

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Isolation und Charakterisierung von humanen mesenchymalen
Stammzellen (hMSCs) aus Knochenmark zur Bestimmung der *in vitro*
Biokompatibilität von verschiedenen Biomaterialien im Rahmen des
Tissue Engineerings**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Qin Liu
aus Wuhan, China

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. P.H. Warnke

2. Berichterstatter: PD Dr. H. Meyer-Lückel

Tag der mündlichen prüfung: 07.Juni.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 07.Juni.2010

gez.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Stammzellen	1
1.2 Eigenschaften von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs)	3
1.3 Identifizierung der hMSCs	6
1.3.1 Charakterisierung der hMSCs über Oberflächenmarker	7
1.3.2 Charakterisierung der hMSCs über das multipotente Differenzierungsverhalten	7
1.3.2.1 Knochen und die osteogene Differenzierung von hMSCs	8
1.3.2.2 Knorpel und die chondrogene Differenzierung von hMSCs	9
1.3.2.3 Die adipogene Differenzierung von hMSCs	11
1.4 Therapeutische Anwendung von hMSCs	11
1.5 Tissue Engineering	12
1.6 Ziel dieser Arbeit	14
2. Methoden	16
2.1 Isolierung der hMSCs aus Knochenmark	16
2.2 Kultivierung von Zellen	16
2.3 Mikroskopische Zellzahlbestimmung	17
2.4 Kryokonservierung von Zellen	17
2.5 Auftauen kryokonservierter Zellen	17
2.6 Ernten der Zellen	18
2.7 CFU-F Assay	18
2.8 Immunfluoreszenzfärbung von hMSCs	18
2.9 Durchflusszytometrische Analyse	19
2.10 Osteogene Differenzierung	20
2.11 Adipogene Differenzierung	21
2.12 Fixierung von Zellen	21
2.13 Bestimmung der Aktivität von ALP	21
2.14 Bestimmung der Mineralisierung der Matrix mittels von-Kossa-Methode	22
2.15 Bestimmung der Mineralisierung der Matrix mittels Alizarin Red S	22
2.16 Bestimmung der Adipogenität mittels Oil Red O	23
2.17 Bestimmung des Wachstumsverhaltens von hMSCs auf CeraBall [®] -Scaffolds <i>in vitro</i>	23

2.17.1 Bestimmung der Zellvitalität durch Zellfärbung mittels FDA und PI	24
2.17.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	25
2.17.3 MTT-Test	25
2.17.4 WST-Test	26
2.18 Bestimmung des Wachstumsverhaltens von hMSCs auf BioGide®-Membranen	26
2.18.1 LDH-Test	27
2.18.2 MTT-Test	28
2.18.3 WST-Test	28
2.18.4 BrdU-Test	29
2.18.5 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	30
3. Ergebnisse	31
3.1 Isolierung und Charakterisierung der hMSCs	31
3.1.1 Isolierung und Expansion der hMSCs aus dem Knochenmark	31
3.1.2 Immunfluoreszenzfärbung von hMSCs	32
3.1.3 CFU-F Assay	33
3.1.4 Durchflusszytometrische Analyse	34
3.1.5 Osteogene Differenzierung	36
3.1.5.1 Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase	36
3.1.5.2 Nachweis der Mineralisierung der Matrix mittels von-Kossa-Methode	37
3.1.5.3 Nachweis der Mineralisierung der Matrix mittels Alizarin Red S	38
3.1.6 Adipogene Differenzierung	39
3.2 Bestimmung des Wachstumsverhaltens von hMSCs auf verschiedenen Biomaterialien <i>in vitro</i>	40
3.2.1 CeraBall®-Scaffolds und hMSCs	40
3.2.1.1 WST-Test	41
3.2.1.2 MTT-Test	41
3.2.1.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	42
3.2.1.4 Bestimmung der Zellvitalität mittels FDA und PI	43
3.2.2 Bestimmung des Wachstumsverhaltens von hMSCs auf BioGide®-Membranen	45
3.2.2.1 LDH-Test	45
3.2.2.2 MTT-Test	45
3.2.2.3 WST-Test	46
3.2.2.4 BrdU-Test	47

3.2.2.5 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	48
4. Diskussion	50
4.1 Isolierung und Charakterisierung der hMSCs	50
4.1.1 Isolierung und <i>in vitro</i> Expansion der hMSCs	50
4.1.2 Charakterisierung der hMSCs	51
4.2 Biokompatibilität der verschiedenen Biomaterialien für hMSCs	53
4.2.1 Biokompatibilität von CeraBall [®] -Scaffolds	54
4.2.2 Biokompatibilität von BioGide [®] -Membranen	54
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis	57
7. Anhang	73
7.1 Abbildungen	73
7.2 Tabellen	74
7.3 Abkürzungen	74
7.4 Material	76
7.4.1 Chemikalien	76
7.4.2 Verbrauchsmaterial	78
7.4.3 Geräte	78
7.4.4 Kits	79
7.4.5 Antikörper	79
7.5 Danksagung	81
7.6 Lebenslauf	82

1. Einleitung

1.1 Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen. Sie teilen sich asymmetrisch. Dadurch entsteht einerseits eine exakt identische Tochter-Stammzelle, was die ständige Selbsterneuerung ermöglicht. Andererseits wird durch die asymmetrische Teilung ein Nachkomme hervorgebracht, welcher nicht mehr die identischen Eigenschaften der Mutterzelle beibehält und weiter zu einem spezifischen Zelltyp des Organismus ausdifferenzieren kann. Im Hinblick auf ihre Möglichkeiten, sich in verschiedene Zelltypen differenzieren zu können, werden die Stammzellen in drei Gruppen unterteilt: **totipotente**, **pluripotente** und **multipotente** Stammzellen.

Bei **Totipotenz** handelt sich um die Fähigkeit zur Bildung des kompletten Individuums. Zu den **totipotenten** Stammzellen zählen die befruchtete Eizelle (Zygote) von Säugetieren und ihre Teilungsstadien bis zum 8-Zellstadium (Slobodianski et al. 2006).

Zu den **pluripotenten** Zellen zählen die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen). Sie bilden die innere Zellmasse der Blastozyste, welche sich aus der Zygote entwickelt. Die ES-Zellen findet man beim Menschen etwa vom 4. bis zum 7. Tag nach der Befruchtung. Sie können sich zu den drei Keimblättern Endoderm, Ektoderm und Mesoderm entwickeln und danach alle Zelltypen des Körpers bilden (Abb. 1). Erstmals wurden 1998 die humanen ES-Zellen erfolgreich kultiviert (Thomson et al. 1998). Das theoretisch unendliche Regenerierungspotenzial eröffnet zwar viele Möglichkeiten in der Medizin, die Gewinnung und der Einsatz humaner ES-Zellen in der Forschung und in der klinischen Anwendung sind jedoch ethisch nicht unbedenklich und werden kontrovers diskutiert (Ringe et al. 2006; Niemeyer et al. 2004).

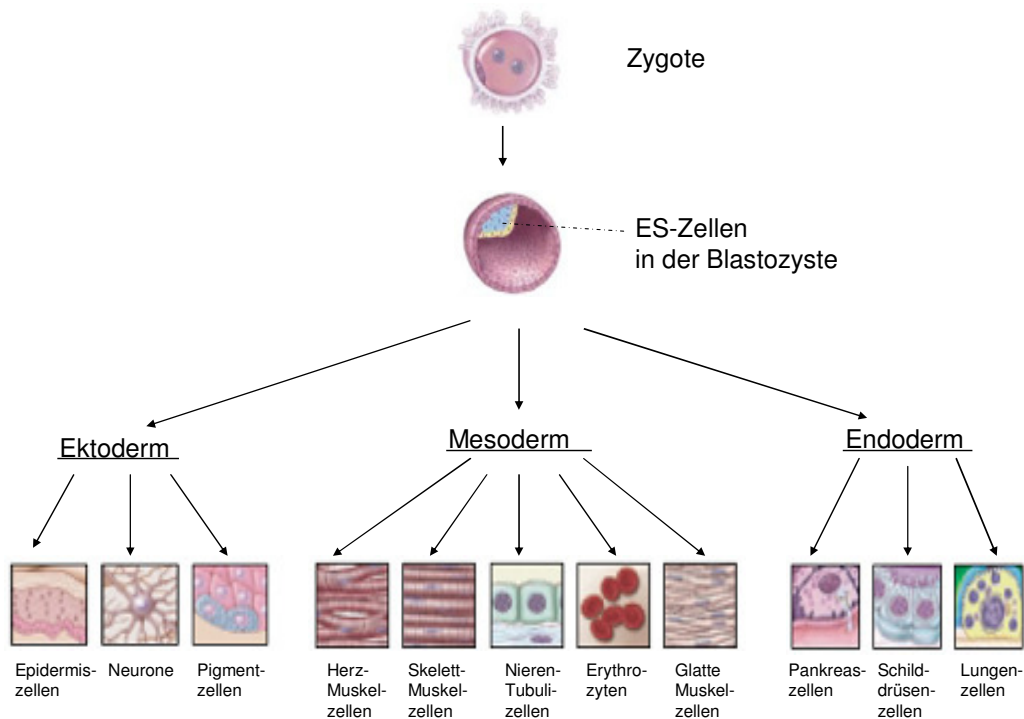


Abb. 1: Differenzierung der ES-Zellen in Zellen der drei Keimblätter. Aus der Zygote entwickelt sich die Blastozyste. Die drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) werden anschließend aus ES-Zellen in der Blastozyste gebildet. Alle Körperzellen leiten sich aus den drei Keimblättern ab. ES-Zelle: embryonale Stammzelle. (Abbildung nach Winslow et al. 2001; modifiziert)

Zu den **multipotenten** Zellen zählen die adulten Stammzellen. Sie können unter geeigneten Bedingungen entlang bestimmter Zell- und Gewebelinien differenzieren, besitzen jedoch nicht mehr die Fähigkeit, sich zu jeder Art Zelle zu entwickeln (Mariani et al. 2003). Zu den adulten Stammzellen gehören die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und die mesenchymalen Stammzellen (MSCs). Inzwischen konnten die adulten Stammzellen außerhalb des Knochenmarks noch in ca. 20 Organen des menschlichen Körpers nachgewiesen werden, beispielsweise in der Haut (Slack et al. 2000), in der Retina (Coles et al. 2004), im Gehirn (Johansson et al. 1999), im Fettgewebe (Zuk et al. 2001), im Darm (Bach et al. 2000) und in der Leber (Herrera et al. 2006).

Die erste definierte adulte Stammzelle ist die HSC (Lewis et al. 1964). HSCs sind CD34-positive und CD3-, CD14-, CD16-, CD19-, CD20-, CD56- negative Zellen. CD steht für *Cluster of Differentiation*. Die CD-Moleküle sind membrangebundene Proteine und bezeichnen die Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmarker der Zellen, die sich nach biochemischen oder funktionellen Kriterien ordnen lassen. HSCs bilden sämtliche Blutzellen

und können aus Knochenmark und Nabelschnurblut isoliert werden. Die therapeutische Anwendung von HSCs war bereits bei hämatologischen Erkrankungen erfolgreich (Zubler et al. 2006).

1.2 Eigenschaften von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs)

In der vorliegenden Arbeit wurden humane mesenchymale Stammzellen (*human mesenchymal stem cells*, hMSCs) untersucht. Diese hMSCs sind multipotente, undifferenzierte Zellen. Sie zeichnen sich sowohl durch ihre Kapazität zur Selbsterneuerung als auch durch ihr Differenzierungspotenzial in verschiedenen Geweben aus (Pittenger et al. 1999). Unter definierten Bedingungen können sich hMSCs *in vitro* in Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten, Muskelzellen und in Blutzellbildung unterstützende Stromazellen differenzieren (Gluckman et al. 2004; Phinney et al. 1999; Conget et al. 1999; Colter et al. 2001; Park et al. 1999) (Abb. 2).

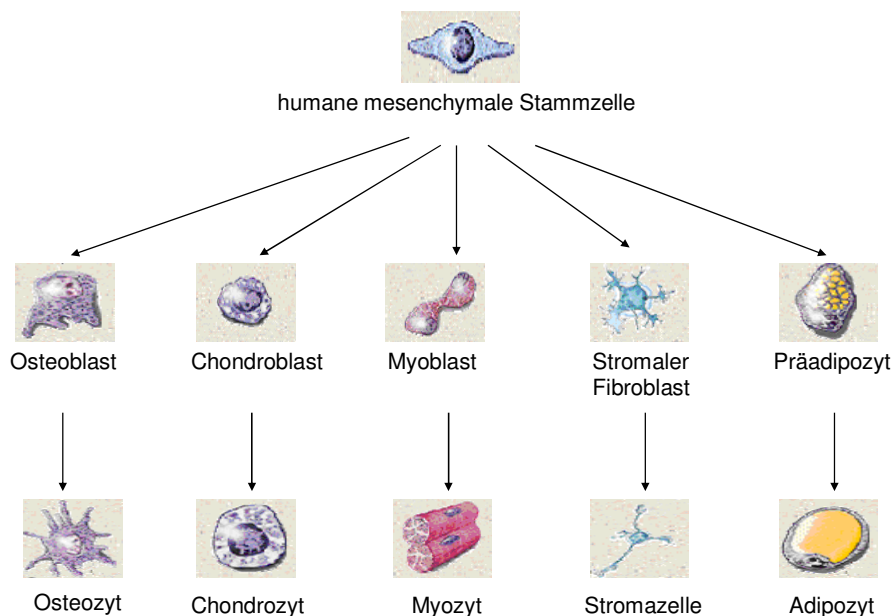


Abb. 2: Differenzierungspotenzial der humanen mesenchymalen Stammzellen. Humane mesenchymale Stammzellen sind in der Lage, sich in Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten, Stromazellen und Myozyten zu differenzieren. (Abbildung nach Pittenger et al. 2001; modifiziert)

Aus dem Mesoderm leiten sich hMSCs ab. Es sind spindelförmige Zellen mit Fibroblastenartigen Ausläufern. Die Selbsterneuerung der hMSCs beschreibt die Fähigkeit, dass diese Zellen durch mitotische Teilung über längere Zeiträume (z.B. die gesamte Lebensdauer eines Organismus) auch eine identische Kopie von sich selbst generieren können.

Sowohl in *in vivo* als auch in *in vitro* Studien zeigen hMSCs Heterogenität, was auf ihre Selbstreplikation und ihr Differenzierungspotenzial zurückzuführen ist (Baksh et al. 2004). Die undifferenzierten hMSCs teilen sich asymmetrisch und dabei entstehen entweder wieder identische Stammzellen oder nichtidentische Progenitorzellen der differenzierten Zielzellen in verschiedene Richtungen (Baksh et al. 2004). Abbildung 3 zeigt, dass der hMSC-Pool im Knochenmark nicht nur die vermeintlichen "Mesenchymalen Stammzellen", sondern auch die Subpopulation in verschiedenen Stadien der Differenzierung umfasst.

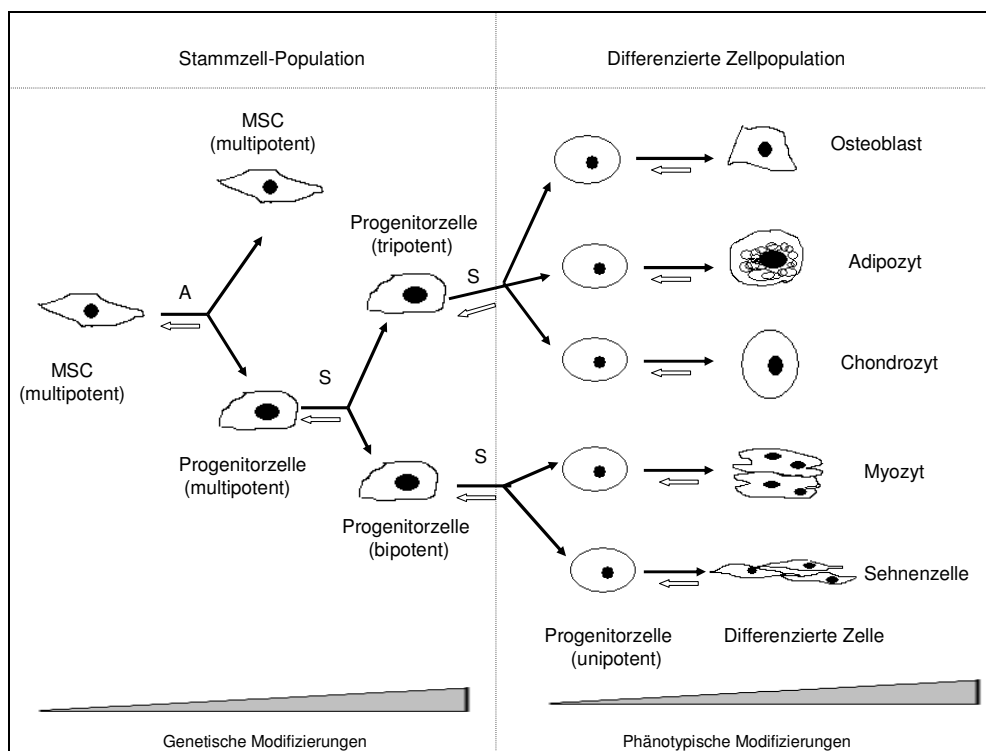


Abb. 3: Schematische Darstellung der Entwicklung von hMSCs im Knochenmark. Die verschiedenen Differenzierungszustände existieren im Knochenmark stets gleichzeitig nebeneinander. A: Asymmetrische Zellteilung; S: Symmetrische Zellteilung; MSC: mesenchymale Stammzelle. (Abbildung nach Bakch et al. 2004; modifiziert)

Ein anderer wichtiger Charakter der hMSCs ist die Immunmodulation. hMSCs wirken *in vitro* immunsuppressiv. Sie verhindern die Proliferation von T-Zellen nach Stimulation mit

Alloantigenen und Mitogenen durch *human leucocyte antigen* (HLA)-unabhängige Mechanismen (Bartholomew et al. 2002; Krampera et al. 2003; Le Blanc et al. 2003; Tse et al. 2003). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die hMSCs ein Aktivierungsprogramm in zytotoxischen T-Zellen blockieren konnten (Le Blanc et al. 2007). hMSCs entkommen auch der Lyse von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Rasmusson et al. 2003).

Weiterhin besitzen hMSCs Plastizität. Es ist bekannt, dass hMSCs die Fähigkeit besitzen, in Zellen mit neuroektodermalem und endodermalem Ursprung zu differenzieren, was auch als Transdifferenzierung bezeichnet wird (Song et al. 2004). Der Ausdruck Transdifferenzierung bezeichnet die phänotypische Umwandlung eines Zelltyps in den Zelltyp eines anderen Gewebes. Während des Prozesses der Transdifferenzierung wurde eine umfangreiche Zellvermehrung beobachtet. Die Zellen verloren ihren linien-spezifischen Phänotyp sowohl in Morphologie als auch in Funktion, bevor sie wieder zu einem ähnlichen Zustand der primitiven Stammzellen zurückkehrten (Baksh et al. 2004).

Die erste erfolgreiche Isolation und Expansion von hMSCs aus dem Knochenmark geht auf Friedenstein in den 1970er Jahren zurück (Friedenstein et al. 1970). Die Isolation basierte auf der Adhäsion der knochenmarkabgeleiteten, Fibroblasten-ähnlichen Zellen an die Plastikoberfläche der Zellkulturflasche. Dadurch wurden die hMSCs von den hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks, die nicht adhärent wachsen, getrennt. Neben dem Knochenmark befinden sich hMSCs ebenfalls im Fettgewebe, im Pankreas, in der Plazenta, in Nabelschnurblut, im Fruchtwasser und im Periost (Zuk et al. 2002; Hu et al. 2003; Igura et al. 2004; Bieback et al. 2004; Tsai et al. 2004; Ringe et al. 2006).

Die Frequenz von hMSCs im Knochenmark und im Nabelschnurblut ist etwa eine von 10^4 mononukleären Zellen und im Fettgewebe 5 von 10^4 mononukleären Zellen (Kern et al. 2006). Die *Ex-vivo*-Expansion der hMSCs ist daher ein wichtiges Ziel der Wissenschaft, da beispielsweise bei der Behandlung der Spender-Gegen-Wirt-Krankheit (*Graft versus host reaction*) eine ausreichende Dosis von mindestens 2×10^6 hMSCs pro kg Körpergewicht für den Einsatz von hMSCs im erwachsenen Patienten zur Verfügung stehen sollte (Ringden et al. 2006). Die Vermehrungskapazität einer Population hMSCs wird vom Alter und Zustand des Knochenmarkspenders und vom Entnahmezeitpunkt beeinflusst (Caplan et al. 1994; Digirolamo et al. 1999). Außerdem fehlt den hMSCs die Telomerase-Aktivität (Zimmermann et al. 2003), was beim Einsatz der hMSCs berücksichtigt werden muss. Es wurde beobachtet, dass die kultivierten hMSCs nach durchschnittlich 34-50 Verdopplungen der Zellpopulation in das Stadium von Seneszenz, was den Alterungsprozess der Zellen bedeutet, eintraten und ihr multipotentes Differenzierungspotenzial verloren (Bruder et al. 1997). Bei der Expansion

der hMSCs spielt die Aussaatdichte eine Rolle. Eine 2000-fache Expansion der gesamten Zellen konnte erreicht werden, wenn die hMSCs mit einer Dichte von 1,5-3 Zellen pro cm^2 Kulturoberfläche ausgesät wurden. Im Vergleich dazu konnte mit einer höheren Dichte von 12 Zellen / cm^2 nur eine 60-fache Expansion erreicht werden (Coulter et al. 2000).

Im Allgemeinen sind hMSCs multipotente, Fibroblasten-ähnliche Zellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Immunmodulation. In den meisten Studien wurden bisher hMSCs aus Knochenmark, Periost oder Nabelschnurblut isoliert und anschließend charakterisiert.

1.3 Identifizierung der hMSCs

Das *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for cellular Therapy* (ISCT) veröffentlichte die minimalen Kriterien für die Definition von hMSCs (Dominici et al. 2006), die sowohl für wissenschaftliche Untersuchungen als auch für prä-klinische Studien geeignet sind. Demnach müssen die hMSCs erstens *in vitro* adhären an Kunststoff kultiviert wachsen, zweitens spezifische Oberflächenproteine exprimieren und drittens multipotentes Differenzierungspotenzial besitzen (Tab. 1).

1. Die Zellen wachsen adhären an Kunststoff unter Standard-Bedingungen	
2. Phänotyp: Positiv ($\geq 95\%$)	Negativ ($\leq 2\%$)
CD105	CD 45
CD 73	CD 34
CD 90	CD 14 oder CD 11b
	CD 79 α oder CD 19
	HLA-DR
3. <i>In vitro</i> Differenzierung: Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten	

Tab. 1: Die minimalen Kriterien zur Identifizierung von humanen mesenchymalen Stammzellen. CD: *Cluster of Differentiation*; HLA: humane Leukozytenantigen.

1.3.1 Charakterisierung der hMSCs über Oberflächenmarker

Da bisher kein einziger für hMSCs spezifischer Marker ermittelt werden konnte, werden hMSCs in der Regel hinsichtlich der Co-Expression für eine Reihe von Oberflächenmarkern charakterisiert. Anhand der durchflusszytometrischen Analyse müssen mehr als 95% der Zellpopulation positiv für die Oberflächenproteine CD105, CD73 und CD90 sein und weniger als 2% der hMSCs dürfen positiv für CD45, CD34, CD14, CD19 und HLA-DR sein (Dominic et al. 2006).

Zur Identifizierung der hMSCs werden hier drei oben genannte Oberflächenmarker (CD105, CD90, CD73) verwendet, welche positiv bei hMSCs exprimiert werden müssen. CD105 ist ein Bestandteil des Rezeptor-Komplexes von *transforming growth factor* (TGF)- β (Cheifetz et al. 1992; Lastres et al. 1996; Barbara et al. 1999). Er ist beteiligt an der Organisation des Zytoskeletts, der Zellmorphologie und der Zellmigration und reguliert zudem den Prozess der Vaskularisierung (Burrows et al. 1995; Miller et al. 1999; Duff et al. 2003). CD90 ist ein Marker für eine Vielzahl von Stammzellen und kann für axonale Prozesse von reifen Nervenzellen verwendet werden (Masson et al. 2006; Nakamura et al. 2006; Gargett et al. 2006; Mestas et al. 2004). CD73 ist eine 5'-Nucleotidase auf der Zelloberfläche und katalysiert den Abbau von AMP zu Adenosin.

Die Abwesenheit von hämatopoetischen Antigenen auf den hMSCs wird als ein zusätzliches Kriterium verwendet, um sicher zu stellen, dass die isolierte hMSCs-Population keine hämatopoetischen Zellen enthält. CD14, CD19, CD34 und CD45 sind typische Marker hämatopoetischer Zellen und werden nicht von hMSCs exprimiert. Hinsichtlich der immunsuppressiven Eigenschaften von hMSCs wird hier die fehlende Expression eines Subtyps von MHC-II (HLA-DR) in den Kriterien mitgeführt. Sofern hMSCs nicht mit Interferon- γ stimuliert werden, ist HLA-DR auf der Zelloberfläche nicht nachweisbar (Dominici et al. 2006).

1.3.2 Charakterisierung der hMSCs über das multipotente Differenzierungsverhalten

Für eine eindeutige Identifizierung von hMSCs ist eine zusätzliche Charakterisierung über das multipotente Differenzierungspotenzial erforderlich. hMSCs sind in der Lage, unter geeigneten Differenzierungsbedingungen in die osteogene, adipogene und chondrogene Richtung zu differenzieren (Pittenger et al. 1999).

1.3.2.1 Knochen und die osteogene Differenzierung von hMSCs

Knochengewebe hat einen 30%igen organischen und einen 70%igen anorganischen Anteil. Die anorganische Substanz besteht aus der kristallinen Form des Kalziumphosphats, dem so genannten Hydroxylapatit. Der organische Teil besteht hauptsächlich aus Kollagen sowie einigen nichtkollagenösen Proteinen wie z. B. Osteocalcin, Osteonektin und *Bone Sialoprotein*. Das Kollagen im Knochen besteht im Wesentlichen aus Kollagen Typ I. Die anderen Kollagentypen wie Kollagen III, V, VI und X können jedoch auch im Knochen nachgewiesen werden. (Chichester et al. 1993; Collin et al. 1992; Beresford et al. 1993; Aubin et al. 1998).

Zwei spezialisierte Zelltypen regulieren den Knochenauf- und umbau. Osteoblasten sind knochenaufbauende Zellen und stammen aus mesenchymalen Stammzellen ab. Sie bilden die organische Knochenmatrix (Osteoid), deren spätere Mineralisierung durch Einlagerung von Hydroxylapatit zu den mechanischen Eigenschaften des Knochens führt. Im Gegensatz dazu sind Osteoklasten knochenabbauende Zellen. Sie stammen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen ab und dienen der Resorption der Knochenmatrix. Der ständige Erneuerungsprozess des Knochens (*Bone Remodelling*) ist das Ergebnis von einem balancierten Zusammenspiel der Osteoblasten und Osteoklasten (Loveridge et al. 1999).

Die Bildung der Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen unterliegt mehreren Reifungsprozessen. In der ersten Phase befinden sich die Zellen in einer Proliferationsphase, in welcher die hauptsächlich aus Kollagen Typ I bestehende Extrazellulärmatrix gebildet wird. In der zweiten Phase kommt es zu einer hohen Expression der alkalischen Phosphatase (ALP) und Matrixproteinen, wie *Bone Sialoprotein* (BSP) und Osteonektin, die in die Mineralisierung der Matrix involviert sind. Die dritte Phase zeichnet sich durch das von reifen Osteoblasten exprimierte Protein Osteocalcin aus. Reife Osteoblasten differenzieren zu Osteozyten bzw. gehen in Apoptose (Ringe et al. 2006). Ein wichtiger Schlüsselfaktor der osteogenen Differenzierung ist der Transkriptionsfaktor Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*). Osteocalcin, Osteonektin, BSP und Kollagen I werden durch Runx-2 hoch exprimiert. Tabelle 2 zeigt eine schematische Darstellung der Proteinexpression während der osteogenen Differenzierung.

Protein	hMSC	Osteoblast frühes Stadium	Osteoblast spätes Stadium
Kollagen Typ I	++	++++	+++
Alkalische Phosphatase	-	++++	++
Osteonektin	-	+++	++
Bone Sialoprotein	-	++++	++
Osteocalcin	-	++	++++

Tab. 2: Schematische Darstellung der Proteinexpression während der osteogenen Differenzierung. (-): keine Expression; (+): geringe Expression; (++): mittlere Expression; (+++): hohe Expression; (++++): sehr hohe Expression. (Abbildung nach Knieb et al. 2006; modifiziert)

Die osteogene Differenzierung aus hMSCs kann durch Zugabe von Dexamethason oder Wachstumsfaktoren wie das *Bone Morphogenic Protein* (BMP) *in vitro* induziert werden. In der vorliegenden Arbeit dienten Dexamethason, β -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure-2-phosphat als stimulierende Faktoren. Dexamethason inhibiert in diesem Fall die Proliferation der hMSCs und fördert deren osteogene Differenzierung (Beresford et al. 1992). β -Glycerophosphat bietet eine zusätzliche Phosphatquelle an. L-Ascorbinsäure-2-phosphat fördert die Kollagensynthese und darüber hinaus die erhöhte Syntheseaktivität nichtkollagenöser Proteine der Knochenmatrix (Ringe et al. 2006).

1.3.2.2 Knorpel und die chondrogene Differenzierung von hMSCs

Der Knorpel zeichnet sich durch einige Besonderheiten aus: Er ist gefäßlos, nervenfrei und nur aus einem Zelltyp (Chondrozyten) aufgebaut. Die Ernährung erfolgt ausschließlich durch Diffusion aus den benachbarten Geweben (Guo et al. 2004). Es gibt drei verschiedene Knorpelarten im humanen adulten Organismus: den Faserknorpel, den elastischen Knorpel und den hyalinen Knorpel. Knorpel findet sich hauptsächlich in den Gelenken, in den Rippen, in Ohren und Nase, sowie im Tracheo-Bronchialsystem.

Knorpel besteht zu 70-80% aus Wasser, der restliche Teil setzt sich aus der extrazellulären Matrix (ECM) und den Chondrozyten zusammen. Die ECM besteht im Wesentlichen aus Glykosaminoglykanen und dem Kollagenfaser-Netzwerk, das hauptsächlich aus Kollagen Typ II besteht. Die anderen Kollagentypen im hyalinen Knorpel sind Kollagen IX und XI. Kollagen X findet man nur in der Nähe der Grenzfläche zum Knochen. Die Chondrozyten sind in der ECM in speziellen Kapseln eingebettet.

Die Entstehung des Knorpelgewebes, die Chondrogenese, ist ein sehr komplexer Prozess. Abbildung 4 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Chondrogenese mit den wichtigsten Markerproteinen. Am Anfang stimuliert das Protein BMP in der mesenchymalen Zelle die Expression des Transkriptionsfaktors Sox9 (*SRY (sex determining region Y)-box 9*), was auf regulatorischer Ebene für den Ablauf der gesamten Chondrogenese von zentraler Bedeutung ist (Healy et al. 1999). Sox9 reguliert weiter die Expression der Gene für Aggrecan und Kollagen Typ II, XI (Bridgewater et al. 1998; Liu et al. 2000; Sekiya et al. 2000). Eine Avaskularisierung des Gewebes während der Chondrogenese ist die Voraussetzung zur Bildung der Knorpel-spezifischen Matrix (Yin et al. 2001).

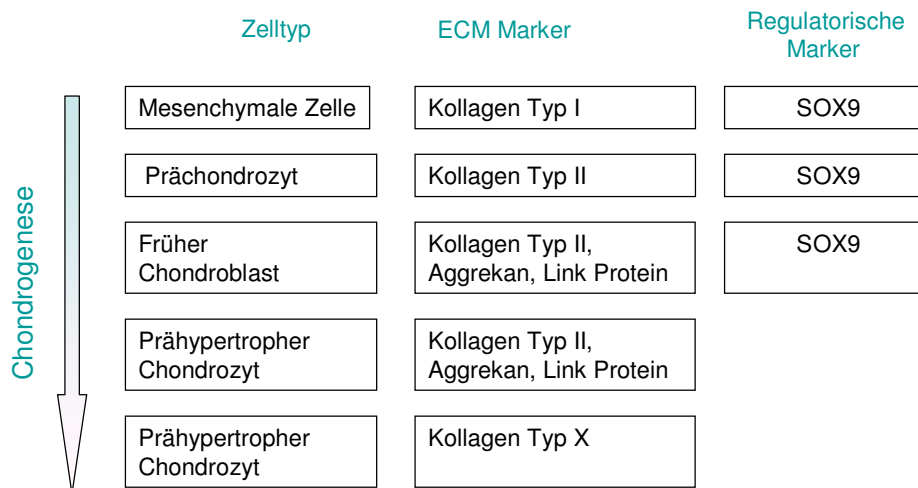


Abb. 4: Schematische Darstellung einzelner Schritte der Chondrogenese mit den wichtigsten Markerproteinen. (Abbildung nach Lefebvre et al. 2005; modifiziert)

Die chondrogene Differenzierung der hMSCs erfolgt *in vitro* oftmals in Form von hochdichten Zellaggregaten, den so genannten Pellets. Die Pellet-Kultur ermöglicht einen

niedrigen Sauerstoffgehalt, welcher für die permanente Erhaltung des Differenzierungsstatus der Chondrozyten eine Rolle spielt. Durch Zugabe von Dexamethason und *transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1) sowie *insulin-like growth factor I* (IGF-I) kann die Chondrogenese induziert werden (Ringe et al. 2006). IGF-I steigert die Matrixbiosynthese und erhöht die mitogene Aktivität von Chondrozyten. Gleichzeitig hemmt er den Matrixabbau (De Ceuninck et al. 2004). TGF- β 1 steigert die Produktion der anionischen Proteoglykane und ist in der Synovialflüssigkeit von immobilisierten Knien hochreguliert (Nixon et al. 1998; Okazaki et al. 2001). Dexamethason stimuliert bestimmte Transkriptionsfaktoren und beeinflusst darüber hinaus auch die Migrations- und Adhäsionseigenschaften der Zellen, was sich sowohl an der Zellmorphologie als auch im Wachstumsmuster erkennen lässt (Slobodianski et al. 2006).

1.3.2.3 Die adipogene Differenzierung von hMSCs

Die reifen Adipozyten zeichnen sich durch ihre zytoplasmatischen Lipidvakuolen um den Zellkern aus. Mittels induzierender Faktoren wie Insulin, Dexamethason, Indomethacin und 1-Methyl-3-Isobutylxanthin können sich hMSCs in die adipogene Richtung lenken lassen (Pittenger et al. 1999). Insulin beteiligt sich an mehreren Prozessen der adipogenen Induktion. Es fördert die Aufnahme von Glukose und stimuliert die Glykolyse und die Fettsynthese (Ringe et al. 2006). Dexamethason ist an der Einleitung der Adipogenese beteiligt und hemmt zusammen mit Indomethacin die Synthese von Arachidonsäure, einer Fettsäure, die bei Entzündungsprozessen und der Entstehung von Schmerzsignalen wichtig ist (Lehninger et al. 1994; Laneuville et al. 1994). 1-Methyl-3-Isobutylxanthin ist ein Enzym für bestimmte Stoffwechselprozesse und ist an einer verringerten Proliferation und einer verstärkten Differenzierung der Zellen beteiligt (Ringe et al. 2006).

1.4 Therapeutische Anwendungen von hMSCs

Das biologische und klinische Interesse an humanen mesenchymalen Stammzellen ist in den letzten zwei Jahrzehnten dramatisch gestiegen. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen ist die Gewinnung und Erforschung adulter Stammzellen nach gängiger Meinung ethisch unbedenklich, da sie aus dem erwachsenen Menschen gewonnen werden können. Die

Anwendungen der hMSCs umfassen unter anderem die Geweberegeneration und die Immunmodulation zur Verhinderung einer Spender-Gegen-Wirt-Reaktion sowie die Gentherapie (Wulf et al. 2006; Devine et al. 2000; Frassoni et al. 2002; Bruder et al. 1998; Award et al. 1999; Strauer et al. 2002; Chuah et al. 2000; Koc et al. 2000).

Aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit und ihrer Selbsterneuerung sowie ihres multipotenten Differenzierungspotenzials haben hMSCs im Bereich der regenerativen Medizin immer mehr an Bedeutung gewonnen, insbesondere bei der Knochenregeneration. Die Anwendung der MSCs zum Wiederaufbau von Knorpel und Knochen ist schon in Tiermodellen gut erforscht. Die Ausheilung von Knochen- und Knorpeldefekten in Tiermodellen konnte durch die lokale Implantation von MSCs wesentlich beschleunigt werden (De Kok et al. 2003; Mankani et al. 2001; Tsuchida et al. 2003). Bislang wurden jedoch sehr selten klinische Studien publiziert, die den Einsatz von hMSC zur Rekonstruktion von Knochendefekten im Menschen beschrieben (Warnke et al. 2009; Cancedda et al. 2003; Schimming et al. 2004).

Da hMSCs eine immunmodulatorische Wirkung gegen Alloantigen haben, werden sie zur Behandlung der akuten Spender-Gegen-Wirt-Krankheit (*Graft versus host reaction*) verwendet (Blanc et al. 2007). Die Co-Transplantation von hMSCs und hämatopoetischen Stammzellen verringerte die Rate und den Schweregrad einer Spender-Gegen-Wirt-Krankheit nach allogener Stammzelltransplantation (Ball et al. 2007).

Ein drittes klinisches Einsatzgebiet der hMSCs ist die Gentherapie. Hinsichtlich ihrer immunsuppressiven Eigenschaft sind hMSCs ein idealer Träger für interessante Gene in das Gewebe (Arinzeh et al. 2003; Grinnemo et al. 2004; Deng et al. 2003; Liechty et al. 2000; Baksh et al. 2004). Chamberlain et al. berichteten, dass hMSCs, welche das dominant-negative Mutantengen von Kollagen Typ I enthalten, bei der Behandlung der Erbkrankheit *osteogenesis imperfecta* erfolgreich eingesetzt werden konnten (Chamberlain et al. 2004).

In den letzten Jahren wurden hMSCs intensiv erforscht. Mit dem Zugewinn an Erkenntnissen wird die klinische Verwendung der hMSCs in Zukunft noch vielfältiger.

1.5 Tissue Engineering

Der Motor für die Entwicklung des Tissue Engineerings ist der steigende Bedarf an Geweberegeneration. Bei Tissue Engineering handelt es sich um die Anzüchtung eines lebenden Gewebes, das die Funktion eines zerstörten Gewebes übernehmen soll. Die Kultivierung kann sowohl im Körper (*in vivo* Tissue Engineering) als auch unter

Laborbedingungen (*in vitro* Tissue Engineering) erfolgen. Fernziel von Tissue Engineering ist die Züchtung von komplexen Geweben oder ganzen Organen.

Das Tissue Engineering ist ein Forschungsbereich, mit dem sich Ingenieurs-, Werkstoff-, Lebenswissenschaften und die Medizin befassen. Tissue Engineering umfasst folgende Bereiche: Zellen, Biomaterialien und Biomoleküle. Die Zellen werden nach der Isolation in zweidimensionaler Kultur vermehrt und anschließend auf dreidimensionale Biomaterialien ausgesät. Die Zellen adhären auf dem Biomaterial und beginnen idealerweise ein Gewebe aufzubauen. Dafür werden Wachstumsfaktoren und Angiogenese-fördernde Faktoren sowie die Differenzierung induzierende Faktoren angewendet.

Aufgrund ihrer relativ leichten Verfügbarkeit und ihrer Eigenschaften wie der Selbsterneuerung und des Multidifferenzierungspotenzials eignen sich hMSCs als zelluläre Ressource für das Tissue Engineering, insbesondere im Rahmen der Knochenregeneration. Trotz des hohen Selbstheilungspotentials von Knochen werden große Defekte, die so genannten *critical size defects* (Defekte $> 5 \text{ cm}^3$), ein Leben lang nicht spontan heilen. Die autologe Knochenverpflanzung ist zurzeit die Standardtherapie solcher knöcherner Defekte (Warnke et al. 2004; Vilquin et al., 2006). Ihr Nachteil ist jedoch die Schaffung eines weiteren Knochendefekts zur Gewinnung des autologen Transplantats und das Risiko von Infektionen. Die Anwendung von mesenchymalen Stammzellen bietet Hoffnung (Warnke et al. 2006). Studien in Tiermodellen haben bereits mehrfach nachgewiesen, dass die Transplantation von mesenchymalen Stammzellen die Rekonstruktion von solchen Knochendefekten wesentlich beschleunigt (De Kok et al. 2003; Mankani et al. 2001; Tsuchida et al. 2003). Über den Einsatz von hMSCs bei der Knochenregeneration wurde allerdings bislang wenig geforscht. In der vorliegenden Arbeit sollten hMSCs im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit untersucht werden.

Eine andere Herausforderung des Tissue Engineerings besteht darin, ein geeignetes dreidimensionales Biomaterial zu finden, was die Funktion der extrazellulären Matrix übernehmen kann. Die Biomaterialien sollten während des Prozesses der Anzucht des Gewebes die Zelladhäsion, die Zellproliferation und die Differenzierung anregen können. Diese Zellträger (auch Scaffolds genannt) müssen eine möglichst hohe Porosität besitzen, damit die darauf adhären wachsenden Zellen Platz für den Aufbau des Gewebes bekommen. Andererseits müssen Scaffolds die mechanische Stabilität besitzen, um die erwartete Form des angezüchteten Gewebes aufrecht zu erhalten. Außerdem sollten Scaffolds leicht an die erforderliche Form anpassbar sein (Mao et al. 2005). Die Oberflächen der Scaffolds können

durch verschiedene Faktoren modifiziert werden. Dadurch kann die Adhäsion der Zellen verbessert und die Proliferation und die Differenzierung der Zellen unterstützt werden.

Speziell für Zwecke der Knochenrekonstruktion stehen neben Polylaktid und Polyglykolsäure auch Hydroxylapatit (HA)- und β -Trikalziumphosphat (TCP)-Konstrukte zur Verfügung (Lee et al. 2001; Hench et al. 2002; Hench et al., 2004; Rahaman et al. 2005; Gerber et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Scaffold aus einer Mischung von HA und TCP verwendet. Ein anderes in der Arbeit verwendetes Biomaterial besteht aus Kollagen I und III. Kollagen ist ebenfalls ein häufig angewendetes Biomaterial im Bereich des Tissue Engineerings. Bisher wurden 14 verschiedene Kollagentypen identifiziert (Van der Rest et al. 1990). Kollagen I wurde jedoch aufgrund der Verfügbarkeit in großen Mengen und seiner spezifischen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften zur Herstellung der Biomaterialien bevorzugt (Panchence et al. 1996).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Die Regeneration eines großen Knochendefekts zur skeletalen Rekonstruktion ist heute noch eine Herausforderung (Warnke et al. 2004). Die Standardtherapie dafür ist die autologe Knochentransplantation. Ihr Nachteil ist allerdings die Schaffung eines weiteren Knochendefekts zur Gewinnung des autologen Transplantats und das Risiko von Infektionen. Das Tissue Engineering ist eine große Hoffnung im Rahmen der regenerativen Medizin (Warnke et al. 2004, 2006). Wegen ihrer Selbstreplikation und ihrer multipotenten und immunsuppressiven Eigenschaften eignen sich hMSCs als zelluläre Ressource für Tissue Engineering-Zwecke und könnte die heutige Standardtherapie revolutionieren.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Gewinnung von hMSCs aus Knochenmarkaspiraten und die anschließende Charakterisierung. Entsprechende Protokolle waren bisher am Universitätsklinikum Schleswig Holstein (UK-SH) nicht etabliert. Die Etablierung der neuen Protokolle wurde durch die Arbeitsgruppe vom Professor Strunk aus Graz (Österreich) unterstützt. In den meisten Studien wurden hMSCs mittels Ficoll-Dichtegradienten aus dem Knochenmark isoliert. Eine andere verwendete Isolationsmethode ist die magnetische Zellsortierung (*Magnetic-Activated Cell Sorting*, MACS). Für die klinische Anwendung sind die beiden Methoden jedoch zeitaufwendig und stark vom Anwender abhängig. In der vorliegenden Arbeit sollte eine einfachere und schnellere Isolationsmethode etabliert werden. Weiterhin sollten die gewonnenen Zellen hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker und ihres

multipotenten Differenzierungspotenzials auf Übereinstimmung mit den Kriterien für hMSCs überprüft werden.

Ein anderes Ziel der Arbeit war die Beurteilung des Wachstumsverhaltens von hMSCs auf verschiedenen dreidimensionalen Biomaterialien. Gleichzeitig sollte damit die Biokompatibilität der Biomaterialien für hMSCs geprüft werden. Als Biokompatibilität bezeichnet man die Verträglichkeit der Scaffolds (der dreidimensionalen Zellträger) für Lebewesen. Bevor die Scaffolds *in vivo* angewendet werden können, muss ihre Biokompatibilität in der Zellkultur geprüft werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Biokompatibilität von zwei dreidimensionalen Biomaterialien, CeraBall[®]-Scaffold und BioGide[®]-Membran, mit Hilfe von standardmäßigen Biokompatibilitätstests *in vitro* unter Anwendung von hMSCs bestimmt werden.

2.3 Mikroskopische Zellzahlbestimmung

Die Zahl der lebenden Zellen wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde ein Volumen Zellsuspension mit einem Volumen Trypanblau-Lösung vermischt. Trypanblau wirkt als Indikator für die Vitalität der Zellen. Nur tote Zellen wurden durch Trypanblau tiefblau gefärbt, lebende Zellen erschienen unter dem Lichtmikroskop leuchtend hell.

Ein Volumen des Mixes wurde in die Zählkammer gegeben und anschließend die Anzahl lebender Zellen in 4 Großquadraten gezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte gemäß folgender Gleichung:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Mittelwert aus 4 Großquadraten} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4$$

2.4 Kryokonservierung von Zellen

Reagenzien:

Einfrier-Medium

α -MEM

10% DMSO (Dimethylsulfoxid)

Zur langfristigen Aufbewahrung der Zellen wurden ca. 1×10^6 Zellen abzentrifugiert und in 1 ml Einfrier-Medium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und anschließend bei -70°C eingefroren. Das DMSO soll dabei eine Kristallbildung in den Zellen und somit eine Schädigung der Zellmembran verhindern. Nach einigen Tagen wurden die Zellen zur endgültigen Lagerung bei -180°C in einen Stickstofftank überführt.

2.5 Auftauen kryokonservierter Zellen

Die Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, mit 10 ml Zellkulturmedium verdünnt und für 5 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden die Zellen in entsprechendem Zellkulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Zelldichte in Zellkulturflaschen überführt.

2.6 Ernten der Zellen

Reagenzien: PBS (*phosphate buffered saline*)
0,05% Trypsin - 0,02% EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
Nährmedium

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C mit Trypsin überschichtet, was eine Ablösung der Zellen innerhalb von 5 Minuten vom Boden der Zellkulturflasche bewirkte. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe der vierfachen Menge an Medium gestoppt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 4°C und 1500 rpm abzentrifugiert. Je nach weiterer Verwendung wurde das Zellpellet in neuem Medium aufgenommen oder eingefroren.

2.7 CFU-F Assay

CFU-F steht für *colony – forming unit fibroblasts*. Das Ziel dieses Assays ist die Bewertung der klonalen Expansionskapazität von hMSCs. Es wurden 5 hMSCs pro cm² in einer 20 cm²-Kulturschale ausgesät. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche. Nach 12 Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 800 µl Kristall-Violett-Lösung (3 g / l) für 10 Minuten gefärbt. Nach dem Waschen mit destilliertem Wasser wurde die Schale bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit einer Kamera photographiert.

2.8 Immunfluoreszenzfärbung von hMSCs

Reagenzien: First-Antikörper: Antikörper gegen Vinkulin (hergestellt aus Maus)
Second-Antikörper: Alexa Mouse 488 (green)
Hoechst-33342
70% Ethanol
1% BSA mit 0,1% Triton X-20 in PBS
0,1% BSA in PBS
1% Tween-20 in PBS
0,05% Tween-20 in PBS

Zunächst wurden die hMSCs mit einer Dichte von 2×10^3 Zellen pro cm^2 auf Glasträger ausgesät und für zwei Tage im Nährmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 70% Ethanol (-20°C) für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Dann wurde die Probe mit PBS gewaschen und mit 1% BSA und 0,1% Triton X-20 für 20 Minuten bei Raumtemperatur bedeckt. Die BSA-Lösung blockierte die unspezifische Bindung zwischen den Antikörpern und der Probe. Triton X-20 ermöglichte den Eintritt des Antikörpers durch die Zellmembran. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1% Tween für 20 Minuten bei Raumtemperatur überschichtet und danach mit dem 1:400 verdünnten Antikörper gegen Vinkulin bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am zweiten Tag wurde der Antikörper gegen Vinkulin entfernt. Nach dem Waschen mit 0,05% Tween in PBS wurde die Probe mit dem 1:400 verdünnten Second-Antikörper, der mit Fluoreszenz gekoppelt ist, im Dunkeln für eine Stunde inkubiert. Parallel erfolgte die Färbung des Zellkerns mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst-33342, der selektiv an DNA binden kann. Hier wurden die untersuchten Zellen während der Inkubation mit dem Second-Antikörper gleichzeitig mit Hoechst-33342 in 0,1% BSA überschichtet. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten unter jedem der benötigten Filtersätze.

2.9 Durchflusszytometrische Analyse

Reagenzien: Intratect (100 ml enthält 5 g Immunglobulin)

Fluoreszenz-gekoppelte monoklonale Antikörper

Fixierungspuffer: je 12,5 μl Fixative Solution (10x, Beckman Coulter, USA)
in 1 ml PBS

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich sowohl Zellgröße und Granularität der Zellen als auch Zelloberflächenmarker und intrazelluläre Moleküle untersuchen und nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse das Co-Expressionsmuster der Oberflächenproteine von hMSC bestimmt. Dazu wurden 1×10^6 Zellen in 600 μl Nährmedium pro Ansatz verwendet. Zunächst wurden 10 μl Intratect-Lösung, welche das Immunglobulin enthielt, in die durchflusszytometrischen Röhren gegeben, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde jeweils 100 μl Zellsuspension mit den Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern bei 4°C im Dunkeln für 20 Minuten inkubiert (Tab. 3). Hier dienten die entsprechenden Isotypen der Antikörper als Negativkontrollen. Zum Schluss wurde jeweils 1 ml Fixierungspuffer zu jedem Röhren

gegeben und bis zur Messung im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte am Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, USA). Anschließend wurde der Prozentsatz der markierten Zellen mithilfe der Software CXP (Beckman Coulter, USA) analysiert.

Röhrchen	FITC	PE	PC5	PC7	ECD
1	IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
2	CD90	CD105	7-AAD	CD45	IgG
3	CD19	CD105	HLA-DR	CD45	IgG
4	CD29	CD105	CD14	CD45	IgG
5	CD90	CD73	CD34	CD45	IgG

Tab. 3: Ansatzschema der durchflusszytometrischen Analyse. FITC, PE, PC5, PC7 und ECD sind Fluoreszenzfarbstoffe. CD: *Cluster of Differentiation*; ECD: *Electrochemical*; FITC: Fluorescein-Isothiocyanat; PE: Phycoerythrin; PC5: PE-Cy5; PC7: PE-Cy7; Cy: Carbo cyanin.

2.10 Osteogene Differenzierung

Osteogenes Differenzierungsmedium: α -MEM

10% FCS

1% Penicillin / Streptomycin

2 mM L-Glutamin

100 nM Dexamethason

10 mM β -Glycerolphosphat

52 mg / l L-Ascorbinsäure-2-Phosphat

230 mg / l CaCl₂

Zur Durchführung der osteogenen Differenzierung wurden die hMSCs nach zweiter Passage verwendet. Zunächst wurden die hMSCs mit einer Dichte von 2×10^3 Zellen / cm² in einer 6-Well-Platte ausgesät und im Nährmedium bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Nach einem Tag erfolgte die Zugabe des osteogenen Differenzierungsmediums. Die Stimulierung erfolgte über einen Zeitraum von 14 bis 21 Tagen. Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche.

2.11 Adipogene Differenzierung

Adipogenes Differenzierungsmedium: α -MEM

10% FCS

1% Penicillin / Streptomycin

4 mM L-Glutamin

1 μ M Dexamethason

20 U / l Insulin

60 μ M Indomethacin

0,5 mM 1-Methyl-3-Isobutylxanthin

Zur adipogenen Differenzierung wurden die hMSCs nach zweiter Passage verwendet. Zunächst wurden die hMSCs bei einer Dichte von 3×10^4 Zellen / cm^2 auf eine 6-Well-Platte ausgesät und im Nährmedium bei 37°C , 5% CO_2 kultiviert. Die Zugabe des adipogenen Differenzierungsmediums erfolgte 24 Stunden nach der Einsaat. Die adipogene Stimulation dauerte 14 Tage, wobei der Wechsel des Mediums zweimal pro Woche erfolgte.

2.12 Fixierung von Zellen

Reagenzien: 4% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4)

Die Zellen wurden nach dem Absaugen des alten Mediums einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur für 10 Minuten überschichtet. Danach wurde die Paraformaldehyd-Lösung abgesaugt und die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen konnten dann bis zur biochemischen Färbung bei 4°C aufbewahrt werden.

2.13 Bestimmung der Aktivität von ALP

Arbeitslösung: 1 Tablette SIGMA FAST BCIP / NBT in 10 ml destilliertem Wasser

Hierbei wurde die Tablette SIGMA FAST BCIP / NBT (5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat / Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) verwendet, um die ALP-Aktivität der Zelle nachzuweisen. Das

Prinzip beruht auf der Abspaltung von AS-MX aus AS-MX-Phosphat in Gegenwart von alkalischer Phosphatase und der anschließenden Bindung von AS-MX an Diazoniumsalz, welches dann als blaues Pigment sichtbar wird.

Nach 14-tägiger osteogener Stimulation wurden die Zellen zunächst mit 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit der Arbeitslösung bedeckt. Nach 20-minütiger Inkubation wurde die Arbeitslösung entfernt und die Zellen wurden dreimal mit destilliertem Wasser gespült. Zum Schluss wurde die Probe unter dem Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert. Parallel wurden nicht stimulierte Kontrollen durchgeführt, wobei die Zellen nur mit Nährmedium behandelt wurden.

2.14 Bestimmung der Mineralisierung der Matrix mittels von-Kossa-Methode

Reagenzien: 5% Silbernitratlösung in destilliertem Wasser
0,1% Eosin

Die Mineralisierung der Matrix ist neben dem Protein ALP ein anderes osteogenes Merkmal. Mittels der von-Kossa-Färbung lässt sich die Bildung einer mineralisierten Matrix nachweisen. Das in Carbonaten und Phosphaten der Matrix gebundene ungelöste Kalzium wird durch Silberionen ausgetauscht. Die Silberionen werden zu metallischem Silber reduziert. Kalziumhaltige Zonen färben sich damit braun und lassen so deutlich den Grad der Mineralisierung erkennen.

Nach 21-tägiger osteogener Stimulation wurden die Zellen zunächst mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5% Silbernitratlösung bei Raumtemperatur 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Zellen für eine Stunde hellem Licht ausgesetzt. Zum Schluss wurden die Zellen mit 0,1% Eosin gefärbt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Nicht induzierte Kontrollen wurden analog behandelt, nur dass an Stelle des Induktionsmediums Nährmedium verwendet wurde.

2.15 Bestimmung der Mineralisierung der Matrix mittels Alizarin Red S

Färbelösung: 1 g Alizarin Red S in 50 ml destilliertem Wasser (pH 4,1 – 4,3)

Alizarin Red S ist neben der Silbernitratlösung eine Alternative zur Bestimmung der mineralisierten Matrix und gehört in die Farbstoffklasse der Anthrachinone. Das durch diese Methode gefärbte Kalzium erscheint unter dem Lichtmikroskop rot.

Nach 21-tägiger osteogener Stimulation wurden die Zellen zunächst mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit der frisch angesetzten Färbelösung von Alizarin Red S bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Die Färbelösung wurde danach dekantiert und die Zellen wurden dreimal mit destilliertem Wasser gespült. Die Daten wurden unter dem Lichtmikroskop dokumentiert. Nicht induzierte Kontrollen wurden analog behandelt, nur dass an Stelle des Induktionsmediums Nährmedium verwendet wurde.

2.16 Bestimmung der Adipogenität mittels Oil Red O

Reagenzien: Stammlösung: 0,5 g Oil Red O in 100 ml 99% Isopropanol

Färbelösung: 3 Teile Stammlösung und 2 Teile destilliertes Wasser
60% Isopropanol

Oil Red O ist ein Farbstoff, der sich im Lipidanteil der Gewebe ablagert. Somit erscheinen neutrale Fette rot. Nach 14-tägiger adipogener Stimulation wurden die Zellen zunächst mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach einmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Zellen mit 60% Isopropanol 5 Minuten überschichtet. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der frisch angesetzten Färbelösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Färbelösung wurde entfernt und der Zellrasen wurde mit destilliertem Wasser gespült. Die rot gefärbten Fetttropfchen ließen sich unter dem Lichtmikroskop betrachten. Nicht induzierte Kontrollen wurden analog behandelt, nur dass an Stelle des Induktionsmediums Nährmedium verwendet wurde.

2.17 Bestimmung des Wachstumsverhaltens von hMSCs auf CeraBall®-Scaffolds *in vitro*

Das hier angewendete dreidimensionale CeraBall®-Scaffold ist von der Firma Stryker (Duisburg, Deutschland) und besteht aus Hydroxylapatit (5%) und β -Trikalziumphosphat (95%). Der Durchmesser des Scaffolds beträgt 6 mm (Abb. 5). Zur Bestimmung der *in vitro* Biokompatibilität von CeraBall®-Scaffold wurden die in der Arbeit isolierten und

charakterisierten hMSCs verwendet. Hierzu wurden Zellvitalitätsfärbung, MTT- und WST-Test und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

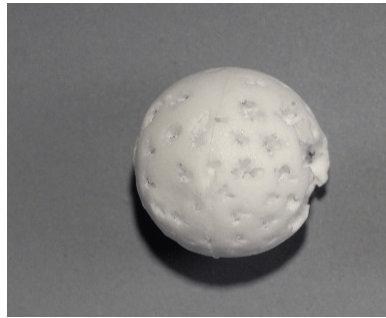


Abb. 5: CeraBall®-Scaffold. Der Durchmesser des CeraBall®-Scaffolds beträgt 6 mm.

2.17.1 Bestimmung der Zellvitalität durch Zellfärbung mittels FDA und PI

Reagenzien: FDA-Stammlösung: 1 mg / ml in Aceton

PI-Stammlösung: 1 mg / ml in destilliertem Wasser

FDA-Arbeitslösung: 30 μ l Stammlösung in 10 ml PBS

PI-Arbeitslösung: 500 μ l Stammlösung in 10 ml PBS

Die Zellvitalität kann mittels Fluorescein Diacetate (FDA) und Propidium Iodide (PI) bestimmt werden. FDA ist farblos und in der Lage, die intakte Zellmembran der lebenden Zelle zu durchdringen. In der Zelle wird FDA durch das Enzym Esterase, das in allen Zellen vorkommt, zu Fluorescein umgewandelt. Das Fluorescein bleibt in der Zelle enthalten und dadurch werden die lebenden Zellen grün gefärbt. Im Gegensatz dazu werden die toten Zellen durch PI rot gefärbt. PI ist ein Fluorescein und kann die Zellmembran der lebenden Zellen nicht durchdringen. So interkaliert PI nur in die DNA der toten Zellen, deren Plasmamembran defekt ist.

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden die hMSCs in Eluat aus dem CeraBall®-Scaffold kultiviert und anschließend mittels FDA und PI angefärbt. Das Eluat wurde jeweils aus Serum-freiem Medium, in dem das CeraBall®-Scaffold für 10 Minuten und 1 Stunde sowie 24 Stunden getränkt wurde, eingesammelt. In einem 8-Well-Objektträger wurden 1×10^4 hMSCs pro Well ausgesät und kultiviert. Nach einem Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden weiter in Eluaten aus verschiedenen Zeitpunkten kultiviert. Zellen, die in Serum-freiem Medium kultiviert waren, dienten als Kontrolle.

Nach einem Tag wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit FDA-Arbeitslösung bei 37°C im Dunkeln für 15 Minuten überschichtet. Nach dem Absaugen der FDA-Arbeitslösung wurde die PI-Arbeitslösung zugegeben. Nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die PI-Arbeitslösung entfernt und die Zellen wurden bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit PBS bedeckt. Die Anregung erfolgte bei 488 nm. Die grüne Fluoreszenz wurde bei 530 nm, und die rote bei 620 nm detektiert. Die lebenden Zellen wurden grün gefärbt, während die rote Farbe den Tod der Zellen andeutete.

2.17.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Die Zellmorphologie auf den Biomaterialen kann mittels Rasterelektronenmikroskop bestimmt werden. Auf einem CeraBall[®]-Scaffold wurden 1×10^4 hMSCs ausgesät. Nach 2-, 4- und 9-tägiger Kultivierung bei 37°C, 5% CO₂ erfolgte die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung. Die Zellen wurden mit 3% Glutaraldehyd in PBS (pH 7,4) für 24 Stunden bei 4°C fixiert. Nach der Entfernung des Glutaraldehyds wurde das Biomaterial, auf dem sich die Zellen befanden, jeweils 5 Minuten mit 50%, 60%, 70%, 80%, 90% und 100% Ethanol bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte das so genannte *critical point drying* am K850 Critical Point Dryer (Emitech, USA). Das anschließende Sputtern mit Gold wurde am SCD 500 device (CAL-Tec, Ashford, UK) durchgeführt. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung und Dokumentation wurde mit dem Rasterelektronenmikroskop Typ XL 30CP (Philips Electro Optics, Kassel) bei 10 kV durchgeführt.

2.17.3 MTT-Test

Kit: MTT Cell Proliferation Kit (Roche, Mannheim)

Der MTT-Test erlaubt die Vitalitätsbestimmung der Zellen. MTT steht für 3-(4, 5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2, 5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid, das gelb und wasserlöslich ist. MTT wird von metabolisch aktiven Zellen zu einem violetten, wasserunlöslichen Formazan umgesetzt (Vistica et al. 1991; Maehara et al. 1986; Slater et al. 1963). Vor der photometrischen Messung wird das Formazan in einem Solubilisierungspuffer gelöst. Der photometrisch gemessene Wert des Formazans entspricht der Zahl der viablen Zellen.

Mit Hilfe des MTT-Tests wurde die Proliferation der Zellen in Eluaten aus CeraBall[®]-Scaffolds untersucht. Zunächst wurde das Scaffold in 2 ml Serum-freies Nährmedium getränkt, nach 10 Minuten und 1 Stunde sowie 24 Stunden wurde das Eluat abpipettiert und bei 4°C aufbewahrt. In einer 96-Well-Platte wurden 2500 hMSCs in 100 µl Nährmedium pro Well ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung wurden das Nährmedium durch 100 µl Eluat ersetzt. Die im Serum-freien Medium kultivierten hMSCs dienten als Kontrolle. Nach weiterer 24-stündiger Kultivierung bei 37°C, 5% CO₂ wurde der MTT-Test nach Herstellerangaben mittels des MTT cell Proliferation Kits von der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm.

2.17.4 WST-Test

Reagenzien: WST-1 (Roche)

Mittels WST-Test lässt sich der Metabolismus der Zellen bestimmen. Das beim WST-Test angewendete Reagenz WST-1 steht für 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1, 3-Benzol-Disulfonat. Das schwach rot gefärbte WST-1 wird von metabolisch aktiven Zellen in das dunkelrote Formazan umgesetzt (Berridge, et al. 1996). Der photometrisch gemessene Wert des Formazans entspricht der Zahl der viablen Zellen.

Es wurden 1×10^4 hMSCs pro CeraBall[®]-Scaffold in einer 24-Well-Platte ausgesät und weiter mit hMSCs-Nährmedium kultiviert. Nach 2-, 4- und 9-tägiger Kultivierung wurde das alte Medium durch 1 ml frisches Medium ersetzt und anschließend wurde 100 µl WST-1 zugegeben. Nach 4-stündiger Kultivierung bei 37°C, 5% CO₂ erfolgte eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 460 nm. Das Polystyrol vom Boden des Wells diente als Kontrolle.

2.18 Bestimmung des Wachstumsverhaltens von hMSCs auf BioGide[®]-Membranen

Die BioGide[®]-Membran ist eine aus hochgereinigtem Kollagen I und III (porciner Ursprung) hergestellte Membran von der Firma Geistlich (Schweiz). Diese dreidimensionale Membran hat eine zweischichtige Struktur (Abb. 6): Die poröse Oberfläche erlaubt das Einwachsen von

Knochen bildenden Zellen. Die dichte Oberfläche verhindert das Einwachsen von fibrösem Bindegewebe. In der vorliegenden Arbeit wurde die raue Seite getestet.

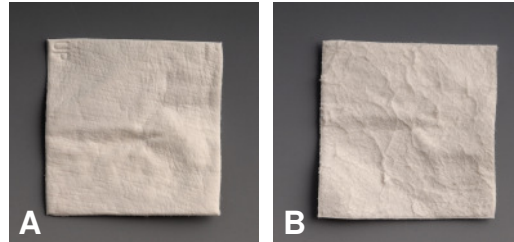


Abb. 6: Die zweischichtige Struktur der BioGide[®]-Membran. Die Membran ist 25 x 25 mm groß. **A.** Die dichte Seite der Membran. **B.** Die raue Seite der Membran.

2.18.1 LDH-Test

Reagenzien: LDH Detection Kit (Roche, Mannheim)

1% Triton X-100

1 mol / l HCl

Lactate dehydrogenase (LDH) ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym und kommt in den meisten Zellen vor. Zellen, deren Zytoplasmamembranen beschädigt sind, setzen LDH in den Überstand der Zellkultur frei. Der LDH-Test quantifiziert die Aktivität der LDH im Überstand und zeigt daher die Zytotoxizität des getesteten Materials an. Im ersten Schritt katalysiert die LDH Lactat zu Pyruvat, wobei Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) zu NADH und H^+ reduziert wird. Anschließend nimmt das Tetrazoliumsalz INT (2-(4-Indophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium) die H^+ -Ionen mit Hilfe des Enzyms Diaphorase auf und wechselt zu wasserlöslichem intensiv rot gefärbtem Formazan. Die rote Färbung kann photometrisch gemessen werden, wobei die Intensität des roten Farbstoffs mit der Aktivität der LDH korreliert.

Hier wurde das Eluat der BioGide[®]-Membran (10 mm x 10 mm) verwendet. Das Eluat wurde jeweils aus Serum-freiem Medium, in dem die BioGide[®]-Membran für 10 Minuten und 1 Stunde sowie 24 Stunden getränkt wurde, abpipettiert und bei 4°C aufbewahrt. In einer 96-Well-Platte wurden 5000 hMSCs in 100 μl Nährmedium pro Well ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung wurde das Nährmedium durch 150 μl Eluat ersetzt. Hierbei dienten die Zellen als Positivkontrolle, die unter Zugabe des Detergens 1% Triton X-100 (im Serum-freien Medium) vollständig lysiert wurden. Die Zellen, die mit Serum-freiem Medium

behandelt wurden und deshalb eine minimale LDH-Enzymaktivität im Überstand besaßen, dienten als Negativkontrolle. Nach 24-stündiger Kultivierung mit Eluat wurde 100 µl Überstand pro Well auf eine neue 96-Well-Platte übertragen. Die Bestimmung der Aktivität von LDH im Überstand erfolgte nach Herstellerangaben mittels des Roche LDH Detection Kits. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl HCl (1 mol / l) pro Well abgestoppt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 490 nm. Aus den photometrisch gemessenen Werten wurde die Zytotoxizität der Proben im Verhältnis zu Positiv- bzw. Negativkontrolle errechnet. Die Zytotoxizität der Positivkontrolle wurde als 100% bezeichnet, während die Zytotoxizität der Negativkontrolle als 0 bezeichnet wurde. Die Zytotoxizität wurde mittels folgender Gleichung ermittelt:

Zytotoxizität (%) =

$$(\text{Testwert (OD)} - \text{Negativwert (OD)}) / (\text{Positivwert (OD)} - \text{Negativwert (OD)}) \times 100$$

2.18.2 MTT-Test

Kit: MTT Cell Proliferation Kit (Roche, Mannheim)

Mit Hilfe des MTT-Tests wurde die Proliferation der Zellen im Eluat der BioGide[®]-Membran untersucht. Das Eluat wurde jeweils aus Serum-freiem Medium, in dem die BioGide[®]-Membran (10 mm x 10 mm) für 10 Minuten und 1 Stunde sowie 24 Stunden getränkt wurde, eingesammelt. In einer 96-Well-Platte wurden 2500 hMSCs in 100 µl Nährmedium pro Well ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung wurde das Nährmedium durch 100 µl Eluat ersetzt. Die im Serum-freien Medium kultivierten hMSCs dienten als Kontrolle. Nach 24 Stunden erfolgte die Durchführung des MTT-Tests durch die Anwendung des MTT-Kits von der Firma Roche (Mannheim).

2.18.3 WST-Test

Reagenzien: WST-1 (Roche, Mannheim)

Die Proliferation der Zellen auf der BioGide[®]-Membran lässt sich mittels WST-Test bestimmen. Es wurden 5000 hMSCs pro BioGide[®]-Membran (10 mm x 10 mm) in einer 24-Well-Platte ausgesät und weiter im Nährmedium für hMSCs kultiviert. Nach 4-tägiger Kultivierung wurde der WST-Test nach Herstellerangaben von der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 460 nm. hMSCs, die auf dem Deckglas (Durchmesser: 10mm) kultiviert wurden, dienten als Kontrolle.

2.18.4 BrdU-Test

Reagenzien: Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche, Mannheim)

1 mol / l H₂SO₄

Der BrdU-Test ist ein Proliferationstest und wurde bereits 1982 von Gratzner et al. etabliert. Dieser Test beruht auf dem Einbau vom synthetischem 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) anstelle von Desoxythymidin in die neu replizierte DNA von proliferierenden Zellen. Die DNA wurde in diesem Fall durch das Reagenz FixDenat denaturiert und fixiert. Dieser Schritt ermöglicht das Angreifen von einem monoklonalen Antikörper, welcher spezifisch an BrdU in den Zellen binden kann. Dieser Antikörper ist an das Enzym Peroxidase konjugiert und setzt das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Farbstoff um. Die Reaktion wurde durch die anschließend zugegebene Schwefelsäure abgestoppt, wodurch es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb kam. Dieser gelbe Farbstoff kann dann photometrisch gemessen werden. Da die DNA-Replikation eine Voraussetzung für die zelluläre Proliferation ist, ergibt sich aus dem Wert des BrdU-Tests die Zahl der proliferierenden Zellen.

Das Ziel des hier durchgeführten BrdU-Tests ist, zu bestimmen, wie gut sich die Zellen nach Kultivierung mit Eluat erholen können. Das Eluat wurde jeweils aus Serum-freiem Medium, in dem die BioGide[®]-Membran (10 mm x 10 mm) für 10 Minuten und 1 Stunde sowie 24 Stunden getränkt wurde, eingesammelt. In einer 96-Well-Platte wurden 2500 hMSCs in 100 µl Nährmedium pro Well ausgesät. Zunächst wurden die Zellen mit Eluat für einen Tag kultiviert. Danach wurde das Eluat abgesaugt und die Zellen weiter mit Nährmedium kultiviert. 5 Tage später erfolgte die Durchführung des BrdU-Tests nach Herstellerangaben mittels des Roche Kits (Cell Proliferation ELISA, BrdU). Die hMSCs, die durchgehend nur mit dem Nährmedium kultiviert wurden, dienten als Kontrolle. Die photometrische Messung

erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die entstehende Farbintensität korrelierte mit der Anzahl proliferierender Zellen.

2.18.5 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Auf einer BioGide[®]-Membran (10 mm x 10 mm) wurden 1×10^4 hMSCs ausgesät. Nach 7-tägiger Kultivierung erfolgte die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung. Die Zellen wurden mit 3% Glutaraldehyd in PBS (pH 7,4) für 24 Stunden bei 4°C fixiert. Nach der Entfernung des Glutaraldehyds wurde das Biomaterial, auf dem sich die Zellen befanden, jeweils 5 Minuten mit 50%, 60%, 70%, 80%, 90% und 100% Ethanol bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte das so genannte *critical point drying* am K850 Critical Point Dryer (Emitech, USA). Das anschließende Sputtern mit Gold wurde am SCD 500 device (CAL-Tec, Ashford, UK) durchgeführt. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung und Dokumentation wurde mit dem Gerät XL 30CP (Philips Electro Optics, Kassel) bei 10 kV durchgeführt.

3. Ergebnisse

Im ersten Teil dieses Kapitels werden die Isolation der hMSCs aus KM und die anschließende Charakterisierung anhand von Oberflächenmarkern und des multipotenten Differenzierungsverhaltens zusammengefasst. Im zweiten Teil werden die *in vitro* Untersuchungen der Biokompatibilität von verschiedenen Scaffolds mit Hilfe der hMSCs beschrieben.

3.1 Isolierung und Charakterisierung der hMSCs

3.1.1 Isolierung und Expansion der hMSCs aus dem Knochenmark

Zur Gewinnung humaner mesenchymaler Stammzellen wurden Knochenmarkaspirate (Spender: n = 5; Alter: 9-67) verwendet. Die Konzentrationen der mononukleären Zellen (MNCs) in den Knochenmarkaspiraten wurden automatisch gezählt und streuten zwischen $1,7 \times 10^6$ und $12,5 \times 10^6$ Zellen / ml. Bei einer Zelldichte von $4,4 \times 10^4$ MNCs pro cm^2 wurden die Knochenmarkzellen mit 60 ml Nährmedium für hMSCs in einer 225cm^2 -Zellkulturflasche bei 37°C , 5% CO_2 kultiviert. Nach drei Tagen erfolgte der komplette Mediumwechsel und hMSCs wurden aufgrund ihrer Eigenschaft der Adhärenz dadurch selektiert. Nach ungefähr zwei Wochen fand sich lichtmikroskopisch ein konfluenter Zellrasen, bestehend aus spindelförmigen, Fibroblasten-ähnlichen Zellen. Die Zellen wurden durch Trypsin abgelöst und die Zahl der dadurch gewonnenen Zellen pro Kulturflasche schwankte zwischen 1×10^6 und 3×10^6 . Eine Übersicht über die Spenderdaten ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Die geernteten Zellen wurden als Passage P_0 bezeichnet und weiter bei einer Zelldichte von 30 Zellen pro cm^2 in einer 225cm^2 -Zellkulturflasche kultiviert. Die Adhärenz der Zellen fand am dritten Tag statt. Nach 12 bis 16 Tagen erreichten die Zellen 70% Konfluenz. Die Anzahl der Zellen pro Kulturflasche betrug ca. eine Million. Weiterhin wurden die Zellen durch durchflusszytometrische Analyse und multipotente Differenzierungsassays charakterisiert. In den folgenden Versuchen wurden die isolierten Zellen aus allen fünf Knochenmarkaspiraten mitgeführt.

Spender	Geschlecht	Alter in Jahren	MNCs / ml KM	Zahl der isolierten Zellen pro T225
1	♀	67	$1,7 \times 10^6$	2×10^6
2	♂	9	$4,5 \times 10^6$	3×10^6
3	♂	11	$12,5 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$
4	♂	48	3×10^6	1×10^6
5	♀	54	$4,4 \times 10^6$	1×10^6
Median	2 ♀ : 3 ♂	37,8	$5,22 \times 10^6$	$1,94 \times 10^6$

Tab. 4: Spenderdaten. Spenderdaten mit Geschlecht, Alter und Zahl mononukleärer Zellen / ml KM sowie Zahl der aus Knochenmark isolierten und kultivierten Zellen pro 225cm²-Kulturflasche. KM: Knochenmark; MNCs: mononukleäre Zellen; T225: 225cm²-Kulturflasche.

3.1.2 Immunfluoreszenzfärbung von hMSCs

Um die Morphologie der hMSCs zu untersuchen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die hMSCs wurden zunächst in einer Dichte von 2×10^3 Zellen pro cm² auf Glasträgern kultiviert. Nach zwei Tagen erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde beobachtet, dass das Zytoplasma grün angefärbt war und der Zellkern blau. Die Zellen zeigten einen spindelförmigen Phänotyp (Abb. 7). Durch die Immunfluoreszenzfärbung konnte bestätigt werden, dass das Aussehen der untersuchten Zellen der Morphologie der hMSCs entsprach.

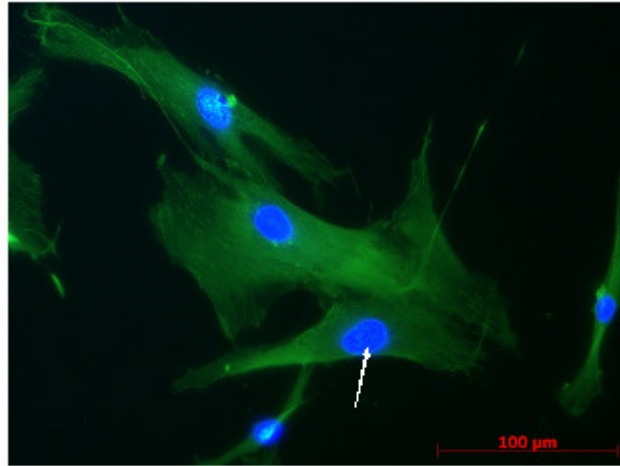


Abb.7: Immunfluoreszenzfärbung von hMSCs. Die Zellen wurden mit vinkulin-spezifischen Antikörpern für eine Nacht inkubiert und am zweiten Tag weiter mit Fluoreszenz-gekoppeltem Second-Antikörper für eine Stunde inkubiert. Parallel erfolgte die Zellkernfärbung mittels Hoechst-33342. Anschließend erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Dokumentation. Das Zytoskelett ist grün und der Zellkern blau (siehe weißer Pfeil) angefärbt.

3.1.3 CFU-F Assay

Zur Bestimmung der klonalen Expansionskapazität von hMSCs wurde ein CFU-F Assay durchgeführt. Es wurden 5 hMSCs pro cm^2 in einer 20cm^2 -Kulturschale ausgesät. Nach 12 Tagen wurden die Zellen mit 800 μl Kristall-Violett-Lösung (3g / l) angefärbt. Kolonien, die aus mindestens 50 Zellen bestanden, wurden mittels Lichtmikroskopie gezählt.

Abbildung 8 zeigt, dass in einer Kulturschale Kolonien gebildet wurden. Es konnte dadurch bewiesen werden, dass die isolierten Zellen die klonale Expansionskapazität besaßen.

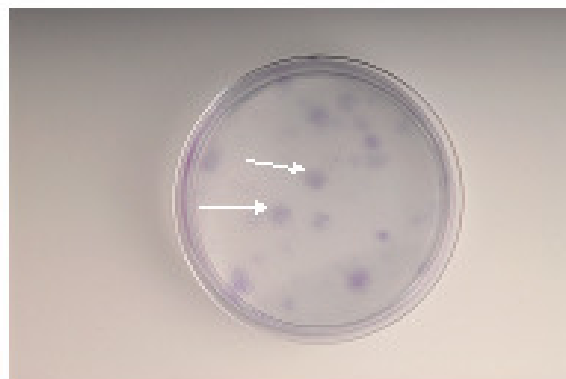


Abb. 8 (vorherige Seite): CFU-F Assay. Es wurden 100 hMSCs in einer 20cm²-Kulturschale ausgesät. Nach 12-tägiger Kultivierung im Nährmedium wurden die Zellen mit Kristall-Violett-Lösung angefärbt. Die violett gefärbten Areale (siehe weiße Pfeile) zeigen die Kolonien, die aus mindestens 50 Zellen bestanden.

3.1.4 Durchflusszytometrische Analyse

Um die Expression der Oberflächenmarker von den aus KM isolierten und kultivierten Zellen zu bestimmen, wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die untersuchten Zellen wurden zunächst mit Fluoreszenz markierten Antikörpern für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Hier dienten die entsprechenden Isotypen der Antikörper als Negativkontrollen.

Abbildung 9 zeigt, dass die Expression der Oberflächenproteine wie CD105, CD90, CD73 und CD29 bei den untersuchten Zellen positiv nachgewiesen werden konnte. Die Expression der anderen Oberflächenmarker wie CD45, CD19, CD14, CD34, 7-AAD und HLA-DR ließen sich bei den untersuchten Zellen nicht nachweisen.

Es konnte durch durchflusszytometrische Analyse bestätigt werden, dass die Expression der Oberflächenmarker der untersuchten Zellen mit dem Expressionskriterien für hMSCs übereinstimmte.

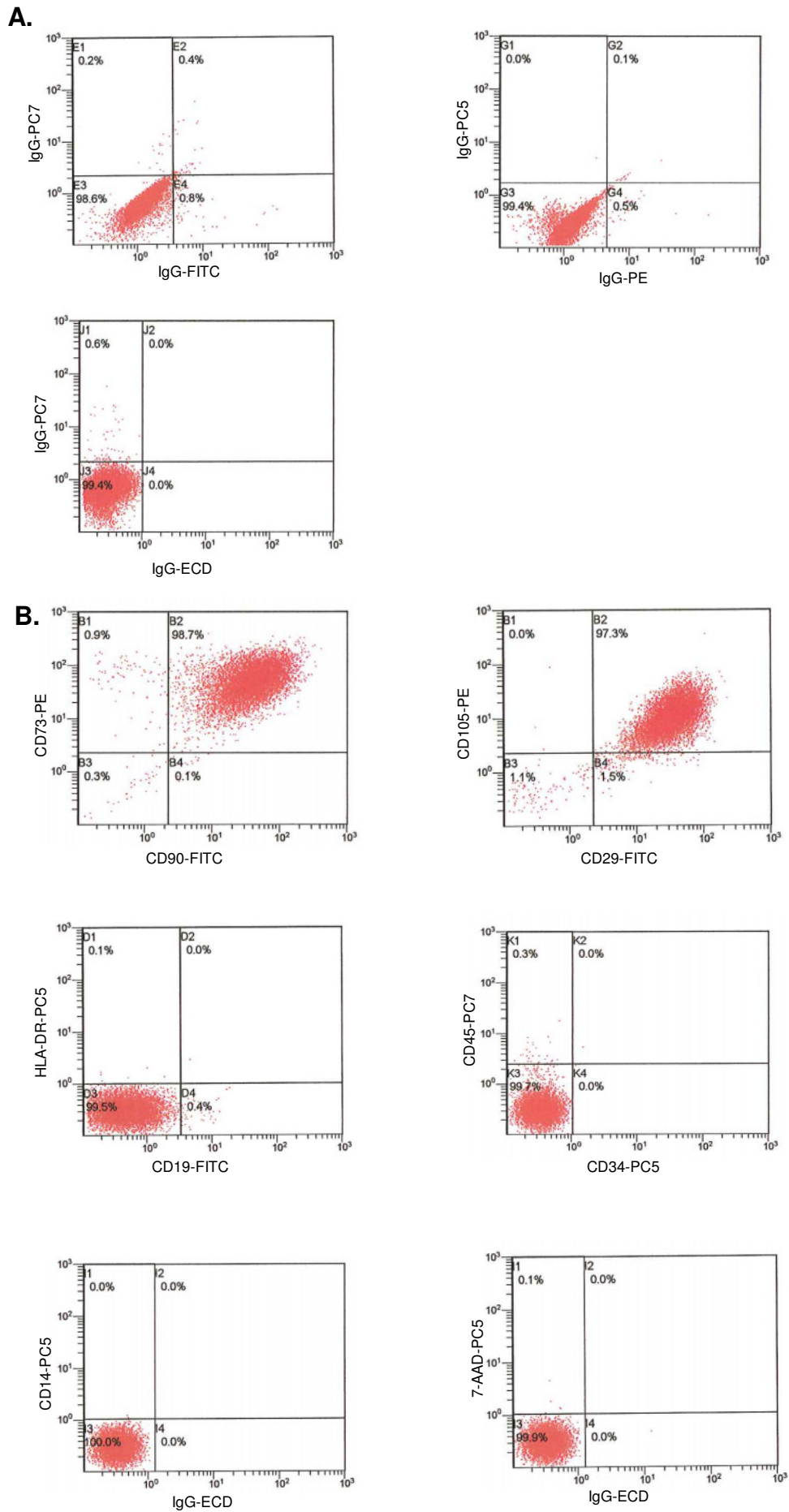


Abb. 9 (vorherige Seite): Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenproteine von isolierten Zellen aus Knochenmark. Die aus Knochenmark isolierten und kultivierten Zellen wurden zunächst mit verschiedenen Antikörpern, welche mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren, inkubiert. Hier dienten die entsprechenden Isotypen der Antikörper als Negativkontrollen. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Die Zahlen in den Diagrammen geben den Prozentsatz an entsprechenden Oberflächenmarker-positiven oder -negativen Zellen an. **A.** Durchflusszytometrische Analyse von entsprechenden Isotypen der Antikörper. **B.** Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker der untersuchten Zellen.

3.1.5 Osteogene Differenzierung

Nach 14-tägiger osteogener Stimulation erfolgte die Untersuchung zur Bestimmung der Aktivität der ALP in der Zellkultur. Die Mineralisierung der Matrix wurde nach 21-tägiger Induktion mittels von-Kossa-Methode und Alizarin Red S nachgewiesen. Hier dienten die nicht osteogenen induzierten Zellen als Kontrolle.

3.1.5.1 Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase

Zum Nachweis der Aktivität der ALP wurde eine Tablette 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat / Nitroblau-Tetrazoliumchlorid verwendet. Die dadurch entstehende Blaufärbung weist auf die Aktivität der ALP in der Zellkultur hin.

Abbildung 10 zeigt die lichtmikroskopischen Aufnahmen nach der Durchführung des ALP-Tests. Bei der osteogen stimulierten Zellkultur ließ sich eine Blaufärbung nachweisen (Abb. 10 B). Im Gegensatz dazu konnte bei der nicht osteogen induzierten Zellkultur keine Blaufärbung nachgewiesen werden (Abb. 10 A).

Hier konnte gezeigt werden, dass die im osteogenen Induktionsmedium kultivierten, untersuchten Zellen ALP-Aktivität besaßen. Im Vergleich dazu ließ sich kaum ALP-Aktivität bei den nicht osteogen induzierten Zellen nachweisen.

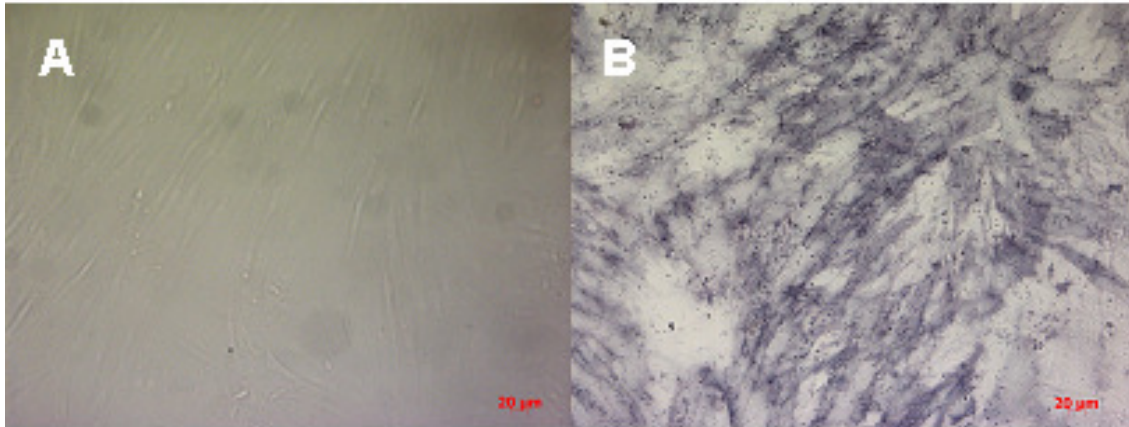


Abb. 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen zur Bestimmung der Aktivität der ALP von osteogen induzierten hMSCs. **A.** Die nicht induzierten Zellen (Kontrolle). **B.** Die osteogen induzierten Zellen. Nach 14-tägiger Kultivierung in osteogen induzierten Medium oder in Nährmedium wurden die Zellen zunächst mit 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit der ALP-Arbeitslösung inkubiert. Zum Schluss erfolgten lichtmikroskopische Aufnahmen. Die Aktivität der ALP in der Zellkultur konnte anhand der Blaufärbung nachgewiesen werden. Die nicht induzierten Zellen dienten hier als Kontrolle. ALP: alkalische Phosphatase.

3.1.5.2 Nachweis der Mineralisierung der Matrix mittels von-Kossa-Methode

Der Nachweis der mineralisierten Matrix erfolgte über die Färbung des gebildeten Kalziums. In Abbildung 11 ist repräsentativ die durch von-Kossa-Methode gefärbte Zellkultur im differenzierten und im undifferenzierten Zustand dargestellt. Die mineralisierte Matrix ließ sich anhand brauner Färbung des Kalziums identifizieren.

Wie in Abbildung 11B zu sehen ist, ließ sich eine braune Färbung bei der osteogen stimulierten Zellkultur erkennen (weiße Pfeile). Im Vergleich dazu konnte keine Braunfärbung bei der nicht stimulierten Zellkultur nachgewiesen werden.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass eine mineralisierte Matrix bei osteogen induzierten Zellen gebildet wurde.

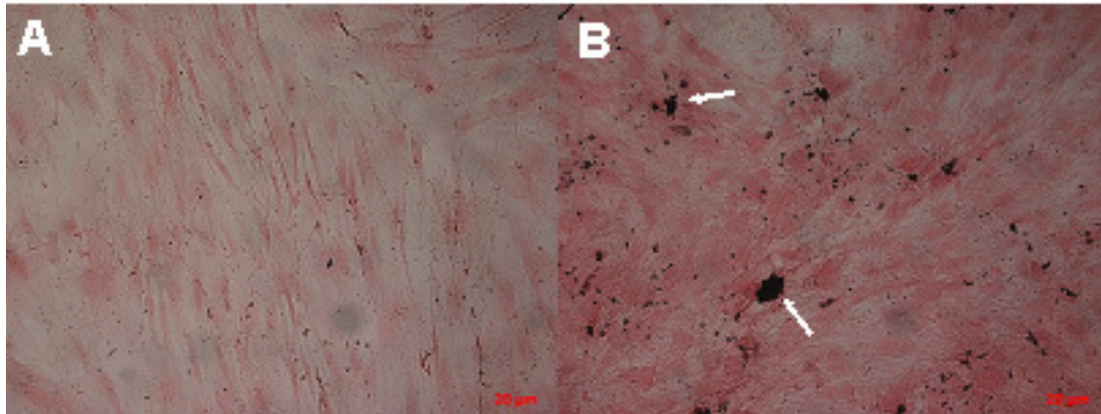


Abb. 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen zur Bestimmung der mineralisierten Matrix von osteogen induzierten hMSCs mit Hilfe der von-Kossa-Methode. A. Anfärbung der mineralisierten Matrix bei nicht induzierten Zellen (Kontrolle). **B.** Anfärbung der mineralisierten Matrix bei osteogen induzierten Zellen. Nach 21-tägiger Kultivierung in osteogen induziertem Medium oder in Nährmedium wurden die Zellen zunächst mit 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit Hilfe der von-Kossa-Methode untersucht. Zum Schluss erfolgten lichtmikroskopische Aufnahmen. Die Braunfärbung wies auf eine mineralisierte Matrix hin (weiße Pfeile). Die nicht induzierten Zellen dienten hier als Kontrolle.

3.1.5.3 Nachweis der Mineralisierung der Matrix mittels Alizarin Red S

Die Mineralisierung der Matrix kann neben der von-Kossa-Methode noch mittels Alizarin Red S nachgewiesen werden. Wie bei der von-Kossa-Methode wurden die Zellen mit osteogen induziertem Medium für drei Wochen kultiviert. Nicht induzierte Zellen dienten als Kontrolle. Danach wurden die Zellen mit Alizarin Red S angefärbt. Unter dem Lichtmikroskop sollte die durch Alizarin Red S gefärbte mineralisierte Matrix rot erscheinen. Abbildung 12 zeigt, dass bei der osteogen differenzierten Zellkultur eine deutliche Rotfärbung beobachtet wurde. Bei der dazugehörigen Kontrolle ließ sich keine Rotfärbung erkennen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Matrix der untersuchten Zellen im osteogen differenzierten Zustand kalzifiziert wurde.

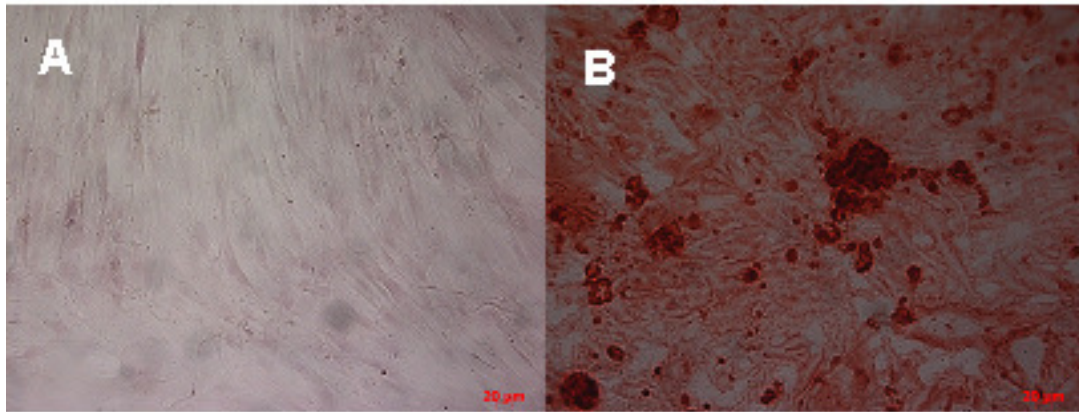


Abb. 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der mineralisierten Matrix von osteogen induzierten hMSCs mittels Alizarin Red S. A. Anfärbung der mineralisierten Matrix bei nicht induzierten Zellen (Kontrolle). **B.** Anfärbung der mineralisierten Matrix bei osteogen induzierten Zellen. Nach 21-tägiger Kultivierung in osteogen induziertem Medium oder in Nährmedium wurden die Zellen zunächst mit 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit Alizarin Red S angefärbt. Zum Schluss erfolgte die lichtmikroskopische Dokumentation. Die mineralisierte Matrix wurde rot gefärbt. Die nicht induzierten Zellen dienten hier als Kontrolle.

3.1.6 Adipogene Differenzierung

Nach 14-tägiger adipogener Stimulation wurden die Zellen mit Oil Red O inkubiert. Nicht induzierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Fetttropfchen in den Zellen ließen sich lichtmikroskopisch sichtbar rot anfärben.

Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, wurde die rote Farbe bei den stimulierten Zellen gefunden (Abb. 13 B). Es wurde jedoch keine Rotfärbung in der nicht stimulierten Zellkultur beobachtet (Abb. 13 A).

Da Fetttropfchen ein Merkmal von Adipozyten sind, konnte somit festgestellt werden, dass die untersuchten Zellen in die adipogene Richtung gelenkt werden konnten.

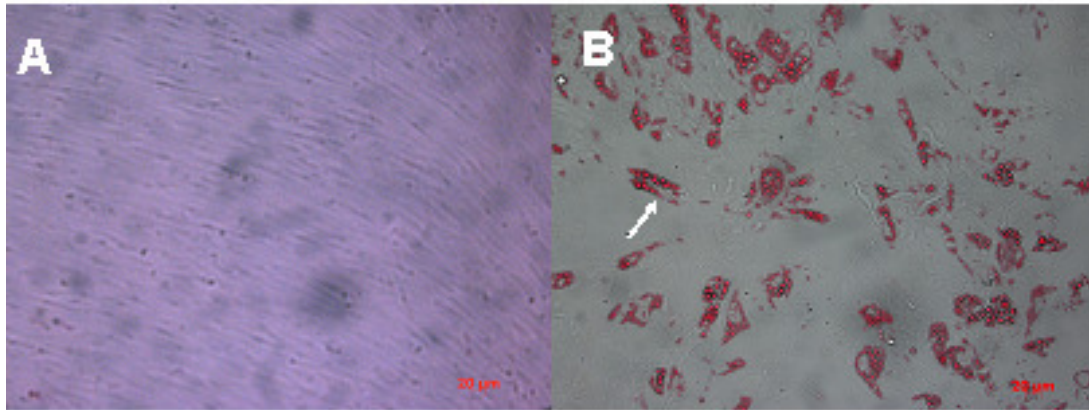


Abb. 13: Lichtmikroskopische Aufnahmen der angefärbten Fetttröpfchen in den adipogen induzierten hMSCs mittels Oil Red O. A. Anfärbung der Fetttröpfchen bei nicht induzierten Zellen (Kontrolle). B. Anfärbung der Fetttröpfchen bei adipogen induzierten Zellen. Nach 14-tägiger Kultivierung in adipogen induziertem Medium oder in Nährmedium wurden die Zellen zunächst mit 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit Oil Red O angefärbt. Anschließend erfolgten die lichtmikroskopischen Aufnahmen. Die Fetttröpfchen in den Zellen wurden rot gefärbt (siehe weißer Pfeil). Die nicht induzierten Zellen dienen als Kontrolle.

Zusammengefasst zeigten die isolierten und kultivierten Zellen aus KM eine spindelförmige Morphologie und wuchsen adhärent. Die Zellen exprimierten auf ihren Oberflächen CD105, CD73, CD90 und CD29. CD19, CD45, CD14, CD34, 7-AAD und HLA-DR waren nicht nachweisbar. Die isolierten Zellen ließen sich in osteogene und adipogene Richtung differenzieren.

3.2 Bestimmung des Wachstumsverhaltens von hMSCs auf verschiedenen Biomaterialien *in vitro*

3.2.1. CeraBall[®]-Scaffolds und hMSCs

Zur Bestimmung der *in vitro* Biokompatibilität von CeraBall[®]-Scaffolds wurden die in der Arbeit isolierten und charakterisierten hMSCs verwendet. Hierzu wurden Zellvitalitätsfärbung, MTT- und WST-Test und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

3.2.1.1 WST-Test

Die ermittelten Absorptionswerte wurden grafisch dargestellt (Abb. 14). Die Y-Achse gibt den Absorptionswert der gemessenen Zellen an und entspricht der Zahl der viablen Zellen. Die Anzahl der lebenden Zellen auf dem CeraBall[®]-Scaffold nach 2, 4 und 9 Tagen Kultivierung waren im Allgemeinen etwas niedriger als die jeweilige Kontrolle (Polystyrol). Es ließ sich erkennen, dass sich die Anzahl der lebenden Zellen im Laufe der Kultivierung erhöht.

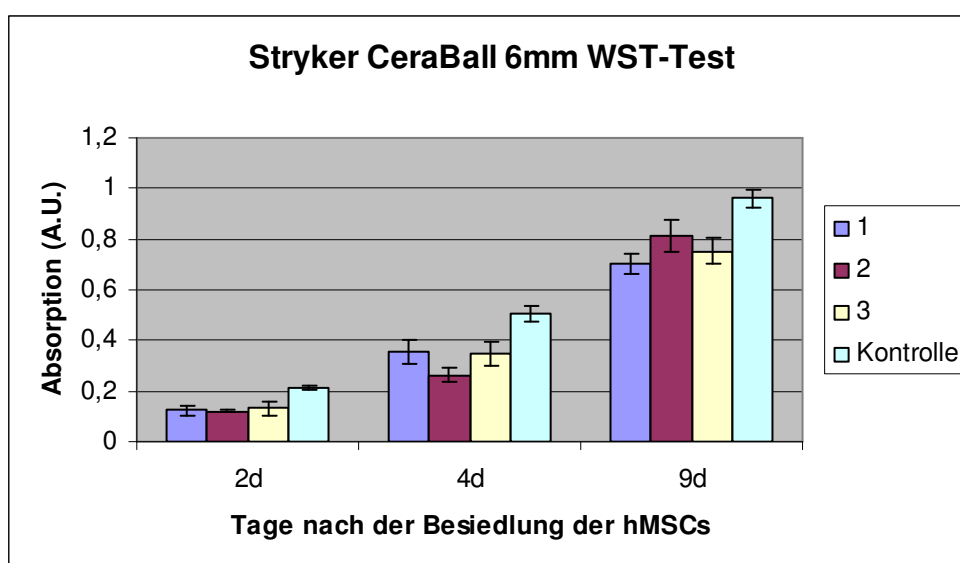


Abb. 14: WST-Test von hMSCs auf CeraBall[®]-Scaffolds für verschiedene Zeiträume. 1×10^4 Zellen wurden auf jedem CeraBall[®]-Scaffold ausgesät und weiter im Nährmedium für hMSCs kultiviert. Nach 2, 4 und 9 Tagen erfolgte die Durchführung des WST-Tests. Die Y-Achse gibt den gemessenen Absorptionswert an. Die verschiedenen farbigen Balken an jedem gemessenen Tag zeigen drei unabhängige Experimente. Das Polystyrol diente als Kontrolle. d: Tage.

3.2.1.2 MTT-Test

Mit Hilfe des MTT-Tests wurde die Proliferation der Zellen in Eluat aus CeraBall[®]-Scaffolds untersucht. HMSCs im Nährmedium dienten als Kontrolle. Die gemessenen Absorptionswerte wurden grafisch dargestellt (Abb. 15). Die Y-Achse gibt die Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle in Prozent an. Bei der Proliferationsrate der hMSCs, die mit einstündigem oder 24-stündigem Eluat aus CeraBall[®]-Scaffolds kultiviert wurden, gab es keinen großen

Unterschied und war auch ähnlich zur Kontrolle. Im Vergleich dazu war die Proliferationsrate der in 10-minütigem Eluat kultivierten hMSCs niedriger.

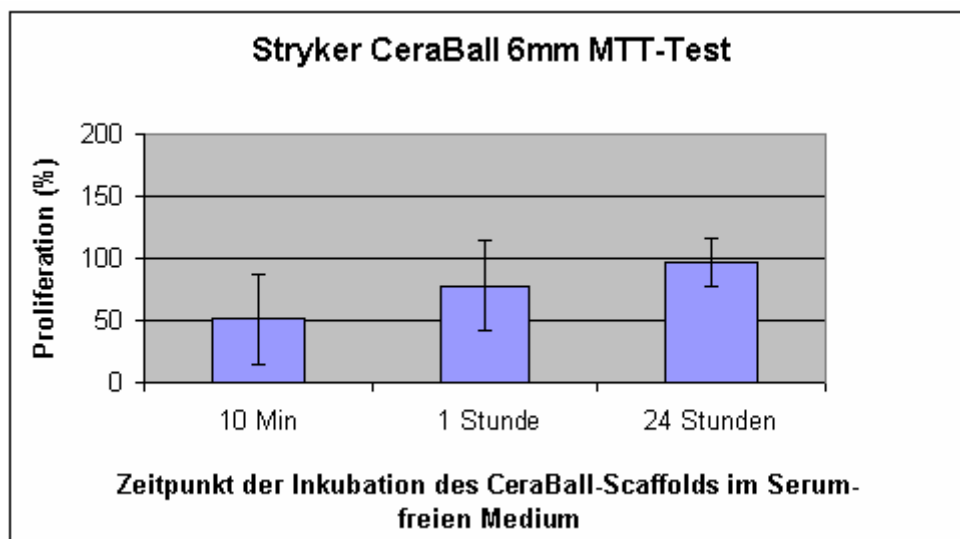


Abb. 15: MTT-Test von hMSCs nach Kultivierung mit Eluaten aus CeraBall®-Scaffolds. Jeweils 2500 hMSCs wurden mit 100 µl 10-minütigem, einstündigem und 24-stündigem Eluat aus CeraBall®-Scaffolds kultiviert. Nach einem Tag erfolgte die Durchführung des MTT-Tests. HMSCs im Nährmedium dienen als Kontrolle. Die Y-Achse gibt den relativen Prozentsatz des gemessenen Absorptionswerts im Vergleich zur Kontrolle an. Ein Balken zeigt jeweils den Mittelwert von 8 parallel durchgeführten Versuchen. Min: Minuten.

3.2.1.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Nach 2-, 4- und 9-tägiger Kultivierung von hMSCs auf CeraBall®-Scaffolds erfolgte die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung. Abbildung 16 A zeigt das reine Gerüst ohne Besiedlung der Zellen. Nach 2-tägiger Kultivierung konnten hMSCs auf der Oberfläche des Scaffolds beobachtet werden. Die Zellen zeigten eine flache, ausgebreitete Morphologie (Abb. 16 B). Am 4. Tag ließen sich mehr Zellen auf dem Scaffold entdecken. Und große Zell-Cluster waren entstanden (Abb. 16 C). Nach 9-tägiger Kultivierung wurde bereits eine große Anzahl von ausgebreiteten Zellen auf der Oberfläche der Scaffolds registriert. Die Überwucherung und das Eindringen der Zellen in die Poren wurde ebenfalls beobachtet (Abb. 16 D).

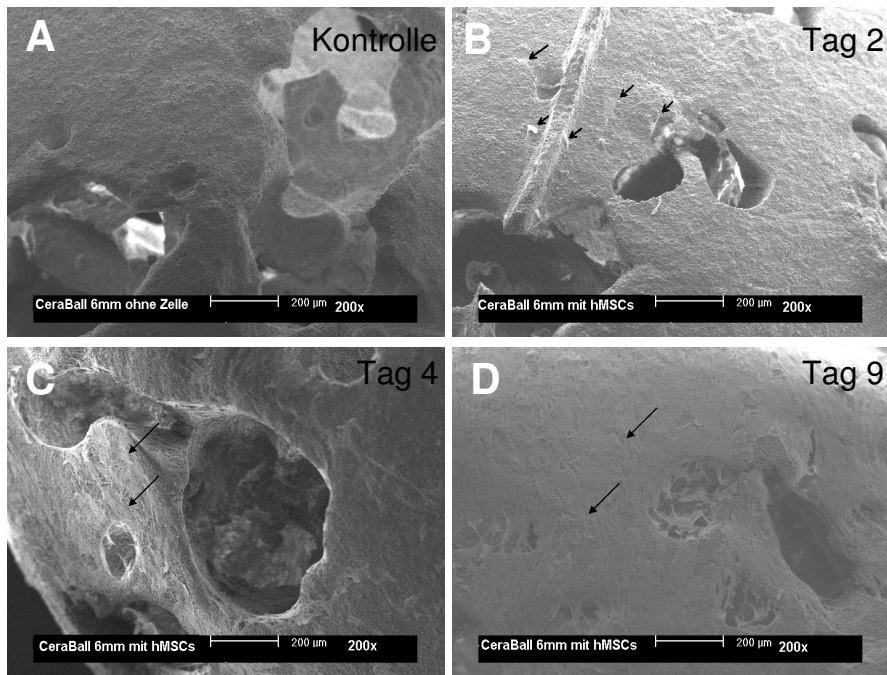


Abb. 16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Ceraball[®]-Scaffolds mit und ohne Besiedlung durch hMSCs. 1×10^4 hMSCs wurden auf das jeweilige Ceraball[®]-Scaffold ausgesät. Die Aufnahmen erfolgten nach 2 Tagen (B), 4 Tagen (C) und 9 Tagen (D). Die Abbildung (A) zeigt die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von einem Ceraball[®]-Scaffold ohne hMSCs (Kontrolle).

3.2.1.4 Bestimmung der Zellvitalität mittels FDA und PI

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden die in Eluat aus CeraBall[®]-Scaffolds kultivierten hMSCs mittels FDA und PI angefärbt. Die in Serum-freiem Medium kultivierten hMSCs dienten als Kontrolle.

Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, wurden die meisten Zellen nach der Kultivierung grün angefärbt. Es waren keine großen Unterschiede zwischen den Zellen im Eluat und den Zellen im Nährmedium nachzuweisen.

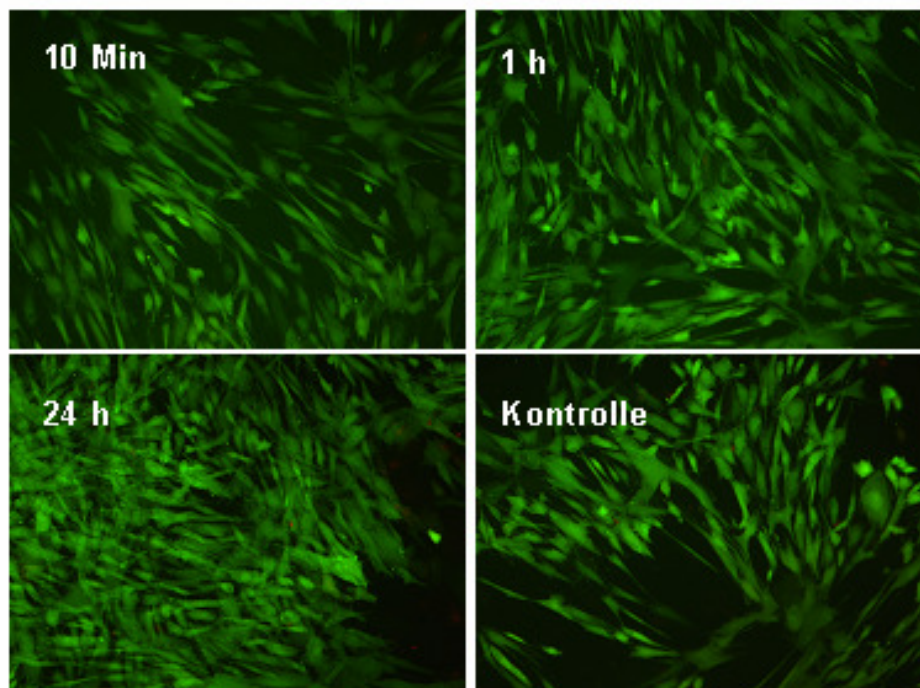


Abb. 17: Zellvitalitätsfärbung mittels FDA und PI. 1×10^4 hMSCs pro Well wurden in einem 8-Well-Oberjektträger mit 200 μ l 10-minütigem, einstündigem und 24-stündigem Eluat aus CeraBall[®]-Scaffolds kultiviert. Nach einem Tag erfolgte die Färbung mittels FDA und PI. Im Anschluss daran wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Die lebenden Zellen wurden durch FDA grün angefärbt. Die Fraktionen der toten Zellen wurden durch PI rot angefärbt. FDA: Fluorescein Diacetate; PI: Propidium Iodide; h: Stunde

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der MTT-, WST-Tests und Zellvitalitätsfärbung sowie der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass das CeraBall[®]-Scaffold *in vitro* die Proliferation der hMSCs genauso gut wie das Polystyrol unterstützen konnte. Die Zellen wuchsen auch nach 9 Tagen gut auf diesen Scaffolds. Mittels rasterelektronenmikroskopischer Untersuchung ließ sich erkennen, dass sich die hMSCs während des ganzen Zeitraums der Kultivierung auf der Oberfläche des CeraBall[®]-Scaffolds gut verbreiteten.

3.2.2 Bestimmung des Wachstumsverhaltens von hMSCs auf BioGide®-Membranen

3.2.2.1 LDH-Test

Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, war die Zytotoxizität des 10-minütigen Eluats am höchsten. Das 24-stündige Eluat zeigte die niedrigste Zytotoxizität für hMSCs. Es ließ sich erkennen, dass die Zytotoxizität des Eluats mit längerer Eintauchzeit abnimmt.

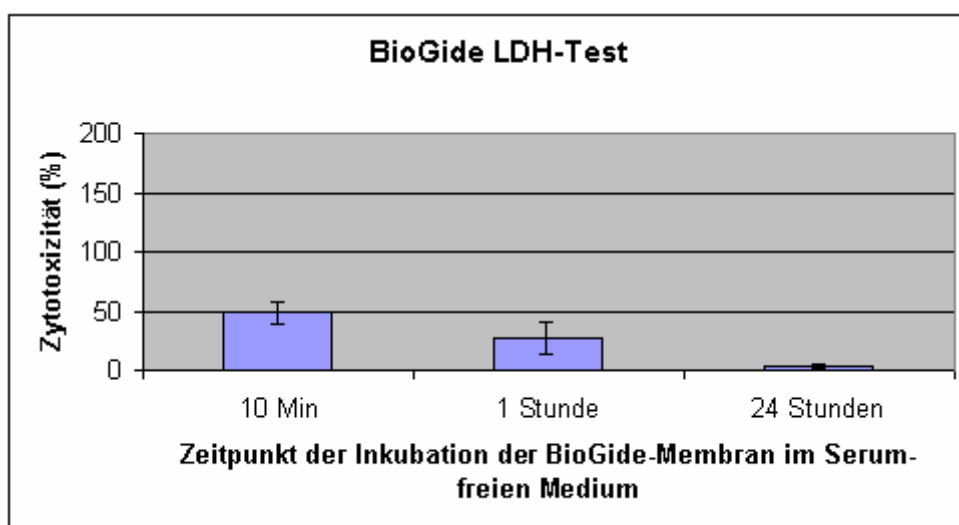


Abb. 18: LDH-Test von hMSCs nach Kultivierung mit Eluaten der BioGide®-Membranen. Jeweils 5000 hMSCs wurden mit 100 µl 10-minütigem, einstündigem und 24-stündigem Eluat der BioGide®-Membran (10 mm x 10 mm) kultiviert. Mit 1% Triton X-100 (im Serum-freien Medium) behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle; mit Nährmedium kultivierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Y-Achse gibt die relative Zytotoxizität im Verhältnis zur Positiv- und Negativkontrolle an. Ein Balken zeigt den Mittelwert von 8 parallel durchgeführten Versuchen. Min: Minuten.

3.2.2.2 MTT-Test

Mit Hilfe des MTT-Tests wurde die Proliferation der Zellen in Eluaten der BioGide®-Membran untersucht. Die im Serum-freien Medium kultivierten hMSCs dienten als Kontrolle. Die Y-Achse in Abbildung 19 zeigt die relative Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle in Prozent an. Die relative Proliferationsrate vom 24-stündigen Eluat war am höchsten und lag bei 120%. Es konnte auch gezeigt werden, dass die relative Proliferationsrate des 10-minütigen Eluats bei 56% lag und am niedrigsten war.

Hier konnte gezeigt werden, dass das Eluat mit zunehmender Eintauchzeit die Proliferation von hMSCs besser unterstützen konnte.

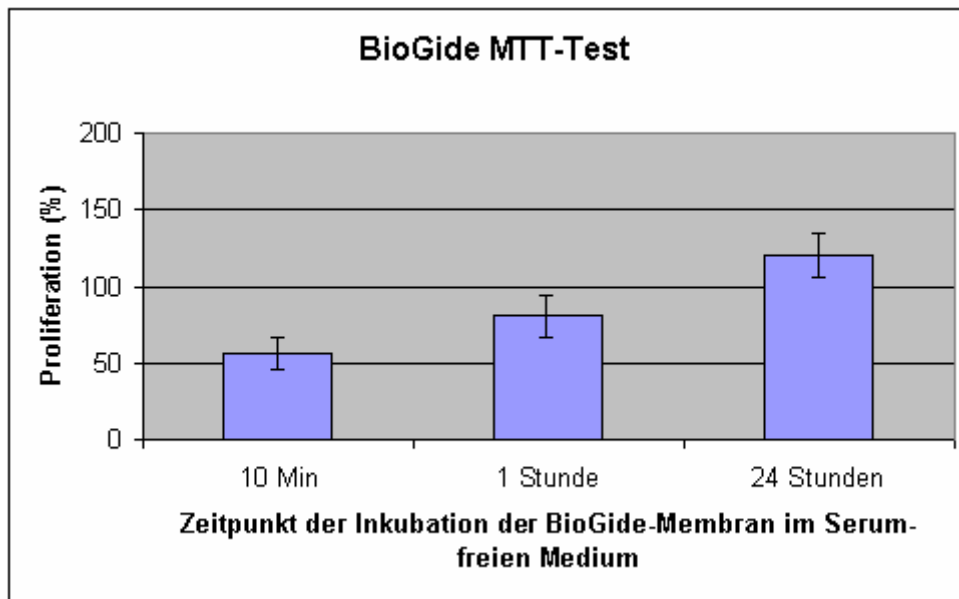


Abb. 19: MTT-Test von hMSCs nach Kultivierung mit Eluaten der BioGide[®]-Membranen. 2500 hMSCs wurden mit 100 µl 10-minütigem, einstündigem und 24-stündigem Eluat der BioGide[®]-Membran (10 mm x 10 mm) kultiviert. Nach einem Tag erfolgte die Durchführung des MTT-Tests. HMSCs in Nährmedium dienten als Kontrolle. Die Y-Achse gibt die relative Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle in Prozent an. Die Balken zeigen den Mittelwert von 8 parallel durchgeführten Versuchen. Min: Minuten.

3.2.2.3 WST-Test

Die Proliferation der Zellen auf der BioGide[®]-Membran lässt sich mittels WST-Test bestimmen. Die auf dem Deckglas (Durchmesser: 10mm) kultivierten hMSCs dienten als Kontrolle.

Die ermittelten Absorptionswerte wurden grafisch dargestellt (Abb. 20). Die Y-Achse gibt den Absorptionwert der gemessenen Zellen an und entspricht der Zahl der viablen Zellen. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, war die Zahl der lebenden hMSCs auf der BioGide[®]-Membran höher als die Zahl der Zellen auf dem Deckglas.

Durch das Ergebnis des WST-Tests ließ sich feststellen, dass die BioGide[®]-Membran die Proliferation der hMSCs besser unterstützen konnte als das Deckglas.

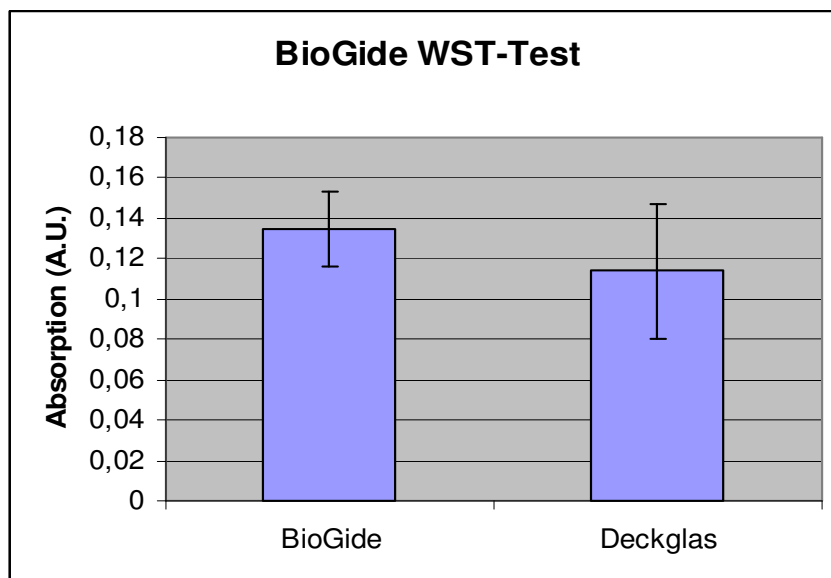


Abb. 20: WST-Test von hMSCs auf der BioGide®-Membran. 5000 hMSCs wurden auf jeder BioGide®-Membran (10 mm x 10 mm) ausgesät und weiter im Nährmedium für hMSCs kultiviert. Nach 4 Tagen erfolgte die Durchführung des WST-Tests. Die Y-Achse gibt den gemessenen Absorptionswert an. Das Deckglas (Durchmesser: 10mm) diente als Kontrolle. Die Balken zeigen den Mittelwert von 8 parallel durchgeführten Versuchen.

3.2.2.4 BrdU-Test

Das Ziel des hier durchgeführten BrdU-Tests ist, zu bestimmen, wie gut sich die Zellen nach Kultivierung mit Eluat erholen können. Nach eintägiger Kultivierung mit Eluat wurden die hMSCs weiter mit normalem Nährmedium kultiviert. Nach 5 Tagen erfolgte die Durchführung des BrdU-Tests. Die hMSCs, die durchgehend nur mit dem Nährmedium kultiviert wurden, dienten als Kontrolle.

Die gemessenen Absorptionswerte wurden grafisch in Abbildung 21 dargestellt. Die Y-Achse gibt den relativen Prozentsatz von synthetisierter DNA im Vergleich zur Kontrolle an und wird deshalb als Proliferation von Zellen (in %) dargestellt. Es ließ sich erkennen, dass alle Zellen, bevor sie in Eluat aus verschiedenem Zeitpunkt kultiviert wurden, eine relativ gute Proliferation im Vergleich zur Kontrolle besaßen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die vorher im 24-stündigen Eluat kultivierten hMSCs die höchste Proliferationsrate aufwiesen.

Es konnte festgestellt werden, dass die hMSCs nach der Inkubation mit Eluat der BioGide®-Membran gut wachsen konnten.

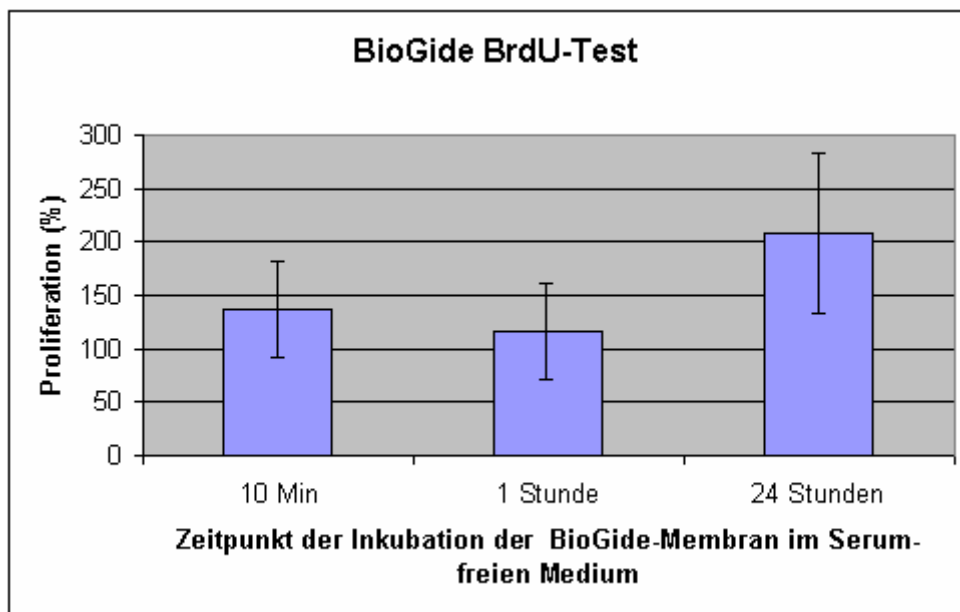


Abb. 21: BrdU-Test von hMSCs. Zunächst wurden 2500 hMSCs pro Well in einer 96-Well-Platte mit jeweils 100 μ l 10-minütigem, einstündigem und 24-stündigem Eluat aus der BioGide[®]-Membran (10 mm x 10 mm) kultiviert. Nach einem Tag wurden die Eluate durch Nährmedium ersetzt und die Zellen wurden weiter kultiviert. Nach 5 Tagen erfolgte der BrdU-Test. Die hMSCs, die durchgehend nur mit dem Nährmedium kultiviert wurden, dienten als Kontrolle. Die Y-Achse gibt die relative Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle in Prozent an. Die Balken zeigen den Mittelwert von 8 parallel durchgeführten Versuchen. Min: Minuten.

3.2.2.5 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Auf einer BioGide[®]-Membran (10 mm x 10 mm) wurden 1×10^4 hMSCs ausgesät. Nach 7-tägiger Kultivierung erfolgte die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung. Die Abbildung 22 A und B zeigen die reine Membran ohne Besiedlung von Zellen bei einer Vergrößerung von 1000- und 2000-fach, und Abbildung 22 C und D zeigen die mit hMSCs besiedelte Membran bei einer Vergrößerung von 1000- und 2000-fach. Wie in Abbildung 22 C und D zu sehen ist, verbreiteten sich die hMSCs nach 7-tägiger Kultivierung flächig auf der Oberfläche der Membran. Es ließen sich eine große Anzahl Zellen (siehe weiße Pfeile) auf der Oberfläche der Membran erkennen.

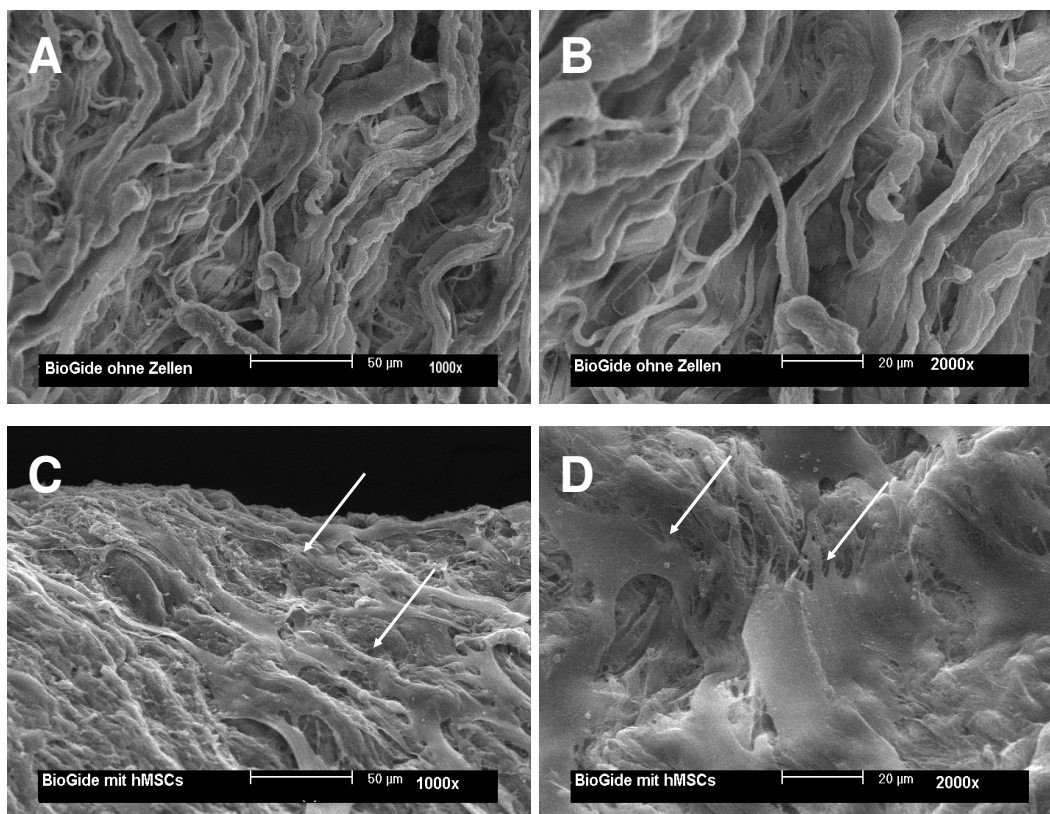


Abb. 22: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von BioGide®-Membranen mit und ohne Besiedlung von hMSCs. 1×10^4 hMSCs wurden auf die jeweilige BioGide®-Membran (10 mm x 10 mm) ausgesät. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten nach 7-tägiger Kultivierung. **A.** BioGide®-Membran ohne Zell-Besiedlung unter dem Rasterelektronenmikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung. **B.** BioGide®-Membran ohne Zell-Besiedlung unter dem Rasterelektronenmikroskop bei einer 2000-fachen Vergrößerung. **C.** BioGide®-Membran mit hMSCs-Besiedlung unter dem Rasterelektronenmikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung. **D.** BioGide®-Membran mit hMSCs-Besiedlung unter dem Rasterelektronenmikroskop bei einer 2000-fachen Vergrößerung.

Zusammengefasst konnte festgestellt werden, dass die BioGide®-Membran kaum zytotoxisch für die hMSCs war und die Proliferation dieser Zellen *in vitro* unterstützen konnte. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass sich die hMSCs gut auf der Oberfläche der BioGide®-Membran verbreiteten. Es konnte auch durch LDH- und MTT-Test nachgewiesen werden, dass die Eintauchzeit der Membran im Serum-freien Medium das Wachstum der hMSCs beeinflussen konnte. Je länger die Eintauchzeit war, desto niedrigere Zytotoxizität zeigte das Eluat und desto besser konnte das Eluat die Proliferation der Zellen unterstützen. Der WST-Test zeigte, dass die hMSCs auf der Membran besser wachsen konnten als auf dem Deckglas.

4. Diskussion

Das innovative Gebiet des Tissue Engineerings bietet ein großes therapeutisches Potenzial für die Regeneration des Skeletts bei großen, segmentalen Knochendefekten. Aufgrund ihrer relativ leichten Verfügbarkeit und ihrer Selbstreplikation sowie ihres multipotenten Differenzierungspotenzials sind humane mesenchymale Stammzellen ein guter Kandidat für die regenerative Medizin.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die hMSCs aus Knochenmarkaspiraten der Spender isoliert und *in vitro* expandiert. Anschließend wurden die gewonnenen Zellen hinsichtlich der Expression von Oberflächenproteinen und des multipotenten Differenzierungspotenzials charakterisiert. Im zweiten Teil der Arbeit wurden dreidimensionale Biomaterialien wie CeraBall[®]-Scaffolds und BioGide[®]-Membranen auf ihre Biokompatibilität für hMSCs *in vitro* überprüft.

4.1 Isolierung und Charakterisierung der hMSCs

4.1.1 Isolierung und *in vitro* Expansion der hMSCs

In dieser Arbeit standen Aspirate von Knochenmark (KM) von 5 Spendern zur Verfügung, um hMSCs zu gewinnen. Standardmäßig werden hMSCs, wie durch vielen Studien bestätigt, mittels Ficoll-Dichtegradienten aus dem Knochenmark isoliert. Eine wichtige Einschränkung des Ficoll-Isolationsverfahrens für die klinische Anwendung ist, dass es sehr zeitaufwendig und stark vom Anwender abhängig ist (Hermann et al., 2008). Eine andere Isolationsmethode, bei der Knochenmarkaspirate verwendet werden, ist die magnetische Zellsortierung (*Magnetic-Activated Cell Sorting*, MACS) (Taira et al. 2008). Diese Methode ist ebenfalls sehr zeitaufwendig. Für die klinische Anwendung sollte eine Isolationsmethode etabliert werden, die einfacher und schneller ist. In der vorliegenden Arbeit wurden die hMSCs nach Bartmann et al. 2007 aus Knochenmark isoliert und weiter kultiviert. Laut Untersuchung dieser Gruppe wurde α -MEM mit 10% FCS für die Kultivierung der Zellen verwendet, weil es im Vergleich zu anderen Medien mit FCS das Wachstum der hMSCs am besten unterstützt. Die Isolation der hMSCs aus den Knochenmarkaspiraten sowie ihre Expansion *in vitro* gelang bei allen fünf Spendern. Die Konzentration der mononukleären Zellen (MNCs) im Knochenmark betrug durchschnittlich $5,22 \times 10^6$ Zellen / ml. Je 1×10^7 MNCs wurden in

einer 225cm²-Kulturflasche ausgesät. Nach 3-tägiger Kultivierung erfolgte ein kompletter Mediumwechsel. Aufgrund fehlender Adhärenz an die Plastikoberfläche konnten die hämatopoetischen Zellen im KM dadurch von den adhärent gewachsenen Zellen getrennt werden. Unter dem Lichtmikroskop sahen die adhären Zellen spindelförmig aus. Nach ca. 14 Tagen lag die Konfluenz der Zellen bei 70%. Die Zahl der durch Trypsinierung gewonnenen Zellen betrug zwischen einer und drei Millionen. Weiterhin wurden die gewonnenen Zellen in einer Dichte von 30 Zellen / cm² in einer 225cm²-Flasche kultiviert und zwei Wochen später konnten ca. eine Million Zellen gewonnen werden. Im Vergleich zum Dichtegradienten und zur MACS-Methode ist die hier angewandte Isolierungsmethode einfacher. Mittels dieses Verfahrens war es möglich, aus einer geringeren Menge an Knochenmark (durchschnittlich 2 ml) in ca. zwei Wochen eine große Menge an hMSCs zu bekommen. Es konnte auch gezeigt werden, dass durch eine niedrigere Aussaatdichte (30 Zellen / cm²) tatsächlich eine wesentlich höhere Proliferationsrate erreicht werden konnte.

4.1.2 Charakterisierung der hMSCs

Eine weitere Frage war, ob es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um mesenchymale Stammzellen handelt. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte eine Spindelform der isolierten Zellen, welches mit der Morphologie von hMSCs übereinstimmte (Dominici et al. 2006). Der CFU-F Assay wies auf Adhäsionseigenschaften und das Potenzial zur klonalen Expansion der untersuchten Zellen hin.

Da bisher kein einziger für hMSCs spezifischer Marker ermittelt werden konnte, ist die Bestimmung des Co-Expressionsmusters der Oberflächenproteine für die Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen erforderlich (Dominici et al. 2006). Hier wurde die Expression der Oberflächenproteine bei den isolierten Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Mit Hilfe der verschiedenen Antikörper konnte festgestellt werden, dass mehr als 95 % der untersuchten Zellen die Oberflächenmarker von hMSCs wie beispielsweise CD105, CD90, CD73 und CD29 auf ihren Oberflächen exprimierten. Es konnte auch gezeigt werden, dass spezifische Marker für hämatopoetische Zellen wie CD45, CD34, CD14, CD19 und 7-AAD sowie das an der Immunantwort beteiligte Protein HLA-DR bei den untersuchten Zellen nicht nachweisbar waren.

Für die Charakterisierung der hMSCs reicht die Bestimmung der Oberflächenmarker allein nicht aus. Es ist eine zusätzliche Charakterisierung über das multipotente

Differenzierungsverhalten erforderlich (Dominici et al. 2006). Mesenchymale Zellen sind in der Lage, in die adipogene, osteogene oder chondrogene Richtung zu differenzieren (Pittenger et al. 1999). In dieser Arbeit wurde die Induktion der osteogenen und der adipogenen Differenzierung bei den isolierten Zellen durchgeführt, um das Differenzierungspotenzial der Zellen zu erfassen.

Für die ostogene Differenzierung wurden die Zellen mit Induktionsfaktoren wie Dexamethason, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat und β -Glycerophosphat stimuliert. Anhand der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) und der Mineralisierung der Matrix wurde eine erfolgreiche osteogene Differenzierung nachgewiesen. Die Aktivität der ALP ist ein frühes Merkmal der Osteogenese (Knieb et al. 2006). Der Anstieg der Aktivität der ALP konnte bei allen fünf aus Spender-Knochenmark isolierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, die nicht induziert war, auf Proteinebene nachgewiesen werden. Ein späteres Merkmal der Osteogenese ist die Mineralisierung der Matrix (Knieb et al. 2006). Mit Hilfe der von-Kossa-Methode wurde die mineralisierte Matrix braun angefärbt. Es konnte nachgewiesen werden, dass nur die osteogen induzierte Zellkultur die typische Braunfärbung zeigte. Die ausschließlich mit Nährmedium behandelten Zellen wurden nicht braun angefärbt. Neben der von-Kossa-Methode konnte die Mineralisierung der Matrix durch Alizarin Red S Färbung nachgewiesen werden, wobei die mineralisierte Matrix rot angefärbt wurde. Das Ergebnis der Färbung mittels Alizarin Red S stimmte mit dem Ergebnis der von-Kossa-Methode überein.

Bei der adipozytären Induktion wurden die isolierten Zellen mit Faktoren wie Insulin, Dexamethason, Indomethacin und 1-Methyl-3-Isobutylxanthin stimuliert. Es konnte ein adipogenes Differenzierungspotenzial bei den isolierten Zellen nachgewiesen werden. Die durch Induktion entstehenden Lipidtröpfchen in den Zellen wurden mit Oil Red O rot angefärbt, was auf eine erfolgreiche adipogene Differenzierung hinwies.

Zusammengefasst wuchsen die aus allen fünf Knochenmarkspiraten isolierten Zellen adhärent und zeigten eine spindelförmige Morphologie. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass das Co-Expressionsmuster der Oberflächenproteine der isolierten Zellen mit den Kriterien für hMSCs übereinstimmte. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass die isolierten Zellen ein multipotentes Differenzierungspotential besaßen. Es lässt sich daraus schlussfolgern, dass die in der vorliegenden Arbeit aus Knochenmark gewonnenen Zellen die Charakteristika humaner mesenchymaler Stammzellen erfüllen (Dominici et al. 2006).

Für die klinische Anwendung der *in vitro* expandierten humanen Stammzellen ist es erforderlich, auf den Einsatz tierischer Wachstumsfaktoren zu verzichten. Bei der Anwendung von Kälberserum (FCS) besteht die Gefahr der Übertragung von Infektionserregern des

Rindes. Der Kontakt mit dem Tiereweiß kann außerdem allergische Reaktion auslösen (Selvaggi et al. 1997; Mackensen et al. 2000; Horwitz et al. 2002; Tuschong et al. 2002; Muul et al. 2003; Gregory et al. 2006). Deshalb wird aktiv nach Alternativen gesucht. Schallmoser et al. ersetzten daher das Kälberserum durch humanes Blutplättchen Lysat (*human platelet lysate*, HPL). HPL beinhaltet Wachstumsfaktoren wie z.B. *platelet-derived growth factors* (PDGF), *transforming growth factor- β* (TGF- β), *epidermal growth factor* (EGF) und *basic fibroblast growth factor* (bFGF), die Mitogene für hMSCs sind (Marx, et al. 1998; Gruber et al. 2002; Gruber et al. 2003; Graziani et al. 2006; Soffer et al. 2004; Dallari et al. 2006; Lucarelli et al. 2003; Kilian et al. 2004; Doucet et al. 2005). Durch die Kultivierung der hMSCs sowohl in HPL-haltigem Medium als auch in FCS-haltigem Medium wurde nachgewiesen, dass das HPL die Proliferation der hMSCs besser als der FCS förderte (Schallmoser et al. 2007). Es ließ sich kein Unterschied für den Immunphänotyp und das Differenzierungspotenzial zwischen den Zellen in den beiden Medien nachweisen (Schallmoser et al. 2007). Die Verwendung von HPL für die Kultivierung von hMSCs macht einen Ersatz in der klinischen Praxis möglich.

4.2 Biokompatibilität der verschiedenen Biomaterialien für hMSCs

Die Regeneration eines großen Knochendefekts ist auch heute noch eine klinische Herausforderung. Die Standardtherapie solcher Defekte ist die autologe Knochentransplantation, welche einen zweiten operativen Eingriff bedeutet. Tissue Engineering bietet eine Alternative im Rahmen der Knochenregeneration. Aufgrund ihrer Eigenschaften eignen sich hMSCs als zelluläre Ressource für das Tissue Engineering. Als Zellträger dienen verschiedene Biomaterialien, die die Zelladhäsion und Proliferation sowie Zelldifferenzierung unterstützen können. Bevor solche Materialien *in vivo* verwendet werden können, muss zuerst ihre Biokompatibilität *in vitro* bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Materialien, CeraBall[®]-Scaffolds und BioGide[®]-Membranen, auf ihre *in vitro* Biokompatibilität für hMSCs überprüft.

4.2.1 Biokompatibilität von CeraBall®-Scaffolds

Beim CeraBall®-Scaffold handelt es sich um ein synthetisiertes kugelförmiges Knochenersatz-Material aus einer Mischung von 5% Hydroxylapatit (HA) und 95% β -Trikalziumphosphat (TCP). HA ist ein hydroxyliertes Kalziumphosphatsalz. Es bildet den Hauptbestandteil der anorganischen Substanz in Knochen. β -TCP ist eine synthetische, organische Verbindung. HA und β -TCP werden häufig im Bereich der Knochenregeneration verwendet (Tay et al. 1999; Ducheyne et al. 1999; Livingston et al. 2002). Ihre Biokompatibilität ist auf ihre chemische und strukturelle Ähnlichkeit mit dem nativen Knochen zurückzuführen (Rizzi et al. 2001).

Hier wurde die Biokompatibilität des CeraBall®-Scaffolds *in vitro* unter Anwendung der hMSCs untersucht. Mittels WST- und MTT-Test konnte festgestellt werden, dass sowohl das Scaffold selbst als auch sein Eluat die Proliferation der hMSCs unterstützen konnte. Es ließ sich ebenfalls erkennen, dass die Zellen nach längerer Kulturzeit (9 Tage) auch gut auf dem Scaffold wachsen konnten. Die Färbung mittels FDA und PI wies auf die Vitalität der im Eluat kultivierten Zellen hin. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine ausgebreitete Morphologie der Zellen und Zell-Cluster waren ebenfalls zu identifizieren. Ein Eindringen der Zellen in die Poren des Scaffolds ließ sich ebenfalls beobachten. Es konnte dadurch gezeigt werden, dass das CeraBall®-Scaffold die Proliferation der hMSCs unterstützt. Die Porengröße des Scaffolds spielt ebenfalls eine Rolle bei der Unterstützung der Zellproliferation (Boden et al. 1999; Ripamonti et al. 2001; Warnke et al. 2009). Die Poren des CeraBall®-Scaffolds sind mehr als 100 μm , was die Proliferation von hMSCs fördern kann. Dieses Scaffold könnte daher ein hoffnungsvoller Kandidat als Biomaterial für die Knochenregeneration sein.

4.2.2 Biokompatibilität von BioGide®-Membranen

Die BioGide®-Membran setzt sich aus Kollagen I und III (porciner Ursprung) zusammen. Diese native Kollagenmembran kann als Barriere in der gesteuerten Knochenregeneration (*guided bone regeneration*, GBR) dienen. Der Mechanismus der GBR beruht auf der Verhinderung des apikalen Wachstums vom Epithel innerhalb des Knochendefekts und der Schaffung eines abgeschiedenen Raums, in dem die regenerativen Zellen kolonisieren können

(Dahlin et al. 1988; Karring et al. 1993). Das Biomaterial, das als Barriere bei der GBR wirkt, sollte zuerst auf seine Biokompatibilität überprüft werden (Gottlow et al. 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Biokompatibilität der BioGide[®]-Membran *in vitro* unter Anwendung der hMSCs untersucht. Hinsichtlich des LDH- und MTT-Tests konnte festgelegt werden, dass die BioGide[®]-Membran kaum Zytotoxizität besaß. Die Proliferation der hMSCs auf der Membran ließ sich mittels WST-Test bestimmen. Nach 4-tägiger Kultivierung auf der Membran wuchsen die hMSCs besser als die Kontrollzellen auf einem Deckglas. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine große Anzahl von Zellen auf der Membran und die Zellen verteilten sich flächig. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die BioGide[®]-Membran eine gute *in vitro* Biokompatibilität für hMSCs aufweist.

Die native Kollagenstruktur der Membran ist dem humanen Kollagen sehr ähnlich. Diese Tatsache könnte erklären, warum hMSCs auf einer BioGide[®]-Membran so gut wachsen. Wegen seiner phylogenetisch konservierten Primärsequenz und seiner helikalen Struktur ist Kollagen weniger immunreaktiv (De Lusto et al., 1987). Außerdem wird die Kollagenmembran durch die Kollagenase der infiltrierenden Makrophagen enzymatisch resorbiert (Tatakis et al., 1999). Zusammengefasst ist es möglich, dass BioGide[®]-Membranen weiter im Rahmen der GBR unter Anwendung der hMSCs *in vivo* untersucht werden können. Zusammengefasst konnte festgestellt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit isolierten und kultivierten Zellen aus KM den Kriterien für hMSCs entsprachen. Durch die Standard-Biokompatibilitätstests konnte geschlussfolgert werden, dass BioGide[®]-Membranen und CeraBall[®]-Scaffolds die Proliferation von hMSCs *in vitro* unterstützen konnten.

5. Zusammenfassung

Für die Behandlung von Knochendefekten bietet das Arbeitsgebiet des Tissue Engineerings eine hoffnungsvolle Strategie im Rahmen der Knochenregeneration. Aufgrund ihrer Selbstreplikation und ihres multipotenten Differenzierungspotenzials eignen sich humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) als zelluläre Ressource für das Tissue Engineering. In den meisten Studien wurden hMSCs aus Knochenmarkaspiraten isoliert und *in vitro* expandiert bevor sie klinisch eingesetzt wurden. Die Isolationsmethoden wie Ficoll-Dichtegradienten und die magnetische Zellsortierung (*Magnetic-Activated Cell Sorting*, MACS) sind allerdings sehr zeitaufwendig und stark vom Anwender abhängig.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine einfachere und schnellere Isolationsmethode erfolgreich etabliert. Anhand ihrer Adhäsionseigenschaft an die Plastikoberfläche der Kulturflasche wurden hMSCs aus Knochenmarkaspiraten selektiert. Die gewonnenen Zellen wurden weiter kultiviert und hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker und ihres Differenzierungspotenzial charakterisiert. Durch die durchflusszytometrische Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die isolierten Zellen Oberflächenproteine wie CD105, CD90, CD73 und CD29 positiv exprimierten. Es wurde ebenfalls festgestellt, dass die Marker für hämatopoetische Zellen wie CD45, CD34, CD14, CD19, 7-AAD sowie das an der Immunantwort beteiligte Protein HLA-DR bei den untersuchten Zellen nicht nachweisbar waren. Das Ergebnis entsprach dem Expressionsmuster der Oberflächenproteine von hMSCs. Andererseits wiesen die isolierten Zellen auf ein osteogenes sowie adipogenes Differenzierungspotenzial hin. Es wurde gezeigt, dass mittels der in der Arbeit verwendeten Methode hMSCs erfolgreich aus Knochenmark isoliert werden konnten.

Eine andere Herausforderung des Tissue Engineerings besteht darin, ein geeignetes Biomaterial als Zellträger zu finden. Weiterhin wurde deshalb das Wachstumsverhalten von hMSCs auf zwei dreidimensionalen Biomaterialien *in vitro* untersucht. Hinsichtlich des BrdU-, MTT-, WST-, LDH-Tests und der Zellvitalitätsfärbung sowie der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte festgestellt werden, dass die beiden Biomaterialien, das Kalziumphosphat enthaltene CeraBall®-Scaffold und die BioGide®-Kollagenmembran, die Proliferation der hMSCs *in vitro* unterstützen konnten. Diese beiden Materialien in Kombination mit hMSCs erweisen sich als aussichtsreiche Kandidaten für das Tissue Engineering von Knochen in der Zukunft.

6. Literaturverzeichnis

Arinzeh T.L., Peter S.J., Archambault M.P., van den B.C., Gordon S., Kraus K., Smith A., Kadiyala S. (2003) Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am*, 85, 1927-1935

Aubin J.E. (1998) Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol.*, 76, 899-910

Awad H.A., Butler D.L., Boivin G.P., Smith F.N., Malaviya P., Huibregtse B., Caplan A.I. (1999) Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng*, 5, 267-277

Bach S.P., Renehan A.G. and Potten C.S. (2000) Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis*, 21, 469-476

Baksh D., Song L. and Tuan R.S. (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 8, 301-316

Ball L.M., Bernardo M.E., Roelofs H., Lankester A., Cometa A., Egeler R.M., Locatelli F., Fibbe W.E. (2007) Cotransplantation of *ex vivo*-expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*, 110, 2764-2767

Barbara N.P., Wrana J.L., Letarte M. (1999) Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily. *J Biol Chem*, 274, 584-594

Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al. (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Hematol*, 30, 42-48

Beresford J.N. et al. (1992) Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci*, 102, 341-351

Beresford J.N., Graves S.E., Smoothy C.A. (1993) Formation of mineralized nodules by bone derived cells *in vitro*: a model of bone formation? *Am J Med Genet*, 45, 163-178

Berridge M.V., Tan A.S. (1996) The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 4, 15-19

Bhattacharya B., Miura T., Brandenberger R. et al. (2004) Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood*, 103, 2956-2964

Bieback K. et al. (2004) Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22, 625-634

Blanc K. Le, Ringden O. (2007) Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *Journal of Internal Medicine*, 262, 509-525

Boden S.D. et al. (1999) Posterolateral lumbar intertransverse process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite-tricalcium phosphate after laminectomy in the nonhuman primate. *Spine*, 24, 1179-1185

Bridgewater L.C., Lefebvre V. and de Crombrughe B. (1998) Chondrocyte-specific Bridge enhancer elements in the *Col11a2* gene resemble the *Col2a1* tissue-specific enhancer. *J Biol Chem*, 273, 14998-5006

Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E. (1997) Growth kinetics, self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*, 64, 278-294

Bruder S.P., Kraus K.H., Goldberg V.M., Kadiyala S. (1998) The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*, 80, 985-996

Burrows F.J., Derbyshire E.J., Tazzari P.L., Amlot P., Gazdar A.F., King S.W., Letarte M., Vitetta E.S., Thorpe P.E. (1995) Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res*, 1, 1623-1634

Cancedda R., Mastrogiacomo M., Bianchi G., Derubeis A., Muraglia A., Quarto R. (2003) Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Novartis Found Symp*, 249, 133-143

Caplan A.I. (1994) The mesengenic process. *Clin Plast Surg*, 21, 429-435

Calplan A.I. (2005) Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedies. *Tissue Eng*, 11, 1198

Chamberlain J.R., Schwarze U., Wang P.R., Hirata R.K., Hankenson K.D., Pace J.M., Underwood R.A., Song K.M., Sussman M., Byers P.H., Russell D.W. (2004) Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science*, 303, 1198-1201

Cheifetz S., Bellón T., Calés C., Vera S., Bernabéu C., Massagué J., Letarte M. (1992) Endoglin is a component of the transforming growth factor- β receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 267, 19027-19030

Chicherster C.O., Fernández M., Minguell J.J. (1993) Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. *Cell Adhes Commun*, 1, 93-99

Chuah M.K., Van Damme A., Zwinnen H., Goovaerts I., Vanslembrouck V., Collen D., Vandendriessche T. (2000) Long-term persistence of human bone marrow stromal cells transduced with factor VIII retroviral vectors and transient production of therapeutic levels of human factor VIII in nonmyeloablated immunodeficient mice. *Hum Gen Ther*, 11, 729- 738

Coles B.L., Angenieux B., Inoue T., Del Rio-Tsonis K., Spence J.R., McInnes R.R., Arsenijevic Y., van der Kooy D. (2004) Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 15772-15777

Collin P., Guenther H.L., Fleisch H. (1992) Constitutive expression of osteoclast-stimulating activity by normal clonal osteoblast-like cells: effects of parathyroid hormone and 1, 25 dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*, 131, 1181-1187

Colter D.C., Class R., DiGirolamo C.M., Prockop D.J. (2000) Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 3213-3218

Colter D.C., Sekiya I., Prockop D.J. (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 USA*, 98, 7841-7845

Conget P.A., Minguell J.J. (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*, 181, 67-73

Dahlin C., Linde A., Gottlow J., Nyman S. (1988) Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 81, 672-676

Dallari D., Fini M., Stagni C. et al. (2006) *In vivo* study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res*, 24, 877-888

De Ceuninck F., Caliez A., Dassencourt L., Anract P., Renard P. (2004) Pharmacological disruption of insulin-like growth factor 1 binding to IGF-binding proteins restores anabolic responses in human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 6, 393-403

De Lusto F., Condell R.A., Nguyen M.A., McPherson J.M. (1987) A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. *J Biomed Mater Res*, 20, 109-120

De Kok I.J., Peter S.J., Archambault M. et al. (2003) Investigation of allogeneic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings. *Clin Oral Implants Res*, 14, 481-489

Deng Y., Guo X., Yuan Q., Li S. (2003) Efficiency of adenoviral vector mediated CTLA4Ig gene delivery into mesenchymal stem cells. *Chin Med J (Engl.)*, 116, 1649-1654

Devine S.M., Hoffman R. (2000) Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol Review*, 7, 358-363

Digirolamo C.M., Stokes D., Colter D., Phinney D.G., Class R., Prockop D.J. (1999) Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*, 107, 275-281

Dominici M., Le Blank K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Krause D.S., Deans R.J., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.M. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-317

Doucet C., Ernou I., Zhang Y.Z. et al. (2005) Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*, 205, 228-236

Ducheyne P., Qiu Q. (1999) Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*, 20, 2287-2303

Duff S.E., Li C., Garland J.M., Kumar S. (2003) CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*, 17, 984-992

Evans M.J., Kaufman M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156

Frasconi F., Labopin M., Bacigalupo A., Gluckman E., Rocha V., Bruno B. (2002) Expanded mesenchymal stem cells (MSC), co-infused with HLA identical hemopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft-versus-host disease: a matched pair meeting of the analysis. EBMT Meeting, Montreux

Friedenstein A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S. (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3, 393-403

Gargett C.E. (2006) Identification and characterisation of human endometrial stem/progenitor cells. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 46, 250-253

Gerber T., Knoblich B., Traykova T., Holzhüter G., Dörfling P., Henkle K.O., Bienengraber V. (2001) Entwicklung, *in vitro* und *in vivo* Tests eines hochporösen Knochenersatzmaterials. Osteologie, 10, 175-183

Gluckman E. (2004) *Ex vivo* expansion of cord blood cells. Exp Hematol, 32, 410-412

Gottlow J. (1993) Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results. Journal of Perio-dontology, 64, 1157-1165

Gratzner H.G. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. Science, 218, 474-475

Graziani F., Ivanovski S., Cei S. et al. (2006) The *in vitro* effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. Clin Oral Implants Res, 17, 212-219

Gregory C.A., Reyes E., Whitney M.J., Spees J.L. (2006) Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogenic species-specific serum and administration in fibrin constructs. Stem Cells, 24, 2232-2243

Grinnemo K.H., Mansson A., Dellgren G., Klingberg D., Wardell E., Drvota V., Tammik C., Holgersson J., Ringden O., Sylven C., Le Blanc K. (2004) Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. J Thorac Cardiovasc Surg, 127, 1293-1300

Gruber R., Varga F., Fischer M.B., Watzek G. (2002) Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. Clin Oral Implants Res, 13, 529-535

Gruber R., Karreth F., Frommlet F. et al. (2003) Platelets are mitogenic for periosteum-derived cells. J Orthop Res, 21, 941-948

Guo X. et al. (2004) Repair of large articular cartilage defects with implants of antilogous mesenchymal stem cells seeded into beta-tricalcium phosphate in a sheep model. *Tissue Eng*, 10, 1818–1829

Handschel J., Wiesmann H.P., Stratmann U., Kleinmheinz J., Meyer U., Joos U. (2002) TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials*, 23, 1689-1695

Healy C., Uwanogho D., Sharpe P.T. (1999) Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev Dyn*, 215, 69-78

Hench L.L., Polak J.M. (2002) Third-generation biomedical materials. *Science*, 295, 1014-1017

Hench L.L., Xynos I.D., Polak J.M. (2004) Bioactive glasses for *in situ* tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym*, 15, 543-562

Hermann P.C., Huber S.L., Herrler T., von Hesler C., Andrassy J., Kevy S.V., Jacobson M.S., Heeschen C. (2008) Concentration of bone marrow total nucleated cells by a point-of-care device provides a high yield and preserves their functional activity. *Cell Transplant*, 16, 1059-1069

