

**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**

**ANALYSE DES KNOCHENSPEZIFISCHEN VERHALTENS
PORCINER MULTIPOTENTER STAMMZELLEN *IN VITRO***

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
BERIT RENATE LANKHORST
aus Oldenburg in Oldenburg

Kiel 2009

1. Berichterstatterin: Frau PD Dr. Dr. C. E. Zimmermann

2. Berichterstatter/
Berichterstatterin: Herr Prof. Dr. C. Dörfer

Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2010

Zum Druck genehmigt: Kiel,
den: 09.06.2010

gez.: _____

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung)
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
KM	Kulturmedium
MTP	Mikrotiterplatte
OM	Osteogenes Induktionsmedium
P	Passage
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
pMSC	Porcine mesenchymale Stammzellen
PRP	Platelet Rich Plasma (Thrombozytenreiches Plasma)
s.	siehe
TBS	Tris Buffered Saline (Trisgepufferte Salzlösung)
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1	<i>Strategien zum Knochenersatz in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.....</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Tissue Engineering.....</i>	<i>2</i>
1.2.1	Definition und Konzept des Tissue Engineering.....	2
1.2.2	Beispiele für das Tissue Engineering von Knochen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.....	3
1.3	<i>Knochenstoffwechsel.....</i>	<i>3</i>
1.3.1	Aufbau des Knochens.....	3
1.3.2	Osteoblastendifferenzierung und Funktion.....	4
1.3.3	Osteoblastenmarker.....	5
1.3.4	Knochenphysiologie.....	5
1.4	<i>Humane Stammzellen.....</i>	<i>6</i>
1.4.1	Geschichte.....	6
1.4.2	Definition.....	6
1.4.3	Isolierung.....	7
1.4.4	Charakterisierung.....	7
1.5	<i>Porcine Stammzellen.....</i>	<i>8</i>
1.6	<i>Fragestellung.....</i>	<i>8</i>
2	Material und Methoden	10
2.1	<i>Versuchsaufbau.....</i>	<i>10</i>
2.2	<i>Übersicht und Nomenklatur der Zelllinien</i>	<i>10</i>
2.3	<i>Herstellung der Nährmedien.....</i>	<i>10</i>
2.4	<i>Auftauen der Zelllinien.....</i>	<i>11</i>
2.5	<i>Zellzählung und Vitalitätsbestimmung.....</i>	<i>11</i>
2.6	<i>Kultivierung der pMSC.....</i>	<i>12</i>
2.7	<i>Osteogene Induktion der pMSC.....</i>	<i>12</i>
2.8	<i>Kontrolle von Zellproliferation und Zelldifferenzierung, Sammeln der Zellkulturüberstände.....</i>	<i>13</i>
2.9	<i>Passagieren der pMSC aus den 6-Well-Multischalen.....</i>	<i>14</i>
2.10	<i>Zytospin-Verfahren.....</i>	<i>14</i>
2.11	<i>Immunzytochemischer Nachweis von Osteocalcin</i>	<i>15</i>
2.11.1	Herstellung und Vorbereitung der Reagenzien.....	15
2.11.2	Durchführung des immunzytochemischen Nachweises.....	15
2.12	<i>Mikroskopische Auswertung.....</i>	<i>16</i>

2.13	<i>Bestimmung von Kollagen I in den Zellkulturüberständen</i>	16
2.13.1	Vorbereitung des Kollagen-I-ELISA	17
2.13.2	Durchführung des Kollagen-I-ELISA.....	18
2.14	<i>Bestimmung von Kollagen III in den Zellkulturüberständen</i>	19
2.15	<i>Bestimmung von Osteocalcin in den Zellkulturüberständen</i>	19
2.15.1	Vorbereitung des Osteocalcin-ELISA.....	20
2.15.2	Durchführung des Osteocalcin-ELISA	20
2.16	<i>Statistische Methoden</i>	20
3	Ergebnisse	22
3.1	<i>Vitalität der verwendeten Zelllinien</i>	22
3.2	<i>Proliferation und Morphologie der kultivierten bzw. induzierten pMSC</i>	23
3.3	<i>Ergebnisse der immunzytologischen Färbungen</i>	25
3.3.1	Reliabilität der Auszählung	26
3.3.2	Osteocalcinexpression	27
3.4	<i>Kollagen-I-Konzentrationen in Zellkulturüberständen</i>	28
3.4.1	Kollagen-I-Konzentrationen nach siebentägiger Kultivierung.....	29
3.4.2	Kollagen-I-Konzentrationen nach 14-tägiger Kultivierung.....	30
3.4.3	Vergleich der Kollagen-I-Konzentrationen der induzierten Ansätze	31
3.4.4	Vergleich der Kollagen-I-Konzentrationen der Kontrollansätze.....	32
3.5	<i>Kollagen-III-Konzentrationen in Zellkulturüberständen</i>	32
3.5.1	Kollagen-III-Konzentrationen nach siebentägiger Kultivierung	33
3.5.2	Kollagen-III-Konzentrationen nach 14-tägiger Kultivierung.....	34
3.5.3	Vergleich der Kollagen-III-Konzentrationen der induzierten Ansätze	35
3.5.4	Vergleich der Kollagen-III-Konzentrationen der Kontrollansätze	36
3.6	<i>Osteocalcin-Konzentrationen in Zellkulturüberständen</i>	36
3.6.1	Osteocalcin-Konzentrationen nach siebentägiger Kultivierung	37
4	Diskussion	38
4.1	<i>Verwendete Materialien</i>	38
4.1.1	Wahl des Tiermodells	38
4.1.2	Nährmedien und deren Zusätze	39
4.2	<i>Verwendete Methoden</i>	39
4.2.1	Zellkultur	39
4.2.2	Zytospin-Verfahren und Immunzytochemie.....	40
4.2.3	ELISA	40
4.3	<i>Ergebnisse</i>	41
4.3.1	Vitalität der pMSC nach dem Auftauen	41
4.3.2	Zellproliferation und Zellmorphologie	41

4.3.3	Zytospin und Immunzytochemie	42
4.3.4	ELISA	42
4.4	<i>Schlussfolgerung</i>	45
5	Zusammenfassung	46
6	Literaturverzeichnis	47
7	Anhang	55
7.1	<i>Materialien und Geräte</i>	55
7.2	<i>Versuchsaufbau</i>	58
8	Danksagungen	59
9	Lebenslauf	60

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Strategien zum Knochenersatz in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Zur Behandlung ausgedehnter Knochendefekte wird in vielen Bereichen der Medizin, so auch in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie in der Regel autologer, d. h. körpereigener Knochen aus Beckenkamm, Schienbein, Schulterblatt, Rippe etc. eingesetzt. Autologer Knochen gilt dank seiner osteokonduktiven und osteoinduktiven Wirkung bis heute als Goldstandard (Ringe et al. 2002 a, Giannoudis et al. 2005). Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osteogenese sind die drei wesentlichen Bestandteile der Knochenregeneration. Fehlt einer dieser Faktoren, kommt es nicht zur erfolgreichen Osteointegration zwischen Ersatzmaterial und körpereigenem Knochen.

Osteoinduktion bezeichnet den Vorgang, durch den kompetente Zellen zur Differenzierung in knochenbildende Zellen angeregt werden. Dabei stellen mesenchymale Stammzellen kompetente Zellen dar. Die Osteoinduktion wird durch Signalmoleküle, sogenannte Zytokine wie z.B. Bone Morphogenetic Protein (BMP), vermittelt. Die Differenzierung zu Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen ist Voraussetzung für die Knochenneubildung, die Osteogenese. Osteokonduktion beschreibt die Bildung neuen Knochens und neuer Blutgefäße entlang einer vorgegebenen Leitstruktur. Aufgrund der Osteoinduktivität und Osteokonduktivität autologen Knochens werden für seine Entnahme ein zweiter Eingriff, eine verlängerte Operationszeit, postoperative Schmerzen und die Morbidität der Spenderregion in Kauf genommen (Younger und Chapman 1989, Hadlock et al. 1998, Zimmermann et al. 2001).

Als Alternative zu autologem Knochen stehen Knochenersatzmaterialien wie Calciumphosphatzemente und Keramiken zur Verfügung, die als osteokonduktive Leitstruktur dienen und bei denen die oben genannten Nachteile eines zweiten operativen Eingriffs weitgehend umgangen werden können. Ein ideales Knochenersatzmaterial sollte nicht nur osteokonduktive, sondern auch osteoinduktive Wirkung haben. Es sollte zudem biokompatibel, resorbierbar und einfach zu handhaben sein sowie in den Knochendefekt und das umliegende Gewebe integriert werden (Giannoudis et al. 2005). Bisher besitzt keines der verfügbaren Knochenersatzmaterialien alle genannten Eigenschaften.

Eine Osteoinduktivität könnte erzielt werden, indem man kompetente Zellen wie mesenchymale Stammzellen mit osteogenen Differenzierungsfaktoren kombiniert und in den Knochendefekt implantiert. Als weitere Alternative ist das Tissue Engineering geeignet, bei dem ein biokompatibles Gerüst mit bereits differenzierten Zellen in den Defekt eingebracht wird.

1.2 Tissue Engineering

1.2.1 Definition und Konzept des Tissue Engineering

Tissue Engineering bezeichnet die Kombination der Technologien der Ingenieurs-, Werkstoff-, und Lebenswissenschaften (Life Sciences), um Gewebefunktionen aufrecht zu erhalten, zu ersetzen, zu verbessern oder grundlegend zu erforschen. Es umfasst die Züchtung von Geweben *in vitro* zu Transplantationszwecken (Cancedda et al. 2000).

Für das Tissue Engineering werden folgende Komponenten benötigt:

1. ein biokompatibles Gerüst bzw. Trägermaterial, oft Scaffold genannt,
2. Differenzierungsfaktoren wie Zytokine, die ein osteoinduktives molekulares Signal darstellen und
3. Zellen, die *in vitro* auf dem Gerüst wachsen und in das gewünschte Gewebe differenzieren können, bevor das sogenannte Konstrukt implantiert wird (Ripamonti et al. 2001, Stock und Vacanti 2001, Ringe et al. 2002 a).

Für die Knochenzüchtung können autologe Stammzellen aus dem Knochenmark oder anderen Geweben isoliert, im Labor expandiert und kultiviert werden (Rispuđ und Shapiro 2005) sowie auf einem Trägermaterial mit anschließender Implantation in den Defekt ausgesät werden (s. Abb. 1).

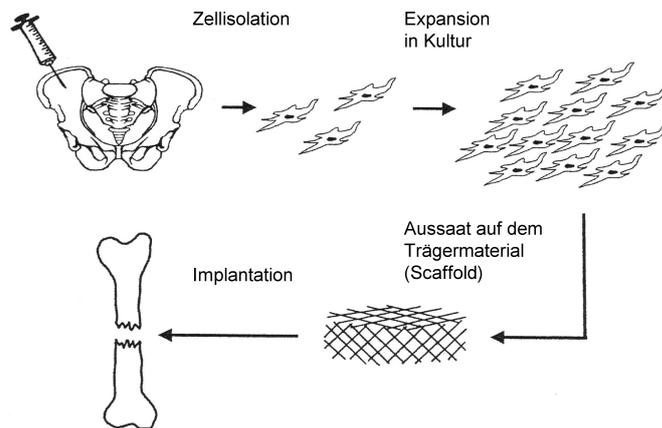


Abb. 1: Schematische Darstellung der Zelltransplantation aus dem Beckenkamm. Die Zellen werden zuerst isoliert. Nach Expansion in Zellkultur werden sie auf einem Trägermaterial ausgesät und schliesslich in den Defekt implantiert. Aus Mistry und Mikos 2005, Abb. 1.

1.2.2 Beispiele für das Tissue Engineering von Knochen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

In einem *in vitro* Versuch haben Abukawa et al. ein resorbierbares Polymergerüst in Form eines Unterkieferkondylus mit induzierten mesenchymalen Stammzellen vom Minischwein besiedelt und kultiviert. Sie konnten die Entstehung einer knochenähnlichen Matrix an der Oberfläche des Polymergerüsts nachweisen (Abukawa et al. 2003).

In ähnlicher Weise konnte die Bildung einer knochenähnlichen Matrix *in vitro* in Konstrukten aus porösen beta-Tricalciumphosphat-Gerüsten, Kollagen-1-Hydrogel und humanen mesenchymalen Stammzellen gezeigt werden (Weinand et al. 2006).

In einem weiterführenden *in vivo* Versuch gelang es Abukawa et al., mandibuläre Knochendefekte im Minischwein durch Implantation von mit mesenchymalen Stammzellen besiedelten, resorbierbaren Polymergerüsten aufzufüllen. Sie wiesen nach, dass die Defekte aus neu gebildetem Knochen bestanden und von neu gebildeten Blutgefäßen durchzogen waren (Abukawa et al. 2004). Hibi et al. behandelten die Kieferspalte einer neunjährigen Patientin mit einem osteogenen Material, bestehend aus autologen mesenchymalen Stammzellen und thrombozytenreichem Plasma (PRP). Es kam zu 80% des Volumens zu einer Auffüllung mit Knochen, durch den der laterale Schneidezahn und der Eckzahn durchbrechen konnten (Hibi et al. 2006). PRP enthält Fibrinogen als Matrix und Wachstumsfaktoren wie Platelet-Derived Growth Factor, Transforming Growth Factor-beta, Vascular Endothelial Growth Factor und Insulin-like Growth Factor. Diese Faktoren fördern unter anderem die Zellproliferation, Matrixbildung, Kollagensynthese, die Bildung von Osteoid und damit die Geweberegeneration (Kanno et al. 2005).

Es besteht für das Tissue Engineering noch viel Forschungsbedarf, um geeignete und vor allem reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Daher sind präklinische Studien mit Tierversuchen notwendig.

1.3 Knochenstoffwechsel

1.3.1 Aufbau des Knochens

Knochen besteht aus einer äußeren kompakten Schicht, der Substantia compacta, und einer inneren schwammartigen Schicht, der Substantia spongiosa. Man unterscheidet zwei Arten von Knochen, den Geflechtknochen und den Lamellenknochen, die sich zwar in ihrem Aufbau, nicht jedoch in ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheiden.

Die Knochengrundsubstanz besteht zu 50% aus anorganischen Bestandteilen wie Calciumphosphat in Form von Hydroxylapatit, zu 25% aus organischen Bestandteilen wie Kollagen Typ I (95%), Osteonektin, Osteocalcin und Sialoprotein und zu 25% aus Wasser.

Die zellulären Elemente des Knochens sind die Knochen bildenden Osteoblasten, Knochen ernährende Osteozyten, Knochen resorbierende Osteoklasten und Vorläuferzellen im Knochen (Schiebler et al. 1996).

1.3.2 Osteoblastendifferenzierung und Funktion

Die Osteoblastendifferenzierung (s. Abb. 2) aus mesenchymalen Stammzellen ist die Voraussetzung für die Entstehung von Knochen.

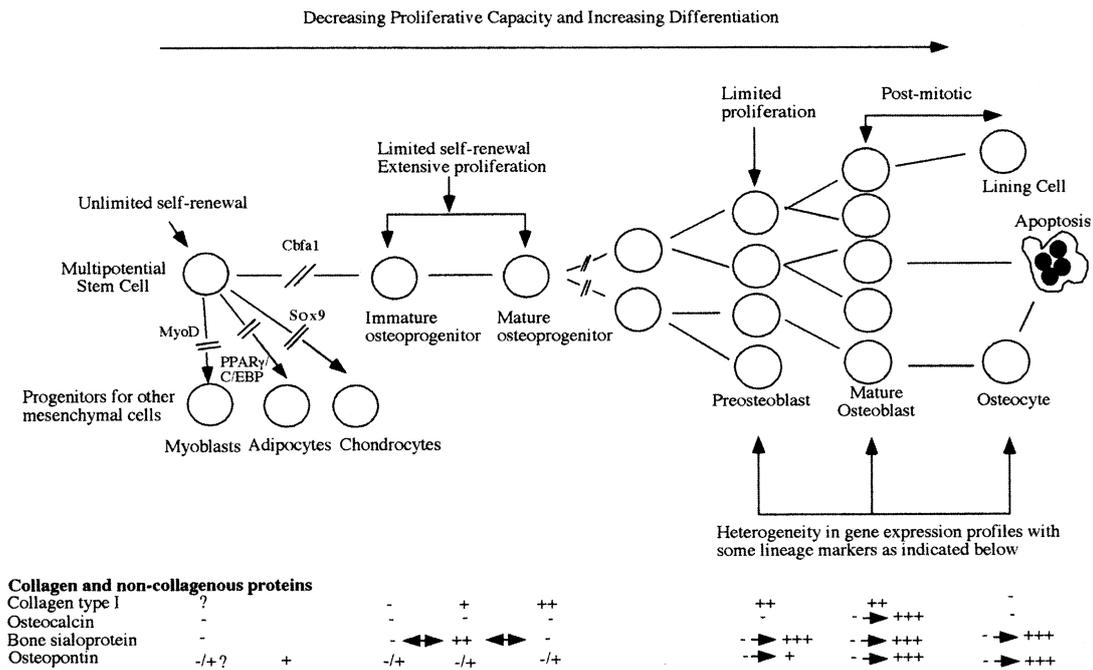


Abb. 2: Schematische Darstellung der einzelnen Differenzierungsstufen der osteoblastären Entwicklung. Dargestellt sind Zeitpunkt des Auftretens und Ausmass der Expression ausgewählter Osteoblastenmarker. Keine nachweisbare Expression (-) ; geringe bis sehr hohe Expression (-/+ bis +++) und heterogene Expression von einzelnen Zellen (- → +++). Umgezeichnet nach Aubin 2001, Abb. 1.

Der Entwicklung des Knochens liegen aufeinander abgestimmte Vorgänge zugrunde. Sie werden vermittelt durch biochemische Signale, die von Zytokinen/ Wachstumsfaktoren, Molekülen der extrazellulären Matrix und Interaktionen zwischen den Zellen ausgehen (Lian und Stein 1992). Bislang konnten die Faktoren, die zur Knochenbildung notwendig sind, nur zum Teil identifiziert werden (Cancedda et al. 2000). Drei Entwicklungsstadien wurden bei der Osteoblastengnese beschreiben:

- 1.) Die Proliferation der Osteoblasten,
- 2.) die Ausreifung der Matrix und
- 3.) deren Mineralisierung.

Die Osteoblasten sind zum einen für die Synthese und Sekretion der meisten extrazellulären Matrixproteine (wie Kollagen Typ I, Osteocalcin, Sialoprotein, BMP, Transforming Growth Factor Beta) verantwortlich. Damit ist ihre wichtigste Aufgabe die Bildung von Knochen (Horowitz et al. 2005). Dies geschieht durch Produktion und Ausreifung osteogener Matrix, gefolgt von der Mineralisation der Matrix (Hadjidakis und Androulakis 2006).

Zum anderen sind Osteoblasten an der Regulierung der Osteoklastendifferenzierung beteiligt, welche den Knochenabbau bestimmt.

1.3.3 Osteoblastenmarker

Osteoblastäre Zellen exprimieren alkalische Phosphatase, Sialoprotein, Kollagen I und Osteocalcin und sind in der Lage, extrazelluläre Calciumaggregate anzulegen (Hadjidakis und Androulakis 2006).

