

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

Thema der Dissertation

**Einfluss der osteogenen Stimulation und Beimpfung mit
vaskulär-endothelialelem Wachstumsfaktor auf die
Knochenneubildung besiedelter Konstrukte im Mausmodell
- Molekularbiologische Untersuchung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Florian Pohlig

aus

Traunstein

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Schieker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Müller
Priv.-Doz. Dr. Dr. Christoph Pautke

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Denitsa Docheva
Dr. med. Sebastian Seitz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	5
1.1. Knochenersatzmaterialien	5
1.2. Tissue Engineering	7
1.2.1. Übersicht	7
1.2.2. Leitschienen und Zellen für das Tissue Engineering.....	9
1.2.3. Tissue Engineering im Tiermodell	10
1.3. Nachweis von artfremden Zellen	14
1.4. Aufgabenstellung.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Zellkultur.....	21
2.1.1. Humane mesenchymale Stammzellen.....	21
2.1.2. Mausfibroblasten	22
2.1.3. Zellzählung	23
2.1.4. Isolierung einzelner Zellen (single cell picking).....	24
2.2. Tierversuche.....	25
2.2.1. Leitschienen	25
2.2.2. Besiedlung.....	25
2.2.3. Kultivierung der Leitschienen	26
2.2.4. Kontrollgruppe	26
2.2.5. Versuchstiere	27
2.2.6. Implantation der Leitschienen	28
2.3. Molekularbiologische Methoden	31
2.3.1. Isolation der DNA	31
2.3.2. Qualitative Polymerase Chain Reaction (PCR).....	32
2.3.3. Quantitative Polymerase Chain Reaction.....	35
2.4. Materialien und Geräte	38
2.4.1. Geräte	38
2.4.2. Chemikalien und Materialien für die Molekularbiologie	39
3. Ergebnisse	41
3.1. Tierversuche.....	41

3.1.1. Besiedlungseffizienz.....	41
3.1.2. Versuchstiere	42
3.2. Molekularbiologie	42
3.2.1. Isolation der DNA aus den Geweben und Leitschienen.....	42
3.2.2. Qualitative PCR.....	44
3.2.3. Semiquantitative Auswertung.....	49
3.2.4. Quantitative PCR.....	50
4. Diskussion	57
4.1. Zellkultur und Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF)	57
4.2. Tierversuche und Nachweismethoden für humane DNA.....	61
4.3. Qualitative und quantitative Untersuchung	64
4.4. Anregungen und Ausblick	68
4.4.1. Anregungen.....	68
4.4.2. Ausblick.....	69
5. Zusammenfassung.....	71
6. Literaturverzeichnis	73
Abkürzungsverzeichnis	91
Danksagung	92

1. Einleitung

1.1. Knochenersatzmaterialien

Eine alltägliche Aufgabe in der orthopädischen Chirurgie und Traumatologie ist die Behandlung ossärer Defekte unterschiedlichster Ätiologie. Diese können durch Traumata, Tumoren, Infektionen oder kongenitale Malformationen verursacht werden. Die Therapieoptionen beinhalten dabei neben dem Goldstandard der autogenen und allogenen Knochentransplantation auch den Einsatz verschiedenster Knochenersatzmaterialien (Rueger 1998). Bei der autogenen Knochentransplantation erfolgt die Defektauffüllung mit körpereigener Spongiosa, welche zuvor zum Beispiel am Beckenkamm oder der Tibia entnommen wurde. Als äußerst vorteilhaft erweisen sich dabei die osteogenen, osteoinduktiven und auch osteokonduktiven Eigenschaften des autogenen Transplantats. So findet die Knochenneubildung in osteogenen Materialien durch bereits vorhandene vitale Osteoblasten statt. Im Rahmen der Osteoinduktion werden ortsständige oder transplantierte Stammzellen und Osteoprogenitorzellen zur osteogenen Differenzierung angeregt und die Osteokonduktion fördert als Leitstruktur die Einwanderung von Zellen und Gewebe in den Defekt (Laurencin et al. 2006). Jedoch ist diese Therapie mit zusätzlichem operativem Aufwand, einer begrenzten Verfügbarkeit und vor allem mit einer hohen Entnahmemorbidität verbunden (Joshi 2004). Bei der Verwendung von allogenen Knochenmaterial können zwar lokale Komplikationen und postoperative Beschwerden an der Entnahmestelle vermieden werden, jedoch ist diese Option, analog zu Bluttransfusionen und Organtransplantationen, mit der Gefahr von Infektionen und immunologischen Komplikationen bis hin zu einer Abstoßungsreaktion verbunden (Mellonig et al. 1992; Friedlaender 2000).

Als Alternative dazu steht eine große Vielfalt synthetisch hergestellter Knochenersatzmaterialien in nahezu unbegrenzter Menge zur Verfügung. Diese unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Materialzusammensetzung sondern auch in deren biologischer Wirkung (Schieker et al. 2008). Im Idealfall besitzen auch

sie alle drei Eigenschaften autogener beziehungsweise allogener Spongiosa und ersetzen somit vorübergehend nicht nur strukturelle Elemente und die Funktionen des defekten Knochens sondern fördern auch die Knochenheilung (Rueger 1998).

Die meisten heute in der Klinik an Patienten angewandten Biomaterialien weisen jedoch nur eine osteokonduktive Wirkung auf und fungieren daher als reine Leitschiene für einwachsendes Gewebe und einer damit verbundenen Knochenneubildung (Hak 2007). Diese werden im Verlauf der Knochenheilung, abhängig vom verwendeten Material, ohne Resorption der Leitschiene (z.B. Hydroxylapatit) durchbaut (Briem et al. 2002) oder es findet ein Umbau unter gleichzeitigem Abbau der Leitschiene (z.B. Tricalciumphosphat) im Sinne eines vollständigen *Remodellings* statt (Schilling et al. 2004). Um Letzteres zu ermöglichen aber dennoch eine größtmögliche Stabilität im Defektbereich zu gewährleisten ist die Kombination mehrerer Biomaterialien mit unterschiedlichen Eigenschaften in einer Leitschiene, den so genannten Kompositen, notwendig (Khan et al. 2008). Jedoch wird der Einsatz rein osteokonduktiver Materialien durch die hohen Anforderungen an das Implantatlager und der stark von Patientenalter, Defektgröße, Knochenart, Vaskularisation und Stabilität des defekten Knochens abhängigen Reparationsfähigkeit limitiert (Bauer et al. 2000).

Ergänzend dazu können osteoinduktive Wachstumsfaktoren appliziert werden, welche eine Differenzierung von Stammzellen zu Osteoblasten und deren Proliferation bewirken. Diese werden im Rahmen der natürlichen Knochenheilung von den beteiligten Zellen parakrin sezerniert und aus der Knochenmatrix im Defektbereich freigesetzt (Kraus et al. 2006). Bereits 1965 konnte die Arbeitsgruppe um Urist osteoinduktive Faktoren im Knochen nachweisen (Urist 1965). Im Laufe der Jahre konnte eine Vielzahl dieser Faktoren identifiziert und näher erforscht werden. Dazu gehören vor allem die zum Teil bereits klinisch zugelassenen bone morphogenetic proteins (BMPs) (Govender et al. 2002), insulin like growth factor (IGF) oder platelet-derived growth factor (PDGF) (Parikh 2002). Erst seit der Möglichkeit einer rekombinanten Herstellung stehen diese Proteine in größeren Mengen zur Verfügung.

Somit ermöglicht die Kombination von bisher als reine Defektfüller eingesetzten osteokonduktiven Materialien und osteoinduktiven Wachstumsfaktoren die Herstellung neuer Knochenersatzmaterialien mit prolongierter Freisetzung der gewünschten Wachstumsfaktoren (Luginbuehl et al. 2005; Patel et al. 2008).

Allerdings konnten Ozturk et al. zeigen, dass nicht jede Kombination synergistische Effekte aufweist, sondern durchaus auch hemmend wirken kann (Ozturk et al. 2006). Auch die optimale Dosierung und die Ortständigkeit der Faktoren erweist sich auch heute noch als nicht ausreichend aufgeklärt.

Obwohl heute eine Vielzahl an Knochenersatzmaterialien zur klinischen Anwendung angeboten werden, bleibt dieses Verfahren meist auf die Behandlung größerer Defekte beschränkt, da für deren Augmentation oftmals nicht genügend Eigenspongiosa gewonnen werden kann. Bei kleineren Defekten stellt die autogene Knochen transplantation nach wie vor das Verfahren der Wahl dar. Dies ist nicht zuletzt auf die gleichzeitige Verpflanzung vitaler, knochenbildender Zellen zurückzuführen, welche die Regeneration in erheblicher Weise fördern.

1.2. Tissue Engineering

1.2.1. Übersicht

Tissue Engineering (TE) ist ein relativ neues interdisziplinäres Gebiet mit dem Ziel der Herstellung lebender Substitute für Gewebedefekte. Basis ist die Applikation von funktionell aktiven Zellen auf unterstützende Leitschienen und eine kontrollierte Zugabe von Wachstumsfaktoren. Dieses Forschungsgebiet wurde Mitte der 1990er Jahre vor allem von Vacanti und Langer populär gemacht, welche bereits damals die Notwendigkeit einer engen Kooperation der Natur- mit den Ingenieurwissenschaften aufgrund der Komplexität dieses Gebiets erkannten (Langer et al. 1993).

Ziel ist daher, die Züchtung von Knochen *in vitro*, um die mit oben genannten Nachteilen verbundene autogene Spongiosatransplantation zu ersetzen. Dazu werden aus Knochenmark gewebetypische Zellen oder Stammzellen isoliert und kultiviert, um die benötigte Zellzahl zu erhalten. Daraufhin erfolgt die Besiedlung von Leitschienen mit diesen Zellen, um eine gerichtete Gewebsentwicklung zu gewährleisten. Bei Verwendung von Stammzellen empfiehlt sich deren Stimulation in Richtung osteoblastärer Differenzierung mittels entsprechender Medien. Zusätzlich kann die Knochenneubildung in den Leitschienen durch die Applikation von unter 1.1. genannten Wachstumsfaktoren positiv beeinflusst werden. Nach einer weiteren

Kultivierungsphase der besiedelten Konstrukte *in vitro* zur besseren Adhäsion der Zellen auf dem Trägermaterial erfolgt die Implantation in den Defektbereich (Vacanti et al. 1999). Dort kommt es im Idealfall zu einer Knochenneubildung mit paralleler Resorption der Leitschiene und in der Folge zu einer *Restitutio ad integrum* (Mistry et al. 2005). Dabei soll zunächst das Implantat die notwendige Stabilität im Defektbereich gewährleisten, bis im Rahmen des *Remodelling* der neu gebildete Knochen diese Aufgabe übernehmen kann (Schieker et al. 2006; Drosse et al. 2008).

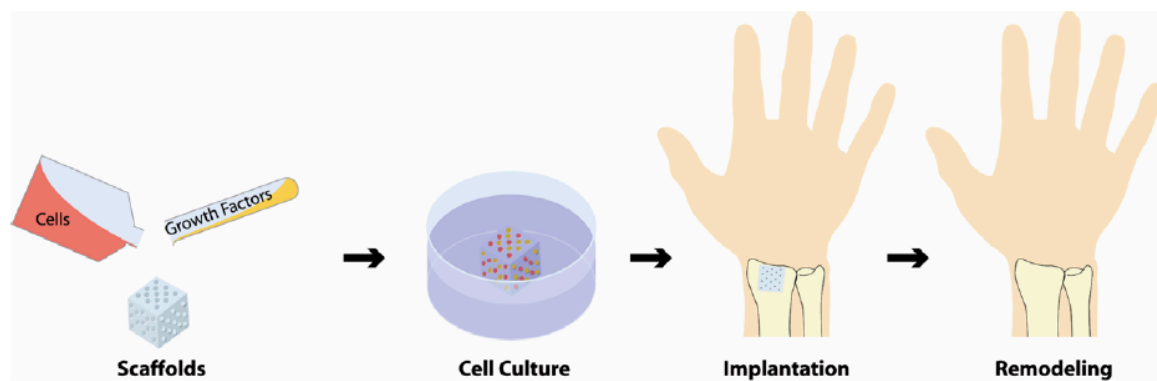


Abb. 1 Schematische Darstellung der einzelnen Schritte des Tissue Engineering von der Besiedlung von Leitschienen *in vitro* bis zum Remodelling *in vivo* (Drosse et al. 2008)

Schnell kam es daraufhin zu ersten klinischen Anwendungen. So gelang der Arbeitsgruppe um Vacanti die Rekonstruktion eines amputierten Daumenendgliedes mittels einer mit autologen Periostzellen besiedelten Hydroxylapatitleitschiene (Vacanti et al. 2001). Andere Arbeitsgruppen erzielten ähnliche Ergebnisse bei ektoper Implantation besiedelter Konstrukte. Warnke et al. gelang 2004 die Rekonstruktion eines Mandibuladefektes mit einer im ektopen Lager kultivierten Leitschiene (Warnke et al. 2004). Jedoch zeigten die klinischen Ergebnisse, die in keinem Verhältnis zum zeitlichen Aufwand und der Belastung des Patienten standen, die derzeitigen Grenzen des Tissue Engineering auf.

Das TE findet aufgrund der derzeit noch zu großen ungelösten Probleme hinsichtlich der freien Verfügbarkeit und Lagerbarkeit, der Zellquellen (autogen und allogenen) und der immunologischen Akzeptanz allogener Zelltransplantate bis heute keine breite klinische und kommerzielle Anwendung (Ahsan et al. 2005).

1.2.2. Leitschienen und Zellen für das Tissue Engineering

Für das Tissue Engineering von Knochen ist ein Trägermaterial für die osteogenen Zellen notwendig, um die Ortsständigkeit der Zellen im Defektbereich zu gewährleisten. Dieses Trägermaterial soll aber gleichzeitig auch als Leitschiene für die proliferierenden Zellen und das einwachsende umliegende Gewebe dienen, da ein gerichtetes Wachstum ohne sie nach derzeitigem Wissensstand nicht möglich ist (Abukawa et al. 2003). Verschiedenste bereits oben genannte organische und anorganische Knochenersatzmaterialien kommen hierfür in Frage. Breite Anwendung finden z.B. anorganische Kalziumphosphatkeramiken (Hydroxylapatit, Trikalziumphosphat) oder organische Verbindungen wie Polymere (Polyester, Polyaminosäuren). Auch Knochenmatrixextrakte und -fraktionen boviner und humaner Herkunft werden häufig als Leitschienen eingesetzt. Zudem steht heute eine Reihe von Verbundmaterialien zur Verfügung, welche die gewünschten Eigenschaften der unterschiedlichen Materialklassen in sich vereinen.

Neben den materialspezifischen Eigenschaften der Leitschienen ist vor allem auch deren interne Architektur von großer Bedeutung. Somit kann durch die Wahl einer Leitschiene mit optimaler Porengröße von mehr als 300 nm und hoher Interkonnektivität die Zelladhäsion und Zellverteilung innerhalb des Konstrukts, die Versorgung mit Nährstoffen sowie die Vaskularisierung positiv beeinflusst werden (Vanis et al. ; Murphy et al. 2010).

Die Wahl der verwendeten Zellen stellt einen weiteren entscheidenden Faktor dar. In der aktuellen Literatur finden verschiedene Zellen wie Osteoblasten, Osteoprogenitorzellen, Bone Marrow Stroma Cells (BMSC) aber auch mesenchymale Stammzellen Verwendung. Erstgenannte drei Zellarten stellen dabei bestimmte Stufen in der osteoblastären Differenzierungskaskade dar und stammen ursprünglich von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen (MSC) ab (Czyz et al. 2003), welche daher neben Osteoblasten, unter entsprechenden Kulturbedingungen, auch zu anderen Zell- und Gewebearten wie Fett- oder Knorpelzellen differenzieren können (Pittenger et al. 1999). Aufgrund des meist eingeschränkten Proliferationspotenzials ausdifferenzierter Zellen adulter Spender empfiehlt sich für das Tissue Engineering von Knochen die Verwendung von MSC oder Osteoprogenitorzellen (Cancedda et al. 2003; Schieker et al. 2004). Als problematisch erweist sich jedoch der geringe Anteil (0,001 – 0,01%) von MSC im

Knochenmark, welcher mit zunehmendem Alter oder infolge von Erkrankungen zusätzlich abnimmt (Tsuchida et al. 2003). Allerdings kann dies durch die Verwendung allogener Zellen aus einer Zellbank umgangen werden (Olivier et al. 2004).

1.2.3. Tissue Engineering im Tiermodell

Im Rahmen des Tissue Engineering stellen Tiermodelle nach *in vitro* Studien den nächsten Schritt für eine spätere Übertragbarkeit der Ergebnisse in den klinischen Alltag dar. Dabei gilt es die komplexen Reaktionen des Organismus auf das implantierte Konstrukt zu untersuchen. Diese beinhalten sowohl gewünschte Effekte wie die Resorption der Leitschiene im Rahmen des Remodelling als auch eine ungewünschte Immunantwort oder die Bildung tumoröser Veränderungen. Erst die damit gewonnenen Erkenntnisse erlauben eine weitestgehend sichere Anwendung im Rahmen klinischer Studien.

Primär erfolgt die Untersuchung im Kleintiermodell aufgrund der relativ niedrigen Anschaffungs- und Haltungskosten. Dies erlaubt größere Untersuchungsgruppen und in der Folge zuverlässigere Ergebnisse. Als vorteilhaft erweist sich auch die kürzere Lebenserwartung von Kleintieren, da somit die Alterungsprozesse des Knochens und des implantierten Konstrukts besser beurteilt werden können (Liebschner 2004). Erst nach Klärung biologischer Fragen am Kleintier ist eine Ausdehnung auf Großtiere aufgrund der damit verbundenen Kosten sinnvoll, um dann sowohl biomechanische Aspekte zu untersuchen als auch chirurgische Techniken zu etablieren (Buma et al. 2004).

Besonders bei Kleintiermodellen besteht die Möglichkeit das besiedelte Konstrukt im ektopen oder orthotopen Lager zu implantieren. Dabei ist die Implantation ins Fremdgewebe (ektop) technisch einfach und erlaubt sowohl Aussagen zu Charakteristika der Leitschienen hinsichtlich einer ausreichenden Porosität für die Gewebe- und Gefäßintegration (Fisher et al. 2002) als auch zu den verwendeten Zellen und deren Verhalten *in vivo*. Besonders eine Migration der Zellen in Gewebe und Organe des Wirts gilt es dabei auszuschließen (Schieker et al. 2004). Ferner ist eine mögliche Knochenneubildung nur durch die besiedelten Konstrukte und die Gefäßversorgung durch den Wirt bedingt (Schantz et al. 2002) und damit unabhängig von im Defekt freigesetzten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren

oder einer periostalen Knochenbildung (Kruyt et al. 2003; Dimitriou et al. 2005). Neben der üblichen subkutanen Implantation besteht außerdem die Möglichkeit die Konstrukte in Muskeln, im Peritoneum oder im Mesenterium zu platzieren (Ishaug-Riley et al. 1997). In einer Reihe von Studien konnte so eine Knochenneubildung beobachtet werden (Kruyt et al. 2007; Matsushima et al. 2009). Im Vergleich dazu konnten andere Arbeitsgruppen nach ektooper Implantation besiedelter Konstrukte zu keinem Explantationszeitpunkt eine Knochenneubildung nachweisen (Schieker et al. 2004; Seitz et al. 2007).

