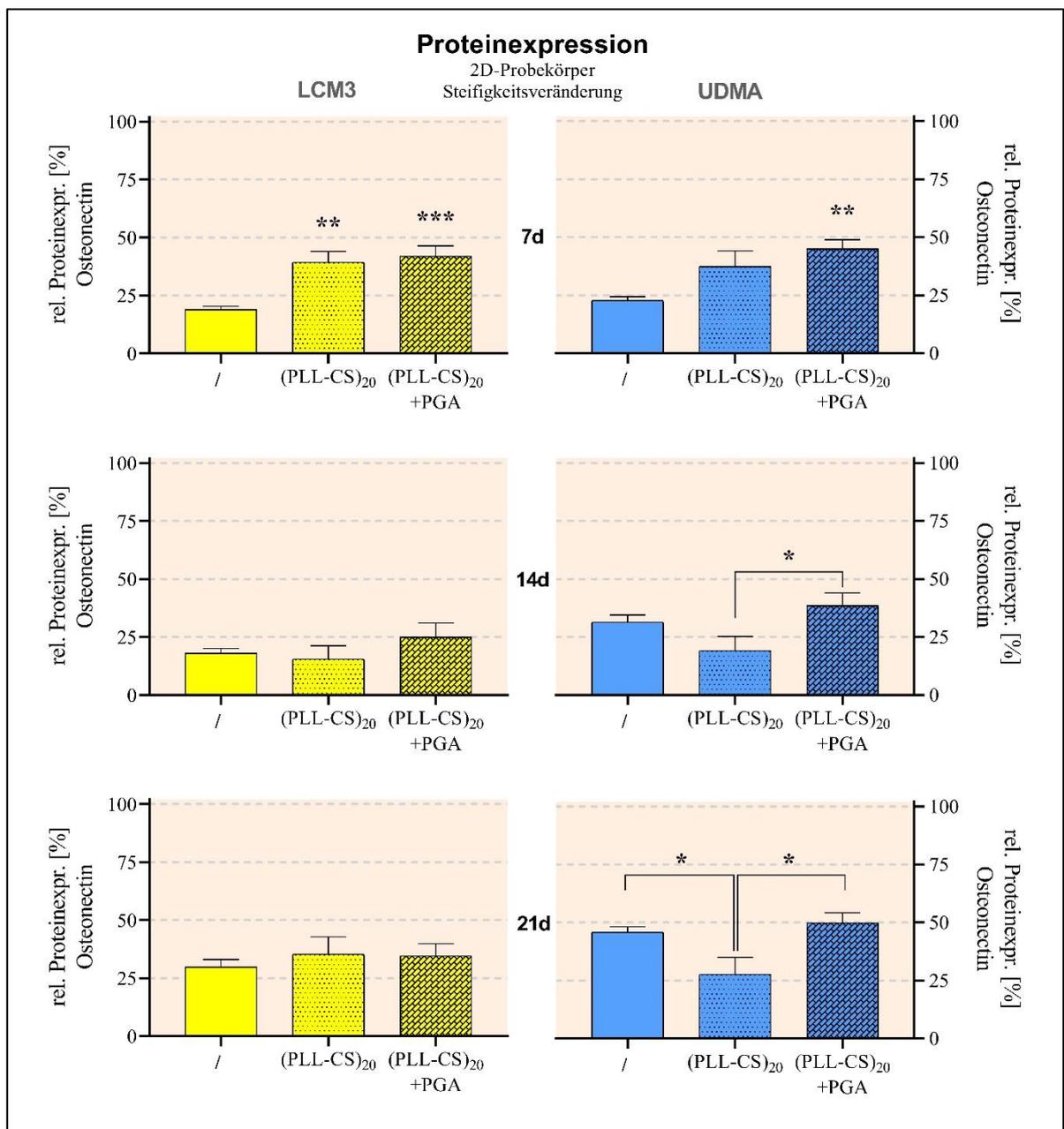


Abbildung 19: rel. Proteinexpression der hMSC auf (PLL-CS)₂₀+PGA-Oberflächen. Mittelwerte \pm SEM der rel. ON-Expression der hMSC auf LCM3- und UDMA-2D-Probekörper mit (PLL-CS)₂₀- und (PLL-CS)₂₀+PGA-

Oberflächen über die Beobachtungszeiträume 7d, 14d und 21d (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$)

Zusammenfassend zeigt sich, dass das PGA-modifizierte LCM3 und UDMA bessere Proliferationsergebnisse liefert als die alleinige (PLL-CS)₂₀-Beschichtung. Die PGA-modifizierten LCM3-Proben zeigten, besonders an ersteren Tagen, eine Tendenz zur höheren Proliferation als ihr direkter UDMA-Vergleich. Bezüglich der Proteinexpression zeigen die PGA-modifizierten Proben eine leichte Tendenz zur höheren ON-Expression als die (PLL-CS)₂₀-Beschichtungen, aber besonders im Vergleich zum unbeschichteten LCM3 zeigt sich eine signifikante Änderung hinsichtlich des (PLL-CS)₂₀- und (PLL-CS)₂₀+PGA-modifizierten LCM3 an ersteren Tagen.

3.4 Proliferation und Differenzierung von hMSC auf BMP-2-modifizierten 2D-Probekörpern

Die hMSC zeigten auf LCM3 am siebten Tag der Differenzierung eine signifikante Verbesserung der Proliferation bei rhBMP-2-Konzentrationen von 0,05 mg/ml ($p = 0,0249$) und 0,10 mg/ml ($p = 0,0059$) (Abbildung 20). Auf den UDMA-Oberflächen zeigten die hMSC ebenfalls eine signifikante Verbesserung für die Dosierungsniveaus der rhBMP-2-Konzentrationen ab 0,05 mg/ml (0,05 mg/ml: $p = 0,0122$; 0,10 mg/ml: $p \leq 0,0001$). Am 14. Tag zeigten hMSC auf LCM3 eine signifikante Verbesserung der Proliferation bei allen rhBMP-2-Konzentrationen im Vergleich zum rhBMP-2-freien LCM3+(PLL-CS)₂₀ (0,01 mg/ml: $p = 0,0092$; 0,05 mg/ml: $p = 0,0009$; 0,10 mg/ml: $p \leq 0,0001$). Die hMSC auf den UDMA-Oberflächen zeigten ebenfalls signifikante Veränderungen für alle rhBMP-2-Konzentrationen (0,01 mg/ml: $p = 0,0254$; 0,05 mg/ml: $p = 0,0025$; 0,10 mg/ml: $p \leq 0,0001$). Am 21. Tag zeigte sich kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den LCM3- und UDMA-Probekörpern. Hingegen zeigte sich am 21. Tag die Proliferation bei einer rhBMP-2-Konzentration von 0,05 mg/ml für LCM3 signifikant verbessert gegenüber UDMA ($p = 0,007$).

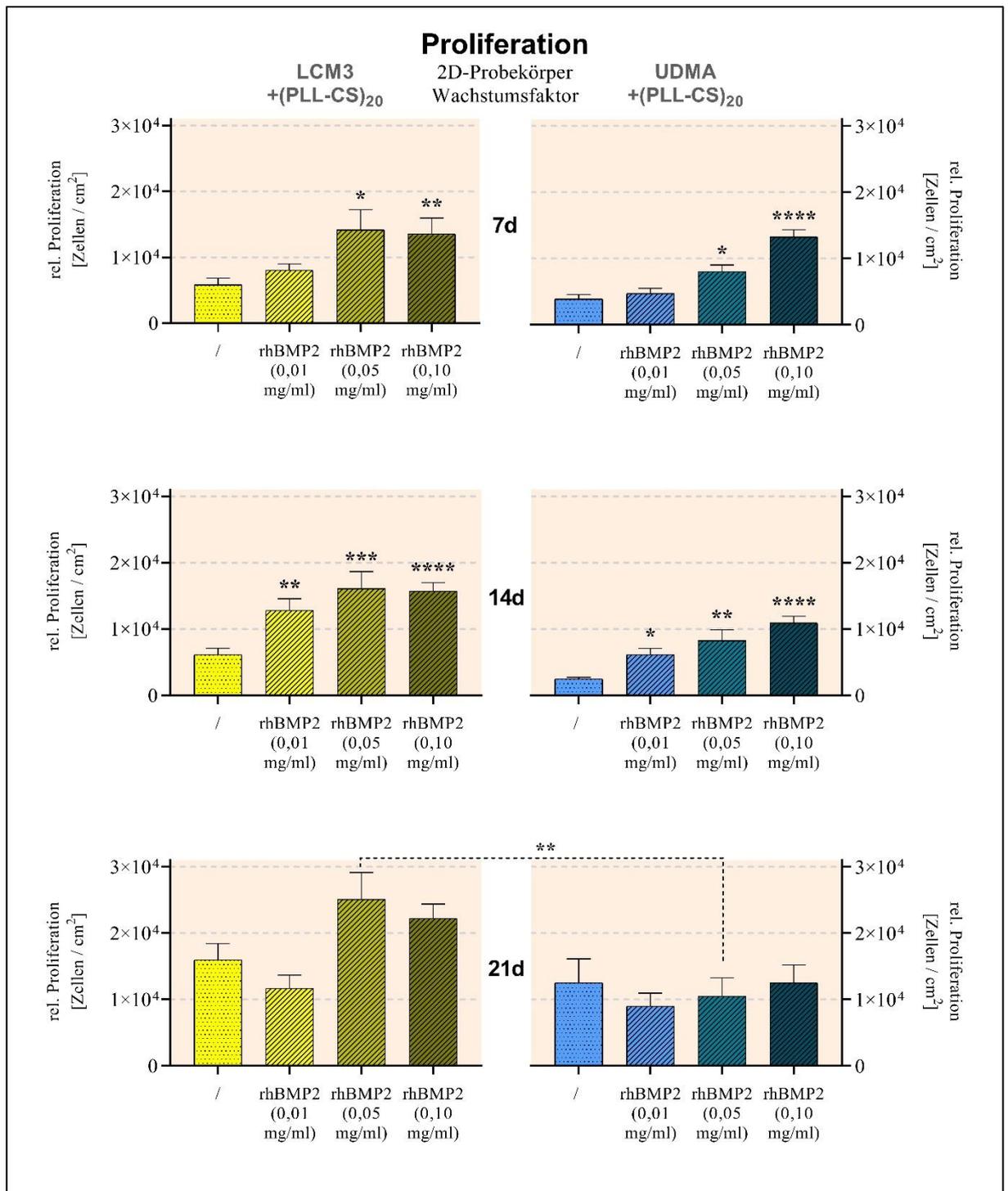


Abbildung 20: rel. Proliferation der hMSC auf BMP-2-modifizierten (PLL-CS)₂₀-Oberflächen. Mittelwerte \pm SEM der rel. Proliferation der hMSC auf LCM3- und UDMA-2D-Probekörper mit BMP-2-modifizierten (PLL-CS)₂₀-Oberflächen über die Beobachtungszeiträume 7d, 14d und 21d (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$)

Die Expression von ON zeigte sich am 14. Tag auf LCM3- und UDMA-Oberflächen signifikant verändert (Abbildung 21). Auf LCM3-Oberflächen kam es zu einer signifikanten Verbesserung der ON-Expression bei den 0,01 mg/ml- und 0,05 mg/ml-rhBMP-2 (0,01 mg/ml: $p = 0,0347$; 0,05 mg/ml: $p = 0,0471$). Die hMSC auf den UDMA-Oberflächen zeigten eine signifikante Verbesserung erst bei einer Konzentration von 0,10 mg/ml rhBMP-2 ($p = 0,004$).

