

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
Direktor: Prof. Dr. I. Marzi

**Tissue Engineering -  
Kultivierung verschiedener Progenitorzellen mit mesenchymalen  
Stammzellen auf Knochenersatzmaterialien in vitro**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Vorgelegt von  
Agmal Scherzed  
aus Kabul

Frankfurt am Main, 2009

Dekan: Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. med. I. Marzi

Korreferent: Prof. Dr. J. Stehle

Tag der mündliche Prüfung: 03.12.2009

*Für Wagma und Lina*

*Eine wirklich gute Idee erkennt man daran,  
dass ihre Verwirklichung von vorne herein ausgeschlossen erscheint...*

*Albert Einstein*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b>	1
1.1	Allgemeine Einführung	2
1.1.1	Knochengewebe	3
1.1.2	Knochenzelle	3
1.2	Humane Osteoblasten-Zelllinie (SaOS-2)	4
1.3	Knochenregeneration	4
1.3.1	Primäre Knochenheilung	5
1.3.2	Sekundäre Knochenheilung	5
1.3.3	Critical Size Defect	6
1.3.4	Pseudarthrosen	6
1.4	Blutversorgung des Knochens	7
1.5	Knochenmark	9
1.5.1	Stammzellen	9
1.6	Knochenersatzstoffe	11
1.6.1	Autogene und Allogene Knochentransplantation	13
1.6.2	Hydroxylapatit	13
1.6.3	Tricalciumphosphat (TCP)	14
1.6.4	Komposita	15
1.6.5	Resorbierbare und Nichtresorbierbare Ersatzstoffe	15
1.6.6	Biologische Potenz	18
1.6.7	Gesicherte Einsatzgebiete	19
1.7	Hypothese/Fragestellung	21
<b>II</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	21
	<b>Material</b>	
2.1.1	Apparaturen und Materialien	22
2.1.2	Zellen	24
2.1.3	Nährmedien	24
2.1.4	Chemikalien	24
2.1.5	Puffer und Lösungen	25
2.1.6	Zytokine	25

2.1.7	Antikörper	26
2.1.8	Zellfärbung	26
2.1.9	RT-PCR	26
<b>Methoden</b>		
2.2	Zellverarbeitung und -kultivierung	27
2.2.1	SaOS-Zellen	27
2.2.2	Isolierung und Kultivierung von MSC	27
2.2.3	Zellpassage der Mesenchymalen Stammzellen	28
2.2.4	Isolierung und Kultivierung von CD 133 <sup>-</sup> EPC	28
2.2.5	Isolierung und Kultivierung von CD 133 <sup>+</sup> EPC	29
2.2.6	Zellzählung und Vitalitätstest	31
2.2.7	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	32
2.2.8	Osteogene Differenzierung und Vergleich verschiedener Medien ( <i>Osteogenic Stem Cell Kit</i> , <i>DMEM:F12</i> und <i>Mesencult</i> )	32
2.3	Färbemethoden	33
2.3.1	Van Kossa Färbung	33
2.3.2	Alizarinrot-Färbung	33
2.3.3	Alkalische Phosphotase Färbung	34
2.4	Beschichten der Knochenersatzstoffe mit extrazellulären Matrixproteinen	34
2.4.1	Kultivierung von SaOS-2, MSC und EPC auf $\beta$ -TCP	34
2.4.2	Aussaat der Zellen auf Matrices ( $\beta$ -TCP, Collagen)	35
2.4.3	Ermittlung der Aussaat-effizienz	35
2.4.4	Nachweis des Überlebens und des Differenzierungszustandes der MSC, EPC und MSC+EPC auf $\beta$ -TCP	36
2.4.5	Cokultivierung von MSC und adhärenz early EPC auf $\beta$ -TCP	37
2.4.6	Aussäen der Zellen auf Collagenvlies	37
2.4.7	MTT-Assay	38
2.5	RT-PCR	38
2.5.1	RNA-Isolierung	38
2.5.2	cDNA-Synthese	39

2.5.3	Kontroll-PCR für GAPDH zur Bestimmung relativen cDNA-Gehalts einer Probe	39
2.5.4	Semiquantitative RT-PCR	41
2.5.5	Gelelektrophorese	42
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	Zellmorphologie	43
3.2	Färbungen	44
3.2.1	Van Kossa Färbung	44
3.2.2	Alizarinrot-Färbung	45
3.2.3	Alkalische Phosphotase Färbung	46
3.3	Molekularbiologische Untersuchungsmethodn an osteogen stimulierten Zellen	47
3.4	Aussaateffizienz	48
3.4.1	MTT	48
3.5	Überlebensnachweis der Zellen auf Matrixmaterialien mittels molekularbiologischen Untersuchungen	49
3.5.1	CD 133 <sup>+</sup> EPC (late) mit osteogenem Medium	49
3.5.2	CD 133 <sup>+</sup> EPC auf Kollagenbeschichteter $\beta$ -TCP-Granula	51
3.5.3	CD 133 <sup>-</sup> EPC mit osteogenem Medium	52
3.5.4	CD 133 <sup>-</sup> EPC auf Fibronectin beschichteten $\beta$ -TCP	53
3.5.5	Mesenchymale Stammzellen auf Fibronectin beschichteten $\beta$ -TCP Granula mit Mesencult	54
3.5.6	MSC auf Fibronectin beschichteten $\beta$ -TCP	55
3.5.7	MSC + CD 133 <sup>-</sup> EPC auf $\beta$ -TCP	57
3.5.8	EPC auf Collagenvlies mit Fibronectin-Beschichtung	58
3.5.9	MSC auf Collagenvlies mit Fibronectin-Beschichtung	59
3.5.10	Gemeinsame Kultivierung von MSC und EPC auf Collagenvlies	60
<b>IV</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
<b>V</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>VI</b>	<b>Literaturangabe</b>	<b>75</b>
<b>VII</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>86</b>

<b>VIII</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>88</b>
<b>IX</b>	<b>Danksagung</b>	<b>90</b>
<b>X</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>91</b>

# I. EINLEITUNG

Trotz großer Fortschritte in der Frakturbehandlung kommt es bei 5-10% aller Patienten zur verzögerten Knochenheilung oder gar zur Pseudarthrose. Die Ursachen hierfür sind vielfältig und häufig durch die Verletzungsschwere oder durch Begleitverletzungen und -erkrankungen bedingt. Große Knochendefekte entstehen u.a. in Trümmerzonen bei schweren Knochentraumen, nach Resektion von Tumoren, Pseudarthrosen oder osteomyelitische Herde, Arthrodesen, Spondylodesen oder Umstellungsosteotomien. Große Frakturspalten sind neben dem großen, offenen Weichteilschaden die wichtigsten Prädiktoren für eine Heilungsverzögerung. Bei größeren Knochendefekten bzw. Defekt- und Infektpseudarthrosen (von mehr als 2 cm Länge) wird, wenn die Kortikalis verletzt ist und eine primäre Instabilität vorliegt, die Indikation zur Transplantation von Knochengewebe und bzw. der Einsatz von Knochenersatzmaterialien gestellt (Trentz O 1986).

Die primäre Versorgung eines Knochendefektes mit autogener Spongiosa gilt derzeit als „Goldstandard“, da sie in den umgebenden Knochen integriert und damit die ursprüngliche Stabilität erreicht wird (Matti H 1932, Schweiberer L 1982). Zugleich unterliegt sie dem körpereigenen Remodeling und passt sich den biomechanischen Anforderungen an. Bei o.g. Indikationen wird primär körpereigener Knochen (autologes Transplantat) transplantiert. Jedoch sind der autologen Knochen transplantation Grenzen gesetzt: zum einen durch die begrenzte Menge des autogenen Materials; zum anderen ist die Transplantatentnahme mit einer hohen Morbidität (Hämatombildung, Nervenschaden, Infekt, je nach Literaturangabe bis zu 44,8%) verbunden. Daher ist bei großen Knochendefekten oft auch der Einsatz von humanem Spenderknochen (allogenes Transplantat) notwendig (Rübsamen-Waigmann H 1997). Dafür wird allogener Knochen (oft Hüftkopfknochen) aus lokal geführten Knochenbanken verwendet. Humaner allogener Spenderknochen wird jedoch aus Gründen der biologischen Sicherheit einer Kryokonservierung (Bankknochen) oder auch einer thermischen Desinfektion unterzogen und stellt daher im Unterschied zum Autotransplantat ein avitales Knochen transplantat



dar. Allogener Knochen sollte nur in ein gut durchblutetes Transplantatlager implantiert werden. Beim Aufbau knöcherner Defekte in mangel durchbluteten bzw. sogar infizierten Gebieten sollte auf die Verwendung von Fremdknochen verzichtet werden. Es besteht dann nämlich die Gefahr, dass das Material keinen vaskulären Anschluß findet und als totes Transplantat im Gewebe liegen bleibt bzw. als Fremdkörper abgestoßen wird und schlimmstenfalls eine lokale Entzündung exazerbieren lässt.

Eine andere Behandlungsalternative zur Überbrückung langstreckiger Knochendefekte an Röhrenknochen ist der Segmenttransport mit Hilfe der Kallusdistraction (Giebel G 1987). Oft wird jedoch die Montage des Fixateur externe und die lange Behandlungszeit vom Patienten nicht akzeptiert, so dass nach weiteren Behandlungsoptionen intensiv gesucht wird.

*Tissue Engineering* ist eine Technologie, mit der *in vitro* erzeugte Konstrukte aus Zellen und biokompatiblen Trägermaterial benutzt werden, um Gewebeschäden oder -defekte z.B. Knochen oder Knorpel zu reparieren (Schäfer et al. 2004).

Die Hauptkomponenten, die man für *Tissue Engineering* benötigt sind also Zellen, ein strukturelles Gerüst (*Scaffold*) und Wachstumsfaktoren (Rose F 2002).

Um eine effektive Therapie zu entwickeln, wird nachfolgend die Physiologie und Pathophysiologie des Organs Knochen beschrieben.

### **1.1 Allgemeine Einführung**

Das Skelettsystem entwickelt sich aus dem mesodermalen Keimblatt.

Die charakteristischen Eigenschaften des Knochengewebes werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Dazu gehören die Anordnung und der Durchmesser der Kollagenfibrillenbündel genauso wie die Menge der eingelagerten Kalziumsalze. Hauptsächlich werden zwei Arten von Knochengewebe unterschieden, Geflecht- und Lamellenknochen (Buckwalter JA 1995).

### 1.1.1 Knochengewebe

#### Geflechtknochen

Im Geflechtknochen liegen die Kollagenfibrillen im Bündel vor, die regelrecht miteinander verflochten sind. Überall wo Knochengewebe sehr rasch gebildet wird (z.B. bei der Frakturheilung), entsteht zunächst Geflechtknochen. Im Zuge des natürlichen Umbaus entsteht dann unter der biomechanischen Belastung der hochwertige Lamellenknochen (Buckwalter JA1995).

#### Lamellenknochen

Er ist das typische Knochengewebe des Erwachsenen. Nach der Dichte der Lamellen unterscheidet man zwischen der harten Kompakta, die in dem äußeren Knochenbereich liegt und der aufgelockerten Spongiosa, die im Knocheninneren bzw. in den verdickten Knochenenden liegt. Innerhalb der Spongiosa befindet sich das rote Knochenmark (Buckwalter JA 1995).

### 1.1.2 Knochenzellen

#### Osteoblasten

Es wird angenommen, dass Osteoblasten sich aus undifferenzierten mesenchymalen Zellen entwickeln (Suda T 1992).

Osteoblasten sind Zellen, die Knochen aufbauen. Man kann ihre Entwicklung in 4 Stadien einteilen.

*Preosteoblast*: Teilt alle phänotypischen Gemeinsamkeiten des Osteoblasten, zum Beispiel eine alkalische Phosphataseaktivität, produziert jedoch nicht alle Marker des Osteoblasten (Aubin 2001).

*Knochenbelegzellen (Bone lining cells)*: Sie sind im Gegenteil zur Osteoblasten inaktiv. Sie sind flache zytoplasmaarme Zellen. Sie bedecken die Knochenoberfläche, nehmen jedoch an dem *Knochenremodeling* nicht teil. Knochenbelegzellen werden auch als ruhende Osteoblasten bezeichnet (Bowman BM, Miller SC 1986).

*Osteoblasten*: Sie charakterisieren sich durch die Fähigkeit Knochenmatrix zu synthetisieren, welche schließlich mineralisiert. Sie exprimieren eine Vielzahl an Markern wie zum Beispiel alkalische Phosphatase und sie synthetisieren kollagene und nicht kollagene Knochenmatrix wie Osteocalcin.

**Osteozyt:** Osteozyten sind der am häufigsten vorkommende Zelltyp im Knochen. Es wird angenommen, dass annähernd 10-mal so viele Osteozyten wie Osteoblasten in adultem Knochen vorkommen (Parfitt AM1977).

### **Osteoklasten**

Im Gegensatz zur Osteoblasten sind die Osteoklasten vielkernige Zellen. Sie stammen von den hämatopoetischen Stammzellen ab (Suda T 1992).

Osteoklasten haben einen einzigartigen und effizienten Mechanismus entwickelt, um Mineralien aufzulösen und Knochenmatrix abzubauen (Vaananen HK 2000).

### **1.2 Humane Osteoblasten-Zelllinie (SaOS-2)**

Beim Osteosarkom handelt es sich um einen malignen Knochentumor. Er gehört zu der Gruppe der primär osteogenen, d.h. knochenbildenden Tumoren. Es existiert eine Reihe von Osteoblastenzelllinien. Nach Rifas et al. sind SaOs-2-Zelllinien die am höchsten differenzierten osteoblastenähnlichen Zellen (Rifas L 1994).

Aufgrund ihrer hohen alkalischen Phosphatase Aktivität, Osteonektin und das Vorhandensein von Parathormon- und 1-25-Hydroxycholecalciferol-Rezeptoren besitzen SaOS-2 Zellen die Fähigkeit zur Mineralisierung (Rodan SB 1987). Sie gelten somit als reife Osteoblasten, die jedoch weiterhin ihre Tumoreigenschaften behalten.

### **1.3 Knochenregeneration**

Der Begriff „Fraktur“ kommt aus dem lateinischen „fractura“ und bedeutet „Bruch“. Darunter versteht man eine Verletzung des Knochens, die in der Regel mit dem Verlust der Kontinuität des Knochens einhergeht (ausgenommen Grünholzfraktur).

Der Knochen besitzt die einzigartige Eigenschaft sich vollständig zu regenerieren und seine ursprünglichen Form und Belastbarkeit wiederherzustellen.

Im Gegensatz zu Weichteilgeweben heilt Knochengewebe ohne Narbenbildung (DeLacure MD 1994).

Der Knochenheilungsprozess wird unterschieden in primäre Knochenheilung und sekundäre Knochenheilung (Schenk et al. 1977).

### **1.3.1 Primäre Knochenheilung**

Der Begriff der primären Knochenheilung geht auf Lane (Lane WA 1914) zurück, der die Knochenheilung ohne sichtbaren Kallus als „*bone healing by primary intention*“ bezeichnete.

Die Voraussetzungen für die primäre Knochenheilung sind die intakte Durchblutung der Fragmente, eine stabile Überbrückung des Frakturspalts sowie die exakte anatomische Aneinanderlagerung der Frakturrenden (Schenk et al. 1977). Verbleiben zwischen stabil fixierten Fragmenten minimale Knochenspalten, so verläuft die primäre Knochenheilung dann unter geringer Kallusbildung. Die Distanzgrenze für das Auftreten einer Spalthheilung liegt bei 0,5 mm (Schenk et al. 1977). So kann man bei der primären Frakturheilung zwischen Kontakt- und Spalthheilung unterscheiden.

### **1.3.2 Sekundäre Knochenheilung**

Die indirekte oder sekundäre Knochenheilung ist die natürliche Form der Frakturheilung, welche über den Umweg der Kallusbildung zustande kommt.

Die sekundäre Knochenheilung verläuft in unterschiedlichen Stadien, die teilweise parallel verlaufen.

- Ausbildung eines Frakturhämatoms
- Organisation des Hämatoms durch einwachsende Fibroblasten
- Differenzierung des Zwischengewebes zu Geflechtknochen (Kallus)
- Funktionelle Adaption zu lamellärem Knochen und Rekonstruktion des medullären Gefäßsystems unter Abbau von überschüssigem Kallus (Duale Reihe Chirurgie 2003).

Die Kallusbildung ist abhängig vom Bewegungsausmaß im Frakturspalt. Je instabiler die Fraktur umso, größer ist die Kallusbildung (Klein P 2003).

Ein gewisses Maß an intrafragmentärer Beweglichkeit ist jedoch zur Stimulation der Knochenbruchheilung von Vorteil (Goodship et al. 1985).

### 1.3.3 Critical Size Defect

Das Regenerationspotential der Knochen ist vom Alter und der Funktionsfähigkeit des Organismus abhängig. Überschreitet ein Knochendefekt eine bestimmte Größe, ist der Organismus nicht in der Lage, diesen Defekt zu überbrücken. Diese Defektgröße wird als *Critical size defect* (Csd) bezeichnet.

Demnach beschreibt ein Csd den kleinsten intraossären Defekt, bei dem auf Grund der Länge des Defektes die Überbrückung des Frakturspalts über die natürliche Knochenheilung unmöglich wird (Schmitz et al. 1986).

Schmitz et al. definierten die Mindestgröße eines Csd nämlich über den 1,5 fachen Durchmesser des Knochens.

### 1.3.4 Pseudarthrosen

Der Begriff Pseudarthrose stammt aus dem griechischen und bedeutet *Falschgelenk*. Die Häufigkeit der Entwicklung einer Pseudarthrose wird in der Literatur mit 2% bis 10% beschrieben (Bauer et al. 1997, Helfet et al. 2003).

Man unterscheidet eine verzögerte Knochenheilung (*delayed union*), bei der ohne weitere operative Maßnahmen eine Verschmelzung erwartet werden kann, von einer nicht eingetretenen Heilung (*nonunion*) (Einhorn TA 1999). Es gibt keine eindeutig akzeptierte Definition für den Begriff *union*.

In der Klinik bezieht sich die Bewertung der *union* vor allem auf klinische und radiographische Untersuchungen.

Diese Kriterien beinhalten das Nichtvorhandensein von manuell auslösbaren Bewegungen und Schmerzen im Frakturbereich und/oder die Fähigkeit der vollen Gewichtsbelastung auf dem Betroffenen Bein ohne Schmerz oder Unterstützung (Scott et al. 1994, Sharrard WJW 1990).

Dagegen werden bei der verzögerte Knochenheilung die Heilungsprozesse zwar fortgesetzt, eine Heilung aber findet im erwarteten Zeitraum nicht statt und das Resultat bleibt unsicher (Einhorn TA 1998).

Die Nichtkonsolidierung einer Fraktur innerhalb von 4 Monaten wird heute weltweit als Definition einer *delayed-union* anerkannt (Rüter A et al. 1999).

Die Kombination aus knöcherner und fibröser Heilung wird als *nonunion* bezeichnet. Bei der *Nonunion* fehlt die knöcherne Kontinuität und Funktion.

Rütter et al. definieren den Begriff Pseudarthrose (Nonunion) über das Ausbleiben einer Frakturheilung nach einem Zeitraum von mehr als 6 Monaten.

Die *Nonunions* werden nach ihre Vitalität in hypertrophe und atrophe *Nonunions* klassifiziert. Diese gibt einen äußerst wichtigen Hinweis über die Ätiologie und die Behandlungsstrategien (Einhorn TA 1999, Rüter et al.1999, Schweiberer et al. 1999).

Die Charakterisierung der hypertrophen *Nonunion* ist durch Kallusbildung an den beiden Frakturenden gegeben, wobei die knöcherne Überbrückung fehlt. Normalerweise wird diese Art von *nonunion* durch Instabilität verursacht, wobei die osteogene Antwort auf der Frakturseite noch intakt ist. Röntgenologisch erscheinen die Konturen der Pseudarthrose deutlich aufgetrieben. Man nennt dies daher eine „Elefantenfuß-Pseudarthrose“ (Rütter et al. 1999).

Die Behandlung ist hierbei auf eine Verbesserung der Frakturstabilität ausgerichtet.

Im Gegensatz dazu zeigt die atrophe *nonunion* keinen oder nur wenig Kallus als Zeichen einer insuffizienten osteogenen Aktivität an der Frakturseite. Der wichtigste Faktor, der zur Entstehung einer atrophen *nonunion* beiträgt, ist das Fehlen der Vaskularität im Frakturgebiet. Das Behandlungsprinzip besteht aus der Wiederherstellung der Vitalität im Frakturbereich durch die Resektion des fibrösen Gewebes innerhalb des Spaltes und anschließender Applikation von osteogenen bzw. osteoinduktiven Materialien (Einhorn TA 1999, Rütter et al. 1999, Schweiberer et al. 1999).

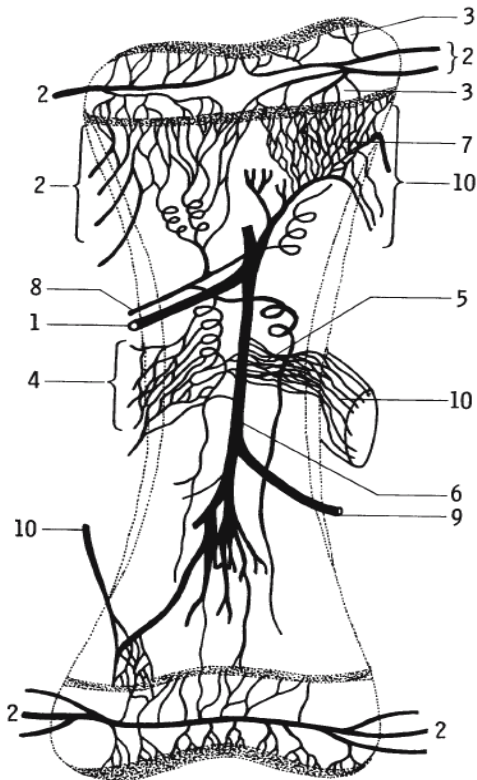
#### **1.4 Blutversorgung des Knochens**

Die Tatsache, dass Knochen aus einem lebenden Gewebe besteht und somit auf eine ausreichende Energiezufuhr angewiesen ist, stellt eine wichtige Erkenntnis dar. Somit führt, ähnlich wie in anderen Geweben, eine Unterbrechung der Blutversorgung zu einer Nekrose des Knochens.

Anhand der Abbildung 1 wird die Blutversorgung eines Röhrenknochens dargestellt. Die wichtigste arterielle Blutversorgung eines Röhrenknochens erfolgt über die A. nutritia(1). Die Knochenenden werden von den Aa. Accessoriae(2) versorgt. Sie anastomosieren mit den diaphysären Kapillaren und geben terminale Äste zum Knochenmark, zur Kortikalis und Spongiosa sowie zum Gelenkknorpel(3) ab.

Die äußere Kortikalisschicht wird durch periostale Gefäße versorgt(4). Das arterielle Blut mündet in die Marksinusoide (5) und weiter in die Zentralvene(6)

oder in die metaphysären Sammelvenen(7). Über die V. nutritia(8) oder eine andere große abführende Vene(9) sowie über metaphysäre Venen und kleine perforierende Kortikalisvenen(10) erfolgt dann der Abstrom des Blutes (Adler CP 2005).



**Abbildung 1: Schema der Blutversorgung des Knochens. (Nach Brooks 1971)**

Eine funktionelle Blutversorgung des Knochens ist nicht nur für die Energiegewinnung und somit für die Vitalität des Knochens wichtig, sondern auch für die anatomische und funktionelle Wiederherstellung von Knochendefekten.

In der Behandlung von Knochenfrakturen zeigt sich immer wieder, dass neben der Stabilisierung d.h. Reposition und Fixation der Fraktur und seiner Fragmente, eine adäquate Durchblutung des Knochens für die Knochenbruchheilung eine wesentliche Voraussetzung darstellt (Macnab 1974, Shim SS 1968, Trueta J 1974). Somit erklärt sich auch die Tatsache, dass der knöcherne Einbau von nicht bzw. schlecht durchbluteten Fragmenten wesentlich länger dauert als der Einbau gut durchbluteter Fragmente (Rhineland FW 1974).