Obwohl man im Knochen eine hohe Aktivität an alkalischer Phosphatase nachweisen kann, ist dieser Nachweis nicht knochenspezifisch, da alkalische Phosphatase auch in anderen Geweben wie Knorpel, Leber und Niere vorkommt (Henthorn et al. 1988, Weiss et al. 1988, Leboy et al. 1989). Kollagen I ist ein hoch spezialisiertes Glykoprotein, das als Hauptbestandteil des Knochens in der Knochenmatrix vorkommt. Es wird, wie auch alkalische Phosphatase und Sialoprotein, als früher Marker in der osteogenen Differenzierungskaskade angesehen (Huang et al. 2007). Ausser in Knochenzellen kommt Kollagen I auch in der Cornea, der Haut und den Sehnen vor. Kollagen I wird bereits von Vorläuferzellen der Osteoblasten gebildet (Aubin 2001, s. auch Abb. 2).

Osteocalcin ist ein nichtkollagenes extrazelluläres Matrixprotein, dessen Genkodierung spezifisch für Osteoblasten ist (Gruber et al. 2004). Es gilt als Marker der späten osteogenen Differenzierungskaskade (Aubin 2001, Clausen et al. 2006, s. auch Abb. 2). Osteocalcin enthält γ -Carboxyl-Glutaminsäure, ist Vitamin-K-abhängig und spielt eine wichtige Rolle in der Calciumbindung. Ferner stabilisiert es das Hydroxylapatit in der Matrix und reguliert die Knochenbildung (Ducy et al. 1996), unter anderem verhindert es die vorzeitige Mineralisation der Matrix (Luo et al. 1997).

1.3.4 Knochenphysiologie

Das Skelett ist ein metabolisch aktives Organ, das lebenslang ständig umgebaut und erneuert wird, um den sich ändernden mechanischen Anforderungen gerecht zu werden und um den Calciumspiegel im Plasma aufrecht zu erhalten. Der Umbau des Knochens wird durch ein komplexes systemisches und lokales Zusammenspiel von Hormonen (z. B. Parathormon, Calcitriol, Calcitonin), und anderen Proteinen reguliert, die sowohl von den hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks, als auch den Zellen des Knochens gebildet werden, (Hadjidakis und Androulakis 2006). Man unterscheidet drei Phasen: 1. die Resorption des Knochens durch Osteoklasten, 2. das Ende der Resorption, gekennzeichnet durch die Einwanderung von mononukleären Zellen an der

Knochenoberfläche, und 3. die Bildung neuen Knochens durch Osteoblasten. An diesem Prozess sind die Bone Multicellular Units beteiligt, bestehend aus Osteoklasten und Osteoblasten, deren Aktionen aufeinander abgestimmt sind (Suda et al. 1999).

Bei der für den Gesichtsschädelknochen typischen direkten desmalen Verknöcherung wandern unter Einfluss von Zytokinen wie BMP-2 mesenchymale Stammzellen in diese Region ein. BMPs, von denen beim Menschen bisher 20 verschiedene Typen identifiziert werden konnten, sind Wachstumsfaktoren und gehören zur Gruppe der Transforming Growth Factor Beta Superfamilie. Sie spielen in der Embryologie und in der Knochenentwicklung eine sehr große Rolle. BMPs sind in der Lage, eine enchondrale Knochenneubildung sogar an heterotopen, außerhalb des Skelettsystems liegenden Geweben zu induzieren, wie z. B. im Muskelgewebe beim Affen *Papio ursinus* (Ripamonti 2004).

BMP bindet an spezifische membrangebundene Rezeptoren von mesenchymalen Stammzellen, woraufhin diese zuerst zu Präosteoblasten/ Osteoprogenitorzellen differenzieren, proliferieren, ein Cluster bilden und schließlich zu Osteoblasten differenzieren (Majumdar et al. 2001). Diese bilden nicht mineralisiertes Osteoid, welches zu Knochenbälkchen umgebaut wird, bis Geflechtknochen entsteht. Gleichzeitig bilden sich neue Blutgefäße. Nach der Bildung des Geflechtknochens wird dieser unter physiologischer Belastung zu Lamellenknochen umgebaut (Carstens et al. 2005).

1.4 Humane Stammzellen

1.4.1 Geschichte

Bereits 1867 vermutete Cohnheim, dass es im adulten Knochenmark nichthämatopoetische Stammzellen gibt (Cohnheim 1867). Friedenstein konnte 1976 nachweisen, dass nichthämatopoetische Zellen des Knochenmarks an Zellkulturkunststoff adhären und unter geeigneten Kulturbedingungen in der Lage sind, fibroblastenähnliche Zellkolonien zu bilden (Friedenstein 1976).

Das adulte Knochenmark enthält neben hämatopoetischen nicht hämatopoetische Stammzellen, die das Potential haben, in die Progenitorzellen der verschiedenen mesenchymalen Gewebe zu differenzieren. Diese nicht hämatopoetischen Stammzellen wurden von Caplan als mesenchymale Stammzellen bezeichnet (Caplan 1991).

1.4.2 Definition

Allgemein gilt, dass es sich bei Stammzellen um Zellen handelt, die die Fähigkeit zu uneingeschränkter Proliferation besitzen und deren Tochterzellen in einem komplexen Differenzierungsprozess in unterschiedliche Zelltypen differenzieren können (Hall und Watt 1989; Watt und Hogan 2000).

Je nach Stammzelltyp sind die Tochterzellen toti- oder omnipotent (Zygote), pluripotent (embryonale Stammzellen) oder multipotent (mesenchymale Stammzellen) (Gage 2000).

Totipotente Stammzellen können zu allen denkbaren Zelltypen und damit *in vivo* zu einem ganzen Organismus ausreifen (Lindl 2002).

Pluripotente humane embryonale Stammzellen wurden 1998 erstmals aus fetalem Gewebe isoliert und können ausser in Trophoblastenzellen der Plazenta in jede andere Zelle des lebenden Organismus ausreifen. (Shamblott et al. 1998, Thomson et al. 1998).

Multipotente Stammzellen reifen nur in bestimmte Gewebe aus (Gage 2000).

1.4.3 Isolierung

Die Zahl mesenchymaler Stammzellen im menschlichen Knochenmark ist altersabhängig. Sie beträgt beim Neugeborenen eine, bei einem 50-jährigen Menschen 0,25 und bei einem 80-jährigen Menschen nur noch 0,1-0,05 von 10^5 Knochenmarkszellen und ist damit sehr gering (Caplan 1994). Humane mesenchymale Stammzellen wurden zunächst aus dem Knochenmark des Beckenkamms isoliert (Haynesworth et al. 1992, Pittenger et al. 1999). Aber auch in anderen Organen konnte ihr Vorkommen geizigt werden. Gruber et al. isolierten mesenchymale Vorläuferzellen und osteogen differenzierte Zellen aus der Kieferhöhlenschleimhaut und wiesen nach, dass sich unter Einfluss von BMP-6 und BMP-7 der osteogene Phänotyp verstärkte (Gruber et al. 2004). Andere Autoren konnten mesenchymale Stammzellen aus den Zahnpapillen von impaktierten dritten Molaren isolieren (Ikeda et al. 2006).

1.4.4 Charakterisierung

Mesenchymale Stammzellen sind neben ihrer Adhärenz an Zellkulturkunststoff und der Bildung fibroblastenartiger Kolonien (Friedenstein 1976) durch eine Vielzahl spezifischer Zelloberflächenproteine (Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Wachstumsfaktoren) und deren Rezeptoren (extrazelluläre Matrixmoleküle) charakterisiert, sowie durch ihre Fähigkeit, in die verschiedenen Zelltypen mesenchymaler Gewebe zu differenzieren (Pittenger et al. 1999; Ringe et al. 2002 a).

Isolierte und kultivierte Stammzellen unterschiedlicher Spezies zeigten sowohl chondrogenes (Johnstone et al. 1998; Mackay et al. 1998), adipogenes (Pittenger et al. 1999), tenogenes (Young et al. 1998) als auch osteogenes Differenzierungspotential (Jaiswal et al. 1997). Ferner können sich diese Zellen in Muskelzellen (Wakitani et al. 1995), Tendinoblasten (Young et al. 1998), Nervenzellen (Kopen et al. 1999) und hämatopoetische Stromazellen (Cheng et al. 2000, Koc und Lazarus 2001) differenzieren.

1.5 Porcine Stammzellen

Porcine Stromazellen aus dem Knochenmark wurden 1993 von Thomson et al. sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht, um deren Verwendung im Tiermodell für das Tissue Engineering von Knochen zu etablieren. Sechs bis acht Wochen nach der Implantation in athymische Mäuse *in vivo*, bildeten die porcinen Knochenmarksstromazellen partiell mineralisierten Knorpel, knochenähnliches Gewebe und fibröses Gewebe. Zehn bis 14 Tage nach osteogener Induktion *in vitro* mit Dexamethason, beta-Glycerolphosphat und Ascorbinsäure bildeten die Zellen mineralisierte Knoten mit zentralen Calciumaggregaten, umgeben von einer Kollagen-I-reichen-Matrix. Dabei konnten sie zeigen, dass sich porcine Stromazellen bezüglich des Knorpel- und Knochenstoffwechsel ähnlich wie humane Zellen verhalten (Thomsen et al. 1993).

2002 haben Ringe et al. ein Protokoll zur Isolierung von porcinen mesenchymalen Stammzellen (pMSC) entwickelt und deren Phänotyp und Differenzierungspotential auf RNA-Ebene untersucht. Sie konnten für pMSC ein ähnliches Differenzierungsverhalten zeigen wie es für humane mesenchymale Stammzellen bekannt ist und schlossen daraus, dass das Schwein als Tiermodell für weitere Studien zum Tissue Engineering geeignet ist (Ringe et al. 2002 b).

Während für humane mesenchymale Stammzellen eine Reihe spezifischer Oberflächenmarker identifiziert wurden (Huss 2000; Ikeda et al. 2006), ist deren Zahl bei porcinen mesenchymalen Stammzellen bislang limitiert (Ringe et al. 2002 b, Moscoso et al. 2005). Ebenso wurden Kulturbedingungen für die Proliferation und Differenzierung von porcinen mesenchymalen Stammzellen noch nicht klar definiert (Bosch et al. 2006).

Hinsichtlich eines zukünftigen Einsatzes zum Tissue Engineering von Knochen im Rahmen eines porcinen Tiermodells sollte die vorliegende Arbeit weiteren Aufschluss über das knochenspezifische Verhalten porciner mesenchymaler Stammzellen *in vitro* geben.

1.6 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, in einem porcinen Tiermodell das osteogene Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen *in vitro* zu analysieren.

Die Fragen, die in der Arbeit beantwortet werden sollten, waren folgende:

1. Sind porcine mesenchymale Stammzellen osteogen induzierbar?
2. Wie ändert sich die Zellmorphologie im Laufe der Kultivierung und osteogenen Differenzierung?

3. Wie ändert sich der (osteogene) Phänotyp der Zellen, insbesondere die Expression osteoblastärer Markerproteine wie Kollagen I, Kollagen III und Osteocalcin auf Proteinebene?

4. Welchen Einfluss haben Kulturdauer bzw. Induktionsdauer auf den osteogenen Phänotyp der porcinen mesenchymalen Stammzellen?

2 Material und Methoden

Die verwendeten Materialien und Geräte sind im Anhang aufgelistet (s. 7.1).

2.1 Versuchsaufbau

Zur Analyse des knochenspezifischen Verhaltens kultivierter porciner mesenchymaler Stammzellen (pMSC) wurden diese nach 14-tägiger osteogener Induktion mit Hilfe des Zytospin-Verfahrens isoliert und immunzytochemisch auf ihre Osteocalcinexpression hin untersucht. Ferner wurden die Kollagen-I-, Kollagen-III- und Osteocalcinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen der zweiwöchigen Induktionszeit mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) quantifiziert (s. 7.2).

2.2 Übersicht und Nomenklatur der Zelllinien

Die verwendeten pMSC entstammten einer vorangegangenen Untersuchung zur Etablierung geeigneter Kulturbedingungen multipotenter pMSC.

Die Zellen wurden aus Beckenkammspongiosa adulter Minischweine (n=9) isoliert und subkultiviert. Die Zellen der ersten, zweiten und dritten Passage wurden nach Zusatz von 10% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma) zum Kulturmedium (s. 2.3) bis zur Durchführung der vorliegenden Untersuchung bei -70° C in 1,8 ml Cryo Tube Vials (Nunc) gelagert. Somit standen 27 Zelllinien (neun Minischweine S₂-S₁₀ mit je drei Passagen P₁-P₃) zur Verfügung. Pro Zelllinie wurden eingefrorene Aliquots von 1 ml mit circa 1·10⁶ Zellen/ml eingesetzt. Lediglich S₃P₃ mußte durch Subkultivierung aus S₃P₂ gewonnen werden.

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Arbeitsbedingungen in einer Reinraumwerkbank (BHA 48; Faster).

2.3 Herstellung der Nährmedien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit Kulturmedium, das wie folgt hergestellt wurde:

Steril filtriertem Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM; Biochrom AG) wurden 10% fötales Kälberserum (Perbio), 100 I.E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Penicillin/Streptomycin; Biochrom) und 1 mmol/l Ascorbinsäure (Sigma) zugesetzt.

Das osteogene Induktionsmedium bestand aus steril filtriertem DMEM, 10% fötalem Kälberserum, 100 nM Dexamethason (Serva Feinbiochemica), 10 mM beta-Glycerolphosphat (Sigma), 52 mg/l Ascorbinsäure (180 µmol/l) und 230 mg/l Calciumchlorid (Sigma).

Als Sterilitätskontrollen wurden je 10 ml aller hergestellten Nährmedien in T-75-Kulturflaschen (Sarstedt) im Brutschrank (HERA cell 240; Heraeus) bei 37° C und 5% CO₂ mitgeführt.

2.4 Auftauen der Zelllinien

Die bei -70°C gelagerten Zellsuspensionen wurden aufgetaut, mit einer 1 ml Pipette (Sarstedt) in ein 50 ml Falcon Tube (Sarstedt) überführt und in 10 ml Kulturmedium mit einer 10 ml Pipette (Sarstedt) vorsichtig resuspendiert. Diese Suspension wurde für fünf Minuten bei 1.200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Centrifuge 5702R, Eppendorf). Der Überstand der Zellsuspension wurde sofort mit einer abgeflamten Pasteur-Pipette (Assistant) abgesaugt, um das für die Zellen bei Raumtemperatur toxische DMSO zu entfernen. Das verbliebene Zellpellet wurde in 1 ml frischen Kulturmedium gelöst.

2.5 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzählung und Vitalitätsbestimmung erfolgte nach der sogenannten Ausschluss- oder Exklusionsmethode. Diese basiert auf der Tatsache, dass geladene Teilchen (hier Trypanblau) oberhalb eines bestimmten Molekülradius die Zellmembran lebender Zellen nicht passieren können. Dies ist nur möglich, wenn die Zellmembran geschädigt bzw. schon zerstört ist. Bei lebenden Zellen gelangt der Farbstoff nicht in das Zellinnere, während sich tote Zellen mit dem betreffenden Farbstoff blau anfärben lassen. Dieser Ausschlusstest ist einfach durchzuführen und erlaubt eine rasche Quantifizierung (Lindl 2002).

Für die Zellzählung wurden $20\ \mu\text{l}$ der Zellsuspension mit einer Eppendorf-Pipette (Eppendorf) abgenommen und mit $20\ \mu\text{l}$ Trypanblau (Gibco) in einem 1,5 ml Reagiergefäß (Sarstedt) vorsichtig vermischt. Mit der gefärbten Zellsuspension wurde eine Neubauer Zählkammer (vier Kammern à $0,1\ \mu\text{l}$ Volumen) befüllt. Unmittelbar danach wurden die Zellen in den vier Kammern mit dem Umkehr-Mikroskop (Diavert, Leitz) bei 10facher Vergrößerung ausgezählt. In einem Zellzählungsprotokoll wurde die Anzahl vitaler (farbloser) und avitaler (blaugefärbter) Zellen notiert.

Mit vier Zählkammern von je $V = 0,1\ \mu\text{l}$ Volumen, dem Verdünnungsfaktor $f=2$ (bestehend aus den Volumina der Zellsuspension und des Trypanblau) und der Anzahl N_{vital} der lebenden Zellen in allen vier Kammern ergibt sich die Konzentration C der Zellen (Anzahl vitaler Zellen pro μl) gemäß:

$$C = \frac{f \cdot N_{\text{vital}}}{4 \cdot V}$$

Der prozentuale Anteil R vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl N_{gesamt} , der Summe vitaler und toter Zellen, ergibt sich gemäß:

$$R = \frac{N_{\text{vital}}}{N_{\text{gesamt}}} \cdot 100\%$$

2.6 Kultivierung der pMSC

Von der Zelllinie S2P2 wurden $1,875 \cdot 10^5$ aufgetaute Zellen (2.500 Zellen pro cm^2) mit 10 ml Kulturmedium in eine T-75-Kulturflasche (Sarstedt) ausgesät und im Brutschrank bei 37°C , 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 kultiviert. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt. Bei Erreichen einer 70%-80%igen Konfluenz des Zellrasens (Kontrolle unter dem Umkehrmikroskop) wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium mit einer 10 ml Pipette in einem 50 ml Falcon Tube gesammelt. Die Kulturflasche wurde für drei Minuten mit 10 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS; Gibco) gefüllt. Anschließend wurde das D-PBS mit einer abgeflamnten Pasteur-Pipette abgesaugt, und 1,5 ml Accutase (PAA) wurden mit einer Transferpipette (Sarstedt) so in die Kulturflasche getropft, dass der gesamte Boden benetzt war. Die Kulturflasche wurde für 15 Minuten in den Brutschrank gestellt. Unter Verwendung des zuvor gesammelten Nährmediums wurden nun die adhärennten Zellen vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde wieder in das 50 ml Falcon Tube transferiert und für fünf Minuten bei 1.200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer abgeflamnten Pasteur-Pipette abgesaugt und das Zellpellet mit 1-2 ml Kulturmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zellzählung (s. 2.5).

2.7 Osteogene Induktion der pMSC

Zur Analyse des knochenspezifischen Verhaltens der pMSC *in vitro* wurden die Zellen nun wie folgt osteogen induziert:

Nach der Zellzählung wurde jede Zellsuspension mit 50.000 Zellen pro Vertiefung (entsprechend 5.000 Zellen pro cm^2) in je drei Vertiefungen einer 6-Well-Multischale (Nunc) zur weiteren Kultivierung ausgesät. Jede 6-Well-Multischale erhielt somit zwei Zelllinien. Jede Vertiefung wurde mit 2 ml Kulturmedium aufgefüllt, und durch vorsichtiges Schwenken der Platte wurden die Zellen gleichmäßig verteilt.

Alle drei bis vier Tage erfolgte ein Medienwechsel. Dazu wurde das Nährmedium mit einer abgeflamnten Pasteur-Pipette abgesaugt und 2 ml frisches Nährmedium vorsichtig in jede Vertiefung geträufelt.