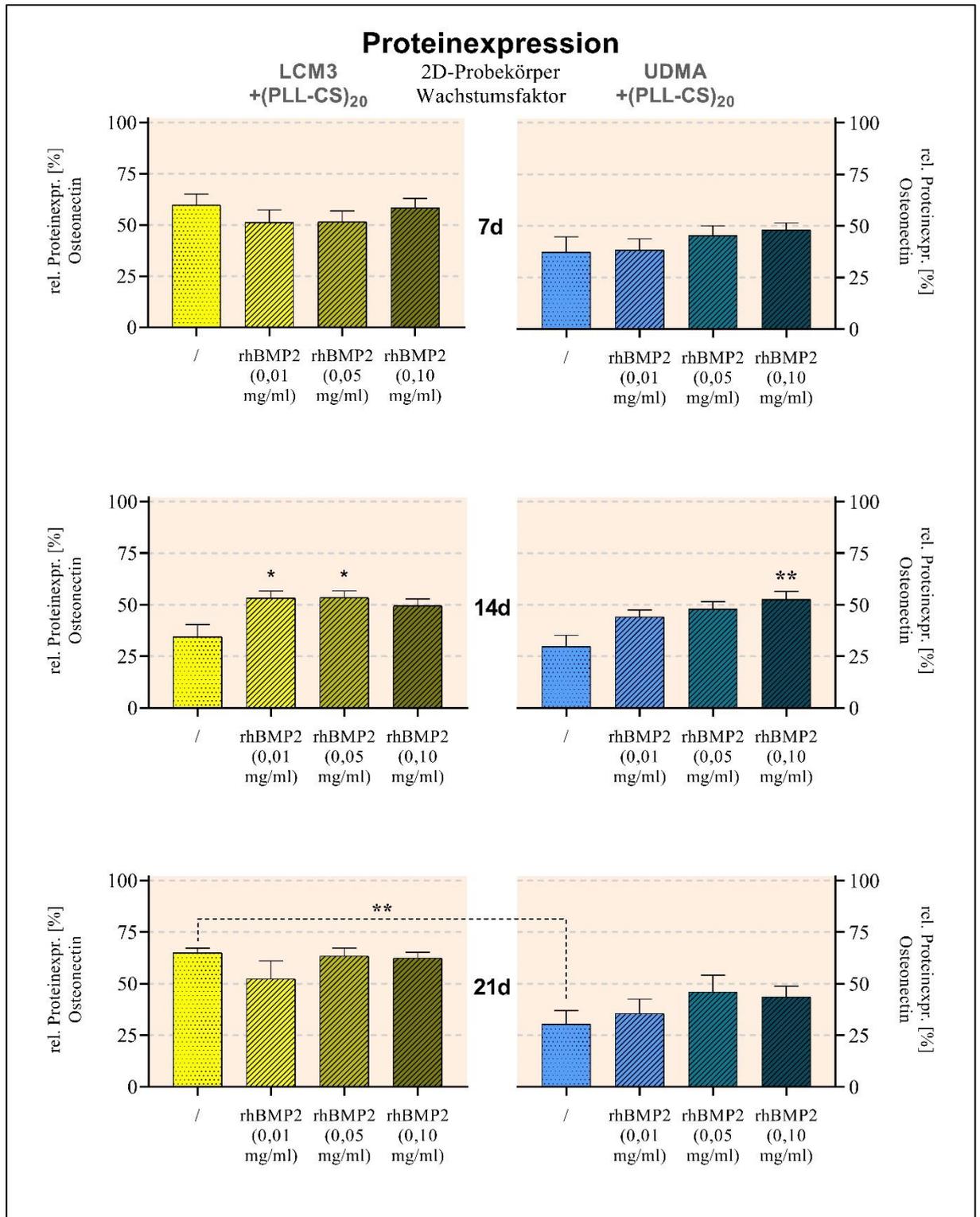


Abbildung 21: rel. Proteinexpression der hMSC auf BMP-2-modifizierten (PLL-CS)₂₀-Oberflächen. Mittelwerte \pm SEM der rel. ON-Expression der hMSC auf LCM3- und UDMA-2D-Probekörper mit BMP-2-modifizierten (PLL-CS)₂₀-Oberflächen über die Beobachtungszeiträume 7d, 14d und 21d (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$)

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Proliferation von hMSC auf den modifizierten LCM3- und UDMA-Oberflächen in Gegenwart von BMP-2 signifikant zunahm. Es zeigte sich jedoch, dass hierfür bereits Konzentrationen von 0,01 und 0,05 mg/ml BMP-2-Konzentrationen auf LCM3 ausreichten, während auf den UDMA-Oberflächen erst höhere Konzentrationen von 0,10 mg/ml rhBMP-2 entsprechendes zeigten.

4 Diskussion

4.1 Trägermaterialien

Mit Hilfe der 2PP-Technologie wurden LCM3- und UDMA-Gerüste mit einem definiert quadratisch-geometrischem Design hergestellt und miteinander verglichen. Die Proliferation von hMSC auf den LCM3-Gerüsten zeigte hier im Laufe der Zeit eine signifikante Zunahme der Zellzahlen, während auf den UDMA-Gerüsten keine entsprechende Zunahme zu verzeichnen war (56 μm : $p = 0,0008$; 66 μm : $p \leq 0,0001$; 78 μm : $p = 0,0496$; 96 μm : $p = 0,0004$; 123 μm : $p = 0,0010$). Durch vorangegangene Studien (Weiß et al. 2009; Weiß et al. 2011) konnte bereits der zytokompatible Effekt für 3T3-Zellen und bovine Chondrozyten hinsichtlich der Materialien LCM3 und UDMA gezeigt werden. Die Zellanhaftung und Zellausbreitung wird jedoch wesentlich von der Art des Photopolymers beeinflusst (Weiß et al. 2011). Hinsichtlich der hMSC kann der Grund für den Unterschied zwischen dem LCM3 und UDMA in diesem Bericht in der Tatsache liegen, dass LCM3 eine gute Biokompatibilität, ohne nachteilige Auswirkungen auf zelluläre Komponenten, aufweist (He et al. 2018; Huang et al. 2014), weshalb das Copolymer von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zur Verwendung im TE zugelassen wurde (Gunatillake und Adhikari 2003; Thirivikraman et al. 2017). Das lactidreiche LCM3 mit einem LA:CL-Verhältnis von 8:2 zeichnet sich durch einen hohen E-Modul (4,8 MPa) aus und ist daher für den Knochenaufbau geeignet. Da die Steifigkeit von Osteoid und Knorpel zwischen 10 – 50 kPa liegt (Buxboim et al. 2010), liegen die mechanischen Eigenschaften von LCM3-Gerüsten für die Knochen- und Knorpelrekonstruktion im richtigen Bereich (Hauptmann et al. 2019a). Zusätzlich ist das LCM3 durch seinen geringeren Caprolactongehalt 2PP-konform, da keine optische störende Kristallite bei Raumtemperatur gebildet werden (Felfel et al. 2016). Entsprechend kann aus LCM3 ein Gerüst für das BTE geschaffen werden, das auf die Therapie von *critical size defects* abzielt, indem es eine, für die Knochenregeneration geeignete, langsame Abbaurate bietet und zusätzlich Eigenschaften aufzeigt, die die Angiogenese und eine gute Spannungsverteilung bei hohen Knochenbelastungen ermöglichen (Felfel et al. 2016). Im Gegensatz zum LCM3 wurde das *Leakage* des UDMA aus Mikrostrukturen wiederholt beschrieben (Goldberg 2008; Yoshii 1997) und zeigte zytologische Reaktionen, wie die Bildung von Sauerstoffradikalen, Zellapoptose und genetische Veränderungen (Goldberg 2008; Kleinsasser et al. 2004). Wisniewska-Jarosinska et al. (2011) zeigten in ihrer Studie, dass UDMA (1 mM) signifikant ($p \leq 0,001$) die Lebensfähigkeit von chinesischen Hamster-Eierstockzellen verringerte, einen DNA-Schaden verursachte und die Apoptose induziert. Infolgedessen könnten die nachteiligen Auswirkungen dieses Auslaugungsprozesses dazu geführt haben, dass die hMSC auf den UDMA-Träger nicht in der Lage waren, die Zellzahlen zu erhöhen (Geurtsen et al. 1998; Kurt et al. 2018). Gleichwohl wird das UDMA häufig in biologischen Anwendungen als Basismonomer in selbstklebenden Dentalharzzementen verwendet, wobei die negativen Auswirkungen durch Kopplung mit anderen Monomeren abnehmen können (Kurt et al. 2018).