## 1.5 Knochenmark

Das Knochenmark besteht aus retikulärem Bindegewebe und füllt die Räume zwischen den Knochenbälkchen der Spongiosa und die röhrenförmigen Räume der großen Extremitätenknochen aus. Es umfasst ca. 5% des Körpergewichts. Knochenmark ist ein heterogenes Organsystem mit multiplen Zelllinien. Stammzellen verschiedenster Zelllinien und Differenzierungsstufen sind in niedriger Konzentration im Knochenmark enthalten. Der Knochen enthält das rote Knochenmark, in dem die Blutzellen gebildet werden sowie gelbes Knochenmark, das hauptsächlich aus Fett besteht und vorwiegend als Energiereservoir dient (Yaszemski MJ 1996).

### 1.5.1 Stammzellen

Eine Stammzelle besitzt grundsätzlich die Fähigkeit zur ständigen Proliferation und Selbsterneuerung. Embryonale Stammzellen werden für das *Tissue engineering* nicht eingesetzt. Wohingegen die Bedeutung der Stromalen Knochenmarkszellen (Marrow Stromal Cell) MSC für das *Tissue Engineering* von potentieller Wichtigkeit ist.

### **Stromale Knochenmarkszellen, *Marrow stromal cells* (MSC)**

Neben den hämatopoetischen Stammzellen beherbergt das Knochenmark auch Zellen, die sich in nicht hämatopoetische Zelltypen differenzieren lassen.

Der deutsche Pathologe Cohnheim mutmaßte schon vor über 130 Jahren über die Existenz nicht hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark (Cohnheim J 1867).

Die ersten Vorarbeiten zur Isolierung von humanen Stromalen Knochenmarkszellen (hMSC) gehen auf Friedenstein in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts zurück (Friedenstein et al. 1974).

Caplan entwickelte daraus das Modell der Mesengenese (Caplan AI 1991), isolierte erfolgreich Zellen mit entsprechendem mesenchymalen Differenzierungspotential und führte den Terminus Mesenchymale Stammzelle (MSC) ein (Pittenger MF 1999).

Mesenchymale Stammzellen oder heutzutage vermehrt als Stromale Knochenmarkszelle bezeichnet (MSC) sind pluripotent, d.h. sie besitzen die Fähigkeit sich, unter geeigneten Bedingungen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*,



in verschiedene mesenchymale Gewebe auszdifferenzieren (z. B. Knochen, Fett, Muskel, Knorpel) (Minguell et al. 2001, Pittenger et al. 1999).

Bis heute fehlen jedoch entsprechende Oberflächenmarker zur Identifikation der stromalen Knochenmarkszellen. Sie sind im Gegensatz zu den hämatopoetischen Stammzellen CD-34 negativ. Die relativ einfache Gewinnung und Verarbeitung machen das Arbeiten mit MSC sehr attraktiv. Zusätzlich tritt die ethische Problematik der Gewinnung der ESZ nicht auf.

### **Endotheliale Progenitorzellen (EPC)**

Für die Physiologie und die Regeneration des Knochens spielt sein Gefäßsystem und die Blutversorgung eine entscheidende Rolle. Für die Gefäßbildung sind zwei Mechanismen zuständig. Die Angiogenese und die Vaskulogenese, die sich nicht durch ihre Entstehung, sondern in ihrer Voraussetzung unterscheiden.

Der Begriff Angiogenese (griechisch „die Gefäßentstehung“) beschreibt das Wachstum von Kapillaren aus bestehenden Gefäßen.

Der Begriff Vaskulogenese (lat. vas „das Gefäß“ und genese griechisch „die Geburt“) beschreibt die Entstehung von neuen Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen (Risau W 1997). Früher nahm man an, dass die Vaskulogenese nur auf den embryonalen Organismus beschränkt ist. Doch durch die Identifizierung und funktionellen Charakterisierung von EPC in peripherem Blut von Erwachsenen wurde diese Annahme widerlegt (Asahara T 1997).

Endotheliale Progenitorzellen bestehen aus einer heterogenen Gruppe, die entweder aus Knochenmark oder aus dem peripheren Blut isoliert werden können. Sie werden charakterisiert durch ihre Oberflächenmarker wie CD 34, CD 133 und VEGFR-2 (KDR o FIK-1) (Friedrich EB 2006).

Aus dem Knochenmark isolierte Progenitorzellen haben zum größten Teil CD 133<sup>+</sup> Antigene (Yin AH 1997), wohingegen die aus dem peripheren Blut isolierten Zellen diese Oberflächenmarker verloren haben (Asahara T 1997). Somit wird zwischen verschiedenen Subpopulationen unterschieden, nämlich den „late“ EPC CD34<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup> und VEGFR-2 pos. und den „early“ EPC CD34<sup>+</sup> CD 133<sup>-</sup> und VEGFR-2 pos. Populationen (Rafii S 2003, Urbich C 2004).

Rehman et al zeigten, dass zusätzlich zu den obengenannten Populationen Progenitorzellen existieren, welche keine CD 34<sup>+</sup> Oberflächenmarker besitzen

jedoch positiv für CD 133<sup>+</sup> Oberflächenmarker sind (Rehman J 2003). Diese Subpopulation scheint viel primitiver zu sein.

Es wurde zudem gezeigt, dass in Anwesenheit von Gewebeschämie oder endothelialen Defekten, EPC aus dem Knochenmark mobilisiert wurden, um sich gezielt im Bereich der Defekte anzuordnen mit dem Ziel, eine Neovaskularisation anzuregen und dadurch den Blutfluss zu erhöhen (Laufs U 2004, Rafii S 2003, Werner N 2002).

In der Tat zeigen einige Studien und Tierexperimentelle Arbeiten zur Extremitäten-Ischämie, Wundheilung und Myokardinfarkt, dass EPC an Gefäßneubildung *in vivo* beteiligt sind (Kunz GA 2006). Die Steigerung der Neovaskularisation schützt das Gewebe vor der kritischen Ischämie (Isner JM 1999). Einige Pilotstudien zeigen, dass sowohl aus Knochenmark als auch aus dem zirkulierenden Blut stammende EPC einen nützlichen therapeutischen Effekt auf die Erhöhung des Blutangebots von ischämischem Gewebe haben (Assmus B 2002, Tateishi-Yuyama E 2002).

### **1.6 Knochenersatzstoffe**

Knochenersatzmaterialien sollten Knochen vorübergehend ersetzen können und im Idealfall dem „Original“ Knochen bzw. Knochentransplantat in Bezug auf biologische Wertigkeit und Knochenheilung möglichst nahe kommen (Aldinger G 1996, Seeherman L 2001). Sie müssen aber auch bestimmte Anforderungen erfüllen. Diese sind:

- Biokompatibel
- Osteokonduktiv /Osteoinduktiv
- Belastungstabil
- Resorbierbar

### **Biokompatibilität**

Die Knochenersatzstoffe zeichnen sich in ihre Biokompatibilität dadurch aus, in dem sie keine Abstoßungsreaktion provozieren. Zusätzlich müssen sie die Anforderung erfüllen, bei nicht Resorbierbarkeit eine bindegewebs- und entzündungsfreie Knochenbindung zu gewährleisten.

**Osteokonduktivität /Osteoinduktivität**

Osteoinduktivität beschreibt die Fähigkeit eines Implantats MSC des Wirts zu knochenbildenden Osteoblasten auszudifferenzieren. Osteokonduktivität beschreibt die Fähigkeit eines Biomaterials aufgrund seiner Struktur das Einwachsen von Gefäße und Knochengewebe zu fördern (Tadic D 2003). Sie fungiert also als eine Art Leitschiene.

**Belastungsstabilität**

Primär sollte die Kontinuität des Knochens wiederhergestellt werden und dieser mechanisch belastbar sein. Die Stabilität und Belastbarkeit ist wichtig, um eine frühe Remobilisierung der Patienten zu ermöglichen.

**Resorbierbarkeit**

Um eine mechanische Stabilität zu gewährleisten sollte der Abbau des Biomaterials und die Neubildung von Knochen im Gleichgewicht stehen, so dass es zu keiner Verringerung der mechanischen Stabilität kommt. Außerdem ist die Resorptionsdauer von enormer Bedeutung. Denn erst durch ihren Abbau kann Platz für neue Knochengewebe geschaffen werden.

In der Unfallchirurgie existieren verschiedene Methoden Knochendefekte aufzufüllen. Man unterscheidet zwischen eigenem (autogenem) Material, fremden (allogenen) Material und Knochenersatzmaterialien (alloplastisch). Nach Rüger (Rüger JM 1992) werden die Ersatzmaterialien in:

- Biologisch, organische Substanzen (autogene/allogenes Transplantat)
- Synthetische Materialien
- Synthetisch, organische Verbindungen
- Komposita

unterteilt.

### 1.6.1 Autogene und Allogene Knochentransplantation

Autogene Transplantation ist sowohl biokompatibel, osteokonduktiv und osteoinduktiv und daher auch der Goldstandard bei der Knochen-  
transplantation. Ihre Verfügbarkeit ist jedoch begrenzt. Nicht zu vernachlässigen sind die weiteren Traumata, die bei der Explantation dem Patienten zugeführt werden (Neumann M et al. 2006).

Allogene Materialien bergen die Gefahr einer Infektion mit zum Beispiel HIV (Kühne Ch A 2002). Zusätzlich stellen enorme Kosten, die bei der Findung der passenden Spender und bei der Sterilisierung von allogenen Materialien entstehen, ein großes Problem dar.

Daher ist das Streben groß, synthetische Materialien zu finden, welche sich durch eine hervorragende Biokompatibilität auszeichnen.

Bekannteste Materialien sind Hydroxylapatite ( $Ca_5(PO_4)_3OH$ ) und Tricalciumphosphate ( $Ca_3(PO_4)_2$ ). Sie basieren auf Calciumphosphatderivaten und zeichnen sich durch ihre hohe Biokompatibilität und Osteokonduktivität aus.

Ob ein Material osteokonduktiv ist, hängt von verschiedenen Faktoren wie der Mikro- und Makroporosität (Porengröße, Porenvolumen, Interkonnektion (Verbindung) der Poren untereinander) und der dreidimensionalen Struktur ab.

Ein Porendurchmesser größer als  $100\mu m$  führt zum Einwachsen von Knochengewebe und zu einer verbesserten Vaskularisierung (Klein CPAT 2004).

### 1.6.2 Hydroxylapatit

Hydroxylapatit (HA) ist mit etwa 50% der Hauptbestandteil der mineralisierten Komponente des Knochens. Die Summenformel lautet  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ . Das stöchiometrische Ca/P-Verhältnis in HA kann synthetisch oder durch thermische Behandlung von natürlich vorkommender Knochengrundsubstanz sog. Sinterung hergestellt werden.

Hierbei liegen keine Einkristalle mehr vor und somit ist die Resorption des Zements nahe zu unmöglich. Größere HA-Partikel verbleiben im Körper länger als 10 Jahre. Durch die feste keramische Bindung verfügt HA jedoch über eine hohe mechanische Belastbarkeit.

Druckfestigkeitswerte zwischen 300 und 900 MPa und eine Biegefestigkeit zwischen 100 und 120 MPa lassen jedoch nur eine Anwendung für nicht lasttragende Bereiche zu (Maxian et al. 1993, Oonishi et al. 1990).

In HA beträgt das Kalzium/Phosphat Verhältnis 1,67 (DeGroot K 1980).

Die Porengrößen schwanken bei den kommerziell erhältlichen Keramiken zwischen 100 bis 1500  $\mu\text{m}$ , wobei es sich um ein interkonnektierendes Porensystem handelt.

HA hat eine osteokonduktive, jedoch keine osteoinduktive Wirkung (Carotenuto G 1999).

Verwendet wird die Keramik für orthopädische Implantate, Dentalimplantate, Innenohrimplantate und als Knochenersatz (Hench LL 1993).

### **1.6.3 Tricalziumphosphat (TCP)**

Eine weitere Materialgruppe, welche zu den Kalziumphosphatkeramiken gehört, sind die Trikalziumphosphatkeramiken (TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). Das Verhältnis von Kalzium zu Phosphat des synthetisch hergestellten TCPs beträgt 1,5. Bei TCP wird zwischen  $\alpha$ -TCP und  $\beta$ -TCP unterschieden.

Diese unterscheiden sich in ihre Temperaturphasen und unterschiedliche Kristallstruktur und die Resorbierung (Neumann M 2006). TCP gilt aufgrund seiner Zusammensetzung und der Kristallstruktur als löslich. Der Abbau erfolgt zum einen physiko-chemisch, zum anderen über die Resorption durch Monozyten, Makrophagen, Fremdkörperriesenzellen und Osteoklasten (Klein et al. 1983).

Die Porosität, Porengröße und das Porensystem der TCP sind dem der HA vergleichbar, jedoch ist die mechanische Belastbarkeit geringer. TCP besitzt wie HA eine osteokonduktive jedoch keine Osteoinduktive Wirkung (Carotenuto G 1999).

### 1.6.4 Komposita

Die Sprödigkeit und das Fehlen der Elastizität sind ein Problem bei der Verarbeitung keramischer Ersatzstoffe. Diesem Problem kann durch die Kombination mineralisch-keramischer Substanzen mit elastischen Komponenten begegnet werden. Solche Verbundstoffe werden als Komposita bezeichnet.

Im Knochenheilungsbereich bedient man sich beispielsweise der Kombinationen aus Kalziumphosphaten und Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie z.B. Kollagen I. Hier zu nennen ist das Kollagenvlies (Markenname) der Firma Osartis. Dieses besteht aus HA und Kollagen I. Beide sind Hauptbestandteile des menschlichen Knochens. Durch das Kollagen erhält das Biomaterial Elastizität und Biokompatibilität (Kikichi M 2004).

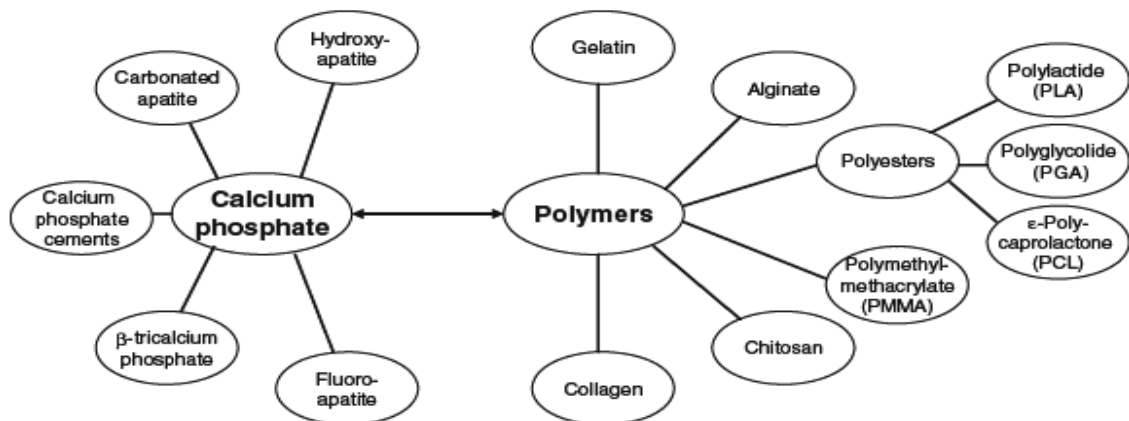


Abbildung 2: Einige mögliche Kombinationen zwischen Polymeres und Kalziumphosphate (Autor *European Journal of Trauma* 2006 · Nr.2)

### 1.6.5 Resorbierbare und nichtresorbierbare Ersatzstoffe

Bei der großen Anzahl unterschiedlichster Knochenersatzmaterialien kann folgende Klassifikation vorgenommen werden. Sie ist an der Zusammensetzung des natürlichen Knochens orientiert:

- der inerten Material- und Strukturkomponente (Matriximplantate)
- Pool an *growth and differentiation factors* (GDF-Implantate)
- der zellulären Komponente (Vitalimplantate)

### **Matriximplantate**

Vertreter der teil- und vollsynthetischen matrixanalogen Materialien sind Keramiken wie Endobon, Pyrost, Ceros (Boden SD 1999, Seeherman H 2001), Cerasorb als rein mineralische Implantate oder auch Collagraft als Kollagen-Mineral-Komposit zu nennen. Auch kalziumphosphatbasierter Knochenzement und Biogläser sind hier anzuführen.

Biogläser bestehen überwiegend aus  $\text{SiO}_2$ - Verbindungen. Sie sind meist bioaktiv, werden jedoch nicht resorbiert. Tutoplast u.a. stellen Knochenderivate dar, die durch verschiedene chemische Behandlungsschritte aus natürlichem Knochen erhalten werden. Diese Materialien können nach Transplantation jedoch keine zellgebundene oder faktorvermittelte Aktivität entfalten, sondern fungieren als biologisch passive Implantate als Volumenfüller. Sie zeigen z.T. sehr gute biomechanische und osteokonduktive Eigenschaften, aber verfügen über keine osteogene oder osteoinduktive Aktivität. Ihre sinnvolle Anwendung setzt daher ein vitales Lager voraus. Ein weiterer Nachteil stellt insbesondere bei HA-Keramiken die geringe Biodegradierbarkeit dar (schlechte Resorbierbarkeit). Lediglich HA-Partikel bis zu einer Größe von 50  $\mu\text{m}$  werden phagozytiert. Die wesentlich schneller abbaubaren  $\beta$ -Tricalciumphosphat (TCP)-Keramiken (gute Resorbierbarkeit) erweisen sich hierbei vorteilhafter, jedoch nimmt die Belastbarkeit ab und die durch den raschen Abbau freigesetzten Kristallkörner verlegen Blut- und Lymphgefäßen. Generell besteht eine ausgezeichnete Gewebeverträglichkeit der Keramiken, sowie eine gute Osteoaffinität, die bis zum direkten knöchernen Verbund mit dem umgebenden Knochen reicht. Eine hohe Porosität zieht aber wiederum eine geringe mechanische Stabilität nach sich.

Bei kalziumphosphatbasierten Knochenzementen verhindert das plombenartige Verschließen des Defekts das Einwachsen von Granulationsgewebe. Die Knochenregeneration und gleichzeitig auch der Zementabbau sollen hierbei durch die Integration des Zements in das physiologische Remodelling des Knochens stattfinden.

Wenn es gelingt, bei Kunststoffen (wie z.B. Vliese mit 98% Porosität) zusätzlich zu den strukturellen und biomechanischen Vorteilen auch ausreichende Biokompatibilität und Biodegradierbarkeit zu erlangen, werden sie zukünftig eine zunehmende Bedeutung erlangen.

### **GDF-Implantate (growth and differentiation factors)**

Bei diesen Kompositionsimplantaten aus einem Matriximplantat und aufgebracht bzw. natürlicherweise darin enthaltenen GDF dient der Implantatgrundkörper als *Carrier* für die Wirkstoffe mit definierter biologischer Aktivität (Seeherman H 2001). Hier sind wichtige Eigenschaften für die Adsorption von Faktoren und ihre kontrollierte Freisetzung nach Implantation neben den bereits erwähnten Anforderungen an das Matriximplantat erforderlich. Klinisch werden derzeit nur GDF-Implantate natürlichen Ursprungs benutzt (Grafton u.a.m.). Synthetische rekombinante Biofaktoren sind in Deutschland bisher nicht zugelassen. Verschiedene osteoinduktive *Bone morphogenic protein* (BMP)-Kompositmaterialien haben sich in der präklinischen Prüfung bewährt (Mundy GR 1996, Uludag H 2001), befinden sich aber derzeit in der klinischen Prüfung. Auch andere Faktoren wie TGF- $\beta$ 2 und IGF-1 (Boden SD 1999, Lee YM 2000) sowie andere Faktor-Carrier wie Keramiken, metallische Implantate, Kalziumphosphatzemente, Kunststoffe oder natürliche Polymere wie Kollagene oder Hyaluronsäure konnten präklinisch erfolgreich verwendet werden. Ein bisher ungelöstes Problem ist die Entwicklung eines geeigneten Matriximplantats der GDF-Implantate, welches die gleiche Biokompatibilität und Bioverfügbarkeit gewährleistet wie im natürlichen Knochen. Viele Matriximplantate neigen zu einer vorschnellen und schlagartigen Freisetzung der adsorbierten Faktoren mit unerwünschten Folgen.

### **Vitalimplantate**

Sie stellen ein Kompositum aus einem inerten Matriximplantat und lebenden Zellen dar, die von verschiedener Art und auf verschiedene Weise aufgebracht sein können. Bei den Zellen handelt es sich aber immer um Zelltypen mit natürlichem oder künstlich hervorgerufenem osteogenem Potenzial. Gute Resultate zeigte das Aufbringen von rotem Knochenmark auf HA-Keramiken oder auch Kollagen. Es beruht auf der Anwesenheit von Osteoprogenitorzellen im Mark, jedoch ist ihre Anzahl patientenindividuell und alterabhängig und schränkt so das Verfahren ein.

Bei den modernen Methoden des *Bio-* oder *Tissue engineering* werden autologe Zielzellen (differenzierte Osteoblasten, Osteoprogenitorzellen, adulte



stromale Stammzellen, Zellen des Muskelgewebes) nach *Biopsie ex vivo* gezüchtet, vermehrt und charakterisiert. Dadurch ist ein Vitalimplantat definierter reproduzierbarer Qualität bezüglich Anzahl, Art und zellulärem Differenzierungszustand herzustellen.

GDF- und Vitalimplantate werde zunehmend an stärkerer Bedeutung gewinnen, da sie dem Verhalten von natürlichem Knochengewebe in seinen vielfältigen Eigenschaften näherkommen als die bisher dominierenden, biologisch inerten Matriximplantate, welche jedoch in der Behandlung von Knochendefekten in relativ ersatzstarken Lager ihren Platz weiterhin behalten werden. Hingegen werden GDF- und Vitalimplantate bei Knochendefekten in einem ersatzschwachen Lager (Urist MR 1980) wie z.B. schlechter Allgemeinzustand, höheres Alter, bestehende Vorerkrankungen (Diabetes) oder ausgedehnte Defekte von Bedeutung sein.

#### **1.6.6 Biologische Potenz**

Die biologische Potenz eines Knochentransplantates wird anhand von verschiedenen Kriterien beurteilt (Tabelle 1). Der höchste therapeutische Wert kommt den autogenen Knochentransplantaten zu. Innerhalb des autogenen Knochens weisen die Spongiosatransplantate aufgrund ihrer Struktur die größte osteogene Potenz auf und finden die häufigste Anwendung. Das gefäßgestielte Transplantat weist die größte biologische Potenz auf, jedoch ist es aufgrund des besonderen operativen Aufwands und der Schwierigkeit des Verfahrens klinisch von geringer Bedeutung.

**Tabelle 1: Kriterien der biologischen Potenz eines Knochentransplantats (nach Mutschler und Lane)**

Biologische Eigenschaft	Transplantatwirkung
Osteogene Aktivität	Osteogenese durch übertragene Zellen
Osteoinduktive Aktivität	Osteoblastäre Transformation von mesenchymalen Zellen durch Faktoren in der EZM
Vaskularität	Erhöhte Knochenregeneration durch schnelle Blutversorgung des gestielten Transplantats
Biomechanische Stabilität	Mechanische Festigkeit eines Transplantats gegenüber verschiedenen Krafteinwirkungen

### 1.6.7 Gesicherte Einsatzgebiete

Indikationen für Knochenersatzmaterialien sind:

- das Auffüllen ossärer Defekte durch Frakturen, Tumoren, Zysten etc.
- Fusionen im Bereich der Wirbelsäule
- Arthrodesen
- Fraktur-Prävention bei Osteoporotikern durch Einbringen stabiler Transplantate in gefährdete Bereiche (z.B. Schenkelhals)

Um die Knochenheilung in Bezug auf Menge und Qualität des neugebildeten Knochens und die Zeiteinheit, in der die knöcherne Reparatur stattfindet, positiv zu beeinflussen, muss ein Knochenersatzmaterial eine osteoinduktive, osteokonduktive und eine osteostimulierende Wirkung besitzen. Außerdem sollte sie weder lokale noch systemisch toxische Effekte, keine Kanzerogenität, jedoch Histokompatibilität, Bioaktivität, Belastungsstabilität, Resorbierbarkeit, Sterilisierbarkeit und Formbarkeit aufweisen. Ein Werkstoff, der alle diese Eigenschaften besitzt, ist bisher noch nicht gefunden worden. Bei den bisher bekannten Werkstoffen stehen sich Stabilität und Osteokonduktivität /Resorbierbarkeit scheinbar unversöhnlich gegenüber. Aluminiumoxid-Keramiken sind belastungsstabil, aber bioinert; Hydroxylapatit-Keramiken sind zwar osteokonduktiv, versagen jedoch schnell bei Torsions- und Scherkräften und sind nur als Granulat resorbierbar. Resorbierbare Keramiken wie z.B. Tricalciumphosphat zeigen noch schlechtere mechanische Kennwerte.