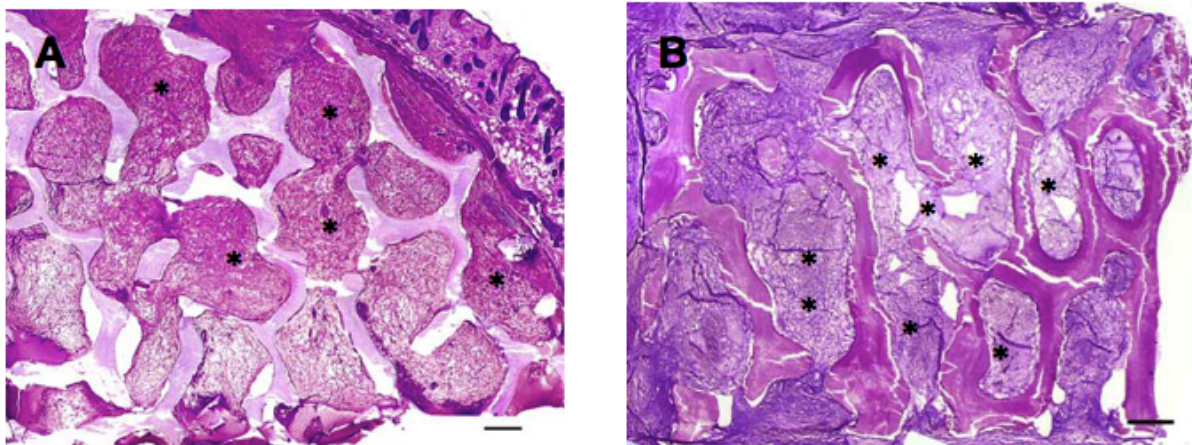


Abb. 2 Histologische Färbung (Paragon) besiedelter Leitschienen nach Explantation aus dem ektopten Lager: A – gut sichtbares Granulationsgewebe in der Leitschienenperipherie (*), B – flächige Nekrose ohne Demarkationsgrenze (*) (Seitz et al. 2007). Maßstabsbalken - 300 μm

Mögliche Ursachen stellen hierbei sowohl die Größe der gewählten Leitschienen aber auch die Anzahl der aufgetragenen Zellen dar. Bei zu groß gewählten Konstrukten kann aufgrund der kritischen Diffusionsstrecke von maximal 3,5 mm eine suffiziente Versorgung aller Zellen unter Umständen nicht gewährleistet werden (Kruyt et al. 2004). Auch die Verwendung von Zell-Matrix-Konstrukten mit zu geringer aber auch zu hoher Zelldichte kann sich negativ auf die Knochenneubildung auswirken (Kruyt et al. 2008; Lode et al. 2008). Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Leitschienen und verwendeter Zellarten jedoch nur bedingt möglich (Howard et al. 2008).

Nachteile der ektooper Implantation sind das Fehlen mechanischer Einflüsse auf das Konstrukt aber auch eine möglicherweise schlechte Durchblutung des gewählten Implantatlagers. Die Arbeitsgruppe um Hartman konnte jedoch keinen signifikanten

Unterschied zwischen subkutaner und intramuskulärer Implantation zeigen (Hartman et al. 2004).

Dem gegenüber steht die Implantation besiedelter Leitschienen in einen Defektbereich (sog. orthotope Implantation). Dazu eignet sich besonders ein Defekt kritischer Größe. Schmitz und Hollinger definierten diesen als kleinste intraossäre Läsion, die keiner Spontanheilung unterliegt und somit zu einer Pseudarthrose führt (Schmitz et al. 1986). Der *critical size defect* (CSD) wird in Tiermodellen üblicherweise im Bereich der Schädelkalotte oder den langen Röhrenknochen erzeugt. Dies ermöglicht an Röhrenknochen neben der Untersuchung osteokonduktiver und -induktiver Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien und Tissue Engineering Konstrukten auch die Beurteilung ihrer biomechanischen Eigenschaften (Goldstein 2002). Ein wichtiger Aspekt ist dabei die Verwendung adulter Versuchstiere mit geschlossenen Epiphysenfugen aufgrund des hohen Regenerationspotentials unreifer Knochen (Hollinger et al. 1990). Allerdings ist das CSD-Modell mit einem erheblich größeren operativen Aufwand verbunden. Zudem besteht im Bereich der langen Röhrenknochen die Notwendigkeit einer Fixation mit hoher Rigidität um mechanische Einflüsse auf die Knochenneubildung auszuschließen (Drosse et al. 2008; Zhao et al. 2009). Mehrere Arbeitsgruppen konnten so Knochenneubildung in besiedelten Konstrukten nachweisen und deren Vorteil gegenüber unbeimpften Kontrollen zeigen (Petite et al. 2000; Cancedda et al. 2003). Ein direkter Vergleich der Ergebnisse gestaltet sich aufgrund der verwendeten Fixationssysteme mit unterschiedlicher Rigidität jedoch schwierig.

Die Arbeitsgruppe um Kruyt konnte im Rahmen einer vergleichenden Studie bei ektoper Implantation eine gleichmäßige Verteilung des neugebildeten Knochens innerhalb des Konstrukts zeigen, was auf eine Osteogenese auf Basis der aufgebrachten Zellen schließen lässt. Dagegen war bei orthotoper Implantation eine Knochenneubildung nur im Kontaktbereich der Leitschiene mit dem Knochen zu beobachten und nur ein marginaler Vorteil gegenüber unbesiedelten Kontrollen nachweisbar. Eine zellbasierte Knochenneubildung war dabei nahezu nicht vorhanden (Kruyt et al. 2007). Eine mögliche Erklärung hierfür stellt eine größere Diffusionsstrecke sowie ein für das Überleben der Zellen ungünstiges Milieu aufgrund eines Hämatoms im Defektbereich dar (Street et al. 2000).

Im Gegensatz dazu konnte in mehreren Studien zur Knochenneubildung in Critical Size Defekten am Schädel eine signifikant höhere Knochenneubildung beim Einsatz

besiedelter Leitschienen im Vergleich zu unbesiedelten Konstrukten nachgewiesen werden (Degano et al. 2008; Dumas et al. 2009). Aufgrund der dort ablaufenden desmalen Ossifikation ist ein Vergleich mit Defektmodellen am lasttragenden Röhrenknochen jedoch ebenfalls nur eingeschränkt möglich.

Somit stellt die ektope Implantation eine einfache und schnelle Möglichkeit zur Beurteilung der Leitschienen und einer möglichen Knochenneubildung in Abwesenheit beeinflussender Faktoren aus dem Defektbereich dar. Als zweiter Schritt ist dann die aufwändigere Implantation ins orthotope Lager sinnvoll.

Insgesamt erwies sich in nahezu allen Studien die geringe Überlebensrate der auf die Leitschienen aufgetragenen Zellen als problematisch. Eine adäquate zellbasierte Knochenneubildung war daher nur eingeschränkt möglich. Mögliche Ursachen hierfür stellen sowohl zu groß gewählte Leitschienen mit einer Diffusionsstrecke von mehr als 3,5 mm aber auch eine unzureichende Neoangiogenese dar (Schieker et al. 2004; Seitz et al. 2007). Diese kann jedoch durch den Einsatz von vaskulär-endothelialelem Wachstumsfaktor (VEGF) stimuliert werden (siehe Abb. 3). Hierbei handelt es sich um ein wichtiges Signalmolekül der Vaskulo- und Angiogenese, welches unter anderem die Teilung und Migration von Endothelzellen stimuliert (Ferrara et al. 2001). Durch Applikation von VEGF vor Implantation der besiedelten Konstrukte kann daher eine verbesserte Vaskularisierung der Leitschienen *in vivo* erzielt werden (Kaigler et al. 2006; Kempen et al. 2009).



Abb. 3 Dreidimensionale Struktur von VEGF (Bildquelle: www.3dchem.com)

1.3. Nachweis von artfremden Zellen

Große Bedeutung kommt beim Tissue Engineering auch dem Nachweis der verwendeten Zellen zu. Dies gilt sowohl für das Überleben der Zellen auf den Leitschienen *in vivo* als auch für deren Verbleib am Implantationsort, um ein unerwünschtes Zellwachstum in Geweben des Wirts ausschließen zu können. Im Rahmen tierexperimenteller Studien konnte nämlich gezeigt werden, dass es nach intravenöser Applikation von humanen mesenchymalen Stammzellen zu einer Absiedlung in verschiedenen Organsystemen des Empfängers kommt (Cancedda et al. 2003). Nach Implantation besiedelter Leitschienen ins ektope Lager konnte eine Zellmigration bisher aber nicht nachgewiesen werden (Schieker et al. 2004). Verschiedene Nachweismethoden unterschiedlicher Sensitivität finden hierfür heute Anwendung.

Einen verbreiteten Ansatz stellt die *in situ* Hybridisierung dar. Dabei macht man sich für die verwendete Zellart oder Spezies spezifische DNA-Abschnitte bekannter Basensequenzen zu nutze. Nach Denaturierung der DNA-Doppelstränge der Probe erfolgt deren Hybridisierung mit zuvor radioaktiv oder mit Fluoreszenzfarbstoff markierter, zu den spezifischen Abschnitten komplementärer Einzelstrang-DNA. Mit

Hilfe entsprechender Detektoren oder Mikroskope ist somit ein Nachweis der verwendeten Zellen im Fremdgewebe möglich (Solomon et al. 1999).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit genetisch modifizierte Zellen zu verwenden. Durch eine Erweiterung des Genoms durch Luciferase- oder GFP-Gene kommt es zu einer Lumineszenz oder Fluoreszenz der Zellen und ermöglicht so eine Abgrenzung zum umgebenden Gewebe. Besonders hervorzuheben ist dabei der mögliche Nachweis im lebenden Organismus (Jenkins et al. 2003). Beide oben genannten Methoden eignen sich zum Zellenachweis bei gleichzeitiger Fragestellung nach der Lokalisation der Zellen innerhalb der Leitschiene bzw. der Organe. Eine systematische Quantifizierung ist jedoch nur eingeschränkt möglich.

Ein weiteres sehr verbreitetes Verfahren stellt die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction = PCR) dar. Dabei handelt es sich um ein zyklisches Verfahren zur millionenfachen Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte. Diese stehen dann für weitere Analysen zu Verfügung. Als Vorbild dafür fungierte der natürliche Replikationsprozess doppelsträngiger DNA. Neben den aus thermophilen Bakterien isolierten, hitzestabilen DNA-Polymerasen (Taq-Polymerase) sind auch eine Lösung mit den vier Nukleotiden (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und zwei sequenzspezifische oligonukleotide Einzelstränge (Primer) notwendig. Die Primer dienen dabei der beiderseitigen Eingrenzung der zu amplifizierenden Sequenz und fungieren gleichzeitig als Startbaustein für die Replikation. Spezielle Pufferlösungen stellen eine geeignete chemische Umgebung sicher.

Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 12–50 Zyklen, die jeweils in drei Stufen in einem Thermocycler ablaufen. Während der initialen Denaturierung kommt es aufgrund einer Erhitzung auf 95°C zur Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen und somit zum Auseinanderweichen der Doppelstränge. Im nächsten Schritt wird die Temperatur auf 50 – 65°C abgesenkt, um eine Anlagerung der Primer zu ermöglichen. Die genaue Temperatur wird dabei meist knapp unterhalb der Schmelztemperatur der Primer gewählt, um eine größtmögliche Spezifität des Produkts zu gewährleisten. Durch die Taq-Polymerase erfolgt im dritten Schritt bei 72°C die Synthese des komplementären Strangs durch Anlagerung der Nukleotide. Aufgrund der zyklischen Wiederholung dieser Schritte kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der gewünschten Sequenz (Haras et al. 1994).

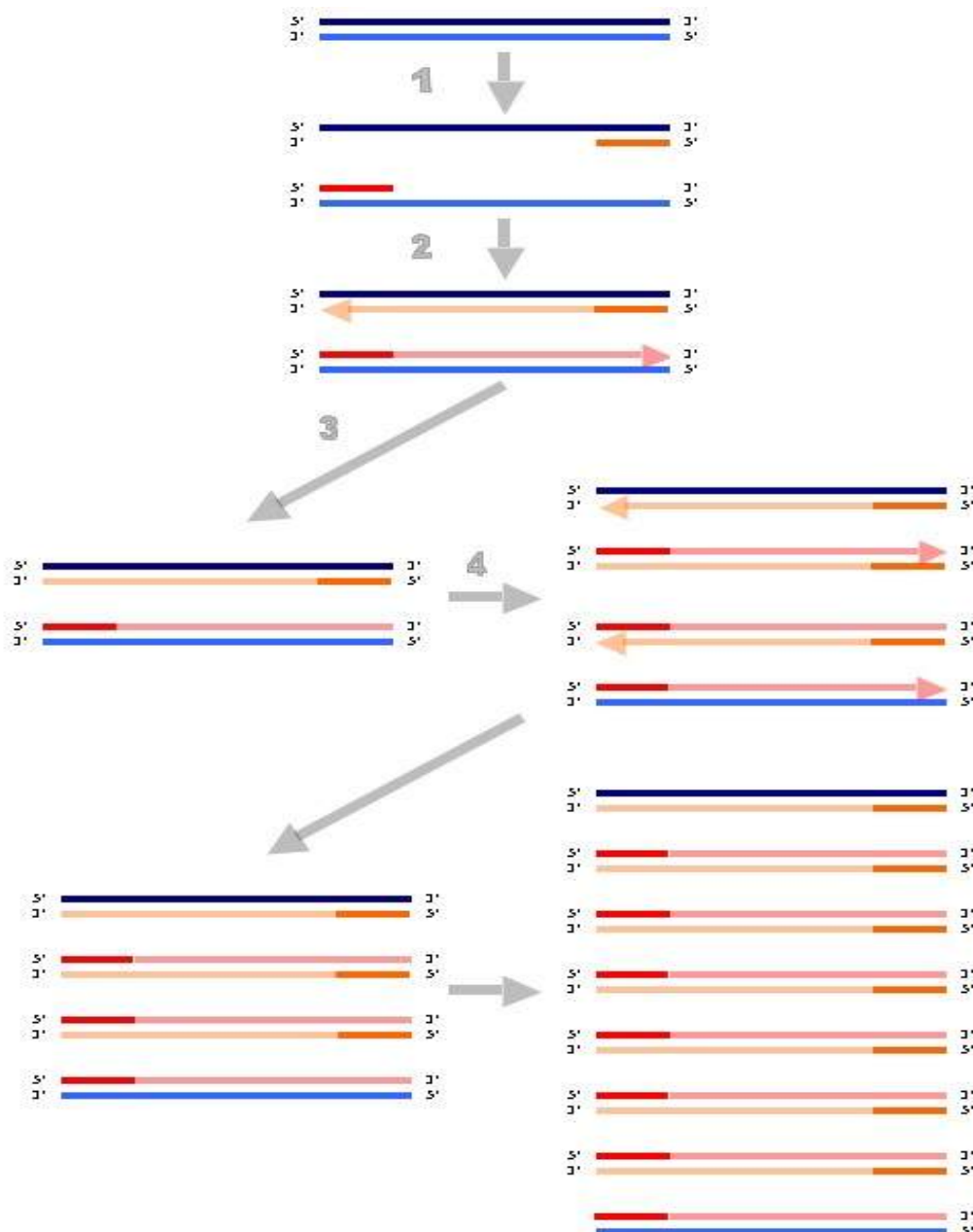


Abb. 4 Reaktionszyklen PCR - Übersicht: 1. Denaturierung des DNA Doppelstrangs und Annealing der Primer, 2. Bindung der Taq-Polymerasen und Elongation, 3. und 4. Wiederholung der Schritte 1. und 2. mit exponentieller Amplifikation (Nussbaum et al. 2001)

Auf diese Weise ist es je nach Fragestellung möglich ganze Gene, Teile eines Gens oder aber auch nicht-kodierende DNA-Abschnitte millionenfach zu vervielfältigen. Um transplantierte Zellen im Wirtsgewebe sicher nachweisen zu können muss ein Primerpaar gewählt werden, welches für eine DNA-Sequenz kodiert, die nur auf den gesuchten Zellen vorkommt. Eine Möglichkeit besteht dabei in der Wahl von männlichen Spenderzellen und einem weiblichen Versuchstier (sog. sex-mismatch Transplantation). Durch den Einsatz von an Y-chromosomale DNA-Abschnitte

bindenden Primern ist ein sicherer Nachweis der Fremdzellen möglich, da die Wirtszellen kein Y-Chromosom enthalten (Muramatsu et al. 2002; Yu et al. 2009).

Da das eukaryotische Genom zu einem nicht unerheblichen Teil aus nicht-kodierenden, repetitiven Sequenzen unterschiedlicher Länge besteht, können auch diese Abschnitte durch den Einsatz entsprechender Primer für einen spezifischen Nachweis herangezogen werden. Diese enthalten Varianten oder Polymorphismen, welche charakteristisch für ein Individuum sind (Naidoo et al. 1998). So werden in der Forensik bereits routinemäßig Oligonukleotide aus der Klasse der *short tandem repeats* (STR) oder die etwas längeren Minisatelliten (10–100Bp) zur Erstellung von genetischen Fingerabdrücken verwendet (Raina et al. 2002). Auch die längeren Alpha-Satelliten (172-178Bp) gehören zur repetitiven DNA und befinden sich im Bereich der Zentromeren. Die Arbeitsgruppe um Becker konnte zeigen, dass diese Abschnitte speziesspezifisch sind und so ein Primerpaar etablieren, das einen sensitiven Nachweis humaner Zellen in murinem Gewebe ermöglicht (Becker et al. 2002). Die hohe Sensitivität ist dabei auf die bis zu tausendfache Wiederholung dieser Sequenz innerhalb der DNA von nur einer Zelle zurückzuführen. Durch die exponentielle Amplifikation im Rahmen der PCR steht so eine erheblich größere Menge gebildeter DNA-Sequenzen für den weiteren Nachweis zur Verfügung als bei Vervielfältigung eines nur singular auf der DNA vorkommenden Abschnitts.

Mit der herkömmlichen PCR ist allerdings nur ein qualitativer bzw. semiquantitativer Nachweis einer gesuchten Nukleinsäuresequenz möglich. Zur Quantifizierung isolierter DNA-Abschnitte wird daher eine modifizierte Art der PCR, die sog. Real-Time PCR (RT-PCR), eingesetzt. Klinisch findet dieses Verfahren bereits routinemäßig für die Quantifizierung von Mikroorganismen im Blut oder in der Hämatologie zur Chimärzellbestimmung nach allogener Knochenmarkstransplantation Verwendung (Smith et al. 2007).

Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen, die während eines PCR-Zyklus durchgeführt werden (Bustin et al. 2005). Dazu werden fluoreszierende Farbstoffe während der Elongationsphase in die DNA eingebaut, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe um ein vielfaches ansteigt. Es besteht somit eine Korrelation zwischen der Zunahme der Target-DNA und der Fluoreszenzintensität von Zyklus zu Zyklus. Am Ende der Elongation erfolgt in jedem Zyklus die Fluoreszenzmessung. Aufgrund der begrenzten Template-Menge in der ersten Phase der Amplifikation ist eine optimale exponentielle Vervielfältigung nur bedingt

möglich. Ähnlich verhält es sich in der dritten Phase, in der es durch die hohe Anzahl von Produkten zu einer gegenseitigen Hemmung, zur Hybridisierung von Produktfragmenten, zu einem langsamen Verbrauch der Substrate und letztlich zu einer Schädigung der Polymerasen und Nucleotide durch die Hitze kommt. Eine exponentielle und damit auch quantifizierbare Amplifikation findet sich somit nur in der zweiten Phase. Um den Anfang dieser exponentiellen Phase zu bestimmen wird häufig der CT-Wert (Cycle Threshold = Schwellenwert-Zyklus) ermittelt. Dieser beschreibt den Zyklus, in dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Das heißt, dass der CT-Wert bei einer geringen Template-Menge höher ist als bei einer großen Ausgangsmenge.