Nachdem der Zellrasen in den Vertiefungen zu 70%-80% konfluent war (tägliche Durchmusterung unter dem Umkehr-Mikroskop), wurden die Zellen für 14 Tage nach folgendem Schema osteogen induziert (s. Abb. 3):

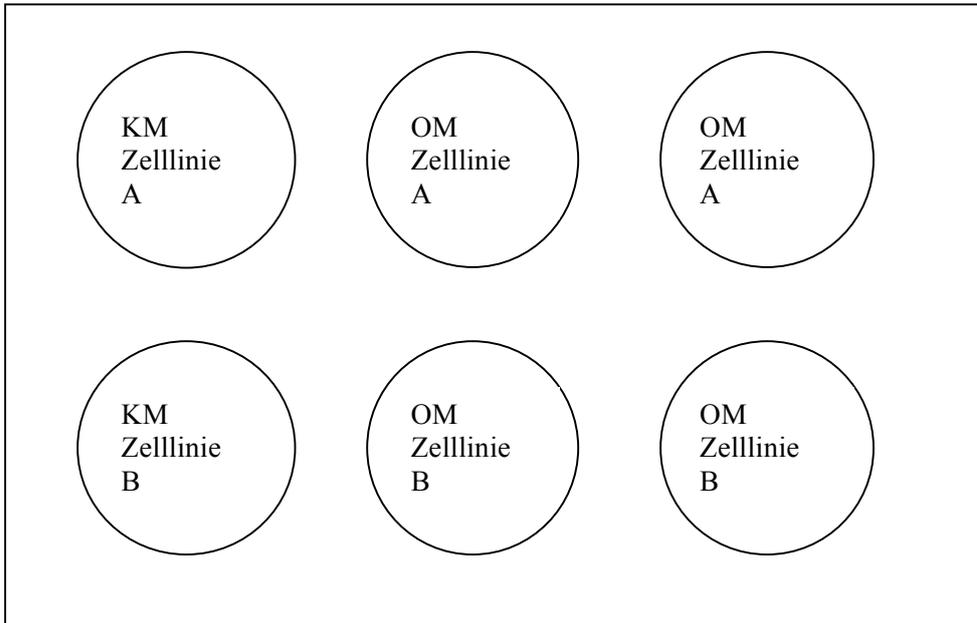


Abb. 3: Aussaatschema für die Zelllinien in den 6-Well-Multischalen. KM=Kulturmedium, OM=osteogenes Induktionsmedium.

Die erste Vertiefung jeder Zelllinie wurde mit je 2 ml Kulturmedium als Kontrollmedium aufgefüllt, die anderen beiden Vertiefungen wurden mit je 2 ml osteogenem Induktionsmedium beschickt.

2.8 Kontrolle von Zellproliferation und Zelldifferenzierung, Sammeln der Zellkulturüberstände

Zur Verlaufskontrolle von Zellwachstum und Zelldifferenzierung wurden die Zellkulturen unmittelbar vor jedem Medienwechsel bei zehnfacher Vergrößerung mit dem Umkehr-Mikroskop durchgemustert und fotografiert (Nikon Coolpix 5000, Nikon).

Die Medienwechsel erfolgten auch während der 14-tägigen Induktion alle drei bis vier Tage. Der jeweilige Zellkulturüberstand jeder Vertiefung wurde mit einer Eppendorf-Pipette in je ein beschriftetes 3,5 ml Cryo Tube (Cellstar; Greiner Labortechnik) überführt. Die Zellkulturüberstände des ersten und zweiten Medienwechsels (erste Woche) und des dritten und vierten Medienwechsels (zweite Woche) wurden gepoolt. Die gepoolten Überstände wurden bis zur weiteren Analyse bei -20° C gelagert.

2.9 Passagieren der pMSC aus den 6-Well-Multischalen

Nach 14-tägiger Induktion wurden die Zellen vom Boden der 6-Well-Multischalen abgelöst. Jede Vertiefung der 6-Well-Multischale wurde für drei Minuten mit 2 ml D-PBS inkubiert. Jede Vertiefung wurde anschließend mit 0,7 ml Accutase beschickt und für 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurden die mit Accutase abgelösten Zellen jeder Vertiefung mit je 4 ml Kulturmedium bzw. osteogenem Induktionsmedium (für die induzierten Zellen) aus einer 10 ml Pipette abgespült und anschließend in separate 50 ml Falcon Tubes überführt und suspendiert. Die Zellsuspensionen wurden dann fünf Minuten mit 1.200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand mit einer abgeflamten Pasteur-Pipette abgesaugt und die Zellen zweimal mit 5 ml Phosphate Buffered Saline (PBS; Biochrom; pH=7,4; Rezept s. 2.13.1) gewaschen. Dazu wurden 5 ml steriles PBS in das 50 ml Falcon Tube pipettiert, das Zellpellet resuspendiert und die Zellsuspension erneut zentrifugiert. Das PBS wurde abgesaugt und der Vorgang wiederholt. Nach dem zweiten Waschgang wurde mit einer Eppendorf Pipette 10% bovines Serumalbumin (BSA; Sigma) in Tris Buffered Saline (TBS (Rezept s. 2.11.1)) zugegeben und die Zellsuspension erneut resuspendiert.

2.10 Zytospin-Verfahren

Zur Ermittlung des osteogenen Differenzierungspotentials der pMSC wurde das Zytospin-Verfahren eingesetzt, bei dem Zellen einer Zellsuspension mittels Zytospin-Zentrifuge auf Glasobjektträger geschleudert werden. Dieses ermöglicht die spätere immunzytochemische Charakterisierung von aus Zellverbänden isolierten Zellen.

Pro Zelllinie (n=27) standen drei Zellsuspensionen (einmal mit Kulturmedium, zweimal mit osteogenem Induktionsmedium kultiviert) zur Verfügung. Pro Zellsuspension wurden vier bis acht Objektträger angelegt.

War das Zellpellet nach dem Waschen mit PBS (s. 2.9) mit bloßem Auge nicht sichtbar, wurden die Zellen mit je 50 µl 10% BSA in TBS pro Objektträger mit einer Eppendorf-Pipette resuspendiert. War das Zellpellet hingegen sichtbar, wurden die Zellen zunächst mit je 50 µl PBS pro Objektträger verdünnt und erst danach mit je 50 µl 10% BSA in TBS pro Objektträger resuspendiert. Die zuvor mit Ethanol (Merck) gereinigten und beschrifteten Objektträger (AL) wurden mit dem Filterpapier (Shandon; raue Seite nach oben) und dem Füllstopfen in den Zytoclip (Metallclip) der Zytospin-Zentrifuge (Thermo Shandon) eingespannt. Die Zentrifuge wurde mit den Objektträgern symmetrisch bestückt, die Füllstopfen mit je 50 µl Zellsuspension beschickt und bei 1.000 Umdrehungen pro Minute fünf Minuten zentrifugiert. Waren nach mikroskopischer Kontrolle zu wenig Zellen auf den Objektträgern, wurde der Vorgang unter Verwendung desselben Objektträgers mit neuem Filterpapier mit 50 µl Zellsuspension wiederholt. Waren zu viele Zellen

auf den Objektträgern, wurde der Vorgang insgesamt wiederholt, dann aber mit nur 25 µl Zellsuspension.

Die Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

2.11 Immunzytochemischer Nachweis von Osteocalcin

Zur Prüfung der Osteogenität der pMSC erfolgte der immunzytochemische Nachweis von Osteocalcin, einem späten Marker der osteogenen Differenzierungskaskade.

2.11.1 Herstellung und Vorbereitung der Reagenzien

Herstellung von TBS:

7,85g 0,05M TRIS/HCl (Sigma), 8,76g 0,15M Natriumchlorid (Merck) wurden auf dem Magnetrührer in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst.

Herstellung des 1% BSA in TBS:

0,5g BSA wurden in 50 ml TBS in einem 50 ml Falcon Tube gelöst.

Saures Hämalaun nach Meyer (Merck) wurde durch einen Papierfilter filtriert.

Kaiser's Glyceringelatine (Merck) wurde im Brutschrank erwärmt, bis sie flüssig war.

2.11.2 Durchführung des immunzytochemischen Nachweises

Als Positivkontrollen für den immunzytochemischen Nachweis von Osteocalcin dienten aus in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem porcinen Knochengewebe angefertigte und auf Objektträger gebrachte Gewebeschnitte.

Diese wurden zunächst entparaffiniert. Dazu wurden die Objektträger dreimal für je zehn Minuten in einer Küvette mit frisch angesetztem Xylol (Merck) inkubiert. Anschließend wurden sie in eine absteigende Alkoholreihe für jeweils fünf Minuten (von 100% bis zu 50%) gegeben. Zum Schluss wurden sie fünf Minuten in destilliertes Wasser mit 3% Wasserstoffsuperoxid (Merck) gestellt, um die im Gewebe enthaltene endogene Peroxidase zu inaktivieren. Dies ist wichtig, da der sekundäre Antikörper mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist. Würde man die endogene Peroxidase nicht inaktivieren, käme es beim Anfärben zu einer falsch-positiven Reaktion (s.u.).

Die Schnitte wurden danach getrocknet und mit einem Dakopen (Dako) umkreist.

Die bei -20° C gelagerten Objektträger (s. 2.10) wurden aufgetaut, luftgetrocknet, beschriftet und für zehn Minuten in einer Küvette mit Aceton (Merck) fixiert und luftgetrocknet. Die anzufärbenden Zellen wurden mit einem Dakopen umkreist. Anschließend wurden die Objektträger für fünf Minuten in eine Küvette mit frisch angesetztem Methanol (Merck) mit 0,6% Wasserstoffsuperoxid gestellt, um auch hier die endogene Peroxidase zu inaktivieren

Danach wurden alle Objektträger für fünf Minuten in destilliertem Wasser gespült, für fünf Minuten in TBS auf dem Schüttler (HS 250 basic; IKA Labortechnik) gewaschen und getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit je 50 µl des primären Antikörpers (monoklonaler Maus-Anti-Schwein-Anti-Osteocalcin-Antikörper, Abcam ab) inkubiert. Dies erfolgte mit einer Verdünnung von 1:50 in 1% BSA in TBS über Nacht bei 4° C in einer feuchten Kammer.

Für die Negativkontrollen wurden unter gleichen Bedingungen je 50 µl 1% BSA in TBS jedoch ohne Zusatz des primären Antikörpers eingesetzt.

Danach wurden die Objektträger dreimal für jeweils fünf Minuten in TBS auf dem Schüttler gewaschen. Die Präparate wurden mit je 50 µl des sekundären Antikörpers (StrepABCComplex/HRP Mouse/Rabbit Gebrauchslösung, Dako) für 30 Minuten inkubiert und anschließend dreimal für je fünf Minuten in TBS gewaschen. An diesen sekundären Antikörper ist das Enzym HRP konjugiert. HRP oxidiert Substanzen, wie 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), wodurch ein braunes Endprodukt gebildet wird (Boenisch et al. 2003).

Währenddessen wurde in einem 10 ml Röhrchen (Sarstedt) 1 Tablette 3,3'-Diamino-benzidin-tetrahydrochlorid (Sigma) in 10 ml TBS aufgelöst und 10 µl 30%iges Wasserstoffsuperoxid (Merck) dazugegeben. Mit je 50 µl dieser DAB-Substratlösung wurden die Zellen für drei bis fünf Minuten gefärbt.

Die Objektträger wurden anschließend fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen, 45 Sekunden in saurem Hämalaun nach Meyer inkubiert, zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut, kurz in destilliertes Wasser getaucht und die Objektträger mit Kaiser's Glyceringelatine eingedeckelt. Die eingedeckelten Objektträger wurden über Nacht getrocknet und unter dem Mikroskop (Leitz) durchgemustert.

2.12 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der gefärbten Zelllinien sowie der Positiv- und Negativkontrollen erfolgte verblindet. Es wurden pro Objektträger jeweils 100 Zellen ausgezählt und von diesen die Anzahl gefärbter und ungefärbter Zellen protokolliert. Diese Zellzählung fand zweimal im Abstand von sieben Tagen statt.

Zudem wurden die Zellen unter dem Mikroskop bei 10- und 20facher Vergrößerung mit der Digitalkamera fotografiert.

2.13 Bestimmung von Kollagen I in den Zellkulturüberständen

Um Aufschluss über das osteogene Verhalten und die Syntheseleistung der pMSC zu bekommen, wurde Kollagen I, ein früher Marker der osteogenen Differenzierungskaskade, in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt.

Dieser ELISA beruht auf einer zweistufigen Antigen-Antikörper-Reaktion. Das Antigen wird zunächst an ein Trägermaterial (Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte (MTP)) gebunden und dann dem primären Antikörper ausgesetzt. Dem entstehenden Antigen-Antikörper-Immunkomplex wird ein enzymkonjugierter sekundärer Antikörper angelagert, dessen Enzym mit einem Chromogen reagiert. Die dabei auftretende Farbreaktion ist ein Maß für die Konzentration des Antigens und lässt sich photometrisch bestimmen.

2.13.1 Vorbereitung des Kollagen-I-ELISA

Herstellung von PBS:

Es wurden 35,6g Dinatriumhydrogenphosphat (Merck) in einem Becherglas mit Magnetstäbchen mit 1.500 ml destilliertem Wasser und 13,6g Kaliumdihydrogenphosphat (Merck) in 1.000 ml destilliertem Wasser auf dem Magnetrührer (IKA Labortechnik) gelöst. Anschließend wurde der Dinatriumhydrogenphosphatlösung solange Kaliumdihydrogenphosphat-lösung hinzugefügt, bis mit einem geeichten pH-Meter (inoLab) ein pH-Wert von 7,4 eingestellt war. Diese Lösung wurde mit destilliertem Wasser in einem Meßkolben auf 2.000 ml aufgefüllt und gemischt.

Herstellung des 3% BSA in PBS:

1,5g BSA wurden in einem 50 ml Falcon Tube in 50 ml PBS gelöst.

Herstellung von 0,1% Tween 20:

100 ml PBS und 100 µl Tween 20 (Merck) wurden in einem Reagiergefäß vermischt.

Herstellung von 1N Schwefelsäure:

Es wurden zuerst 8,5 ml destilliertes Wasser pro MTP in ein 50 ml Falcon Tube gegeben. Erst danach wurden 500 µl 95%ige Schwefelsäure (Merck) hinzugefügt. Diese Reihenfolge ist unbedingt einzuhalten!

Herstellung der Standardverdünnungsreihe:

Pro MTP (96-Well-Mikrotiterplatte; Nunc) wurde für das Antigen Kollagen I ein Standard (Kollagen Typ I vom Schwein; Biologo) als geometrische Verdünnungsreihe mitgeführt. Zuerst wurden sieben 1,5 ml Reagiergefäße (Sarstedt) zur Aufnahme des Antigens Kollagen I mit 125; 62,5; 31,3; 15,6 und 7,8 ng beschriftet. Im ersten Reagiergefäß wurden 2,5 µl (125 ng Kollagen I) des Antigens Kollagen I und 500 µl PBS gemischt, in die anderen sechs Reagiergefäße wurden je 250 µl PBS vorgegeben. Aus dem ersten Reagiergefäß wurden 250 µl entnommen und in das zweite Reagiergefäß überpipettiert und gemischt. Als nächstes wurden aus dem zweiten Reagiergefäß 250 µl entnommen und in das dritte Reagiergefäß gegeben usw. 250 µl aus dem letzten Reagiergefäß wurden verworfen.

2.13.2 Durchführung des Kollagen-I-ELISA

Die Beschickung der MTP erfolgte nach dem folgenden Protokoll (s. Tabelle 1). Dabei wurden Standards und Proben (Nährmedium, PBS und gesammelte Überstände) doppelt bestimmt.

	[ng]	[ng]										
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
<u>A</u>	KM	OM	PBS	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<u>B</u>	KM	OM	PBS	„	„	„	„	„	„	„	„	„
<u>C</u>	125	125	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<u>D</u>	62,5	62,5	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„
<u>E</u>	31,3	31,3	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
<u>F</u>	15,6	15,6	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„
<u>G</u>	7,8	7,8	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
<u>H</u>	PBS	PBS	„	„	„	„	„	„	„	„	„	„

Tabelle 1: Beispielprotokoll der Beschickung einer Mikrotiterplatte für den Kollagen-I-ELISA. Sowohl bei den Kontrollen, als auch bei der Standardreihe und den Überständen erfolgten Doppelbestimmungen. Spalten 1 und 2: Kollagen-I-Gehalt in [ng]. OM= osteogenes Induktionsmedium; KM= Kulturmedium; PBS=Phosphate Buffered Saline, 1-39: Proben.

Je 100 µl der Antigenverdünnungen und 200 µl der Proben (Nährmedien, PBS und gesammelte Überstände) wurden in die Vertiefungen der MTP mit einer Pipette pipettiert.

Die MTP wurde mit einer Folie abgedeckt und über Nacht bei 4° C aufbewahrt.

Zur Entfernung eines Antigenüberschusses wurden die Vertiefungen der MTP dreimal mit je 200 µl PBS gewaschen. Das PBS wurde über dem Waschbecken ausgeschüttet und die MTP auf einem saugfähigen Papiertuch abgeklopft.

Mit einer 8-Kanal-Pipette (Eppendorf) wurden anschließend 200 µl 3% BSA in PBS in jede Vertiefung gegeben und die MTP für 60 Minuten auf den Schüttler gestellt. Der primäre Antikörper (polyklonaler Kaninchen-Anti-Schwein-Anti-Kollagen-Typ-I-Antikörper, Biologo) wurde mit einer Verdünnung von 1:200 angesetzt (1 Teil Antikörper und 200 Teile 3% BSA in PBS). 100 µl der Antikörperverdünnung wurden in die Vertiefungen der MTP pipettiert und die Platte für 90 Minuten auf den Schüttler gestellt.

Anschließend wurde die MTP, wie beschrieben, dreimal mit PBS gewaschen.

Der sekundäre Antikörper (Peroxidase gebundenes Anti-Kaninchen-IgG, Biologo) wurde in einem Verhältnis von 1:500 angesetzt (1 Teil sekundärer Antikörper, 500 Teile 3% BSA in PBS). Je 100 µl des sekundären Antikörpers wurden in die Vertiefungen der MTP pipettiert und die Platte für 90 Minuten auf dem Schüttler inkubiert.

Die Vertiefungen der MTP wurden dreimal mit je 200 µl PBS mit 0,1% Tween 20 gewaschen. Währenddessen wurde das Chromogen nach Herstellerangaben angesetzt. Hierzu wurden 10 ml destilliertes Wasser mit 4 Tropfen Pufferkonzentrat, 6 Tropfen TMB-Konzentrat und 4 Tropfen Wasserstoffsuperoxid aus dem Peroxidase Substrat Kit (Vector) in einem 50 ml Falcon Tube vermischt. Von diesem Chromogen wurden 100 µl in jede Vertiefung der MTP pipettiert und lichtgeschützt für zehn Minuten inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl 1N Schwefelsäure gestoppt. Die MTP wurde daraufhin im Photometer (Behring; ELISA Reader) bei 450 nm abgelesen.

2.14 Bestimmung von Kollagen III in den Zellkulturüberständen

Da Kollagen III in geringen Mengen im Knochen vorkommt, erfolgte die Kollagen III Bestimmung in den Zellkulturüberständen analog zum Kollagen I ELISA (s. 2.13). Folgende Unterschiede bestanden:

Es wurden sieben Reagiergefäße zur Aufnahme des Kollagen-III-Antigens für die geometrische Verdünnungsreihe mit 25; 12,5; 6,3; 3,1 und 1,6 ng beschriftet. Im ersten Reagiergefäß wurden 1 µl (25 ng) Kollagen III (Kollagen Typ III vom Rind; Biologo) und 1.000 µl PBS vermischt, in die anderen sechs Reagiergefäße wurden 250 µl PBS vorgegeben. Das Überpipettieren erfolgte wie unter 2.13.1 beschrieben.

Bei dem primären Antikörper handelte es sich hier um einen polyklonalen Kaninchen-Anti-Rind-Antikörper (Biologo), der laut Herstellerangaben mit Schwein kreuzreagiert und mit einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt wurde.

2.15 Bestimmung von Osteocalcin in den Zellkulturüberständen

Zur weiteren Überprüfung der Syntheseleistung der pMSC diente die Bestimmung von Osteocalcin, einem späten Marker der osteogenen Differenzierungskaskade, in den Zellkulturüberständen mittels ELISA.