Die Idee des Komposite beinhaltet, dass osteokonduktive Materialien zusätzlich eine osteoinduktive Komponente erhalten. Durch die Zugabe einer induktiv oder stimulierend wirkenden Komponente zu einer stabilen Grundsubstanz erreicht man primär belastungsstabile Verhältnisse, so dass das Transplantat von körpereigenem Knochen durchbaut oder sogar ersetzt wird.

## 1.7 Hypothese/Fragestellungen

Im Bereich des Knochen-Tissue-Engineering richtet sich das Hauptaugenmerk der Forschung mit der Differenzierungspotential der humanen stromale Knochenmarkszellen.

Aus der klinischen Erfahrung ist bekannt, dass eine frühe Vaskularisierung die Bedingung für das Einwachsen der Knochen regenerierenden Zellen ist. Verschiedene Studien zeigten, dass EPC an der *in situ* Neovaskularisierung beteiligt sind. Möglicherweise sind EPC geeignet auch im Knochenbereich den Aufbau eines neuen Gefäßplexus zu befördern.

Die Grundidee hinter dieser Arbeit ist die Hypothese, dass eine Mischkultur aus EPC und MSC auf einer Trägermatrix zu einer Verbesserung der Knochenheilung führt im Vergleich zu einer Matrix, die nur mit MSC beladen wurde.

Es gibt jedoch derzeit keine Arbeiten, die sich mit der Kultivierung von EPC auf Trägermatrices, einzeln oder in Kokultur mit MSC beschäftigen. Das primäre Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bedingungen für eine erfolgreiche Kultivierung beider Zellsorten auf prototypischen Trägermaterialien ( $\beta$ -TCP, Hydroxylapatit-dotierte Kollagenmatrix) zu evaluieren.

Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Adhärenz EPC, einzeln oder im Verbund mit MSC, auf den Trägermaterialien?
- Sind Beschichtungen notwendig, um die Adhäsion der EPC zu verbessern?
- Überleben EPC, einzeln oder im Verbund mit MSC, über einen signifikanten Zeitraum auf den Trägermaterialien?
- Behalten auf Matrices kultivierte EPC/MSC ihren Differenzierungszustand bei?

## II. MATERIAL UND METHODEN

### Materialien

#### 2.1.1 Apparaturen und Materialien

Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus, Hanau, Deutschland
Digitalkamera, Nikon <i>Coolpix 4500</i>	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
EDTA-Röhrchen 2,7 ml	Sarstedt, Nümbrecht
ELISA -Reader CERES UV 900C	Bio-Tek Instruments, Windoski, VT, USA
Eppendorf-Pipetten 0.5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf; Star Lab, Ahrensburg, Deutschland
Falconröhrchen 50ml, 10ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
Geldokumentationssystem <i>Geldoc 1000</i>	Biorad, München, Deutschland
Inkubator, CO <sub>2</sub>	Jouan, Winchester, VA, USA
Insulinspritzen	Sherwood Medical, Schwalbach, Deutschland
Kryoröhrchen 400-1800 µl	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kühlschrank, +4 bis -20	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank, -80°	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss, Göttingen,

Neubauer-Zählkammer	Deutschland Optik Labor, Friedrichs dorf, Deutschland
Pasteurpipetten	COPAN, Italia
PCR Thermocycler <i>Cyclogene</i>	Thermodux, Wertheim
PCR-Tubes 0,2 ml, Flachdecke	Molecular Bio Products, San Diego
Pipettenspitzen	Star Lab, Ahrensburg, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serummonovetten 10ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sicherheitswerkbank Klasse 2	Antares, Hartmannsdorf, Deutschland
Transferpipette	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Thermocycler <i>PCR-Sprint</i>	Hybaid-AGS, Heidelberg
Vortex <i>MSI Minishaker</i>	Ika Inst., Wilmington; NC, USA
Wärmebad	GFL, Burgwedel Deutschland
Zellkulturplatten, Cell+(24, 12, 6)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifuge	Heraeus, Hanau Deutschland
25 cm <sup>2</sup> Tissue culture flask	Sarstedt USA
75 cm <sup>2</sup> Tissue culture flask	Sarstedt USA
6 Wellplatte	Sarstedt Inc. USA
12 Wellplatte	Becton Dickinson USA
24 Wellplatte	Sarstedt Inc. USA
96 Wellplatte	Sarstedt Inc. USA
25 ml Polypropylene conical tubes	BD Falcon USA
50 ml Polypropylene conical tubes	BD Falcon USA

### 2.1.2 Zellen

Buffy-coat

Blutspendedienst

Frankfurt

Knochenmark freiwilliger Patienten

Universtätsklinik Frankfurt

Zelllinie SaOS<sub>2</sub>

ATCC, Manassas, VA,  
USA

### 2.1.3 Nährmedien

DMEM/Ham´s F-12(1:1) mit Glutamine

Invitrogen

EBM-mit Zusatz von

Clonetics, St. Katharinen,

EGM SingleQuots

Cambrex Bio Science

Walkersville, MD, USA

Gentamycin

1ml/500µl Medium

Heparin/Liquemin (1200µl, Heparin-Natrium  
5000 IE/0,2 ml)

Ratiopharm

Mesen Cult Basalmedium für humane

StemCell Technologies,

Mesenchymale Stammzellen

Vacouver, Canada.

MesenCult Mesenchymal Stem Cell Stimulatory  
Supplements

StemCell Technologies,  
Vacouver, Canada.

MesenCult Osteogenic Kit

StemCell Technologies,  
Vacouver, Canada.

### 2.1.4 Chemikalien

10 x PCR-Puffer+MgCl<sub>2</sub> [15 mM]

Fa. Hybaid-AGS;

Heidelberg

Agarose

Fa. Life Technologies,

Berlin

Alizarinrot

CHROMA,

Fürstfeldbruck

Ammoniak

FLUKA

Aqua dest. (steril)

Fa. Braun, Melsungen

Borsäure

Fa. Merck, Darmstadt

Dimethylsulfoxid	SIGMA
DMSO	Fa. Hybaid-AGS; Heidelberg
DNA-Leiter (100 bp – 1000 bp)	Fa. Promega, Mannheim
EDTA	Fa. Roth, Karlsruhe
Ethanol (96% - 100%)	Fa. Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fa. Sigma, Deisenhofen
FAST-RED-VIOLET	SIGMA
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
KHCO <sub>3</sub>	Fa. Merck, Darmstadt
NaOH	SIGMA
Naphtol-AS-BI-Phosphat	SIGMA
NH <sub>4</sub> Cl	Fa. Merck, Darmstadt
Polymorphprep™	Fa. Nycomed, Norwegen
Taq-Polymerase [5 units/ml]	Fa. Eppendorf, Hamburg
TRIS	Fa. USB, Cleveland, USA
β-Mercaptoethanol	Fa. Merck, Darmstadt

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Accutase	PAA Laboratories, Linz, Austria
Biscoll (Ficoll 1.077g/ml)-Sep-Trennlösung	Biochrom, Berlin
Fibronectin (10 µg/ml)	Sigma, Deisenhofen
Lysepuffer	Selbst hergestellt
MTT Proliferation Kit	Roche, Deutschland
PBS w/o Ca <sup>++</sup> Mg <sup>+</sup>	PAA, Pasching, Österreich
PBS <sup>++</sup>	Gibco, Paisley, Schottland

### 2.1.6 Zytokine

VEGF, human Recombinant	R&D Systems, Wiesbaden
-------------------------	------------------------



### 2.1.7 Antikörper

CD-133 Microbeads, human

Miltenyi Biotec, Bergisch  
Gladbach

### 2.1.8 Zellfärbung

Blue Juice 10-fach

Invitrogen

Kernechtrot

Uniklinik Frankfurt

Silbernitrat

Sigma, USA

Natriumthiosulfat Pentahydrat

Applichem, Darmstadt

Deutschland

Trypan Blau 0,4%

Invitrogen

Türkislösung

Merck, Darmstadt

### 2.1.9 RT-PCR

cDNA-Synthese mit *Superscript RT*

Invitrogen, Karlsruhe

dNTP mix 10mM 4x2,5

Invitrogen

Primer- Synthese durch MWG-Biotech

Ebersberg

Reverse Transkriptase Powerscript

BD Clontech

RNA-Isolierung mit *RNeasy*

Qiagen, Hilden

Rneasy mini Kit

Qiagen

Titanium Taq Polymerase

Bd Clontech

## Methoden

### 2.2 Zellverarbeitung und -kultivierung

#### 2.2.1 SaOS-Zellen

Das für die SaOS-2-Zellen verwendete Standard-Medium besteht aus folgenden Elementen: DMEM F-12 (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium F-12) + 10% FCS (Fötale Kälberserum). Die mesenchymalen Stammzellen wurden mit Mesencult Komplett Medium und die endothelialen Progenitorzellen mit Endothelial Basal Medium kultiviert. Die Inkubation der Zellen fand bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank statt. Der Mediumwechsel fand alle 72 h statt.

#### 2.2.2 Isolierung und Kultivierung von Mesenchymalen Stammzellen (MSC)

Die Studienprotokolle waren von der Lokalen Ethikkommission anerkannt und eine Einverständniserklärung der Patienten zur Verwendung der Knochenmarkzellen für wissenschaftliche Zwecke lag vor.

Während einer Operation im Bereich des Beckenkamms in der Klinik für Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie der Universitätsklinikum Johann Wolfgang Goethe in Frankfurt am Main, wurde ca. 20-30 ml Knochenmark aspiriert und mit 1200 µl Heparin in einer 50 ml Spritze gemischt.

Knochenmark wird im Verhältnis 1:3 mit PBS<sup>w/o</sup> in einem Zentrifugenröhrchen gemischt und für 10 min. bei 900 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend verworfen, das Pellet dann in 10 ml PBS<sup>w/o</sup> aufgenommen und die Zellsuspension für 10 min. bei 900 g und RT erneut zentrifugiert. Das Pellet wird mit PBS<sup>w/o</sup> resuspendiert und 1:1 auf Ficoll (1.073 g) aufschichten und für 30 min. bei 900g und RT zentrifugiert. Die obere Schicht des Gradienten bis zur Phasengrenzfläche enthält die MSC und wird vorsichtig abgesaugt. Die MSC werden in ein neues Röhrchen gegeben und mit dem dreifachen Volumen an PBS<sup>w/o</sup>/ 2% FCS versetzt. Anschließend werden die Zellen für 10 min. bei 900g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in Mesencult Komplett Medium resuspendiert. Die Zellen werden auf eine Dichte von 5x10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> eingestellt.

Die Zellen werden für 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert, bevor der erste Mediumwechsel stattfindet. Dann erfolgt alle 3 Tage der Mediumwechsel.

### 2.2.3 Zellpassage der Mesenchymalen Stammzellen (MSC)

Beim Erreichen der Konfluenz wird das Medium komplett entfernt und die Zellen mit PBS<sup>w/o</sup> gewaschen. Um die Zellen vom Untergrund zu lösen, werden diese mit 5 ml Accutase für 5 min. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die mikroskopische Kontrolle ein vollständiges Ablösen der Zellen ergab, wurde die Accutase mit MesenCult 1:1 verdünnt und die abgelösten Zellen anschließend bei 400g zentrifugiert.

Nach Absaugen des Überstandes werden die Zellen resuspendiert und mit frischem Medium in zwei neue Kulturgefäße gegeben oder aber für die Experimente genutzt.

### 2.2.4 Isolierung und Kultivierung von CD 133<sup>-</sup> Endothelial Progenitor Cell (EPC)

PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) werden über eine Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aus Buffy-Coat isoliert, und auf Fibronectin beschichteten (10µg/ml) 24-Lochplatten, in einer Dichte von ca.  $2 \times 10^6$  PBMCs/cm<sup>2</sup> ausgesät.

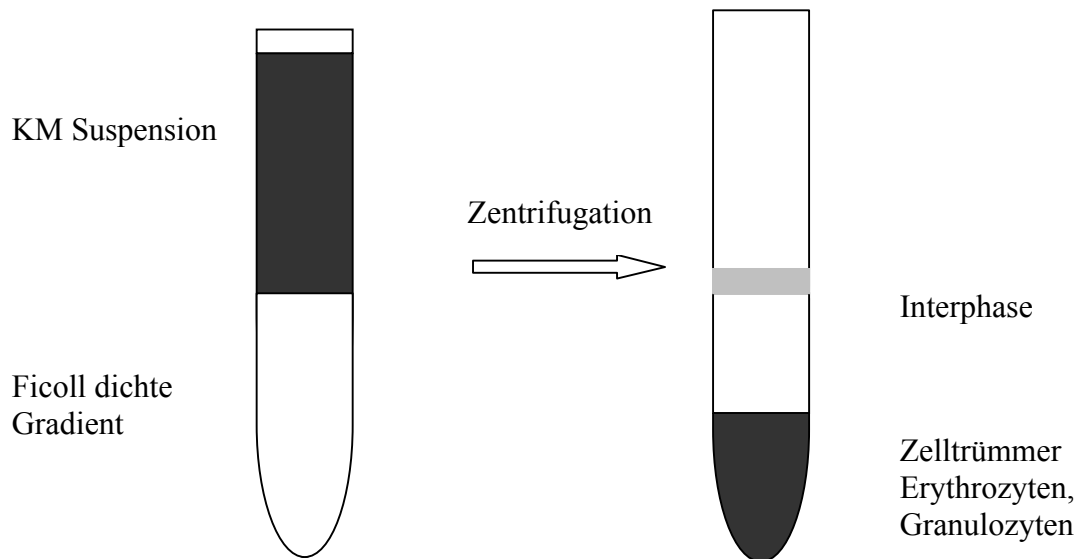
Ab hier erfolgt alle Waschschrte mit PBS<sup>w/o</sup> und zehnmütiger Zentrifugation bei 700g.

Zunächst wird der Buffy-Coat mit PBS<sup>w/o</sup> 1:3 verdünnt.

Die in 50ml Falconröhrchen vorgelegte Ficoll-Lösung (1.077g/ml) wird mit dem verdünnten Buffy-Coat beschichtet und bei 700g für 20 Minuten zentrifugiert. Die sich in der Interphase befindliche PBMC-Fraktion wird mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in 50 ml kalter PBS<sup>w/o</sup> resuspendiert. Es folgt anschließend zwei Waschschrte.

Das Zellpellet wird nun in 10 ml EBM (Endothelial Basal Medium + *EGM2 SingleQuots*) resuspendiert. Anschließend erfolgt eine Zellzählung (siehe 2.2.6). Die Zellen werden in einer Dichte von ca.  $5 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach drei Tagen erfolgt ein Mediumaustausch. Dabei werden die nicht, bzw. schwach adhärierenden Zellen entfernt. Danach werden die adhären Zellen für 2 weitere Tage kultiviert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen 2 x mit PBS<sup>w/o</sup> gewaschen, um nicht adhären Zellen zu entfernen.



**Abbildung 3: Isolierung der CD 133<sup>-</sup> Endothelial Progenitor Cell (EPC)**

### 2.2.5 Isolierung und Kultivierung von CD 133<sup>+</sup> Endothelial Progenitor Cell (EPC)

Alle Schritte müssen unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Um ausschließlich CD 133<sup>+</sup> (*outgrowth*) Endothelial Progenitor Cell (CD 133<sup>+</sup> EPC) zu isolieren, wird das Prinzip der magnetischen Separation zu Hilfe genommen (*Magnetic activated cell sorting* - MACS). Bei dieser Trennmethode werden die Zellen über monoklonale Antikörper markiert, die an ferromagnetische Partikel konjugiert sind. Die Zellsuspension mit den spezifisch markierten und den unmarkierten Zellen wird auf eine Trennsäule aufgetragen, die sich in einem Magnetfeld befindet. Die antikörpermarkierten Zellen bleiben in der Säule haften, die unmarkierten Zellen werden herausgewaschen. So ist es möglich bei der MACS Methode sowohl eine Positivselektion als auch eine Negativselektion durchzuführen.

Bei der Negativselektion befinden sich die Zellen im ausgewaschenen Eluat.

Versuchsdurchführung:

Die Zellsuspension wird einmal mit Puffer (PBS<sup>w/o</sup>, 2mM EDTA und 0,5%FCS) gewaschen und auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  -  $1 \times 10^8$  eingestellt. 300µl der

Zellsuspension wird mit 100µl FcR-*Blocking* Reagenz und 100µl CD 133<sup>+</sup> Cell MikroBeads gemischt und für 30 min. bei +4 °C zur Antikörperbindung inkubiert. Das FcR-Blocking blockiert die Fc-gamma Rezeptoren. Diese Rezeptoren binden die konstante Antikörperregion. Durch die Blockade wird die unerwünschte Bindung von Antikörpern an Fcgamma-positiven Zellen (NK-Zellen, Monozyten, Granulozyten) verhindert. Dies führt zu einer Erhöhung der Spezifität.

Die *Bead*-markierte Zellsuspension wird anschließend auf eine Trennsäule, die sich in einem Magnetfeld befindet aufgetragen (siehe Abbildung). Anschließend wird die Säule mit *MiniMacs* Spülpuffer viermal vorsichtig gewaschen. Nach dem Waschvorgang wird die Trennsäule mit der CD 133<sup>+</sup> Zellen vom Magnetfeld entfernt und auf ein unbenutztes Auffanggefäß gegeben. Die CD 133<sup>+</sup> Zellen werden aus der Säule eluiert und auf 10 ml Spülpuffer aufgeführt und bei 850 g für 10 min. zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden die Zellen in einem Expansionsmedium (IMDM + 10%FCS, 50 ng/ml VEGF, 100 ng/ml SCF) auf Fibronectin beschichtete Kulturgefäße ausplattiert und für 3 Wochen expandiert. Mediumwechsel findet 1 x wöchentlich statt. Hierfür wird das halbe Volumen Medium vorsichtig oberflächennah abpipettiert und durch frisches Medium ersetzt. Bei hoher Zelldichte wurden die nur schwach bis gar nicht adhärierenden Zellen zur weiteren Expansion subkultiviert.

Nach 3 Wochen werden die Zellen entfernt und in eine Fibronectin-vorbeschichtete Wellplatte (BD-Biocoat) transferiert und mit EndoCult-Medium endothelial differenziert (ca. 7 Tage).

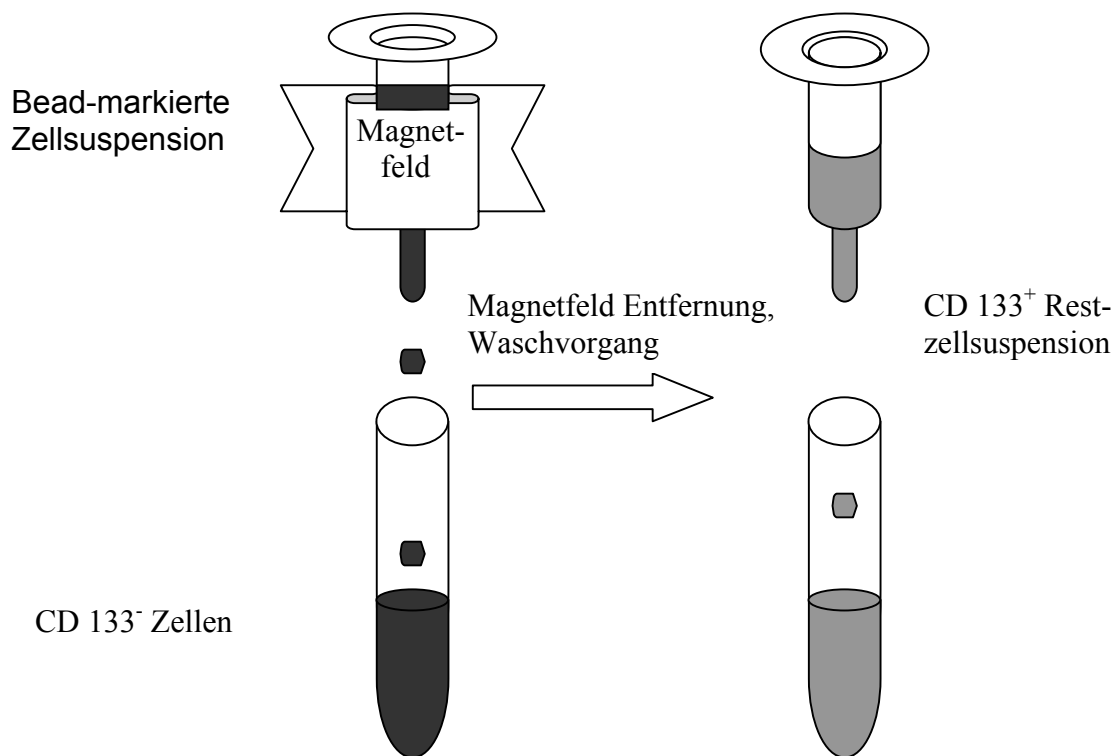


Abbildung 4: Isolierung der CD 133<sup>+</sup>EPC

### 2.2.6 Zellzählung und Vitalitätstest

Defekte Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau auf, lebende Zellen dagegen schließen ihn aus und erscheinen im Mikroskop farblos.

Um die Zellzählung vorzunehmen, werden 50µl der Zellsuspension mit 50µl eines Farbstoffs angefärbt. Für SaOS2-Zellen wird das Farbstoff Trypanblau 0,4% verwendet, während für die Anfärbung der MSC und EPC Türkislösung verwendet wird.

Um die Zellzählung vorzunehmen, wird 10µl dieses Gemischs in die Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop die Zellzahl der ungefärbten, lebenden Zellen ermittelt.

#### *Prinzip der Neubauer-Zählkammer:*

Durch Auszählung der auf den Zählfeldern liegenden Zellen lässt sich die Anzahl der Zellen pro Volumeneinheit errechnen.

Zellzahl wird dann auf Grund der Verdünnung mit einem Verdünnungsfaktor multipliziert. Multipliziert man diesen Wert mit einem entsprechenden Faktor

(Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche und Kammerhöhe) erhält man die Zellzahl pro Volumeneinheit.

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Zellzahl}(4 \text{ Großquadrante})/4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000$$

### **2.2.7 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen**

Die Zellen wurden zuerst mittels Accutase 0,5 ml vom Boden der Kulturflasche abgelöst und anschließend abzentrifugiert. Nach Resuspendierung im Einfriermedium (10 % DMSO (Dimethylsulfoxid), 90 % FCS) werden die Zellen in Cryo-Röhrchen überführt, um sie übernacht auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abzukühlen. Die Lagerung erfolgt anschließend in flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Die tiefgefrorene Kyroröhrchen werden aus dem Stickstoffbehälter entnommen und im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Unmittelbar nach dem Auftauen werden die Zellen in ein 15 ml Röhrchen (BD Falcon) überführt und auf 10 ml mit  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Medium aufgefüllt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 10 min. bei 400g. Der Überstand wird verworfen, die Zellen mit Medium resuspendiert und erneut bei 400g abzentrifugiert. Für MSC wurde MesenCult-medium verwendet, für SaOS-Zellen DMEM:F-12.

Anschließend werden die Zellen in Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf Zellkulturflaschen zur Weiterkultivierung verteilt. Nach 24h erfolgt erneut ein Mediumwechsel.

### **2.2.8 Osteogene Differenzierung und Vergleich verschiedener Medien (Osteogenic Stem Cell Kit, DMEM:F12 und Mesencult)**

Für die Osteogene Differenzierung werden die Medien DMEMF:12 und Mesencult mit folgenden Zusätzen, Ascorbinsäure [ $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$ ],  $\beta$ -Glycerophosphat [ $10^{-7}\text{M}$ ] und Dexamethason [ $10^{-2}\text{M}$ ] kombiniert. Der *Osteogenic stem Cell Kit* (Cell Systems) besteht aus Mesencult MSC Basal Medium, Osteogenic Stimulatory Supplements (Human), 1M  $\beta$ -Glycerophosphat, Dexamethason und Ascorbinsäure.