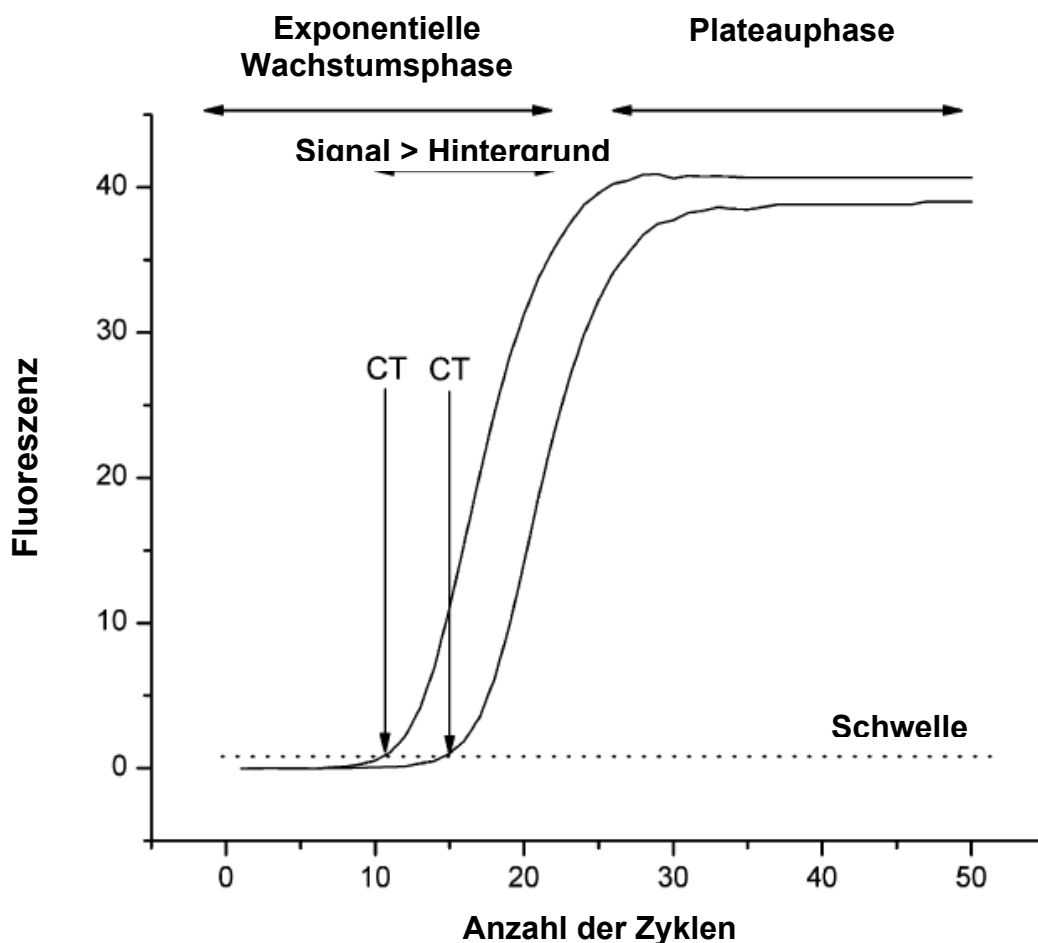


Abb. 5 Übersicht über die quantitative PCR (nach Kubista et al. 2006)

Die absolute Quantifizierung unbekannter Probenmengen wird anhand einer Standardkurve durchgeführt. Diese basiert auf einer Verdünnungsreihe, welche exakt

definierte Mengen der Zielsequenz enthält. Dazu wird die Anzahl der Zyklen gemessen bis jeder Standard ein definiertes Fluoreszenzniveau in der exponentiellen Phase erreicht. Die Anzahl ist abhängig von der jeweiligen Ausgangsmenge und wird als *Crossing Point* (CP) bezeichnet. Am jeweiligen CP weisen somit alle Standards ein identisches Fluoreszenzniveau und daher die gleiche Menge neu synthetisierter DNA auf. Aus den ermittelten CP Werten und den bekannten Ausgangsmengen kann dann eine Standardkurve konstruiert werden (Kubista et al. 2006).

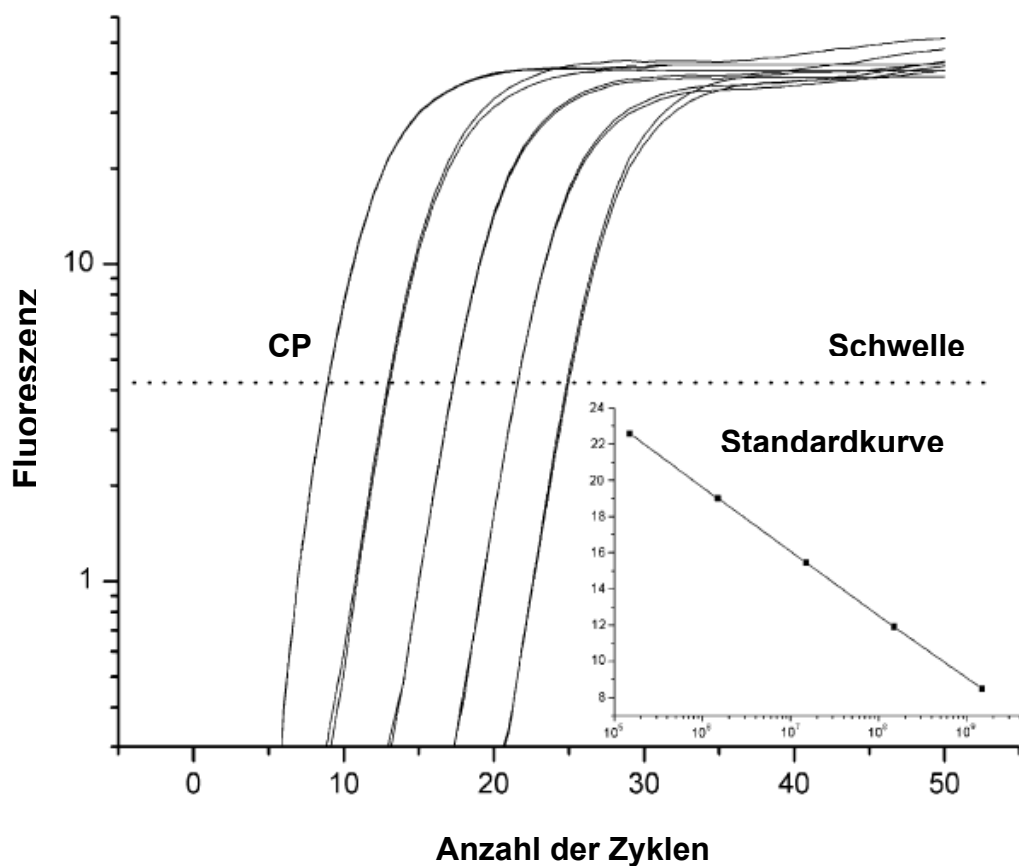


Abb. 6 Übersicht über die Ermittlung einer Standardkurve (nach Kubista et al. 2006)

Anhand dieser Standardkurve können dann die unbekanntenen Ausgangsmengen der zu analysierenden Proben ermittelt werden.

1.4. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Einfluss von osteogener Stimulation und VEGF auf die Knochenneubildung besiedelter Konstrukte *in vivo* zu untersuchen. Insgesamt waren hierzu vier wesentliche Schritte von Bedeutung:

1. Zunächst sollten humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) *in vitro* kultiviert und nach Stimulation in Richtung osteoblastärer Kaskade auf Hydroxylapatit-Leitschienen aufgebracht werden.
2. Anschließend war die operative Implantation der besiedelten und zum Teil mit VEGF versetzten Leitschienen in athymen Nacktmäuse vorgesehen. Nach 2 und 12 Wochen sollten die Euthanasie der Versuchstiere sowie die Explantation sowohl der Konstrukte als auch der Organe erfolgen.
3. Die entnommenen Organe sollten nun mittels PCR molekularbiologisch analysiert werden, um eine mögliche Migration der transplantierten Zellen in das umliegende Gewebe und die Organe der Versuchstiere auszuschließen.
4. Auch die explantierten Leitschienen sollten einer molekularbiologischen Auswertung zugeführt werden, um sowohl das Überleben der auf die Leitschienen aufgebrachten Zellen über beide Implantationszeiträume zu verifizieren als auch diese mittels RT-PCR zu quantifizieren.

Die histologische Untersuchung der Konstrukte wurde im Rahmen einer separaten Dissertation durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Humane mesenchymale Stammzellen

In Vorgängerarbeiten zur zugrunde gelegten Fragestellung erwiesen sich kommerziell erhältliche humane Mesenchymale Stammzellen (hMSC) der Firma Camrex (New Jersey, USA) als gut geeignet. Die Gewinnung erfolgte unter standardisierten Bedingungen mittels Dichtengradientenzentrifugierung aus Knochenmarksaspirat gesunder weißer Spender. Der Nachweis, dass es sich um mesenchymale Stammzellen handelt konnte durch eine Überprüfung spezifischer Oberflächenmarker und Differenzierbarkeit in adipogene, chondrogene sowie osteogene Richtung geführt werden (Pittenger et al. 1999).

2.1.1.1. Kulturbedingungen und Medien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte adhärent als Monolayer in T75-Zellkulturflaschen bei 37°C in einem Inkubator bei einer CO₂-Konzentration von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90%. Hierfür, ebenso wie für die Kultivierung der Leitschienen wurde Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) verwendet, bestehend aus:

MSCGM Bulletkit® (Fa. Camrex):

- Mesenchymal stem cell basal medium	440 ml	
- Fetal bovine serum (FBS)	50 ml	10% (v/v)
- L-Glutaminlösung 200mM	10 ml	2 mM
- Penicillin/Streptomycin	0,5 ml	0,5U/ml / 0,05 µg/ml

Die Durchführung aller nachfolgend beschriebenen Arbeiten erfolgte auf einer Sterilbank mit kontinuierlich laminarem Luftstrom. Nach Aussaat von etwa 3000

Zellen pro Quadratzentimeter in oben genannten Kulturflaschen wurde dreimal pro Woche ein Mediumwechsel sowie bei Erreichen einer ca. 80%igen Konfluenz eine Passagierung durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 3ml *phosphate buffered saline* (PBS; w/o Ca²⁺, w/o Mg²⁺) durch Schwenken der Kulturflasche gespült, um eine Inaktivierung des Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) im nächsten Schritt durch verbliebenes Medium zu vermeiden. Daraufhin wurde das PBS abgesaugt und 2ml Trypsin/EDTA zugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch leichtes Beklopfen der Flasche wurde die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden unterstützt. Nach mikroskopischer Kontrolle und gegebenenfalls Verlängerung der Inkubationszeit um wenige Minuten (max. 15 min) bis zur vollständigen Ablösung aller Zellen erfolgte die Inaktivierung des Trypsin/EDTA durch Zugabe von 3ml Kulturmedium. Die so entstandene Zellsuspension konnte, nach Abnehmen von 10µl zur Zellzählung mittels einer Neubauer-Zählkammer (s.u.), nun zur Besiedlung der Leitschienen beziehungsweise Weiterkultivierung in Kulturflaschen verwendet werden. Das PBS wurde auf Raumtemperatur, alle anderen Medien auf 37°C vorgewärmt. Für alle Versuche wurden hMSCs in der 5. Passage verwendet.

2.1.2. Mausfibroblasten

Für die Herstellung der Kontrollen für die molekularbiologische Auswertung fanden murine Zellen der Zelllinie MC3T3-E1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DMSZ) Verwendung. Diese wurden aus der Schädeldecke von Mausembryonen der Gattung/Spezies C57BL/6 gewonnen.

2.1.2.1. Kulturbedingungen und Medien

Analog zu den hMSCs erfolgte die Kultivierung adhärent als Monolayer in T75-Zellkulturflaschen in einem Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ Konzentration und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 %. Das verwendete Kulturmedium setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen.

Kulturmedium für Mausfibroblasten:

- Alpha-MEM mit Glutamax I	443 ml	
(+Ribonukleotid + Desoxyribonukleotid)		
- Fetal bovine serum (FBS)	50 ml	10% (v/v)
- L-Glutaminlösung 200mM	10 ml	2 mM
- Penicillin/Streptomycin	2 ml	20 U/ml / 20 µg/ml

Alle nachfolgenden Arbeiten wurden auf einer Sterilbank durchgeführt. Nach Aussaat von ca. 3000 Zellen pro Quadratzentimeter wurden die Zellen in oben genanntem Inkubator kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche und bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 70 – 80 % wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde initial das Kulturmedium entfernt und der Zellrasen mit 3 ml PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurden 2 ml Trypsin/EDTA aufpipettiert und die Flasche für 4 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Inkubation für weitere 4 Minuten bei Raumtemperatur fortgeführt. Die Ablösung der Zellen vom Boden wurde durch leichtes Beklopfen der Flasche unterstützt und regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Durch Zugabe von 3 ml Kulturmedium erfolgte die Inaktivierung des Trypsins. Nach Überführung der Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen erfolgte eine Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer (s.u.). Die Zellen konnten nun zur Weiterkultivierung oder zur Herstellung von 1- und 10-Zell-Kontrollen verwendet werden.

2.1.3. Zellzählung

Die zahlenmäßige Erfassung der Zellen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit, wie bereits erwähnt, mittels einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden beide Außenstege der Zählkammer mit destilliertem Wasser leicht angefeuchtet und dann das Deckglas von vorne aufgeschoben. Durch die Ausbildung von Interferenzlinien (Newton'sche Ringe) konnte die korrekte Lage des Deckglases überprüft werden. Nun wurden 10 µl der Zellsuspension mit 5 µl Trypanblau versetzt und vermengt. Hiervon wurde nun ein Tropfen durch die Kapillarwirkung zwischen Kammer und

Deckglas eingebracht. Nach Auszählung aller vier Quadranten unter einem Mikroskop bei zehnfacher Vergrößerung konnte die Zellkonzentration pro 1 ml mit folgender Formel berechnet werden.

$$\left(\frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{4}\right) * \left(\frac{\text{Volumen Zellprobe ()} + \text{Volumen Trypanblau ()}}{\text{Volumen Zellprobe ()}}\right) * 10000$$

Die Gesamtzellzahl errechnete sich durch Multiplikation des Ergebnisses mit der gesamten Suspensionsmenge (in ml).

2.1.4. Isolierung einzelner Zellen (single cell picking)

Zur Herstellung der für die Polymerase Chain Reaction (s.u.) benötigten 1- und 10-Zell-Kontrollen wurden mittels einer Pipette unter mikroskopischer Aufsicht einzelne Zellen isoliert. Hierzu wurden kultivierte hMSCs trypsinisiert und mit PBS im Verhältnis 1:25 verdünnt. In einer Petrischale erfolgte die weitere Verdünnung von 1 ml des Zellgemischs mit 4 ml PBS. Nach Platzierung der Petrischale unter dem Objektiv des Mikroskops wurde das Sichtfeld auf einen zuvor auf der Unterseite der Petrischale zur Orientierung angebrachten Punkt fokussiert. Durch leichtes Schwenken der Schale wurden einzelne nicht adhärenente Zellen in die Nähe der Markierung gelenkt, um so mit einer 10 µl Pipette langsam aufgesogen zu werden. Zuvor musste durch eine leichte Bewegung des Gefäßes festgestellt werden, ob bereits eine Adhärenz der Zelle am Boden besteht, um eine Beschädigung der Zellmembran zu vermeiden. Die isolierte Zelle wurde anschließend in ein vorbereitetes Eppendorf Röhrchen überführt. Zur Herstellung der 10-Zell-Kontrollen wurde dieser Vorgang insgesamt zehn Mal durchgeführt.

Aufgrund des schnellen Anhaftens der Zellen am Boden der Petrischale musste nach 10 Minuten eine neue Zellsuspension hergestellt werden, da der Anteil an nicht adhärenenten Zellen dann zu gering wurde.

2.2. Tierversuche

2.2.1. Leitschienen

Als Leitschienen diente bovine Spongiosa (Tutobone®) der Firma Tutogen Medical GmbH (Neunkirchen am Brand, Deutschland). Die Herstellung der würfelförmigen Konstrukte (Kantellänge 3 mm) aus boviner Spongiosa erfolgte nach einem von der Firma Tutogen Medical patentierten Verfahren, welches unter anderem die Entfernung antigener Komponenten aus dem Geweben, die Inaktivierung von Viren und Prionen sowie die Sterilisierung mit Gammastrahlung beinhaltet.

2.2.2. Besiedlung

Um eine bessere Adhärenz der hMSCs zu erreichen wurde eine Vorinkubation der Leitschienen durchgeführt. Hierzu wurden die Konstrukte steril in eine 48-Well Platte überführt, vollständig mit MSCGM bedeckt und für 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch FBS ersetzt. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von etwa 12 Stunden.

Die Zellen wurden, wie bereits oben beschrieben, passagiert und gezählt sowie nach Absaugen des Vorinkubationsmediums der Leitschienen in einer hochkonzentrierten Suspension ($1,1 \times 10^6$ Zellen in 660 μ l Medium) auf diese aufgebracht. Zur Erhöhung der Besiedlungseffizienz wurde die Leitschiene in den ersten zwei Stunden alle 20 min gewendet, die Zellsuspension resuspendiert und erneut auf das Konstrukt aufgebracht. In den folgenden zwei Stunden erfolgte diese Prozedur stündlich. Nach weiteren zwei Stunden wurden die besiedelten Tutobones in eine neue 48-Well Platte überführt und über Nacht inkubiert. Zur Ermittlung der Inokulationseffizienz erfolgte die getrennte Auszählung der in jedem Well verbliebenen Zellen.

2.2.3. Kultivierung der Leitschienen

Die Kultivierung der besiedelten Tutobones erfolgte je nach Gruppe für 14 Tage im Brutschrank in MSCGM oder Medium zur osteogenen Stimulation, welches aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt war:

Medium zur osteogenen Stimulation:

- DMEM high glucose Medium	88,4 ml	
- Fetal bovine serum (FBS)	10 ml	10 % (v/v)
- Penicillin/Streptomycin	0,4 ml	40 IU/ml
- Dexamethason	0,2 ml	100 nM
- β -Glycerophosphat	0,6 ml	10 mM
- L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	0,4 ml	50 μ M

Die einzelnen Bestandteile wurden getrennt angesetzt und das fertige Medium vor der Verwendung steril filtriert.

Ein Mediumwechsel wurde dreimal wöchentlich durchgeführt.

Unmittelbar vor der Implantation wurde auf die dafür vorgesehenen Leitschienen rekombinanter muriner vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF, Fa. PeproTech, Hamburg, Germany) aufgebracht, um eine bessere Vaskularisierung der Konstrukte *in vivo* zu erreichen. Dieser wurde initial mit *Aqua dest.* auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml und dann mit PBS weiter auf eine Endkonzentration von 16 ng/ μ l verdünnt, wovon auf jede Leitschiene 50 μ l aufpipettiert wurden.

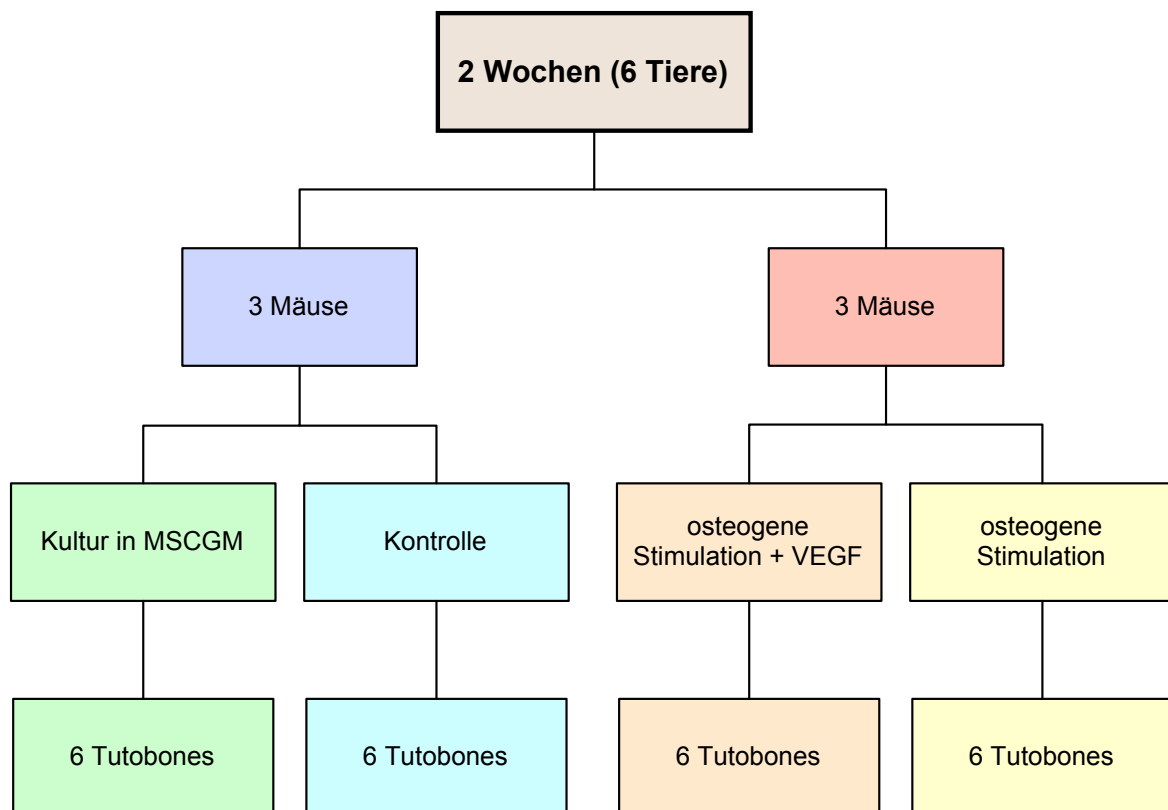
2.2.4. Kontrollgruppe

Die Konstrukte der Kontrollgruppe wurden wie oben beschrieben vorinkubiert, dann jedoch ohne Besiedlung mit hMSCs für zwei Wochen in MSCGM kultiviert.

2.2.5. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten athym, nu/nu Nacktmäuse (männlich, 4 – 6 Wochen) der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Germany). Die Identifizierung der Tiere erfolgte anhand unmittelbar nach der Lieferung angebrachter Ohrmarkierungen.