Hierzu wurde das Bone-Gla-Protein Bio AssayTM ELISA Kit (US Biological) verwendet. Es enthält eine mit einem monoklonalen Maus-Anti-Mensch-Anti-Gla-Osteocalcin Antikörper beschichtete MTP, ein Standard Gla-Osteocalcin, ein Antikörperkonjugat (monoklonaler Maus Anti-Mensch Anti-Gla-Osteocalcin Antikörper gekoppelt an HRP), ein Verdünnungsmittel für die Proben und eine Substratlösung. Der Anti-Gla-Osteocalcin-Antikörper kreuzreagiert laut Herstellerangaben mit Schwein.

2.15.1 Vorbereitung des Osteocalcin-ELISA

Herstellung von PBS:

8g Natriumchlorid (NaCl; Merck), 0,2g Kaliumchlorid (KCl), 2,9g Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4 , Merck) und 0,2g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4 , Merck) wurden in 1.000 ml destilliertem Wasser gelöst.

Herstellung von 1N Schwefelsäure: s. 2.13.1.

Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden folgende Lösungen hergestellt:

Das Antikörperkonjugat wurde zehn Minuten lang in 11 ml destilliertem Wasser gelöst.

Das Standard-Gla-Osteocalcin wurde ebenfalls zehn Minuten lang in 1 ml Verdünnungsmittel für die Proben gelöst. Aus dieser Standardlösung mit 16 ng/ml Osteocalcin wurde unter Verwendung des Verdünnungsmittels für die Proben eine Verdünnungsreihe von 16 ng/ml bis 0,5 ng/ml Osteocalcin hergestellt.

2.15.2 Durchführung des Osteocalcin-ELISA

Standards und Proben (Zellkulturüberstände, Nährmedium und PBS) wurden gemäß Protokoll (s. Tabelle 1) doppelt bestimmt (s.auch 2.13.2). Je 100 μl der Standardlösungen bzw. der Proben (Zellkulturüberstände, Nährmedium oder PBS) wurden in die entsprechenden Vertiefungen der MTP pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen der MTP dreimal mit je 400 μl PBS gewaschen (s. auch 2.13.2).

Danach wurden je 100 μl des Antikörperkonjugats in die Vertiefungen der MTP pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden die Vertiefungen der MTP viermal gewaschen. Danach wurden je 100 μl Substratlösung in die Vertiefungen pipettiert und für 15 Minuten inkubiert. Mit je 100 μl 1N Schwefelsäure pro Vertiefung wurde die Reaktion abgestoppt und die Absorption bei 450 nm im Photometer bestimmt.

2.16 Statistische Methoden

Die Ergebnisse der Immunhistochemie wurden mit der deskriptiven Statistik ausgewertet.

Die Überprüfung der Zuverlässigkeit der Auszählung (Reliabilität) wurde mit dem Bland-Altman-Plot dargestellt.

Die Auswertung der ELISAs erfolgte mit deskriptiver Statistik.

Zusätzlich wurden die Extinktionsunterschiede der induzierten Ansätze bzw. der nicht induzierten Kontrollen durch einen Test bei gepaarten Stichproben (gepaarte Differenzen) geprüft.

Die Vergleiche der Passagen untereinander (Mehrfachvergleiche) wurden mit der Scheffe-Prozedur überprüft.

Der Vergleich der Kollagen I bzw. Kollagen III Konzentrationen vom 7. und 14. Tag wurde mit der Gruppenstatistik und dem Test bei gepaarten Stichproben ausgewertet.

Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (SPSS für Windows, Version 15). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Office Excel, Version 2003).

3 Ergebnisse

Für alle Experimente wurden die aus dem Knochenmark adulter Minischweine S₂ - S₁₀ (n=9) gewonnenen mesenchymalen multipotenten Stammzellen der ersten, zweiten und dritten Passage verwendet.

Eine Kontamination der Zellkulturen trat nicht auf, wie die mitgeführten Sterilitätskontrollen der Nährmedien zeigten.

3.1 Vitalität der verwendeten Zelllinien

Nach dem Auftauen der Zelllinien war der Anteil vitaler pMSC der ersten, zweiten und dritten Passage durchschnittlich 17,8 % niedriger als vor dem Einfrieren (s. Abb. 4). Nach dem Auftauen bestanden zudem größere interindividuelle Vitalitätsunterschiede als vor dem Einfrieren wie die Standardfehler der Mittelwerte zeigen. Der durchschnittliche Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl lag über 73,0%, so dass für alle Experimente ausreichend hohe Zellzahlen zur Verfügung standen. Eine Abnahme der Vitalität infolge längerer Kultivierungszeit bzw. höherer Passagezahl konnte nicht festgestellt werden.

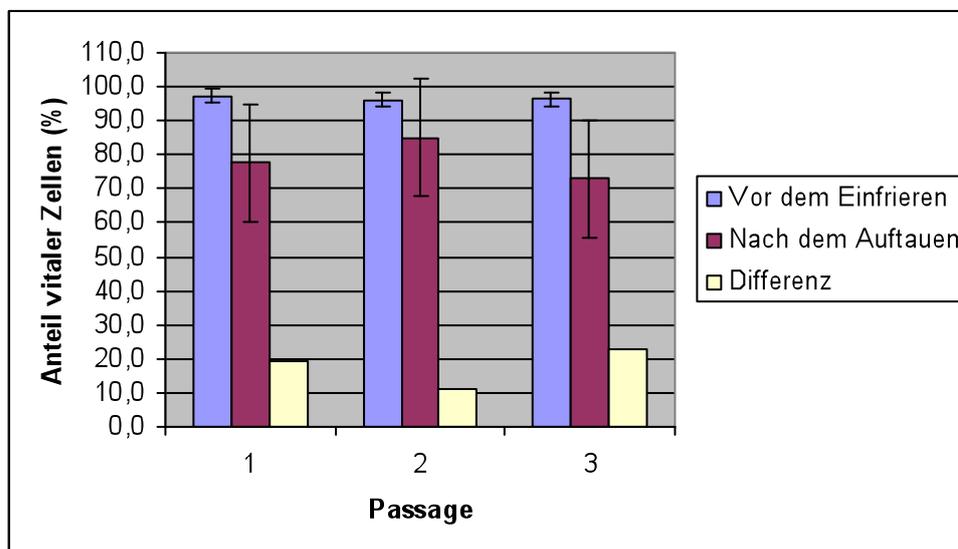


Abb. 4: Ergebnis der Vitalitätsbestimmung der porcinen mesenchymalen Stammzellen (n=27) vor Einfrieren und nach Auftauen. Anteil vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl in [%] für die 1., 2. und 3. Passage.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. Nach dem Auftauen war der Anteil vitaler Zellen aller Passagen niedriger als vor dem Einfrieren. Der durchschnittliche Anteil vitaler Zellen lag über 73,0% der Gesamtzellzahl.

3.2 Proliferation und Morphologie der kultivierten bzw. induzierten pMSC

Drei bis vier Tage nach Aussaat zeigte der Zellrasen im Phasenkontrast eine Konfluenz von 30% bis 40%. Nach sieben bis acht Tagen betrug die Konfluenz 70% bis 80%, und die Zellen hatten ein fibroblastenartiges Aussehen. Nach Erreichen der 70% bis 80%igen Konfluenz wurde mit der Induktion begonnen.

Die mit Kulturmedium kultivierten Zellen (Kontrollen) wiesen am dritten bis vierten Tag der Induktion eine Konfluenz von 90% auf, die bis zum Ende der zweiwöchigen Kultivierung auf 100% anstieg. Die Morphologie dieser Zellen war nach einer Woche überwiegend spindelförmig (s. Abb. 5), am Ende der zweiten Woche waren zusätzlich quaderförmige Zellen auf dem Kulturschalenboden zu sehen (s. Abb. 6).

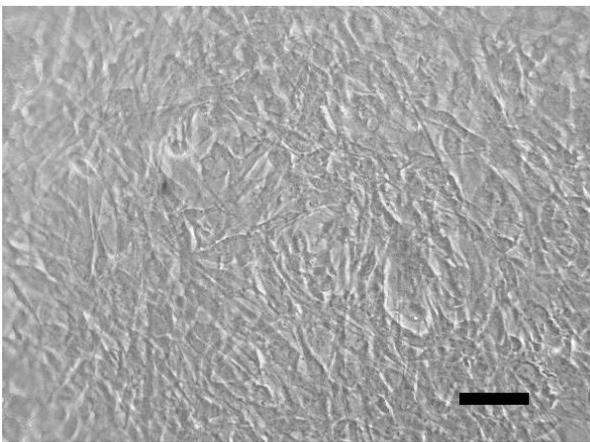


Abb. 5: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von mit Kulturmedium kultivierten Zellen (Kontrolle, nicht induzierte Zellkultur) nach siebentägiger Kultivierung. Die Morphologie der Zellen war spindelförmig. Die Konfluenz betrug 100% (zehnfache Vergrößerung). Balken = 100 μ m.

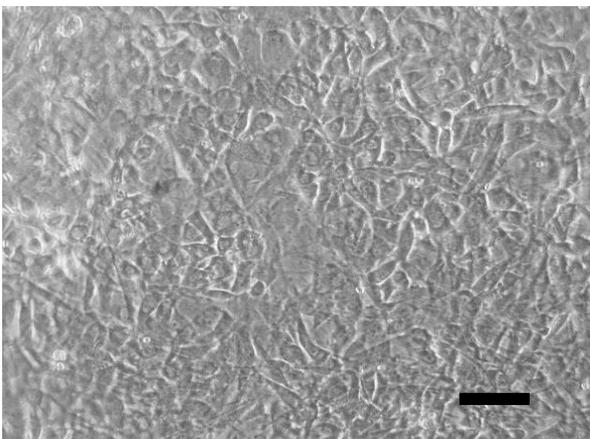


Abb. 6: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von mit Kulturmedium kultivierten Zellen (Kontrolle, nicht induzierte Zellkultur) nach 14-tägiger Kultivierung. Die Morphologie der Zellen war spindel- und quaderförmig. Die Konfluenz betrug 100% (zehnfache Vergrößerung). Balken = 100 μ m.

Die Konfluenz der mit osteogenem Induktionsmedium induzierten Zellen stieg bis zum vierten Tag nach der Induktion ebenfalls auf 90% an. Ab dem siebten Tag konnte eine beginnende osteogene Differenzierung beobachtet werden. Anders als bei den Kontrollansätzen bildeten sich zwischen dem siebten und zehnten Tag Zellinseln, in deren Mitte sich kreisförmige schwarze Ablagerungen befanden. Die Morphologie der Zellen war um diese schwarze Ablagerung, zur Mitte der Zellinsel hin, quaderförmig. Am Rande der Zellinsel zeigten sich spindelförmige Ausläufer (s. Abb. 7). Am Ende der zweiwöchigen Induktion lag die Konfluenz der Zellen nur noch zwischen 10% und 40% (s. Abb. 8).

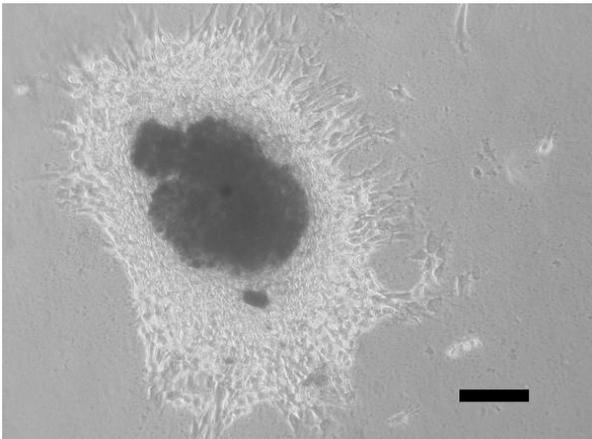


Abb. 7: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von mit osteogenem Induktionsmedium kultivierten Zellen nach siebentägiger Induktion. Die Zellen haben eine Insel mit zentraler schwarzer Ablagerung gebildet. Die Zellen im Zentrum der Insel waren quaderförmig, am Rand zeigten sie spindelförmige Ausläufer (zehnfache Vergrößerung). Balken = 100 μ m.

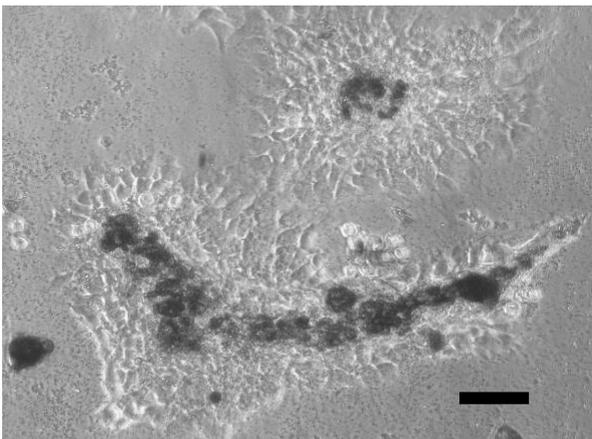


Abb. 8: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von mit osteogenem Induktionsmedium kultivierten Zellen nach 14-tägiger Induktion. Auffällig war auch hier die Inselbildung der Zellen mit zentralen schwarzen kreisförmigen Ablagerungen. Die Zellen waren quaderförmig, mit spindelförmigen Ausläufern am Rand der Zellinsel. Die Konfluenz betrug 10% bis 40% (zehnfache Vergrößerung). Balken = 100 μ m.

Bei der Passagierung für das Zytospin-Verfahren ließen sich in einigen Fällen die abgelösten Zellen trotz gründlicher Durchmischung nur eingeschränkt resuspendieren. Sie waren aneinander adhärent und bildeten Zellklumpen. In anderen Fällen konnten die Zellen nur unvollständig abgelöst werden. Sie waren dann dagegen problemlos resuspendierbar.

3.3 Ergebnisse der immunzytologischen Färbungen

Die nach Kultivierung mit osteogenem Induktionsmedium mit Hilfe des Zytospin-Verfahrens auf Objektträger gebrachten induzierten Zellen (und die nicht induzierten Kontrollen) wurden immunzytochemisch auf ihre Osteocalcinexpression als Parameter des osteogenen Phänotyps untersucht. Die Spezifität und

Sensitivität der immunzytologischen Färbung wurde durch das Mitführen von Positivkontrollen (porcines Knochengewebe) und Negativkontrollen (Inkubation ohne primären Antikörper) gesichert.

Die Quantifizierung der Osteocalcinexpression erfolgte durch zweimaliges verblindetes Auszählen der Osteocalcin-positiven und Osteocalcin-negativen Zellen im Abstand von sieben Tagen.

3.3.1 Reliabilität der Auszählung

Die Zuverlässigkeit der Auszählung (Intra Observer Reliability) lag bei der Kontrollgruppe, von vier Fällen abgesehen, bei >90% (s. Abb. 9).

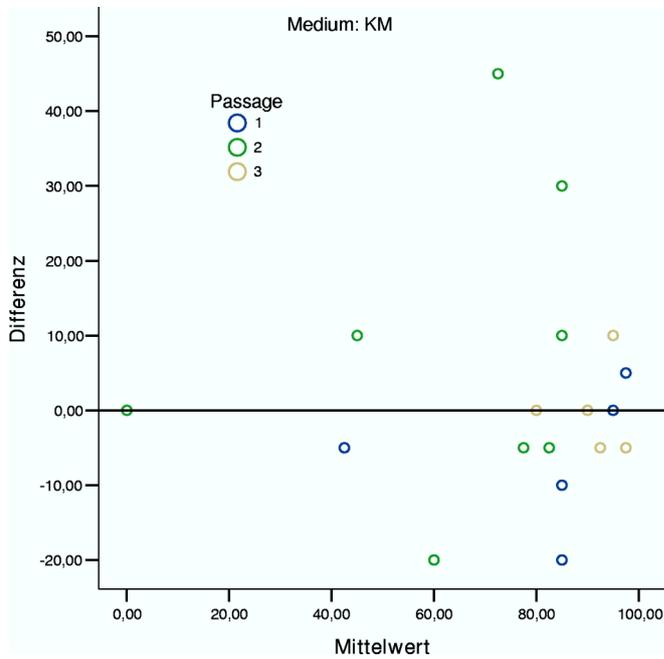


Abb. 9: Bland-Altman-Plot der Zellzählung der osteocalcinpositiven Zellen der nicht induzierten Kontrollen der ersten bis dritten Passage. Dargestellt ist die Differenz aus zwei Zellzählungen gegen den Mittelwert derselben. Die Nulllinie entspricht der 100%igen Übereinstimmung. Die Zuverlässigkeit der Auszählung lag, abgesehen von vier Fällen, bei >90%. KM=Kulturmedium.

Bei den osteogen induzierten Zellen lag die Zuverlässigkeit der Auszählung, von zwei Fällen abgesehen, bei >95% (s. Abb. 10).

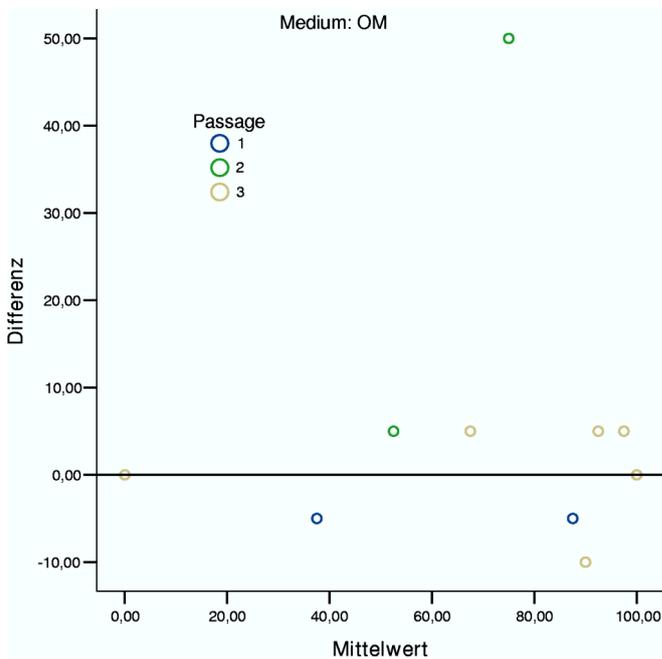


Abb. 10: Bland-Altman-Plot der Zellzählung der osteocalcinpositiven Zellen der osteogen induzierten Zellen der ersten bis dritten Passage. Dargestellt ist die Differenz aus zwei Zellzählungen gegen den Mittelwert derselben. Die Nulllinie entspricht der 100%igen Übereinstimmung. Die Zuverlässigkeit der Auszählung lag, abgesehen von zwei Fällen, bei >95%. OM=osteogenes Induktionsmedium.

3.3.2 Osteocalcinexpression

Sowohl die mit Kulturmedium als auch mit osteogenem Induktionsmedium induzierten Zellen exprimierten Osteocalcin. Der durchschnittliche Anteil der Osteocalcin-positiven Zellen lag bei induzierten und nicht induzierten Ansätzen zwischen 65% und 90% (s. Abb. 11). Bei den Zellen der 1. und 2. Passage war der Anteil Osteocalcin exprimierender Zellen nach Induktion höher, bei den Zellen der 3. Passage niedriger als bei den nicht induzierten Kontrollen. Einen statistisch signifikanten Unterschied gab es jedoch nicht, weder zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen noch zwischen den verschiedenen Passagen.