MSC und SaOS-2 Zellen werden in 6-Wellplatten ausplattiert und mit verschiedenen Medien inkubiert. Nach bestimmten Zeitabständen werden die Osteogenen Differenzierungsgrade der Zellen mittels verschiedenen

Färbeverfahren (Van Kossa-, Alizarin-, Alkalische Phosphatase- Färbung) aber auch molekularbiologisch untersucht.

## **2.3 Färbemethoden**

### **2.3.1 Von Kossa Färbung**

Zunächst werden die Zellen mit PBS<sup>w/o</sup> dreimal gereinigt. Um sie zu fixieren, wird eisgekühltes Ethanol (70%) hinzugegeben und für 20 min. bei RT inkubiert. Anschließend wird das Ethanol abgesaugt und die Zellen mit Aqua-dest gewaschen. Die Zellen werden für 60 min. bei RT mit einer 5 % Silbernitratlösung inkubiert und danach wieder dreimal mit Aqua-dest gewaschen. Im nächsten Schritt werden die Zellen 5 min. bei RT in einer 5 % Natriumthiosulfat Lösung inkubiert und erneut mittels Aqua-dest dreimal gewaschen.

Kalziumablagerungen in Mineralisierungszonen färben sich durch die Reduktion mit Silber schwarz an.

Anschließend findet noch eine 10 minütiger Gegenfärbung mit Kernechtrot 0,05 % statt.

Die Zellen werden zum Schluss noch einmal mit Aqua-dest erneut gereinigt, um sie vom Farbstoff zu befreien.

### **2.3.2 Alizarinrot-Färbung**

Für den Nachweis von abgeschiedenen, kristallinem Calcium wurde zusätzlich die Alizarin-Färbung angewendet.

Vorbereitung der Färbelösung:

0,5 g Alizarinrot wird mit 45 ml Aqua-dest versetzt, unter ständigem Rühren und durch Zusatz von 5 ml einer 1:100 verdünnten 28%igen Ammoniaklösung gelöst. Durch Zusatz weiterer Ammoniaklösung wird ein pH von 6,36-6,40 eingestellt, anschließend die Lösung filtriert.

Das Kulturmedium wird gründlich abgesaugt und verworfen.

Die Zellen werden mittels Formaldehyds 0,5-2% für 30 s fixiert und mit Aqua-dest dreimal gewaschen.



Die Zellen werden anschließend mit 250 µl Alizarinrottlösung für 10-15 min bei RT und ohne Einwirkung von Licht angefärbt. Danach wurde erneut dreimal mit aqua dest gewaschen.

### **2.3.3 Alkalische Phosphatase Färbung**

Für die Färbung der alkalischen Phosphatase müssen die Zellen zunächst im serumfreien Medium für 48h inkubiert werden. Anschließend wird der Zellrasen dreimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen.

Das angewandete Fixierungsgemisch besteht aus 90ml Methanol und 10ml Formaldehyd [37%], mit dem der Zellrasen für 30 s fixiert wird. Die Fixierungslösung wird anschließend abschlagen und die Zellen dreimal mit Aqua-dest waschen.

#### *Vorbereitung:*

10-25mg Naphtol-AS-BI-Phosphat (Sigma) werden in 0,5ml Dimethylsulfoxid gelöst, außerdem werden 50 ml TRIS-Puffer (0,2M) pH 8,2-9,8 und 50mg FAST-RED-VIOLET (Sigma) dazugemischt und filtriert. Anschließend werden mittels 1N NaOH ein pH von 9,8 eingestellt.

Die fixierten Zellen werden mit der Färbelösung bei Raumtemperatur, ohne Lichteinwirkung für 20 min. angefärbt. Die Färbelösung wird anschließend abepittiert und die Zellen mit Aqua-dest gewaschen. Die rotbraune Färbung zeigt das Vorhandensein zellulärer Alkalischer Phosphatase an.

## **2.4 Beschichten der Knochenersatzstoffe TCP mit extrazellulären Matrixproteinen**

### **2.4.1 Kultivierung von SaOS2, MSC und EPC auf TCP**

Unter sterile Bedingungen werden zunächst die TCP-Granula mit Fibronectin (10 µg/ml in PBS<sup>w/o</sup>) oder Collagen G (0.75 mg/ml in PBS<sup>w/o</sup>) beschichtet. Danach schließt sich eine 1 stündige Inkubation bei RT (Fibronectin) bzw. 37°C (Collagen) an. Der Kontrollansatz wird nur in PBS<sup>w/o</sup> inkubiert.

### **2.4.2 Aussaat der Zellen auf Matrices (TCP, Collagen):**

Unter sterile Bedingungen wird das Medium verworfen. Die Zellen werden anschließend mit PBS<sup>w/o</sup> gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 10 ml PBS<sup>w/o</sup> für 10 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach dem Verwerfen des PBS<sup>w/o</sup> werden die Zellen mit 5 ml Accutase für 10 min. inkubiert und nach Ablösen der Zellen bei 700g abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen ins Medium resuspendiert. Anschließend wird die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf eine Dichte von  $2,5 \times 10^6/\mu\text{l}$  (MSC),  $2,5 \times 10^6/\mu\text{l}$  (EPC) eingestellt.

Die vorinkubierten TCP-Granula werden dicht in ein Well einer 12 Lochplatte transferiert, so dass der Boden einschichtig vollkommen bedeckt ist. Die Granula werden mit jeweils  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu\text{l}$  Medium mittels einer Eppendorfpipette beimpft.

Das Medium wird vom Boden der Wellplatte wieder abgesaugt und erneut auf die TCP-Granulas verteilt, so dass alle Granula einmal mit der Zellsuspension beimpft werden. Nach 10 min Inkubation im 37°C Inkubator wird die Zellsuspension wieder vom Boden der Wellplatte mittels einer Mikorpipette abgesaugt und erneut auf die TCP-Granula verteilt. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt.

Im nächsten Schritt werden je 4-5 TCP-Granula pro Well einer 24 Lochplatte transferiert, und mit jeweils 1 ml Kulturmedium versetzt (mit bzw. ohne osteogene Stimulantien).

### **2.4.3 Ermittlung der Aussaat-effizienz:**

Die nicht auf den TCP-Granula haften gebliebenen Zellen, die sich jedoch aber noch auf dem Boden der Wellplatte befinden, werden mittels Accutase abgelöst und gezählt.

Durch einen Quotienten aus den gezählten nicht haften gebliebenen Zellen Y und der Anzahl der initial eingesetzten Zellen ( $2,5 \times 10^5$  Zellen) errechnet sich die Aussaat-effizienz.

$$\text{Aussaat-effizienz (\%)} = [1 - (Y / 2,5 \times 10^5)] * 100\%$$

#### **2.4.4 Nachweis des Überlebens und des Differenzierungszustandes der MSC, EPC und MSC+EPC auf $\beta$ -TCP.**

Nur vitale Zellen synthetisieren mRNA bzw. machen Genexpression. GAPDH ist ein Enzym aus der Glykolyse, seine Expression indiziert, dass basale Stoffwechselfvorgänge ablaufen.

Der Differenzierungszustand wird anhand der Genexpression von ALP, Kollagen-I, Osteonektin, Osteokalzin(MSC) bzw. von vWF und VEGF (EPC) ermittelt.

Die Differenzierung von einer Stammzelle zur Osteoblasten wird in drei Stadien eingeteilt.

- Proliferation
- Synthese extrazelluläre Matrix und Differenzierung zur reifen Osteoblasten
- Mineralisation

Die Differenzierung der Osteoblasten geht mit einer charakteristischen Genexpression einher. Hier werden unter anderem alkalische Phosphatase, Kollagen I, Osteonektin, Osteocalcin produziert. Zur Differenzierung der Endotheliale Funktion werden die Genexpression von vWF und VEGF-2 hinzugezogen.

Jeweils am Tag T0, T2, T6 und T10 werden die  $\beta$ -TCP-Granula mittels einer sterilen Pinzette in einen sterilen Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) mit 350  $\mu$ l Zellyse-Puffer (Puffer *RLT* + 10 $\mu$ l Mercaptoethanol/ml, Qiagen) überführt. Die Zellen werden anschließend für 10 min. inkubiert. Alle 2-3 min wird Lyse-Puffer vom Boden der Eppendorfreaktionsgefäß abgesaugt und erneut auf die Granula pipetiert.

Der Zellyse-Puffer wird in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und das Gefäß mit der Granula bei 900g für 5min zentrifugiert. Der aus der Granula ausgetretene Zellysepuffer wird abgenommen und zu dem zuvor abpipetierten Zellysepuffer gegeben. Die weitere Verarbeitung erfolgte dann wie in Punkt 2.5.1 RNA-Isolierung beschrieben.

#### **2.4.5 Cokultivierung von MSC und adhärenzte early EPC auf TCP**

Jeweils  $1.25 \cdot 10^5$  MSC bzw. EPC in einem Volumen von jeweils 100  $\mu$ l werden vermischt und auf die TCP-Granula wie oben beschrieben ausgesät.

#### **2.4.6 Aussäen der Zellen auf Collagenvlies**

Alle Arbeiten müssen unter sterile Bedingungen stattfinden.

Um den niedrigen pH-Wert abzupuffern wird das Collagenvlies in einer 24 Wellplatte mit 1ml FCS für 1h bei 37°C im Brutschrank vorinkubiert.

Zwischenzeitlich erfolgt eine Zelltrennung, Zellzählung sowie Zellzahl Einstellung wie in 2.2.6 und 2.4.2 beschrieben.

Das Collagenvlies in eine neue Wellplatte transferiert. Anschließend wird das Collagenvlies mittels einer Mikropipette mit 100 $\mu$ l der Zellsuspension ( $2,5 \cdot 10^5$  Zellen) beimpft.

Der Zellsuspension wird vom Boden der Wellplatte erneut abgesaugt und auf das Collagenvlies verteilt. Anschließend werden die Collagenvliese im Brutschrank für 10min. bei 37°C inkubiert. Nach der genannten 10 min. wird das Restzellsuspension vom Boden der Wellplatte abgesaugt und erneut auf das Collagenvlies verteilt. Dieser Schritt wird dreimal wiederholt.

Zuletzt wird das Collagenvlies in eine neue Wellplatte mit 1ml Medium transferiert und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Alle 3 Tage wird das Medium gewechselt und jeweils am Tag T0, T2, T6, T10 werden die Collagenvliese mittels einer sterilen Pinzette in einen sterilen Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) mit 350  $\mu$ l Zellyse-Puffer überführt. Die Zellen werden anschließen für 10 min. bei 37°C inkubiert. Alle 2-3 min. wird der Zellysepufferl vom Boden Eppendorfreaktionsgefäß abgesaugt und erneut auf das Collagenvlies gegeben.

Der RLT-Puffer wird in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

Um die DNA zu scheren muss der Puffer mittels einer Insulinspritze fünfmal aspiriert werden. Anschließend wird das Lysat entweder bei -80°C eingefroren oder für die RNA-Isolierung weiter verwendet.

Um das Überleben und die Differenzierung der Zellen zu untersuchen werden für die PCR folgende Primer verwendet. GAPDH, CBFA1, Osteonectin, Osteocalcin, Collagen-I, Alkalische Phosphotase (ALP), Von Willebrand Faktor (VWF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).

### 2.4.7 MTT-Assay

Um die Vitalität der ausgesäten Zellen zu prüfen ist die MTT-Assay-Methode geeignet. Lebende Zellen nehmen das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) auf und setzen es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem stark blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff um.

Im Versuchsvorgang wurden die Zellen auf  $\beta$ -TCP für höchstens 10 Tage in eine 96-Lochplatte bei 37°C inkubiert. Am Tag 2, 6 und 10 findet die Bearbeitung der Wellplatten statt.

10  $\mu$ l MTT-Lösung werden in jede Wellplatte gegeben. Anschließend findet eine Inkubation für 4h statt.

Für die photometrische Messung (570-590 nm) werden die Zellen übernacht mit einer in dem Kit enthaltenen Lösung lysiert, um den Farbstoff freizusetzen. Der Überstand wird anschließend in eine neue Wellplatte transferiert. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen und mit der Zellzahl.

## 2.5 RT-PCR

### 2.5.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der zellulären RNA wurde mit *RNeasy* durchgeführt. 350  $\mu$ l RLT-Puffer (Lysierungspuffer): 1000  $\mu$ l + 10  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol wurden auf das Zellpellet gegeben und es erfolgte ein 2-3 maliges Aspirieren mit einer Insulinspritze, um die DNA zu scheren. Daraufhin wird 350  $\mu$ l Lysat mit 350  $\mu$ l EtOH (70 %) gemischt, auf eine *RNeasy*-Säule pipettiert und 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen und die Probe mit 700  $\mu$ l Puffer *RWI* versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben) und Verwerfung des Eluats erfolgte die Zugabe von 500  $\mu$ l Puffer *RPE*. Nach Wiederholung des zuletzt beschriebenen Vorgangs erfolgte 2 min Zentrifugation bei 10.000 g. Danach wurde die RNA durch Zugabe von 25  $\mu$ l DEPC-Wasser (DEPC = Diethyl-Pyrocbonat = RNase-Inhibitor) direkt auf die Säulenmembran und eiminütiger Zentrifugation bei 8000g eluiert.

Danach wurde die RNA in die cDNA-Synthese eingesetzt.

### 2.5.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit je 1 µg RNA, mittels *Superscript RT* nach Anleitung des Herstellers. Zu den cDNA-Synthese-Kits wurden sämtliche notwendigen Lösungen gebrauchsfertig mitgeliefert. Für die Durchführung der cDNA-Synthese wurden jeweils 1 µl *Oligo-dT-Primer* in sterilen 0,2 ml-PCR-Gefäßen vorgelegt und mit maximal 17 µl RNA-Lösung gemischt. Nach 10 min Inkubation bei 70°C und 1min Lagerung auf Eis wurde jede Probe mit jeweils 10,5 µl Mastermix (enthält 3 µl 10x PCR-Puffer, 3 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 1,5 µl dNTP's, 3 µl DTT) versetzt und 5 min bei 42°C inkubiert (Thermocycler). Nach Zugabe von jeweils 1 µl *Superscript RT* (reverse Transkriptase) erfolgte die 50 min Inkubation bei 42°C + 15 min bei 70°C. Die Proben wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.5.3 Kontroll-PCR für GAPDH zur Bestimmung des relativen cDNA-Gehalts einer Probe

Substanzen für PCR von BD-Clontech Heidelberg, Primer vom MWG-Biotech, Probenpuffer von Life Technologies; PCR-Bedingungen: Programm 35 Zyk (PCR-Sprint).

#### Änderung: Eppendorf Taq, 5 u/µl

- 1 x Ansatz der Mastermixe für Kontroll-PCR

1-facher Ansatz	H <sub>2</sub> O[µl]	10XPCR Puffer + Mg <sup>2+</sup> [15mM,µl]	DNTP [je 10 mM, µl]	Primer GAPDH up [µl]	Primer GAPDH down [µl]	Taq [14 u/µl][µl]
Mastermix	18,75	2,25	0,25	0,25	0,25	-----
Taq-Mix	2	0,25	-----	-----	-----	0,25

- Ansätze auf Eis pipettieren, pro Tbe 22,0µl Mastermix + 0,5µl cDNA Probe + 2,5µl Taq-Mix (in dieser Reihenfolge)
- Nach Zugabe des Taq-Mix, Proben in Eppifuge abzentrifugieren (Schnelltaste, bis ca. 2000U7min)
- PCR:

1. 120 s	94°C	] x 35
2. 30 s	94°C	
3. 30 s	58°C	
4. 30 s	72°C	
5. 600 s	72°C	

Proben einfrieren (-20°C) oder in Gelelektrophorese einsetzen.

**Tabelle 2: Verwendete Primersequenzen zum Nachweis der Expression unterschiedlicher Rezeptorgene**

Gen	Sequenz (5'--3')	Produkt [dp]
GAPDH	1. ATC TTC CAG GAG CGA GAT CC 2. ACC ACT GAC ACG TTG GCA GT 3. AGT AGA GGC AGG GAT GAT GTT	540 bp 470bp
vWF	1. CAC CGT TTG CCC ACC CTT CG 2. GCC CAC TGG GAG CCG ACA CT 1. CAC CGT TTG CCC ACC CTT CG 2. GCC CAC TGG GAG CCG ACA CT	434 bp
Osteocalcin	1. CAT GAG AGC CCT CAC 2. AGA GCG ACA CCC TAG	314 bp
Osteonektin	1. GAT GAG GAC AAC AAC CTT CTG AC 2. TTA GAT CAC AAG ATC CTT GTC GAT	368 bp
Cbfa1	1. CGA CAG CCC CAA CTT CCT GTG 2. TGC CTT CTG GGT TCC CGA	556 bp
ALP	1. ACG TCG CTA AA ATG TCA TC 2. CTG GTA GGC GAT GTC CTT A	475 bp
Kollagen I	1. TGA CGA GAC CAA GAA TCT G 2. CCA TCC AAA CCA CTG AAA CC	599 bp
VEGF	1. CAC CGT TTG CCC ACC CTT CG 2. GCC CAC TGG GAG CCG ACA CT	434 bp

### 2.5.4 Semiquantitative RT-PCR

Zunächst erfolgte der Ansatz der Mastermixe für die entsprechenden Parameter gemäß der Tabelle.

**Tabelle 2: 1 x Ansatz der Mastermixe für 12 Parameter: Für Mehrfachansätze mit Anzahl der cDNA-Proben + 0,5 multiplizieren, pro Tube werden 40  $\mu$ l pipettiert.**

1xfach	GAPDH	Cbfa1, Osteonectin, Osteocalcin, AP, Collagen I, vWF, VEGF
H <sub>2</sub> O	34,5 $\mu$ l	34 $\mu$ l
10xPCR-Puffer	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
dNTP's	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
Primer up	0,25 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
Primer down	0,25 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
DMSO	----	----
cDNA-Mix pro Ansatz	2,5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Taq-Mix pro Ansatz	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

Jeder Reaktionsansatz enthält 50 $\mu$ l und setzt sich aus dem Mastermix, Taq-Mix und cDNA-Mix zusammen. Der Mastermix wurde in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen (pro Parameter ein 1,5 ml Reaktionsgefäß) gemischt und jeweils 40  $\mu$ l auf PCR-Gefäße verteilt. Der cDNA-Mix enthält die zu untersuchende Probe, 10 x PCR-Puffer und H<sub>2</sub>O. Jeweils 5  $\mu$ l cDNA-Mix wurden auf die PCR-Ansätze verteilt. Weiterhin wurden 5  $\mu$ l Taq-Mix pro PCR-Tube benötigt, Aktivität 1,2 units pro Ansatz. Folgende PCR-Bedingungen wurden gewählt:

- |    |          |      |        |
|----|----------|------|--------|
| 1. | 120 s    | 94°C |        |
| 2. | 30 s     | 94°C | ] x 35 |
| 3. | 30 s     | 58°C |        |
| 4. | 30 s     | 72°C |        |
| 5. | 600 s    | 72°C |        |
| 6. | $\infty$ | 4°C  |        |



### 2.5.5 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese werden mittelgroße Gele für eine Probenzahl von 2 x 19 plus 2 x Molekulargewichtsmarker gegossen. Hierzu werden 2,3g Agarose in 115 ml TBE-Puffer + 20 ml H<sub>2</sub>O für 4 min in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid wird die Agarose in die *Polymerasechaine-reactin*-Form gegossen und es erfolgt die 30 minütige Polymerisation.

Die Proben werden mit jeweils 5 µl *Blue juice* Puffer versetzt. Es werden 10 µl Probe pro Geltasche, bzw. 6 µl Molekulargewichtsmarker pro Reihe aufgetragen. Die Laufzeit beträgt 60 min bei 120 Volt. Danach wurde das Gel auf einem UV-Transluminator betrachtet und mit Videokamera fotografiert und digitalisiert.

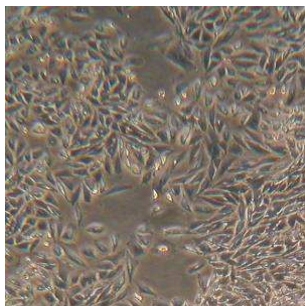
Die densitometrische Bestimmung der Bandenintensität erfolgte mit der Software *Multianalyst*.

## III. - E R G E B N I S S E

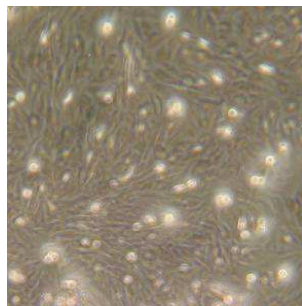
### 3.1 Zellmorphologie

Nach Inkubation von SaOS-2-Zellen, MSC und EPC mit ihren jeweiligen Standardmedien (Mat+Met. Punkt 2.2) wurden die zellmorphologische Charakteristika mikroskopisch beurteilt.

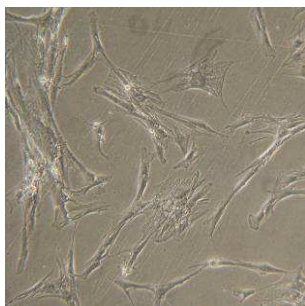
SaOS-2 und MSC Zellen sind spindelförmig- und zeigen ein fibroblasten-ähnliches Erscheinungsbild. Die Verdopplungszeit der SaOS-2 Zellen betrug 32h. Die Verdopplungszeit der SaOS-2 Zellen nahm unter der osteogen Umdifferenzierung mit  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und Dexamethason ( $\beta$ -Gly, Acs, Dex) deutlich ab. Nicht nur die Verdopplungszeit sondern auch die phänotypische Morphologie änderte sich. Bei den SaOS-2 Zelllinien konnten ab dem 20-22 Kulturtag kleine knötchenförmige Formationen beobachtet werden, die sich in der Van Kossa Färbung als Kalkformationen nachweisen ließen. Die fibroblastenähnliche Morphologie der MSC veränderte sich nicht.



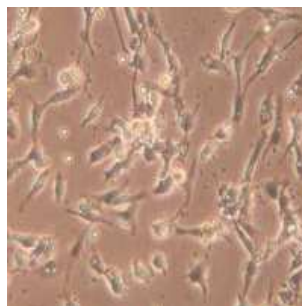
a.)



b.)



c.)



d.)

**Abbildung 5: Mikroskopische Darstellung der Zellmorphologie Vergrößerung 200 fach**

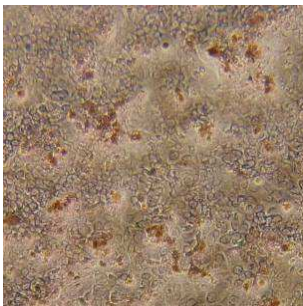
- a.) Fibroblastenartiges Wachstum der SaOS-2 unter Kultivierung mit DMEF:F12
- b.) Knötchenförmige Formation der SaOS-2 unter Kultivierung mit DMEF:F12 +  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und Dexamethason ( $\beta$ -Gly, ACS und Dex).
- c.) Fibroblastenartiges Wachstum der MSC unter Kultivierung mit Mesencult
- d.) Endotheliale Progenitorzellen unter Kultivierung mit Endothelial Basal Medium

## 3.2 Färbungen

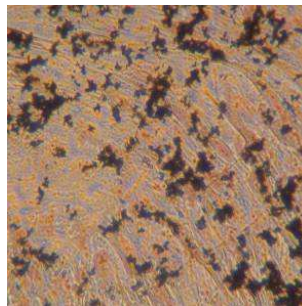
### 3.2.1 Van Kossa Färbung

Um einen Vergleich des osteogenen Stimulierungspotentials von DMEM:F12 mit den oben genannten Zusätzen ( $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und Dexamethason) und dem kommerziell erhältlichen *osteogenic Stem Cell Kit* (siehe 2.3.1) durchführen zu können, wurden die Färbemethoden Van Kossa, Alizarinrot und Alkalische Phosphatase angewandt.