4.2 Oberflächenmodifikation durch Mikrostrukturierung

Die Besiedlung von 3D-Trägern ist abhängig von vielen Faktoren, u. a. von der Architektur, wie z. B. Porengröße oder -gestaltung, Interkonnektivität, Porosität und Topographie. Die proliferativen und osteogenen Eigenschaften von hMSC sind mechanosensitiv und können durch die dreidimensionale Struktur des Gerüsts beeinflusst werden (Ferlin et al. 2016; Hsieh et al. 2016). In Anbetracht dessen hatte, in der vorliegenden Studie, die Porengröße einen signifikanten Einfluss auf die hMSC-Proliferation auf den LCM3-Trägern, die die höchsten Zellzunahme in Poren der Größen 66 μm und 96 μm zeigte (56 μm : $p = 0,0008$; 66 μm : $p \leq 0,0001$; 78 μm : $p = 0,0496$; 96 μm : $p = 0,0004$; 123 μm : $p = 0,0010$). Hingegen zeigte sich die hMSC-Proliferation auf den UDMA-Trägern unberührt von diesem Einfluss. Kleinere Poren, zwischen 43 μm bis 49 μm , ermöglichten keine 3D-Organisation der hMSC auf den unterschiedlichen Materialien und Porengrößen. Die Poren über 123 μm zeigten keine signifikant bessere Proliferation auf LCM3 oder UDMA. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Poren einerseits groß genug sein müssen, um die Zellmigration zu ermöglichen, während sie auf der anderen Seite klein genug sein sollten um eine ausreichende Zelladhäsionsoberfläche bereitzustellen (Matsiko et al. 2015). Frühere Studien zeigten, dass Porengrößen um 150 μm unterstützend zur spontanen osteogenen Stimulation von hMSC auf 3D-Trägern wirken (Koroleva et al. 2015), während kleinere poröse Strukturen mit einer erhöhten Proteinadsorption, einem erhöhten Ionen- und Nährstoffaustausch sowie einer erhöhten Apatitbildung einhergehen (Ambre et al. 2015). Über ein einstimmiges Ergebnis zur optimalen Porengröße für verschiedene Zelllinien gibt es rezent keinen Konsens (Dhandayuthapani et al. 2011; Gao et al. 2014; Griffon et al. 2006; Hutmacher et al. 2007; Karageorgiou und Kaplan 2005; Lawrence und Madihally 2008; Lee et al. 2008; Lien et al. 2009; Mandal und Kundu 2009; Mygind et al. 2007; Oh et al. 2007). Allgemein sind Porengrößen zwischen 100 μm und 300 μm bestimmt worden, die für eine erfolgreiche osteogene Differenzierung erforderlich sind (Karageorgiou und Kaplan 2005). Für synthetische Polymere variieren die Porengrößen zwischen 40 bis 465 μm (Karageorgiou und Kaplan 2005). Die Unterschiede im Vergleich zu den früher berichteten Ergebnissen in Bezug auf Porengröße und Zellzahl lassen sich möglicherweise durch Unterschiede des entsprechenden Zelltyps und Gerüstmaterials erklären, die in den einzelnen Studien verwendet wurden. In der vorliegenden Studie verbesserten mikrostrukturierte LCM3-Träger mit einer Porengröße zwischen 56 μm bis zu 123 μm signifikant die Proliferation von hMSC. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass eine geometrische Form eines hydrophilen Polymers mit quadratischen Poren, das Zellwachstum dahingehend beeinflusst, dass eine *Open-Box*-Geometrie die Zellen in die dritte Dimension wachsen, und dadurch das Einwachsen von Zellen fördern kann (Heitz et al. 2017).

Die zytoskelettale Reaktion von Zellen auf unterschiedlichen Oberflächenstrukturen und Porengrößen kann durch Expression von Intermediärfilamenten analysiert werden. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung der mechanischen Integrität von Zellen, die entsprechend an mechanische Belastungen angepasst werden kann (Barata et al. 2017;

Goldman et al. 2008; Marino et al. 2014). Insbesondere bei hMSC hat Vimentin einen starken Einfluss auf den Zellkern, der die Steifigkeit und das Nukleusvolumen beeinflusst. So scheint ein auxetisches Material weniger dehnbar zu sein, wenn es von einem verstärkten Netzwerk unterstützt wird, da die mit Druck- oder Zugbelastungen verbundenen Volumenänderungen dem Gerüstnetzwerk entgegenwirken. Dieser Effekt wird bei der osteogenen Differenzierung noch verstärkt (Keeling et al. 2017). Die Messung der Persistenzlänge von Intermediärfilamenten, als Modell zur Quantifizierung der Steifigkeitsreaktion auf ein Polymer, variieren jedoch über einen weiten Bereich von 100 nm bis zu mehreren Mikrometern (Goldman et al. 2008). Eine Veränderung der Mikrostrukturierung kann eine zytoskelettale Reaktion unabhängig von Porengröße und Material auslösen, jedoch ist diese nur in bestimmten Porengrößen verstärkt und materialabhängig (Karageorgiou und Kaplan 2005; Matsiko et al. 2015). In unserem Modelllaufbau zeigt die konstante Expression von Vimentin, dass es zu keiner Einschränkung oder Beeinflussung der zellulären Integrität durch Material oder 3D-Strukturierung gekommen war. Hingegen zeigte sich auf dem UDMA eine Tendenz zur höheren Variation der Vimentinexpression.

4.3 Biofunktionalisierung durch PEM-Beschichtung und deren Steifigkeitsmodifikation

Nicht nur die Porengröße selbst kann Zellen spezifisch beeinflussen, sondern auch deren Oberfläche kann die Zellproliferation, -organisation und -differenzierung beeinflussen (Murphy et al. 2012; Wang et al. 2016; Wu et al. 2017). Gerüste aus synthetischen Polymeren sind oft hydrophob und weisen keine Biofunktionalität auf (Verma et al. 2010). Die Zellanhaftung und deren Proliferation können durch die Modifikation der Oberflächenbenetzbarkeit und -ladung des Grundmaterials mittels PEM-Beschichtung verbessert werden (Ferraris et al. 2018; Guo et al. 2018). Durch die Anwendung des (PLL-CS)₂₀-Multilayers zur Modifikation der Copolymeroberflächeneigenschaften kam es jedoch zur signifikanten Abnahme der zellulären Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe mit dem unbeschichteten LCM3 (7d: $p \leq 0,0001$; 14d: $p \leq 0,0001$; 21d: $p \leq 0,0001$) oder UDMA (7d: $p \leq 0,0001$; 14d: $p \leq 0,0001$; 21d: $p \leq 0,0001$). Während die Zellzahlen auf den einfachen (PLL-CS)₂₀-Multilayern niedrig blieben, wurde jedoch die Expression von Osteonectin durch die PEM-Schicht auf LCM3 am siebten ($p = 0,0048$) und 21. Tag ($p = 0,0137$) signifikant verbessert. Polysaccharide, insbesondere GAGs, besitzen ein hohes Wasserbindungspotential, was zu hochquellbaren, hydrogelartigen Anordnungen führt. Das Ergebnis der höheren Wassermenge in den CS-Proben ist eine hydrogelartige Steifheit und ein niedriger E-Modul (Richert und Boulmedais und et al. 2004; Richert und Engler und et al. 2004; Schneider et al. 2006; Wu et al. 2009). Die Beobachtung einer schlechteren Zellausbreitung und -proliferation auf CS-Multilayern, korreliert daher mit der niedrigen mechanischen Steifigkeit (~ 9 kPa) (Grohmann et al. 2011). Durch die Steifigkeits-

modifikation unter Verwendung von PGA (~ 369 kPa) kam es zu einer teils signifikanten Zunahme, sowohl von der Zellproliferation bezüglich des umliegenden nicht-modifizierten (PLL-CS)₂₀-beschichteten LCM3 (7d: $p \leq 0,0001$; 21d: $p = 0,0004$), als auch der Expression von Osteonectin hinsichtlich des nicht-modifizierten (PLL-CS)₂₀-beschichteten UDMA (14d: $p = 0,0363$; 21d: $p = 0,0221$). Die ON-Expression hingegen blieb auf dem (PLL-CS)₂₀-beschichteten, wie auch auf dem PGA-modifizierten LCM3 identisch. Trotz des initialen Benefits der PGA-Modifizierung verlor der Effekt bei längerer Kultivierung an Wirkung. Dies ist jedoch bekannt für statisch kultivierte MSC. Dieser Effekt kann durch kontinuierliche mechanische Stimulation oder die Präsenz von BMP-2 aufgehoben werden (Del Rosario et al. 2015; Steinmetz et al. 2015). Jedoch kann der Effekt einer zunehmenden PEM-Filmsteifigkeit zu einer vergrößerten Anhäufung und Proliferation osteoblastenähnlicher Zellen führen (Grohmann et al. 2011; Richert und Boulmedais und et al. 2004; Schneider et al. 2006). Allein das flächenisolierte Auftragen von PGA auf die (PLL-CS)₂₀-Filme erhöht die Elastizität der behandelten Flächen signifikant auf ~ 369 kPa (Grohmann et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte so eine vermehrte Adhäsion und Proliferation der hMSC beobachtet werden. Ursächlich hierfür kann der Prozess der Durotaxis sein, der einen deutlichen Vorteil von hMSC-Zellen auf EZM-Oberflächen mit einer höheren Steifigkeit beschreibt (Collins et al. 2010). Weiter zeigt sich, dass die (PLL-CS)₂₀-Multilayer eine überwiegende *random coiled*-Konformation aufweisen. Grohmann et al. (2012) konnten zeigen, dass die Peptidkonformation einen Einfluss auf die zellbiologischen Funktionen von Osteoblasten hat. (PLL-CS)₂₀-Multilayer hemmen durch ihre überwiegende *random coil*-Konformation die Ausbreitung von Osteoblasten. Im Gegensatz dazu verändern die Polypeptidketten nach PGA-Modifikation die *random coiled*-Struktur in eine β -Faltblattstruktur und zeigen somit eine vergrößerte Ausbreitungsfläche. Dieser Effekt kann die Proliferation unterstützen und eine signifikante Proliferationszunahme bedingen (Elyada et al. 2014; Grohmann et al. 2012).

4.4 Biofunktionalisierung durch die Kombination von PEM und Wachstumsfaktor BMP-2

Um die Proliferation und die osteogene Differenzierung von hMSC zusätzlich zu verbessern, wurden die (PLL-CS)₂₀-Multilayer mit rhBMP-2 modifiziert. Die Wirkung und der Einfluss von BMP-2 hängt von der Entfernung und Dosierung ab. Lee et al. (2014) zeigten, dass 2 mm ausreichen, um den BMP-2-Einfluss bei einer Konzentration von 0,05 mg/ml an benachbarten Stellen zu stoppen. Eine Erhöhung der Menge an verabreichtem BMP-2 kann jedoch zu einer pathologischen ektopen Knochenbildung führen, wie sie nach Wirbelsäulenoperationen beobachtet wurden (Deutsch 2010; Tannoury und An 2014). Um den Effekt von BMP-2 an der Stelle der Differenzierung zu beeinflussen und eine kontrollierte BMP-2-Abgabe zu erreichen wurde die *LbL*-Technik zur Modifikation der (PLL-CS)₂₀-Beschichtungen angewendet. Die (PLL-CS)-Multilayer können, aufgrund der im Allgemeinen guten Bindungsaffinität von sGAG