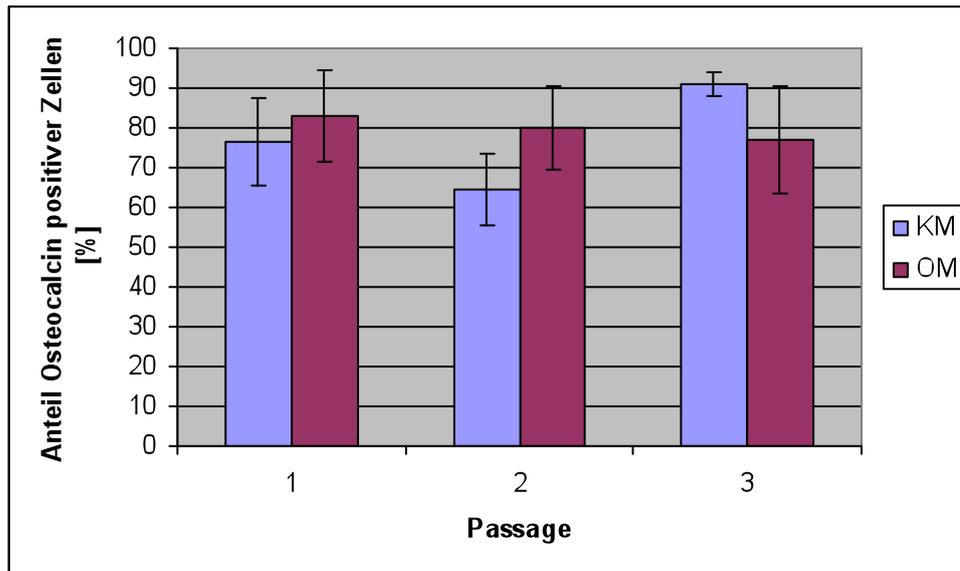


Abb. 11: Ergebnisse der immunzytochemischen Färbung der Osteocalcinexpression von induzierten bzw. nicht induzierten Zellen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler der Mittelwerte. KM= Kulturmedium, OM= osteogenes Induktionsmedium. Der Anteil Osteocalcin-positiver Zellen lag bei induzierten und nicht induzierten Zellen zwischen 65% und 90%. Signifikante Unterschiede bestanden nicht.

3.4 Kollagen-I-Konzentrationen in Zellkulturüberständen

Zur weiteren Charakterisierung des Effektes der osteogenen Induktion, wurden die 27 Zelllinien über 14 Tage mit osteogenem Medium kultiviert und die Zellkulturüberstände bei jedem Mediumwechsel gesammelt.

Die bis zum siebten Tag gewonnenen Überstände (erster und zweiter Medienwechsel) und die bis zum 14. Tag gewonnenen Überstände (dritter und vierter Medienwechsel) wurden gepoolt und die Kollagen-I-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt.

Die im ELISA gemessenen Extinktionswerte wurden mit Hilfe der Standardkurve in [ng/ml] umgerechnet. Extinktionen, die außerhalb der Standardkurven des ELISA lagen, wurden in die Auswertung nicht mit einbezogen.

3.4.1 Kollagen-I-Konzentrationen nach siebentägiger Kultivierung

Nach einwöchiger Induktion lagen die durchschnittlichen Kollagen-I-Konzentrationen in den Überständen der drei Passagen zwischen 317 ng/ml und 99 ng/ml. Bei den nicht induzierten Kontrollen waren mit Werten zwischen 190 ng/ml und 115 ng/ml deutlich niedrigere Konzentrationen messbar. In der ersten Passage war dieser Unterschied statistisch signifikant ($p=0,024$).

Sowohl bei den osteogen induzierten Zellkulturen als auch bei den Kontrollen nahmen die Kollagen-I-Konzentrationen mit steigender Passagezahl ab. Dieser Abfall war in den induzierten Überständen statistisch signifikant ($p=0,016$).

Da die in den Kontrollansätzen gemessenen Extinktionen bei den Ansätzen der dritten Passage unterhalb des linearen Bereichs der Standardkurven des ELISA lagen, wurden diese Werte in der Analyse nicht verwertet (s. Abb. 12).

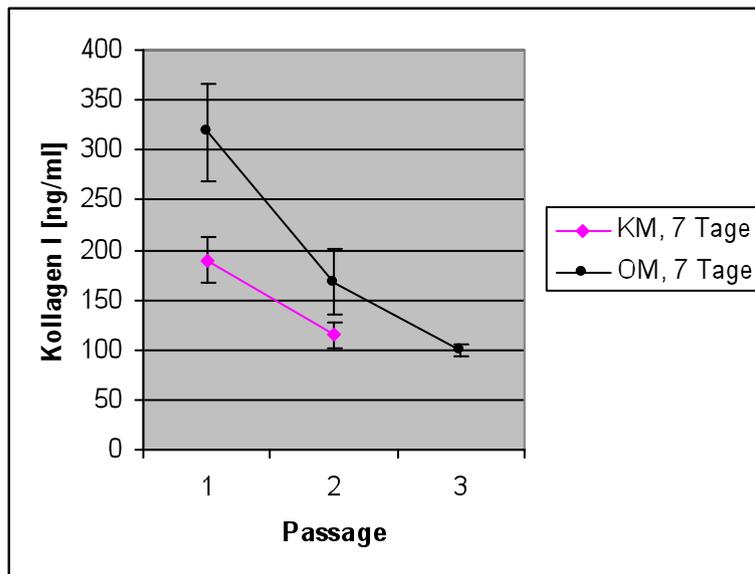


Abb. 12: Kollagen-I-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der Ansätze der ersten bis dritten Passage nach siebentägiger osteogener Induktion bzw. Kultivierung. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. KM= Kulturmedium, OM= osteogenes Induktionsmedium. Die Kollagen-I-Konzentrationen in den mit osteogenem Induktionsmedium induzierten Ansätzen waren gegenüber den mit Kulturmedium kultivierten Kontrollen in der ersten Passage signifikant höher ($p=0,024$). Die Kollagen-I-Konzentrationen nahmen mit steigender Passagezahl ab. Bei den induzierten Überständen war diese Abnahme statistisch signifikant ($p=0,016$).

3.4.2 Kollagen-I-Konzentrationen nach 14-tägiger Kultivierung

Mit der Kultivierungsdauer stiegen die Kollagen I Konzentrationen in den Zellkulturüberständen. In der zweiten Induktionswoche lagen die durchschnittlichen Kollagen-I-Konzentrationen der gepoolten induzierten Zellkulturüberstände zwischen 209 ng/ml und 309 ng/ml. In den induzierten Ansätzen der zweiten Passage wurde die höchste Konzentration ermittelt, die jedoch aufgrund ihres hohen Standardfehlers als Ausreißer interpretiert werden muß. Bei den nicht induzierten Kontrollen lagen die Kollagen-I-Konzentrationen zwischen 231 ng/ml und 209 ng/ml. Zwischen induzierten und nicht induzierten Ansätzen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Ferner blieben die Kollagen-I-Konzentrationen von der ersten bis zur dritten Passage in beiden Ansätzen weitgehend konstant (s. Abb. 13).

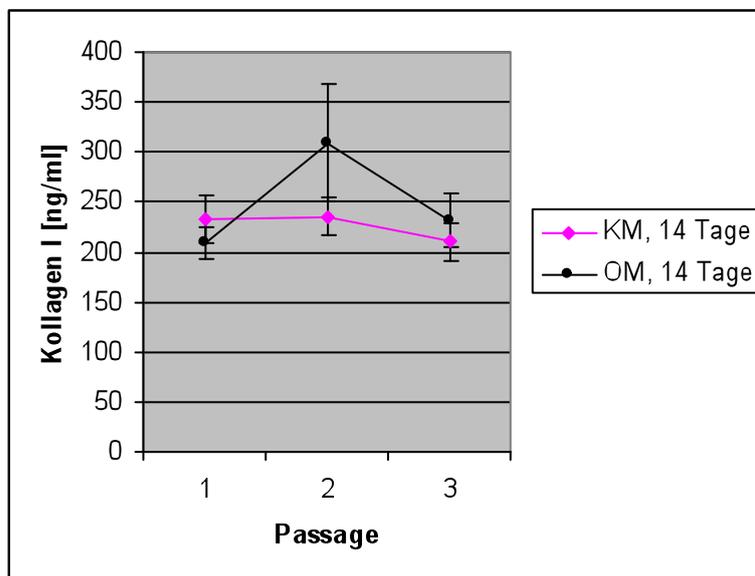


Abb. 13: Kollagen-I-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der Ansätze der ersten bis dritten Passage nach 14-tägiger osteogener Induktion bzw. Kultivierung. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. KM= Kulturmedium, OM= osteogenes Induktionsmedium. Die Kollagen-I-Konzentrationen in den mit osteogenem Induktionsmedium induzierten Ansätzen wiesen gegenüber den mit Kulturmedium kultivierten Kontrollen keine signifikanten Unterschiede auf.

3.4.3 Vergleich der Kollagen-I-Konzentrationen der induzierten Ansätze

Abb. 14 zeigt den Vergleich der Kollagen-I-Konzentrationen in den Überständen der induzierten Ansätze nach sieben- bzw. 14-tägiger Induktion.

Nach siebentägiger Induktion lagen diese in der ersten Passage bei 317 ng/ml und fielen bis zur dritten Passage auf 99 ng/ml ab (s. auch Abb. 12).

Nach 14-tägiger Induktion lagen die Kollagen-I-Konzentrationen in der zweiten und dritten Passage über denen nach siebentägiger Kultivierung. In der dritten Passage war dies statistisch signifikant ($p=0,037$) (s. Abb. 14).

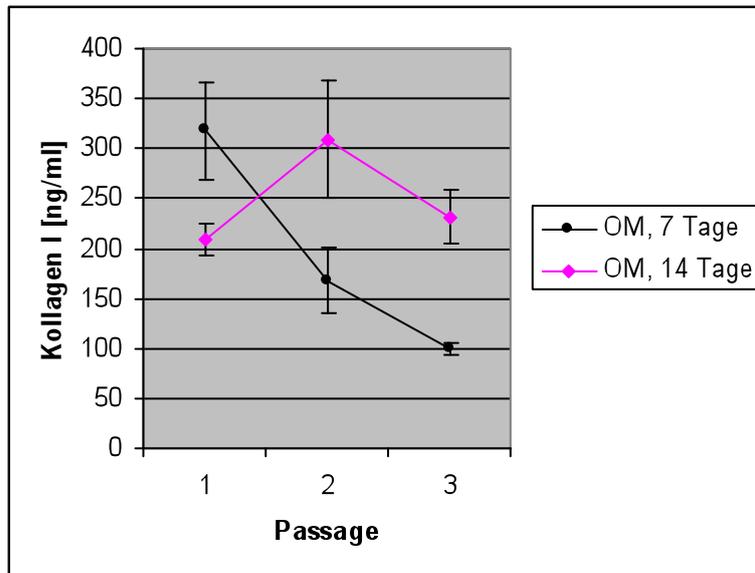


Abb. 14: Vergleich der Kollagen-I-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der induzierten Ansätze der ersten bis dritten Passage nach sieben- bzw. 14-tägiger Induktion. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. OM= osteogenes Induktionsmedium. Die Kollagen-I-Konzentrationen waren nach 14-tägiger Induktion in der zweiten und dritten Passage höher als die Konzentrationen nach siebentägiger Induktion. In der dritten Passage war dieser Unterschied statistisch signifikant ($p=0,037$).

3.4.4 Vergleich der Kollagen-I-Konzentrationen der Kontrollansätze

Die Kollagen-I-Konzentrationen der Kontrollansätze fielen nach siebentägiger Kultivierung von der ersten zur zweiten Passage von 190 ng/ml auf 115 ng/ml ab (s. auch Abb. 12).

Nach 14-tägiger Kultivierung waren die Konzentrationen mit 210 ng/ml bis 236 ng/ml höher als die Konzentrationen nach siebentägiger Kultivierung (s. Abb. 13 und 15). In der zweiten Passage war dieser Unterschied signifikant ($p=0,009$) (s. Abb. 15).

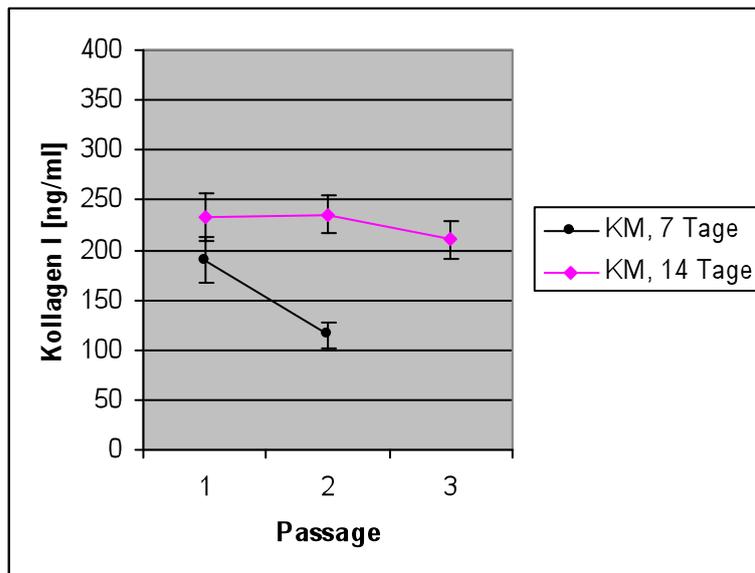


Abb. 15: Vergleich der Kollagen-I-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der Kontrollansätze der ersten bis dritten Passage nach sieben- bzw. 14-tägiger Kultivierung. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. KM= Kulturmedium. Die Kollagen-I-Konzentrationen waren nach 14-tägiger Kultivierung höher als die Konzentrationen nach siebentägiger Kultivierung. In der zweiten Passage war dieser Unterschied statistisch signifikant ($p=0,009$).

3.5 Kollagen-III-Konzentrationen in Zellkulturüberständen

Analog zur Bestimmung der Kollagen-I-Konzentrationen (s. 3.4) erfolgte die Bestimmung der Kollagen-III-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen während 14-tägiger Induktion in osteogen induzierten Zellkulturen bzw. nicht induzierten Kontrollen mittels ELISA.

3.5.1 Kollagen-III-Konzentrationen nach siebentägiger Kultivierung

Die Kollagen-III-Konzentrationen lagen in den osteogen induzierten Ansätzen nach siebentägiger Induktion zwischen 67 ng/ml und 21 ng/ml, in den Kontrollansätzen zwischen 60 ng/ml und 43 ng/ml (s. Abb. 16) und betragen damit ein Drittel bis ein Zehntel der Kollagen-I-Konzentrationen (vgl. Abb. 12).

Die Kollagen-III-Konzentrationen der induzierten und nicht induzierten Ansätze unterschieden sich in der ersten und zweiten Passage nicht wesentlich voneinander. Lediglich in den induzierten Ansätzen der dritten Passage waren die Kollagen-III-Konzentrationen mit 21 ng/ml statistisch signifikant geringer ($p=0,015$) als die der Kontrollen mit 43 ng/ml.

Die Kollagen-III-Konzentrationen nahmen von der ersten bis zur dritten Passage ab. Diese Abnahme war bei den induzierten Ansätzen von der ersten zur dritten Passage statistisch signifikant ($p<0,01$).

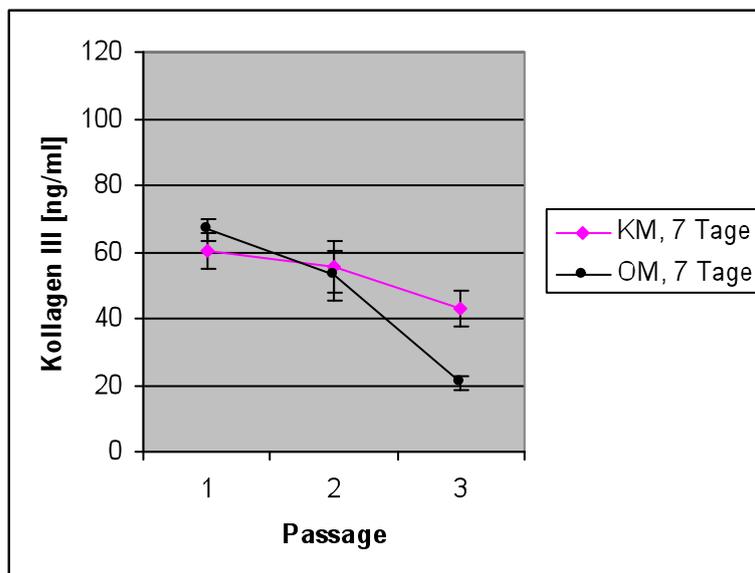


Abb. 16: Kollagen-III-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der Ansätze der ersten bis dritten Passage nach siebentägiger osteogener Induktion bzw. Kultivierung. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. KM= Kulturmedium, OM= osteogenes Induktionsmedium. Die Kollagen-III-Konzentrationen in den mit osteogenem Induktionsmedium induzierten Ansätzen waren gegenüber den mit Kulturmedium kultivierten Kontrollen in der dritten Passage statistisch signifikant niedriger ($p=0,015$). Die Kollagen-III-Konzentrationen nahmen jeweils von der ersten bis zur dritten Passage ab. In den induzierten Ansätzen war diese Abnahme statistisch signifikant ($p<0,01$).

3.5.2 Kollagen-III-Konzentrationen nach 14-tägiger Kultivierung

Nach 14-tägiger Kultivierung lagen die Kollagen-III-Konzentrationen der mit osteogenem Induktionsmedium induzierten Ansätzen zwischen 71 ng/ml und 29 ng/ml (s. Abb. 17) und betragen damit ein Drittel bis ein Achtel der Kollagen-I-Konzentrationen (vgl. Abb. 13). Die Kollagen-III-Konzentrationen der Kontrollansätze lagen zwischen 77 ng/ml und 97 ng/ml (s. Abb. 17) und betragen die Hälfte bis ein Drittel der Kollagen-I-Konzentrationen (vgl. Abb. 13).

Während es zwischen den Kollagen-III-Konzentrationen der induzierten und nicht induzierten Ansätze der ersten und zweiten Passage keine statistisch signifikanten Unterschiede gab, waren die Konzentrationen bei den induzierten Ansätzen der dritten Passagen signifikant niedriger als bei den Kontrollen ($p=0,01$).

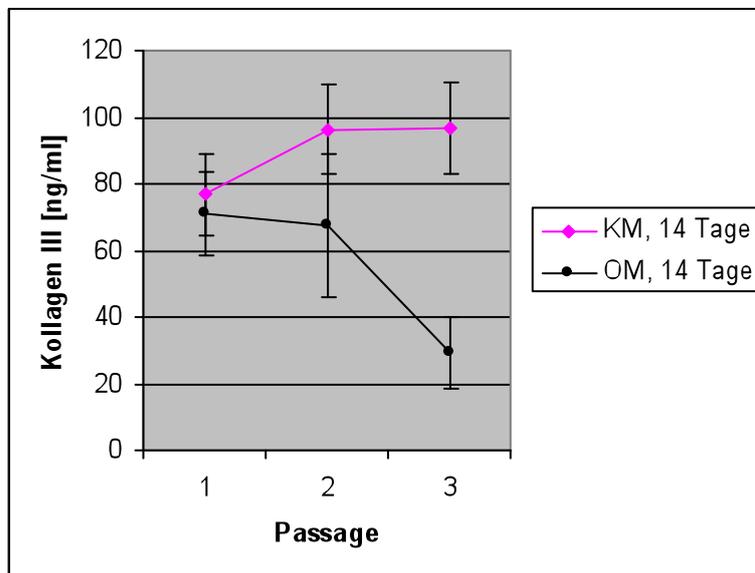


Abb. 17: Kollagen-III-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der Ansätze der ersten bis dritten Passage nach 14-tägiger osteogener Induktion bzw. Kultivierung. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. KM= Kulturmedium, OM= osteogenes Induktionsmedium. Die Kollagen-III-Konzentrationen in den mit osteogenem Induktionsmedium induzierten Ansätzen der dritten Passage waren signifikant niedriger als in den mit Kulturmedium kultivierten Kontrollen ($p=0,01$).