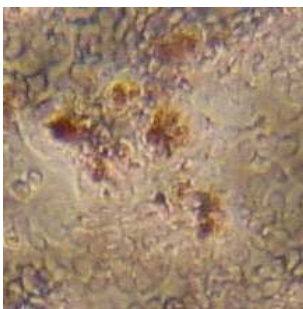
Die Van Kossa Färbung wurde zuerst mit SaOS-2 Zellen etabliert. Die Kontrollfärbung war negativ. Die positiven Signale zeigten sich nach Stimulation durch osteogenen Zusätze. Danach wurde das Experiment mit MSC und EPC wiederholt. Die MSC waren in der Kontrollgruppe negativ, in den osteogen stimulierten Gruppen jedoch positiv. Die Endothelialen Progenitor Zellen zeigten sich weder in der Kontroll- noch in der osteogen stimulierten Gruppe positiv.



a.)



b.)



c.)



d.)

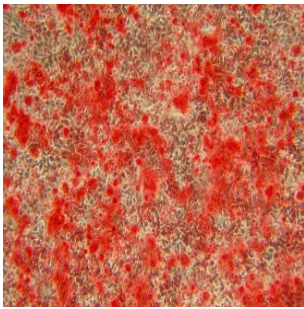
**Abbildung 6: Van Kossa Färbung zur Darstellung der verschiedenen Zellen unter osteogener Stimulierung.** Vergrößerung 200 fach

a.) SaOS-2, b.) MSC kultiviert mit selbsthergestelltem Medium bestehend aus Grundmedium + einzeln bezogene Substanzen Beta Gly, ACS und Dex.

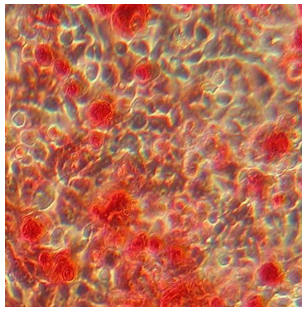
c.) SaOS-2, d.) MSC kultiviert mit in ihren jeweiligen Standardmedien unter Zugabe von osteogenic stem cell kit

### 3.2.2 Alizarinrot-Färbung

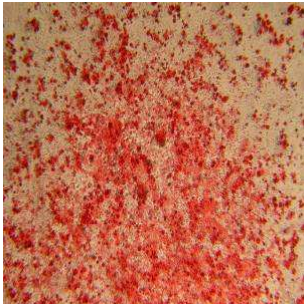
In der Alizarinfärbung zeigten sich alle Kontrollgruppen negativ. Durch osteogene Stimulierung wurden positive Signale lediglich bei MSC und SaOS-2 erzielt. EPC waren sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der osteogen stimulierten Gruppe negativ.



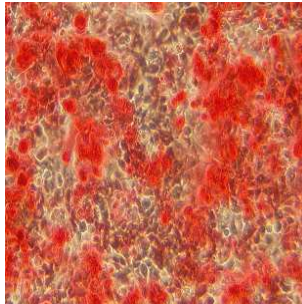
a.)



b.)



c.)



d.)

**Abbildung 7: Alizarin Färbung zum Nachweis von abgeschiedenem, kristallisiertem Calcium.**

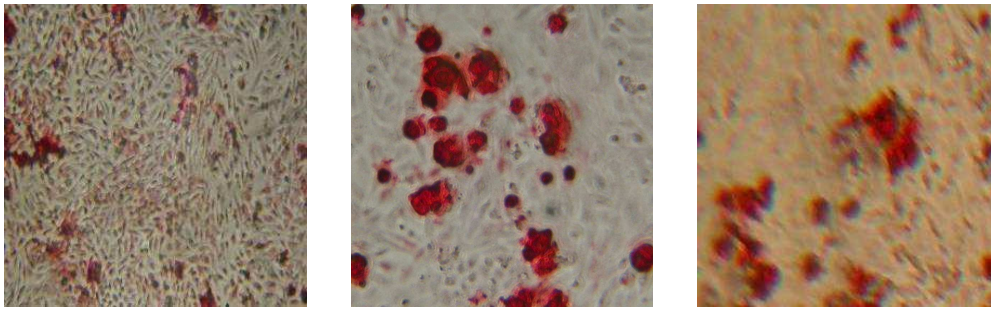
Darstellung der verschiedenen Zellen unter osteogener Stimulierung Vergrößerung 200 fach

a.) SaOS-2, b.) MSC kultiviert mit selbsthergestelltem Medium bestehend aus Beta Gly, ACS und Dex.

c.) SaOS-2, d.) MSC kultiviert mit osteogenic stem cell kit

### 3.2.3 Alkalische Phosphatase Färbung

Es konnte gezeigt werden, dass SaOS-2 Zellen auch ohne Zusatz osteogener Agentien eine alkalische Phosphatase-Aktivität aufwiesen. Die Kontrollgruppen der MSC und EPC waren negativ. Die osteogen stimulierten Gruppen der SaOS-2 und MSC zeigten positive Signale, nicht jedoch der EPC.



a.)

b.)

c.)

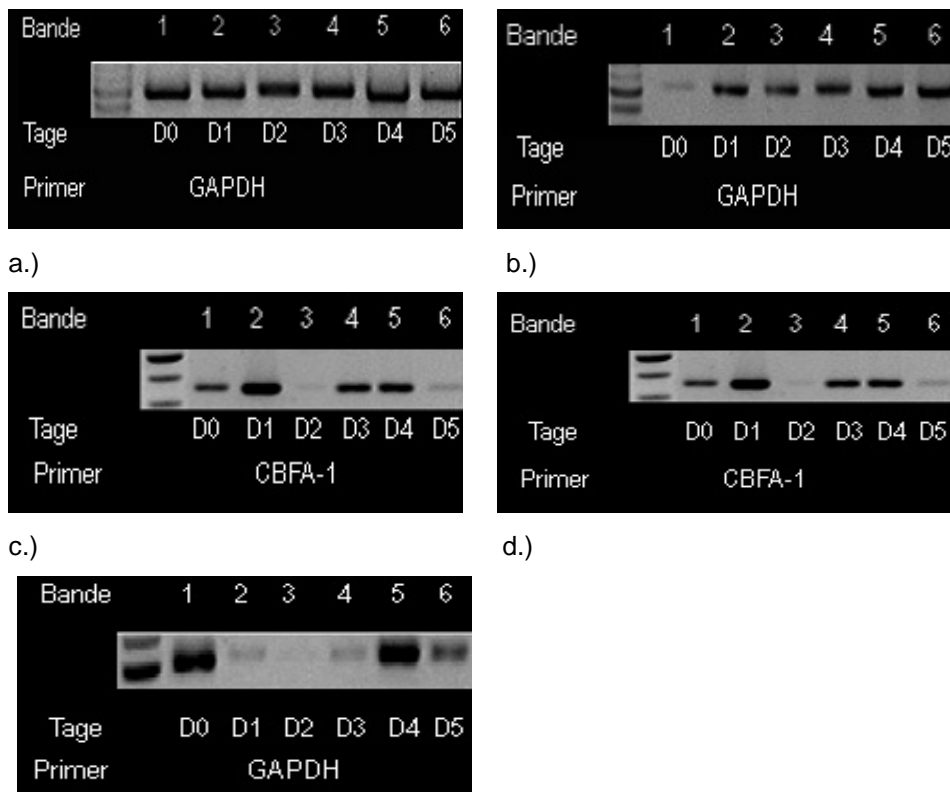
**Abbildung 8.) Alkalische Phosphatase Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung.** Vergrößerung 200 fach

a.) SaOS-2, b.) MSC kultiviert mit selbsthergestelltem Medium bestehend aus DMEM:F12 supplementiert mit Beta Gly, ACS und Dex.

c.) MSC kultiviert mit osteogenic stem cell kit.

### 3.3 Molekularbiologische Untersuchungen an osteogen stimulierten Zellen

Es zeigten sich bei allen Zellen die Expression von GAPDH. Die Cbfa1-Genexpression fand sich sowohl bei SaOS-2 als auch bei MSC nach osteogener Stimulation. Die Cbfa1 Expression konnte bei EPC nicht nachgewiesen werden.



e.)

**Abbildung 9: Darstellung für den molekularbiologischen Nachweis des Überlebens und der osteogenen Umdifferenzierung der Zellen D0-D5. Repäsentative, Ethidumbromid gefärbte Agarosegele mit PCR-Produkten für GAPDH, sind dargestellt. (n = 3)**

a.), b.) GAPDH Genexpression bei SaOS-2 und MSC

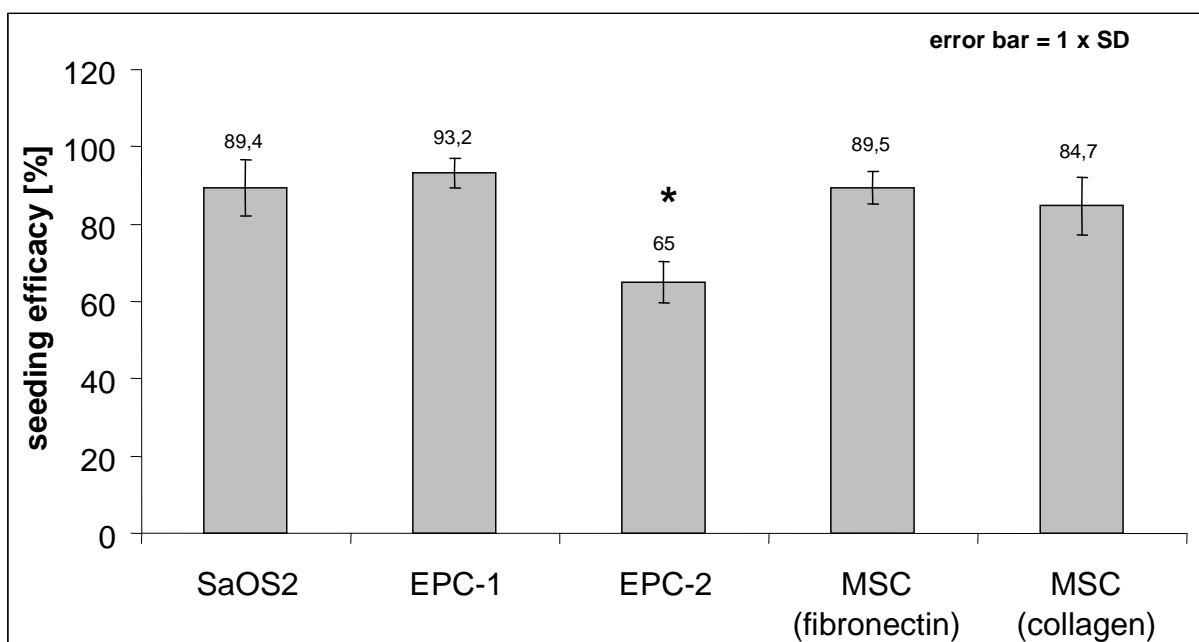
c.) SaOS-2, d.) MSC: Cbfa1 Genexpression nach Kultivierung mit selbsthergestelltem Medium bestehend aus DMEM:F12 + Beta Gly, ACS und Dex.

e.) EPC GAPDH-Genexpression

### 3.4 Aussaat-effizienz

Die TCP-Granula wurden mit jeweils  $2,5 \times 10^5$  Zellen unter identischen Bedingungen beladen. Hier wurde ein Vergleich zwischen den verschiedenen Beschichtungen, Fibronectin und CollagenG, wurde mit MSC durchgeführt. Anschließend wurde die Anzahl nichtadhärenter Zellen ermittelt. Die Adhärenz der Zellen lag zwischen 80-90%.

Hier zeigte sich ein geringerer Unterschied zu Gunsten von Fibronectin. Durchschnittlich blieben 4,8% mehr Zellen auf den Fibronectin beschichteten Granula haften.



**Abbildung 10: Graphische Darstellung der Aussaat-effizienz von SaOS-2, EPC-1, EPC-2 und MSC auf TCP mit Fibronectin und Collagen Beschichtung.**

EPC-1 Adhärenz Zellen

EPC-2 nichtadhärenz EPC

#### 3.4.1 MTT

Die Ergebnisse zeigen, dass die auf die Matrix ausgesäten Zellen metabolisch aktiv bleiben. Die relativ starken Schwankungen zwischen den Versuchstagen könnten auf eine ungleichmäßige Beladung der TCP-Granula mit der jeweiligen Zellsorte zurückzuführen sein.

**Tabelle 3: Metabolische Aktivität von MSC und EPC auf TCP, gemessen mit dem MTT-Test.**

MSC	D2	D6	D10
Anzahl	17894 ± 1781	10113 ± 603	8257 ± 1305

EPC	D2	D6	D10
Anzahl	13367 ± 1189	22033 ± 2705	34549 ± 3078

### 3.5 Überlebensnachweise der Zellen auf Matrixmaterialien mittels molekularbiologischen Untersuchungen

In diesem Teil der Arbeit wurden die Überlebensfähigkeit der verschiedenen Zellen auf verschiedenen Matrices, die osteogene Differenzierung und die Beibehaltung der endothelialen Differenzierung unter dem Einfluss der osteogenen Medien untersucht. Das Überleben der Zellen wurde durch die Expression des „Housekeeping-Gens“ GAPDH gezeigt. Die osteogene Differenzierung wurde anhand der Genexpression für Cbfa1, alkalische Phosphatase, Kollagen I, Osteonektin und Osteocalcin nachgewiesen. Um die endotheliale Differenzierung der Zellen nachzuweisen wurde die Genexpression des vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) und des von Willebrand Faktors (vWF) untersucht.

#### 3.5.1 CD 133<sup>+</sup> EPC (late EPC) mit osteogenem Medium

Die CD133<sup>+</sup> EPC Zellen wurden in Wellplatten mit osteogenem Medium kultiviert und zur RNA-Isolierung an den Tagen 2, 6 und 10 Zellen geerntet. Die quantitative Analyse mittels PCR konnte zeigen, dass die CD133<sup>+</sup> Zellen in dem osteogenen Medium auch noch nach 10 Tagen vital waren.

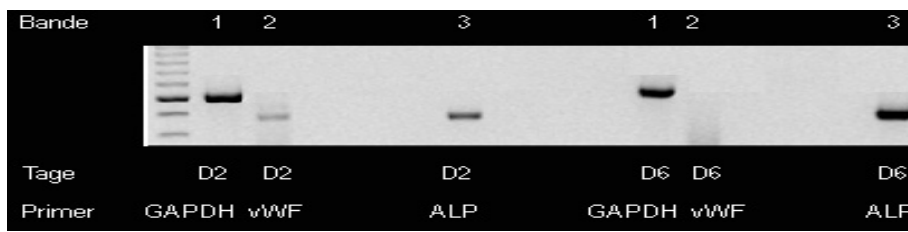
Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass an Tag 2 die endotheliale Differenzierung der CD133<sup>+</sup> Zellen nachweisbar war. Diese konnte jedoch an den Tagen 6 und 10 nicht mehr festgestellt werden. Hingegen zeigte sich eine osteogene Transdifferenzierung der Zellen. An Tag 2 fand sich ein deutlich positives Signal für alkalische Phosphatase (ALP). Dieses wurde an Tag 6 stärker und war an Tag 10 nicht mehr nachweisbar. Die Genexpression für



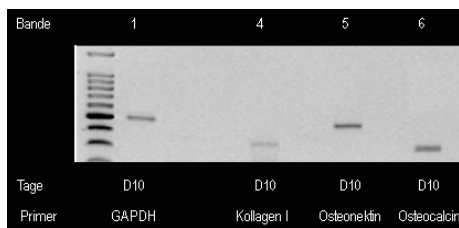
Osteonektin, Kollagen I und Osteocalcin war an Tag 2 und Tag 6 negativ. Jedoch konnte die Expression letztgenannter Gene an Tag 10 eindeutig nachgewiesen werden.

**Tabelle 4: CD133<sup>+</sup>EPC nach Stimulation mit osteogenem Medium. n=3**  
**Signalstärke +++ = 3x Positiv ++ = 2x Positiv + = 1x Positiv (+) = 0,5x Positiv**  
**0= kein Signal**

CD 133 <sup>+</sup> EPC mit osteogenem Medium	GAPDH	ALP	Kollagen I	Osteocalcin	Osteonektin	vWF
Tag 2	+++	++	0	0	0	+
Tag 6	+++	+++	0	0	0	0
Tag 10	+(+)	0	+(+)	+(+)	+	0



a.)



b.)

**Abbildung 11: Darstellung für den molekularbiologischen Nachweis des Überlebens und der osteogenen Umdifferenzierung CD133<sup>+</sup> EPC (Endotheliale Progenitorzellen) D2-D10.** Repäsentative, Ethidumbromid gefärbte Agarosegele mit PCR-Produkten für GAPDH, vWF, ALP, Kollagen I, Osteonektin und Osteocalcin sind dargestellt.

a.) In der Bande 1, 2 und 3 ist GAPDH, vWF und ALP an Tag 4 dargestellt. In der Reihe 6 ist ALP stärker exprimiert.

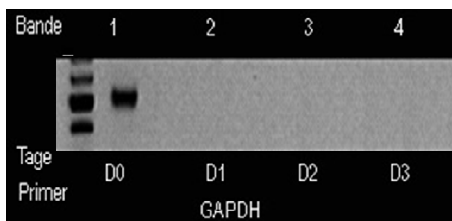
b.) In der Bande 1, 2, 3 und 4 sind GAPDH, Osteonektin, Kollagen I und Osteocalcin dargestellt.

### 3.5.2 CD 133<sup>+</sup> auf Kollagenbeschichteter $\beta$ -TCP-Granula

Um das Verhalten der CD133<sup>+</sup>EPC auf TCP-Granula zu testen, wurden die Zellen ebenfalls auf fibronectin beschichtetem  $\beta$ -TCP ausgesät. Es konnte jedoch an den Folgetagen keine GAPDH-Expressin festgestellt werden, d.h. die Zellen haben entweder nicht überlebt oder haben sich vom TCP abgelöst. Daraufhin wurde der Versuch mit Collagen-G beschichteter Matrix wiederholt. Hier konnte ein Überleben der Zellen nach 24 h, jedoch nicht darüberhinaus, festgestellt werden. Neben der GAPDH konnte keine Expression endothelialer bzw. osteogener Markergene gemessen werden.

**Tabelle 5: CD133<sup>+</sup> EPC auf TCP mit Collagen G Beschichtung. Signalstärke +++ = 3x Positiv, ++ = 2x Positiv, + = 1x Positiv, (+) = 0,5x Positiv, 0= kein Signal**

CD 133 <sup>+</sup> EPC auf TCP + Kollagen G Beschichtung	GAPH	ALP	Kollagen I	Osteocalcin	Osteonektin	vWF
24 h	++(+)	0	0	0	0	0



**Abbildung 12: Darstellung für den molekularbiologischen Nachweis des Überlebens CD133<sup>+</sup> EPC (Endotheliale Progenitorzellen) D2-D10. Represäsentative, Ethidumbromid gefärbte Agarosegele mit PCR-Produkten für GAPDH. (n = 3), CD133<sup>+</sup> EPC auf Collagen G Beschichtung mit positiver Bande für GAPDH nach 24 h**

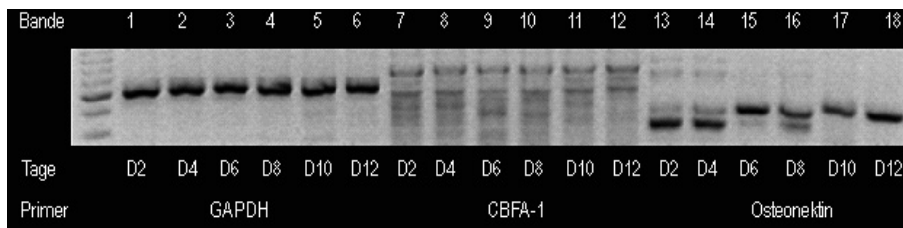
### 3.5.3 CD133<sup>-</sup> EPC mit osteogenem Medium

Das Verhalten der CD133<sup>-</sup> EPC wurde mit dem Verhalten der CD133<sup>+</sup> EPC verglichen. Dabei wurden CD133<sup>-</sup> EPC auf identische Art osteogen stimuliert wie zuvor die CD133<sup>+</sup> EPC. Die Zellen wurden in Wellplatten mit osteogenem Medium kultiviert und zur RNA-Isolierung an Tag 2, 4, 6, 8, 10 und 12 geerntet. GAPDH-Expression konnte bis Tag 12 nachgewiesen werden, d.h. die Zellen waren vital.

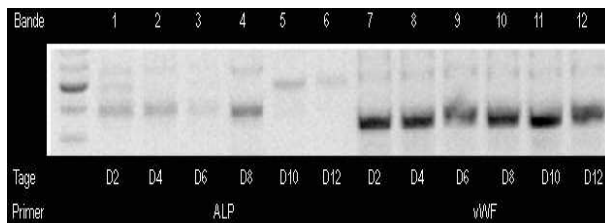
Wie die CD 133<sup>+</sup> Zellen, zeigten auch die CD133<sup>-</sup>EPC eine Genexpression der alkalischen Phosphatase ab Tag 2 bis einschließlich Tag 8. Ab 10 war keine ALP Genexpression mehr nachweisbar. Die RT-PCR für Cbfa1 und Osteonectin waren an allen Tagen positiv. Es fand sich keine Expression des Kollagen I und des Osteocalcin Gens. Die endotheliale Differenzierung der Zellen, dargestellt durch positive Signale für vWF, war an allen Tagen vorhanden.

**Tabelle 6: CD133<sup>-</sup> EPC kultiviert in einer Wellpalte mit osteogenem Medium für 12 Tage. Signalstärke +++ = 3x Positiv, ++ = 2x Positiv, + = 1x Positiv, (+) = 0,5 Positiv, 0= kein Signal. n=3**

CD133 <sup>-</sup> EPC + Osteomedium	GAPDH	ALP	Cbfa1	Kollagen I	Osteocalcin	Osteonektin	vWF
Tag 2	+++	+	+	0	0	++	++
Tag 4	+++	+	+	0	0	++	++
Tag 6	+++	(+)	+	0	0	++	++
Tag 8	+++	+	+	0	0	+	++
Tag 10	+++	0	+	0	0	+	++
Tag 12	+++	0	+	0	0	++	++



a.)



b.)

**Abbildung 13: Darstellung für den molekularbiologischen Nachweis des Überlebens und der osteogenen Umdifferenzierung und des Beibehaltens der endothelialen Differenzierung CD133<sup>-</sup> EPC (Endotheliale Progenitorzellen) D2-D12. Repäsentative Ethidumbromid gefärbte Agarosegele mit PCR-Produkten für GAPDH, Cbfa-1, Osteonektin ALP und vWF sind dargestellt.**

a.) In der Bande 1-6 ist GAPDH; 7-12 Cbfa1 und 13-18 Osteonektin für die Tage 2, 4, 6, 8, 10 und 12 abgebildet.

b.) In der Bande 1-6 ist ALP und 7-12 vWF für die Tage 2, 4, 6, 8, 10 und 12 dargestellt.

### 3.5.4 CD133<sup>-</sup> EPC auf Fibronectin beschichteten TCP Granula,

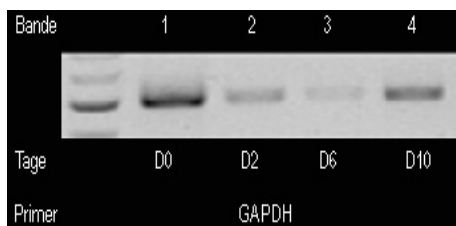
Um das Verhalten der CD133<sup>-</sup> EPC mit dem der CD133<sup>+</sup> EPC vergleichen zu können, wurden sie auf Fibronectin beschichtete Granula transferiert und an den Tagen 0, 2, 6 und 10 wurden zur RNA-Isolierung die Zellen geerntet. Dabei wurde anhand der Genexpression für GAPDH, VEGF und vWF das Überleben und die endotheliale Differenzierung untersucht.

Die Versuche wurden 3-mal reproduziert. Alle Zellen waren bis einschließlich Tag 10 auf der Granula adhären und vital (dargestellt durch die Genexpression von GAPDH). Im Durchschnitt wurden bezüglich der GAPDH-, VEGF- und vWF-Genexpression positive Signale an den Tagen 0, 2, 6 und 10 gefunden.