zu Wachstumsfaktoren und deren synergistischen Unterstützung (Hudalla und Murphy 2011), durch Einbau solcher empfindlichen Biomoleküle eine verbesserte Bioaktivität zeigen. Gefördert wird dies insbesondere durch die milden Beschichtungsbedingungen der *LbL*-Technik (Macdonald et al. 2010; Macdonald et al. 2011). Die Proliferation von hMSC auf diesen modifizierten LCM3-Oberflächen nahm in Gegenwart von 0,05 mg/ml (7d: $p = 0,0249$; 14d: $p = 0,0009$) und 0,10 mg/ml BMP-2 (7d: $p = 0,0059$; 14d: $p \leq 0,0001$) bis zum 14. Tag signifikant zu. Eine vergleichbare Verbesserung wurde auf den UDMA-Oberflächen beobachtet (0,05 mg/ml: 7d: $p = 0,0122$; 14d: $p = 0,0025$; 0,10 mg/ml: 7d: $p \leq 0,0001$; 14d: $p \leq 0,0001$). Gleiches gilt für die Expression von Osteonectin, die sowohl auf BMP-2-modifizierten LCM3- als auch auf UDMA-Oberflächen am 14. Tag anstieg. Es gab jedoch einen Unterschied zwischen LCM3- und UDMA-Probekörpern. Der Anstieg war für die 0,01 mg/ml und 0,05 mg/ml BMP-2-Konzentrationen auf LCM3 signifikant ($p = 0,0347$; $p = 0,0471$), während die UDMA-Oberflächen nur für höhere Konzentrationen von 0,10 mg/ml BMP-2 einen signifikanten ($p = 0,004$) Anstieg der Osteonectin-Expression zeigten. Obwohl die (PLL-CS)-Multilayer ein großes Potenzial besitzen, gibt es nur wenige Studien in der Anwendung von Wachstumsfaktor-modifizierten PEM-Filmen. Crouzier et al. (2011) konnten mit C2C12-Zellen zeigen, dass sich die Bioaktivität biomimetischer (PLL/Hyaluron)-Multilayer mit Matrix-gebundenem BMP-2 signifikant verbesserten und die C2C12-Zellen in Abwesenheit von BMP-2 schlechter proliferierten. Ähnliche Ergebnisse konnte auch die Gruppe um Macdonald et al. (2011) beschreiben, welche eine BMP-2-freisetzende *LbL*-Membran, durch die Kombination von Poly-(β -Aminoester) und CS nutzte. *In vitro* konnte eine frühe Aktivierung der alkalischen Phosphatase in den MC3T3-E1-Zellen nach sechs Tagen sowie eine verstärkte Calciumablagerung und Mineralisierung nach 28 Tagen nachgewiesen werden. Das LCM3 bietet schon bei niedrigeren BMP-2-Dosierungen eine Verbesserung der Proliferation und der osteogenen Differenzierung auf deren Oberflächen als UDMA. Dies kann an der guten Biokompatibilität und dem hohen E-Modul seitens des LCM3 liegen (Hauptmann et al. 2019b; He et al. 2018; Huang et al. 2014). Beim UDMA kann wiederum der Effekt des *Leakage* nachteilig sein (Goldberg 2008; Yoshii 1997). Auf diese Weise scheint das LCM3, auch bei dem Versuch das eingebaute BMP-2 zu reduzieren, begünstigt zu sein. So könnten die unerwünschten Ereignisse, wie pathologische ektopische Knochenbildung oder verstärkte Osteolyse vermieden werden (Deutsch 2010; Tannoury und An 2014).

4.5 Ausblick

Ein erfolgreiches Stromazellen-basiertes BTE würde eine Kombination von mesenchymalen Vorläuferzellen, geeigneten Biofaktoren zur Förderung der osteogenen Differenzierung und zellfreundlichen Gerüstbiomaterialien erfordern (Wang et al. 2020). Die Forschungen, welche sich größtenteils in der präklinischen Phase befinden (Battafarano et al. 2021), konzentrieren sich auf hMSC zur Verbesserung der Knochenregeneration (Marolt Presen et al. 2019; Yorukoglu et al. 2017). Technisch können die Zellen auf unterschiedlichen Gerüsten kultiviert

werden (Sartika et al. 2020). Bei der Konstruktion von 3D-Trägern für die hMSC-Besiedlung sollte jedoch auch die optimale Porosität beachtet werden. Porengrößen zwischen 60 bis 100 μm in Verbindung mit einer kontrollierten Steifigkeitsmodifikation und Integration von Wachstumsfaktoren auf biologisch resorbierbaren Materialien sind heute möglich. Das biologische Copolymer LCM3 bietet hierfür in Kombination mit der *LbL*-Technik zur Gewinnung von PEM eine interessante Option, insbesondere da niedrigere Konzentrationen von BMP-2 zu einer signifikanten Verbesserung der osteogenen Differenzierung führen konnten. Zusätzlich sind Oberflächenmodifikationen der PEM hinsichtlich der Steifigkeitserhöhung durch PGA möglich. Herausstechend ist die Verfügbarkeit einer flexiblen Materialgrundlage auf Basis der Polymere PLA und PCL, zusammengeführt zu einem modifizierbaren Copolymer. In Kombination mit der 2PP, einer nanoskaligen Polymerisationstechnik auf Basis von Multiphotonenabsorption und softwarebasierten Modellen, ist die Herstellung von 3D-Gerüsten mit steuerbaren Struktur-Beziehungen möglich und bieten so weitere Möglichkeiten der Entwicklung und gegenseitigen Beeinflussung hinsichtlich der Therapien (Regenerative Medizin) im dem sich entwickelnden Bereich des TE. Studien zeigten darüber hinaus, dass eine kombinierte Anwendung von hMSC und endothelialen Zellen zur besseren Initialisierung der Revaskularisation beitragen kann (Böhrnsen und Schliephake 2016; Kocherova et al. 2019). Solche prävasculierten, osteogenen Zell-Matrix-Träger könnten eine aussichtsreiche Wahl für zukünftige Defektregenerationen werden.

5 Zusammenfassung

Ziel der Studie: Für einen zusätzlichen Wissensgewinn in der Grundlagenforschung der *bone tissue regeneration*, war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, als *proof of principle*, zum einen herauszufinden welchen Einfluss unterschiedliche Porengrößen eines speziellen Copolymer-Trägers auf humane Stromazellen (hMSC) haben, im Vergleich zu denen eines Standardpolymers. Zum anderen sollte der Einfluss einer biomimetischen Funktionalisierung dieses Copolymers, mittels EZM-analoger Polyelektrolyt-Multilayer (PEM), auf die hMSC untersucht werden. Außerdem sollte der Einfluss separater Modifikationen dieser EZM-analogen PEM, durch lokalisierte Steifigkeitsmodifikationen und dem Implementieren eines Wachstumsfaktors, auf die hMSC untersucht werden.

Material und Methode: Mit Hilfe der Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) wurden aus einem synthetischen, biokompatiblen (D,L)-Lactid-co- ϵ -Caprolacton-dimethacrylat-Copolymer (LCM3) 3D-Gerüste mit unterschiedlich großer quadratischer *Open-Box*-Architektur hergestellt. Die Porengröße lag zwischen 43 und 177 μm Kantenlänge. Um die optimalen zellulären Bedingungen dieser abbaubaren Matrix zu bestimmen, erfolgte die *in vitro*-Analyse der Proliferation und Differenzierung von hMSC auf LCM3 und der Vergleich mit einer Standard-Matrix aus anorganischem Urethan-dimethacrylat (UDMA). Zur Etablierung einer biomimetischen Matrixoberflächenstruktur wurden die synthetischen Copolymere durch PEM, bestehend aus einem Komplex aus Polypeptid Poly-L-Lysin (PLL) und Chondroitinsulfat (CS), modifiziert. Mit Hilfe von Poly-L-Glutaminsäure (PGA) erfolgte die Modifizierung der PEM in ihrer Steifigkeit. Zur weiteren Funktionalisierung der PEM wurde unter Verwendung von rekombinantem bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) zusätzlich ein Wachstumsfaktor eingebaut. Die Auszählung und statistische Auswertung der mittels Immunfluoreszenz und Immunhistochemie markierten hMSC erfolgte nach einem bis fünf bzw. sieben bis 21 Tagen.

Ergebnisse: Eine signifikante Proliferation der hMSC zeigte sich für Porengrößen von 56 bis 123 μm (56 μm : $p = 0,0008$; 66 μm : $p \leq 0,0001$; 78 μm : $p = 0,0496$; 96 μm : $p = 0,0004$; 123 μm : $p = 0,0010$). Eine kontinuierliche Expression von Vimentin als klassischer Marker für den mesenchymalen Phänotyp konnte für alle Porengrößen beobachtet werden.

Durch die PEM-Beschichtung konnte eine signifikante Zunahme der hMSC-Differenzierung erzielt werden ($p \leq 0,01$). Gekennzeichnet wird dies durch die Osteonectin-Expression als Ausdruck für die Induktion der Knochenmineralisation.

In Gegenwart von PGA konnte die Proliferation auf den PEM-Oberflächen des LCM3 signifikant verbessert werden ($p \leq 0,0001$). Die Osteonectin-Expression der hMSC blieb nach PGA-vermittelter Strukturumlagerung der PEM-Oberflächen gleich, im Vergleich zum unbeschichteten LCM3 jedoch signifikant erhöht ($p = 0,0005$).

Durch die BMP-2-Funktionalisierung konnte die hMSC-Proliferation und -differenzierung auf PEM-Oberflächen signifikant verbessert werden. Bei Konzentrationen von 0,01 mg/ml ($p \leq 0,01$), 0,05 mg/ml ($p \leq 0,001$) und 0,10 mg/ml ($p \leq 0,0001$) erhöhte sich die Proliferation

von hMSC auf rhBMP-2-modifiziertem LCM3 sowie die Proteinexpression von Osteonectin signifikant ($p \leq 0,05$).

Diskussion: Die durch Mikrostrukturierung hervorgerufene Oberflächenmodifizierung zeigt, dass die Poren einerseits groß genug dimensioniert sein müssen, um die Zellmigration zu ermöglichen, aber ebenfalls klein genug bleiben müssen um eine ausreichende Zelladhäsion bereitzustellen. Die Proliferation der hMSC zeigt eine Abhängigkeit vom Material und der Porengröße mit einer besseren Proliferation und Integration auf LCM3.

Die Biofunktionalisierung durch die CS-PEM-Beschichtung neigt zu einem eher hydrogelartigen, mit einem niedrigen E-Modul versehenen Typus, welcher eine *random coil*-Konformation aufweist. Durch eine Modifikation, mittels einer Vernetzung mit PGA, übernehmen die PEM eine intermolekulare β -Faltblatt-Struktur, die zu einem erhöhten Elastizitätsmodul der Oberflächen führt. Dies führt zu einer Verbesserung der Proliferation und unterstreicht den Einfluss der Oberflächensteifigkeit in Bezug auf die Wechselwirkungen zwischen den Zellen und dem Biomaterial.

Eine Biofunktionalisierung durch die Kombination des Wachstumsfaktors BMP-2 mit der PEM-Beschichtung zeigt, dass auf einem LCM-Copolymer im Vergleich zum UDMA bereits bei niedrigen Dosen eine verbesserte Proliferation und osteogene Differenzierung nachgewiesen werden kann.