3.5.3 Vergleich der Kollagen-III-Konzentrationen der induzierten Ansätze

Die Kollagen-III-Konzentrationen der induzierten Ansätze lagen nach sieben- bzw. 14-tägiger Induktion zwischen 71 ng/ml und 21 ng/ml und unterschieden sich nicht voneinander.

Von der ersten bis zur dritten Passage war in allen Ansätzen ein Abfall der Kollagen-III-Konzentrationen zu erkennen. Aufgrund großer Standardfehler war dieser jedoch nicht statistisch signifikant (s. Abb. 18).

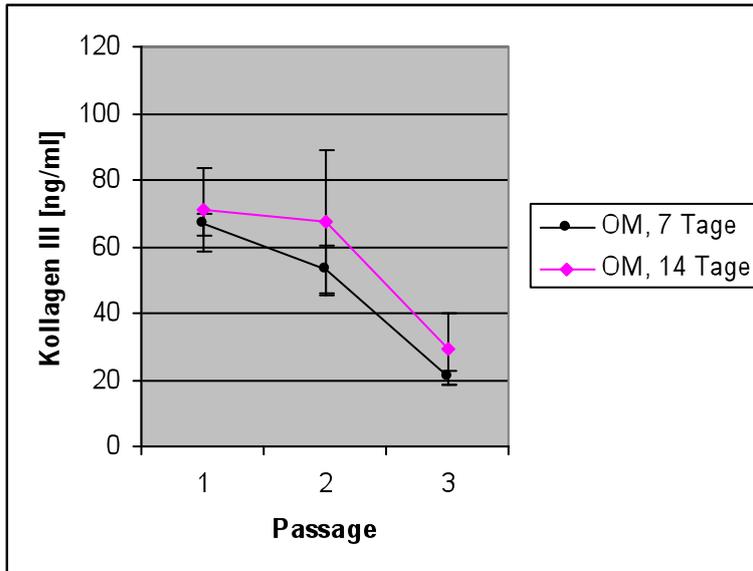


Abb. 18: Vergleich der Kollagen-III-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der induzierten Ansätze der ersten bis dritten Passage nach sieben- bzw. 14-tägiger Induktion. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. OM= osteogenes Induktionsmedium. Die Kollagen-III-Konzentrationen nach sieben- bzw. 14-tägiger Induktion unterschieden sich nicht voneinander. Sie nahmen von der ersten zur dritten Passage ab.

3.5.4 Vergleich der Kollagen-III-Konzentrationen der Kontrollansätze

Die Kollagen-III-Konzentrationen der Kontrollansätze lagen nach siebentägiger Kultivierung zwischen 60 ng/ml und 43 ng/ml und waren niedriger als nach zweiwöchiger Kultivierung (77 ng/ml bis 97 ng/ml). In der zweiten ($p=0,011$) und dritten Passage ($p=0,001$) waren die Unterschiede statistisch signifikant (s. Abb. 19).

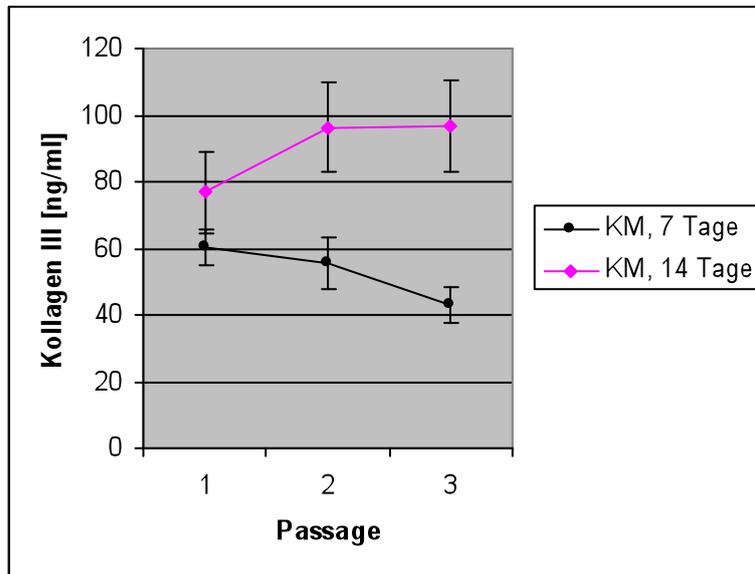


Abb. 19: Vergleich der Kollagen-III-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der Kontrollansätze der ersten bis dritten Passage nach sieben- bzw. 14-tägiger Kultivierung. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. KM= Kulturmedium. Die Kollagen-III-Konzentrationen waren nach 14-tägiger Kultivierung höher als die Konzentrationen nach siebentägiger Kultivierung. In der zweiten ($p=0,011$) und dritten Passage ($p=0,001$) war der Unterschied statistisch signifikant.

3.6 Osteocalcin-Konzentrationen in Zellkulturüberständen

Die Bestimmung der Osteocalcin-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen erfolgte analog zur Kollagenbestimmung mittels ELISA (s. 3.4).

Die im ELISA gemessenen Extinktionen wurden in [ng/ml] umgerechnet.

Extinktionen, die außerhalb der Standardkurven des ELISA lagen, wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen. Dies war bei allen nach 14-tägiger Induktion bzw. Kultivierung gemessenen Extinktionen der Fall. Daher konnten nur die Extinktionen nach einwöchiger Kultivierung ausgewertet werden.

3.6.1 Osteocalcin-Konzentrationen nach siebentägiger Kultivierung

Die Osteocalcin-Konzentrationen der induzierten Ansätze lagen nach siebentägiger Kultivierung zwischen 2,2 ng/ml und 1,9 ng/ml. Sie waren gegenüber den Osteocalcin-Konzentrationen der Kontrollansätze (zwischen 3,9 ng/ml und 2,8 ng/ml) deutlich niedriger. Dieser Unterschied war in der ersten ($p=0,023$) und zweiten Passage ($p=0,013$) statistisch signifikant (s. Abb. 20).

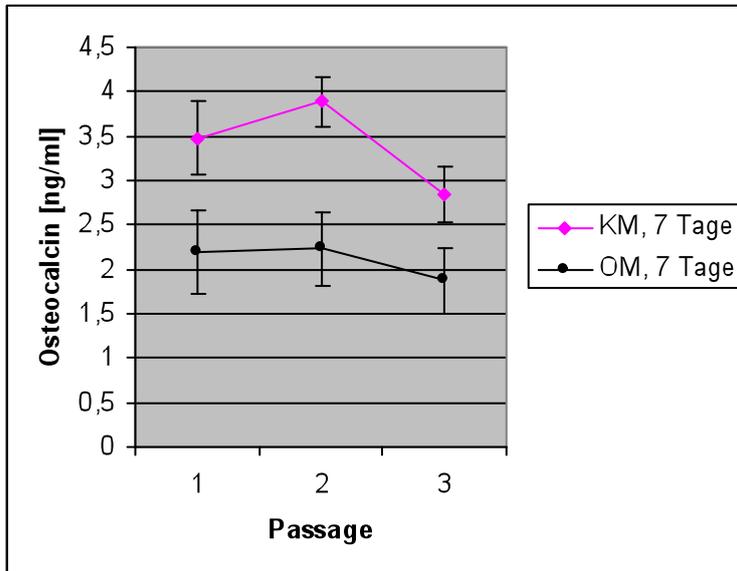


Abb. 20: Osteocalcin-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der Ansätze der ersten bis dritten Passage nach siebentägiger Induktion bzw. Kultivierung. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte. KM= Kulturmedium, OM= osteogenes Induktionsmedium. Die Osteocalcin-Konzentrationen in den mit osteogenem Induktionsmedium induzierten Ansätzen waren gegenüber den mit Kulturmedium kultivierten Kontrollen erniedrigt. In der ersten ($p=0,023$) und zweiten Passage ($p=0,013$) war dieser Unterschied statistisch signifikant.

4 Diskussion

4.1 *Verwendete Materialien*

4.1.1 Wahl des Tiermodells

Da beim Tissue Engineering lebende Zellen eingesetzt werden, sind für präklinische Studien Tierexperimente erforderlich. Als Tiermodell der vorliegenden Arbeit wurde das Minischwein gewählt, da der porcine Knochenstoffwechsel dem des Menschen sehr ähnlich ist (Sisson und Hillmann 1975). So werden Knochenappositionsraten beim Menschen mit $1,0 \pm 0,2 \mu\text{m}$ pro Tag (Dunstan und Evans 1980) und bei Schweinen mit $1,0 \mu\text{m}$ pro Tag (Hönig et al. 1997) angegeben. Bei Ratten beträgt die Knochenappositionsrate im Durchschnitt $1,2 \mu\text{m}$ pro Tag (Tam et al. 1978, Tam et al. 1979) und bei Hunden $0,9$ bis $1,3 \mu\text{m}$ pro Tag (Wronski et al. 1981). Wichtig bei Untersuchungen zur Knochenregeneration ist neben der Knochenappositionsrate auch die kritische Defektgröße (Critical Size Defect). Dabei handelt es sich um die kleinste Größe eines Knochendefekts, der während Lebenszeit nicht mehr spontan heilen kann (Schmitz und Hollinger 1986). Der Critical Size Defect der Calvaria beträgt z. B. bei der Ratte 8 mm (Takagi und Urist 1982), beim Kaninchen 15 mm (Frame 1980) und beim Hund 20 mm (Prolo et al. 1982).

Verglichen mit Mäusen oder Ratten erleichtern die anatomischen Gegebenheiten und biomechanischen Eigenschaften des craniofacialen Systems des Schwein das Vorgehen bei chirurgischen Fragestellungen und ermöglichen dadurch ferner eine bessere Übertragbarkeit von Ergebnissen auf den Menschen. Daher stellt das Minischwein für die osteologische Forschung ein sehr geeignetes Tiermodell dar. Da bislang kaum Studien existieren, die sich mit dem osteogenen Differenzierungsverhalten von porcinen mesenchymalen Stammzellen auf Proteinebene beschäftigen, erschien die vorliegende Arbeit als Grundlage für die Etablierung eines porcinen Tiermodells zum Tissue Engineering von Knochen mit Stammzellen besonders wichtig.

Ringe et al. konnten aus Femur und Tibia adulter Tiere durch Explantkultur gewonnene mesenchymale Stammzellen und Progenitorzellen auf Genexpressionsebene als multipotent charakterisieren (Ringe et al. 2002 b). Die porcinen mesenchymalen Stammzellen der vorliegenden Studie waren im Rahmen einer vorangegangenen Untersuchung aus Beckenkamm-spongiosa durch Explantkultur isoliert, kultiviert und als multipotent charakterisiert worden.

Mit zunehmendem Alter zeigen humane mesenchymale Stammzellen eine Abnahme sowohl der Proliferationsrate als auch des Differenzierungspotentials (Fehrer und Lepperdinger 2005). Auch *in vitro* nehmen Proliferations- und Differenzierungskapazität mit zunehmender Kulturdauer ab (D'Ippolito et al. 1999). Um zu untersuchen, ob bereits relativ kurze Kultivierungszeiten Einfluss

auf die osteogene Induzierbarkeit und das Differenzierungspotential der Zellen haben, wurden die ersten drei Passagen der porcinen Zelllinien ausgewählt. Dadurch sollten Einflüsse einer langen Kultivierung, die zu einer Abnahme des multipotenten Verhaltens führen (Vacanti et al. 2005), ausgeschlossen werden.

4.1.2 Nährmedien und deren Zusätze

Als Medium wurde DMEM mit 10% fötalem Kälberserum verwendet. DMEM gilt allgemein als ein sehr gutes Zellkulturmedium für humane mesenchymale Stammzellen (Pittenger et al. 1999, Guo et al. 2001, Stute et al. 2004).

Fötales Kälberserum enthält Wachstumsfaktoren, die die Zellproliferation humaner Knochenmarksstromazellen fördern (Kuznetsov et al. 2000).

Ascorbinsäure war als Zusatz im Medium enthalten, um die Zellproliferationsrate und die Produktion mineralisierter Matrix zu verbessern (Jaiswal et al. 1997, Xiao et al. 1997).

Dexamethason und beta-Glycerolphosphat gelten als osteogene Induktionsfaktoren für humane mesenchymale Stammzellen (Bruder et al. 1997, Jaiswal et al. 1997) und wurden dem osteogenen Induktionsmedium in üblichen Konzentrationen zugesetzt.

Calciumchlorid wurde dem osteogenen Induktionsmedium als Calciumquelle zugesetzt, da Calcium eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel spielt. Sowohl auf als auch zwischen den Kollagenfasern befinden sich Hydroxylapatitkristalle, die über Calciumbindungen mit den Kollagenfasern verbunden sind (Hadjidakis und Androulakis 2006).

4.2 Verwendete Methoden

4.2.1 Zellkultur

Die Kulturbedingungen waren ähnlich wie von anderen Autoren für humane (Mauney et al. 2004, Stute et al. 2004, Clausen et al. 2006) und auch porcine (Abukawa et al. 2004, Bosch et al. 2006) mesenchymale Stammzellen angegeben. Die Medienwechsel erfolgten alle drei bis vier Tage. Dies ist eine Voraussetzung für das Wachstum und die Vitalerhaltung der Zellen, da mit zunehmender Kulturdauer die Konzentration der Nährstoffe im Medium abnimmt, Wachstumsfaktoren aufgrund ihrer Halbwertszeit inaktiviert werden und sich toxische Zellmetabolite anreichern (Lindl 2002).

Vor jedem Medienwechsel wurden die Zellkulturen mit dem Mikroskop durchgemustert, um Morphologie, Konfluenz und damit auch Zellvitalität zu beurteilen.

Bei einer 70% bis 80%igen Konfluenz des Zellrasens erfolgte die osteogene Induktion der Zellen, da eine höhergradige Konfluenz zu einer Kontaktinhibition und schliesslich zum Absterben der Zellkultur führen kann (Lindl 2002).

Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt, um die Syntheseleistung der Zellen nach der Induktion untersuchen und damit den osteogenen Zelltypus belegen zu können. Die

unterschiedlichen Entnahmezeitpunkte (erste und zweite Woche nach Induktion bzw. Kultivierung) sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit sich der Zellmetabolismus innerhalb von sieben Tagen verändert hatte.

4.2.2 Zytospin-Verfahren und Immunzytochemie

Die Ablösung der Zellen von den 6-Well-Multischalen erfolgte mit Accutase™, was als besonders schonendes Verfahren gilt (Lindl 2002).

Die Zellen wurden zweimal hintereinander mit PBS gewaschen, um bei der immunzytochemischen Charakterisierung der Zellen keine verfälschten Ergebnisse durch Reste von Nährmedien zu erhalten.

Mit der Zytospin-Zentrifuge wurden die Zellen auf Objektträger geschleudert. Dieses Verfahren ermöglicht es, viele einzelne Zellen in einem definierten Bereich des Objektträgers zu isolieren. In den Fällen, in denen sich die Zellen nur unvollständig resuspendieren liessen, war die Auswertung der immunzytochemischen Färbung erschwert. Dennoch war eine Auswertung bei allen 27 Zelllinien möglich.

Die immunzytochemische Darstellung der Osteocalcinexpression diente der weiteren Charakterisierung der osteogen induzierten Zellen. Osteocalcin gilt als spezifischer Osteoblastenmarker, der in der späten osteogenen Differenzierungskaskade von reifen Osteoblasten und Osteozyten exprimiert wird (Aubin 2001).

Osteocalcin spielt eine wichtige Rolle bei der Calciumbindung. Es stabilisiert das Hydroxylapatit in der Matrix und reguliert den Knochenstoffwechsel (Hadjidakis und Androulakis 2006). Ausserhalb des Knochens wird Osteocalcin lediglich noch von Odontoblasten und Zementoblasten synthetisiert (Bronckers et al. 1987).

Um die Reliabilität der mikroskopischen Auswertung zu überprüfen, wurden die Zellen zweimal im Abstand von sieben Tagen verblindet ausgezählt. Die Reliabilität wurde mit dem Bland-Altman-Plot dargestellt (<http://de.wikipedia.org/wiki/Bland-Altman-Diagramm>), einer in diesem Fall üblichen statistischen Auswertung.

4.2.3 ELISA

Zur Ermittlung des osteogenen Phänotyps wurden die Konzentrationen von Kollagen I, Kollagen III und Osteocalcin in den Zellkulturüberständen mittels ELISA ermittelt.

Im Gegensatz zu Osteocalcin wird Kollagen I, das Hauptkollagen des Knochens, bereits in der frühen Phase der osteogenen Differenzierungskaskade exprimiert und kann in Kulturen von Osteoprogenitorzellen, Präosteoblasten, reifen Osteoblasten und Osteozyten nachgewiesen werden (Aubin 2001).

Kollagen III ist ein hoch spezialisiertes Glykoprotein und kommt vor allem im Knorpel, dem Glaskörper und der Haut vor. In geringen Mengen befindet sich Kollagen III auch in der adulten Knochenmatrix (Keene et al. 1991). Es ist zudem das wichtigste Kollagen der fibrösen Matrix, die sich entlang der Oberfläche des Periosts formiert (Ashhurst 1990). Kollagen III wird im frühen Stadium der Frakturheilung gebildet und später durch Kollagen I ersetzt (Page et al. 1986, Multimäki et al. 1987).

Die Analyse der Kollagen I-, Kollagen III- und Osteocalcin-Expression auf Proteinebene erschien daher für die Charakterisierung des osteogenen Phänotyps der hier verwendeten mesenchymalen Stammzellen besonders geeignet.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Vitalität der pMSC nach dem Auftauen

Nach dem Auftauen sank der Anteil vitaler Zellen in den Zellsuspensionen. Mit durchschnittlich 82,2% war er circa 10% niedriger als in vergleichbaren Studien mit humanen mesenchymalen Stammzellen (Bruder et al. 1997; Kotobuki et al. 2005, Liu et al. 2008). Das zur Kryokonservierung verwendete DMSO ist eine bei Raumtemperatur potentiell zelltoxische Substanz, die jedoch nach dem Auftauen durch sofortige Verdünnung und Absaugen nach Zentrifugation entfernt wurde.

Beim Prozess des Einfrierens kann es zum direkten Zelltod infolge von Zellmembranverletzungen durch Eiskristallisation und osmotischen Schock oder zur Apoptose (selbstinduzierter Zelltod) der Zellen bedingt durch Veränderungen der extrazellulären Matrix, Schäden der Gap Junctions oder physikalischen Stress, z. B. Kälteschock und osmotischen Stress (Heng et al. 2006) kommen. Die Zahl der nach Auftauen vitalen Zellen war insgesamt ausreichend zur Durchführung der Experimente.

4.3.2 Zellproliferation und Zellmorphologie

Die porcinen Zellkulturen aller drei Passagen zeigten innerhalb einer Woche subkonfluentes Wachstum. Ihre Proliferation ist mit dem Wachstumsverhalten humaner (Haynesworth et al. 1992, Jaiswal et al. 1997), caniner (Kadiyala et al. 1997, Bruder et al. 1998) und mesenchymaler Stammzellen von Ratten (Maniatopoulos et al. 1988) vergleichbar.

