



Fraunhofer
IBMT

INSTITUT FÜR BIOMEDIZINISCHE TECHNIK (ST. INGBERT, SULZBACH, MÜNSTER/WOLBECK)

ZELLBIOLOGIE & ANGEWANDTE VIROLOGIE **CELL BIOLOGY & APPLIED VIROLOGY**



Titelbild: Lager Wolbeck: Einlagerung von Humanproben der Umweltprobenbank des Bundes in Kryotanks zur späteren retrospektiven Analyse (Foto: Bernd Müller).

Cover picture: Wolbeck repository: Storage of human samples of the German Environmental Specimen Bank (Umweltprobenbank des Bundes, UPB) in cryotanks for later, retrospective analysis (Photo: Bernd Müller).



Prof. Dr. Hagen von Briesen
+49 (0) 6894/980-286
hagen.briesen@ibmt.fraunhofer.de

Biobanken & Kryolager (mit Außenstelle Münster/Wolbeck)
Biobanks & Cryorepositories (including Münster/Wolbeck branch)

Prof. Dr. Hagen von Briesen
+49 (0) 6894/980-286
hagen.briesen@ibmt.fraunhofer.de

Umweltprobenbank des Bundes – Humanproben
German Environmental Specimen Bank – Human Samples

Dr. Dominik Lermen
+49 (0) 6894/980-251
dominik.lermen@ibmt.fraunhofer.de

HIV Specimen Cryorepository (Bill & Melinda Gates Foundation)
HIV Specimen Cryorepository (Bill & Melinda Gates Foundation)

Dr. Anja Germann
+49 (0) 6897/9071-73
anja.germann@ibmt.fraunhofer.de

CRYO-BREHM – Zellbank für Wildtiere
CRYO-BREHM – Cellbank for Wildlife

Dr. Dominik Lermen
+49 (0) 6894/980-251
dominik.lermen@ibmt.fraunhofer.de

Bioprozesstechniken & Nanotechnologie
Bioprocess Technologies & Nanotechnology

Prof. Dr. Hagen von Briesen
+49 (0) 6894/980-286
hagen.briesen@ibmt.fraunhofer.de

Präklinische Nanobiotechnologie
Preclinical Nanobiotechnology

Dr. Sylvia Wagner
+49 (0) 6894/980-274
sylvia.wagner@ibmt.fraunhofer.de

In-vitro-Kulturtechniken
In Vitro Culture Technologies

Dr. Erwin Gorjup
+49 (0) 6894/980-274
erwin.gorjup@ibmt.fraunhofer.de

Prüflaboratorien & Qualitätssicherung
Test Laboratories & Quality Assurance

Prof. Dr. Hagen von Briesen
+49 (0) 6894/980-286
hagen.briesen@ibmt.fraunhofer.de

ZELLBIOLOGIE & ANGEWANDTE VIROLOGIE

CELL BIOLOGY & APPLIED VIROLOGY

Angebote, Ergebnisse und Produkte der Abteilung Biobanken & Kryolager

Umweltprobenbank des Bundes – Humanproben
HIV Specimen Cryorepository (B & M Gates Foundation)
CRYO-BREHM – Zellbank für Wildtiere

Angebote, Ergebnisse und Produkte der Abteilung Bioprozesstechniken & Nanotechnologie

Präklinische Nanobiotechnologie
In-vitro-Kulturtechniken

Prüflaboratorien & Qualitätssicherung

**Projektbeispiel: Biokompatible Hybridkeramiken als
Knochenersatz**

Ausstattung

Offers, results and products of the Biobanks & Cryorepositories Department

Environmental Specimen Bank – Human Samples
HIV Specimen Cryorepository (B & M Gates Foundation)
CRYO-BREHM – German Cell Bank for Wildlife

Offers, results and products of the Bioprocess Technologies & Nanotechnology Department