Der Tierversuch wurde durch die Tierversuchskommission der Regierung von Oberbayern genehmigt.



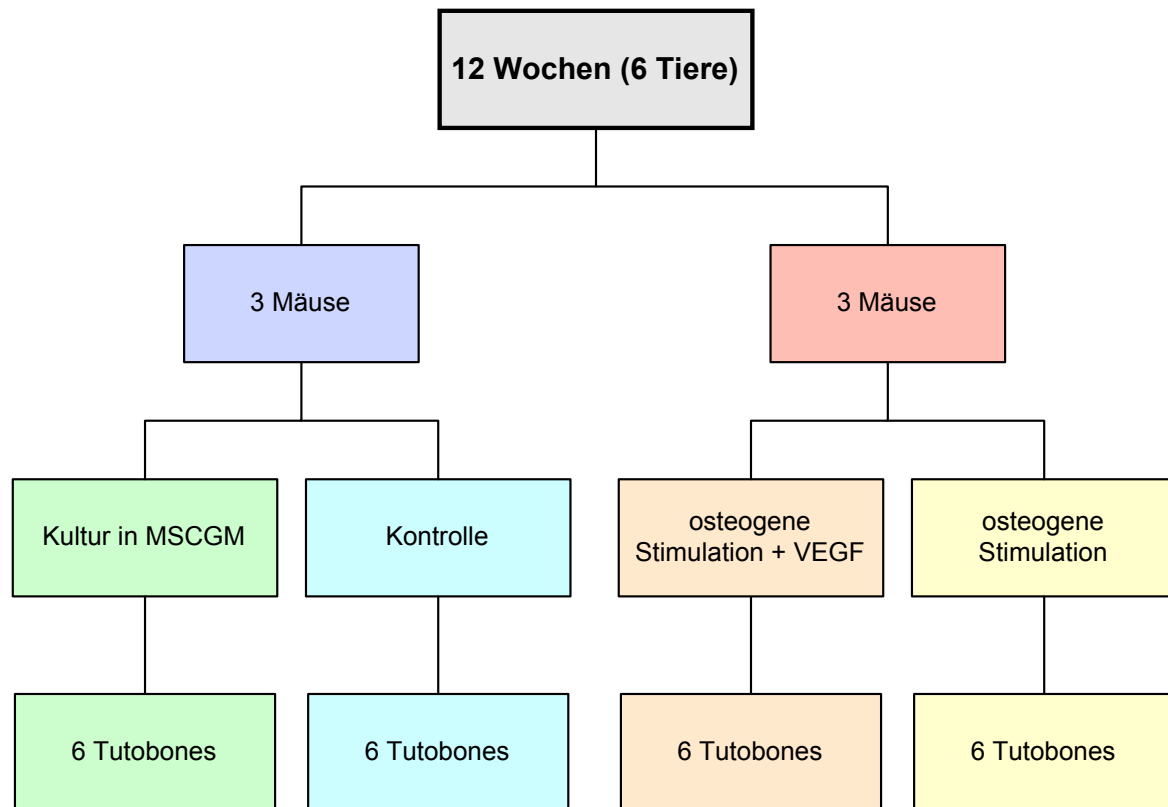


Abb. 7 Schematische Darstellung der Tierversuche

2.2.6. Implantation der Leitschienen

2.2.6.1. Anästhesie

Die Anästhesie der Versuchstiere erfolgte gewichtsadaptiert (2,5 ml/kg Körpergewicht) mittels einer Narkoselösung, bestehend aus 0,025 mg Fentanyl/ml, 2,5 mg Dormicum/ml und 0,05 mg Dormitor/ml. Diese wurde intramuskulär in die Streckseite des linken Hinterlaufs (M. semimembranosus, M. semitendinosus) appliziert.

Als Antidot wurde eine Lösung aus 3 ml Naloxon (0,4 mg/ml), 5 ml Flumazenil (0,1 mg/ml) und 0,5 ml Antisedan (5 mg/ml) hergestellt, welche ebenfalls gewichtsadaptiert (8,5 ml/kg Körpergewicht) intramuskulär injiziert wurde.

2.2.6.2. Implantation

Die Fixierung der Mäuse erfolgte auf einer Sterilbank in Bauchlage mit Klebestreifen über den vier Extremitäten. Eine mit Zellstoff bezogene Styroporplatte diente zur Wärmeisolation.

Initial wurde die Rückenhaut über den Processi spinosi kranialwärts über eine Länge von 2,5 cm eröffnet. Danach erfolgte die stumpfe Präparation von jeweils zwei paravertebralen, subkutanen Taschen mit einer Präparationsschere. Nun wurden die Leitschienen wie in Abbildung 2 dargestellt in die vorpräparierten Taschen implantiert. Nach kontaminationsfreier Platzierung aller vier Tutobones erfolgte eine Kontrolle auf die korrekte Lage der Konstrukte sowie der Wundverschluß mittel Einzelknopfnah. Als Nahtmaterial diente Vicryl 3/0 SH bzw. Vicryl 4/0.

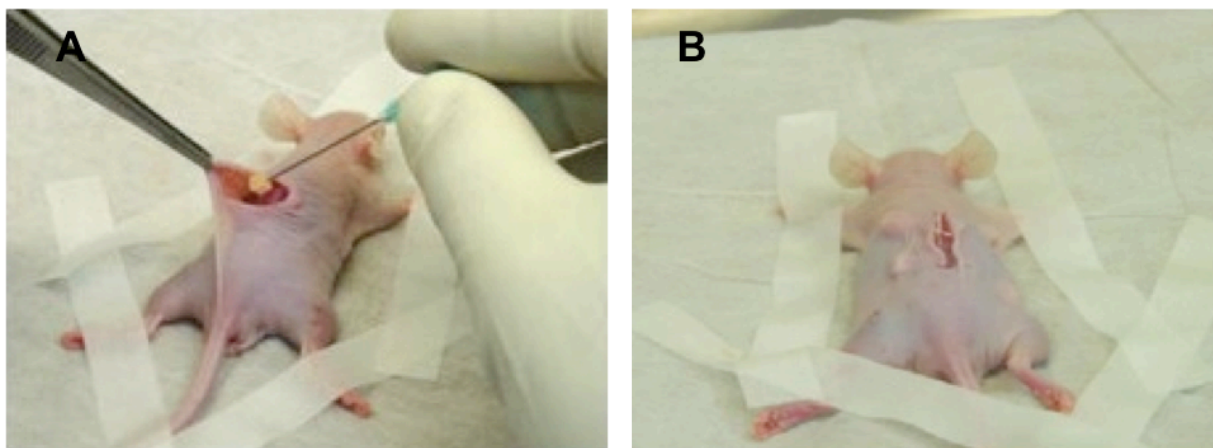


Abb. 8 Implantation der Leitschienen: (A) Einbringen der Leitschienen in die subkutanen Taschen, (B) 4 Tutobones subkutan, paravertebral vor Wundverschluß

Postoperativ wurde den Versuchstieren nuchal 0,05 ml Tramal subkutan zur Analgesie verabreicht. Anschließend erfolgte die intramuskuläre (M. semimembranosus, M. semitendinosus) Applikation des Antidots in oben beschriebener Dosierung. Nach etwa 10 Minuten wurden die Tiere einer orientierenden klinischen Untersuchung unterzogen. Alle Mäuse erschienen postoperativ aktiv und weitestgehend schmerzfrei.

Bei allen Operationen wurde ausschließlich steriles Instrumentarium verwendet.

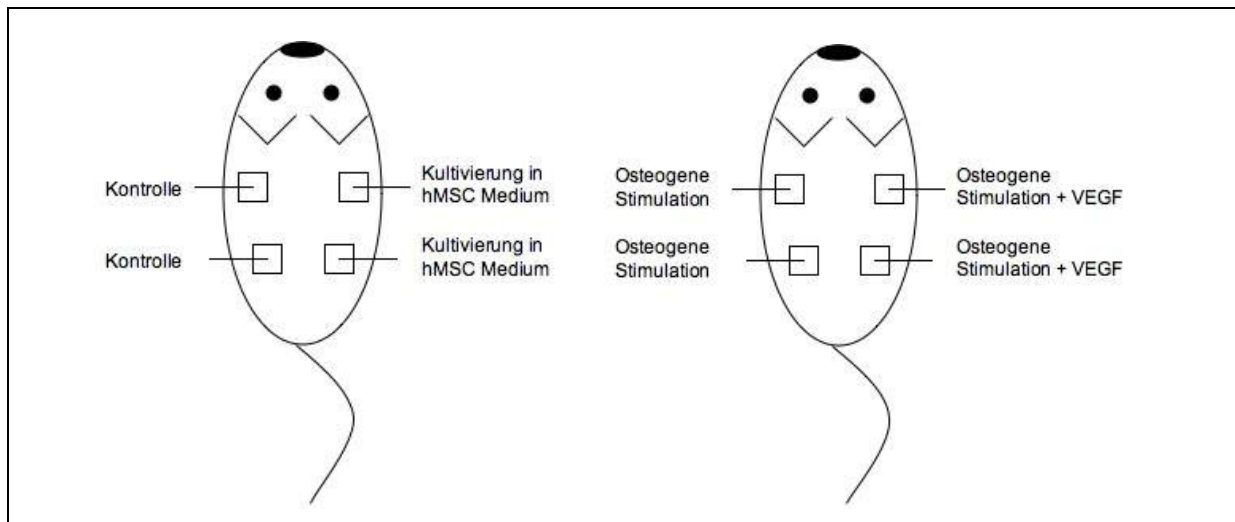


Abb. 9 Schematische Darstellung der Position der Leitschienen *in vivo* ohne und mit Stimulation (Implantationsdauer jeweils 2 und 12 Wochen)

2.2.6.3. Explantation und Organentnahme

Nach zwei, respektive zwölf Wochen erfolgten die Explantation der Konstrukte sowie die Entnahme von Organen und Blut. Die Anästhesie sowie die Fixierung der Tiere wurden analog zur Implantation durchgeführt. Zunächst erfolgte die Wiedereröffnung der Rückenhaut im Bereich der bei allen Tieren reizlosen Narbe. Um eine kontaminationsfreie Explantation der Kontrollen zu gewährleisten wurden diese zuerst entfernt. Daraufhin wurden die besiedelten Leitschienen explantiert. Das den Implantaten dorsal angelegene Haut- und ventral angelegene Muskelgewebe (M. latissimus dorsi) wurde hierbei ebenfalls exzidiert. Jeweils eine Leitschiene wurde dabei für die molekularbiologische Aufarbeitung konserviert, die verbleibenden zwei Tubobones wurden jeweils halbiert und für die histologische beziehungsweise immunhistochemische Auswertung vorbereitet.

Nach erfolgreicher Entnahme der Leitschienen erfolgte die Euthanasie der Tiere durch eine gezielte Frakturierung der Halswirbelsäule durch Fixation im Nacken und gleichzeitigem Zug am Schwanz. Nun konnte, nach Umlagerung in Rückenlage, durch eine kardiale Punktion mit einer 1 ml Spritze mit 50 μ l EDTA eine Blutprobe (0,8 – 1,0 ml) gewonnen werden. Nach Eröffnung der Bauchhöhle und des Brustkorbs durch einen ventromedianen Hautschnitt sowie Durchtrennung des Brustbeins mit einer Präparierschere wurden Herz, Lunge, Leber, Milz sowie Hoden entnommen. Weiterhin erfolgte nach Eröffnung der Schädelkalotte die Entnahme des

Gehirns. Alle entnommenen Proben und Organe wurden sofort in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Bis zu weiteren Aufarbeitung wurden alle Proben bei -80°C gelagert.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Isolation der DNA

Die Isolation der DNA aus den entnommenen Gewebeproben, Leitschienen sowie den kultivierten Zellen erfolgte mittels DNeasy Blood and Tissue Kit der Firma Qiagen (Hilden, Germany). Die chemische Zusammensetzung der hierbei verwendeten Pufferlösungen ist vom Hersteller nicht näher bezeichnet.

Die aus dem Gefrierfach (-80°C) entnommenen Organe und Leitschienen wurden bis zur Verarbeitung auf Eis gelagert um eine etwaige Autolyse zu verhindern. Nach einer Gewichtsbestimmung mittels einer Präzisionswaage wurden die Organe auf einer mit autoklavierter Alufolie abgedeckten Arbeitsfläche mit einem Skalpell zerkleinert, in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und erneut gewogen. Die Verarbeitung der Tubobones erfolgte stets ohne deren Zerkleinerung. Abhängig von Probenmaterial und Gewicht wurde nun die entsprechende Menge an Proteinase K (600 mAU/ml) und einer Pufferlösung (ATL) hinzugefügt. Nach ausführlicher Mischung mit einem Vortex-Vermenger wurden alle Proben in einem *Hybridizer* platziert und bis zur vollständigen Analyse über Nacht inkubiert.

Vom so gewonnenen Organlysat wurden $230\ \mu\text{l}$ entnommen und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von $4\ \mu\text{l}$ RNase A folgte eine Inkubation von 2 Minuten bei Raumtemperatur.

Vom langsam bei Raumtemperatur aufgetauten EDTA-Blut wurden $100\ \mu\text{l}$ entnommen, mit $20\ \mu\text{l}$ Proteinase K versetzt und mit PBS auf ein Gesamtvolumen von $220\ \mu\text{l}$ aufgefüllt. Nach Zugabe von $4\ \mu\text{l}$ RNase A folgte ebenfalls eine Inkubation von 2 Minuten bei Raumtemperatur.

Bei den kultivierten Zellen wurden zunächst eine Zählung sowie eine Trypsinierung vorgenommen. Draufhin wurden diese in $200\ \mu\text{l}$ PBS resuspendiert und nach Zugabe

von 4 µl RNase A wie die übrigen Proben für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Erst dann erfolgte die Zugabe von 20 µl Proteinase K.

Im weiteren Verlauf wurden alle Proben mit 200 µl AL-Pufferlösung versetzt und in einem Heizblock bei 70°C für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol und gründlicher Mischung mittels Vortex-Mixer zu einer homogenen Lösung wurde diese auf die Membran einer in einem Auffanggefäß platzierten DNeasy Isolierungssäule pipettiert und zentrifugiert (8000 Umdrehungen/min, 1 min, RT). Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule in einem neuen Auffanggefäß platziert. Nun konnten 500 µl eines Waschpuffers (AW 1) auf die Membran aufgebracht und der oben beschriebene Zentrifugationsschritt wiederholt werden. Nach abermaligem Verwerfen des Durchlaufs wurde die Säule in einen neuen Auffangbehälter platziert und eine weitere Waschpufferlösung (AW 2) auf die Membran aufgebracht. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (13000 Umdrehungen/min, 3 min, RT). Die nun gereinigte DNA wurde im letzten Schritt mit zunächst 100 µl AE-Pufferlösung nach 1 Minute Inkubationszeit mittels Zentrifugation (8000 Umdrehungen/min, 1 min, RT) aus der Membran gelöst. Dieser Schritt wurde mit 60 µl AE-Pufferlösung wiederholt. Es folgte die photometrische Bestimmung der Reinheit sowie der Konzentration der DNA jeder einzelnen Probe bei 260 nm Wellenlänge.

2.3.2. Qualitative Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.3.2.1. Ansatz und Reaktionsbedingungen

Der Nachweis humaner DNA in den Organen der Versuchstiere sowie auf den Leitschienen erfolgte durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR). Hierzu fand ein Primerpaar mit folgenden Sequenzen Verwendung (Seitz et al. 2007):

Name	Sequenz
Cr17_1a	5'-GGG ATA ATT TCA GCT GAC TAA ACA G-3'
Cr17_2b	3'-TTC CGT TTA GTT AGG TGC AGT TAT C-5'

Tab. 1 Primersequenzen qualitative PCR

Diese kodierten für ein humanspezifisches Fragment von 850 Bp Länge im Zentromerbereich des Chromosoms 17. In den Zentromerbereichen humaner DNA befinden sich hoch repetitive Einheiten, welche zur Klasse der Alpha-Satelliten gehören. Diese *Repeats* mit einer Länge von ca. 171 Bp wiederholen sich ständig und sind wiederum in ganz bestimmten Sequenzen aneinandergereiht. So erfolgt die Bildung höher geordneter, sich ebenfalls wiederholender Einheiten von etwa 2,7 kB Länge.

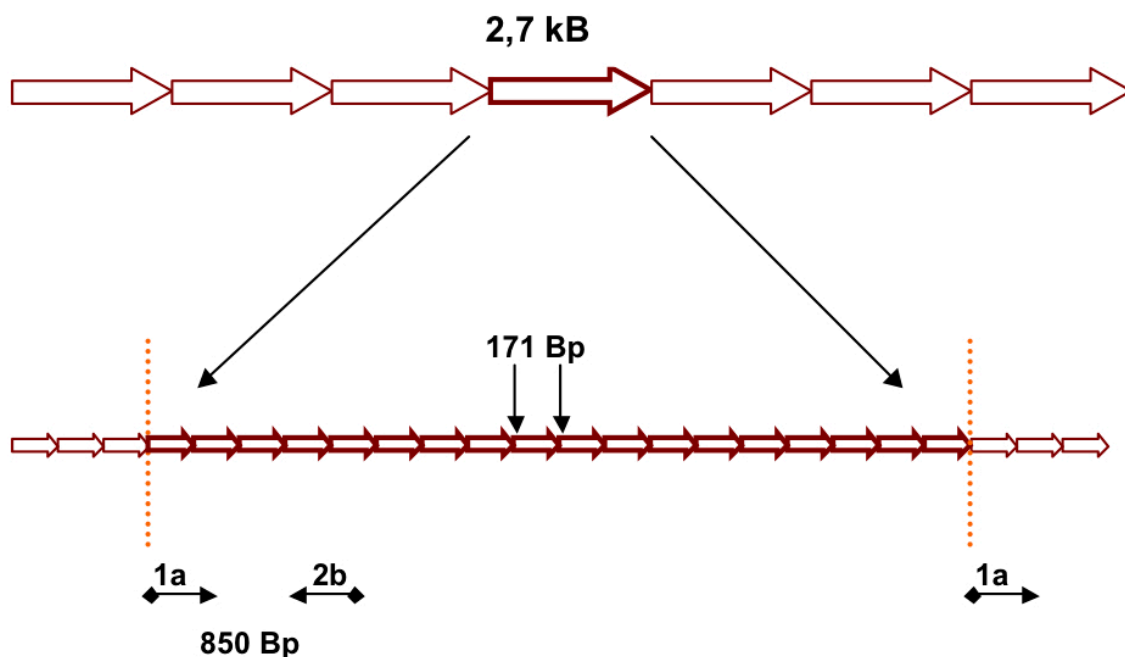


Abb. 10 Übersicht über das amplifizierte Segment (hochrepetitive Einheiten im Zentromerbereich von Chromosom 17 mit einer Länge von 2,7 kB, welche sich wiederum aus Einheiten mit einer Länge von 171 Bp zusammensetzen; der verwendete Primer erfasst ein humanspezifisches Fragment mit einer Länge von 850 Bp)

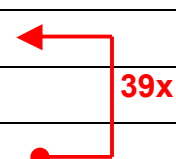
Aufgrund der hohen Kopienzahl von mehreren 1000, welche parallel amplifiziert werden, ist eine zur Analyse ausreichende Produktmenge gewährleistet.

Ein PCR-Ansatz bestand aus einem Reaktionsvolumen von 50 μ l und enthielt 250 ng hDNA Template, 10mM jedes Nukleotids (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), jeweils 250 nM des oben genannten Sense- und Antisense-Primers, 1,25 U Taq Polymerase sowie einfach verdünnte Q-Solution mit 15 mM MgCl. Der Ansatz erfolgte in einem Reaktionsgefäß durch Zugabe von 5 μ l PCR-Pufferlösung (10x), 10 μ l Q-Solution (5x), 1 μ l dNTP Mix (je 10 mM) und je 1,25 μ l der Primer. Basierend auf der photometrischen Bestimmung der DNA Konzentration der Proben konnte das einer DNA Menge von 250 ng entsprechende Volumen berechnet und ebenfalls in das

Reaktionsgefäß pipettiert werden. Anschließend wurde der Ansatz mit *Aqua ad in.* auf ein Gesamtvolumen von 49,75 µl aufgefüllt. Als letzter Schritt erfolgte die Zugabe von 0,25 µl Taq Polymerase sowie die gründliche Durchmischung durch wiederholtes auf- und abpipettieren. Alle oben genannten Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt, um einen vorzeitigen Reaktionsbeginn zu verhindern.