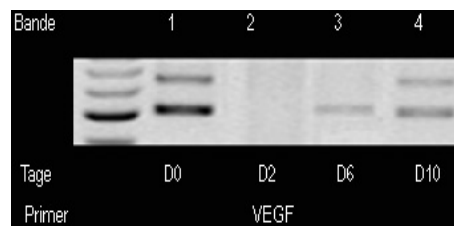
**Tabelle 7: CD133<sup>+</sup> EPC auf Fibronectin beschichteten TCP Granula.**

Signalstärke +++ = 3x Positiv    ++ = 2x Positiv    + = 1x Positiv    (+) = 0,5x Positiv  
0 = kein Signal

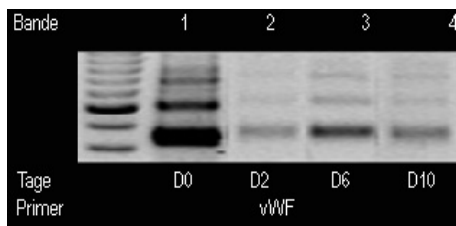
CD133 <sup>+</sup> EPC mit Osteogenem Medium	GAPDH	VEGF	vWF
Tag 0	++	+(+)	++(+)
Tag 2	+	(+)	(+)
Tag 6	+	+	++
Tag 10	+(+)	(+)	+



a.)



b.)



c.)

**Abbildung 14: Darstellung für den molekularbiologischen Nachweis des Überlebens und des Beibehaltens der endothelialen Differenzierung CD133<sup>+</sup> EPC (Endotheliale Progenitorzellen) D0-D10. Repäsentative Ethidumbromid gefärbte Agarosegele mit PCR-Produkten für GAPDH, VEGF und vWF sind dargestellt.**

a.) In Bande 1-4 ist GAPDH (Versuch 1); 5-8 GAPDH (Versuch 2) und 9-12 GAPDH (Versuch 3) abgebildet

b.) In der Bande 1-4 ist VEGF (Versuch 1); Bande 5-8 VEGF (Versuch 2) und Bande 9-12 VEGF (Versuch 3) dargestellt.

c.) In der Bande 1-4 ist vWF (Versuch 1); Bande 5-8 vWF (Versuch 2) und Bande 9-12 vWF (Versuch 3) dargestellt.

### 3.5.5 Mesenchymale Stammzellen auf Fibronectin beschichteten TCP Granula mit Mesencult

Um auch das Verhalten der mesenchymalen Stammzellen auf TCP Granula zu untersuchen, wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen auf Fibronectin beschichteten TCP Granula mit Mesencult inkubiert. An den Tagen 2, 6 und 10 wurden zur RNA-Isolierung die Zellen geerntet, um auf molekularbiologischem Untersuchungsweg eine

Aussage über die Vitalität und den Differenzierungszustand der Zellen machen zu können. Die Zellen waren bis einschließlich Tag 10 adhärent und vital und es konnte die Expression osteogener Markergene nachgewiesen werden.

An den Tagen 2, 6 und 10 waren positive Signale für GAPDH, Osteonectin und Cbfa1 zu registrieren. An Tag 2 konnte keine Genexpression für ALP, Kollagen I und Osteocalcin beobachtet werden. An den Tagen 6 und 10 konnte die Genexpression für ALP, Osteocalcin und Kollagen I nachgewiesen werden.

**Tabelle 8: MSC auf inkubiert mit Mesencult auf Fibronectin beschichteten TCP Granula**  
Signalstärke +++ = 3x Positiv ++ = 2x Positiv + = 1x Positiv (+) = 0,5 Positiv

MSC + Mesencult auf TCP	GAPDH	ALP	Kollagen I	Osteocalcin	Osteonektin	Cbfa1
Tag 2	+++	0	0	0	+++	+(+)
Tag 6	+++	++	+	++(+)	+++	+(+)
Tag 10	+++	++	(+)	++	+++	+(+)

### 3.5.6 MSC auf Fibronectin beschichteten $\beta$ -TCP

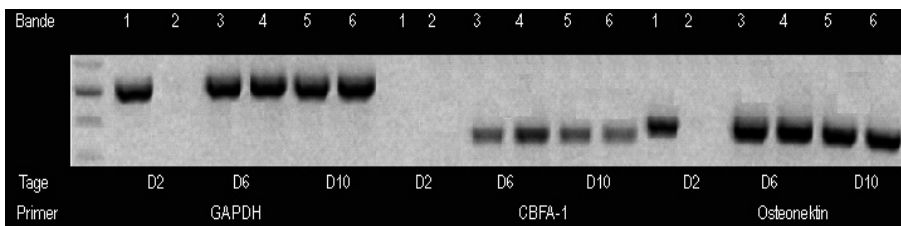
Da die fibronectinbeschichtete  $\beta$ -TCP Granula alleine, ohne osteogenes Medium, eine osteoinduktive Wirkung auf MSC hatten, wurde nun die synergistische Wirkung der TCP-Granula mit osteogenem Medium untersucht.

Die Zellen wurden für 10 Tage auf TCP-Granula in Anwesenheit von osteogenen Zusätzen inkubiert. Es zeigte sich, dass die osteogenen Substanzen die GAPDH-Genexpression nicht beeinträchtigten, d.h. wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatten. Die Zugabe der osteogenen Substanzen bewirkte keine weitere Zunahme der ALP-, Kollagen I-, Osteocalcin-, Osteonektin- und Cbfa1 Genexpression. Es zeigte sich, dass das osteogene Potential des osteogenen Mediums mit TCP dem der TCP-Granula mit Mesencult ohne Zutaten entspricht.

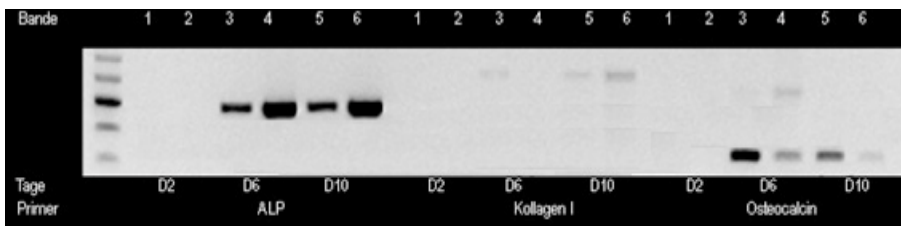
**Tabelle 9: MSC kultiviert mit nach Protokoll selbst hergestelltes Medium auf Fibronectin beschichteten TCP Granula, n=3**

Signalstärke +++ = 3x Positiv ++ = 2x Positiv + = 1x Positiv (+) = 0,5 Positiv

MSC auf TCP-Granula mit Osteomedium	GAPDH	ALP	Kollagen I	Osteocalcin	Osteonektin	Cbfa1
Tag 2	+++	0	0	0	+++	++
Tag 6	+++	+++	(+)	+	+++	+
Tag 10	+++	+++	+	(+)	+++	++(+)



a.)



b.)

**Abbildung 15: Darstellung für den molekularbiologischen Nachweis des Überlebens und der osteogenen Umdifferenzierung der MSC (Mesenchymale Stammzellen) D2-D10. Repräsentative Ethidumbromid gefärbte Agarosegele mit PCR-Produkten für GAPDH, Cbfa-1, Osteonektin, ALP Kollagen I und Osteocalcin sind dargestellt.**

a.) MSC auf TCP mit/ohne osteogenem/s Medium.

- Bande 1: (GAPDH,Cbfa1, Osteonectin) ohne osteogene Zusätze Tag 2
- Bande 2: (GAPDH, Cbfa1, Osteonectin) mit osteogenen Zusätzen Tag 2
- Bande 3: (GAPDH; Cbfa1, Osteonectin) ohne osteogene Zusätze Tag 6
- Bande 4: (GAPDH, Cbfa1, Osteonectin) mit osteogenen Zusätzen Tag 6
- Bande 5: (GAPDH, Cbfa1, Osteonectin) ohne osteogene Zusätze Tag 10
- Bande 6: (GAPDH, Cbfa1, Osteonectin) mit osteogenen Zusätzen Tag 10

b.) Repräsentative Darstellung für den molekularbiologischen Nachweis des Überlebens und der osteogenen Umdifferenzierung der MSC(n = 3)

- Bande 1: (ALP, CollagenI und Osteocalcin) ohne osteogene Zusätze Tag2
- Bande 2: (ALP, CollagenI und Osteocalcin) mit osteogenen Zusätzen Tag2
- Bande 3: (ALP, CollagenI und Osteocalcin) ohne osteogene Zusätze Tag6
- Bande 4: (ALP, CollagenI und Osteocalcin) mit osteogenen Zusätzen Tag6
- Bande 5: (ALP, CollagenI und Osteocalcin) ohne osteogene Zusätze Tag10
- Bande 6: (ALP, CollagenI und Osteocalcin) mit osteogenen Zusätzen Tag10

### 3.5.7 MSC + CD133<sup>+</sup> EPC auf TCP

Das Verhalten der unterschiedlichen Zellen auf TCP Granula (MSC und EPC) in separaten Versuchsansätzen zeigte, dass die Zellen vital bleiben. Weiterhin kam es zur Umdifferenzierung oder im Falle von EPC zur Beibehaltung der endotheliale Differenzierung.

MSC und EPC wurden gemeinsam in einer Wellplatte auf  $\beta$ -TCP Granula kultiviert, mittels RT-PCR konnte zwar keine Expression endothelialer, jedoch von osteogenen Markergene nachgewiesen werden. Auch nach Verdopplung der EPC Zahl, von  $1,25 \times 10^5$  auf  $2,5 \times 10^5$  Zellen, konnte keine Genexpression endothelialer Markergene nachgewiesen werden. In beiden Versuchsansätzen wurde jedoch eine Genexpression osteogener Markergene gefunden.

Um weitere Methoden zu testen, wurden die Zellen zunächst in getrennten Wellplatten auf TCP Granula transferiert und anschließend gemeinsam in einer neuen Wellplatte kultiviert. Zusätzlich wurde hier der Mediumwechsel nicht jeden 2. Tag sondern alle 5 Tage durchgeführt, so dass für die 10 tägige Inkubation das Medium nur einmal gewechselt werden musste. Nach diesen Umstellungen konnte die Expression endothelialer Markergene bis einschließlich Tag 10 gezeigt werden.

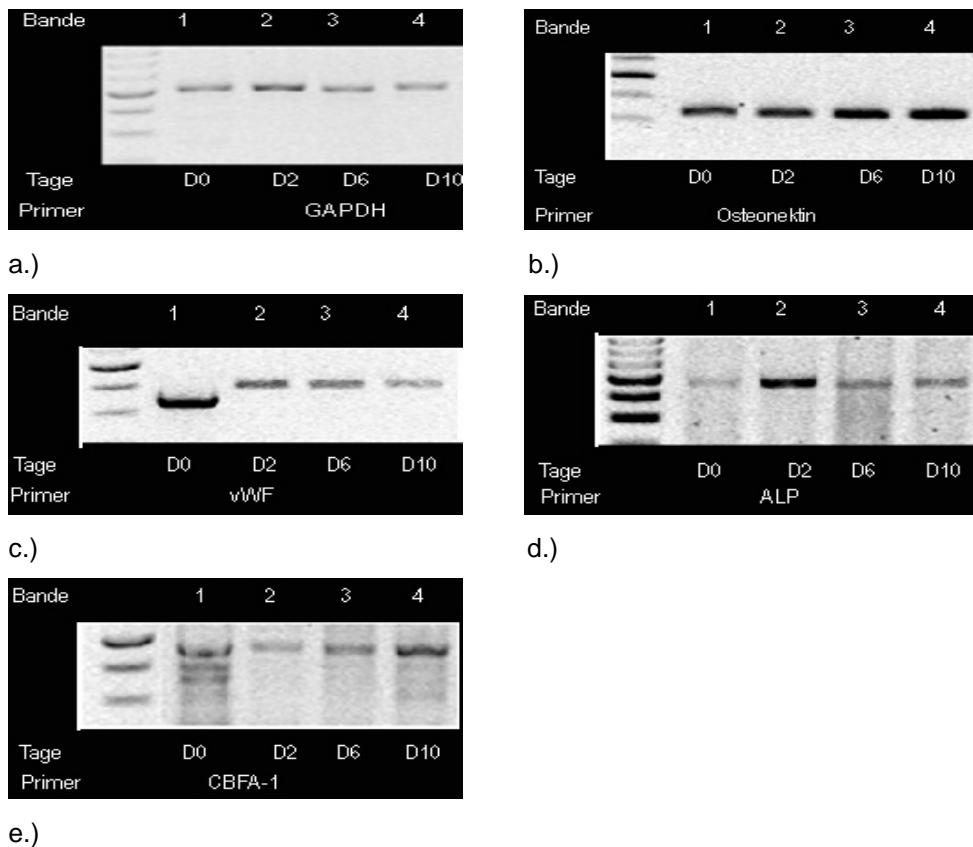
Transkripte von GAPDH, Cbfa1, Osteonectin und vWF waren über den gesamten Beobachtungszeitraum von 10 Tagen vorhanden. Die Genexpression für Osteocalcin und Collagen I konnte nicht nachgewiesen werden.

**Tabelle 10: MSC + CD133<sup>+</sup> late EPC kultiviert mit nach Protokoll selbst hergestelltem Medium auf Fibronectin beschichteten TCP Granula, n=3**

Signalstärke +++ = 3x Positiv ++ = 2x Positiv + = 1x Positiv (+) = 0,5 Positiv

MSC + 133 <sup>+</sup> EPC	GAPDH	Cbfa1	Osteonektin	Osteocalcin	Kollagen I	vWF
Tag 0	+	+	+	0	0	+
Tag 2	++	(+)	+++	0	0	(+)
Tag 4	+(+)	+	+	0	0	+(+)
Tag 6	+	(+)	+++	0	0	(+)
Tag 8	+	(+)	++	0	0	(+)
Tag 10	+	(+)	+++	0	0	(+)





**Abbildung 16: Darstellung für den molekularbiologischen Nachweis des Überlebens und der osteogenen Umdifferenzierung und des Beibehaltens der endotheliale Differenzierung MSC (Mesenchymale Stammzellen) und CD133<sup>+</sup> EPC (Endotheliale Progenitorzellen) D0-D10. Represäsentative Ethidumbromid gefärbte Agarosegele mit PCR-Produkten für GAPDH, Cbfa-1, Osteonektin, ALP und vWF sind dargestellt. Hier wurden MSC und CD133<sup>+</sup> EPC gemeinsam mit osteogenem Medium auf TCP-Granula kultiviert.**

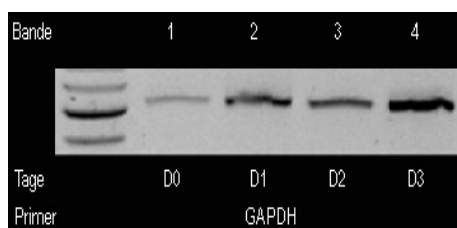
- a.) In Bande 1-4 ist GAPDH für die Tage 0-10 abgebildet. ;
- b.) In der Bande 1-4 ist Osteonektin für die Tage 0-10 abgebildet
- c.) In der Bande 1-4 ist vWF für die Tage 0-10 abgebildet.
- d.) In der Bande 1-4 ist ALP für die Tage 0-10 abgebildet.
- e.) In der Bande 1-4 ist Cbfa-1 für die Tage 0-10 abgebildet.

### 3.5.8 EPC auf Collagenvlies mit Fibronectin-Beschichtung

Das von der Firma Ostartis zu Verfügung gestellte Collagenvlies wurde als ein alternatives Trägermaterial zu der  $\beta$ -TCP Granula untersucht. Das Collagenvlies zeigte ein schwieriges Verhalten während des Beschichtens, des Umtransferierens und des Mediumwechsels. Die mangelnde Festigkeit machte das Arbeiten beinahe unmöglich. Das Produkt wurde anschließend von der Firma überarbeitet. Bei der Beschichtung und Beimpfung des neuen Collagenvlieses wurde entsprechend der Beschichtung und Beimpfung der TCP Granula durchgeführt. Da das Collagenvlies durch häufigere Mediumwechsel brüchig wurde, wurde der Mediumwechsel auf jeden 5. Tag reduziert. Als

unerwünschter Nebeneffekt des reduzierten Mediumwechsels, zeigte sich eine zunehmende pH-Reduktion.

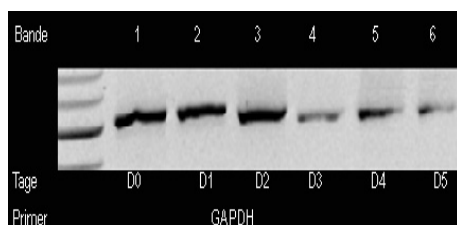
Das Collagenvlies wurde ab Tag 7 brüchig. Die Strukturinstabilität und die schnelle pH-Veränderungen machten eine Kultivierung der Zellen über einen längeren Zeitraum unmöglich. Deshalb wurden die Zellen für 3 Tage kultiviert und anschließend auf das Überleben getestet. Es zeigte sich, dass die Zellen bis einschließlich Tag 3 vital waren. Eine osteogene Differenzierung fand nicht statt.



**Abbildung 17:** Darstellung für den molekularbiologischen Nachweis des Überlebens der CD133<sup>+</sup> EPC (Endotheliale Progenitorzellen) D0-D3. Repäsentative Ethidumbromid gefärbte Agarosegele mit PCR-Produkt für GAPDH ist dargestellt.

### 3.5.9 MSC auf Collagenvlies mit Fibronectin-Beschichtung

Das Verhalten der Mesenchymalen Stammzellen auf Collagenvlies war äquivalent zu EPC. Die Überlebensfähigkeit der Zellen war bis einschließlich Tag 5 nachweisbar.



**Abbildung 18:** Darstellung für den molekularbiologischen Nachweis des Überlebens der MSC (Mesenchymale Stammzelle) D0-D5. Repäsentative Ethidumbromid gefärbte Agarosegele mit PCR-Produkt für GAPDH, ist dargestellt.

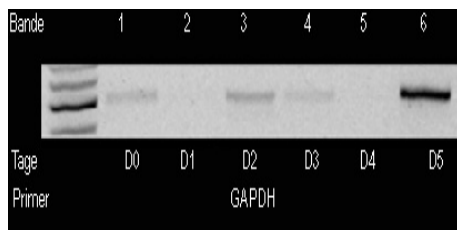
### 3.5.10 Gemeinsame Kultivierung von MSC und EPC auf Collagenvlies

Da die Überlebensfähigkeit der Zellen in separaten Ansätzen (MSC, EPC) gezeigt werden konnte, wurden beide Zellen gemeinsam kultiviert. Es zeigte sich, dass die Zellen fähig waren gemeinsam zu überleben. Die Osteonektin-Transkription konnte ab Tag 0 nachgewiesen werden, jedoch nicht für Osteocalcin bzw. Collagen I. Die endotheliale Differenzierung, gemessen anhand der vWF-Genexpression, konnte bis Tag 4 nachgewiesen werden. Der Vergleich zwischen TCP und Collagenvlies zeigte, dass das Collagenvlies keinen osteoinduktiven Effekt auf MSC hat. Die EPC behalten ihre endotheliale Differenzierung bei.

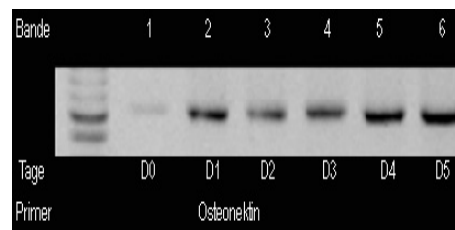
**Tabelle 11: MSC kultiviert mit nach Protokoll selbst hergestelltes Medium auf Fibronectin beschichteten TCP Granula**

Signalstärke +++ = 3x Positiv    ++ = 2x Positiv    + = 1x Positiv    (+) = 0,5 x Positiv

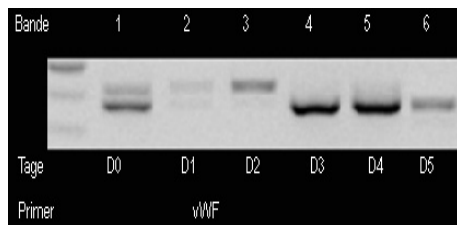
EPC + MSC	GAPDH	Osteonektin	Osteocalcin	Kollagen I	VEGF	vWF
Tag 0	+	+	0	0	0	++
Tag 1	(+)	++	0	0	0	+
Tag 2	+	+++	0	0	0	+
Tag 3	+	+(+)	0	0	0	+++
Tag 4	0	+	0	0	0	+++
Tag 5	+++	+++	0	0	0	0



a.)



b.)



c.)

**Abbildung 19: Darstellung für den molekularbiologischen Nachweis des Überlebens und der osteogenen Umdifferenzierung und des Beibehaltens der endotheliale Differenzierung MSC (Mesenchymale Stammzellen) und CD133<sup>+</sup> EPC (Endotheliale Progenitorzellen) D0-D5. Repäsentative Ethidumbromid gefärbte Agarosegele mit PCR-Produkten für GAPDH, Osteonectin und vWF sind dargestellt.**

**Hier wurden MSC und late EPC gemeinsam Collagenvlies kultiviert.**

- a.) In den Banden 1- 6 ist GAPDH für die Tage 0-5 abgebildet.
- b.) In den Banden 1- 6 ist Osteonectin für die Tage 0-5 abgebildet.
- c.) In den Banden 1- 6 ist vWF für die Tage 0-5 abgebildet.

## IV. DISKUSSION

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig, dass sich die zwei verschiedenen Zellsorten, stromale Knochenmarkszellen (MSC) und Endotheliale Progenitorzellen (EPC), gemeinsam über einen signifikanten Zeitraum auf Knochenersatzstoffen kultivieren lassen und dabei ihre grundlegenden Charakteristika beibehalten.

In dieser Arbeit wurden stromale Knochenmarkszellen aus Knochenmark-Aspirationen isoliert. Die Plastizität der MSC und ihre relativ leichte Isolierung machen sie im Bereich *Tissue Engineering* attraktiv, zum anderen ist die Aspirationsmethode weitaus atraumatischer für den Patienten als die Biopsieentnahme. Osteoblasten wurden aus folgenden Gründen für die Versuchsdurchführungen nicht eingesetzt. Sie sind ausdifferenzierte Zellen, d.h. es kann kein Einfluss mehr auf ihre Differenzierbarkeit genommen werden. Die osteogenen Zellen befinden sich innerhalb der Differenzierungskaskade von MSC bis hin zu Osteoblasten bzw. Osteozyten (Aubin 1998). Diese osteogenen Zellen können aus dem Knochenmark sowohl über Dichtegradienten als auch aus spongiösem Knochen mittels mechanischer Verfahren isoliert werden (Tuli et al 2003).

Hierbei erhält man ein heterogenes Gemisch, das aus verschiedenen Zelltypen, wie zum Beispiel Fibroblasten, stromale Knochenmarkszellen, Osteoblasten oder Endothelzellen besteht (Jonsson et al. 1999). Die Zellen unterscheiden sich jedoch sowohl in ihrer Morphologie (Colter et al. 2001) als auch in ihrer Immunhistochemie von einander (Vogel et al. 2003).

Für die Etablierung der Methoden werden viele Zellen und kostspielige Zellkulturmaterialien benötigt. Daher war ein Ziel, eine Zelllinie einzuführen, die leicht zu Handhaben ist und keine übermäßigen Kosten verursacht.

Osteoblasten-ähnliche Modelkulturen von verschiedenen Spezies wurden, wie zum Beispiel für Maus (Scott et al. 1980, Sudo et al. 1983), Ratte (Martin et al. 1976) und Mensch (Gallagher et al. 1983, Robey 1985, Rodan et al. 1987) etabliert.

Für die Etablierungsphase wurde die Zelllinie SaOS-2 verwendet. Die humane Osteoblasten Zelllinie SaOS-2 wurde 1975 von Fogh eingeführt (Fogh 1975). Sie zeichnet sich durch eine hohe Proliferation aus.

Als Knochenzelltypischer Marker kann ALP-Aktivität nachgewiesen werden. Dieses konnten wir im Versuch 2.3.3 bestätigen.