Herrera M.B., Bruno S., Buttiglieri S., Tetta C., Gatti S., Deregibus M.Z., Bussolati B., Camussi G. (2006) Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells*, 24, 2840-2850

Horwitz E.M., Gordon P.L., Koo W.K. et al. (2002) Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 8932-8937

Hu Y. et al. (2003) Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med*, 141, 342-349

Igura K. et al. (2004) Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*, 6, 543-553

Johansson C.B., Momma S., Clarke D.L., Risling M., Lendahl U., Frisen J. (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 96, 25-34

Karring T., Nyman S., Gottlow J., Laurell L. (1993) Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human studies. *Periodontology*, 2000, 26-35

Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K. (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24, 1294-1301

Kilian O., Flesch I., Wenisch S. et al. (2004) Effects of platelet growth factors on human mesenchymal stem cells and human endothelial cells *in vitro*. *Eur JMed Res*, 9, 337-344

Knieb C. (2006) Entwicklung von Trägerstrukturen auf der Basis von Chitosanfasern für das Tissue Engineering, Diplomarbeit, TU Dresden

Koc O.N., Day J., Nieder M., Gerson S.L., Lazarus H.M., Krivit W. (2002) Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Tranplant*, 30, 215-222

Krampera M., Glennie S., Dyson J. et al. (2003) Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101, 3722-3729

Laneuville O. et al. (1994) Differential inhibition of human prostaglandin endo-peroxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 271, 927-934

Lastres P., Letamendía A., Zhang H., Ríus C., Almendro N., Raab U., López L.A., Langa C., Fabra A., Letarte M., Bernabéu C. (1996) Endoglin modulates cellular response to TGF- β 1. *J Cell Biol*, 133, 1109-1121

Le Blanc K., Ringdén O. (2007) Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *Journal of Internal Medicine*, 262, 509-525

Le Blanc K., Tammik L., Zetterberg E., Ringdén O. (2003) HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Haematol*, 31, 890-896

Lee K.Y., Mooney D.J. (2001) Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev*, 101, 1869-1879

Lehninger A.L. (1994) *Prinzipien der Biochemie*. Heidelberg: Spektrum akademischer Verlag, 751-754; 861-862; 867

Lewis J.P., Trobaugh F.E. (1964) Haematopoietic Stem Cells. *Nature*, 204, 589-590

Liechty K.W., Mackenzie T.C., Shaaban A.F., Radu A., Moseley A.M., Deans R., Marshak D.R., Flake A.W. (2000) Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*, 6, 1282-1286

Liu Y., Li H., Tanaka K., Tsumaki N., Yamada Y. (2000) Identification of an enhancer sequence within the first intron required for cartilage-specific transcription of the alpha2 (XI) collagen gene. *J Biol Chem*, 275, 12712-12718

Livingston T., Ducheyne P., Garino J. (2002) *In vivo* evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res*, 62, 1-13

Loh Y.H., Wu Q., Chew J.L., Vega V.B., Zhang W., Chen X. et al. (2006) The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genet*, 38, 431-440

Loveridge N. (1999) Bone: more than a stick. *J Anim Sci*, 77, 190-196

Lucarelli E., Beccheroni A., Donati D. et al. (2003) Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials*, 24, 3095-3100

- Mackensen A., Drager R., Schlesier M. et al. (2000) Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptidepulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother*, 49, 152-156
- Maehara Y., Anai H., Tamada R., Sugimachi K. (1987) The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. *Eur J Cancer Clin Oncol.*, 23, 273-276
- Mankani M.H., Kuznetsov S.A., Fowler B. et al. (2001) *In vivo* bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol Bioeng*, 72, 96-107
- Mao J.J. (2005) Stem-cell-driven regeneration of synovial joints. *Bio Cell*, 97, 289-301
- Mariani S.M. (2003) Stem Cells: dreams or Reality? *Med Gen Med*, 5, 23
- Marx R.E., Carlson E.R., Eichstaedt R.M. et al. (1998) Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85, 638-646
- Masson N.M., Currie I.S., Terrace J.D., Garden O.J., Parks R.W., Ross J.A. (2006) Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291, 45-54
- Muller I., Kordowich S., Holzwarth C. et al. (2006) Animal serumfree culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy*, 8, 437-444
- Park S.R., Oreffo R.O., Triffitt J.T. (1999) Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes *in vitro*. *Bone*, 24, 549-554
- Mestas J., Hughes C.C. (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 172, 2731-2738

Miller D.W., Graulich W., Karges B., Stahl S., Ernst M., Ramaswamy A., Sedlacek H.H., Müller R., Adamkiewicz J. (1999) Elevated expression of endoglin, a component of the TGF- β -receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J Cancer*, 81, 568-572

Muul L.M., Tuschong L.M., Soenen S.L. et al. (2003) Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: longterm results of the first clinical gene therapy trial. *Blood*, 101, 2563-2569

Nakamura Y., Muguruma Y., Yahata T., Miyatake H., Sakai D., Mochida J., Hotta T., Ando K. (2006) Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *Br J Dermatol*, 154, 1062-1070

Niemeyer P. et al. (2004) Adulte mesenchymale Stammzellen zur Regeneration muskuloskeletaler Gewebe. *MMW-Fortschritte der Medizin Originalien*, 107-113

Nixon A.J., Lillich J.T., Burton-Wurster N., Lust G., Mohammed H.O. (1998) Differentiated cellular function in fetal chondrocytes cultured with insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta. *J Orthop Res*, 16, 531-541

Okazaki R., Sakai A., Uezono Y., Ootsuyama A., Kunugita N., Nakamura T., Norimura T. (2001) Sequential changes in transforming growth factor (TGF)-beta1 concentration in synovial fluid and mRNA expression of TGF-beta1 receptors in chondrocytes after immobilization of rabbit knees. *J Bone Miner Metab*, 19, 228-235

Okumura-Nakanishi S., Saito M., Niwa H., Ishikawa F. (2005) Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 280, 5307-5317

Pachence J.M. (1996) Collagen-Based devices for soft tissue repair. *J Appl Biomater*, 33, 35-40

Phinney D.G., Kopen G., Righter W., Webster S., Tremain N., Prockop D.J. (1999) Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, 75, 424-436

Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-147

Rahaman M.N., Mao J.J. (2005) Stem cell based composite tissue constructs for regenerative medicine. *Biotechnol. Bioeng*, 92, 530-538

Rasmusson I., Ringden O., Sundberg B., Le Blanc K. (2003) Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*, 76, 1208-1213

Reubinoff B.E., Pera M.F., Fong C.Y. et al. (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol*, 18, 399-404

Richards M., Tan S.P., Tan J.H. et al. (2004) The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells*, 22, 51-64

Ringden O., Uzunel M., Rasmusson I. et al. (2006) Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*, 81, 1390-1397

Ringe J. (2006) Differenzierungs- und Migrationspotential mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen für das *in situ* Tissue Engineering. Diss, Berlin

Ripamonti U., Crooks J., Rueger D.C. (2001) Induction of bone formation by recombinant human osteogenic protein-1 and sintered porous hydroxyapatite in adult primates. *Plast Reconstr Surg*, 107, 977-988

Rizzi S.C., et al. (2001) Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *J Biomed Mater Res*, 55, 475-486

Schallmoser K., Bartmann C., Rohde E., Reinisch A., Kashofer K., Stadelmeyer E., Drexler C., Lanzer G., Linkesch W., Strunk D. (2007) Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*, 47, 1436-1446

Schimming R., Schmelzeisen R. (2004) Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*, 62, 724-729

Sekiya I., Tsuji K., Koopman P., Watanabe H., Yamada Y., Shinomiya K., Nifuji A., Noda M. (2000) SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem*, 275, 10738-10744

Selvaggi T.A., Walker R.E., Fleisher T.A. (1997) Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*, 89, 776-779

Slack J.M. (2000) Stem cells in epithelial tissues. *Science*, 287, 1431-1433

Slater T.F., Sawyer B., Sträuli U. (1963) Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta*, 77, 383-393

Slobodianski A. (2006) Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten. Diss, Hamburg

Soffer E., Ouhayoun J.P., Dosquet C. et al. (2004) Effects of platelet lysates on select bone cell functions. *Clin Oral Implants Res*, 15, 581-588

Song L., Tuan R.S. (2004) Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J*, 18, 980-982

Sperger J.M., Chen X., Draper J.S. et al. (2003) Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 13350-13355

Strauer B.E., Brehm M., Zeus T., Köstering M., Hernandez A., Sorg R.V., Kögler G., Wernet P. (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 106, 1913-1918

Taira M., Sasaki K., Saitoh S., Nezu T., Kagika T., Harada H., Sasaki M., Kimura S., Hirata I., Araki Y. (2008) TEM/EDX Observation of Micro-beads of Magnetically Activated Cell Sorting (MACS) System and Separation Trial of Mouse Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow Cells by MACS System. *J Oral Tissue Engin*, 6, 33-40

Takao Y., Yokota T., Koide H. (2006) Beta-catenin up-regulates Nanog expression through interaction with Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 353, 699-705

Tatakis D.N., Promsudthi A., Wikesjo U.M. (1999) Devices for periodontal regeneration. *Perio-dontology*, 19, 59-73

Tay B.K., Patel V.V., Bradford D.S. (1999) Calcium sulfate- and calcium phosphate-based bone substitutes. Mimicry of the mineral phase of bone. *Orthop Clin North*, 30, 615-623

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-1147

Tsai J.L., Chang Y.J. et al. (2004) Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*, 19, 1450-1456

Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M., Egalka M.C., Guinan E.C. (2003) Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 75, 389-397

Tsuchida H., Hashimoto J., Crawford E. et al. (2003) Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. *J Orthop Res*, 21, 44-53

Tuschong L., Soenen S.L., Blaese R.M. et al. (2002) Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminasedeficient patients after T cell gene therapy. *Hum Gene Ther*, 13, 1605-1610

Van der Rest W.J., Dublet B., Champlaud M. (1990) Fibril associated collagens. *Biomaterials*, 11, 28

Vilquin J.T., Rosset P. (2006) Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair: current status. *Regenerative Med*, 1, 589-604

Vistica D.T., Skehan P., Scudiero D., Monks A., Pittman A., Boyd M.R. (1991) Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*, 51, 2515-2520

Warnke P.H., Springer I., Wiltfang J., Acil Y., Eufinger H., Wehmöller M., Russo P.A.J., Bolte H, Sherry E, Behrens E and Terheyden H. (2004) Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet*, 364, 766-770

Warnke P.H., Wiltfang J., Springer I., Acil Y., Bolte H., Kosmahl M., Russo P.A., Sherry E., Lützen U., Wolfart S., Terheyden H. (2006) Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials*, 27, 3163-3167

Warnke P.H., Douglas T., Sivananthan S., Wiltfang J., Springer I., Becker S.T. (2009) Tissue engineering of periosteal cell membranes *in vitro*. *Clin Oral Implants Res*, 20, 761-766

Warnke P.H., Douglas T., Wollny P., Sherry E., Steiner M., Galonska S., Becker S.T., Springer I.N., Wiltfang J., Sivananthan S. (2009) Rapid prototyping: porous titanium alloy scaffolds produced by selective laser melting for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*, 15, 115-124

Welsch U. (2003) *Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer (1. Auflage)

Winslow T. (2001) *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions* (NIH Stem Cell Report). National Institut of Health

Wulf G.G., Chapuy B., Trümper L. (2006) Mesenchymal stem cells from bone marrow. Phenotype, aspects of Biology, and clinical perspectives. *Med Klin*, 101, 408-413

Yin M., Pacifici M. (2001) Vascular regression is required for mesenchymal condensation and chondrogenesis in the developing limb. *Dev Dyn*, 222, 522-533

Zimmermann S., Voss M., Kaiser S., Kapp U., Waller C.F., Martens U.M. (2003) Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia*, 17, 1146-1149

Zubler R.H. (2006) *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells and gene therapy development. *Swiss Med Wkly*, 136, 795-799

Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7, 211-228

Zuk P.A. et al. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 4279-4295

7. Anhang

7.1 Abbildungen

Abb. 1	Differenzierung der ES-Zellen in Zellen der drei Keimblätter	2
Abb. 2	Differenzierungspotenzial der humanen mesenchymalen Stammzellen	3
Abb. 3	Schematische Darstellung der Entwicklung von hMSCs im Knochenmark	4
Abb. 4	Schematische Darstellung einzelner Schritte der Chondrogenese mit den wichtigsten Markerproteinen	10
Abb. 5	CeraBall [®] -Scaffold	24
Abb. 6	Die zweischichtige Struktur der BioGide [®] -Membran	27
Abb. 7	Immunfluoreszenzfärbung von hMSCs	33
Abb. 8	CFU-F Assay	34
Abb. 9	Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenproteine von isolierten Zellen aus Knochenmark	36
Abb. 10	Lichtmikroskopische Aufnahmen zur Bestimmung der Aktivität der ALP von osteogen induzierten hMSCs	37
Abb. 11	Lichtmikroskopische Aufnahmen zur Bestimmung der mineralisierten Matrix von osteogen induzierten hMSCs mit Hilfe der von-Kossa-Methode	38
Abb. 12	Lichtmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der mineralisierten Matrix von osteogen induzierten hMSCs mittels Alizarin Red S	39
Abb. 13	Lichtmikroskopische Aufnahmen der angefärbten Fetttröpfchen in den adipogen induzierten hMSCs mittels Oil Red O	40
Abb. 14	WST-Test von hMSCs auf CeraBall [®] -Scaffolds für verschiedene Zeiträume	41
Abb. 15	MTT-Test von hMSCs nach Kultivierung mit Eluaten aus CeraBall [®] -Scaffolds	42
Abb. 16	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Ceraball [®] -Scaffolds mit und ohne Besiedlung durch hMSCs	43
Abb. 17	Zellvitalitätsfärbung mittels FDA und PI	44
Abb. 18	LDH-Test von hMSCs nach Kultivierung mit Eluaten der BioGide [®] -Membranen	45
Abb. 19	MTT-Test von hMSCs nach Kultivierung mit Eluaten der BioGide [®] -Membranen	46
Abb. 20	WST-Test von hMSCs auf der BioGide [®] -Membran	47

Abb. 21	BrdU-Test von hMSCs	48
Abb. 22	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von BioGide [®] -Membranen mit und ohne Besiedlung von hMSCs	49

7.2 Tabellen

Tab. 1	Die minimalen Kriterien zur Identifizierung von humanen mesenchymalen Stammzellen.	6
Tab. 2	Schematische Darstellung der Proteinexpression während der osteogenen Differenzierung	9
Tab. 3	Ansatzschema der durchflusszytometrischen Analyse	20
Tab. 4	Spenderdaten	32

7.3 Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoactinomycin
Abb.	Abbildung
ALP	alkalische Phosphatase
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFU-F	<i>Colony-forming unit fibroblasts</i>
Cy	Carbocyanin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECD	<i>Electrochemical</i>
ECM	extrazelluläre Matrix

EDTA	Ethylendiamintertraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FDA	Fluorescein Diacetate
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GBR	<i>guided bone regeneration</i>
h	Stunde
HA	Hydroxylapatit
HCL	Salzsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen (<i>human leucocyte antigen</i>)
hMSC	humane mesenchymale Stammzelle
HPL	humanes Blutplättchen Lysat (<i>human platelet lysate</i>)
HSC	hämatopoetische Stammzelle
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor I</i>
INT	2-(4-Indophenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-Phenyltetrazolium
ISCT	<i>International Society for cellular Therapy</i>
k	Kilo (10^3)
KM	Knochenmark
l	Liter
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
m	mili (10^{-3})
M	Mol / l
MACS	<i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i>
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
Min	Minute
MNC	mononukleäre Zelle
mol	$6,022 \times 10^{23}$ Teichen (Avogadro-Zahl)
MSC	mesenchymale Stammzelle
MTT	3-(4, 5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2, 5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid

NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factors (PDGF)</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium Iodide
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
Sox9	<i>SRY-box 9</i>
SRY	<i>Sex determining region Y</i>
Tab.	Tabelle
TCP	Trikalziumphosphat
TGF-β1	<i>Transforming growth factor-β1</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1, 3-Benzol-Disulfonat
μ	mikro (10 ⁻⁶)

7.4 Material

7.4.1 Chemikalien

Alizarin Red S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
α-MEM M4526 (Minimum Essential Medium Eagle)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dexamethason	Ingelheim, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eosin	Merck, Darmstadt

Fötales Kälberserum (FCS)	Perbio, Bonn
Fixative Solution	Beckman Coulter, USA
Fluorescein Diacetate (FDA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Hoechst-33342	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Indomethacin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Insulin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Intratect	Biotest, Dreieich
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kristall-Violett-Lösung (3 g / l)	Merck, Darmstadt
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1-Methyl-3-Isobutylxanthin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mounting Medium	Biomeda Corporation, USA
Oil Red O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	PAA, Österreich
Penicillin / Streptomycin (Pen / Strep)	Biochrom, Berlin
Propidium Iodide (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Triton X-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Gibco, Eggenstein
Trypsin / EDTA	Biochrom, Berlin
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
WST-1	Roche, Mannheim

7.4.2 Verbrauchsmaterial

Einfrierröhrchen (1,8 ml, steril)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflasche (75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturflasche (225 cm ²)	Nunc, USA
Gewebekulturplatten (6-, 24-, 96-Loch Platten, steril)	Nunc, USA
Kunststoffröhrchen für Durchflusszytometrie	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	Pechiney, USA
Petrischalen (60 x 15 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten (10 ml, 25 ml, steril)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl, gestopft)	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen (15 ml und 50 ml, steril)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter (0,2 µm)	Whatman, USA
8-Well-Objektträger	Nunc, USA

7.4.3 Geräte

Automatisch Zellzähler: Sysmex KX-21N	Sysmex, Norderstedt
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Critical Point Dryer: K850	Emitech, USA
Durchflusszytometer	Beckman Coulter, USA
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskope	
Lichtmikroskop	Leitz Wetzler, Glücksburg
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Japan
Neubauer-Zählkammer: 0,1 mm x 0,0025mm ²	Laborcenter, Nürnberg
pH-Meter: CG 840	Schott, Mainz
Pipettierhilfe	Brand, Weltheim
Rasterelektronenmikroskop: XL 30CP	Philips Electro Optics, Kassel
SCD 500 device	CAL-Tec, UK
Spectrophotometer	Molecular Devices, USA
Wasserbad: Julabo U3	Julabo Labortechnik, Seelbach

Vortexer: Vortex Genie 2	Bender&Hobein, Schweiz
Zentrifugen	
Megafuge 1,0R	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5702R	Eppendorf, Hamburg

7.4.4 Kits

LDH Detection Kit	Roche, Mannheim
MTT Cell Proliferation Kit	Roche, Mannheim
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche, Mannheim
FAST BCIP / NBT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

7.4.5 Antikörper

Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung

Alexa Mouse 488	Molecular Probes, USA
Monoklonal Anti-Vinkulin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Antikörper für die durchflusszytometrischen Analyse:

Antikörper	Gekoppelte Fluoreszenz	Ursprung	Firma
IgG ₁	FITC	Mouse	Beckman Coulter, USA
IgG ₁	PE	Mouse	Beckman Coulter, USA
IgG ₁	PC5	Mouse	Beckman Coulter, USA
IgG ₁	PC7	Mouse	Beckman Coulter, USA
IgG ₁	ECD	Mouse	Beckman Coulter, USA
CD90	FITC	Mouse	Beckman Coulter, USA
CD19	FITC	Mouse	Beckman Coulter, USA
CD29	FITC	Mouse	Beckman Coulter, USA
CD105	PE	Mouse	Beckman Coulter, USA

CD73	PE	Mouse	Beckman Coulter, USA
7-AAD	PC5	Mouse	Beckman Coulter, USA
HLA-DR	PC5	Mouse	Beckman Coulter, USA
CD14	PC5	Mouse	Beckman Coulter, USA
CD34	PC5	Mouse	Beckman Coulter, USA
CD45	PC7	Mouse	Beckman Coulter, USA

7.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. P.H. Warnke für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die Überlassung des sehr interessanten und herausfordernden Themas, für die stete und engagierte Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Erstgutachtens und der damit verbundenen Mühen.

Bei Herrn PD Dr. A. Humpe möchte ich mich ausdrücklich für die Übernahme des Zweitgutachters, für die stets freundliche Unterstützung und für die Möglichkeit, an seinem Institut arbeiten zu dürfen, bedanken.

Herrn Professor T. Douglas danke ich für die hilfreiche Unterstützung und für die stetige Diskussionsbereitschaft.

Bei Dr. Eske Voß und Frau Andrea Renzing möchte ich mich für ihre unermüdliche Unterstützung sowie den vielen wertvollen Diskussionen und das intensive, wiederholte Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Bei Frau K. Brune möchte ich mich besonders für die freundliche Unterstützung bei der FACS-Analyse bedanken.

Frau Julia Braun danke ich für die stets hilfreiche und freundliche Zusammenarbeit.

Bei Frau G. Otto bedanke ich mich für ihre verständnisvolle Unterstützung bei der Laborarbeit.

Allen Mitarbeitern vom MyJoint Projekt danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre.

Besonders danke ich meiner Familie, die mich immerwährend unterstützt hat.

7.6 Lebenslauf

Name: Qin Liu
Geburtsdatum: 28. Juli 1972
Geburtsort: Wuhan, Hubei Provinz, China

Schulausbildung

1983-1989 Abitur am Wuhan 3. Gymnasium, China

Studium

1989-1994 Humanmedizin an der Hubei Medizin Universität, China

2003-2006 Molekulare Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

2007 Diplomarbeit in der Abteilung für Molekulare Immunologie der
Medizinischen Klinik II an der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Anstellungen

1994-2001 Ärztin für Innere Medizin im 1. Krankenhaus in Wuhan, China

Seit Juni 2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik für Mund-, Kiefer-
und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-
Holstein, Campus Kiel

Publikation

Timothy Douglas, Qin Liu, Jörg Wiltfang, Sureshan Sivananthan,
Patrick H. Warnke. Novel ceramic bone replacement material
CeraBall[®] seeded with human mesenchymal stem cells. Clin. Oral
Impl. Res. 2009

Tagungsbeitrag

Mai 2009

Teilnahme an der 59. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie in Wiesbaden mit Posterbeitrag: Comparison of *in vitro* biocompatibility of NanoBone[®] and BioOss[®] for human osteoblasts