Alle PCR Reaktionen der Proben erfolgten in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

	Temperatur	Zeit	Bezeichnung
1	94°C	3 min	Anfangsdenaturierung
2	94°C	30 s	Denaturierung
3	58°C	1 min	Annealing
4	72°C	1 min	Polymerisierung
5	72°C	10 min	Endpolymerisierung
6	4°C	bis Entnahme	Reaktionsunterbrechung



Tab. 2 Reaktionsschritte qualitative PCR

Als Positivkontrolle wurde aus hMSCs isolierte DNA verwendet. Als Negativkontrolle diente einerseits aus 1×10^6 Mausfibroblasten isolierte DNA sowie *Aqua dest.* anstelle einer DNA Matrize.

2.3.2.2. Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von DNA-Fragmenten, durch negative elektrische Ladung, nach ihrer Größe durch Wanderung in Agarosegel durch ein angelegtes elektrisches Feld. Agarosegel wirkt hierbei durch Bildung dreidimensionaler Polysaccharidnetze als Molekularsieb, so dass der Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit verschieden großer DNA-Fragmente noch verstärkt wird. Durch ein ebenfalls auf das Gel aufgebracht Gemisch definierter Fragmentlängen, Marker oder Längenstandard genannt, kann die Länge der DNA Proben eingeschätzt und verglichen werden.

In dieser Arbeit fanden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1,8% Verwendung. Hierzu wurden 2 g Agarose mit 120 ml 1x TAE-Puffer vermischt und bis zur

vollständigen Lösung aufgeköcht. Dieses Gemisch wurde nach einer kurzen Abkühlphase mit 8 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration im Gel 500ng/ml) versetzt, welches durch Interkalation mit der DNA der Fluoreszenz der aufgetrennten Fragmente im ultravioletten Licht (302 nm) diente. Das noch flüssige Gel wurde daraufhin in eine Form gegossen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Je nach Anzahl der Proben fanden Gele mit einem Volumen von 80 bis 200 ml Verwendung. Das feste Gel wurde dann in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Anschließend erfolgte das Aufbringen der zuvor mit dem Ladepuffer Bromphenolblau beschwerten Proben auf das Gel, um bis zum Anlegen der Spannung ein Absinken der Fragmente in die Taschen des Gels zu gewährleisten. Nach dem Aufbringen aller zu untersuchenden Proben sowie einem Marker wurde für die Dauer von einer Stunde eine Spannung von 120V angelegt. Abschließend erfolgte die Auswertung unter UV-Licht sowie die digitalphotografische Dokumentation.

TAE-Puffer:

- 40mM Tris
- 20 mM Natrium-Acetat
- 2 mM EDTA
- Mit Eisessig auf pH 8,3 eingestellt

Bromphenolblau Ladepuffer 10x:

- 30% (v/v) Glycerin
- 0,25% (w/v) Bromphenolblau
- 0,25% (w/v) Xylencyanol FF
- 0,25% (w/v) Xylencyanol FF

2.3.3. Quantitative Polymerase Chain Reaction

Die quantitative Bestimmung der in vivo auf den Leitschienen verbliebenen Zellen erfolgte in dieser Arbeit mit dem LightCycler System der Firma Roche (Mannheim, Germany). Als Fluoreszenzfarbstoff fand Sybr Green I Verwendung. Aus einem

Standard mit einer definierten hDNA Menge wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt, welche als Matrize zur Erstellung einer Standardkurve diente.

2.3.3.1. Ansatz und Reaktionsbedingungen

Es wurde ein humanspezifischer Primer der Firma SearchLC (Heidelberg, Germany) eingesetzt, welcher kein richtiges Motiv sondern multiple Sequenzen unterschiedlicher Länge auf dem humanen Genom erkennt (Seitz et al. 2007). Dieser liefert pro Zelle 4080 Transkripte.

Die Primesequenzen sind in folgender Tabelle ersichtlich:

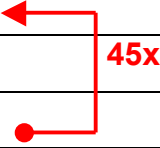
Name	Sequenz
Sense-Primer	5'-AACATGGTGAAACCCCGTCTC-3'
Antisense-Primer	3'-TGCAGTGGCGCGCGATCTTG-5'

Tab. 3 Primersequenzen quantitative PCR

Die zu untersuchenden Proben wurden hierfür im Verhältnis 1:10 mit *Aqua dest.* auf ein Gesamtvolumen von 10 µl verdünnt, um eine DNA-Konzentration im Bereich der Standardkurve zu erreichen. Die Herstellung der Standards erfolgte durch eine Verdünnungsreihe, so dass Standards mit 600 pg, 60 pg, 6 pg und 0,6 pg hDNA in jeweils 10µl *Standard Stabilizer* zur Verfügung standen. Der hierbei eingesetzte PCR-Mix setzte sich pro Reaktion aus 6 µl *Aqua dest.*, 2 µl des Primerpaares und 2 µl Sybr Green 1 zusammen. Letztgenanntes enthielt neben dem Fluoreszenzfarbstoff auch die DNA-Polymerase, den PCR-Puffer sowie die dNTPs. Initial wurden jeweils 10 µl des Templates in eine vorgekühlte LightCycler-Kapillare pipettiert und mit 10µl des PCR-Mix versetzt. Analog hierzu wurden auch jeweils 10 µl der Standards, ebenso wie die Negativkontrolle aus *Aqua dest.*, in Kapillaren überführt und ebenfalls mit PCR-Mix ergänzt. Abschließend wurden die Kapillaren mit Plastikpfropfen verschlossen, 4 Minuten bei 660 rpm (4°C) zentrifugiert und in einem speziellen Karussell in den LightCycler eingebracht.

Ein LightCycler Lauf bestand aus folgenden Schritten:

	Temperatur	Zeit	Bezeichnung
1	95°C	10 min	Anfangsdenaturierung
2	95°C	10 s	Denaturierung
3	68°C	10 s	Annealing
4	72°C	16 s	Polymerisierung
5	72°C	10 min	Endpolymerisierung
6	4°C	bis Entnahme	Reaktionsunterbrechung



Tab. 4 Reaktionsschritte quantitative PCR

Im Anschluß an die eigentliche PCR folgte noch ein Schmelzprogramm. Hierzu wurden die Proben kontinuierlich von 58°C auf 95°C erhitzt, um eine Denaturierung der DNA-Doppelstränge zu erreichen. Dies diente der Abgabe des Fluoreszenzfarbstoffes und führte in der Folge zu einem steilen Abbruch der Fluoreszenz. Somit konnte aufgrund niedrigerer Schmelztemperaturen unspezifischer Produkte sowie der Primerdimere eine hohe Spezifität des Produkts nachgewiesen werden.

2.3.3.2. Berechnung der Zellzahl

Anhand der oben beschriebenen Verdünnungsreihe der Standards generierte der LightCycler eine Standardkurve, welche der Ermittlung der amplifizierten DNA Menge der einzelnen Proben diene. Die gesamte aus einem Tubobone isolierte DNA war jedoch in 300 ml Puffer suspendiert, was eine Multiplikation des mittels LightCycler ermittelten Wertes mit dem Faktor 300 nötig machte. Die Anzahl der zum Explantationszeitpunkt noch auf einer Leitschiene befindlichen hMSC konnte nun durch eine Division durch sechs errechnet werden. Dieser Schritt basierte auf dem allgemein angenommenen DNA Gehalt einer eukaryotischen Zelle von 6 pg.

2.4. Materialien und Geräte

2.4.1. Geräte

Abzugtisch	Medite, Burgdorf
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ -Zellkulturbrutschrank, Typ IG150	Jouan, Unterhaching
Elektrische Präzisionswaage	Kern&Sohn, Frommern
Eismaschine	Tritec, Hannover
Flachbett-Gelelektrophorese-Apparatur, Modell B1	PeqLab, Erlangen
Gefrierschrank (-80 °C)	GFL, Burgwedel
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Geldokumentationssystem, Image Master VDS	Pharmacia Biotech, USA
Heizblock, HLC, BT 130-2	Medax Nagel GmbH, Kiel
Hybridisierungs-ofen, Hybridizer HB-100	UVP, Laboratory Pro, USA
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge, Typ BR4i	Jouan, Unterhaching
LightCycler	Roche, Mannheim
Megafuge	Heraeus Instruments, Hanau
Mikrowellengerät (900 Watt)	Siemens, Fürth
Neubauer-Zählkammer	Plazotta, München
PCR-Multicycler PT-200	Biozym, Oldendorf
Pipetus-akku	Hirschmann, Eberstadt
Routinemikroskop, Axiovert Typ S100	Zeiss, Jena
Schüttler, Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Sterilwerkbank Biohit	Antares, USA
Thermozykler, PCR-Sprint	Hybaid, Ashford, England
Tischzentrifuge Typ CT 4.22	Jouan, Unterhaching
Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer Typ RC 10.9	Jouan, Unterhaching
Varioklav Dampfsterilisator	H&P, Oberschleißheim
Varipipetten, Gilson, Pipetman	Abimed, Langenfeld
Vortex-Genie	Scientific Industries, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel

Wasserbad mit Schüttelvorrichtung

Memmert, Schwabach

2.4.2. Chemikalien und Materialien für die Molekularbiologie

Für die molekularbiologischen Ansätze fand *Aqua ad injectabilia* der Firma Braun, Melsungen Verwendung.

0,5 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg
15 ml Falconröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
50 ml Falconröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Alpha – MEM Kulturmedium (mit Ribonucleotiden)	Gibco, Invitrogen Co., USA
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	R&D Systems, Wiesbaden
Deckgläser für Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
DNA-Längenstandard, 250 bp Leiter	Invitrogen, USA
DNA-Längenstandard, Nr. VIII	Roche, Mannheim
Dneasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Ethanol abs.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Kryokonservierungs-Röhrchen	Nalgene, USA
LC-Primer Set	Search-LC, Heidelberg
LC-SybrGreen Kit	Roche, Mannheim
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
MSC-Basalmedium	Cambrex, USA
MSC-Growth Supplement (MCGS)	Cambrex, USA
PBS (w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Gibco, Invitrogen Co., USA
Penicillin/Streptomycin	Cambrex, USA
Petrischalen (Ø 92 mm)	Sarstedt, Nürnberg
Rnase A	Qiagen, Hilden
SeaKem LE Agarose	FMC BioProducts, USA
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
Trypsin/EDTA-Lösung	Cambrex, USA
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Vascular-Endothelial-Growth-Factor	PeproTech, Hamburg

Zellkulturflaschen, 75 cm² bzw. 25 cm²

Nunc, USA

Zellkulturplatten, 6-, 12- und 24-Kavitäten

Nunc, USA

3. Ergebnisse

3.1. Tierversuche

3.1.1. Besiedlungseffizienz

Nach der Besiedlung der Leitschienen in 48-Well-Platten wurde die Zahl der nicht auf den Leitschienen adhärenen Zellen bestimmt. Somit konnte die Anzahl der effektiv auf jede Leitschiene aufgebrachten Zellen errechnet werden. Es wurde eine Besiedlungseffizienz von 41 - 83 % erreicht. Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der Besiedlungseffizienz für alle Versuchsreihen bei einer Ausgangsmenge von $1,1 \times 10^6$ Zellen.

Stimulation	Anzahl Tutobones	Implantationsdauer	Zellzahl auf Tutobones nach Besiedlung	Besiedlungseffizienz (%)
ohne Stimulation	6	2	681597 ± 71375	62,0 ± 6,5
ohne Stimulation	6	12	717383 ± 66177	65,2 ± 6,0
osteogene Stimulation	6	2	680004 ± 62724	58,1 ± 5,4
osteogene Stimulation	6	12	794267 ± 63104	70,9 ± 5,6
osteogene Stimulation + VEGF	6	2	682500 ± 129212	58,3 ± 11,0
osteogene Stimulation + VEGF	6	12	805093 ± 129602	71,9 ± 11,6

Tab. 5 Besiedlungseffizienz aller Versuchsreihen (Ausgangsmenge 1,1 Mio.)

3.1.2. Versuchstiere

Insgesamt wurden bei 12 Tieren Leitschienen implantiert (siehe Abb. 4). Während des Beobachtungszeitraums von 2 beziehungsweise 12 Wochen waren keine Auffälligkeiten zu verzeichnen. Alle Tiere wiesen bereits nach 2 Wochen gut verheilte und reizlose Wundverhältnisse auf.

Bei der Explantation zeigten alle Leitschienen makroskopisch eine Verwachsung mit dem umliegenden Gewebe. Besonders war dies bei 12 Wochen *in vivo* belassenen und bei mit VEGF vorbehandelten Tubobones der Fall.

Beim Zerteilen der Konstrukte für die histologische Auswertung wurde bei mit VEGF behandelten Leitschienen makroskopisch eine dichtere Durchbauung der Trabekelstruktur festgestellt.

3.2. Molekularbiologie

3.2.1. Isolation der DNA aus den Geweben und Leitschienen

Bei der Explantation wurde jeweils das gesamte Organ entnommen und im Rahmen der DNA Isolation auch komplett aufgearbeitet. Im Fall sehr großer Gewebemenge wurde das Organ im noch gefrorenen Zustand zerteilt, zerkleinert und auf mehrere Röhrchen aufgeteilt um eine bessere Lyse des Gewebes zu gewährleisten. Vor der photometrischen Bestimmung der DNA-Menge wurden die Proben eines Organs wieder zusammengeführt (siehe Tab. 6).

Die Lysate von Herz, Leber, Niere, Haut, Blut und den Leitschienen wiesen nach zwölfstündiger Inkubationszeit eine homogene und gut durchmischbare Konsistenz auf. Bei Letzteren kam es zur vollständigen Lyse des eingewachsenen Gewebes, wobei die trabekuläre Grundstruktur hiervon unbeeinflusst blieb. Die Organe Lunge, Milz, Gehirn und Hoden wiesen nach dem Lysevorgang eine gelatinöse Konsistenz auf. Nach gründlicher Mischung durch mehrmaliges auf- und abpipettieren war aber auch hier eine problemlose Weiterverarbeitung möglich.

Explantationszeitpunkte	Organ	Gesamtgewicht (mg)	Gewicht nach Zerteilen (mg)	Gesamtmenge DNA (mg)
2 Wochen	Blut	3 Proben a 250µl		3,3
	Leber	324,0	139,1	10,4
			127,3	
			104,0	
	Milz	102,3	63,1	5,0
			55,2	
	Niere	271,5	139,9	5,8
			119,1	
	Lunge	189,4	111,0	4,8
			68,2	
	Herz	185,3	95,0	1,8
			72,8	
Gehirn	412,0	117,6	3,3	
		100,7		
		140,8		
Hoden	98,0	98,0	4,0	
Haut/Muskel I	123,2	123,2	3,2	
Haut/Muskel II	101,9	101,9	4,8	
12 Wochen	Blut	3 Proben a 250µl		3,3
	Leber	114,1	114,1	9,4
	Milz	128,6	57,6	7,3
			22,0	
			34,8	
	Niere	283,5	155,0	7,6
			128,5	
	Lunge	199,6	102,4	6,6
			74,8	
	Herz	163,1	84,3	1,6
			78,7	
	Gehirn	287,6	118,4	2,7
91,8				
70,1				
Hoden	113,1	113,1	3,9	
Haut/Muskel I	81,1	81,1	2,8	
Haut/Muskel II	97,6	97,6	2,7	

Tab. 6 Ausgewählte Organgewichte und DNA Ausbeute

3.2.2. Qualitative PCR

In Anlehnung an die Arbeit von Schieker et al. 2004 wurden zum Nachweis der Sensitivität dieser Methode zusätzlich eine 1- und eine 10-Zell-Kontrolle in jeden PCR Lauf eingeschlossen. Diese bestanden aus isolierter DNA aus einer beziehungsweise zehn hMSCs und jeweils 1×10^6 Mausfibroblasten. Exemplarisch werden Abbildungen jeweils eines Tieres aus jeder Versuchsreihe gezeigt.

3.2.2.1. PCR der Kontrollen

Vor dem Einsatz der Kontrollen in den PCR Läufen mit den zu untersuchenden Proben wurden diese getrennt getestet. Hierzu erfolgte ein PCR Lauf mit drei Positiv-, acht 1-Zell- sowie drei 10-Zell-Kontrollen zusammen mit jeweils einer Positiv- und Negativkontrolle. Die Auswertung ergab positive Banden bei allen Positiv- und 10-Zell-Kontrollen sowie bei fünf von acht 1-Zell-Kontrollen.

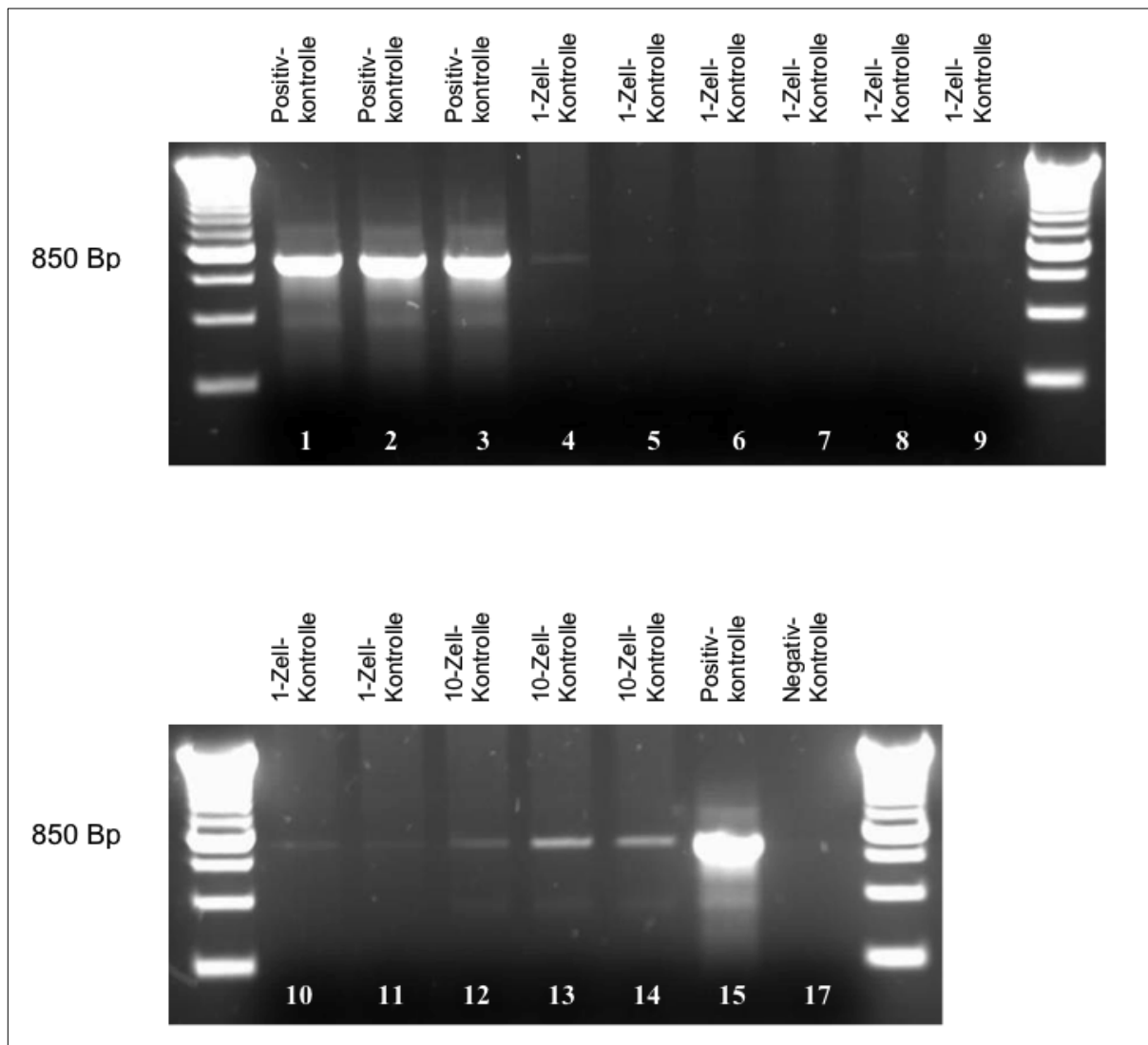


Abb. 11 PCR Ergebnisse der Kontrollen: Nr. 1 – 3 Positivkontrollen, Nr. 4 – 11 1-Zell-Kontrollen, Nr. 12 – 14 10-Zell-Kontrollen, Nr. 15 Positivkontrolle, Nr. 17 Negativkontrolle

Es fanden daher die 1-Zell-Kontrollen der Spuren 4 und 10 sowie die 10-Zell-Kontrollen der Spuren 13 und 14 Verwendung. Aufgrund der identischen Signalintensitäten konnten alle hergestellten Positivkontrollen für die qualitative PCR herangezogen werden.