Schlussfolgerung: Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass mittels 2PP hergestellte 3D-Träger aus methacrylierten (D,L)-Lactid-co- ϵ -Caprolacton-Copolymeren mit einer Porengröße zwischen 56 und 123 μm günstige Voraussetzungen für die hMSC-Proliferation liefern. Oberflächenmodifikationen der PEM-Filme mit PGA oder durch die Integration von Wachstumsfaktoren, wie BMP-2, können die Proliferation und Differenzierung von hMSC positiv beeinflussen.

6 Literaturverzeichnis

- Abdelkebir K, Gaudiere F, Morin-Grognet S, Coquerel G, Atmani H, Labat B, Ladam G (2011): Protein-triggered instant disassembly of biomimetic Layer-by-Layer films. *Langmuir* 27, 14370-14379
- Acerbi I, Cassereau L, Dean I, Shi Q, Au A, Park C, Chen YY, Liphardt J, Hwang ES, Weaver VM (2015): Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr Biol UK* 7, 1120-1134
- Agarwal R, Garcia AJ (2015): Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Adv Drug Deliv Rev* 94, 53-62
- Almalki SG, Agrawal DK (2016): Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation* 92, 41-51
- Ambre AH, Katti DR, Katti KS (2015): Biomaterialized hydroxyapatite nanoclay composite scaffolds with polycaprolactone for stem cell-based bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 103, 2077-2101
- Amid R, Kheiri A, Kheiri L, Kadkhodazadeh M, Ekhlasmandkermani M (2020): Structural and chemical features of xenograft bone substitutes: A systematic review of in vitro studies. *Biotechnol Appl Bioc* 0, 1-21
- Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ (2019): Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma* 33, 203-213
- Barata D, Dias P, Wieringa P, van Blitterswijk C, Habibovic P (2017): Cell-instructive high-resolution micropatterned polylactic acid surfaces. *Biofabrication* 9, 035004
- Battafarano G, Rossi M, De Martino V, Marampon F, Borro L, Secinaro A, Del Fattore A (2021): Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* 22, 1128
- Becker AL, Johnston AP, Caruso F (2010): Layer-by-layer-assembled capsules and films for therapeutic delivery. *Small* 6, 1836-1852
- Bertrand P, Jonas A, Laschewsky A, Legras R (2000): Ultrathin polymer coatings by complexation of polyelectrolytes at interfaces: suitable materials, structure and properties. *Macromol Rapid Commun* 21, 319-348
- Bierbaum S, Douglas T, Hanke T, Scharnweber D, Tippelt S, Monsees TK, Funk RH, Worch H (2006): Collageneous matrix coatings on titanium implants modified with decorin and chondroitin sulfate: characterization and influence on osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res A* 77, 551-562
- Böhrnsen F, Schliephake H (2016): Supportive angiogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells and endothelial cells in monolayer and co-cultures. *Int J Oral Sci* 8, 223-230
- Boudou T, Crouzier T, Ren K, Blin G, Picart C (2010): Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: new biomedical applications. *Adv Mater* 22, 441-467

- Brown TD, Dalton PD, Hutmacher DW (2011): Direct writing by way of melt electrospinning. *Adv Mater* 23, 5651-5657
- Brown TD, Edin F, Detta N, Skelton AD, Hutmacher DW, Dalton PD (2014): Melt electrospinning of poly(epsilon-caprolactone) scaffolds: phenomenological observations associated with collection and direct writing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 45, 698-708
- Buser D, Sennerby L, De Bruyn H (2017): Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. *Periodontol 2000* 73, 7-21
- Buxboim A, Ivanovska IL, Discher DE (2010): Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus: how deeply do cells 'feel' outside and in? *J Cell Sci* 123, 297-308
- Camilo CC, Silveira CAE, Faeda RS, de Almeida Rollo JMD, Purquerio BM, Fortulan CA (2017): Bone response to porous alumina implants coated with bioactive materials, observed using different characterization techniques. *J Appl Biomater Funct Mater* 15, e223-e235
- Castner DG, Ratner BD (2002): Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surf Sci* 500, 28-60
- Causa F, Netti PA, Ambrosio L (2007): A multi-functional scaffold for tissue regeneration: the need to engineer a tissue analogue. *Biomaterials* 28, 5093-5099
- Chan WP, Kung FC, Kuo YL, Yang MC, Lai WF (2015): Alginate/Poly(gamma-glutamic Acid) Base Biocompatible Gel for Bone Tissue Engineering. *Biomed Res Int* 2015, 185841
- Chatakun P, Nunez-Toldra R, Diaz Lopez EJ, Gil-Recio C, Martinez-Sarra E, Hernandez-Alfaro F, Ferrer-Padro E, Giner-Tarrida L, Atari M (2014): The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: a current review of the literature. *Cell Mol Life Sci* 71, 113-142
- Chien HW, Chang TY, Tsai WB (2009): Spatial control of cellular adhesion using photo-crosslinked micropatterned polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* 30, 2209-2218
- Claeyssens F, Hasan E, Gaidukeviciute A, Achilleos D, Ranella A, Reinhardt C, Ovsianikov A, Shizhou X, Fotakis C, Vamvakaki M, et al. (2009): Three-Dimensional Biodegradable Structures Fabricated by Two-Photon Polymerization. *Langmuir* 25, 3219-3223
- Collins JM, Ayala P, Desai TA, Russell B (2010): Three-dimensional culture with stiff microstructures increases proliferation and slows osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Small* 6, 355-360
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001): Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7841-7845

- Costa RR, Custódio CA, Arias FJ, Rodríguez-Cabello JC, Mano JF (2011): Layer-by-Layer Assembly of Chitosan and Recombinant Biopolymers into Biomimetic Coatings with Multiple Stimuli-Responsive Properties. *Small* 7, 2640-2649
- Costa RR, Mano JF (2014): Polyelectrolyte multilayered assemblies in biomedical technologies. *Chem Soc Rev* 43, 3453-3479
- Criado-Gonzalez M, Mijangos C, Hernández R (2021): Polyelectrolyte Multilayer Films Based on Natural Polymers: From Fundamentals to Bio-Applications. *Polymers-Basel* 13, 2254
- Crouzier T, Fourel L, Boudou T, Albigès-Rizo C, Picart C (2011): Presentation of BMP-2 from a soft biopolymeric film unveils its activity on cell adhesion and migration. *Adv Mater* 23, H111-118
- Da Sie Y, Li Y-C, Chang N-S, Campagnola PJ, Chen S-J (2015): Fabrication of three-dimensional multi-protein microstructures for cell migration and adhesion enhancement. *Biomedical optics express* 6, 480-490
- Dalilottojari A, Delalat B, Harding FJ, Cockshell MP, Bonder CS, Voelcker NH (2016): Porous Silicon-Based Cell Microarrays: Optimizing Human Endothelial Cell-Material Surface Interactions and Bioactive Release. *Biomacromolecules* 17, 3724-3731
- Danileviciusa P, Georgiadia L, Pateman CJ, Claeysen F, Chatzinikolaidouac M, Farsaria M (2015): The effect of porosity on cell ingrowth into accurately defined, laser-made, polylactide-based 3D scaffolds. *Appl Surf Sci* 336, 2-10
- Daugela P, Pranskunas M, Juodzbaly G, Liesiene J, Baniukaitiene O, Afonso A, Sousa Gomes P (2018): Novel cellulose/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration: In vitro and in vivo study. *J Tissue Eng Regen Med* 12, 1195-1208
- Decher G (1997): Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* 277, 1232
- Decher G, Hong JD, Schmitt J (1992): Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* 210, 831-835
- Del Rosario C, Rodriguez-Evora M, Reyes R, Delgado A, Evora C (2015): BMP-2, PDGF-BB, and bone marrow mesenchymal cells in a macroporous beta-TCP scaffold for critical-size bone defect repair in rats. *Biomed Mater* 10, 045008
- Deutsch H (2010): High-dose bone morphogenetic protein-induced ectopic abdomen bone growth. *Spine J* 10, e1-4
- Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS (2011): Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science* 2011, 290602
- Diomede F, Marconi GD, Fonticoli L, Pizzicanella J, Merciaro I, Bramanti P, Mazzon E, Trubiani O (2020): Functional Relationship between Osteogenesis and Angiogenesis in Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci* 21, 3242
- Discher DE, Janmey P, Wang YL (2005): Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310, 1139-1143

- Domb A, Mikos AG (2007): Matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 185-186
- 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, 315-317
- Douglas T, Heinemann S, Hempel U, Mietrach C, Knieb C, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H (2008): Characterization of collagen II fibrils containing biglycan and their effect as a coating on osteoblast adhesion and proliferation. *J Mater Sci Mater Med* 19, 1653-1660
- Duarte Campos DF, Blaeser A, Buellesbach K, Sen KS, Xun W, Tillmann W, Fischer H (2016): Bioprinting Organotypic Hydrogels with Improved Mesenchymal Stem Cell Remodeling and Mineralization Properties for Bone Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater* 5, 1336-1345
- Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R (2011): Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol* 6, 13-22
- Dwivedi R, Kumar S, Pandey R, Mahajan A, Nandana D, Katti DS, Mehrotra D (2020): Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *J Oral Biol Craniofac Res* 10, 381-388
- Ehrler DM, Vaccaro AR (2000): The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop Relat Res*, 38-45
- Elena G-G, Melanie JC, Gordon WB (2015): Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone* 81, 112-121
- Elyada A, Garti N, Füredi-Milhofer H (2014): Polyelectrolyte multilayer-calcium phosphate composite coatings for metal implants. *Biomacromolecules* 15, 3511-3521
- Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M (2001): Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 12, 331-349
- Engler AJ, Richert L, Wong JY, Picart C, Discher DE (2004): Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: correlations between substrate stiffness and cell adhesion. *Surf Sci* 570, 142-154
- Fang JY, Tan SJ, Yang Z, Tayag C, Han B (2014): Tumor bioengineering using a transglutaminase crosslinked hydrogel. *Plos One* 9, e105616
- Felfel RM, Pooza L, Gimeno-Fabra M, Milde T, Hildebrand G, Ahmed I, Scotchford C, Sottile V, Grant DM, Liefelth K (2016): In vitro degradation and mechanical properties of PLA-PCL copolymer unit cell scaffolds generated by two-photon polymerization. *Biomed Mater* 11, 015011
- Ferlin KM, Prendergast ME, Miller ML, Kaplan DS, Fisher JP (2016): Influence of 3D printed porous architecture on mesenchymal stem cell enrichment and differentiation. *Acta Biomater* 32, 161-169