Preclinical Nanobiotechnology
In vitro Culture Technologies

Test Laboratories & Quality Assurance

**Project example: Biocompatible hybrid ceramics as
bone substitute**

Equipment

Verbesserte und neuartige Zellkulturtechniken und die darauf aufbauenden analytischen Messverfahren müssen bei der rasanten biotechnologischen Entwicklung von zukunftsorientierten therapeutischen Konzepten Schritt halten. Hierbei gewinnen Standardisierung und Optimierung im Bereich der präklinischen und klinischen Testungen von Wirk- und Impfstoffen zunehmend an Bedeutung. Die Hauptabteilung Zellbiologie & Angewandte Virologie entwickelt hierfür alternative Zellkultursysteme und Testverfahren für die verschiedensten Bereiche der Stammzellforschung und Nanobiotechnologie. Die Wirkstoffentwicklung wird durch den Einsatz entsprechender Technologieplattformen unterstützt. Hierzu zählen Transport- und Freisetzungsuntersuchungen therapeutischer Applikationssysteme über zelluläre Barrieren wie z. B. der Blut-Hirn-Schranke, wofür wir der menschlichen Blut-Hirn-Schranke physiologisch sehr nahestehende Systeme entwickelt haben. Hierin können zum Beispiel Nanopartikel getestet werden, die zuvor mit Alzheimer-Medikamenten beladen wurden und auf deren Oberfläche sich Ankermoleküle befinden, die bestimmte Strukturen der Blut-Hirn-Schranke erkennen. So sollen die Nanopartikel ein Alzheimer-Medikament gezielt ins Gehirn transportieren. Die Entwicklung dieser neuartigen Transportmethode von Medikamenten und die Untersuchung von Chancen und Risiken werden vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Verbundprojekts »NanoBrain« unterstützt, das Teil des europäischen Forschungsnetzes Era-NET »NEURON« ist. Eine weitere zelluläre Barriere, die es bei oraler Applikation zu überwinden gilt, ist die Darmbarriere. In speziell hierfür ausgelegten Darmbarriere-Modellen testen wir Formulierungen von Wirkstoffen für die Photodynamische Therapie, die ansonsten oral nicht bioverfügbar sind. Hier besteht die Chance, diese Wirkstoffgruppe in Tablettenform zu verabreichen und somit die mit Nachteilen behaftete intravenöse Gabe zu umgehen. Dieses Projekt wird im Rahmen des Verbunds »BioTraP for CCC« durch das BMBF gefördert.

Weiterhin lassen sich diese Nanopartikel als Genfähren einsetzen, um gezielt DNA in Zellen zu transportieren, die die Expression bestimmter Proteine ermöglicht. Üblicherweise erfolgen gezielte genetische Veränderungen von Zellen durch virale Vektoren. Die Nutzung dieser bereitet aber erhebliche Probleme wie die Gefahr der Ausbildung von Krebs durch die Aktivierung von Proto-Onkogenen. Die virusfreie genetische Veränderung von Zellen mittels DNA-beladener Nanopartikel stellt sowohl für die Stammzellforschung wie auch für die zukünftige Zelltherapie eine vielversprechende Alternative dazu dar. Auch dieses ist ein vom BMBF unterstütztes Verbundprojekt (»NanoGene«) im Rahmen des europäischen Forschungsnetzes EuroNanoMed.

Darüber hinaus kommen die in der Hauptabteilung neu entwickelten Zellkultursysteme und Testverfahren im Bereich der Nanotoxikologie zum Einsatz: In einem Marie Curie Initial Training Network (ITN)-Projekt des 7. Rahmenprogramms der EU (»NanoTOES«) entwickelt die Abteilung hochsensitive chipbasierte Testverfahren, um physikalische, chemische und biologische Faktoren von Nanopartikeln und deren Einflüsse auf biologische Zellen zu untersuchen. Des Weiteren werden zukunftsweisende Plattformen zum Sammeln, Präparieren, Konservieren und zur Verteilung von Bioreagenzien und klinischen Proben für weltweite Netzwerke entwickelt. Hierzu zählen optimierte Prozesse der Probenaufarbeitung und deren Kryokonservierung. In diesem Zusammenhang wurde am Fraunhofer IBMT im Rahmen der globalen Initiative zur Entwicklung eines HIV-Impfstoffes (»Collaboration for AIDS Vaccine Discovery – CAVD«) eine globale HIV-Kryobank der Sicherheitsstufe S3 aufgebaut, die von der Bill & Melinda Gates Foundation und der saarländischen Landesregierung finanziell getragen wird. Die Kryobank für Bioreagenzien untersteht einem zertifizierten Qualitätssicherungsprogramm, welches das Arbeiten nach den Richtlinien der »Good Clinical Laboratory Practice« (GCLP) kontrolliert. Hier werden Proben in einer vollautomatisierten Anlage zur Kultivierung eukaryoti-

Improved and innovative cell culture techniques and the analytical measurement methods based on these have to keep up with the rapid biotechnological development of future-oriented therapeutic concepts. Standardization and optimization in the area of preclinical and clinical testing of active ingredients and vaccines are becoming increasingly important in this context. For this purpose the Division of Cell Biology & Applied Virology Department is developing alternative cell culture systems and test methods for the various areas of stem cell research and nanobiotechnology. The development of drugs is supported by the use of the corresponding technology platforms. This includes transport and release investigations of therapeutic application systems via cellular barriers such as the blood-brain barrier, for which we have developed systems which are physiologically very close to the human blood-brain barrier. These can be used, for example, to test nanoparticles which are loaded with Alzheimer drugs and which are surface-modified with anchor molecules that recognize corresponding structures on the blood-brain barrier. In this way, the nanoparticles can transport Alzheimer drugs in a targeted manner to the brain. The development of this innovative transport method of drugs and the examination of chances and risks are supported by the Federal Ministry for Education and Research (BMBF) within the framework of the joint project "Nano-Brain", which is part of the European research network ERA-NET "NEURON". Another cellular barrier which has to be overcome in the case of oral application is the intestinal barrier. With the aid of intestinal barrier models especially designed for this purpose, we test formulations of drugs for photodynamic therapy (PDT) which are not biologically available otherwise in oral applications. There is a chance of being able to administer this active substance group in tablet form and thus bypass all of the disadvantages associated with intravenous administration. This project is funded by the BMBF within the framework of the joint project "BioTraP for CCC".

These nanoparticles can also be used as gene ferries to transport DNA in a targeted manner to cells to allow the expression of certain proteins. Targeted genetic alterations of cells are usually achieved using viral vectors. This, however, gives rise to substantial problems such as the risk of the development of cancer due to the activation of proto-oncogenes. The virus-free genetic alteration of cells using DNA-loaded nanoparticles represents a promising alternative in this regard both for stem cell research and for cell therapy in the future. This is also a joint project funded by the BMBF ("NanoGene") within the framework of the European research network EuroNanoMed.

In addition to this, the cell culture systems and test methods newly developed in the division are being used in the area of nanotoxicology: In a Marie Curie Initial Training Network (ITN) project of the 7th framework program of the EU ("Nano-TOES"), the department is developing highly sensitive, chip-based test methods in order to investigate physical, chemical and biological factors of nanoparticles and their influences on biological cells.

Future-oriented platforms for the collection, preparation, conservation and distribution of bioreagents and clinical samples for worldwide networks are also being developed. This includes optimized processes for the preparation and cryopreservation of samples. In this context a global HIV cryobank of safety level S3 was developed at the Fraunhofer IBMT within the framework of the global initiative for the development of an HIV vaccine ("Collaboration for AIDS Vaccine Discovery – CAVD"), which is funded by the Bill & Melinda Gates Foundation and the Saarland Regional Government. The cryobank for bioreagents is subject to a certified quality assurance program which controls the work according to the guidelines of the "Good Clinical Laboratory Practice" (GCLP). Here, samples are produced in a fully automated system for the cultiva-

scher Zellen hergestellt. Damit stellt die Kryobank eine Technologie-Plattform für die weitere Entwicklung und klinische Testung von Impfstoffen und neuen Therapien dar.

Diese Biobank dient auch als Kryolager für ein von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördertes deutsch-afrikanisches Verbundprojekt zur Erforschung des Krankheitserregers *Staphylococcus aureus*. Die Wissenschaftler in Deutschland und Afrika wollen herausfinden, wie verbreitet und resistent die Erreger auf dem afrikanischen Kontinent sind und was getan werden kann, um die tödliche Gefahr einzudämmen.

Als eine weitere wichtige Biobank auf nationaler Ebene wurde seit 2012 die Umweltprobenbank des Bundes (UPB) am Fraunhofer IBMT angesiedelt. Dabei handelt es sich um ein Archiv von Umwelt- und Humanproben, welches ein zentrales Element der Bundesrepublik Deutschland zur Identifikation, Überwachung, Dokumentation und Bewertung von Schadstoffen im Menschen und in der Umwelt darstellt.

Ansprechpartner

Prof. Dr. Hagen von Briesen
Telefon: +49 (0) 6894/980-286
hagen.briesen@ibmt.fraunhofer.de

Sekretariat:
Frau Anja Weber
Telefon: +49 (0) 6894/980-279
anja.weber@ibmt.fraunhofer.de

tion of eukaryotic cells. The cryobank thus represents a technology platform for the further development and clinical testing of vaccines and new therapies.

This biobank also serves as a cryorepository for a German-African joint project funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) for research into the pathogen *Staphylococcus aureus*. The scientists in Germany and Africa want to find out how widespread and resistant the pathogens are on the African continent and what can be done to stem this deadly hazard.

As a further significant biobank on national level, the Environmental Specimen Bank (ESB) was installed at the Fraunhofer IBMT in 2012. This is an archive of environmental and human samples, which is a central element of the Federal Republic of Germany for the identification, monitoring, documentation and evaluation of pollutants in humans and in the environment.

Contact

Prof. Dr. Hagen von Briesen
Telephone: +49 (0) 6894/980-286
hagen.briesen@ibmt.fraunhofer.de

Secretary:
Ms. Anja Weber
Telephone: +49 (0) 6894/980-279
anja.weber@ibmt.fraunhofer.de



Modernste Durchreicheautoklaven sichern die Beschickung der S3-Sicherheitslabore des Fraunhofer IBMT (Foto: Bernd Müller).

State-of-the-art pass-through autoclaves ensure the charging of the S3 safety laboratories of the Fraunhofer IBMT (Photo: Bernd Müller).

ANGEBOTE, ERGEBNISSE UND PRODUKTE DER ABTEILUNG BIOBANKEN & KRYOLAGER

Umweltprobenbank des Bundes – Humanproben

- Planung, Organisation und Management multizentrischer Probenahmen, z. B. jährliche Probenahmen von Humanproben (Blut, Plasma, 24-h-Sammelurin) der Umweltprobenbank des Bundes (UPB) an den vier Standorten Münster, Halle, Greifswald und Ulm
- Erhebung und Dokumentation von Anamnesedaten, Lebensumständen und Lebensgewohnheiten sowie weiterer Informationen zur personenbezogenen Schadstoffexposition der Teilnehmerinnen und Teilnehmer durch standardisierte Fragebögen
- standardisierte Analyse der Humanproben der UPB im Hinblick auf klinisch-chemische Parameter
- Kryokonservierung, Kryolagerung und Verwaltung der gesammelten Humanproben
- Transport der Proben unter Kryobedingungen
- statistische Auswertung und Interpretation chemischer und klinischer Analysedaten, Analysedaten zur Schadstoffbelastung und der Anamnesedaten
- Ausarbeitung und Optimierung von Standardarbeitsanweisungen (SOPs) für die Durchführung von Probenahmen, dem Transport von Humanproben, Analysen klinisch-chemischer Parameter, der Erfassung von Anamnesedaten etc. nach ISO EN DIN/IEC 17025
- Berichterstattung an das Umweltbundesamt im Hinblick auf die durchschnittliche jährliche Belastungssituation junger Erwachsener in der Bundesrepublik Deutschland und deren Trendentwicklung und umweltmedizinische Relevanz
- Betrieb des für die Humanproben der UPB eingerichteten Kryolagers bei Münster/Wolbeck

Ansprechpartner

Dr. Dominik Lermen

Telefon: +49 (0) 6894/980-251

dominik.lermen@ibmt.fraunhofer.de

HIV Specimen Cryorepository (Bill & Melinda Gates Foundation)

- Biobanking von Mikroorganismen und klinischen Proben bis zur Sicherheitsstufe S3 nach Gentechnikgesetz, Infektionsschutzgesetz und Biostoffverordnung
- Produktion von Bioreagenzien (z. B. Virusstämme)
- Fortbildungen (ca. 10 Personen)
 - allgemeine Zellkultur
 - automatisierte Zellkultur
 - Transfektion eukaryotischer Zellen
 - Arbeiten mit infektiösem Material
 - Aufarbeitung peripherer mononukleärer Blutzellen aus Vollblut
- neue Methoden der Kryokonservierung
- Vitalitätsbestimmungen mittels Durchflusszytometrie
- Zellcharakterisierung mittels Durchflusszytometrie
- Messung von Immunantworten (z. B. ELISpot)
- Biolumineszenz-Assays
- bakterielle Transformation
- Plasmid-Präparation
- Restriktionsverdau
- Klonierung
- Agarose-Gelelektrophorese
- Nachweis von Proteinen mittels Western Blot
- Einführung in Qualitätssicherungsprogramme (z. B. Good Clinical Laboratory Practice – GCLP)
- Erstellung von SOPs

Ansprechpartnerin

Dr. Anja Germann

Telefon: +49 (0) 6897/9071-73

anja.germann@ibmt.fraunhofer.de

OFFERS, RESULTS AND PRODUCTS OF THE BIOBANKS & CRYOREPOSITORIES DEPARTMENT

German Environmental Specimen Bank – Human Samples

- planning, organization and management of multi-center sampling events, e. g. the annual taking of human samples (blood, plasma, 24-hour urine collection) of the German Environmental Specimen Bank (ESB) at the four locations Münster, Halle, Greifswald and Ulm
- collection and documentation of medical history data, diary habits, life circumstances and lifestyle as well as further information on exposure relevant behaviour using standardized questionnaires
- standardized analysis of the human samples of the ESB with regard to clinical chemical parameters
- cryopreservation, cryostorage and administration of collected human samples
- transport of samples under cryogenic conditions
- statistical evaluation and interpretation of chemical and clinical data, data on body burden and medical history data
- elaboration and optimization of standard operating procedures (SOPs) for the operation of the sampling, the transport of human samples, analyses of clinical chemical parameters, the registration of the medical history data etc. according to ISO EN DIN/IEC 17025
- reporting to the Federal Environmental Department with regard to the average annual burden situation of young adults in the Federal Republic of Germany and its trends and relevance in terms of environmental medicine
- operation of the cryo-repository at Münster/Wolbeck for the human samples of the ESB

Contact

Dr. Dominik Lermen
Telephone: +49 (0) 6894/980-251
dominik.lermen@ibmt.fraunhofer.de

HIV Specimen Cryorepository (Bill & Melinda Gates Foundation)

- biobanking of microorganisms and clinical samples up to biological safety level (BSL) S3
- production of bio-reagents (e. g. virus strains)
- training (approx. 10 people)
 - general cell culture
 - automated cell culture
 - transfection of eukaryotic cells
 - working with infectious material
 - processing of peripheral mononuclear blood cells derived from whole blood
 - new methods of cryopreservation
 - vitality determination using flow cytometry
 - cell characterization using flow cytometry
 - measurement of immune responses (e. g. ELISpot)
 - bioluminescence assays
 - bacterial transformation
 - plasmid preparation
 - restriction digest
 - cloning
 - agarose gel electrophoresis
 - detection and analysis of proteins using Western Blot
 - introduction to quality assurance programs (e. g. Good Clinical Laboratory Practice – GCLP)
 - compilation of SOPs

Contact

Dr. Anja Germann
Telephone: +49 (0) 6897/9071-73
anja.germann@ibmt.fraunhofer.de

ANGEBOTE, ERGEBNISSE UND PRODUKTE DER ABTEILUNG BIOPROZESSTECHNIKEN & NANOTECHNOLOGIE

Präklinische Nanobiotechnologie

- Präklinische Testung nanopartikulärer Formulierungen
- Etablierung geeigneter Zellkulturmodelle zum spezifischen Tumor-Targeting und Überwindung biologischer Barrieren (z. B. Blut-Hirn-Schranke, intestinale Barriere)
- Nachweis der zellulären Aufnahme und der subzellulären Verteilung
- Freisetzung und Wiederfindung des inkorporierten Wirkstoffs
- Studien zur biologischen Aktivität der inkorporierten Wirkstoffe
- Methoden (Durchflusszytometrie (FACS), Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM), Fluoreszenz-Lifetime-Imaging-Mikroskopie (FLIM), Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TER) mittels Impedanzspektroskopie, radionuklidbasierte und individuell entwickelte Assays)
- Zytotoxizitätsstudien nach ISO 10993/EN 30993

Ansprechpartnerin

Dr. Sylvia Wagner

Telefon: +49 (0) 6894/980-274

sylvia.wagner@ibmt.fraunhofer.de

In-vitro-Kulturtechniken

- Entwicklung physiologischer In-vitro-Gewebemodelle
- Isolierung, Kultivierung, Charakterisierung und Differenzierung adulter Stammzellen
- Zytotoxizitätsstudien nach ISO 10993/EN 30993
- Drug Screening, Verträglichkeitsstudien und Zytotoxizitätsstudien am HET-CAM-System (Hen`s Egg Test on Chorio-Allantoic Membrane)

Ansprechpartner

Dr. Erwin Gorjup

Telefon: +49 (0) 6894/980-274

erwin.gorjup@ibmt.fraunhofer.de

OFFERS, RESULTS AND PRODUCTS OF THE BIOPROCESS TECHNOLOGIES & NANOTECHNOLOGY DEPARTMENT

Preclinical Nanobiotechnology

- preclinical testing of nanoparticulate formulations
- establishment of suitable cell culture models for specific tumour-targeting and overcoming biological barriers (e. g. blood-brain barrier, intestinal barrier)
- verification of the cellular uptake and subcellular distribution
- release and recovery of the incorporated drug
- studies on the biological activity of the incorporated drugs
- methods (flow cytometry (FACS), confocal laser scanning microscopy (CLSM), fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM), measurement of the transendothelial electrical resistance (TER) using impedance spectroscopy, radionuclide-based and individually developed assays)
- cytotoxicity studies according to ISO 10993/EN 30993

Contact

Dr. Sylvia Wagner
 Telephone: +49 (0) 6894/980-274
sylvia.wagner@ibmt.fraunhofer.de

In vitro Culture Technologies

- development of physiological in vitro tissue models
- isolation, cultivation, characterization and differentiation of adult stem cells
- cytotoxicity studies according to ISO 10993/EN 30993
- drug screening, compatibility studies and cytotoxicity studies on the HET-CAM system (hen's egg test on chorioallantoic membrane)

Contact

Dr. Erwin Gorjup
 Telephone: +49 (0) 6894/980-274
erwin.gorjup@ibmt.fraunhofer.de

PROJEKTBEISPIEL: BIOKOMPATIBLE HYBRIDKERAMIKEN ALS KNOCHENERSATZ

Situation

Das menschliche Skelett besteht aus über 200 Knochen, die unseren Körper von innen stützen. Bei einfachen Frakturen ist der Körper, nach Fixierung der Fraktur, in der Lage, mittels regenerativer Prozesse, an denen unter anderen mesenchymale Stammzellen (MSC) beteiligt sind, die beiden Bruchenden miteinander zu verbinden und damit die ursprüngliche Stabilität des Knochens wiederherzustellen. Bei komplexeren Knochenverletzungen reicht diese Selbstheilung des Körpers nicht aus, um eine vollständige Wiederherstellung zu gewährleisten. In solchen Fällen muss der Knochen mittels operativen Eingriffs mit z. B. Metallimplantaten gestützt werden (Osteosynthese). In besonders schweren Fällen muss der verletzte Bereich sogar komplett ersetzt werden. Hierfür stehen zwar Knochenersatzimplantate zur Verfügung, diese sind jedoch als Dauerimplantate mechanisch nicht ausreichend stabil oder werden vom menschlichen Körper nicht schnell genug abgebaut und durch körpereigene Materialien ersetzt. Ziel ist daher die Entwicklung biokompatibler Materialien auf Basis von Hybrid- oder Mischkeramiken mit knochenähnlicher Porenstruktur, die beide erforderlichen Eigenschaften, hohe Stabilität und vollständige Biodegradierung, vereinen.

Ergebnisse

Die entwickelten Knochenersatzmaterialien (Abbildung 1) wurden in vitro auf ihre zelluläre Verträglichkeit (Biokompatibilität) geprüft. In quantitativen Extrakttests und qualitativen Kontakttests wurde der Einfluss der neuen Materialkombinationen auf die Stoffwechselaktivität und das Proliferationsverhalten von Zellen untersucht. Dabei konnte eine unbedenkliche Wirkung der Knochenersatzmaterialien auf die Zellen nachgewiesen werden. Bei der Knochenregeneration sind vor allem Thrombozyten, Periostzellen, mesenchymale Vorläuferzellen und mesenchymale Stammzellen (MSC) beteiligt. Aufgrund dessen erfolgten auf den biokompatiblen Hybridmaterialien Besiedlungstests mit MSC, bei denen die Anhaftung, Proliferation sowie das Einwachsen in die porösen Strukturen untersucht wurden. Humane mesenchymale Stammzellen sind multipotente adulte Stammzellen aus dem Knochenmark. Sie sind in der Lage, sich in vitro über mehrere Monate zu vermehren und in spezifische Zelltypen wie z. B. Osteoblasten zu differenzieren. Als Osteoblasten werden die Knochen bildenden Zellen bezeichnet. Osteoblasten scheiden Proteine wie z. B. Kollagen Typ I in den extrazellulären Raum aus. In dieses Proteingeflecht werden Kalziumphosphate und Kalziumkarbonate eingelagert, wodurch der Extrazellulärraum kalzifiziert wird und seine für den Knochen typische Stabilität erhält.

Zusätzlich zu den Besiedlungstests erfolgte die Untersuchung der osteogenen Differenzierbarkeit der MSC auf den neuen Hybridmaterialien. Die Differenzierbarkeit stellt neben der Biokompatibilität ein entscheidendes Merkmal für die Auswahl der neuen Knochenersatzmaterialien dar. Nach dreiwöchiger Differenzierungszeit konnten mittels immunzytochemischer Färbung die extrazellulären Kollagen-Typ-I-Fibrillen und damit die erfolgreiche osteogene Differenzierung nachgewiesen werden (Abbildung 2). Damit erfüllen die Hybridmaterialien in vitro die erforderlichen Eigenschaften für Knochenersatzimplantate wie die zelluläre Verträglichkeit, die Unterstützung des Einwachsens der Zellen in die Probe sowie die osteogene Differenzierung.

¹ Poröse Hybridkeramik als Knochenersatzmaterial.



1

PROJECT EXAMPLE: BIOCOMPATIBLE HYBRID CERAMICS AS BONE SUBSTITUTE

Situation

The human skeleton is made up of more than 200 bones that stabilize the body from the inside. In the case of simple fractures, the body, after fixation of the fracture, has the regenerative ability to join the two bone ends together and thus restore the original stability of the bone. In this regeneration process mesenchymal stem cells (MSC) are involved among others. In the case of more complex bone injuries, this self-healing process is not sufficient to ensure a complete restoration. In such cases the bone has to be supported by operative interventions, e. g. metal implants (osteosynthesis). In particularly difficult cases, the injured area has to be completely replaced.

Although there are bone substitute implants available for this purpose, these do not have the required mechanical stability for permanent implants, or they are not degraded quickly enough and replaced by endogenous materials by the human body. The aim is, therefore, the development of biocompatible materials on the basis of hybrid or mixed ceramics with a bonelike pore structure that combine the two required properties of high stability and complete biodegradation.

Results

The bone substitute materials developed (Fig. 1) were tested in vitro for their cellular compatibility (biocompatibility). Quantitative extract tests and qualitative contact tests were used to examine the influence of the new material combinations on the metabolic activity and the proliferation of cells. Thereby, a harmless effect of the bone substitute material on the cells was verified. The bone regeneration process involves mainly

thrombocytes, periosteal cells, mesenchymal precursor cells and mesenchymal stem cells (MSC). On this basis, colonization tests were carried out with MSC on the biocompatible materials in which the adhesion, proliferation and the ability to grow into the porous structures were examined. Human mesenchymal stem cells are multipotent, adult stem cells from the bone marrow. They are able to reproduce themselves in vitro over several months and to differentiate into specific cell types such as osteoblasts, i.e. bone-forming cells. Osteoblasts secrete proteins such as collagen type I into the extracellular space. Calcium phosphates and calcium carbonates are deposited in this mesh of protein, which calcifies the extracellular matrix and results in the typical stability of bone.

In addition to the colonization tests, the potential of the MSC on the new hybrid material to differentiate into osteogenic lineage was investigated. Beside the biocompatibility, the potential to induce differentiation is a decisive factor for the selection of new bone substitute materials. After three weeks of differentiation, successful osteogenic differentiation was shown by immunocytochemical staining of the extracellular collagen type I fibrils (Fig. 2). This means that the hybrid materials fulfil the necessary requirements in vitro for bone substitute implants such as cellular compatibility, support of growth of the cells into the sample as well as the osteogenic differentiation.

1 Porous hybrid ceramic as bone substitute material.

Ausblick

Durch die In-vitro-Tests konnten die Biokompatibilität der Knochenersatzmaterialien sowie die Unterstützung der osteogenen Differenzierung nachgewiesen werden. Dadurch sind die Grundlagen geschaffen, um die Eignung der neuen Ersatzmaterialien in weiterführenden Studien z. B. in vivo zu untersuchen.

Hintergrund

Die hier dargestellten Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Fertigungstechnologie des Fraunhofer-Instituts für Keramische Technologien und Systeme (IKTS) in Dresden und wurden von der Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e. V. im Rahmen einer »Mittelstandsorientierten Eigenforschung« (MEF) gefördert.

Ansprechpartner

Dr. Erwin Gorjup

Telefon: +49 (0)6894/980-274

erwin.gorjup@ibmt.fraunhofer.de

2 Osteogen differenzierte mesenchymale Stammzellen (MSC) auf neuartigen Knochenersatzstrukturen bilden das fibrilläre Kollagen Typ I (grün). Die Zellkerne sind blau gefärbt.

Outlook

With the in vitro tests it was possible to verify the biocompatibility of the bone substitute materials as well as the support of the osteogenic differentiation. This means that the ground has been laid to examine the suitability of the new substitute materials in further-going studies, e. g. in vivo.

Background

The works represented here were carried out in collaboration with the production technology working group of the Fraunhofer Institute for Ceramic Technologies and Systems (IKTS) in Dresden and were funded by the Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e. V. within the framework of an "SME-oriented self research" project.

Contact

Dr. Erwin Gorjup
Telephone: +49 (0)6894/980-274
erwin.gorjup@ibmt.fraunhofer.de

2 Osteogenic differentiated mesenchymal stem cells (MSC) on innovative bone substitute structures form the fibril collagen type I (green). The cell nuclei are stained blue.

AUSSTATTUNG

Zellbiologie & Angewandte Virologie

Labore der Sicherheitsklasse S2 und S3 mit Schleusenbereich für mikrobiologische, molekularbiologische und zellbiologische Arbeiten

- TER-Impedanzmesssystem (cellZscope)
- Durchflusszytometer inklusive Sortiereinheit
- Durchlicht- und Auflichtmikroskope mit Phasen- und Differenzialinterferenzkontrast, Fluoreszenzeinrichtung und Dokumentationseinheit, mit Manipulationseinheit und Inkubationshaube
- Spektralphotometer für Absorptions-, Fluoreszenz- und Lumineszenzmessungen in Mikrotiterplatten, Elispotreader
- Cobas c111 Analyzer zur photometrischen Bestimmung klinisch-chemischer Parameter
- Mikro-, Kühl- und Ultrazentrifugen
- Gelelektrophoreseeinheiten für DNA, RNA und Proteine mit Dokumentationseinheiten
- Gefriermikrotom
- »real time«-PCR-Cycler
- automatisierte Zellkultur- und Virusproduktionseinheit
- Leica-TCS-SP8-X-Konfokalmikroskop ausgestattet mit Weißlichtlaser und Dauerstrichlaser der Wellenlänge 405 nm
- Agilent-HPLC-Anlage

Radionuklidlabor der Sicherheitsklasse S2 für den Umgang mit offenen radioaktiven Stoffen

- Flüssigkeitsszintillationszähler Modell 2919 TR
- TER-Impedanzmesssystem (cellZscope)

EQUIPMENT

Cell Biology & Applied Virology

Laboratories with safety level S2 and S3 with double-door system for microbiological, molecular biological and cell biological research:

- TER impedance measuring system (cellZscope)
- flow cytometer including sorting unit
- transmitted light microscopes and reflected light microscopes with phase and differential interference contrast, fluorescence unit and documentation unit, with manipulation unit and incubation hood
- spectral photometer for absorption, fluorescence and luminescence measurements of microtitre plates, elispot reader
- Cobas c111 analyzer for photometric determination of clinical-chemical parameters
- micro, cooling and ultra centrifuges
- gel electrophoresis units for DNA, RNA and proteins with documentation units
- cryo microtome
- real-time PCR cycler
- automated cell culture and virus production unit
- Leica TCS SP8 X confocal microscope equipped with white light laser and continuous wave laser with a wavelength of 405 nm
- Agilent HPLC system

Radionuclide laboratory of safety level S2 for use with open radioactive substances:

- fluid scintillation counter model 2919 TR
- TER impedance measuring system (cellZscope)



Sensitive Fluoreszenz-Mikroskopie und Live Cell Imaging mit Hilfe des konfokalen Laserscanning-Mikroskops Leica TCS SP8 ausgestattet mit Weißlichtlaser und Dauerstrichlaser (405 nm) –

geeignet für anspruchsvolle Proben und sehr hohe Aufnahmegeschwindigkeiten bei voller konfokaler Auflösung (Foto: Annette Maurer).

Sensitive fluorescence microscopy and live cell imaging using the confocal laser scanning microscope Leica TCS SP8 equipped with white light laser and contin-

uous wave laser (405 nm) – suitable for difficult samples and very high recording speeds at full confocal resolution (Photo: Annette Maurer).

ANFAHRT ST. INGBERT

HOW TO FIND US IN ST. INGBERT

Mit dem Auto

Autobahn A 6/Ausfahrt St. Ingbert-West, links abbiegen in Richtung Flughafen Saarbrücken-Ensheim, nach der Ampel links abbiegen in Richtung St. Ingbert-Süd (Ensheimer Straße), im Kreisverkehr geradeaus, nach ca. 1,5 km liegt das Institut auf der linken Seite.

Autobahn A 1/bis Autobahnkreuz Saarbrücken, weiter Richtung Karlsruhe/Mannheim auf der A 8 bis Autobahnkreuz Neunkirchen, weiter in Richtung Saarbrücken auf der A 6.

Autobahn A 8/bis Autobahnkreuz Neunkirchen, weiter in Richtung Saarbrücken auf der A 6.

Autobahn A 4/bis Autobahndreieck Saarbrücken, weiter in Richtung Mannheim auf der A 6.

Mit der Bahn

Ab Saarbrücken Hauptbahnhof mit dem Taxi ca. 15 Minuten; mit dem Bahnbus oder mit dem Zug bis Bahnhof St. Ingbert, von dort mit dem Taxi ca. 1 Minute oder zu Fuß ca. 5 Minuten.

Mit dem Flugzeug

Ab Flughafen Saarbrücken-Ensheim mit dem Taxi 5–10 Minuten.

By car

Autobahn A 6/exit St. Ingbert-West, turn left in the direction of Saarbrücken-Ensheim Airport, after the traffic lights left in the direction of St. Ingbert-Süd (Ensheimer Strasse), straight through the roundabout, the Institute is on the left after around 1.5 km.

Autobahn A 1/drive to Autobahn junction Saarbrücken, then continue in the direction of Karlsruhe/Mannheim on the A 8 to Autobahn junction Neunkirchen, then in the direction of Saarbrücken on the A 6.

Autobahn A 8/ drive to Autobahn junction Neunkirchen, then in the direction of Saarbrücken on the A 6.

Autobahn A 4/to Autobahn junction Saarbrücken, then in the direction of Mannheim on the A 6.

By rail

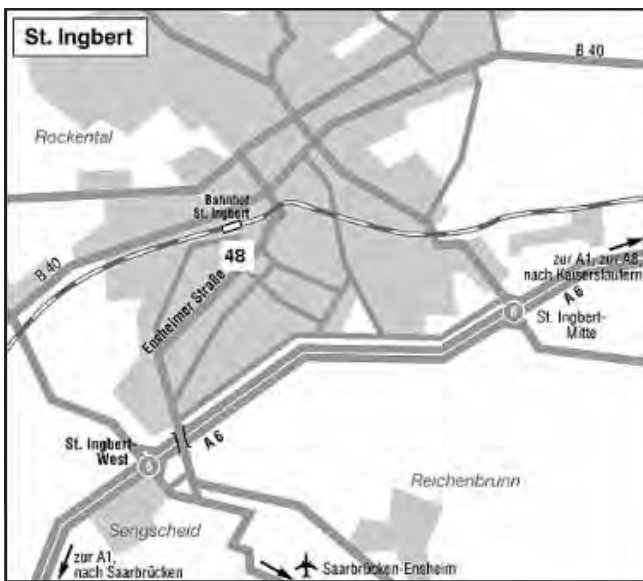
From Saarbrücken-Hauptbahnhof (main station): either 15 minutes by taxi, or first by bus or train to St. Ingbert station, then 1 minute by taxi or approx. 5 minutes on foot.

By air

5 to 10 minutes by taxi from Saarbrücken-Ensheim Airport.

ANFAHRT SULZBACH

HOW TO FIND US IN SULZBACH



Mit dem Auto

Autobahn A 6 Richtung Saarbrücken, Ausfahrt St. Ingbert-West, Hinweisschild: Richtung Sulzbach (ca. 6 km) folgen, vor Sulzbach Abfahrt »Industriegebiet Neuweiler« nehmen, dem Hinweisschild »Fraunhofer-Institut« folgend unter der Brücke durchfahren, erste Möglichkeit rechts, Hinweisschild »Fraunhofer-Institut«, nach 10 m rechts abbiegen, rechter Hand: Einfahrt durch blaues Doppelflügeltor.

By car

Coming from the A 6 in the direction of Saarbrücken, exit St. Ingbert-West, follow the sign in the direction Sulzbach (approximately 6 km); before Sulzbach take the exit "Industriegebiet Neuweiler"; follow the sign "Fraunhofer-Institut", drive under the bridge; take the first possible right, follow the sign "Fraunhofer-Institut"; turn right after 10 metres; on the right-hand side: entrance through the blue double gate.

**Fraunhofer-Institut
für Biomedizinische Technik (IBMT)**
Fraunhofer Institute
for Biomedical Engineering (IBMT)

Ensheimer Straße 48
66386 St. Ingbert
Germany
Telefon: +49 (0) 6894/980-0
Fax: +49 (0) 6894/980-400
info@ibmt.fraunhofer.de
www.ibmt.fraunhofer.de (deutsch/englisch)

Leitung / Head of Institute

Prof. Dr. Heiko Zimmermann
heiko.zimmermann@ibmt.fraunhofer.de

Prof. Dr. Günter R. Fuhr
guenter.fuhr@ibmt.fraunhofer.de

Presse- und Öffentlichkeitsarbeit / Redaktion
Press and Public Relations / Editing

Dipl.-Phys. Annette Eva Maurer
Telefon: +49 (0) 6894/980-102
Fax: +49 (0) 6894/980-188
annette.maurer@ibmt.fraunhofer.de