3.2.2.2. Zwei Wochen (besiedelt/unbesiedelt)

Nach zweiwöchigem Verbleib der besiedelten Leitschienen und der unbesiedelten Kontrollen in vivo wurden die 3 Tiere dieser Versuchsreihe euthanasiert, die Organe und Leitschienen explantiert und die DNA isoliert und analysiert. Nach Abschluß der

PCR wiesen die besiedelten Konstrukte, die Positivkontrolle sowie die 1- und 10-Zell-Kontrolle positive PCR Banden für den Nachweis humaner DNA auf (Spuren 11, 15-17). Die aus den entnommenen Mausorganen isolierten Proben zeigten keine Signale (Spuren 1-10). Auch bei den unbesiedelten Kontrollen, der Negativkontrolle (1×10^6 Mausfibroblasten) sowie der Wasserkontrolle waren keine amplifizierten hDNA-Fragmente nachweisbar (Spuren 12-14). Alle 3 Tiere dieser Versuchsreihe zeigten oben beschriebene Resultate.

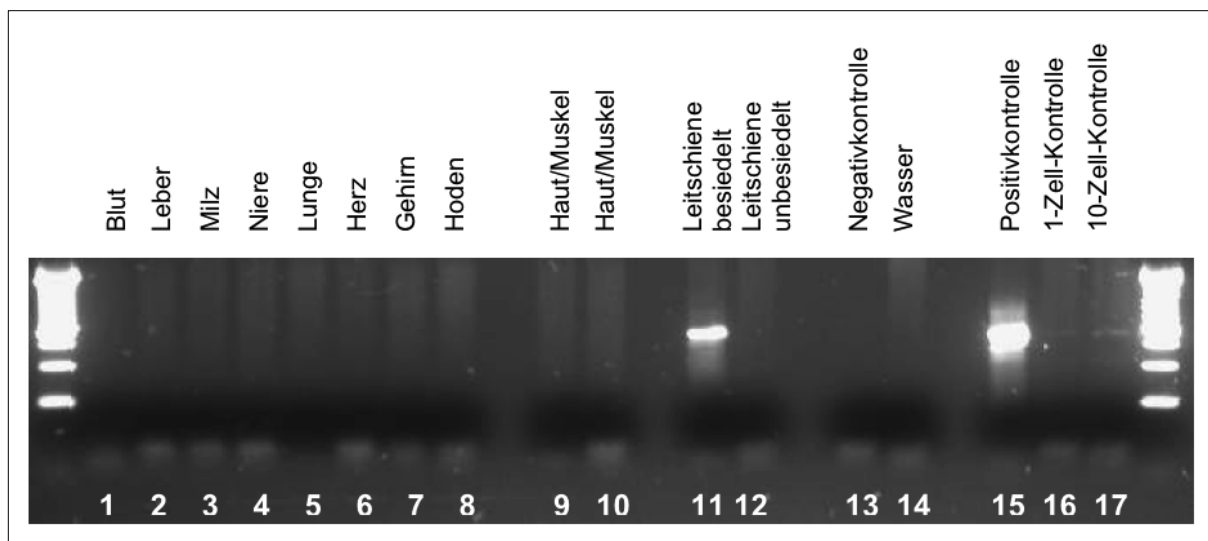


Abb. 12 PCR Ergebnisse nach 2 Wochen Implantationsdauer (besiedelt / unbesiedelt): Nr. 1 Blut, Nr. 2 Leber, Nr. 3 Milz, Nr. 4 Niere, Nr. 5 Lunge, Nr. 6 Herz, Nr. 7 Gehirn, Nr. 8 Hoden, Nr. 9 + 10 Haut/Muskel, Nr. 11 besiedelte Leitschiene, Nr. 12 unbesiedelte Leitschiene, Nr. 13 Negativkontrolle Wasser, Nr. 14 Negativkontrolle Mausfibroblasten, Nr. 15 Positivkontrolle hMSC, Nr. 16 1-Zell-Kontrolle, Nr. 17 10-Zell-Kontrolle

3.2.2.3. Zwei Wochen (besiedelt, osteogen stimuliert, +/- VEGF)

Eine weitere Versuchsreihe über einen Zeitraum von zwei Wochen bildeten erneut drei Tiere, wobei hier aber alle vier implantierten Tubobones besiedelt und osteogen stimuliert wurden. Auf zwei Leitschienen wurde unmittelbar vor der Implantation zusätzlich VEGF aufgebracht.

Wie bei der oben beschriebenen Reihe zeigten auch hier die aufgearbeiteten Mausorgane kein positives Signal (Spuren 1-10). Beide für die molekularbiologische Auswertung verwendeten Leitschienen (+/- VEGF) wie auch die Positiv-, 1- und 10-Zellkontrolle wiesen positive Banden für humane DNA im Bereich von 850 Bp auf

(Spuren 11, 12, 15-17). Beide Negativkontrollen waren ohne Signal. Bei allen Tieren dieser Versuchsreihe waren identische Ergebnisse zu beobachten.

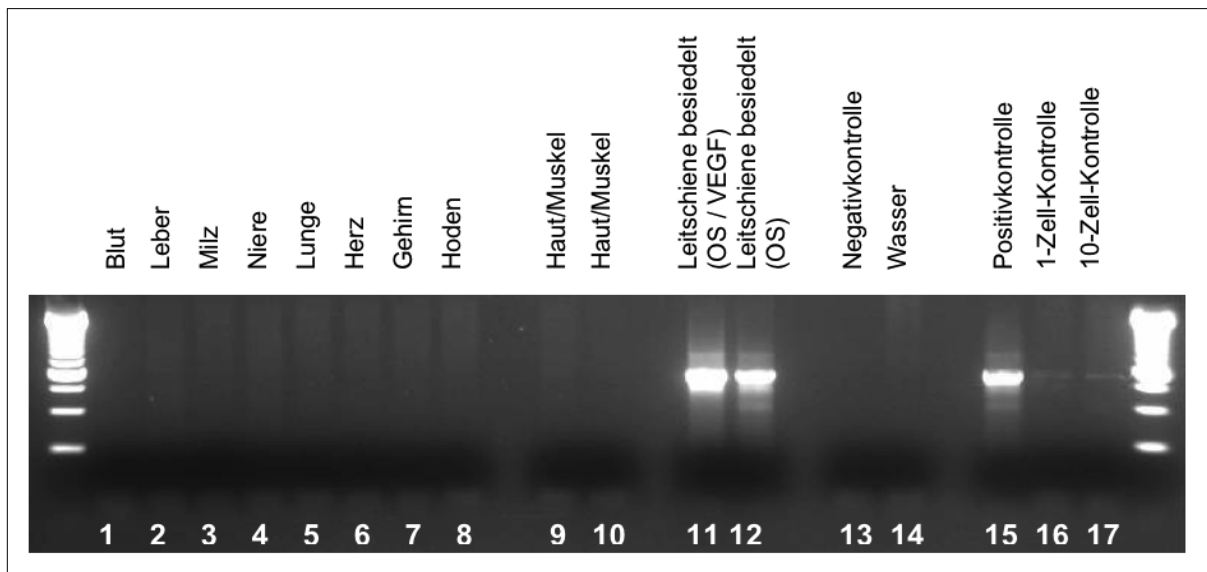


Abb. 13 PCR Ergebnisse nach 2 Wochen Implantationsdauer (besiedelt, osteogen stimuliert, +/- VEGF): Nr. 1 Blut, Nr. 2 Leber, Nr. 3 Milz, Nr. 4 Niere, Nr. 5 Lunge, Nr. 6 Herz, Nr. 7 Gehirn, Nr. 8 Hoden, Nr. 9 + 10 Haut/Muskel, Nr. 11 + 12 besiedelte Leitschiene (+/- VEGF), Nr. 13 Negativkontrolle Wasser, Nr. 14 Negativkontrolle Mausfibroblasten, Nr. 15 Positivkontrolle hMSC, Nr. 16 1-Zell-Kontrolle, Nr. 17 10-Zell-Kontrolle

3.2.2.4. Zwölf Wochen (besiedelt/unbesiedelt)

Drei weiteren Tieren wurden jeweils zwei besiedelte und zwei unbesiedelte Leitschienen implantiert, diese jedoch über einen Zeitraum von zwölf Wochen in vivo belassen.

Auch hier waren bei keinem Tier Fragmente humaner DNA in den aufbereiteten Organen sowie der Negativ- und der Wasserkontrolle nachweisbar (Spuren 1-10, 13, 14). Der Nachweis humaner DNA gelang bei allen besiedelten Leitschienen (Spur 11). Die unbesiedelten Konstrukte zeigten kein Signal (Spur 12). Die hier ebenfalls eingeschlossene Positivkontrolle sowie die interne 1- und 10-Zell-Kontrolle wiesen entsprechend ihrer Menge des amplifizierten Fragments Banden unterschiedlicher Intensität auf (Spuren 15-17). Abbildung 14 zeigt die oben beschriebenen Ergebnisse repräsentativ für alle Versuchstiere dieser Reihe.

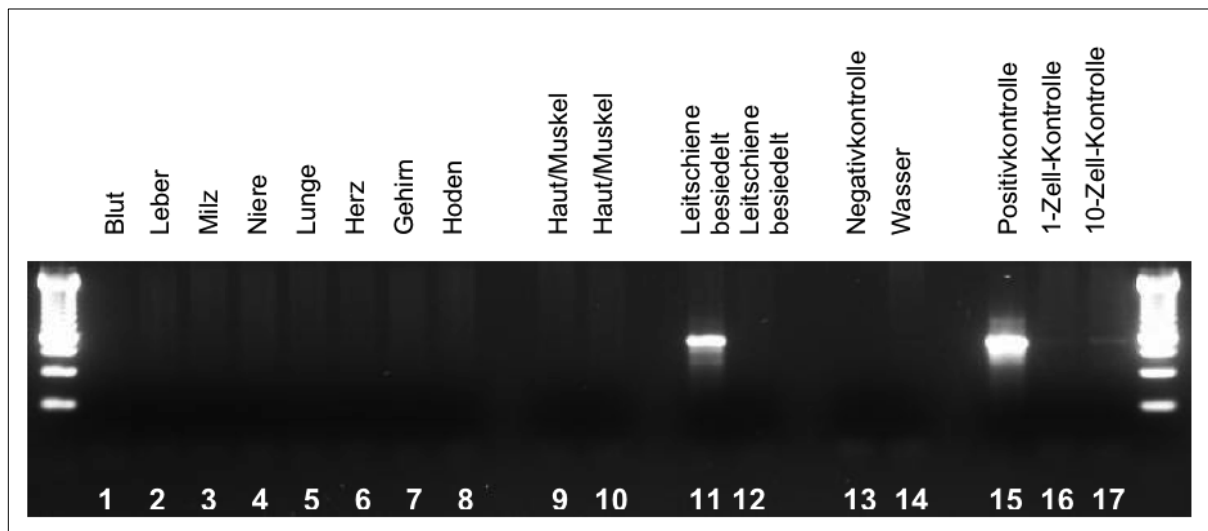


Abb. 14 PCR Ergebnisse nach 12 Wochen Implantationsdauer (besiedelt / unbesiedelt): Nr. 1 Blut, Nr. 2 Leber, Nr. 3 Milz, Nr. 4 Niere, Nr. 5 Lunge, Nr. 6 Herz, Nr. 7 Gehirn, Nr. 8 Hoden, Nr. 9 + 10 Haut/Muskel, Nr. 11 besiedelte Leitschiene, Nr. 12 unbesiedelte Leitschiene, Nr. 13 Negativkontrolle Wasser, Nr. 14 Negativkontrolle Mausfibroblasten, Nr. 15 Positivkontrolle hMSC, Nr. 16 1-Zell-Kontrolle, Nr. 17 10-Zell-Kontrolle

3.2.2.5. Zwölf Wochen (besiedelt, osteogen stimuliert, +/- VEGF)

Eine letzte Gruppe bildeten weitere drei Tiere, denen ebenfalls jeweils vier Leitschienen über einen Zeitraum von zwölf Wochen implantiert wurden. Hierbei erfolgte bei allen Tutobones eine Besiedlung mit hMSCs ebenso wie eine osteogene Stimulation *in vitro* für zwei Wochen. Unmittelbar vor der Implantation wurden jeweils zwei Konstrukte mit VEGF beimpft.

Nach Euthanasie der Tiere wurden wiederum die Leitschienen und Organe explantiert und mittels PCR ausgewertet. Die untersuchten Proben der Mausorgane zeigten erneut keine positiven Signale (Spuren 1-10). Auch beide Negativkontrollen wiesen keine Banden auf (Spuren 13, 14). Alle untersuchten Leitschienen, die Positiv-, 1- und 10-Zell-Kontrolle zeigten Banden im Bereich von 850 Bp. Wiederum waren bei allen Tieren identische Ergebnisse zu beobachten.

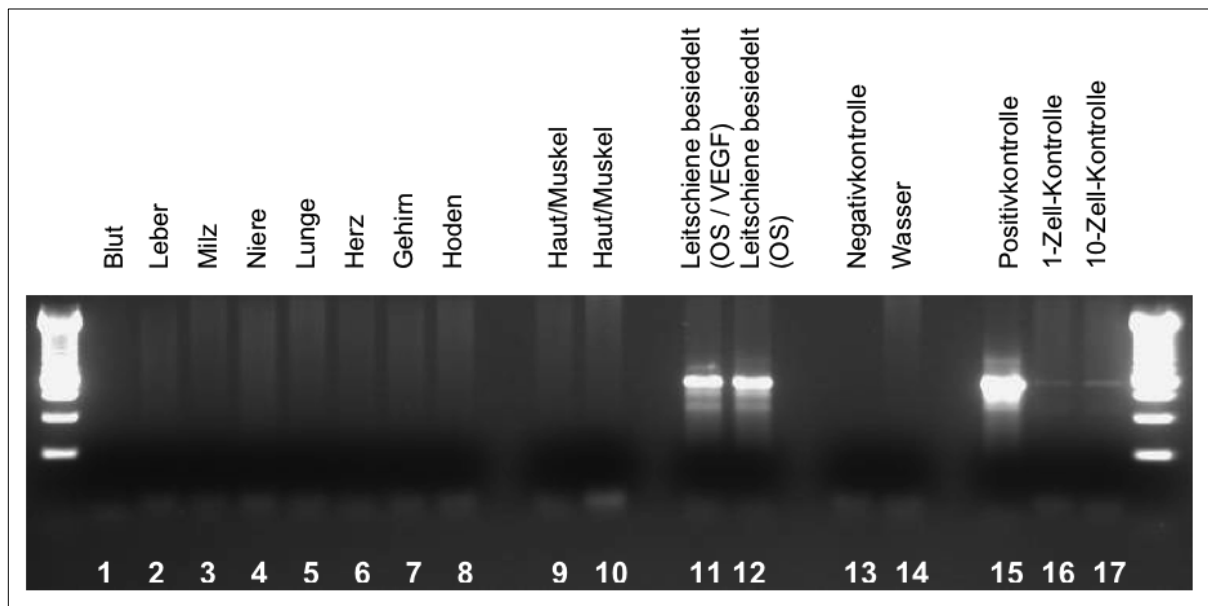


Abb. 15 PCR Ergebnisse nach 12 Wochen Implantationsdauer (besiedelt, osteogen stimuliert, +/- VEGF): Nr. 1 Blut, Nr. 2 Leber, Nr. 3 Milz, Nr. 4 Niere, Nr. 5 Lunge, Nr. 6 Herz, Nr. 7 Gehirn, Nr. 8 Hoden, Nr. 9 + 10 Haut/Muskel, Nr. 11 + 12 besiedelte Leitschiene (+/- VEGF), Nr. 13 Negativkontrolle Wasser, Nr. 14 Negativkontrolle Mausefibroblasten, Nr. 15 Positivkontrolle hMSC, Nr. 16 1-Zell-Kontrolle, Nr.17 10-Zell-Kontrolle

3.2.3. Semiquantitative Auswertung

Mittels der qualitativen PCR konnte in allen besiedelten Leitschienen humane DNA nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch ein Unterschied der Bandenintensitäten zwischen den in MSCGM inkubierten und den osteogen stimulierten Leitschienen.

Die beobachteten Intensitätsunterschiede stehen in direkter Korrelation mit der amplifizierten Kopienzahl humaner DNA. Diese wiederum ist abhängig von der zum Explantationszeitpunkt in den Leitschienen vorhandenen menschlichen DNA. Ein Rückschluss auf eine höhere Anzahl in osteogen stimulierten Leitschienen nach beiden Beobachtungszeiträumen war somit möglich. Veränderungen der Zellzahlen im zeitlichen Verlauf waren auf diese Weise jedoch nicht beurteilbar.

3.2.4. Quantitative PCR

3.2.4.1. Auswertung der Proben

Die Berechnung der Zellzahlen aus den Ergebnissen des LightCycler Laufs erfolgte wie in 2.3.3.2 beschrieben. Eine DNA Menge von 6 pg pro hMSC wurde hierbei zugrunde gelegt. Die Fluoreszenzkurven der Light Cycler Auswertung zeigten hierbei die in der Probe enthaltene Menge hDNA an. Je weiter links eine Fluoreszenzkurve zur Darstellung kam, desto mehr hDNA war in der Probe enthalten (siehe Abb. 16)

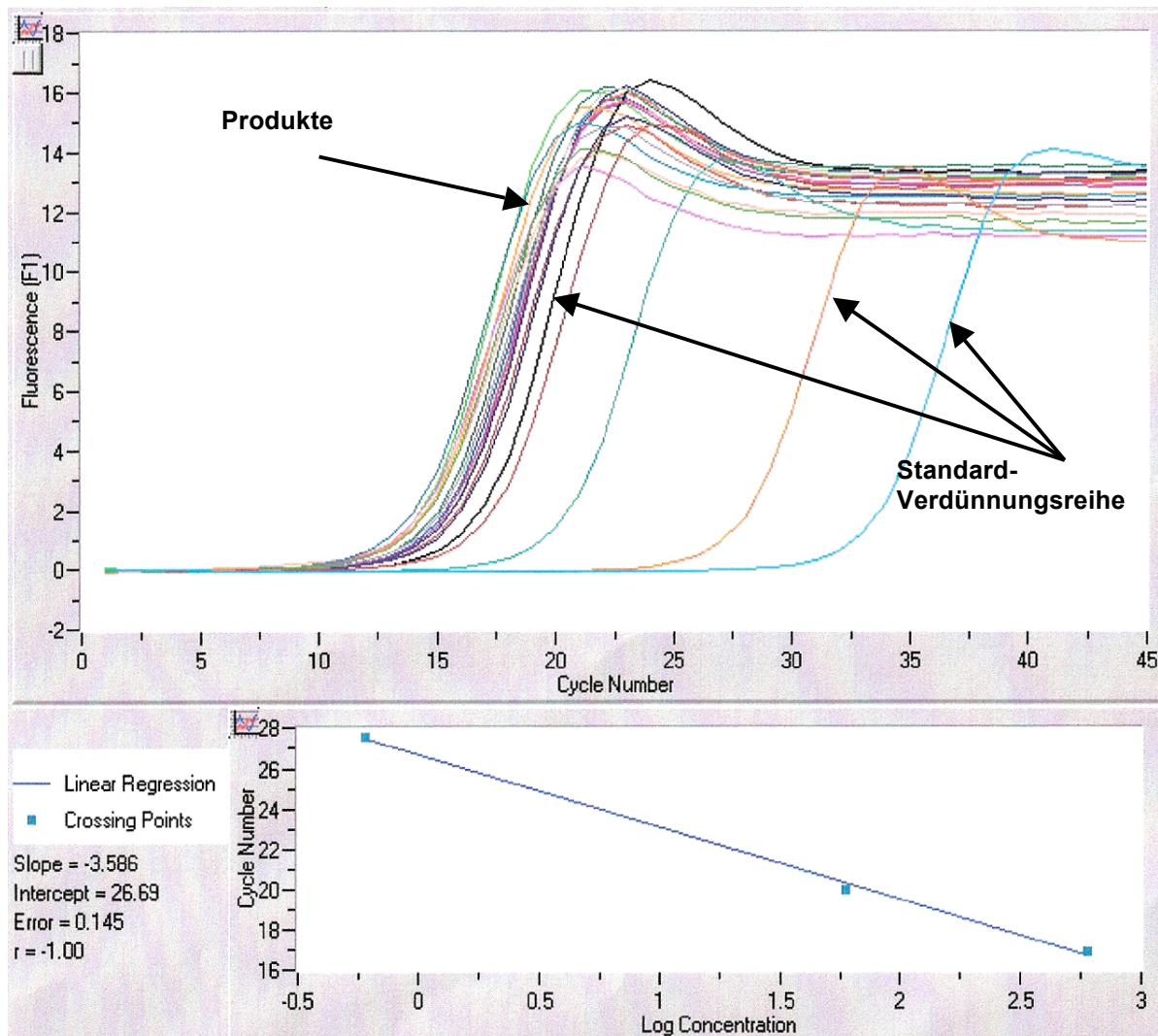


Abb. 16 Fluoreszenzsignalkurven der untersuchten Proben (oben), Crossing Points (ausgewählter Schwellenwert, CT-Wert) übertragen auf logarithmische Template Konzentration (unten)

Die in Abbildung 17 ersichtlichen Schmelzkurven der Proben und Standards zeigen eine Denaturierung der amplifizierten DNA-Doppelstränge und damit einem plötzlichen Abfall der Fluoreszenz bei einer einheitlichen Temperatur von etwa 90°C. Somit konnte eine hohe Spezifität des Produktes nachgewiesen werden.