- Ferraris S, Cazzola M, Peretti V, Stella B, Spriano S (2018): Zeta Potential Measurements on Solid Surfaces for in Vitro Biomaterials Testing: Surface Charge, Reactivity Upon Contact With Fluids and Protein Absorption. *Front Bioeng Biotechnol* 6, 60
- Filippi M, Born G, Chaaban M, Scherberich A (2020): Natural Polymeric Scaffolds in Bone Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* 8, 474
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970): The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3, 393-403
- Friedenstein AJ, Piatetzky S, Il, Petrakova KV (1966): Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16, 381-390
- Fujibayashi S, Takemoto M, Neo M, Matsushita T, Kokubo T, Doi K, Ito T, Shimizu A, Nakamura T (2011): A novel synthetic material for spinal fusion: a prospective clinical trial of porous bioactive titanium metal for lumbar interbody fusion. *Eur Spine J* 20, 1486-1495
- Gao C, Deng Y, Feng P, Mao Z, Li P, Yang B, Deng J, Cao Y, Shuai C, Peng S (2014): Current progress in bioactive ceramic scaffolds for bone repair and regeneration. *Int J Mol Sci* 15, 4714-4732
- Gebinoga M, Katzmann J, Fernekorn U, Hampl J, Weise F, Klett M, Löffert A, Klar TA, Schober A (2013): Multi-photon structuring of native polymers: A case study for structuring natural proteins. *Engineering in Life Sciences* 13, 368-375
- Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G (1998): Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 41, 474-480
- Gloria A, De Santis R, Ambrosio L (2010): Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering. *J Appl Biomater Biomech* 8, 57-67
- Goldberg M (2008): In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig* 12, 1-8
- Goldman RD, Grin B, Mendez MG, Kuczmarski ER (2008): Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr Opin Cell Biol* 20, 28-34
- Gombotz WR, Pettit DK (1995): Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. *Bioconjug Chem* 6, 332-351
- Gribova V, Auzely-Velty R, Picart C (2012): Polyelectrolyte Multilayer Assemblies on Materials Surfaces: From Cell Adhesion to Tissue Engineering. *Chem Mater* 24, 854-869
- Griffon DJ, Sedighi MR, Schaeffer DV, Eurell JA, Johnson AL (2006): Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering. *Acta Biomater* 2, 313-320
- Grohmann S, Rothe H, Frant M, Liefelth K (2011): Colloidal force spectroscopy and cell biological investigations on biomimetic polyelectrolyte multilayer coatings composed of chondroitin sulfate and heparin. *Biomacromolecules* 12, 1987-1997

- Grohmann S, Rothe H, Liefelth K (2012): Investigations on the secondary structure of polypeptide chains in polyelectrolyte multilayers and their effect on the adhesion and spreading of osteoblasts. *Biointerphases* 7, 62
- Gunatillake PA, Adhikari R (2003): Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* 5, 1-16; discussion 16
- Guo J, Ning C, Liu X (2018): Bioactive calcium phosphate silicate ceramic surface-modified PLGA for tendon-to-bone healing. *Colloids Surf B Biointerfaces* 164, 388-395
- Gupta V, Mun G-H, Choi B, Aseh A, Mildred L, Patel A, Zhang Q, Price J, Chang D, Robb G, et al. (2011): Repair and Reconstruction of a Resected Tumor Defect Using a Composite of Tissue Flap–Nanotherapeutic–Silk Fibroin and Chitosan Scaffold. *Annals of biomedical engineering* 39, 2374-2387
- Hammond PT (2011): Engineering materials layer-by-layer: Challenges and opportunities in multilayer assembly. *AIChE Journal* 57, 2928-2940
- Hauptmann N, Lian Q, Ludolph J, Rothe H, Hildebrand G, Liefelth K (2019a): Biomimetic Designer Scaffolds made of D,L-Lactide-epsilon-Caprolactone Polymers by 2-Photon Polymerization. *Tissue Eng Part B Rev* 25, 167-186
- Hauptmann N, Lian Q, Ludolph J, Rothe H, Hildebrand G, Liefelth K (2019b): Biomimetic Designer Scaffolds Made of D,L-Lactide-epsilon-Caprolactone Polymers by 2-Photon Polymerization. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 25, 167-186
- He Y, Liu W, Guan L, Chen J, Duan L, Jia Z, Huang J (2018): A 3D-Printed PLCL Scaffold Coated with Collagen Type I and Its Biocompatibility. *Biomed Res Int* 2018, 5147156
- Heitz J, Plamadeala C, Wiesbauer M, Freudenthaler P, Wollhofen R, Jacak J, Klar TA, Magnus B, Kostner D, Weth A, et al. (2017): Bone-forming cells with pronounced spread into the third dimension in polymer scaffolds fabricated by two-photon polymerization. *J Biomed Mater Res A* 105, 891-899
- Ho MH, Kuo PY, Hsieh HJ, Hsien TY, Hou LT, Lai JY, Wang DM (2004): Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods. *Biomaterials* 25, 129-138
- Hoffman AS (2002): Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 3-12
- Holzapfel BM, Chhaya MP, Melchels FP, Holzapfel NP, Prodinger PM, von Eisenhart-Rothe R, van Griensven M, Schantz JT, Rudert M, Hutmacher DW (2013): Can bone tissue engineering contribute to therapy concepts after resection of musculoskeletal sarcoma? *Sarcoma* 2013, 153640
- Holzapfel BM, Rudert M, Hutmacher DW (2017): Gerüstträgerbasiertes Knochen-Tissue-Engineering. *Orthopade* 46, 701-710
- Horn P, Bork S, Diehlmann A, Walenda T, Eckstein V, Ho AD, Wagner W (2008): Isolation of human mesenchymal stromal cells is more efficient by red blood cell lysis. *Cytotherapy* 10, 676-685
- Hou T, Xu J, Wu X, Xie Z, Luo F, Zhang Z, Zeng L (2009): Umbilical cord Wharton's Jelly: a new potential cell source of mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 15, 2325-2334

- Hsieh WT, Liu YS, Lee YH, Rimando MG, Lin KH, Lee OK (2016): Matrix dimensionality and stiffness cooperatively regulate osteogenesis of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 32, 210-222
- Huang GTJ, Gronthos S, Shi S (2009): Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 88, 792-806
- Huang MH, Li S, Hutmacher DW, Schantz JT, Vacanti CA, Braud C, Vert M (2004): Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of epsilon-caprolactone in the presence of poly(ethylene glycol). *J Biomed Mater Res A* 69, 417-427
- Huang Y, Wong YS, Wu J, Kong JF, Chan JN, Khanolkar L, Rao DP, Boey FY, Venkatraman SS (2014): The mechanical behavior and biocompatibility of polymer blends for Patent Ductus Arteriosus (PDA) occlusion device. *J Mech Behav Biomed Mater* 36, 143-160
- Huber B, Borchers K, Tovar GE, Kluger PJ (2016): Methacrylated gelatin and mature adipocytes are promising components for adipose tissue engineering. *J Biomater Appl* 30, 699-710
- Hudalla GA, Murphy WL (2011): Biomaterials that regulate growth factor activity via bioinspired interactions. *Adv Funct Mater* 21, 1754-1768
- Hutmacher DW (2000): Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21, 2529-2543
- Hutmacher DW (2010): Biomaterials offer cancer research the third dimension. *Nat Mater* 9, 90-93
- Hutmacher DW, Cool S (2007): Concepts of scaffold-based tissue engineering--the rationale to use solid free-form fabrication techniques. *J Cell Mol Med* 11, 654-669
- Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC (2007): State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med* 1, 245-260
- Iler RK (1966): Multilayers of colloidal particles. *J Colloid Interf Sci* 21, 569-594
- James AW, LaChaud G, Shen J, Asatrian G, Nguyen V, Zhang X, Ting K, Soo C (2016): A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Eng Part B Rev* 22, 284-297
- Jiang H, Liu X-Y, Zhang G, Li Y (2005): Kinetics and template nucleation of self-assembled hydroxyapatite nanocrystallites by chondroitin sulfate. *J Biol Chem* 280, 42061-42066
- K. Perron J, E. Naguib H, Daka J, Chawla A (2009): A parametric study on the processing parameters and properties of a porous poly(DL-lactide- co -glycolide) acid 85/15 bioscaffolds. *Polym Eng Sci* 49, 2062-2069
- Karageorgiou V, Kaplan D (2005): Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26, 5474-5491

- Keeling MC, Flores LR, Dodhy AH, Murray ER, Gavara N (2017): Actomyosin and vimentin cytoskeletal networks regulate nuclear shape, mechanics and chromatin organization. *Sci Rep* 7, 5219
- Khan SN, Cammisa FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM (2005): The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 13, 77-86
- Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT (2008): Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1, 36-42
- Kita K, Gauglitz GG, Phan TT, Herndon DN, Jeschke MG (2010): Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells Dev* 19, 491-502
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Harreus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, Kehe K, Reichl FX (2004): Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent* 32, 229-234
- Kocherova I, Bryja A, Mozdziak P, Angelova Volponi A, Dyszkiewicz-Konwińska M, Piotrowska-Kempisty H, Antosik P, Bukowska D, Bruska M, Iżycki D, et al. (2019): Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. *Journal of clinical medicine* 8, 1602
- Kolan KC, Leu MC, Hilmas GE, Velez M (2012): Effect of material, process parameters, and simulated body fluids on mechanical properties of 13-93 bioactive glass porous constructs made by selective laser sintering. *J Mech Behav Biomed Mater* 13, 14-24
- Koroleva A, Deiwick A, Nguyen A, Schlie-Wolter S, Narayan R, Timashev P, Popov V, Bagratashvili V, Chichkov B (2015): Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in 3-D Zr-Si organic-inorganic scaffolds produced by two-photon polymerization technique. *Plos One* 10, e0118164
- Kurt A, Altintas SH, Kiziltas MV, Tekkeli SE, Guler EM, Kocyigit A, Usumez A (2018): Evaluation of residual monomer release and toxicity of self-adhesive resin cements. *Dent Mater J* 37, 40-48
- Labat B, Morin-Grognet S, Gaudière F, Bertolini-Forno L, Thoumire O, Vannier J-P, Ladam G, Atmani H (2016): Synergistic influence of topomimetic and chondroitin sulfate-based treatments on osteogenic potential of Ti-6Al-4V. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 104, 1988-2000
- Lamichhane SP, Arya N, Ojha N, Kohler E, Shastri VP (2015): Glycosaminoglycan-functionalized poly-lactide-co-glycolide nanoparticles: synthesis, characterization, cytocompatibility, and cellular uptake. *Int J Nanomedicine* 10, 775-789
- Landers R, Hubner U, Schmelzeisen R, Mulhaupt R (2002): Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials* 23, 4437-4447
- Langer R (2000): Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Acc Chem Res* 33, 94-101