Wie von Friedenstein für humane Knochenmarkszellen beschrieben, zeigten auch die hier isolierten und kultivierten pMSC ein fibroblastenähnliches Aussehen (Friedenstein 1976). Die spindelförmige Morphologie blieb auch unter fortgeführter Kultivierung mit Kulturmedium erhalten.

Mit zunehmender Konfluenz traten auch quaderförmige Zellen auf, die wie von Sinha und Tuan und Murata et al. vorgeschlagen, als osteoblastenähnlich angesehen werden können (Sinha und Tuan 1996, Murata et al. 2004).

Die Bildung von Zellinseln, sogenannten Nodules unter osteogener Induktion wurde bereits bei murinen embryonalen Stammzellen (Buttery et al. 2001), humanen embryonalen Stammzellen (Bielby et al. 2004, Woll et al. 2006) sowie der porcinen mesenchymalen Stammzellen (Thomson et al. 1993) beschrieben und kann als Zeichen der osteogenen Differenzierung gewertet werden.

Die schwarzen Ablagerungen innerhalb der Zellinseln sind eine zelluläre Leistung der induzierten Zellen, die extrazellulär Calcium aggregieren (Thomson et al. 1993, Jaiswal et al. 1997) und können nach Anfärbung mit Alizarin Rot oder von Kossa identifiziert werden. Auf einen solchen histochemischen Nachweis wurde bewusst verzichtet, da dies das Zytospin-Verfahren nach dafür notwendiger Formalinfixierung und Anfärbung unmöglich gemacht hätte.

4.3.3 Zytospin und Immunzytochemie

Der Grund für das unterschiedliche Adhärenzverhalten bzw. die Bildung von Zellklumpen und die zum Teil erschwerte Resuspendierbarkeit der Zellen bleibt unklar. Denkbar wäre das Vorhandensein einer unterschiedlich stark ausgeprägten extrazellulären Matrix mit konsekutiver erhöhter Zelladhärenz. Die Bildung von Zellklumpen und die damit verbundene erschwerte Auswertung der Zytospins erklärt die Ausreisser bei der Analyse der Reliabilitätsprüfung.

Das Ergebnis der Immunzytochemie war unerwartet: Sowohl die mit Kulturmedium kultivierten als auch die osteogen induzierten Zellen, waren nicht nur überwiegend osteocalcinpositiv, es bestanden auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen.

Erwartet hätte man eine im Vergleich zu den Kontrollen ausgeprägtere Osteocalcinexpression der induzierten Zellen infolge der zweiwöchigen osteogenen Induktion, da Osteocalcin erst im Verlauf der osteogenen Differenzierungskaskade von osteoblastären Zellen synthetisiert wird (Aubin 2001). Demzufolge enthielten sowohl die induzierten als auch die nicht induzierten Zellansätze bereits osteoblastäre Zellen.

4.3.4 ELISA

Die Kollagen-I-Konzentrationen der induzierten Zelllinien waren nach einwöchiger Induktion signifikant höher als die der Kontrollansätze. Dieses Ergebnis weist auf eine zunehmende osteogene Differenzierung durch Induktion hin, da Kollagen I das Hauptkollagen des Knochens ist. Der Abfall der Kollagen-I-Konzentrationen von der ersten bis zur dritten Passage läßt auf ein vermindertes Differenzierungspotential mit zunehmender Kulturdauer schliessen (Ter Brugge und Jansen 2002, Fehrer und Lepperdinger 2005).

Die bei den induzierten Ansätzen beobachtete Zunahme der Kollagen-I-Konzentrationen von der ersten zur zweiten Woche ab Induktion bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. So beschrieben Ringe et al. einen Anstieg der Genexpression von Kollagen I nach 24-tägiger Induktion von pMSC der zweiten Passage, während Zou et al. diesen Anstieg bereits nach sieben bis 14 Tagen bei pMSC der ersten Passage beobachteten (Ringe et al. 2002 b, Zou et al. 2007).

Eine Zunahme der Kollagen-I-Konzentrationen während des zweiwöchigen Kultivierungszeitraums konnte auch bei den nicht induzierten Kontrollansätzen beobachtet werden. Denkbar ist, dass die Zellen auch ohne Zusatz der osteogenen Induktionsfaktoren Dexamethason und β -Glycerolphosphat Kollagen bildeten. So untersuchten Mendes et al. das osteogene Potential von humanen Knochenmarksstromazellen *in vitro*. Sie konnten in allen Zellkulturen Prokollagen I nachweisen, unabhängig davon, ob Dexamethason dem Zellkulturmedium zugesetzt worden war oder nicht (Mendes et al. 2004).

Zu vermuten ist ebenfalls, dass der Zusatz bereits geringer Mengen Ascorbinsäure zum Kulturmedium die Kollagensynthese steigert, da Ascorbat ein essentieller Faktor für die Kollagensynthese ist. Wang et al. demonstrierten, dass die in einem Polymethylmetacrylat-Gerüst enthaltene Ascorbinsäure einen positiven Einfluss auf die osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen hat (Wang et al. 2006). Choi et al. zeigten den konzentrationsabhängigen Effekt von L-Ascorbinsäure-2-Phosphat auf die Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen während zweiwöchiger Kultivierung (Choi et al. 2008).

Kollagen III kommt im Knochen in sehr geringen Mengen vor (Keene et al. 1991). Bereits Maniatopoulos et al. zeigten in ihrer wegweisenden Arbeit mit Knochenmarksstromazellen von Ratten, dass bei deren osteogener Stimulation nicht nur große Mengen Kollagen I, sondern auch geringe Menge Kollagen III synthetisiert werden (Maniatopoulos et al. 1988).

Maehata et al. stellten fest, dass unter dem Einfluss eines Vitamin-C-Derivats sowohl das Zellwachstum als auch die Genexpression von Kollagen III in humanen mesenchymalen Stammzellen stimuliert wird und kamen zu dem Schluss, dass Kollagen III ein essentieller Faktor für die Proliferation humaner osteoblastärer Zellen ist (Maehata et al. 2007). Dagegen konnten Toquet et al. nach osteogener Induktion humaner mesenchymaler Stammzellen keine Kollagen-III-Synthese nachweisen (Toquet et al. 1999). Die in den Kontrollen nach zweiwöchiger Kultivierung gegenüber den induzierten Ansätzen erhöhte Kollagen-III-Expression könnte, angesichts der Ergebnisse von Maehata et al., auf das Vorhandensein von Ascorbinsäure im Kulturmedium zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit porcinen mesenchymalen Zellen zeigen, dass diese unter osteogener Stimulation Kollagen III bilden. Im Gegensatz zur vermehrten Kollagen-I-Synthese bei 14-tägiger osteogener Induktion nahm die Kollagen-III-Synthese jedoch ab. Dieses

Ergebnis ist mit den *in vivo* gezeigten Beobachtungen bei der Frakturheilung vergleichbar (Page et al. 1986, Multimäki et al. 1987). Es ist anzunehmen, dass die Kollagen-III-Synthese zugunsten der Kollagen-I-Synthese reduziert wird.

Mauney et al. untersuchten die osteogene Differenzierung humaner Knochenmarksstromazellen, die auf partiell demineralisierten Knochengerüsten *in vitro* ausgesät waren. Die Osteocalcin-Expression der mit Dexamethason behandelten Zellen konnte am siebten Tag nachgewiesen werden und stieg bis zum 14. Tag weiter an. Die Osteocalcin-Expression in den Kontrollen stieg, wenn auch in geringerem Maß, ebenfalls an. Diesen Anstieg führten die Autoren auf den Effekt von matrixgebundenen Zytokinen wie BMPs aus der partiell demineralisierten Knochenmatrix zurück (Mauney et al. 2004).

Auch in der vorliegenden Arbeit war Osteocalcin in den Ansätzen bereits nach einwöchiger Induktion nachweisbar. Ein weiterer Anstieg der Osteocalcin-Konzentrationen nach zweiwöchiger Induktion konnte dagegen nicht gezeigt werden.

Ringe et al. wiesen einen maximalen Anstieg der Osteocalcingenexpression am 12. und 18. Tag nach osteogener Induktion porciner mesenchymaler Stammzellen mittels Polymerasekettenreaktion nach (Ringe et al. 2002 b). Jaiswal et al. konnten in ihrer Studie mit humanen mesenchymalen Stammzellen 14 Tage nach osteogener Induktion dagegen keine Osteocalcinexpression nachweisen (Jaiswal et al. 1997).

Als Erklärungsmöglichkeiten für den fehlenden Osteocalcinnachweis in den Überständen nach zweiwöchiger Induktion kommen in Betracht: einerseits das Fehlen osteocalcinsynthetisierender Zellen. Dies kann jedoch aufgrund der mittels Zytospin-Verfahrens und Immunzytochemie nachgewiesenen osteocalcinpositiven Zellen ausgeschlossen werden.

Zum anderen ist denkbar, dass relevante Mengen an Osteocalcin zwar synthetisiert wurden, diese jedoch in die Kollagenmatrix inkorporiert wurden und daher im Überstand nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Die Stabilisierung von kollagengebundenem Calcium durch Osteocalcin wurde bereits von Ducy et al. beschrieben (Ducy et al. 1996). Eine Bindung von Osteocalcin an das Kollagen I der extrazellulären Matrix würde ferner erklären, weshalb die Osteocalcin-Konzentrationen der induzierten Zellansätze nach einwöchiger Induktion durchgehend niedriger waren als die der Kontrollen zumal die induzierten Ansätze nach einwöchiger Kultivierung höhere Kollagen-I-Konzentrationen als die Kontrollen aufwiesen.

4.4 Schlussfolgerung

Dass in *in vitro* Untersuchungen belegte osteogene Differenzierungspotential humaner Knochenmarksstromazellen konnte in der vorliegenden Untersuchung auch für porcine mesenchymale Stammzellen gezeigt werden. Im Zuge der osteogenen Differenzierung kam es zur Inselbildung, Aggregation extrazellulärer Calciumkomplexe und Expression knochentypischer Proteine, wie Kollagen I, Kollagen III und Osteocalcin.

Erstmals konnte die Osteocalcin-Expression porciner mesenchymaler Zellen auf Proteinebene nicht nur mittels ELISA in den Zellkulturüberständen, sondern auch mittels Zytospin-Verfahren und Immunzytochemie auf zellulärer Ebene gezeigt werden.

Darüberhinaus zeigte sich, dass die Kollagen-I-Synthese im Laufe der osteogenen Stimulation anstieg, während die Kollagen-III-Synthese sank. Hieraus folgt, dass das Schwein für zukünftige Forschungsansätze zum Tissue Engineering von Knochen ein geeignetes Tiermodell darstellt. Eine möglichst kurze Kulturdauer der porcinen Zellen ist anzustreben.

Mit zunehmender Kulturdauer bzw. Passagezahl nahm die osteogene Differenzierbarkeit der Zellen, nachgewiesen durch die knochentypischen Proteine Kollagen I, Kollagen III und Osteocalcin ab.

5 Zusammenfassung

Für die Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, wie auch für andere Bereiche der Medizin, ist die Nutzung von Stammzellen im Rahmen regenerativer Technologien von zunehmendem wissenschaftlichen Interesse. Für präklinische Studien ist besonders das Minischwein als Tiermodell für craniofaciale osteologische Fragestellungen geeignet. Leider existieren bislang kaum Untersuchungen zum osteogenen Potential porciner mesenchymaler Stammzellen. Ziel der vorliegenden Untersuchung war daher, das knochenspezifische Verhalten porciner multipotenter Stammzellen *in vitro* zu analysieren.

Es wurden 27 Zelllinien von aus Beckenkammpongiosa adulter Minischweine gewonnenen multipotenten Stammzellen der ersten drei Passagen kultiviert und für 14 Tage osteogen induziert. Die Expression der knochentypischen Proteine Kollagen I, Kollagen III und Osteocalcin, wurde in den Zellkulturüberständen nach sieben- bzw. 14-tägiger Induktion mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay bei 450 nm quantifiziert. Erstmals erfolgte darüber hinaus der immunzytochemische Nachweis von Osteocalcin in mittels Zytopspin-Verfahren isolierten osteogen induzierten Zellen, die im Abstand von sieben Tagen verblindet ausgezählt wurden. Nicht induzierte Zellansätze dienten jeweils als Kontrollen.

Die kultivierten, spindelförmigen fibroblastenähnlichen Zellen bildeten während der osteogenen Induktion knötchenförmige Inseln quaderförmiger Zellen mit zentralen Calciumaggregaten aus. Im Gegensatz zu den Kontrollen nahm die Konfluenz am Ende der zweiwöchigen Induktion auf 40% bis 10% ab. Bei guter Reliabilität der Auszählung waren unabhängig von der Kultivierungsdauer 65%-90% der Zellen der drei Passagen osteocalcinpositiv, und es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen. Die osteogene Induktion führte zu einem Anstieg der Kollagen-I-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen (P_1 : $p < 0,05$) und zu einem Abfall der Kollagen-III-Konzentrationen (P_3 : $p < 0,05$). Darüber hinaus nahmen sowohl Kollagen-I- als auch Kollagen-III-Konzentrationen mit zunehmender Kulturdauer ab. Unerwartet war die geringere Osteocalcin-Konzentration in den Überständen der induzierten Zellen. Diese könnte auf die Bindung von Osteocalcin an die extrazelluläre Matrix der induzierten Ansätze zurückzuführen sein.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die verwendeten porcinen Zellen osteogen induzierbar waren und sich deren Morphologie während der Induktion änderte. Zudem beeinflussten Kulturdauer und Induktionsdauer den osteogenen Phänotyp. Porcine mesenchymale multipotente Stammzellen scheinen somit für weitere Studien zur Bearbeitung von Fragestellungen zum Tissue Engineering von Knochen wie auch der Osteogenese bestens geeignet.

6 Literaturverzeichnis

Abukawa H, Shin M, Williams WB, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ (2004)

Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone.
J Oral Maxillofac Surg 62: 601-606.

Abukawa H, Terai H, Hannouche D, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ (2003)

Formation of a mandibular condyle *in vitro* by tissue engineering.
J Oral Maxillofac Surg 61: 94-100.

Ashhurst DE (1990)

Collagens synthesized by healing fractures.
Clin Orthop Relat Res 255: 273-283.

Aubin JE (2001)

Regulation of osteoblast formation and function.
Rev Endocr Metab Disord 2: 81-94.

Bielby RC, Boccaccini AR, Polak JM, Buttery LD (2004)

In vitro differentiation and *in vivo* mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells.
Tissue Eng 10: 1518-1525.

Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH, Key M, Welcher R, Harvey R, Atwood KN (2003)

Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden.
3. Auflage, DakoCytomation GmbH, Hamburg.

Bosch P, Pratt SL, Stice SL (2006)

Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells.
Biol Reprod 74: 46-57.

Bronckers AL, Gay S, Finkelmann RD, Butler WT (1987)

Immunolocalization of gla proteins (osteocalcin) in rat tooth germs: comparison between indirect immunofluorescence, peroxidase-antiperoxidase, avidin-biotin-peroxidase complex, and avidin-biotin-gold complex with silver enhancement.
J Histochem Cytochem 35: 825-830.

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997)

Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation.
J Cell Biochem 64: 278-294.

Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, 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.

Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, Episkopou V, Polak JM (2001)

Differentiation of osteoblasts and *in vitro* bone formation from murine embryonic stem cells.
Tissue Eng 7: 89-99.

Cancedda R, Castagnola P, Cancedda FD, Dozin B, Quarto R (2000)

Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis.
Int J Dev Biol 44: 707-714.

Caplan AI (1991)

Mesenchymal stem cells.
J Orthop Res 9: 641-650.

Caplan AI (1994)

The mesengenic process.
Clin Plast Surg 21: 429-435.

Carstens M, Chin M, Li XJ (2005)

In situ osteogenesis: regeneration of 10-cm mandibular defect in porcine model using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and Helistat absorbable collagen sponge.
J Craniofac Surg 16: 1033-1042.

Cheng L, Qasba P, Vanguri P, Thiede MA (2000)

Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells.
J Cell Physiol 184: 58-69.

Choi KM, Seo YK, Yoon HH, Song KY, Kwon SY, Lee HS, Park JK (2008)

Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation.
J Biosci Bioeng 105: 586-594.

Clausen C, Hermund NU, Donatsky O, Nielsen H (2006)

Characterization of human bone cells derived from the maxillary alveolar ridge.
Clin Oral Implants Res 17: 533-540.

Cohnheim, J (1867)

Über Entzündung und Eiterung.
Arch Pathol Anat Physiol Klin Med 40: 1-79.

D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA (1999)

Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow.
J Bone Miner Res 14: 1115-1122.

Ducy P, Desbois C, Boyce B (1996)

Increased bone formation in osteocalcin, deficient mice.
Nature 382: 448-452.

Dunstan CR, Evans RA (1980)

Quantitative bone histology: a new method.
Pathology 12: 255-264.

Fehrer C, Lepperdinger G (2005)

Mesenchymal stem cell aging.
Exp Gerontol 40: 926-930.

Frame JW (1980)

A convenient animal model for testing bone substitute materials.
J Oral Surg 38: 176-180.

Friedenstein AJ (1976)

Precursor cells of mechanocytes.
Int Rev Cytol 47: 327-355.

Gage FH (2000)

Mammalian neural stem cells.
Science 287: 1433-1438.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005)

Bone substitutes: an update.
Injury 36: 20-27.

Gruber R, Kandler B, Fuerst G, Fischer MB, Watzek G (2004)

Porcine sinus mucosa holds cells that respond to bone morphogenetic protein (BMP)-6 and BMP-7 with increased osteogenic differentiation *in vitro*.
Clin Oral Impl Res 15: 575-580.

Guo Z, Yang J, Liu X (2001)

Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow.
Chin Med J (Engl) 114: 950-953.

Hadjidakis DJ, Androulakis II (2006)

Bone remodeling.
Ann N Y Acad Sci 1092: 385-396.

Hadlock TA, Vacanti JP, Cheney ML (1998)

Tissue engineering in facial plastic and reconstructive surgery.
Facial Plast Surg 14: 197-203.

Hall PA, Watt FM (1989)

Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity.
Development 106: 619-633.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1992)

Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow.
Bone 13: 81-88.

Heng BC, Ye CP, Liu H, Toh WS, Rufaihah AJ, Yang Z, Bay BH, Ge Z, Ouyang HW, Lee EH, Cao T (2006)

Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis.
J Biomed Sci 13: 433-445.

Henthorn PS, Raducha M, Kadesch T, Weiss MJ, Harris H (1988)

Sequence and characterization of the human intestinal alkaline phosphatase gene.
J Biol Chem 263: 12011-12019.

Hibi H, Yamada Y, Ueda M, Endo Y (2006)

Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material.
Int J Oral Maxillofac Surg 35: 551-555.

Hönig JF, Merten HA, Wiltfang J, Wiese KG (1997)

Der Stellenwert des Göttinger Miniaturschweins in der craniofacialen osteologischen Grundlagenforschung.
The Goettingen Miniature Pig- its significance in craniofacial osteological investigations.
Osteologie 6: 125-133.

Horowitz MC, Bothwell ALM, Hesslein DGT, Pflugh DL, Schatz DG (2005)

B cells and osteoblast and osteoclast development.
Immunol Rev 208: 141-153.

<http://de.wikipedia.org/wiki/Bland-Altman-Diagramm> (Tag des Zugriffs: 18.09.2008)

Huang W, Yang S, Shao J, Li Y (2007)

Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation.
Front Biosci 12: 3068-3092.