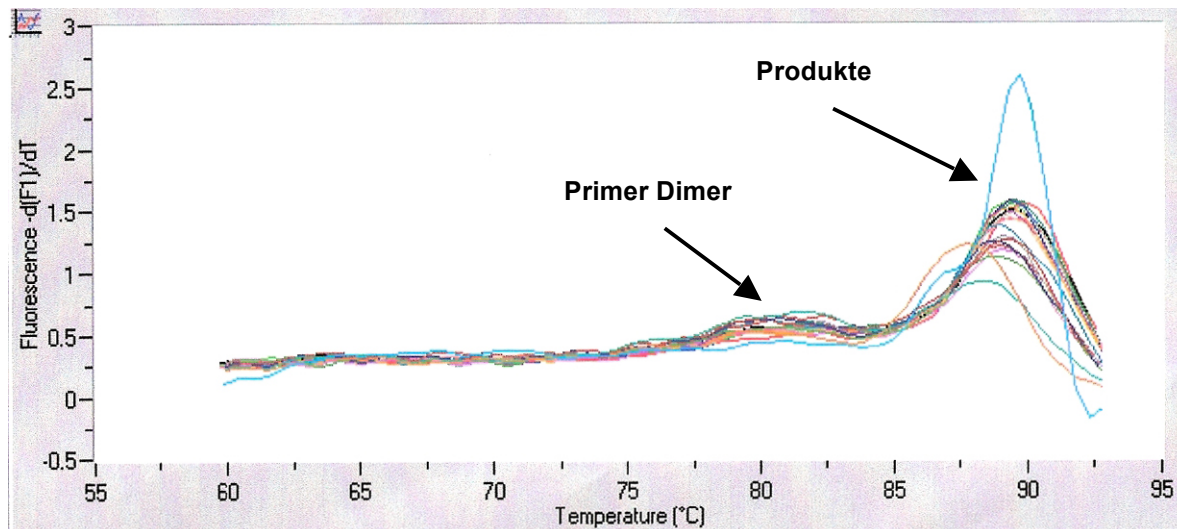


Abb. 17 Schmelzkurven der untersuchten Proben

3.2.4.2. Zwei Wochen (besiedelt/unbesiedelt)

Bei den drei in dieser Gruppe molekularbiologisch ausgewerteten Leitschienen variierte die Zahl der zum Explantationszeitpunkt noch lebenden hMSC zwischen 62499 und 104399. Der Mittelwert betrug 82699 Zellen bei einer Standardabweichung von +/- 17138.

3.2.4.3. Zwölf Wochen (besiedelt/unbesiedelt)

In den nach zwölf Wochen *in vivo* explantierten Leitschienen konnten zwischen 28164 und 94149 überlebende hMSC detektiert werden. Der errechnete Mittelwert betrug 60187 Zellen (+/- 26973 Standardabweichung).

3.2.4.4. Zwei Wochen (besiedelt, osteogen stimuliert, +/- VEGF)

Die in dieser Gruppe ausgewerteten sechs Leitschienen wurden alle für zwei Wochen osteogen stimuliert, jedoch nur drei vor der Implantation mit VEGF beimpft. In den ausschließlich osteogen stimulierten Tutobones überlebten zwischen 65449 und 236299 hMSC. Ein Mittelwert von 125916 Zellen sowie eine Standardabweichung von +/- 78172 wurde hier errechnet.

Die Anzahl der in den zusätzlich mit VEGF stimulierten Leitschienen noch vorhandenen hMSC variierte zwischen 111549 und 295499 (Mittelwert 214982 Zellen, Standardabweichung +/- 76826).

3.2.4.5. Zwölf Wochen (besiedelt, osteogen stimuliert, +/- VEGF)

In dieser Gruppe standen ebenfalls sechs Tutobones für die molekularbiologische Auswertung zur Verfügung. Drei davon wurden ausschließlich osteogen stimuliert und wiesen zwischen 85399 und 186649 zum Explantationszeitpunkt noch lebende hMSCs auf. Der Mittelwert betrug 136024 Zellen, die Standardabweichung +/-50625. In den zusätzlich mit VEGF beimpften Leitschienen konnten noch zwischen 73599 und 107449 hMSC nachgewiesen werden. Der Mittelwert lag bei 90524 Zellen (Standardabweichung +/- 16925).

3.2.4.6. Zusammenfassung

Insgesamt konnte eine sehr gute Besiedlungseffizienz erreicht werden. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Abnahme der Zellzahlen von der Besiedlung bis zu allen Explantationszeitpunkten von mehr als 80% (siehe Abb. 18).

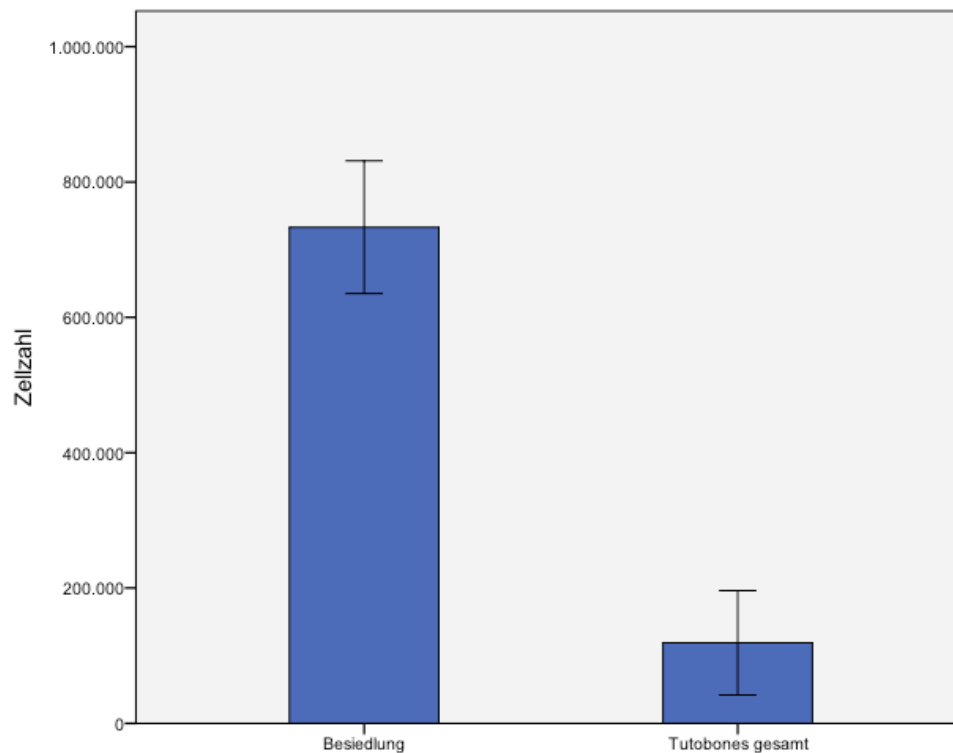


Abb. 18 Übersicht zu Abnahme der Zellzahlen von der Besiedlung bis zu allen Explantationszeitpunkten ($p < 0,0001$)

Im Einzelnen zeigte sich nach einer signifikanten Abnahme der überlebenden hMSC von der Besiedlung bis zur Explantation nach zwei Wochen ein weiterer nicht signifikanter Rückgang der Zellzahlen bis zur Explantation nach zwölf Wochen für die in MSCGM vorkultivierte sowie für die osteogen und mit VEGF stimulierte Gruppe (siehe Abb. 19 und 20).

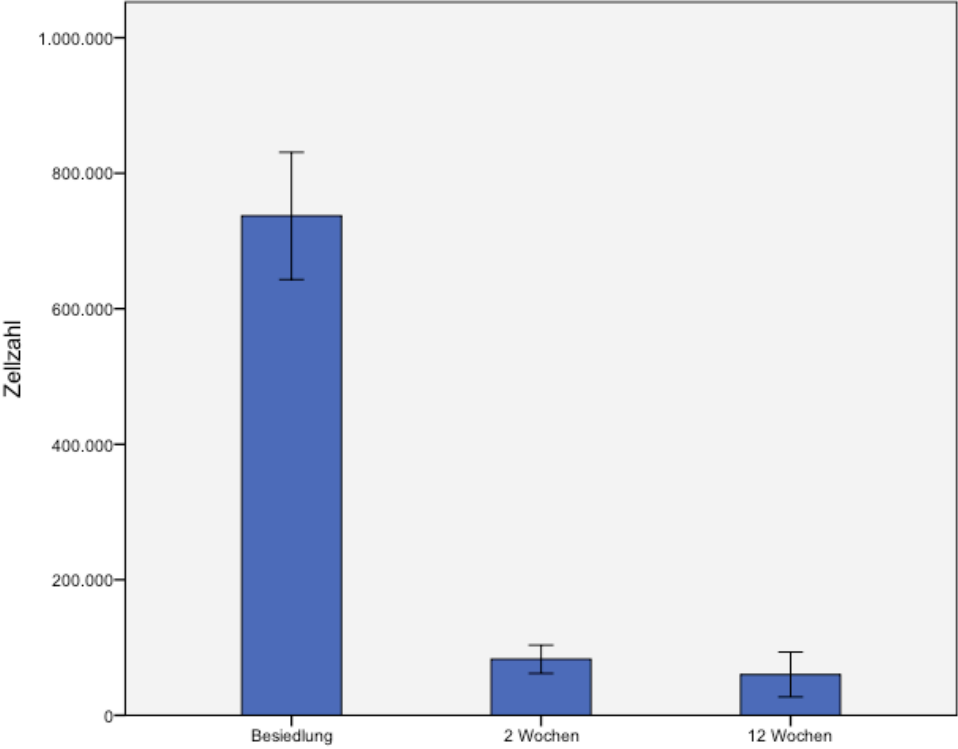


Abb. 19 Entwicklung der Anzahl der überlebenden hMSC zu beiden Explantationszeitpunkten ohne Stimulation

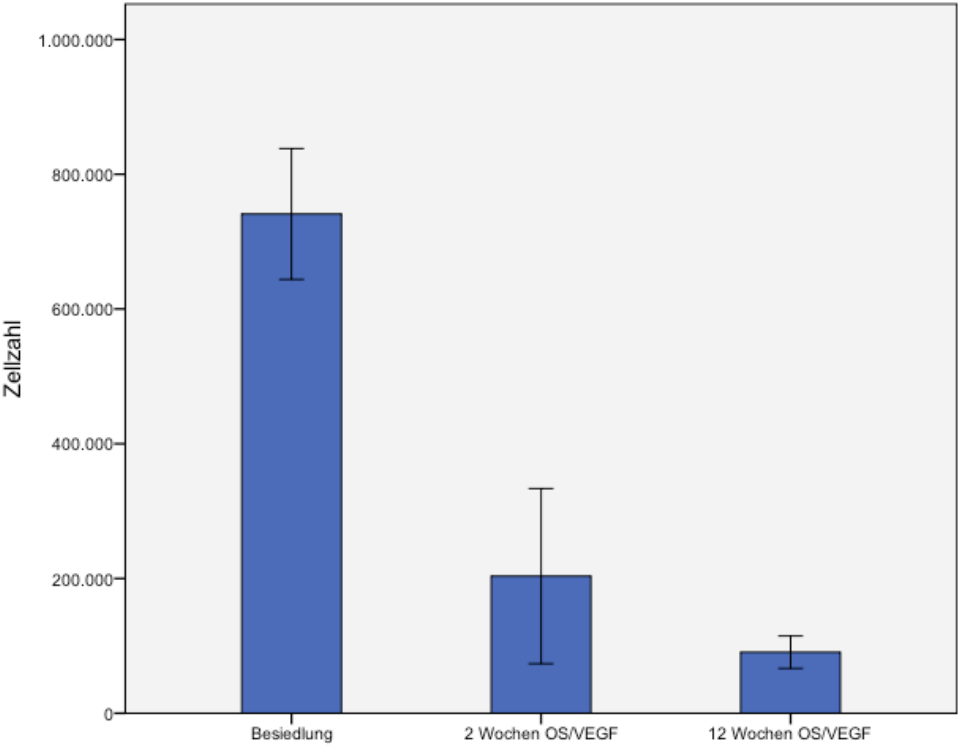


Abb. 20 Entwicklung der Anzahl der überlebenden hMSC zu beiden Explantationszeitpunkten mit osteogener Stimulation und VEGF

Nur die ausschließlich osteogen stimulierte Gruppe wies, wie in Abbildung 21 ersichtlich, nach zwölf Wochen Implantationsdauer eine annähernd hohe Anzahl an überlebenden hMSC wie nach zwei Wochen auf. Dieser Unterschied war jedoch auch hier statistisch nicht signifikant.

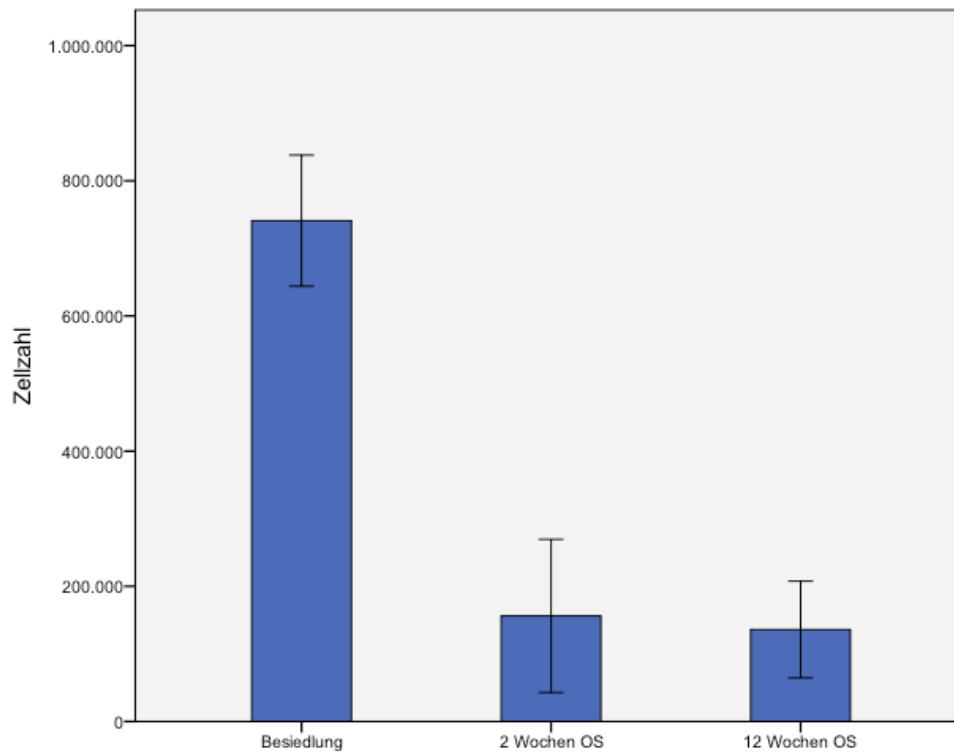


Abb. 21 Entwicklung der Anzahl der überlebenden hMSC zu beiden Explantationszeitpunkten mit osteogener Stimulation

Im Vergleich der rein osteogenen Stimulation mit der zusätzlichen Beimpfung mit VEGF war nach einer Verweildauer der Leitschienen *in vivo* von zwei Wochen eine höhere Anzahl von hMSC auf den mit VEGF behandelten Tutobones nachweisbar. Dagegen war nach zwölf Wochen Implantationsdauer die Zellzahl auf den mit VEGF beimpften Leitschienen geringer. Beides war jedoch ebenfalls statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 22).

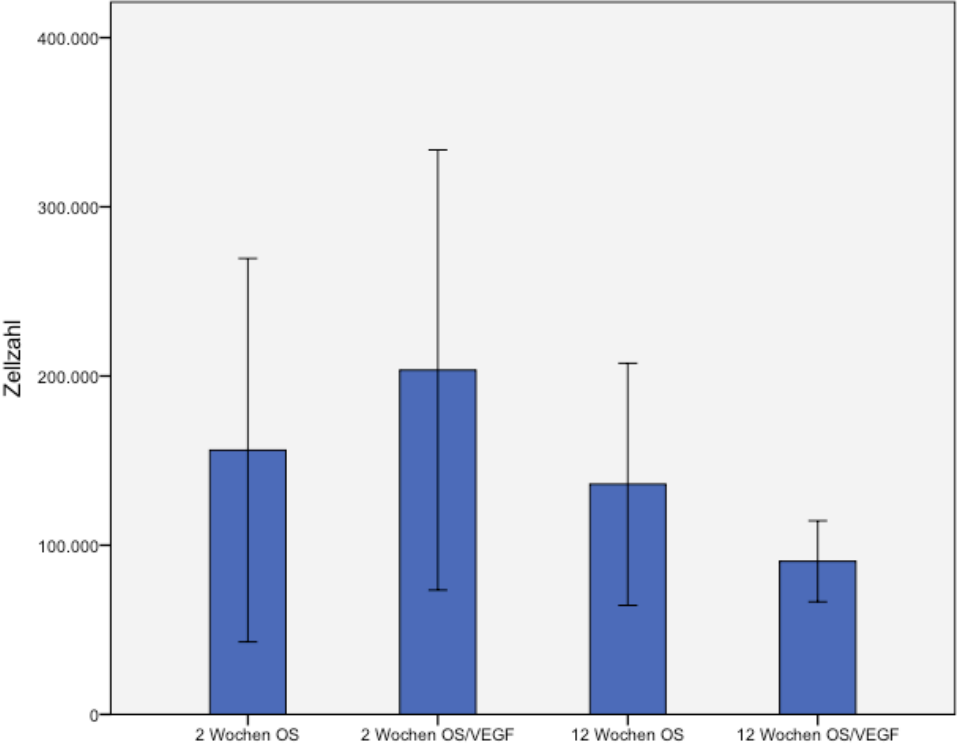


Abb. 22 Entwicklung der Anzahl überlebender hMSC zu beiden Explantationszeitpunkten: osteogen stimuliert, mit/ohne VEGF

4. Diskussion

4.1. Zellkultur und Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF)

In dieser Arbeit fanden pluripotente Stammzellen (hMSC) Verwendung, welche aus dem Knochenmark gesunder humaner Spender gewonnen wurden. Ihre Differenzierbarkeit in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten war hierbei von besonderem Interesse. Neben diesem Kriterium mussten die Zellen allerdings verschiedene weitere Eigenschaften aufweisen um als hMSC definiert zu werden (Dominici et al. 2006). So mussten sie auf dem Kunststoff einer Zellkulturflasche adhären sowie die Antigene CD105, CD73 und CD90 exprimieren. Andererseits durften weder die Antigene CD45, CD34, CD14 CD11b, CD79alpha oder CD19 noch HLA-DR Oberflächenmarker nachweisbar sein. Studien unserer Arbeitsgruppe belegten für kommerziell erhältliche Zellen der Firma Camrex einen hohen Anteil an hMSC (Docheva et al. 2007; Schieker et al. 2007). Als weiterer Vorteil erwies sich die hohe Populationsverdopplungsrate. Viele Arbeitsgruppen verwendeten jedoch bone marrow stromal cell (BMSC) für ähnliche Studien, was die Vergleichbarkeit der Resultate aufgrund eines nur etwa 30%igen Anteils an hMSC erschwert (Muraglia et al. 2000).