- Langer R, Vacanti JP (1993): Tissue engineering. *Science* 260, 920-926
- Lannutti J, Reneker D, Ma T, Tomasko D, Farson D (2007): Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mat Sci Eng C* 27, 504-509
- Laurent CP, Vaquette C, Liu X, Schmitt JF, Rahouadj R (2018): Suitability of a PLCL fibrous scaffold for soft tissue engineering applications: A combined biological and mechanical characterisation. *J Biomater Appl* 32, 1276-1288
- Lawrence BJ, Madhally SV (2008): Cell colonization in degradable 3D porous matrices. *Cell Adh Migr* 2, 9-16
- Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA (2008): Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev* 14, 61-86
- Lee JW, Lim HC, Lee EU, Park JY, Lee JS, Lee DW (2014): Paracrine effect of the bone morphogenetic protein-2 at the experimental site on healing of the adjacent control site: a study in the rabbit calvarial defect model. *J Periodontol* 44, 178-183
- Lee KW, Wang S, Fox BC, Ritman EL, Yaszemski MJ, Lu L (2007): Poly(propylene fumarate) bone tissue engineering scaffold fabrication using stereolithography: effects of resin formulations and laser parameters. *Biomacromolecules* 8, 1077-1084
- Lee KY, Mooney DJ (2001): Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 101, 1869-1879
- Leistner M, Steinke M, Walles T (2013): Biomedizin in der Thoraxchirurgie: eine Standortbestimmung. *Zentralbl Chir* 138, 342-347
- Li G, Zhao M, Xu F, Yang B, Li X, Meng X, Teng L, Sun F, Li Y (2020): Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid. *Molecules* 25, 5023
- Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Lim HC, Scheduling S (2016): Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci* 1370, 109-118
- Lien SM, Ko LY, Huang TJ (2009): Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 5, 670-679
- Lu C, Meinberg E, Marcucio R, Miclau T: Fracture Repair and Bone Grafting. In: Flynn J (Hrsg.): *Orthopaedic Knowledge Update 10. Auflage*; American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont 2011, 11-21
- Lutolf MP, Hubbell JA (2005): Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 23, 47-55
- Macdonald ML, Rodriguez NM, Shah NJ, Hammond PT (2010): Characterization of tunable FGF-2 releasing polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules* 11, 2053-2059
- Macdonald ML, Samuel RE, Shah NJ, Padera RF, Beben YM, Hammond PT (2011): Tissue integration of growth factor-eluting layer-by-layer polyelectrolyte multilayer coated implants. *Biomaterials* 32, 1446-1453

- Macdougall L, Culver H, Lin C-C, Bowman C, Anseth K: 1.3.2F - Degradable and Resorbable Polymers. In: Wagner WR, Sakiyama-Elbert SE, Zhang G, Yaszemski MJ (Hrsg.): *Biomaterials Science (Fourth Edition)*. Auflage; Academic Press, London 2020, 167-190
- Maciulaitis J, Deveikyte M, Rekstyte S, Bratchikov M, Darinskas A, Simbelyte A, Daunoras G, Laurinaviciene A, Laurinavicius A, Gudas R, et al. (2015): Preclinical study of SZ2080 material 3D microstructured scaffolds for cartilage tissue engineering made by femtosecond direct laser writing lithography. *Biofabrication* 7, 015015
- Malinauskas M, Farsari M, Piskarskas A, Juodkazis S (2013): Ultrafast laser nanostructuring of photopolymers: A decade of advances. *Phys Rep* 533, 1-31
- Mandal BB, Kundu SC (2009): Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials* 30, 2956-2965
- Marino A, Desii A, Pellegrino M, Pellegrini M, Filippeschi C, Mazzolai B, Mattoli V, Ciofani G (2014): Nanostructured Brownian surfaces prepared through two-photon polymerization: investigation of stem cell response. *ACS Nano* 8, 11869-11882
- Marolt Presen D, Traweger A, Gimona M, Redl H (2019): Mesenchymal Stromal Cell-Based Bone Regeneration Therapies: From Cell Transplantation and Tissue Engineering to Therapeutic Secretomes and Extracellular Vesicles. *Front Bioeng Biotechnol* 7, 352
- Maruo S, Fourkas J (Hrsg.): Recent progress in multiphoton microfabrication. *Laser Photonics Rev* 1-2:100-111. 2008
- Matsiko A, Gleeson JP, O'Brien FJ (2015): Scaffold mean pore size influences mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and matrix deposition. *Tissue Eng Part A* 21, 486-497
- Melchels FP, Bertoldi K, Gabbrielli R, Velders AH, Feijen J, Grijpma DW (2010): Mathematically defined tissue engineering scaffold architectures prepared by stereolithography. *Biomaterials* 31, 6909-6916
- Meretoja VV, Helminen AO, Korventausta JJ, Haapa-aho V, Seppala JV, Narhi TO (2006): Crosslinked poly(epsilon-caprolactone/D,L-lactide)/bioactive glass composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 77, 261-268
- Mitsak AG, Kemppainen JM, Harris MT, Hollister SJ (2011): Effect of polycaprolactone scaffold permeability on bone regeneration in vivo. *Tissue Eng Part A* 17, 1831-1839
- Murphy CM, Matsiko A, Haugh MG, Gleeson JP, O'Brien FJ (2012): Mesenchymal stem cell fate is regulated by the composition and mechanical properties of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *J Mech Behav Biomed Mater* 11, 53-62
- Mygind T, Stiehler M, Baatrup A, Li H, Zou X, Flyvbjerg A, Kassem M, Bunger C (2007): Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials* 28, 1036-1047
- Nemir S, West JL (2010): Synthetic materials in the study of cell response to substrate rigidity. *Ann Biomed Eng* 38, 2-20

- Oh SH, Park IK, Kim JM, Lee JH (2007): In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials* 28, 1664-1671
- Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N (2014): Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 9, 18
- Ovsianikov A, Gruene M, Pflaum M, Koch L, Maiorana F, Wilhelmi M, Haverich A, Chichkov B (2010): Laser printing of cells into 3D scaffolds. *Biofabrication* 2, 014104
- Ovsianikov A, Malinauskas M, Schlie S, Chichkov B, Gittard S, Narayan R, Lobler M, Sternberg K, Schmitz KP, Haverich A (2011): Three-dimensional laser micro- and nano-structuring of acrylated poly(ethylene glycol) materials and evaluation of their cytotoxicity for tissue engineering applications. *Acta Biomater* 7, 967-974
- Park JE, Todo M (2011): Development and characterization of reinforced poly(L-lactide) scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 22, 1171-1182
- Park SH, Park DS, Shin JW, Kang YG, Kim HK, Yoon TR, Shin JW (2012): Scaffolds for bone tissue engineering fabricated from two different materials by the rapid prototyping technique: PCL versus PLGA. *J Mater Sci Mater Med* 23, 2671-2678
- Parsa A, Vahedi H, Goswami K, Aalirezaie A (2020): Available Findings Fail to Provide Strong Evidence of the Role of Bone Morphogenic Protein-2 in Femoral Head Osteonecrosis. *Arch Bone Jt Surg* 8, 5-10
- Pei M, Seidel J, Vunjak-Novakovic G, Freed LE (2002): Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 149-154
- Pei X, Ma L, Zhang B, Sun J, Sun Y, Fan Y, Gou Z, Zhou C, Zhang X (2017): Creating hierarchical porosity hydroxyapatite scaffolds with osteoinduction by three-dimensional printing and microwave sintering. *Biofabrication* 9, 045008
- Peyton SR, Ghajar CM, Khatiwala CB, Putnam AJ (2007): The emergence of ECM mechanics and cytoskeletal tension as important regulators of cell function. *Cell Biochem Biophys* 47, 300-320
- 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, 143-147
- Pozos Vázquez Cm, Boudou T, Dulong V, Nicolas C, Picart C, Glinel K (2009): Variation of polyelectrolyte film stiffness by photo-cross-linking: a new way to control cell adhesion. *Langmuir* 25, 3556-3563
- Qin X-H, Gruber P, Markovic M, Plochberger B, Klotzsch E, Stampfl J, Ovsianikov A, Liska R (2014): Enzymatic Synthesis of Hyaluronic Acid Vinyl Esters for Two-photon Microfabrication of Biocompatible and Biodegradable Hydrogel Constructs. *Polym Chem-UK* 5, 6523-6533
- Raynaud CM, Maleki M, Lis R, Ahmed B, Al-Azwani I, Malek J, Safadi FF, Rafii A (2012): Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation. *Stem Cells Int* 2012, 658356

- Ren K, Cruzier T, Roy C, Picart C (2008): Polyelectrolyte multilayer films of controlled stiffness modulate myoblast cells differentiation. *Adv Funct Mater* 18, 1378-1389
- Rentsch B, Bernhardt R, Scharnweber D, Schneiders W, Rammelt S, Rentsch C (2012): Embroidered and surface coated polycaprolactone-co-lactide scaffolds: a potential graft for bone tissue engineering. *Biomater* 2, 158-165
- Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR (2006): Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3413-3431
- Richbourg NR, Peppas NA, Sikavitsas VI (2019): Tuning the biomimetic behavior of scaffolds for regenerative medicine through surface modifications. *J Tissue Eng Regen Med* 13, 1275-1293
- Richert L, Boulmedais F, Lavallo P, Mutterer J, Ferreux E, Decher G, Schaaf P, Voegel JC, Picart C (2004): Improvement of stability and cell adhesion properties of polyelectrolyte multilayer films by chemical cross-linking. *Biomacromolecules* 5, 284-294
- Richert L, Engler AJ, Discher DE, Picart C (2004): Elasticity of native and cross-linked polyelectrolyte multilayer films. *Biomacromolecules* 5, 1908-1916
- Rotter N, Oder J, Schlenke P, Lindner U, Bohrsen F, Kramer J, Rohwedel J, Huss R, Brandau S, Wollenberg B, et al. (2008): Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev* 17, 509-518
- Salbach J, Rachner T, Rauner M, Hempel U, Anderegg U, Franz S, Simon J-C, Hofbauer L (2012): Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone. *J Mol Med* 90, 625-635
- Saltzman WM, Olbricht WL (2002): Building drug delivery into tissue engineering. *Nat Rev Drug Discov* 1, 177-186
- Sander EA, Alb AM, Nauman EA, Reed WF, Dee KC (2004): Solvent effects on the microstructure and properties of 75/25 poly(D,L-lactide-co-glycolide) tissue scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 70, 506-513
- Sartika D, Wang CH, Wang DH, Cherng JH, Fan GY, Wang YW, Lee CH, Hong PD, Wang CC, Chang SJ (2020): Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells-Incorporated Silk Fibroin as a Potential Bio-Scaffold in Guiding Bone Regeneration. *Polymers (Basel)* 12, 853
- Schliephake H (2015): Biofunctionalization of material surfaces. *Int J Oral Max Surg* 44, e16-e17
- Schneider A, Francius G, Obeid R, Schwinte P, Hemmerle J, Frisch B, Schaaf P, Voegel JC, Senger B, Picart C (2006): Polyelectrolyte multilayers with a tunable Young's modulus: influence of film stiffness on cell adhesion. *Langmuir* 22, 1193-1200
- Schneiders W, Reinstorf A, Ruhnnow M, Rehberg S, Heineck J, Hinterseher I, Biewener A, Zwipp H, Rammelt S (2008): Effect of chondroitin sulphate on material properties and bone remodelling around hydroxyapatite/collagen composites. *J Biomed Mater Res A* 85, 638-645