Huss R (2000)

Isolation of primary and immortalized CD34-hematopoietic and mesenchymal stem cells from various sources.
Stem Cells 18: 1-9.

Ikeda E, Hirose M, Kotobuki N, Shimaoka H, Tadokoro M, Maeda M, Hayashi Y, Kirita T, Ohgushi H (2006)

Osteogenic differentiation of human dental papilla mesenchymal cells.
Biochem Biophys Res Commun 342: 1257-1262.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997)

Osteogenic differentiation of purified, cultureexpanded human mesenchymal stem cells *in vitro*.
J Cell Biochem 64: 295-312.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998)

In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells.
Exp Cell Res 238: 265-272.

Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP (1997)

Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*.
Cell Transplant 6: 125-134.

Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T (2005)

Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation.
J Oral Maxillofac Surg 63: 362-369.

Keene DR, Sakai LY, Burgeson RE (1991)

Human bone contains type III collagen, type VI collagen, and fibrillin: type III collagen is present on specific fibers that may mediate attachment of tendons, ligaments, and periosteum to calcified bone cortex.
J Histochem Cytochem 39: 59-69.

Koc ON, Lazarus HM (2001)

Mesenchymal stem cells: heading into clinic.
Bone Marrow Transplant 27: 235-239.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999)

Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains.
Proc Natl Acad Sci U S A 96: 10711-10716.

Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Katou Y, Muraki K, Takakura Y, Ohgushi H (2005)

Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells.
Tissue Eng 11: 663-673.

Kuznetsov SA, Mankani MH, Robey PG (2000)

Effect of serum on human bone marrow stromal cells: *ex vivo* expansion and *in vivo* bone formation.
Transplantation 70: 1780-1787.

Leboy PS, Vaias L, Uschmann B, Golub E, Adams SL, Pacifici M (1989)

Ascorbic acid induces alkaline phosphatase, type X collagen, and calcium deposition in cultured chick chondrocytes.

J Biol Chem 264: 17281-17286.

Lian JB, Stein GS (1992)

Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation.

Crit Rev Oral Biol Med 3: 269-305.

Lindl, Toni (2002)

Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Zell- und Gewebekultur sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen.

5. Auflage; Spektrum; Heidelberg, Berlin.

Liu G, Shu C, Cui L, Liu W., Cao Y (2008)

Tissue-engineered bone formation with cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells.

Cryobiology 56: 209-215.

Luo GP, Ducy P, McKee MC (1997)

Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein.

Nature 386: 78-81.

Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF (1998)

Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow.

Tissue Eng 4: 415-428.

Maehata Y, Takamizawa S, Ozawa S, Izukuri K, Kato Y, Sato S, Lee M, Kimura A, Hata R (2007)

Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin c derivative.

Matrix Biol 26: 371-381.

Majumdar MK, Wang E, Moris EA (2001)

BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1.

J Cell Physiol 189: 275-284.

Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH (1988)

Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats.

Cell Tissue Res 254: 317-330.

Mauney JR, Blumberg J, Pirun M, Volloch V, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL (2004)

Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds *in vitro*.

Tissue Eng 10: 81-92.

Mendes SC, Tibbe JM, Veenhof M, Both S, Oner FC, Van Blitterswijk CA, De Bruijn JD (2004)

Relation between *in vitro* and *in vivo* osteogenic potential of cultured human bone marrow stromal cells.

J Mater Sci Mater Med 15: 1123-1128.

Mistry AS, Mikos AG (2005)

Tissue engineering strategies for bone regeneration.

Adv Biochem Eng Biotechnol 94: 1-22.

Moscoso I, Centeno A, Lopez E, Rodriguez-Barbosa JI, Santamarine I, Filgueira P, Sanchez MJ, Dominguez-Perles R, Penuelas-Rivas G, Domenech N (2005)

Differentiation “*in vitro*” of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation.

Transplant Proc 37: 481-482.

Multimäki P, Aro H, Vuorio E (1987)

Differential expression of fibrillar collagen genes during callus formation.

Biochem Biophys Res Commun 142: 536-541.

Murata H, Tanaka H, Taguchi T, Shiigi E, Mizokami H, Sugiyama T, Kawai S (2004)

Dexamethasone induces human spinal ligament derived cells toward osteogenic differentiation.

J Cell Biochem 92: 715-722.

Page M, Hogg J, Ashurst DE (1986)

The effects of mechanical stability on the macromolecules of the connective tissue matrices produced during fracture healing. I. The collagens.

Histochem J 18: 251-265.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999)

Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.

Science 284: 143-147.

Prolo DJ, Pedrotti PW, Burres KP, Oklund S (1982)

Superior osteogenesis in transplanted allogeneic canine skull following chemical sterilization.

Clin Orthop Relat Res 8: 230-242.

Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittinger M (2002 a)

Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs.

Naturwissenschaften 89: 338-351.

Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Büscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Häupl T, Sittinger M (2002 b)

Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages.

Cell Tissue Res 307: 321-327.

Ripamonti U (2004)

Soluble, insoluble and geometric signals sculpt the architecture of mineralized tissues.

J Cell Mol Med 8: 169-180.

Ripamonti U, Ramoshebi LN, Matsaba T, Tasker J, Crooks J, Teare J (2001)

Bone induction by BMPs/OPs and related family members in primates.

J Bone Joint Surg Am 83: 116-127.

Rispud MV, Shapiro IM (2005)

Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering.

Orthod Craniofac Res 8: 54-59.

Schiebler TH, Junqueira LC, Carneiro J (1996)

Histologie.

4. Auflage; Springer; Berlin, Heidelberg, New York.

Schmitz JP, Hollinger JO (1986)

The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions.

Clin Orthop Relat Res 4: 299-308.

Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998)

Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 95: 13726-13731.

Sinha RK, Tuan RS (1996)

Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopaedic implant materials.
Bone 18: 451-457.

Sisson S, Hillmann DJ (1975)

Sisson and Grossmanns' the anatomy of the domestic animals, Band I.
5. Auflage; W.B. Saunders Company; Philadelphia.

Stock UA, Vacanti JP (2001)

Tissue engineering: current state and prospects.
Annu Rev Med 52: 443-451.

Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR (2004)

Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use.
Exp Hematol 32: 1212-1225.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ (1999)

Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families.
Endocr Rev 20: 345-347.

Takagi K, Urist MR (1982)

The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects.
Ann Surg 196: 100-109.

Tam CS, Cruickshank B, Swinson DR, Anderson W, Little HA (1979)

The response of bone apposition rate to some nonphysiologic conditions.
Metabolism 28: 751-755.

Tam CS, Harrison JE, Reed R, Cruickshank B (1978)

Bone apposition rate as an index of bone metabolism.
Metabolism 27: 143-150.

Ter Brugge PJ, Jansen JA (2002)

In vitro osteogenic differentiation of rat bone marrow cells subcultured with and without dexamethasone.
Tissue Eng 8: 321-331.

Thomson BM, Bennett J, Dean V, Triffitt J, Meikle MC, Loveridge N (1993)

Preliminary characterization of porcine bone marrow stromal cells: skeletogenic potential, colony-forming activity, and response to dexamethasone, transforming growth factor beta, and basic fibroblast growth factor.
J Bone Miner Res 8: 1173-1183.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998)

Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.
Science 282: 1145-1147.

Toquet J, Rohanizadeh R, Guicheux J, Couillaud S, Passuti N, Daculsi G, Heymann D (1999)

Osteogenic potential *in vitro* of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic.
J Biomed Mater Res 44: 99-108.

Vacanti V, Kong E, Suzuki G, Sato K, Canty JM, Lee T (2005)

Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture.

J Cell Physiol 205: 194-201.

Wakitani S, Saito T, Caplan AI (1995)

Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. Muscle Nerve 18: 1417-1426.

Wang Y, Singh A, Xu P, Pindrus MA, Blasioli DJ, Kaplan DL (2006)

Expansion and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a vitamin C functionalized polymer.

Biomaterials 27: 3265-3273.

Watt FM, Hogan BLM (2000)

Out of Eden: stem cells and their niches.

Science 287: 1427-1430.

Weinand C, Pomerantseva I, Neville CM, Gupta R, Weinberg E, Madisch I, Shapiro F, Abukawa H, Troulis MJ, Vacanti JP (2006)

Hydrogel-beta-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone.

Bone 38: 555-563.

Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H (1988)

Structure of the human liver/ bone/ kidney alkaline phosphatase gene.

J Biol Chem 263: 12002-12010.

Woll NL, Heaney JD, Bronson SK (2006)

Osteogenic nodule formation from single embryonic stem cell-derived progenitors.

Stem Cells Dev 15: 865-879.

Wronski TJ, Smith JM, Jee WSS (1981)

Variations in mineral apposition rate of trabecular bone within the beagle skeleton.

Calcif Tissue Int 33: 583-586.

Xiao G, Cui Y, Ducy P, Karsenty G, Franceschi RT (1997)

Ascorbic acid dependent activation of the osteocalcin promoter in MC3T3-E1-preosteoblasts:

Requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence.

Mol Endocrinol 11: 1103-1113.

Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ (1998)

Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair.

J Orthop Res 16: 406-413.

Younger EM, Chapman MW (1989)

Morbidity at bone graft donor sites.

J Orthop Trauma 3: 192-195.

Zimmermann CE, Börner BI, Hasse A, Sieg P (2001)

Donor site morbidity after microvascular fibula transfer.

Clin Oral Investig 5: 214-219.

Zou J, Zou X, Chen L, Li H, Mygind T, Kassem M, Bünger C (2007)

Multilineage differentiation of porcine bone marrow stromal cells associated with specific gene expression pattern.

J Orthop Res 26: 56-64.

7 Anhang

7.1 Materialien und Geräte

Materialien und Geräte	Firma; Bestellnummer
3,3'-Diamino-benzidin-tetra-hydrochlorid	Sigma
6-Well-Multischale	Nunc; 140675
8-Kanal-Pipette	Eppendorf
96-Well-Mikrotiterplatte (MTP)	Nunc; 167008
Accutase	PAA; L11-007
Aceton	Merck
Ascorbinsäure	Sigma; A8960-5G
Beta-Glycerolphosphat	Sigma; G9891-25G
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma; A-7906
Brutschrank	Heraeus; HERA cell 240
Calciumchlorid	Sigma; C7902-500G
Cryo Tube Vial, 1,8ml	Nunc; 347627
Cryo Tube, 3,5ml	Greiner Labortechnik; Cellstar
Dakopen	Dako
Dexametason	Serva Feinbiochemica; 18660
Digitalkamera	Nikon Coolpix 5000
Dimethylsulfoxid, 10% (DMSO)	Sigma; D2650
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck; 1.06580.1000
Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM)	Biochrom AG; T 041-01
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS)	Gibco; 14190-136
Eppendorf-Pipette	Eppendorf
Ethanol	Merck
Falcon Tube, 50ml	Sarstedt; 62.547.254
Filterpapier	Shandon; 5991022
Fötales Kälberserum	Perbio; CH30160.02/03
Kaiser's Glyeringelatine	Merck; 1.09242.0100
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck; 1.04873.1000
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kollagen III (Kollagen Typ III vom Rind)	Biologo; CO20312-PI

Materialien und Geräte	Firma; Bestellnummer
Kollagen Typ I vom Schwein	Biologo; CO20191-P1
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Methanol	Merck; 1.06007.2500
Mikroskop	Leitz
monoklonaler Maus-Anti-Schwein-Anti-Osteocalcin-Antikörper	Abcam ab; 13420-50
Natriumchlorid	Merck; 1.06400.5000
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Objektträger	AL; 9.161.145
Osteocalcin (Bone-Gla-Protein Bio Assay TM ELISA Kit)	US Biological; 08069-19
Pasteur Pipette	Assistent; 567/2
Penicillin/Streptomycin	Biochrom; A2213
Peroxidase gebundenes Anti-Kaninchen-IgG	Biologo; PI-1000
Peroxidase Substrat Kit	Vector; SK-4400
PH-Meter	InoLab
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom; L 182-01
Photometer	Behring; ELISA Reader
Pipette, 10ml	Sarstedt; 86.1254.001
Pipette, 1ml	Sarstedt; 86.1251.001
Polyklonaler Kaninchen-Anti-Rind-Antikörper (Anti-Kollagen Typ III)	Biologo; CO20321
Polyklonaler Kaninchen-Anti-Schwein-Anti-Kollagen-Typ-I-Antikörper	Biologo; CO20191
Reagiergefäß, 1,5ml	Sarstedt; 72.690
Reinraumwerkbank	Faster; BHA 48
Saures Hämalaun nach Meyer	Merck; 1.09249.500
Schüttler	IKA Labortechnik; HS 250 basic
Schwefelsäure, 95%ig	Merck; 1.00731.1000
StreptABComplex/HPR Duet, Mouse/Rabbit Gebrauchslösung	Dako; K 0492
T75-Kulturflasche	Sarstedt; 83.1811.002
Transferpipette	Sarstedt; 86.1171.001
TRIS/HCl	Sigma; T 3253

Materialien und Geräte	Firma; Bestellnummer
Trypanblau	Gibco; 15250-061
Tween 20	Merck
Umkehr-Mikroskop	Leitz; Diavert
Wasserstoffsuperoxid	Merck
Xylol	Merck
Zentrifuge	Eppendorf; Centrifuge 5702 R
Zytospin-Zentrifuge	Thermo Shandon

7.2 Versuchsaufbau

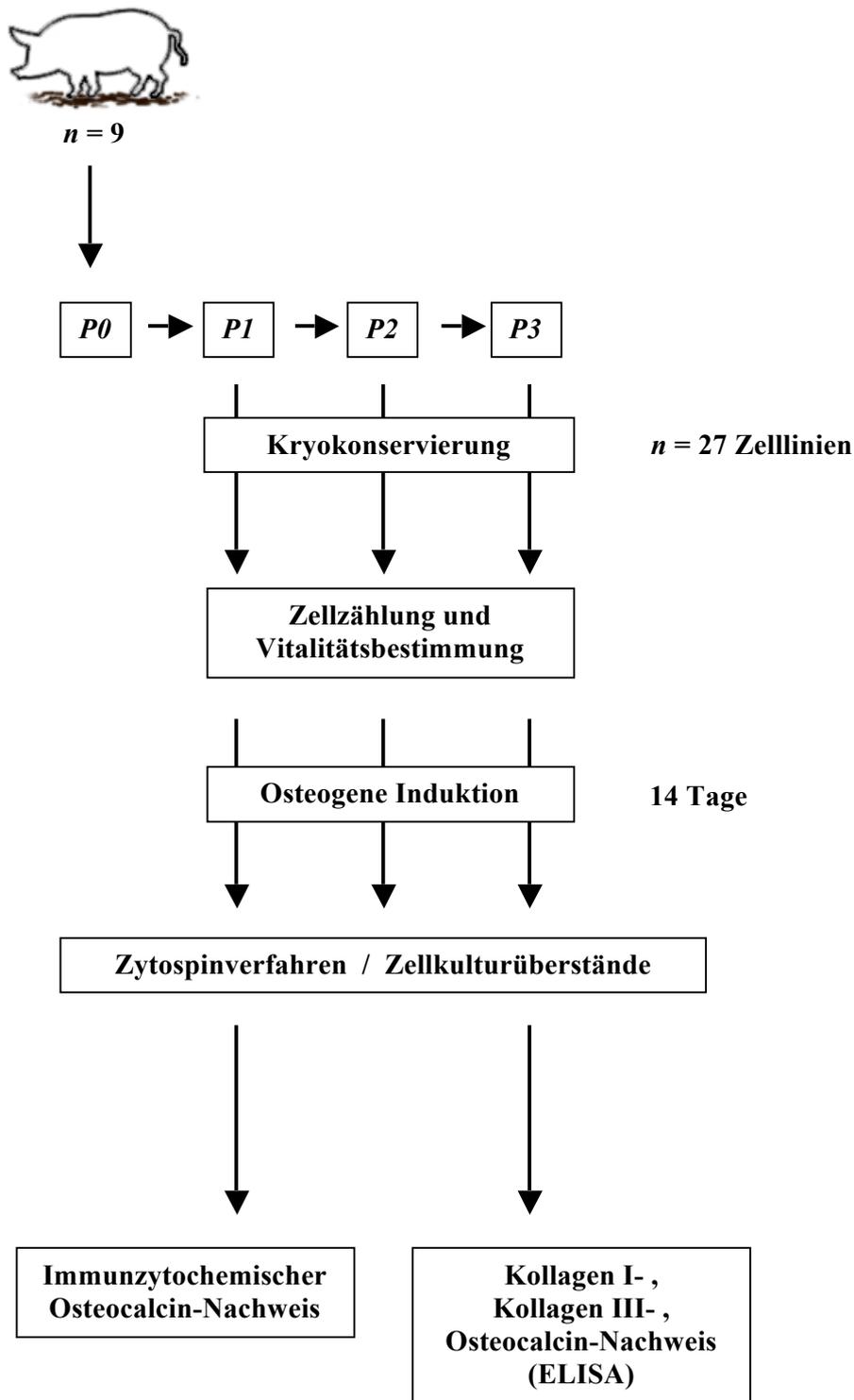


Abb. 21: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. P = Passage, n = Anzahl. Es wurden von insgesamt 27 porcinen mesenchymalen Schweinestammzelllinien der ersten drei Passagen nach Kryokonservierung Zellzahl und Vitalität bestimmt. Nach 14-tägiger osteogener Induktion wurden sowohl die Kollagen-I-, Kollagen-III- und Osteocalcinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen quantifiziert als auch die Zellen immunzytochemisch auf ihre Osteocalcinexpression untersucht.

8 Danksagungen

Frau PD Dr. Dr. C. E. Zimmermann danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas als auch für Ihr außergewöhnliches Engagement während der Durchführung sowie der Auswertung meiner Experimente und nicht zuletzt für die umfassende Beratung bei der Abfassung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel zur Durchführung der Experimente sowie der Arbeitsmöglichkeit in den Laboratorien der Klinik.

Mein besonderer Dank gilt der medizinisch-technischen Assistentin Frau G. Otto, durch deren engagierte Mithilfe und kompetente Beratung die Durchführung der praktischen Arbeiten im Zellkulturlabor sehr erleichtert wurde.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau M. Hauberg und Frau E. Jeske, die mich in die Geheimnisse der Zytospin-Zentrifuge eingeweiht haben.

Mein Dank gilt insbesondere auch Herrn J. Hedderich aus dem Institut für medizinische Statistik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Eleonore Behrens für die großartige moralische Unterstützung.

Und last, not least bedanke ich mich sehr herzlich bei meiner wundervollen Familie für die finanzielle, tatkräftige und auch moralische Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit.

9 Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Berit Renate Lankhorst, geb. Harfst

Wohnort:

Geburtstag und -ort:

Familienstand:

Nationalität: Deutsch

Schulbildung:

1984-1988: Grundschule Schilksee in Kiel

1988-1996: Gymnasium Hebbelschule in Kiel

1996-1997: Institut auf dem Rosenberg, St.Gallen/Schweiz

Praktika:

1997: 6-wöchiges Krankenpflegepraktikum in der Park Klinik in Kiel

1997: 6-wöchiges Krankenpflegepraktikum im St. Elisabeth Krankenhaus in Kiel

1998: 1-wöchiges Zahnarztpraktikum bei Dres. Brandt und Panzer in Kiel

1998: 6-wöchiges Praktikum bei der Fotografin Ute Boeters in Kiel

Berufsausbildung:

1998-2005: Zahnmedizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel

Seit Januar 2006: Doktorandin bei Frau PD Dr. Dr. C.E. Zimmermann in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Die experimentellen Arbeiten fanden zwischen Januar und Oktober 2006 statt.