Unter bestimmten Kultivierungsbedingungen können SaOS-2 Zellen eine mineralisierte Matrix erzeugen. Die hierfür beschriebenen Mediumzusätze Ascorbinsäure (ASC), Dexamethason (Dex) und  $\beta$ -Glycerophosphat ( $\beta$ -Gly) führten in unseren Experimenten ebenfalls zu einer Abscheidung von Kalkformationen, welche bei der anschließenden Van Kossa Färbung nachgewiesen wurde (Ergebnisse 3.2.1).

Um die MSC osteogen umzudifferenzieren, wird von der Firma Cell-System das *Osteogenic Stem Cell Kit* angeboten. Die osteogene Umdifferenzierung der MSC ist aber auch mittels ASC,  $\beta$ -Gly und Dex zu erreichen (Jaiswal et al. 1997).

Nach der Inkubation der Zellen mittels *Osteogenic Stem Cell Kit* und dem nach dem Protokoll selbsthergestellten Medium, wurden die Zellen, anhand knochenspezifischem Markerprotein Cbfa1 und den für Knochengewebe spezifischen Färbungen Van Kossa, Alizarin und Alkalische Phosphatase untersucht.

Die MSC haben keine alkalische Phosphatase- Aktivität und sind weder in der Van Kossa Färbung, noch in der Alkalische Phosphatase Färbung oder in der Alizarin-Rot Färbung positiv. Nach der Behandlung mit Ascorbinsäure,  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason wurden jedoch positive Signale detektiert. Die osteogene Differenzierung konnte auch auf molekularbiologischem Wege gezeigt werden, nämlich durch das Vorhandensein des Cbfa1- Gens. Cbfa1 wird in der Literatur als einer der spezifischen Marker für osteoblastäre Differenzierung beschrieben (Ducy et al 2000).

Da das effiziente Einsetzen der Ressourcen und dadurch ein wirtschaftliches Arbeiten im Labor von großer Wichtigkeit sind, wurde das kostengünstigere Produkt (nach Protokoll selbst hergestelltes Medium) für die weiteren Versuche verwendet. Der Preis für *Osteogenic stem cell kit* beträgt 800€, Mesencult mit Supplements ca. 260€ und die Zusätze für die osteogene Differenzierung (Acs,

Dex und  $\beta$ -Gly) ca. 100€. Somit ist das selbst hergestellte Medium um ca. 540€ pro 500 ml günstiger.

Mesenchymale Stammzellen haben die Fähigkeit, sich selbst zu replizieren und sich in verschiedene Gewebe zu differenzieren (Pittenger et al. 1999). Dadurch ist ihre Anwendung zur Therapie von Knochendefekten im Sinne von *Tissue Engineering* interessant (Bianco 2001).

Wie in der Literatur bereits beschrieben, ist der Organismus nicht in der Lage, einige Knochendefekte, sog. „*Critical size defects (CSD)*“, selbst zu heilen.

Solche CSD werden in der Regel durch eine autologe Spongiosaplastik gedeckt. Von Nachteil ist dabei der zur Entnahme notwendige operative Zweiteingriff mit seinen möglichen Komplikationen wie Hämatom, Infektion und Nervenirritation. Zusätzlich sind die Patienten durch den langanhaltenden Schmerz an der Entnahmestelle betroffen. Nach Younger sogar bis zur 2 Jahre (Younger et al. 1998).

Es wird von manchen Autoren über Hernien berichtet, welche durch den Defekt entstanden sind (Lotem M 1971).

In unserer Studie stellte sich die Frage, welches biokompatible Trägermaterial für uns von Interesse ist. Hydroxylapatit wird häufig in den klinischen Studien benutzt und zeigte auch, durch das Beladen mit MSC, sein osteogenes Potential (Yoshikawa T et al. 1996).

Die Porengröße und seine Struktur machen HA sehr attraktiv. Aber eine sehr lange Resorbtionsspanne und potentielle Problematik wie zum Beispiel Entzündungen (Salyer et al. 1989) machen die klinische Verwendung von HA problematisch. Die Porosität, Porengröße und das Porensystem des  $\beta$ -Tricalciumphosphats ( $\beta$ -TCP) sind mit denen von Hydroxylapatit vergleichbar. Der entscheidende Vorteil der TCP-Keramiken ist die Resorbierbarkeit. Die Resorption erfolgt sowohl durch chemische Lösung, als auch durch Makrophagen, welche den TCP-Zement wie bei physiologischem Remodelling des Knochens resorbieren (Klein et al: 1983, Ochsner PE 1983).

Als weitere Überlegung stellte sich die Frage der Beschichtung. Hier zeigte sich schon bei der Versuchsetablierung, dass es signifikante Unterschiede zwischen beschichtetem und nicht-beschichtetem Trägermaterial gab.

Somit wurde die Arbeit mit beschichtetem Trägermaterial, bestehend aus  $\beta$ -Tricalciumphosphat und Fibronectin, weitergeführt. Die

Beschichtung spielt eine entscheidende Rolle bei der Aussaat-effizienz der Zellen. Die geringe Elastizität, langsame Resorption und hohe Zerbrechlichkeit stellen große Probleme in der klinischen Anwendung der Keramiken dar. Eine der Lösungsmöglichkeiten wäre die Anwendung von Polymeren. Nachteile dieser Ersatzstoffe sind einerseits die Unklarheit im Bezug auf den Verbleib der Abbauprodukte und die Reaktionen des Körpers auf die Residuen (Schnurer SM 2003). Komposita bestehen aus einer Kombination von Kalziumphosphat und Polymeren. Biologisch abbaubare Polymere, solche wie Kollagen oder Fibrin, sind aufgrund ihrer guten Biokompatibilität und osteokonduktiven Eigenschaften besonders gut geeignet (Bensaid W 2003, Lee CH 2001). Wie auch im Punkt 3.5.8 bestätigt und in der Literatur beschrieben (Schieker M 2006) sind die Polymere auf Grund ihrer geringeren mechanischen Stabilität von Nachteil. Durch einige Modifikationen im Kultivierungsprotokoll und durch Modifikation des Produkts durch den Hersteller (Osartis) konnte das Überleben der Zellen sowohl alleine, als auch gemeinsam bis Tag 5 gesichert werden. Wir konnten zeigen, dass eine gemeinsame Inkubation von MSC und CD 133<sup>+</sup> EPC auf Kollagenvlies möglich ist. Die EPC behielten ihre endotheliale Differenzierung bei. Es konnten jedoch keine Signale für Osteocalcin, Kollagen I und VEGF detektiert werden. Es fanden sich dennoch deutliche Signale für Osteonektin, was auf eine osteogene Umdifferenzierung der MSC hindeuten kann.

Nach Lösung der genannten Problematik könnten Polymere durchaus eine gute Alternative zum  $\beta$ -TCP darstellen.

Bei den Versuchsdurchführungen zeigte sich, dass  $\beta$ -TCP auch eine osteoinduktive Fähigkeit besitzt. Mesenchymale Stammzellen exprimierten alkalische Phosphatase, Kollagen I, Cbfa1, Osteonektin und Osteocalcin auch ohne Zusatz osteoinduktiver Substanzen. Eine synergistische Wirkung im Sinne von stärkerer Genexpression wurde bei der Kombination von  $\beta$ -TCP und osteogenem Medium nicht beobachtet.

Aus den klinischen Erfahrungen ist es bekannt, dass eine frühe Vaskularisierung die Knochenregeneration positiv beeinflusst. Diese Revaskularisierung ist das primäre Ziel, da sie die Frakturheilung erst initiiert und dann unterstützt. Von der frühen Wiederherstellung der kortikalen



Durchblutung hängt der osteogene Stimulus ab, der die Frakturheilung ermöglicht (Wallace AL et al. 1991).

Es wird zwischen verschiedenen Endothelialen Progenitorzellen unterschieden, den CD 133<sup>+</sup> (*late*) EPC und den CD 133<sup>-</sup> (*early*) EPC. Verschiedene Modelle zeigten, dass CD 133<sup>+</sup> EPC einen positiven Effekt auf ischämische Gewebe haben (Murohara T et al. 2000).

Unsere Versuche zeigten, dass unter osteogener Stimulation die CD133<sup>+</sup> Zellen ihre endotheliale Differenzierung bis zum Tag 6 beibehielten. Interessanterweise kam es jedoch auch zu einer osteogenen Transdifferenzierung der Zellen.

Die hohe Plastizität der Zellen muss für die klinische Anwendung kritisch betrachtet werden. Denn für eine frühe und adäquate Vaskularisierung sind Zellen von Nöten, die ihre Eigenschaften nicht verändern. Ein weiterer Nachteil der CD 133<sup>+</sup> EPC war die schlechte Adhärenz dieser Zellsorte auf  $\beta$ -TCP unabhängig von der verwendeten Beschichtung.

Somit scheiterte der Versuch einer gemeinsamen Kultivierung der CD133<sup>+</sup> EPC mit Mesenchymalen Stammzellen auf  $\beta$ -TCP. Die weiteren Versuche wurden mittels CD 133<sup>-</sup> (*early*) EPC, isoliert aus PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell), durchgeführt.

Das unterschiedliche Verhalten von CD133<sup>+</sup> „*late* EPC“ und CD133<sup>-</sup> „*early* EPC“, kann möglicherweise anhand ihrer unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren erklärt werden.

Asahara publizierte zum ersten Mal eine detaillierte Beschreibung von Endothelialen Progenitorzellen (Asahara T et al.1997).

Stamm- und Progenitorzellen exprimieren Adhäsionsrezeptoren, welche die spezifische Zell-Zell und Zell-EZM (Extrazellulären Matrix)-Verbindung vermitteln (Simmons P 1997, Yoder M 1995).

Bisher sind mehr als 20 verschiedene Adhäsionsrezeptoren auf Stamm- und Progenitorzellen identifiziert worden, die anhand ihrer Domänen-Struktur und Funktion den Integrinen, Cadherinen, Selektinen, Sialomucinen und Immunoglobulinen zuzuordnen sind (Simmons P 1992, Verfaillie C 1994).

Integrine spielen dabei eine besondere Rolle. Sie gehören zu den intramembranären Glykoproteinen mit bis zu 15  $\alpha\beta$ -Heterodimeren. Diese vermitteln die Zell-Zell oder Zell-EZM -Kontakte. Die Beta-Integrin- Subfamilie

beinhaltet Rezeptoren für EZM-Komponenten Fibronectin, Laminin und Kollagen (Hemler ME 1990). Dadurch wird die Adhäsion der Zellen an der EZM (Fibronectin Beschichtung) gewährleistet. Eine Vielzahl an Untersuchungen zeigte, dass CD133<sup>+</sup> EPC drei charakteristische Oberflächenmarker besitzen, nämlich CD133<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> und vascular endotheliale growth factor rezeptor-2 VEGFR-2, auch bezeichnet als kinase insert domain receptor (KDR) oder Flk-1 (Peichev M et al. 2000). Dahingegen exprimieren hämatopoetische Stammzellen / CD 133<sup>+</sup> EPC kein vasculär endotheliales (VE-) cadherin. Zell-Matrix- und Zell-Zell -Interaktionen sind fundamentale Prozesse, welche die zellulären Funktionen regulieren. Die Adhäsion von Zellen mit EZM wird hauptsächlich durch Integrine, die Adhärenz zwischen Endothelzellen hauptsächlich durch VE-Cadherin vermittelt (Li R 2003). Bei den Cadherinen handelt es sich funktionell um verwandte Glykoproteine, die kalziumabhängig Zell-Zelladhäsion in allen Geweben des Organismus vermitteln (Gumbiner et al. 1996). Es handelt sich um transmembranöse Proteine, welche über ihre homophile Domäne die intrazelluläre Adhäsion gewährleisten (Wang Y 2006). Die Ursache des Nicht-Haftenbleibens der CD133<sup>+</sup> EPC könnte durch das Fehlen dieser Oberflächenmoleküle, nämlich VE-Cadherin, erklärt werden (Rehman J 2004).

Wir wissen, dass die Bildung und Aufrechterhaltung von endothelialen Zell-Zell-Kontakten ein komplexes Zusammenspiel zwischen Plasmamembranproteinen, zytoplasmatischen Proteinen und Komponenten des Zytoskeletts benötigt.

Einige dieser Moleküle sind in speziellen Substrukturen organisiert. Diese Substrukturen werden in Tight-Junctions, Gap-Junctions, Adherens-Junctions und Desmosomen unterteilt.

Bei dem von-Willebrand-Faktor geht man davon aus, dass die Adhäsion von Thrombozyten an das Subendothel durch die Interaktion zwischen thrombozytärem Glykoprotein (GP) Ib und Kollagen-gebundenem von Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt wird (Savage et al. 1996). Somit könnte auch vWF eine Rolle bei der Adhäsion der EPC spielen. Durch das Fehlen der Oberflächenmolekül VE-Cadherin und Mangel an vWF haben die CD133<sup>+</sup> EPC möglicherweise keine Fähigkeit, auf dreidimensionalen Gerüsten ( $\beta$ -TCP-Granula) haften zu bleiben.

Hur J. zeigte genetische und funktionelle Unterschiede zwischen CD133<sup>+</sup> EPC und 133<sup>-</sup> EPC. Er zeigte jedoch auch, dass es keine signifikanten Unterschiede in ihrer *in vivo* Wirkung bei der Neovaskularisierung im ischämischen Tiermodell gab. Sie unterschieden sich lediglich in ihrer Wirkungsweise. CD133<sup>+</sup> EPC erreichte dies durch Sekretion von angiogenetischen Zytokinen, CD133<sup>-</sup> EPC durch Bereitstellung von suffizienten endothelialen Zellen (Hur et al 2003).

Diese Daten bestärken die Verwendung von CD133<sup>-</sup> EPC für das Vaskularisierungsvorhaben. Wir konnten auch zeigen, dass die CD133<sup>-</sup> EPC ihre endotheliale Differenzierung unter Einfluss von osteogenem Medium nicht verlieren.

Die gemeinsame Kultivierung von MSC und CD133<sup>-</sup> EPC auf  $\beta$ -TCP konnte durch einige Umstellungen im Protokoll (Erhöhung der EPC-Zahl, Reduktion der Medienwechsel) erfolgreich durchgeführt werden.

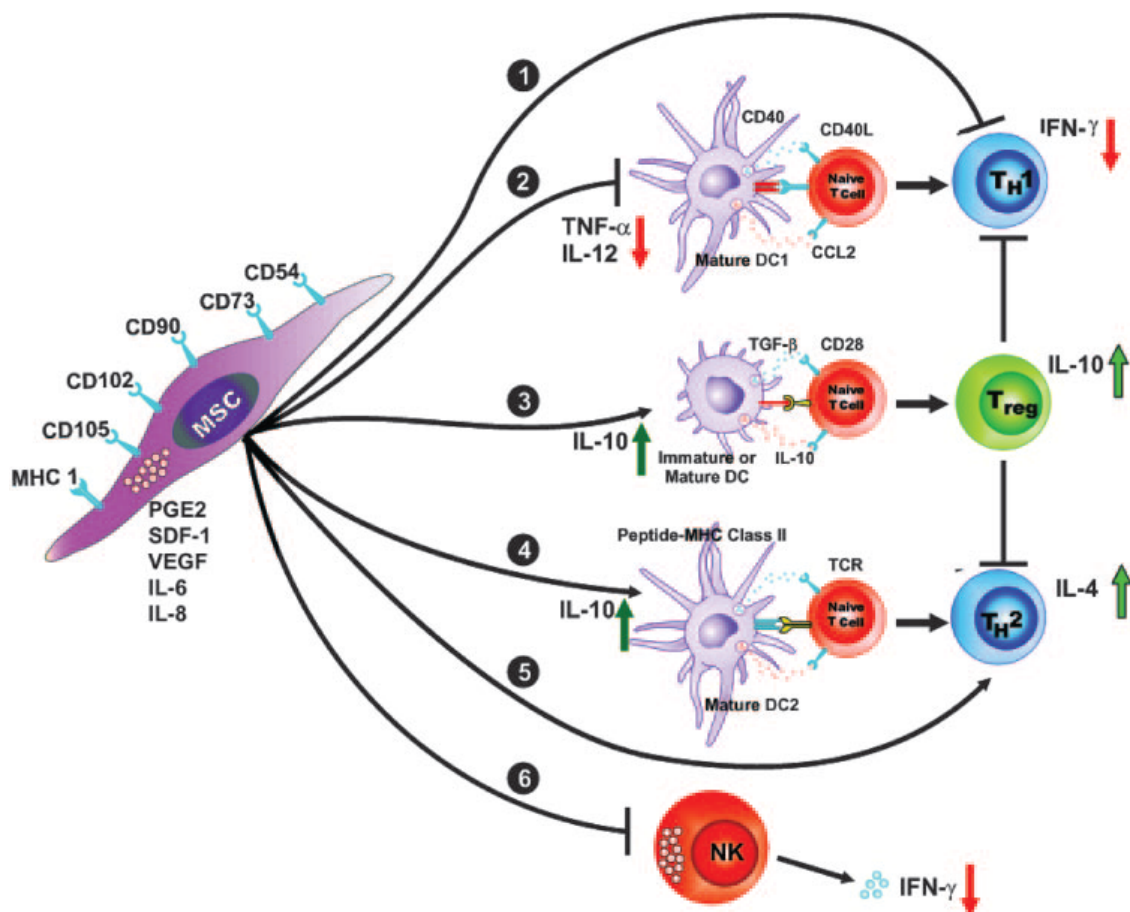
Die Vitalität und das Vorhandensein von sowohl osteogener (Cbfa1, Osteonektin, Osteocalcin und Kollagen I) als auch endothelialer Genexpression (vWF bis einschließlich Tag 10) belegt das Erreichen des Arbeitszieles.

Im gesamten Versuchsaufbau erzielten wir positive Signale, welche die Vitalität der Zellen widerspiegeln, und dies obwohl wir Zellen von zwei genetisch völlig unterschiedlich Individuen für die Testreihen benutzten. Grund hierfür ist das Fehlen von Immunzellen, hauptsächlich cytotoxischen T-Zellen, die durch den Kultivierungsvorgang der EPC weitestgehend eliminiert werden. MSC sind MHC-I-positiv, d.h. sie sind kein Ziel natürlicher Killerzellen, die eventuell den Kultivierungsprozess der EPC überstanden haben.

Auch mit der Konstellation, nämlich Vorhandensein von Immunzellen, wäre höchstwahrscheinlich nicht zu einer *Graft vs host* oder *host vs Graft* Reaktion gekommen. Diese Tatsache kann eventuell mit der immunsuppressiven Wirkung der MSC erklärt werden.

Es könnten 3 wesentliche Punkte dazu beitragen, dass MSC nicht attackiert werden. Zum einen sind MSC MHC II negativ (Majumdar MK 2003), dadurch können sie von CD4<sup>+</sup> Zellen eines fremden Organs nicht erkannt werden. Zweitens inhibieren MSC Antigenpräsentierende Zellen (APC) und zwar hauptsächlich Dendritische Zellen. Beyth et al. zeigten, dass bei den Co-Kulturen MSC / Monozyten die Produktion von INF- $\gamma$ , IL-12 und TNF- $\alpha$  abnahm

(Beyth et al. 2005). Drittens schaffen Mesenchymale Stammzellen durch die Produktion von Prostaglandin, Interleukin-10 (IL-10) und durch die Bildung von Indoleamin 2.3.-desoxygenase (IDO) eine immunsuppressive Umgebung. Die IDO Expression wird durch INF- $\gamma$  induziert. IDO katalysiert die Umwandlung von Tryptophan zu Kynurenine. Dieses hemmt die T-Zelle (Meisel R 2004). Die Produktion von Prostaglandin E2 wird von MSC gebildet, wenn diese sich in immunmodulatorischer Aktivität befinden. Diese Immunmodulation von MSC könnte wie in Abbildung 20 dargestellt angenommen werden. Nach Aggarwal und Pittinger wird der Immunmodulatorische Effekt auf verschiedenem Wege dargestellt. Diese werde auf verschiedene Wege erreicht, nämlich auf Dendritischem Weg (Pfad 2-4), Natürliche Killerzellen (Pfad 6) und über das adaptive Immunsystem (T-Zell-vermittelt) (Pfad 1 und 5).



**Abbildung 20:** Immunmodulatorische Effekt von MSC nach Aggarwal und Pittinger. Bloodjournal 2004

Somit ist auch eine Ko-Kultivierung von MSC von zwei verschiedenen Spendern *in vitro* möglich. Die Einflüsse dieser Zytokine auf EPC sollten jedoch geklärt werden.

Laut Literatur nehmen Prostaglandine zusätzlich zur Produktion von Cyclooxygenase (COX) auch an der Angiogenese mikrovaskulärer Zellen teil (Dempke W 2001). Somit würde sich dieser Effekt eventuell positiv auf die angiogenetische Wirkung von EPC auswirken.

Einige *in vitro* und *in vivo*-Studien zeigen, dass Entzündungsmediatoren wie C-reaktives Protein (CRP) und Interleukin-6 (IL-6) eine signifikante Erniedrigung des EPC- Überlebens verursachen (Verma S 2004).

Da aber Interleukin-10 (IL-10) eine antiinflammatorische Wirkung hat, könnte dieser neg. Effekt auf EPC womöglich nicht eintreten.

Eine Beeinflussung von EPC durch Indoleamine 2.3.-desoxygenase ist in der Literatur nicht beschrieben. Somit kann behauptet werden, dass sich eine immunsuppressive Wirkung von MSC höchstwahrscheinlich nicht negativ auf die Funktion von EPC auswirken würde.

## V - Z U S A M M E N F A S S U N G

Ziel der Arbeit war eine *in vitro* Versuchsetablierung einzuführen. Hierbei sollte sowohl das Überleben der Zellen (MSC und EPC), als auch ihr Verhalten unter osteogener Stimulation histologisch mittels Färbeverfahren und auf molekularbiologischem Wege untersucht werden. Dabei sollte auch ein Vergleich zwischen den zwei Medien, nämlich dem *Osteogenic Stem Cell Kit* und dem selbst hergestellten Medium bestehend aus Ascorbinsäure,  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason gemacht werden.

Hintergrund dieser Versuchsetablierung war es, eine suffiziente Behandlungsstrategie von Frakturen zu erzielen. Jene Knochendefekte, bei denen es auf Grund von bestimmten Umständen zu einer verzögerten oder gar nicht zur Bruchheilung kommt. Unter bestimmten Konditionen, wie zum Beispiel einer ausgedehnten Knochenresektion nach einer chirurgischen Tumorentfernung oder einer ausgedehnten Fraktur, entstehen großen Frakturspalten, solche, die als sog. *Critical size defect* bezeichnet werden. Hier für könnte eine Therapie mit der Hilfe von *Tissue Engineering* erzielt werden.

Stromale Knochenmarkszellen haben die Fähigkeit, unter bestimmten Bedingungen, nämlich unter dem Einfluss von Ascorbinsäure,  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason, sich osteogen umzudifferenzieren. Einige Studien belegen den Nutzen dieser Fähigkeit bei der Konsolidierung der Knochenfraktur. Für eine schnelle Knochenheilung ist die frühe und adäquate Vaskularisierung der Fraktur von außerordentlicher Wichtigkeit. Somit spielen die Endothelialen Progenitorzellen eine große Rolle.

Nach Asahara existieren zwei unterschiedliche Klassen der EPC, CD133<sup>+</sup> und CD133<sup>-</sup> Zellen. Verschiedene Studien zeigen, dass die EPC an der *in situ* Neovaskularisierung beteiligt sind. Somit stellt sich die Frage, erstmalig zu prüfen, ob eine Mischkultur aus EPC und MSC auf einer Trägermatrix kultiviert werden kann, um dadurch womöglich eine Verbesserung der Knochenheilung zu erzielen. Bei der Versuchsetablierung zeigte sich, dass die CD133<sup>+</sup> EPC sich unter dem Einfluss von osteogenem Medium osteogen umdifferenzierten und ihre endotheliale Differenzierung nicht mehr beibehielten. Zusätzlich zeigte sich eine fehlende Adhärenzfähigkeit der CD133<sup>+</sup> EPC.

Somit wurde die Arbeit mit CD133<sup>-</sup> EPC weitergeführt. Unter osteogenem Einfluss behielten diese ihre endotheliale Differenzierung, nämlich vWF und VEGF, bei. Diese „early“ EPC waren zudem auch adhärenz, was die Kultivierung auf Trägermatrices ermöglichte. Während der Versuchsetablierung zeigte sich auch, dass  $\beta$ -TCP einen osteoinduktiven Einfluss auf MSC hatte. Eine synergistische Wirkung im Sinne einer Potenzierung von osteogenem Potential konnte nicht beobachtet werden. Zu klären wären noch die Nachteile, die durch  $\beta$ -TCP entstehen, nämlich geringe Elastizität, langsame Resorption und hohe Zerbrechlichkeit. Daher wurde auch die Etablierung von Collagenvlies, ein Composite aus Kollagen I und Hydroxylapatite (von der Firma Osartis), untersucht. Collagenvlies war mangelhaft in seiner Stabilität. Wir konnten durch einige Modifikationen zeigen, dass die Zellen (MSC und EPC) bis einschließlich Tag 5 auf Collagenvlies vital waren. Zwar konnten Osteonektin und vWF detektiert werden, aber valide Aussagen über die osteogene Umdifferenzierung der Zellen konnten auf Grund der relativ kurzen Inkubationszeit von 5 Tagen nicht getroffen werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CD 133<sup>+</sup> EPC unter osteogener Stimulation ihre Endotheliale Differenzierung verlieren und somit für ein Vaskularisierungsvorhaben in Frakturen unter osteogener Stimulation ungeeignet erscheinen. Zudem ist das Fehlen der Adhärenz ein entscheidender Nachteil. CD133<sup>-</sup> EPC sind adhärenz und behalten ihre Endotheliale Differenzierung unter osteogener Stimulation bei. Somit sind sie auch gut geeignet, um eine für die Frakturheilung essentielle frühere Vaskularisierung zu induzieren.

Die vorliegende Arbeit zeigte erstmalig erfolgreich eine *in vitro* Kultivierung dieser Mischkultur. Es stellt sich nun die Frage, wie diese Mischkultur, bestehend aus CD133<sup>-</sup> EPC und MSC, sich *in vivo* verhält. Dies gilt es nun in tierexperimentellen Studien zu zeigen.

## S U M M A R Y

In this study the combined cultivation of stromal bone marrow cells (MSC) and endothelial progenitor cells (EPC) on bone substitution material(  $\beta$ -TCP) was, for the first time, successfully performed. The goal of the study was the *in vitro* experimental establishment of a combined cultivation. In the process, both the survival of the cells (MSC and EPC) and their behavior under osteogenic stimulation could be examined histologically using dying and molecular genetic methods. Additionally, 2 different mediums were thereby compared, the Osteogenic Stem Cell Kit and a self-made mixture consisting of ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate and dexamethasone.

The relevance of this study lies in basic therapeutic strategies for fractures. More specifically, bone defects in which, under certain circumstances, bone healing is insufficient or completely lacking. Under such circumstances, for example extensive osseous tumor resection or an complex fraktur, large nonunions, so-called critical size defects, result. In such cases, tissue engineering techniques can be applied.

Stromal bone marrow cells have the ability of osteogenic differentiation under certain conditions, as when in the presence of ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate and dexamethasone. Many studies have documented the use of this ability in the consolidation of fractures. For rapid bone healing, timely and adequate vascularization is necessary. Various studies have shown that EPC play a role in the *in situ* neovascularization. Thus, endothelial progenitor cells play a major role.

Accordingly, it is questionable firstly, if a combined culture of MSC and EPC on a substrate matrix is at all possible in order to optimize bone healing. In this study we demonstrated that CD133<sup>+</sup> EPC differentiate osteogenically in the presence of osteogenic medium, thereby losing their original endothelial differentiation. Additionally, it was shown that the CD133<sup>+</sup> EPC lose their adherence.



Consequently, the study was continued using CD133<sup>+</sup> EPC. Under osteogenic influence they retain their endothelial differentiation, vWF and VEGF. These „early“ EPC were also adherent, making cultivation on substrate matrix possible. Additionally, the osteoinductive influence of  $\beta$ -TCP on MSC was demonstrated, although no synergetic effect in the form of potentialization could be observed. The disadvantages of  $\beta$ -TCP, more specifically reduced elasticity, long resorption and high fragility were unclear. Therefore, we also examined the possible use of collagen fleece, a composite of collagen 1 and hydroxylapatite. The collagen fleece were unsatisfactory in their stability. We were able to show, after some modifications, that the cells (MSC and EPC) survived on the collagen fleece up to 5 days. While osteonectin and vWF were detectable, a valid statement concerning the osteogenic differentiation could not be made due to the relatively short incubation time of 5 days. In summary, it was demonstrated that CD133<sup>+</sup> EPC lose their endothelial differentiation and are therefore inapplicable for vascularization in fractures. Furthermore, the lack of adherence is a decisive disadvantage. CD133<sup>-</sup> EPC are adherent and retain their endothelial differentiation under osteogenic stimulation. They are therefore applicable in inducing the early vascularization necessary in bone healing.

The present study demonstrates, for the first time, the successful *in vitro* cultivation of such a combined culture. The question now arises, how this combined culture of CD133<sup>-</sup> EPC and MSC behaves *in vivo*. This necessitates further studies using for example an animal model.

## VI – L I T E R A T U R A N G A B E N

- Adler CP (2005) Knochenkrankheiten: Diagnostik makroskopischer, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 623
- Aldinger G, Beyer A, Schmid U, Herr G (1996) Grundsätzliche Aspekte der osteoinduktiven Aktivität von Knochengewebe und Möglichkeiten ihrer klinischen Anwendung. Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete 134: 205-209.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 275: 964–967
- Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM (2002) Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). Circulation 106: 3009–3017
- Aubin JE (1998) Advances in the osteoblast lineage. Biochem Cell Biol 76: 899-910
- Aubin JE (2001) Regulation of osteoblast formation and function. Rev Endocr Metab Disord 2: 81-94
- Bauer GJ, Hoellen IP (1997) Die distale intraartikuläre Humerusfraktur. Diagnostik, Operationstechnik und Ergebnisse. Aktuelle Traumatologie 27: 125-131
- Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C (2003) A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. Biomaterials 24: 2497-2502
- Beresford JN, Gallagher JA, McGuire MJB (1983) Human bone cells in culture: a novel system for the investigation of bone cell metabolism. Clin Sci 64: 38-39
- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J (2005) Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. Blood 105: 2214–2219

- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. *Stem Cells* 19(3): 180-92
- Boden SD (1999) Bioactive factors for bone tissue engineering. *Clin Orthop* 367: 84-94.
- Bowman BM, Miller SC (1986) The proliferation and differentiation of bone-lining cell in estrogen-induced osteogenesis. *Bone* 7(5): 351-357
- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R (1995) Bone Biology. *J Bone Joint Surg Am* 77: 1276-1289
- Caplan, AI (2005) Mesenchymal stem Cells. *J Orthop Res* 9: 641-650
- Carotenuto G, Spagnuolo G, Ambrosio L, Nicolais L (1999): Macroporous hydroxyapatite as alloplastic material for dental application: *Journal of Materials science. Materials in Medicine* 10: 671-676
- Claes L, Ignatius A (2002) Entwicklung neuer biodegradabler Implantate. *Chirurg* 73(10): 990-996
- Cohnheim J (1867) *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologische Klinische Medizin* 40
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001) Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci* 98: 7841-7845
- DeGroot K (1980) Bioceramics consisting of calciumphosphate salts. *Biomaterials* 1: 47-50
- DeLacure MD (1994) Physiology of bone healing and bone graft. *Otolaryngol Clin North Am* 27(5): 859-874
- Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ (2001) Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 127(7): 411-417
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87: 27-45
- Ducy P (2000) Cbfa1 a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 219: 461-471

- Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res 355: 7-21
- Einhorn TA (1999) Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. Clin Orthop Relat Res 367: 59-67
- Fogh J, Trempe G (1975) New human tumor cell lines. Ed. New York: Plenum 115-159.
- Friedenstein AJ, Deriglas UF, Kulagina NN (1974) Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by in vitro colony assay method. Exp Hematol 2: 83–92
- Friedrich E, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N (2006) CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup> Endothelial Progenitor Cell Subpopulation With Potent Vasoregenerative Capacities. Circulation Research 98: 20-25
- Garfin SR, Andersson G, Gronblad M, Rydevik B (1999) Bone and Joint Decade 2000–2010- for Prevention and Treatment of Musculo-Skeletal Disorders. Spine 24 (11): 1055
- Giebel G (1987) Extremitätenverlängerung und die Behandlung von Segment-Defekten durch Callusdistraction. Chirurg 58: 601-606.
- Goodship AE, Kenwright J (1985) The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. J Bone Joint Surg 67: 650-655
- Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell 84(3): 345-357
- Helfet DL, Kloen P, Anand N, Rosen HS (2003) Open reduction and internal fixation of delayed unions and nonunions of fractures of the distal part of the humerus. J Bone Joint Surg Am 85-A(1): 33-40
- Hemler M (1988) Adhesive protein receptors on hematopoietic cells. Immunol Today 9:109
- Hemler M (1990) VLA proteins in the integrin family: Structures, functions and their roles on leukocytes. Ann Rev Immunol 8: 365
- Hench LL, Andersson Ö (1993) Bioactive glasses. World Scientific Publishing Co. Pte-Ltd., Singapore 41-62
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB (2004) Characterization of Two Types of Endothelial

- Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovasclogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24;288-293
- Isner JM, Asahara T (1999) Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 103(9): 1231-1236
  - Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64(2): 295-312
  - Jonsson KB, Frost A, Nilsson O, Ljunghall S, Ljunggren O (1999) Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison. *Acta Orthop Scand* 70: 365-373
  - Kikichi M, Matsumoto HN, Yamada T (2004) Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites. *Biomaterials* 25(1): 63-69
  - Klein CPAT, Driessen AA, De Groot K (1983) Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J Biomed Mater Res* 17: 769-784
  - Klein P, Schell H, Duda GN (2003) The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J Orthop Res* 21(4): 662-669
  - Kohn DH, Sarmadi M, Helman JI (2002) Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: implications for tissue engineering of bone. *J Biomed Mater Res* 60(2): 292-299
  - Kühne Ch A, Heufelder AE, Hofbauer LC (2002) HIV-Infektion und Knochengewebe. *J Mineralstoff* 9(2): 13-18
  - Kunz GA, Cuculoski F (2006) Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity. *Am Heart J* 152(1): 190-195
  - Lane WA (1914): *The operative treatment of fractures*. Ed. 2. London, Medical publishing Company
  - Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G (2004) Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 109: 220-226

- Lee CH, Singla A, Lee Y (2001) Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 221: 1–22
- Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Klokkevold PR, Chung CP (2000) The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J Periodontol* 71: 418-424
- Li R, Mitra N, Gratkowski H, Vilaire G, Litvinov R, Nagasami C, Weisel JW, Lear JD, DeGrado WF, Bennett JS (2003) Activation of Integrin  $\alpha$  IIb $\beta$ 3 by Modulation of Transmembrane Helix Association. *Science* 300: 795–798
- Lotem M, Maor P, Haimoff H, Woloch Y (1971) Lumbar hernia at an iliac bone graft donor site- a case report. *Clin Orthop* 80: 130-132
- Macnab J, De Haas WG (1974) The role of periosteal blood supply in the healing of fractures of the tibia. *Clin Orthop Relat Res* 105: 27-33
- Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD (2003) Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 10: 228–241.
- Martin TJ, Ingleton PM, Underwood JCE, Melick RA, Michelangeli VP, Hunt NH (1976) Parathyroid hormone responsive adenylate cyclase in an induced transplantable osteogenic sarcoma in the rat. *Nature* 260: 436-438
- Mc Quillan DJ, Richardson MD, Bateman JF (1995) Matrix Deposition by a Calcifying Human Osteogenic Sarcoma Cell Line (SAOS-2). *Bone* 16(4): 415-426
- Matti H (1932) Über freie Transplantation mit Knochenspongiosa. *Langenbecks Arch Chir* 168: 236-242
- Maxian SH, Zawadsky JP, Dunn MG (1993) In vitro evaluation of amorphous calcium phosphate and poorly crystallized HA coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res* 27: 111-117
- Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D (2004) Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 103(12):4619-21.

- Minguell JJ, Erices A, Conget P (2001) Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 226(6): 507-20
- Mundy GR (1996) Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop* 323: 24-28.
- Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T (2000) Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105: 1527–1536.
- Neumann M, Epple M (2006): Composites of Calcium Phosphate and Polymers as Bone Substitution Materials. *EurJ of Trauma* 32(2): 125-131
- Ochsner PE, Berchthold D, Uehlinger K, Verburg A (1983) Ein- und Abbau von resorbierbaren Trikalziumphosphatgranulaten. *Hefte Unfallheilkunde* 165: 77
- Oonishi H, Ishimaru H, Yamamoto M, Tsuji E, Kushitani S, Aono M, Nabeshima T(1990) Comparison of bone ingrowth into porous Ti-6Al-4V beads with/without a plasma sprayed HA. *CRC Handbook of Bioactive Ceramics* 2: 155-162
- Parfitt AM (1977) The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption--bone flow theory. *Clin Orthopand Relat Res* 127: 236-247
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95: 952–958
- 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 (5411): 143-147
- Rafii S, Lyden D (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9: 702-712
- Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL (2003) Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107(8): 1164-1169

- Rhinelander FW (1974) Tibial blood supply in relation to fracture healing. Clin Orthop Relat Res 105: 34-81
- Rifas L, Fausto A, Scott MJ, Avioli LV (1994) Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human osteoblast-like cells: differentiation is associated with repression of metalloproteinase biosynthesis. Endocrinology 134: 213-221
- Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. Nature 386: 671-674
- Robey PG, Termine JD (1985) Human bone cells in vitro. Calcif Tiss Int 37: 453-460
- Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit K, Shull S, Mann K, Rodan GA (1987) Characterization of a human osteosarcoma cell line SAOS with osteoblastic properties. Cancer Res 47: 4961-4966
- Rose FRAJ, Oreffo ROC (2002) "Bone Tissue Engineering: Hope vs. Hype". Biochem Biophys Res Comm 292: 1-7
- Rüksamen-Waigmann H (1997) Virussicherheit von Blutspenden und Knochentransplantaten. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Thieme Stuttgart-New York 1-7.
- Rueger JM (1992) Knochenersatzmittel. Hefte zur Unfallheilkunde Springer, Berlin Heidelberg 213
- Ruggeri L, Capanni M, Martelli MF, Velardi A (2001) Cellular therapy: exploiting NK cell alloreactivity in transplantation. Curr Opin Hematol 8: 355–359.
- Rüter A, Mayr E (1999) Pseudarthrosen. Der Chirurg 70: 1239-1245
- Salyer KE, Hall CD (1989) Porous hydroxyapatite as an only bonegraft substitute for maxillofacial surgery. Plast Reconstr Surg 84: 236–244.
- Savage B (1996) Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen and translocation on von Willebrand factor. Cell 84: 289-297
- Schäfer D, Seidel J, Martin I, Jundt G, Heberer M, Grozinsky A, Vunjak-Novakovic G und Freed L (2004) Engineering und Charakterisierung von funktionalem osteochondralem Ersatzgewebe. Der Orthopäde 33(6): 721-726



- Schenk RK, Willenegger H (1977) Zur Histologie der primären Knochenheilung. Modifikationen und Grenzen der Spaltheilung in Abhängigkeit von der Defektgrösse. Unfallheilkunde 80: 155
- Schieker M, Seitz H, Drosse I, Seitz S, Mutschler W (2006) Biomaterials as Scaffold for Bone Tissue Engineering. Eur J of Traum Emerg Surg 32(2): 114-124
- Schmitz JP, Hollinger JO (1986) The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop 205: 299-308
- Schnurer SM, Gopp U, Kuhn KD, Breusch SJ (2003) Bone substitutes. Orthopade 32: 2-10
- Schweiberer L, Eitel F, Betz A (1982) Spongiosatransplantation. Chirurg 53: 195.
- Schweiberer L, R. Baumgart, St. Deiler (1999) Die biologischen Bedingungen atropher und hypertropher Pseudarthrosen der Schaftknochen Ursachen und Erscheinungsbild. Chirurg 70(11): 1193-1201
- Scott DM, Kent GM, Cohn DV (1980) Collagen synthesis in cultured osteoblast-like cells. Arch Biochem Biophys 201: 384-391.
- Scott G, King JB (1994) A prospective, double-blind trial of electrical capacitive coupling in the treatment of non-union of long bones. J Bone Joint Surg Am 76(6): 820-826
- Seeherman H (2001) The influence of delivery vehicles and their properties on the repair of segmental defects and fractures with osteogenic factors. J Bone Joint Surg Am 83: 79-81.
- Sharrard WJW (1990) A double-blind trial of pulsed electromagnetic fields for delayed union of tibial fractures. J Bone Joint Surg 72: 347-355
- Shim SS (1968) Physiology of blood circulation in bone. J Bone Jt Surg 50: 812-823
- Simmons P, Masinovsky B, Longenecker B (1992) Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. Blood 80: 388–397
- Simmons P, Levesque J, Zannettino A (1997) Adhesion molecules in haemopoiesis. Baillieres Clin Haematol 10: 485–492

- Suda T, Takahashi N, Martin TJ (1992) Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 13: 66-80
- Sudo H, Kodamo HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasal S (1983) In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96: 191-198
- Tabata Y (2001) Recent progress in tissue engineering. *Drug Discovery Today* 6: 483-487
- Tadic D, Epple M (2003) A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials* 25(6): 987-994
- Takamizawa S, Maehata Y, Imai K, Senoo H, Sato S, Hata R (2004) Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *Cell Biol Int* 28: 255-265
- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T (2002) Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360: 427-435
- Trentz O (1986) Transplantation von Knochen bei aseptischen traumatischen und posttraumatischen Zuständen. *Orthopäde* 15: 36-41.
- Trueta J (1974) Blood supply and the rate of healing of tibial fractures. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 105: 11-26
- Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, Wang ML, Hozack WJ, Manner PA (2003) A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol Biotechnol* 23(1): 37-49
- Uludag H, Gao T, Porter TJ, Friess W, Wozney JM (2001) Delivery systems for BMPs: factors contributing to protein retention at an application site. *J Bone Joint Surg Am* 83: 128-135
- Urbich C, Dimmeler S (2004) Endothelial progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95(4): 343-353
- Urist MR (1980) Bone transplants and implants. *Fundamental and clinical bone physiology*. Philadelphia, Lippincot Philadelphia 331-368

- Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM (2000). The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 133: 377-381
- Verfaillie C, Hurley R, Bhatia R (1994) Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 16: 201–216
- Verma S, Kuliszewski MA, Li SH (2004) C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation* 109: 2058-2067
- Vogel W, Grunebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Buhring HJ (2003) Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 88: 126-133
- Wallace AL, Draper ER, Strachan RK, McCarthy ID, Hughes SP (1991) The effect of devascularisation upon early bone healing in dynamic external fixation. *J Bone Joint Surg Br* 73-B: 819-825
- Wang Y, Jin G, Miao H, Li J, Usami S, Chien S (2006) Integrins regulate VE-Cadherin and catenins: Dependence of this regulation on Src, but not on Ras. *Cell Biology* 103(6): 1774-1779
- Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G (2002) Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1567–1572.
- Willenegger G, Perren SM, Schenk R (1971) Primäre und sekundäre Knochenbruchheilung. *Chirurg* 42: 24-52
- Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos AG (1996) Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* 17(2): 175-185
- Yin AH (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90: 5002-5012
- Yoder M, Williams D (1995) Matrix molecule interactions with hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 23: 961–967

- Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S (1996) Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. J Biomed Mater Res 32: 481–492
- Younger EM, Chapman M (1989) Morbidity at Bone Graft Donor Sites. J Orthop Traum 3(3): 192-199

## Curriculum Vitae

Agmal Scherzed  
07.11.1981 in Kabul  
ledig

### Schule

1988 – 1990	Grundschule in Kabul
1990 - 1992	Theodor Heuss Schule in Bad Soden
1992 - 1998	Friedrich Ebert Gesamtschule in Schwalbach
1998 – 2001	Max Beckmann Oberstufengymnasium, Abschluss Allgemeine Hochschulreife

### Studium

10/2001-12/2007	Studium der Medizin am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
08/2003	Ärztliche Vorprüfung
08/2006-08/2007	Praktisches Jahr (Hals-Nasen-Ohrenheilkunde an der Uniklinik Frankfurt; Chirurgie an der Uniklinik Frankfurt sowie am St. John's Medical College in Bangalore/ Indien; Innere Medizin an der Uniklinik Frankfurt)
12/2007	Approbation

### Famulaturen

03/2004	Innere Medizin am Bürgerhospital, Frankfurt Vertiefung von Diagnostik und Therapie häufiger und wichtiger internistischer Krankheitsbilder
09/2004	Traumatologie an der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie am Universitätsklinikum Frankfurt Einsatz in der ambulanten und stationären Versorgung häufiger und wichtiger unfallchirurgischer Krankheitsbilder
08/2005	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde an der Uniklinik Frankfurt Einführung in die Diagnostik und Behandlung verschiedener Krankheiten des Hals-Nasen-Ohrenbereichs sowie Einsatz in der Akutversorgung der Notfälle
09/2005	Kardiologie am kardiologischen Zentrum der Klinik Rotes Kreuz, Frankfurt Diagnostik und Therapie der häufigsten kardiologischen Krankheiten

**Publikationen und  
Poster**

Scherzed A, Tewksbury R, Seebach C, Henrich D, Wilhelm K, Marzi I (2005) Comparison of the osteogenic capacity of osteogenic differentiating media. 9th Annual Meeting on Surgical Research, Frankfurt am Main, Germany, page 482.

Seebach C, Henrich D, Scherzed A, Alini M, Marzi I (2006) "Early" endothelial progenitor cells (EPC) on  $\beta$ -Tricalcium Phosphate scaffold under osteogenic conditions are useful for vascularisation in Bone tissue Engineering. Biotechnology Symposium. From basic research to clinical applications using biotechnology and bioengineering. Lausanne, Switzerland,.

Scherzed A(2007) Erfolgreiche Cokultivierung von endothelialen Progenitorzellen (EPC) und mesenchymalen Stammzellen (MSC) auf beta-Tricalciumphosphat (b-TCP) in vitro. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie.

71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 93. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie, 48. Tagung des Berufsverbandes der Fachärzte für Orthopädie. Berlin

Henrich D, Seebach C, Kaehling C, Scherzed A, Wilhelm K, Tewksbury R, Powerski M, Marzi I (2009) Simultaneous cultivation of human endothelial like differentiated precursor cells and human marrow stromal cells on beta-Tricalciumphosphate. Tissue Eng Part C Methods.

**Beruf**

Seit 04/2008 Assistenzarzt in der Uniklinik Würzburg

Frankfurt, 03.12.2009

Mein herzlichster Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. I. Marzi, Direktor der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, für die Überlassung des äußerst interessanten Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien und die freundliche Erlaubnis, in den Laborräumen tätig zu sein.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Dirk Henrich für die außergewöhnliche Unterstützung meiner Arbeit, die Korrektur meines Manuskripts und die stets freundschaftliche und persönliche Atmosphäre, durch die mir die Arbeit sehr viel Spaß gemacht hat!

Bei Frau Dr. Carolin Seebach möchte ich mich für die Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Weiteren Dank möchte ich an dieser Stelle allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Unfallchirurgischen Labors der Klinik für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die ständige Gesprächsbereitschaft und Unterstützung aussprechen.

Gedankt sei an dieser Stelle meiner Familie (Wago, Lina und Muki), die mich unmittelbar unterstützt haben und stets ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten. Meiner lieben Freundin Luzie möchte ich sehr danken, dass sie es nie leid war, meine grammatikalischen Unzulänglichkeiten zu korrigieren.

### **Schriftliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel: „Kultivierung verschiedener Progenitorzellen mit mesenchymalen Stammzellen auf Knochenersatzmaterialien in vitro“ im Traumatologischen Labor der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, unter Betreuung und Anleitung von Herrn Professor Dr. I. Marzi mit Unterstützung durch Herrn Dr. D. Henrich ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Henrich D, Seebach C, Kaehling C, Scherzed A, Wilhelm K, Tewksbury R, Powerski M, Marzi I (2009) Simultaneous cultivation of human endothelial like differentiated precursor cells and human marrow stromal cells on beta-Tricalciumphosphate. Tissue Eng Part C Methods.

Frankfurt am Main, 03.12.2009

Agmal Scherzed