- Schroeter M, Wildemann B, Lendlein A: Biodegradable Materials. In: Steinhoff G (Hrsg.): Regenerative Medicine: From Protocol to Patient. 2. Auflage; Springer, Dordrecht 2013, 529-556
- Schumacher M, Deisinger U, Detsch R, Ziegler G (2010): Indirect rapid prototyping of biphasic calcium phosphate scaffolds as bone substitutes: influence of phase composition, macroporosity and pore geometry on mechanical properties. *J Mater Sci-Mater M* 21, 3119-3127
- Schwenzer N, Ehrenfeld M: Plastische und wiederherstellende Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie. In: Schwenzer N, Ehrenfeld M (Hrsg.): Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Auflage; Thieme, Stuttgart 2011, 435-476
- Shi R, Huang Y, Ma C, Wu C, Tian W (2019): Current advances for bone regeneration based on tissue engineering strategies. *Front Med* 13, 160-188
- Shiratori SS, Rubner MF (2000): pH-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. *Macromolecules* 33, 4213-4219
- Shirokova AG, Bogdanova EA, Skachkov VM, Pasechnik LA, Borisov SV, Sabirzyanov NA (2017): Bioactive coatings of porous materials: Fabrication and properties. *J Surf Investig-X-Ra* 11, 107-113
- Shukla A, Avadhany SN, Fang JC, Hammond PT (2010): Tunable vancomycin releasing surfaces for biomedical applications. *Small* 6, 2392-2404
- Skoog SA, Goering PL, Narayan RJ (2014): Stereolithography in tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 25, 845-856
- Smith BD, Grande DA (2015): The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. *Nat Rev Rheumatol* 11, 213-222
- Sokolsky-Papkov M, Agashi K, Olaye A, Shakesheff K, Domb AJ (2007): Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 59, 187-206
- Song P, Zhou C, Fan H, Zhang B, Pei X, Fan Y, Jiang Q, Bao R, Yang Q, Dong Z, et al. (2018): Novel 3D porous biocomposite scaffolds fabricated by fused deposition modeling and gas foaming combined technology. *Compos Part B-Eng* 152, 151-159
- Stampfl J, Baudis S, Heller C, Liska R, Neumeister A, Kling R, Ostendorf A, Spitzbart M (2008): Photopolymers with tunable mechanical properties processed by laser-based high-resolution stereolithography. *J Micromech Microeng* 18, 125014
- Starch-Jensen T, Deluiz D, Tinoco EMB (2020): Horizontal Alveolar Ridge Augmentation with Allogeneic Bone Block Graft Compared with Autogenous Bone Block Graft: a Systematic Review. *J Oral Maxillofac Res* 11, e1
- Steinmetz NJ, Aisenbrey EA, Westbrook KK, Qi HJ, Bryant SJ (2015): Mechanical loading regulates human MSC differentiation in a multi-layer hydrogel for osteochondral tissue engineering. *Acta Biomater* 21, 142-153
- Sugioka K, Cheng Y (2014): Ultrafast lasers - reliable tools for advanced materials processing. *Light-Sci Appl* 3, e149

- Tabata Y (2005): Significance of release technology in tissue engineering. *Drug Discov Today* 10, 1639-1646
- Tamai N, Myoui A, Hirao M, Kaito T, Ochi T, Tanaka J, Takaoka K, Yoshikawa H (2005): A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected porous hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Osteoarthr Cartilage* 13, 405-417
- Tang Z, Wang Y, Podsiadlo P, Kotov NA (2006): Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering. *Adv Mater* 18, 3203-3224
- Tannoury CA, An HS (2014): Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery. *Spine J* 14, 552-559
- Thrivikraman G, Athirasala A, Twohig C, Boda SK, Bertassoni LE (2017): Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. *Dent Clin North Am* 61, 835-856
- Tsang VL, Bhatia SN (2004): Three-dimensional tissue fabrication. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 1635-1647
- Tse JR, Engler AJ (2010): Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Curr Protoc Cell Biol* 47, 10.16.11-10.16.16
- Turunen S, Kapyla E, Terzaki K, Viitanen J, Fotakis C, Kellomaki M, Farsari M (2011): Pico- and femtosecond laser-induced crosslinking of protein microstructures: evaluation of processability and bioactivity. *Biofabrication* 3, 045002
- Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ (2015): Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep* 35, e00191
- Vasita R, Katti DS (2006): Growth factor-delivery systems for tissue engineering: a materials perspective. *Expert Rev Med Devic* 3, 29-47
- Velasco MA, Narvaez-Tovar CA, Garzon-Alvarado DA (2015): Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Res Int* 2015, 729076
- Verma D, Katti KS, Katti DR (2010): Osteoblast adhesion, proliferation and growth on polyelectrolyte complex-hydroxyapatite nanocomposites. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 368, 2083-2097
- Vertenten G, Lippens E, Girones J, Gorski T, Declercq H, Saunders J, Van den Broeck W, Chiers K, Duchateau L, Schacht E, et al. (2009): Evaluation of an injectable, photopolymerizable, and three-dimensional scaffold based on methacrylate-endcapped poly(D,L-lactide-co-epsilon-caprolactone) combined with autologous mesenchymal stem cells in a goat tibial unicortical defect model. *Tissue Eng Part A* 15, 1501-1511
- Vitale-Brovarone C, Ciapetti G, Leonardi E, Baldini N, Bretcanu O, Verne E, Baino F (2011): Resorbable glass-ceramic phosphate-based scaffolds for bone tissue engineering: synthesis, properties, and in vitro effects on human marrow stromal cells. *J Biomater Appl* 26, 465-489
- Vogeler M, Bucher R, Schmelzeisen R: Implantologie. In: Gutwald R, Gellrich NC, Schmelzeisen R (Hrsg.): Einführung in die zahnärztliche Chirurgie und

- Implantologie für Studium und Beruf. 2. Auflage; Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln 2010, 383-432
- von Klitzing R (2006): Internal structure of polyelectrolyte multilayer assemblies. *Phys Chem Chem Phys* 8, 5012-5033
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, et al. (2005): Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33, 1402-1416
- Walpole AR, Xia Z, Wilson CW, Triffitt JT, Wilshaw PR (2009): A novel nano-porous alumina biomaterial with potential for loading with bioactive materials. *J Biomed Mater Res A* 90A, 46-54
- Wang C, Huang W, Zhou Y, He L, He Z, Chen Z, He X, Tian S, Liao J, Lu B, et al. (2020): 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Bioact Mater* 5, 82-91
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC (2004): Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 22, 1330-1337
- Wang T, Lai JH, Yang F (2016): Effects of Hydrogel Stiffness and Extracellular Compositions on Modulating Cartilage Regeneration by Mixed Populations of Stem Cells and Chondrocytes In Vivo. *Tissue Eng Part A* 22, 1348-1356
- Wang W, Yeung KWK (2017): Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater* 2, 224-247
- Weiß T, Hildebrand G, Schade R, Liefelth K (2009): Two-Photon polymerization for microfabrication of three-dimensional scaffolds for tissue engineering application. *Eng Life Sci* 9, 384-390
- Weiß T, Schade R, Laube T, Berg A, Hildebrand G, Wyrwa R, Schnabelrauch M, Liefelth K (2011): Two-Photon Polymerization of Biocompatible Photopolymers for Microstructured 3D Biointerfaces. *Adv Eng Mater* 13, B264-B273
- Wiedorn KH, Goldmann T, Henne C, Kuhl H, Vollmer E (2001): EnVision+, a new dextran polymer-based signal enhancement technique for in situ hybridization (ISH). *J Histochem Cytochem* 49, 1067-1071
- Wisniewska-Jarosinska M, Poplawski T, Chojnacki CJ, Pawlowska E, Krupa R, Szczepanska J, Blasiak J (2011): Independent and combined cytotoxicity and genotoxicity of triethylene glycol dimethacrylate and urethane dimethacrylate. *Mol Biol Rep* 38, 4603-4611
- Woodruff M, Hutmacher DW (2010): The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci* 35, 1217-1256
- Wu C, Ramaswamy Y, Zreiqat H (2010): Porous diopside (CaMgSi₂O₆) scaffold: A promising bioactive material for bone tissue engineering. *Acta Biomater* 6, 2237-2245
- Wu G, Shi F, Wang Z, Liu Z, Zhang X (2009): Poly(acrylic acid)-bearing photoreactive azido groups for stabilizing multilayer films. *Langmuir* 25, 2949-2955

- Wu Y, Yang Z, Law JB, He AY, Abbas AA, Denslin V, Kamarul T, Hui JH, Lee EH (2017): The Combined Effect of Substrate Stiffness and Surface Topography on Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A* 23, 43-54
- Xue R, Qian Y, Li L, Yao G, Yang L, Sun Y (2017): Polycaprolactone nanofiber scaffold enhances the osteogenic differentiation potency of various human tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 8, 148
- Yorukoglu AC, Kiter AE, Akkaya S, Satiroglu-Tufan NL, Tufan AC (2017): A Concise Review on the Use of Mesenchymal Stem Cells in Cell Sheet-Based Tissue Engineering with Special Emphasis on Bone Tissue Regeneration. *Stem Cells Int* 2017, 2374161
- Yoshii E (1997): Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 37, 517-524
- Zhang B, Pei X, Song P, Sun H, Li H, Fan Y, Jiang Q, Zhou C, Zhang X (2018): Porous bioceramics produced by inkjet 3D printing: Effect of printing ink formulation on the ceramic macro and micro porous architectures control. *Compos Part B-Eng* 155, 112-121
- Zhang X, Yang M, Lin L, Chen P, Ma KT, Zhou CY, Ao YF (2006): Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose--derived stem cells in vitro and in vivo. *Calcif Tissue Int* 79, 169-178
- Zheng M, Pan M, Zhang W, Lin H, Wu S, Lu C, Tang S, Liu D, Cai J (2021): Poly(α -l-lysine)-based nanomaterials for versatile biomedical applications: Current advances and perspectives. *Bioact Mater* 6, 1878-1909
- Zhu J (2010): Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 31, 4639-4656

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephacke, Herrn Prof. Dr.-Ing. K. Liefeith, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. F. Böhrnsen und Frau Dr. rer. nat. S. Grohmann für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die interessante Themenstellung und die gute Einarbeitung bedanken. Mein besonderer Dank gilt Ihnen aber vor allem für Ihre ständige Gesprächsbereitschaft. Ebenfalls danken möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilungen für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie für das freundliche Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft.