

**Anfertigung der Master-Thesis an der Universidad de
Málaga (UMA)**

Abschlussbericht

Juni 2006

Denise Hoffmann

Zusammenfassung der Masterthesis

Das Thema meiner Thesis lautet „Cellular and molecular characterization of a method for osteogenic commitment of stem cells and its application into the clinical management of congenital skeletal malformations“, das ich an der Universidad de Málaga im Fachbereich Zellbiologie und Genetik bearbeitete.

Obwohl beim Menschen eine gewisse Fähigkeit zur Regeneration von defekten Geweben (z.B. Wundheilung) besteht, kann der Verlust oder die Beschädigung von Knochengewebe verursacht durch Verletzung, Osteonekrose, Tumore oder angeborene Skelettdeformationen zu ästhetischen oder funktionellen Nachteilen führen. In diesen Fällen, wenn die körpereigene Regenerationsfähigkeit erschöpft ist, sind chirurgische Interventionen notwendig.

Heute werden vor allem autologe Knochen- und Knorpeltransplantate in der rekonstruktiven Chirurgie verwendet. Diese Transplantate stammen vom Patienten selbst und werden meist aus dem Hüftknochen entnommen. Trotz ihrer guten osteokonduktiven, osteoinduktiven und osteogenen Eigenschaften sind diese Transplantate auch mit zahlreichen Nachteilen behaftet: Knappheit an zur Verfügung stehendem Knochenmaterial, begrenzte Größe und Form, Verlängerung des gesamten chirurgischen Eingriffs usw. Auf der anderen Seite bergen allogene Transplantate (von anderen menschlichen Spendern) die Gefahr von immunologischen Reaktionen und erfordern die Verabreichung von immunsuppressiven Medikamenten. Synthetische Implantate (Metalle, Keramik, Kunststoffe u.a.) dagegen sind in vielen Formen und Größen herstellbar, passen sich jedoch schlecht den Verhältnissen im Körper an und verlieren mit der Zeit ihre mechanische Stabilität.

In der Regenerativen Medizin verbunden mit Tissue Engineering wird nun versucht diese Probleme der Transplantationsmedizin zu lösen. In der Regenerativen Medizin werden natürlich im Körper vorkommende Produkte, wie Gene, Proteine, Zellen oder Gewebe für die Entwicklung von medizinischen Therapien verwendet. Im Tissue Engineering wird versucht Gewebe zu entwerfen und zu produzieren, ausgehend von Zellen, die in oder über biokompatiblen Materialien angesiedelt werden. Dies erfordert 3 essentielle Komponenten:

- funktionell aktive Zellen, die keine immunologischen Reaktionen hervorrufen, einfach zu erhalten sind und gut auf differentielle Bedingungen ansprechen;
- bioaktive Moleküle, die den Prozess der Differenzierung und Reifung fördern;
- Trägersubstanzen, auf denen die Zellen *in vitro* differenziert und anschließend transplantiert werden können.

In den letzten Jahren sind diesbezüglich mesenchymale Stammzellen in den Fokus der Forschung geraten. Unter kontrollierten Medienbedingungen und durch Zugabe von bioaktiven Reagenzien können diese Zellen entweder in den osteogenen Weg induziert werden oder in andere Bindegewebe. Die Quellen dieser Zellen, ihr Differenzierungspotential und ihre Anwendung in der Regeneration von Knochendefekten werden derzeit erforscht.

Die Forschungsgruppe von Dr. J. Becerra an der Universität von Málaga arbeitet schon seit 1983 auf dem Gebiet der Knochenregeneration. Das Projekt, das ich bearbeitete, ist Teil eines Forschungsprojektes, das sich auf das osteogene Potential von mesenchymalen Stammzellen und die *in vitro*-Produktion von halbsynthetischem Knochengewebe (Zellen + biokompatible Materialien) konzentriert. Diese Materialien sollen zur Behandlung von angeborenen Skelettdeformationen angewendet werden. Dabei hat die Forschungsgruppe von Dr. J. Becerra eine Methode zur Selektion, Amplifikation und Induktion von mesenchymalen Stammzellen in die osteogene Linie (MCO-UMA) patentiert. In verschiedenen Studien der Forschungsgruppe hat sich gezeigt, dass mit dieser Methode Knochenzellen produziert werden können. Werden diese in biokompatiblen Carrier-Materialien angesiedelt, können Knochenimplantate zur Regeneration von Knochendefekten *in vitro* hergestellt werden. Trotz des Funktionierens dieser Methode, ist weiterhin unklar, was bei diesem Prozess der Selektion, Proliferation und Differenzierung auf zellulärer Ebene tatsächlich passiert. Die Analyse der Genexpression der Zellen während dieses Prozesses könnte Aufschluss über die zellulären Mechanismen der Knochenbildung *in vivo* und *in vitro* geben.

Aufgabe dieser Thesis war es deshalb ein semiquantitatives RT-PCR- (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) Protokoll zu entwickeln um die sich differenzierenden Zellen auf ihre Expression definierter Marker der osteogenen Differentiation hin zu untersuchen. Damit sollte es auch möglich sein, den Einfluss von Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1 (Transforming growth factor-beta 1) auf die Zellen zu analysieren. Weiterhin sollte untersucht werden, welchen Einfluss es auf die Zellen hat, wenn sie nicht adherent auf einer Plastikoberfläche (Standard-Methode), sondern in einem Kollegen I-Gel wachsen. Neben der Entwicklung des RT-PCR-Protokolls wurden die Zellen auch optisch charakterisiert um beide Kulturtechniken zu vergleichen.

Aufgrund der Kürze der Zeit musste ich mich in meinem Projekt auf das in meinem Forschungsvorhaben beschriebene Ziel 1 beschränken und innerhalb dieses auf die Charakterisierung der Genexpression mittels RT-PCR. Desweiteren konnte ich nicht wie

zunächst geplant mit Mäusen arbeiten, da bei diesen Tieren die Mutationen, die zu angeborenen Schädeldeformationen führen, schwierig zu erhalten sind. Weiterhin ist die Methode MCO-UMA noch nicht so einfach von Ratten als Tiermodell auf Mäuse übertragbar. Dazu sind noch weitere Studien notwendig. Aufgrund dessen entschied ich mich in Absprache mit Dr. J. Becerra meine Studien mit Ratten durchzuführen.

Die erste Aufgabe meiner Thesis bestand darin, die RT-PCR-Methode zu etablieren, mit der die Zellen auf Genebene charakterisiert werden können. Dazu wurden zunächst geeignete Primer für verschiedene Knochenmarkergene mit Hilfe von OligoPerfect™ Designer von Invitrogen und BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) entworfen. Diese Primer wurden mit Hilfe von Testzellen, die zuvor *in vitro* in die Knochen- bzw. Knorpellinie differenziert wurden, getestet und die optimale Anzahl an PCR-Zyklen sowie Annealing-Temperatur bestimmt. Währenddessen wurden 3 Zellkultur-Experimente durchgeführt. Die Knochenmarkzellen aus den Oberschenkelknochen von Ratten wurden entsprechend der MCO-UMA und der Standard-Methode jeweils mit und ohne TGF-β1 für je 17 Tage kultiviert. Nach jeder Phase des Kulturprozesses (Selektion, Amplifikation und Induktion) wurden Proben für die nachfolgende Analyse der Genexpression der Zellen entnommen und bis zur Analyse eingefroren.

Es konnte gezeigt werden, dass das entwickelte RT-PCR-Protokoll für die Genanalyse von Zellen und Geweben anwendbar ist. Aufgrund von sehr geringen RNA-Konzentrationen in den Proben der Zellkulturexperimente konnten diese Proben jedoch nicht analysiert werden. Weiterhin enthielt die extrahierte RNA durch die Phenol/Chloroform-Extraktion noch Reste von Kontaminationen, die die weitere Analyse verhinderten. Um das besagte RT-PCR-Protokoll auf die Zellproben der MCO-UMA anzuwenden, müssen andere Methoden der RNA-Extraktion gefunden werden. Eine Möglichkeit wäre dabei die Adsorption der RNA an Säulenmaterialien mit anschließenden Wasch- und Elutionsschritten. Eine Variation von kommerziellen Kits ist dafür erhältlich. Weiterhin wird es notwendig sein, ein zuverlässige Methode zur Bestimmung der Lebendzellzahl vor der RNA Extraktion in den Prozess zu implementieren. Danach könnte das Protokoll zur Charakterisierung der Zellen des MCO-UMA-Prozesses angewendet werden. Interessante Erkenntnisse über die Knochenbildung *in vivo* und *in vitro* könnten dadurch gewonnen werden. Durch die Adaptation der Parameter könnte das Protokoll auch auf Zelllinien anderer Spezies (Mäuse, Schafe, etc.) angewendet werden. Die Untersuchung von normalen und mutierten Zellen könnte Aufschluss darüber

geben, ob die Mutationen tragenden Zellen auch mit Hilfe der MCO-UMA in den Knochenweg induziert werden können (Anwendung der MCO-UMA zur Behandlung von angeborenen Skelettdeformationen).

Allgemeine Informationen über Spanien, Málaga und die Universität von Málaga

Flug

Die Reisevorbereitungen für Spanien sind relativ unkompliziert. Málaga selbst besitzt einen Flughafen, der sehr gut von Deutschland aus erreichbar ist. Airlines, die auch zu relativ günstigen Tarifen nach Malaga fliegen, sind unter anderem:

- Air Berlin
- EasyJet
- Condor
- Alitalia (meist via Mailand)
- Lufthansa.

Je nach Reisezeitraum variieren die Preise jedoch stark, sodass man sich frühzeitig nach Flügen umschaun muss. Direktflüge sind meist erheblich teurer. Was man bei Billigfliegern beachten muss, ist die begrenzte Gepäckmenge, die man mitnehmen darf (z.B. bei Air Berlin 20 kg und 3 kg als Handgepäck). Jedoch drücken die Fluggesellschaften auch bei leichtem Übergepäck oft ein Auge zu.

Konto

Da für Spanien kein Visum notwendig ist und man auch kein Geld tauschen muss, ist der restliche Aufwand bezüglich der Reisevorbereitungen gering. Um in Spanien kostenlos Geld abzuheben, empfiehlt sich ein Konto bei der Deutschen Bank. Die Deutsche Bank hat mehrere Filialen in fast jeder Stadt in Spanien, deren Adressen man auch im Internet einsehen kann. Dort kann man dann von seinem deutschen Konto kostenlos Geld abheben, jedoch keine Überweisungen tätigen. Dies ist aber bei der Deutschen Bank online problemlos möglich.

Wohnungssuche

Es empfiehlt sich auch schon vor der Ankunft in Málaga nach Wohnungen umzusehen. In Spanien ist es relativ teuer in Studentenwohnheimen zu wohnen; diese sind jedoch sehr

komfortabel. Je nach Preisklasse werden die Zimmer dort vom Personal geputzt, man bekommt alles Notwendige zur Verfügung gestellt (Handtücher, Bettwäsche, Geschirr), man hat 24h kostenlos Internet, zum Teil sind die Wohnheime mit Fitnessstudio und Schwimmbad ausgestattet. Man kann dort auch wählen zwischen Vollpension, Halbpension oder nur Unterkunft. Man fühlt sich also praktisch wie im Hotel. Dementsprechend ist der Preis: 300-600 Euro/Monat. Die Wohnheime sind meist auch im Internet präsent, sodass man sie sich schon vorher informieren kann.

Eine andere Möglichkeit ist ein Zimmer in einer WG, von denen es in Spanien viele gibt und die wesentlich billiger sind (150 – 300 Euro/Monat). Suchen kann man freie Zimmer in WGs im Internet unter:

www.loquo.com

www.campusanuncios.com

Oft wollen die Leute jedoch, dass man vorbeikommt, um sich das Zimmer anzusehen, was vor Ankunft schwierig ist.

Bei mir war es so, dass mir mein Betreuer an der Uni für einen Monat ein Zimmer in einem Wohnheim in der Nähe der Universität reserviert hatte. Dadurch hatte ich vor der Ankunft in Málaga keinen Aufwand mehr mit der Zimmersuche. Ich hatte in diesem Wohnheim eine kleine Wohnung, ausgestattet mit Schlafzimmer, Bad, Wohnraum und einer kleinen Kochnische mit Kühlschrank. Ich hatte 24h Internet, was für die Anfertigung der Thesis von großem Vorteil ist. Das Wohnheim verfügte auch über eine kleine Cafeteria, in der man essen konnte, sowie einen Waschsalon. Da ich jedoch nur einen Monat dort bleiben konnte, musste ich mich zu Beginn gleich auf die Suche nach einer neuen Unterkunft machen. Die war relativ anstrengend und kompliziert. Hat man ein passendes Zimmer gefunden (z.B. durch eine Anzeige im Internet oder einen Aushang auf dem Campus), ruft man die Bewohner an und kann auch meist gleich kommen um das Zimmer zu besichtigen. Dann gilt dabei jedoch das Prinzip: „Wer zuerst kommt, malt zuerst!“; bzw. wer zuerst angerufen hat, bekommt das Zimmer. Man muss also schnell sein.

Bei der Wohnungssuche vor Ort empfiehlt es sich auch, die angegebene Adresse vorher genau z.B. im Internet oder Stadtplan zu suchen und genau zu wissen wo man hin muss. „Durchfragen“ bringt einen meist nicht weiter, da die meisten Leute auf der Strasse und in den Geschäften, die man fragt sich auch nicht auskennen. So kann es passieren, wenn man

nicht gut vorbereitet ist, dass man Stunden herum irrt. So erging es mir bei meiner Wohnungssuche.

Telefonieren

Hat man sein Handy aus Deutschland mitgebracht und ist dieses kompatibel mit anderen SIM-Karten, kann man sich vor Ort einfach eine SIM-Karte kaufen. Anbieter sind zum Beispiel Movistar und Vodafone. Für 25 Euro erhält man die Prepaid-Karte und damit eine spanische Handynummer. Die 25 Euro kann man meist vollständig vertelefonieren. Wieder aufgeladen kann die Karte dann in jeden Supermarkt. Festnetzanschlüsse in den Wohnungen sind jedoch eher die Ausnahme.

Um nach Deutschland zu telefonieren kann man das Internet-Telefonie-Programm Skype verwenden. Damit kann man für 2 Cent/min. ins deutsche Festnetz und sogar kostenlos zu anderen Computern, die dieses Programm haben, anrufen. Eine entsprechend schnelle Internetverbindung ist dazu jedoch notwendig.

Es gibt auch Telefonkarten, mit denen man durch eine Vorwahl billiger nach Deutschland aus dem spanischen Festnetz telefonieren kann.

Von Deutschland aus kann man unter: www.billigertelefonieren.de billige Vorwahlen ins spanische Festnetz erfahren und so für weniger als 2 Cent/min. nach Spanien anrufen.

Leben in Spanien

Wer vorhat seine Master-Thesis in Spanien zu schreiben, braucht auf jeden Fall gute Sprachkenntnisse. Mit Englisch kommt man meist nicht sehr weit, auch an der Uni nicht.

Trotz guter Spanischkenntnisse ist es zu Beginn sehr schwer die Andalusier zu verstehen. Sie sprechen sehr schnell und undeutlich, aber nach einigen Tagen intensiven Kontakts mit Spaniern wird das Verständnis besser.

Als Deutscher muss man sich in Spanien erst einmal an einen etwas anderen Tagesablauf gewöhnen. Ein normaler Arbeitstag verläuft ungefähr so: Mit der Arbeit beginnt man meist gegen 9 Uhr. Zwischen 11 und 12 Uhr legt man eine zweite Frühstückspause ein mit Kaffee und einer Kleinigkeit zu essen. Mittag ist zwischen 2 und 4 Uhr nachmittags, wobei man meist wirklich eine 2 stündige Mittagspause hat. In dieser Zeit, meist von 14 bis 17 Uhr sind auch fast alle Geschäfte geschlossen! Danach wird oft noch bis 8 oder noch länger gearbeitet. Die Geschäfte haben gewöhnlich bis 21.30 Uhr geöffnet.

Die Menschen in Spanien habe ich als sehr freundlich erlebt. Diesen Eindruck gewinnt man jedoch erst nach einiger Zeit, da die Spanier oft durch ihre Art miteinander zu reden, sehr

grob und laut wirken. Lernt man sie jedoch näher kennen, sind sie sehr freundlich und hilfsbereit. Es ist jedoch auch relativ schwer mit den Heimheimischen in Kontakt zu kommen. Aber bei der Anfertigung der Thesis an der Uni oder in einer Firma wird der Kontakt durch das Arbeitsverhältnis erleichtert.

Stadt Málaga

Málaga ist mit ca. 550 000 Einwohnern die größte Küstenstadt in Andalusien. Während das Mittelmeer die Küsten Málagas begrenzt, wird die Stadt Bergen umgeben. Diese schützen vor Kälte und sorgen für milde Temperaturen. Die heißesten Monate sind Juli und August und sie kältesten Dezember und Februar. Die Berge von Málaga wurden 1989 zum Nationalpark erklärt. Die Stadt selbst bietet kulturell einiges zu sehen. Málaga wurde bereits von den Phöniziern gegründet und hatte unter den Mauren große Bedeutung. Hochinteressante historische Reste in der Stadt selbst und in ihrer Umgebung bezeugen diese Vergangenheit:

Der Königspalast *Alcazaba*, dessen Bau im 11. Jahrhundert begonnen wurde, ist das bedeutendste Bauwerk aus der maurischen Zeit. Heute befindet sich darin das Archäologische Museum. Sehenswert sind auch die schönen Gartenanlagen mit mehreren Brunnen. Am Fuße der Alcazaba findet man die Reste eines römischen Theaters, das 1951 entdeckt wurde. In der Nähe befindet sich auch das *Castillo de Gibralfaro*. Über dem ursprünglichen Palast, der wahrscheinlich von den Phöniziern erbaut worden war, ließ der granadinische Kalif Yasuf I im 14. Jahrhundert diese Festung errichten. Nach der Eroberung Málagas von den Mauren ließen die katholischen Könige 1528 mit dem Bau der Kathedrale über der ursprünglichen Moschee beginnen. Die Arbeiten dauerten bis 1728 und die Fassade stammt vorwiegend aus dieser letzteren Epoche. Sehenswert sind besonders die Kapellen, *Capilla Mayor* und *Capilla del Sagrado Corazón* und das Chorgestühl. Pablo Picasso wurde in Málaga geboren. Sein Geburtshaus am *Plaza Merced* zeigt sein Leben und Schaffen. Im Picasso Museum sind einige seiner Werke ausgestellt. Jeden ersten Sonntag im Monat ist der Eintritt gratis. Im *Teatro Cervantes* trat einst sogar Antonio Banderas auf.

Málaga ist auch kulinarisch nicht zu verachten. Die Malagueños lieben ihr Essen und so sind die Bars und Restaurants Orte des wahren sozialen Lebens. Probieren muss man auf jeden Fall *pescaito frito* (frittierten Fisch), die verschiedenen Sorten *Tapas*, *Patatas Asadas* (gefüllte riesige Folienkartoffeln), *Gambas* (Shrimps) in allen Variationen, *Boquerones in Vinagre*, *Gazpachos*, ...

An Festen in Málaga habe ich vor allem die *Karwoche* miterlebt, die in Malaga, so wie in den meisten größeren andalusischen Städten, mit eindrucksvollen Prozessionen begangen wird.

Auch in der Umgebung von Málaga gibt es einiges zu sehen. Die bekanntesten Städte im Süden von Spanien sind: Granada, Sevilla, Cádiz und Cordoba. Ohne Auto dauert die Fahrt dorthin jedoch relativ lang, sodass man mehrere Tage für den Besuch einplanen sollte.

Aber auch in der näheren Umgebung von Málaga gibt es sehr schöne kleine Städte und Dörfer. Diese liegen entweder direkt am Meer oder in den Bergen. Die Busverbindungen dorthin sind relativ gut und auch günstig im Vergleich zu Deutschland. Ein Auto ist aber auch hier von Vorteil, um kleinere Dörfer oder Sehenswürdigkeiten in den Bergen zu erreichen.

In der Westküste findet man Torremolinos, Benalmadena, Estepona und Marbella. Diese Orte sind jedoch sehr von Tourismus geprägt und zeigen weniger vom wahren spanischen Leben. Marbella ist interessant zu sehen, da dort der Jet Set Spaniens zu finden ist.

Im Landesinneren findet man das schöne und typische weiße Dorf Mijas. Inmitten der bizarren und fast unwirklichen Berglandschaft der Serranía de Ronda befindet sich, am Rande eines 120 Meter tiefen Abgrundes, die Stadt Ronda. Antequera ist bekannt vor allem wegen seiner bedeutenden Funde aus der Bronzezeit. Das 4500 Jahre alte Dolmen de Antequera ist eine von ringförmig angeordneten Felsblöcken umgebene Grabkammer. Nur wenige Kilometer außerhalb Antequeras befinden sich drei weitere prähistorische Grabstätten: Cueva del Romeral, Cueva de Viera, und Dolmen de Menga. Die Stadt bietet aber auch interessante Bauwerke jüngeren Datums, wie etwa seine Arabische Burg und das gewaltige Stadttor Puerta del Arco de los Gigantes. Die Kalksteinfelsen des Torcal de Antequera haben durch Erosion bizarre Formen angenommen. In östlicher Richtung kommt man zuerst nach Rincón de la Victoria, mit seiner Cueva del Tesoro, einer prähistorischen Grotte mit einem See im Inneren. Velez liegt inmitten typisch mediterraner Landschaft mit Wein- und Olivenkulturen. Hier können die Überreste einer arabischen Festung, der Palast der Marqueses de Ventel und die Kirche Santa Maria la Mayor, im Mudejar-Stil und über einer maurischen Moschee errichtet, besichtigt werden. Nerja gilt als "Balcón del Mediterraneo" ("Aussichtsterasse des Mittelmeers"). Abgesehen von der schönen Aussicht und dem malerischen Ortsbild ist es auch durch die Cueva de Nerja, eine 3000 Jahre alte Höhle mit gigantischen Stalaktiten, einen Besuch wert.

Universität

An der Universität von Malaga lohnt es sich auf jeden Fall sich zu immatrikulieren, um einen Studentenausweis der Uni zu bekommen. Damit kann man dann die Bibliothek nutzen und an

den Sportangeboten der Uni billiger (nicht kostenlos!!!) teilnehmen. Zum anderen bekommt man damit auch eine Monatskarte für öffentliche Verkehrsmittel (Bus, es gibt keine U- oder Straßenbahn) günstiger. Diese ist in Málaga auch notwendig. Alles zu Fuß zu schaffen ist unmöglich. Die Wege sind hier sehr weit.

Die Universität von Málaga (Campus Teatinos) befindet sich relativ weit außerhalb des Stadtzentrums. Deshalb ist es besser sich eine Unterkunft in der Nähe der Universität zu suchen, als im Stadtzentrum. Der Campus selbst ist auch sehr weitläufig.

Jede Fakultät hat ihr eigenes Gebäude, die selbst oft mit Cafeteria oder Mensa ausgestattet sind. In den Cafeterias bekommt man meist Kleinigkeiten zu essen, wie Bocadillos und auch einige warme Speisen. Die Preise sind hier ok. In den Mensas ist das Essen teurer als in deutschen Mensas. Für 4-6 Euro bekommt man dafür aber ein vollständiges Menü mit 1° Plato (Vorspeise), 2° Plato (Hauptspeise), Brot, Nachtisch und Getränk. Viele Spanier bringen aber ihr Essen von zu Hause mit und essen dies dann gemeinsam, im Sommer vor allem draußen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz herzlich beim DAAD bedanken, ohne dessen Unterstützung dieser Aufenthalt nicht möglich gewesen wäre und ich hoffe, dass noch viele weitere Studenten diese Erfahrung machen dürfen.