Auch die in der Literatur beschriebene Vielfalt von Leitschienen zur Besiedlung mit Zellen mit unterschiedlichen physikalischen und biologischen Eigenschaften schränkt die Vergleichbarkeit ähnlicher Studien ein. Primär lassen sich diese in anorganische und organische Matrizen unterteilen (Schieker et al. 2008). Ersteren sind vor allem die Calcium-Phosphat-Keramiken wie Hydroxyapatit und Tricalcium-Phosphat sowie deren Kombination zuzuordnen. Trotz der starken Ähnlichkeit mit mineralisierter Knochenmatrix erweist sich hier jedoch der inkomplette Abbau auch über sehr lange Beobachtungszeiträume als problematisch (Rueger et al. 1998; Koepp et al. 2004). Biodegradierbare Polymere wie Kollagen, Fibrin oder Stärke bilden eine wesentliche Gruppe organischer Leitschienenmaterialien. Diese besitzen osteokonduktive Eigenschaften und sind biokompatibel (Bensaid et al. 2003; Salgado et al. 2007).

Einschränkend sind bei der Verwendung von reinen Polymerleitschienen neben der unzureichenden mechanischen Stabilität vor allem die beim Abbau entstehenden Säuren zu sehen, welche sowohl zellschädigend wirken als auch lokale Entzündungsreaktionen hervorrufen können (Kohn et al. 2002).

Ebenfalls zu den organischen Leitschienen sind behandelte spongiöse Knochenmaterialien allogener oder xenogener Herkunft zu zählen. Diese kommen aufgrund ihrer geometrischen Feinstruktur den physiologischen Verhältnissen *in vivo* am nächsten (Kneser et al. 2006), weshalb die Wahl in dieser Arbeit auf lösungsmittelkonservierte und strahlensterilisierte bovine Spongiosa (Tutobone) der Firma Tutogen Medical GmbH (Neunkirchen am Brand, Deutschland) fiel. Hierbei bleibt beim Herstellungsprozess die natürliche Knochenstruktur ebenso wie ihre biomechanischen Eigenschaften unbeeinträchtigt (Tadic et al. 2004). Zusätzlich bot die innere Trabekelstruktur und Porengröße eine ausreichend große innere Fläche für die Anhaftung von Zellen bei der Besiedlung (Vanis et al.). Des Weiteren zeichneten sich derartige Matrizen durch sowohl osteoinduktive als auch osteokonduktive Eigenschaften (Glowacki 2005) und eine positive Beeinflussung der Defektheilung aus (Baer et al. 2002). Beim Einsatz dieses Knochenersatzmaterials in Defektzonen konnte zwar eine gute ossäre Integration ohne bindegewebige Abgrenzung der Leitschiene nachgewiesen werden, allerdings war auch hier ein inkompletter Abbau wie bei den synthetischen Keramiken zu beobachten. Dies stellt gegenüber den Polymeren einen entscheidenden Nachteil dar. Die histologisch nachweisbaren Reste zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Knochen (Kessler et al. 2001; Thorwarth et al. 2007). Im Rahmen der klinischen Anwendung von Leitschienen xenogener Herkunft kann zudem eine Überempfindlichkeitsreaktion wie auch die Übertragung aktuell noch nicht nachweisbarer Krankheitserreger nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Glowacki 2005). Insgesamt machen die bereits erfolgte klinische Zulassung wie auch bisherige Forschungsergebnisse auf dem Gebiet des Tissue Engineering Tutobone zu einer guten Option. In aktuellen Studien finden inzwischen jedoch auch Leitschienen aus Verbundmaterial Anwendung, welche die gewünschten Eigenschaften der unterschiedlichen Materialklassen in sich vereinen (Gentile et al. 2010; Raucci et al. 2010).

Neben der Wahl geeigneter Leitschienen stellt auch die Zelldichte auf den Konstrukten einen sehr wichtigen Faktor hinsichtlich der Ausbildung einer Zellmatrix dar (Holy et al. 2000; Olivier et al. 2004). Bei der Wahl der Besiedlungsmethode ist daher vor allem eine hohe Besiedlungseffizienz anzustreben. Diese kann durch die Kombination verschiedener Ansätze optimiert werden. Durch die sechsstündige Inkubation der Leitschienen in FBS und über Nacht in MSCGM konnten sich Serumproteine auf der Leitschiene ablagern, was eine verbesserte Anhaftung der Zellen ermöglichte (McFarland et al. 1999; Anselme 2000). Die auf die Leitschienen aufgebrauchte Zellmenge von 10^6 Zellen war, bei Berücksichtigung der Leitschienenengröße, im Vergleich zu anderen Arbeiten relativ hoch gewählt (van den Dolder et al. 2003; Seitz et al. 2007), um so eine höhere Zelldichte auf den Tutobones zu erreichen. Diese kann möglicherweise durch noch höhere Zellzahlen weiter gesteigert werden. So konnte die Arbeitsgruppe um Braccini einen positiven Zusammenhang zwischen der Anzahl der aufgebrauchten Zellen und der osteogenen Potenz der Konstrukte zeigen (Braccini et al. 2007). Zusätzlich wurde das Zellsuspensionsvolumen bei der Inokulation minimiert, um den Anteil der auf der Zellkulturplatte adhärierenden Zellen möglichst gering zu halten. Die in dieser Arbeit gewählte Besiedlungsmethode mit mehrfacher Resuspension und erneutem Aufpipettieren der Zellsuspension auf die Leitschienen stellte eine weitere Optimierung dar, da nach einer Stunde unter statischen Besiedlungsbedingungen nur etwa 25% der initial aufgebrauchten Zellen der Matrix anhaften (Holy et al. 2000). Da die Besiedlung in 48-Well-Platten durchgeführt wurde, wäre bei Berücksichtigung der Größe der verwendeten Leitschienen bei Verwendung von 96-Well-Platten eine weitere Optimierung der Besiedlungseffizienz denkbar.

Um die Anzahl der nach Abschluß des Besiedlungsprozesses auf den Leitschienen befindlichen hMSC genau zu bestimmen wurden die in den Well-Platten verbliebenen Zellen für jedes Tutobone einzeln ausgezählt und somit die Besiedlungseffizienz errechnet. In Anbetracht der geringen Größe der von uns gewählten Leitschienen konnte im Vergleich zu ähnlichen Studien mit statischer Besiedlungsmethode eine sehr gute Effizienz erzielt werden (Li et al. 2001; Wendt et al. 2003). Aufgrund dieser fehlenden Angabe in vielen Studien (Boo et al. 2002; Bensaïd et al. 2005) ist die Vergleichbarkeit jedoch eingeschränkt.

Nach erfolgreicher Besiedlung der Leitschienen ist eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung essentiell, um das Überleben der aufgebrauchten Zellen zu gewährleisten. Dies ist allerdings nur in den Randbereichen, nicht jedoch im Inneren der Konstrukte mittels Diffusion möglich (Muschler et al. 2004). Das Einsprossen von Kapillaren in die Leitschienen ist somit von besonderer Bedeutung (Hausman et al. 2001).

Eine wichtige Voraussetzung für eine suffiziente Neoangiogenese ist die Porengröße der verwendeten Leitschienen, welche größer als 300 μm sein sollte (Kuboki et al. 2001; Fisher et al. 2002). Dies war bei den in dieser Arbeit gewählten Leitschienen gewährleistet (Vanis et al. 2006).

Ferner kann die Knochenheilung und -neubildung durch die Anwesenheit verschiedener Cytokine, worunter VEGF hinsichtlich der Neoangiogenese von besonderer Bedeutung ist (Kaigler et al. 2006), stimuliert werden (Bilezikian et al. 2002). Somit kann durch die Applikation von VEGF auf die Leitschienen unmittelbar vor der Implantation die Kapillareinsprossung in die Konstrukte sowie die ektopische Knochenneubildung verbessert werden (Kempen et al. 2009). Auf diese Weise kann zwar eine hohe Anfangskonzentration von VEGF auf den Leitschienen erreicht werden, nicht jedoch eine kontinuierliche Freisetzung über den gesamten Implantationszeitraum. In der Folge kommt es zur Bildung vieler kleiner, jedoch unreifer Blutgefäße (Chen et al. 2007). Durch kontinuierliche Freisetzung niedrigerer VEGF-Konzentrationen sinkt zwar die Anzahl der neugebildeten Gefäße, jedoch sind diese deutlich größer und meist ausgereift (Chen et al. 2007). Die in dieser Arbeit verwendete Applikationsform von VEGF stimulierte daher zwar die Angiogenese, die neugebildeten Gefäße waren aber möglicherweise zu klein, um die Zellen ausreichend zu versorgen. Dies stellt eine mögliche Erklärung für den ausbleibenden Effekt der VEGF-Applikation und die ähnlichen Ergebnisse früherer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ohne Verwendung von VEGF dar (Schieker et al. 2004; Seitz et al. 2007). In ähnlichen Studien finden daher oftmals Leitschienen mit eingearbeitetem VEGF oder vorbehandelte Leitschienen zur prolongierten Bindung von VEGF Verwendung (Barralet et al. 2009; Chen et al. 2010).

4.2. Tierversuche und Nachweismethoden für humane DNA

Für diese Arbeit wurde ein ektopes Implantationsmodell gewählt, obwohl hierunter sowohl die für die Knochenheilung wichtigen biomechanischen Einflüsse wegfallen (Rath et al. 2008) als auch eine Übertragung auf einen späteren orthotopen Einsatz nicht unproblematisch ist (Kruyt et al. 2004; Kruyt et al. 2007). Der fehlende Einfluß parakriner Faktoren des Wirtslagers, der Wegfall von Wechselwirkungen mit ortsständigen Osteoblasten oder Entzündungszellen (Caplan et al. 2001) sowie die Verhinderung periostaler Knochenneubildung (Kruyt et al. 2003) sind für diese Studie jedoch von entscheidendem Vorteil. Somit ermöglicht ein ektopes Modell eine bessere Untersuchbarkeit der Knochenneubildung aus den implantierten Zellen sowohl hinsichtlich der Effekte der Leitschiene auf Zelldifferenzierung und Proliferation als auch der gebildeten extrazellulären Matrix (Ferrera et al. 2002).

Trotz Verwendung von Leitschienen, deren Größe die kritische Diffusionsstrecke von 3,5 mm unterschritt (Kruyt et al. 2004), war sowohl nach 2 als auch nach 12 Wochen eine deutliche Abnahme der auf die Leitschienen aufgebrachten Zellen zu verzeichnen. Ursächlich hierfür ist möglicherweise eine zu geringe Durchblutung des für diese Studie gewählten subkutanen Lagers. In einer vergleichenden Studie konnten Hartman et al. allerdings keinen Vorteil der Implantation besiedelter Konstrukte in gut vaskularisiertes Muskelgewebe gegenüber subkutaner Implantation nachweisen (Hartman et al. 2004). Auch bei orthotoper Implantation ist eine bessere Durchblutungssituation zu erwarten. Kruyt et al. konnten jedoch keine vermehrte zellbasierte Knochenneubildung im Vergleich zum ektopen Modell zeigen (Kruyt et al. 2007), so dass das von uns gewählte Implantatlager für die Fragestellung dieser Arbeit eine gute Option darstellt.

Beim Tissue Engineering ist der Nachweis von auf der Leitschiene verbliebenen Zellen sowie deren Quantifizierung von entscheidender Bedeutung. Ferner gilt es eine Migration der Zellen in Wirtsorgane auszuschließen (Schieker et al. 2004).

Die PCR stellte für die zugrunde gelegte Fragestellung das geeignete Nachweisverfahren dar. Damit konnte durch Isolation der DNA aus den Wirtsorganen unter Verwendung oben genannter humanspezifischer Primer humane DNA bis auf 1 Zelle in 10^6 murinen Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund der damit erreichten hohen Sensitivität fand die PCR bereits früh Anwendung in der klinischen Diagnostik

wie auch im Bereich der Knochenforschung (Muramatsu et al. 2003). Darüber hinaus ermöglichte dieses Verfahren das gesamte explantierte Material zu analysieren, da jeweils die DNA aus dem ganzen Organ beziehungsweise der Leitschiene als Matrize diente. Eine mögliche Zellmigration in andere, nicht untersuchte Organanteile konnte somit ausgeschlossen werden. Zudem erwies sich die mögliche Verwendung der gewonnenen DNA-Proben sowohl für die qualitative als auch die quantitative Auswertung (Gibson et al. 1996) als sehr vorteilhaft.

Als Alternative dazu steht die Technik der in situ Hybridisierung zur Verfügung. Nach Anfertigung von Gewebeschnitten werden dabei humane Nukleinsäuren durch passende Sonden sichtbar gemacht, was eine mikroskopische Untersuchung in Mausgewebe eingebetteter humaner Zellen ermöglicht. Vor allem für eine qualitative Auswertung ist diese Methode vorteilhaft (Speel 1999), da das Signal in Bezug zur Morphologie der Gewebeprobe gesehen werden kann. Als limitierender Faktor erweist sich jedoch nicht nur die Anzahl der Gewebeschnitte sondern auch die Auswahl des richtigen Gewebeschnitts und die Schichtdicke. Ferner besteht die einzige Möglichkeit einer quantitativen Auswertung mit dieser Methode in einer mikroskopischen Auszählung der angefärbten Zellen, was jedoch aufgrund der zuvor genannten Limitationen nur eine Schätzung darstellt. Im Rahmen qualitativer Auswertungen beim Tissue Engineering findet die in situ Hybridisierung auch in aktuellen Studien Verwendung (Niemeyer et al. 2006; Niemeyer et al. 2008).

Insgesamt stellte die PCR aufgrund der sehr hohen Sensitivität sowie des im Vergleich zur in situ Hybridisierung deutlich geringeren zeitlichen und apparativen Aufwands das geeignete Nachweisverfahren dar. Der dadurch fehlende morphologische Bezug innerhalb des Organs im Falle eines positiven Signals war hierbei hintergründig, da keine Migration der Zellen aus dem ektopen Lager zu erwarten war (Schieker et al. 2004; Seitz et al. 2007). Die Verteilung der Zellen innerhalb der Leitschienen zum Zeitpunkt der Explantation konnte auf diese Weise jedoch nicht untersucht werden. Eine histologische und immunhistochemische Untersuchung der Konstrukte wurde in einer gesonderten Dissertationsarbeit durchgeführt.

Im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchung mittels PCR ist die Wahl des für diese Fragestellung optimalen Primerpaares für die Sensitivität der PCR von maßgeblicher Bedeutung. Dabei ist es für die qualitative Auswertung wichtig eine

hohe Kopienzahl des DNA-Abschnitts zu erreichen, um eine optimale Darstellung im Agarosegel zu gewährleisten. Bereiche die innerhalb der DNA mehrfach vorkommen, erscheinen daher als geeignet, da diese bei exponentieller Amplifikation ein Vielfaches mehr an Kopien liefern, als die Vervielfältigung einer einzelnen Sequenz. Des Weiteren ist aber auch die Humanspezifität des gewählten Primerpaares unerlässlich, um menschliche Zellen in murinem Gewebe zuverlässig nachweisen zu können. Die zur Satelliten-DNA gehörende Alpha-Satelliten-Klasse erfüllt beide oben genannten Voraussetzungen. Diese bildet die DNA-Hauptklasse in der Zentromerregion des humanen Chromosoms und zeichnet sich sowohl durch eine hohe Wiederholungszahl einzelner Sequenzen als auch durch ihre Speziesspezifität aus (Warburton et al. 1991). Becker et al. etablierte dazu ein Primerpaar, welches in der Alpha-Satelliten Region im Zentromerbereich des humanen Chromosoms 17 bindet (Becker et al. 2002). Dieses ermöglicht den Nachweis auch kleinster DNA-Mengen, da sich identische Sequenzen dieser Region bis zu 1000-mal wiederholen und somit eine sehr hohe Kopienzahl liefern. Die Voraussetzung der Humanspezifität wurde durch einen Abgleich mit der MouseBLAST Genomdatenbank (MGI, The Jackson Laboratory) erfüllt. Dieser erbrachte keine Übereinstimmung mit einer Maus DNA Sequenz. Unsere Arbeitsgruppe etablierte mit diesem Primerpaar ein PCR-Verfahren, womit ein Nachweis von 1 hMSC in 10^6 Mausfibroblasten sicher möglich war (Schieker et al. 2004).

Bei vorher festgelegtem Spender- und Empfängergeschlecht besteht auch die Möglichkeit Y-chromosomale DNA-Abschnitte zu amplifizieren (Koldehoff et al. 2006). Auch diese Sequenzen erfüllen beide oben genannten Voraussetzungen, werden aber sowohl durch die Einschränkung auf das Geschlecht als auch durch eine niedrigere Sensitivität limitiert (Muramatsu et al. 2005).

Für die quantitative PCR fand ein speziell designter Primer der Firma SearchLC (Heidelberg, Germany) Verwendung, da der Versuch unserer Arbeitsgruppe das zuvor beschriebene Primerpaar einzusetzen misslang. Bei Einsatz des neuen Primerpaares finden sich die amplifizierten Segmente nicht an einem definierten Ort wie der Zentromerregion, sondern sind über das ganze humane Genom auf mehreren Chromosomen verteilt. Zusätzlich konnte in Kontrollexperimenten eine Bindung an murine DNA ausgeschlossen werden, womit beide Voraussetzungen für einen sensitiven Nachweis erfüllt wurden. Durch die Verwendung einer Standardverdünnungsreihe konnte eine Standardkurve erstellt werden (Kubista et al.

2006), die eine Quantifizierung bis auf einen Bereich von weniger als einer hMSC ermöglichte (Seitz et al. 2007).

4.3. Qualitative und quantitative Untersuchung

Neben dem Überleben der implantierten Zellen auf den Leitschienen *in vivo* ist es wichtig, dass die Zellen am Implantationsort verbleiben und nicht in andere Organe wandern, wo sie ein unerwünschtes Zellwachstum verursachen könnten. Im Rahmen von tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass nach intravenöser Applikation von human mesenchymalen Stammzellen es zu einer Absiedlung in verschiedene Organsysteme des Empfängers kommt (Cancedda et al. 2003; Devine et al. 2003).

In den in dieser Arbeit untersuchten Organen (Herz, Lunge, Nieren, Leber, Milz, Gehirn, Hoden, Blut) war zu keinem der beiden Explantationszeitpunkte humane DNA nachweisbar. Auch in das, den besiedelten Leitschienen unmittelbar aufliegende Haut- und Muskelgewebe fand keine Migration der hMSC statt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe (Schieker et al. 2004; Seitz et al. 2007). In diesen Arbeiten wurde jedoch die Hypothese aufgestellt, dass dies vor allem mit der geringen Vaskularisierung in Zusammenhang steht. Die Arbeitsgruppe um Muramatsu zeigte nämlich, dass es bei einem Gefäß-Knochen-Transplantat, folglich einer bestmöglichen Vaskularisierung, durchaus zu einer Migration von Spenderzellen in Wirtsorgane wie Milz und Thymus kommt (Muramatsu et al. 2003). In dieser Arbeit wurde die Neoangiogenese mittels VEGF stimuliert. Dies impliziert, dass aus dem ektopen Lager auch bei verbesserter Vaskularisierung der Leitschienen keine Migration in Wirtsorgane und interessanterweise auch in unmittelbar aufliegende Gewebe stattfindet. Der histologische Nachweis von, im Vergleich zu Vorgängerarbeiten (Schieker et al. 2004; Seitz et al. 2007), vermehrt in die mit VEGF behandelten Leitschienen einsprossenden Gefäßen, untermauert diese Hypothese. Dieses Ergebnis lässt jedoch keinen Rückschluss auf das Migrationsverhalten humaner mesenchymaler Stammzellen in orthotopen Modellen zu.

Bei der Explantation der Leitschienen erschienen die mit VEGF behandelten Konstrukte teilweise mit extrazellulärer Matrix durchbaut zu sein. Dieser makroskopische Eindruck konnte jedoch in der histologischen Untersuchung nicht bestätigt werden. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen früherer Studien unserer Arbeitsgruppe. Dabei wurden jedoch undifferenzierte hMSCs sowie deutlich größere Leitschienen eingesetzt. Als Ursache für die fehlende Knochenneubildung wurden daher die ausbleibende Bildung extrazellulärer Matrix *in vitro* durch die undifferenzierten hMSCs, die mangelnde Versorgung der Zellen im Zentrum der großen Leitschienen sowie eine zu geringe Zelldichte angesehen (Schieker et al. 2004; Seitz et al. 2007). Da nun auch in dieser Arbeit trotz osteogener Differenzierung, höherer Zelldichte und sehr kleiner Leitschienen keine Knochenneubildung nachgewiesen werden konnte, stellt möglicherweise die geringe Durchblutung des von uns gewählten ektopen Lagers einen limitierenden Faktor dar. So konnte in der histologischen Auswertung nach 2 Wochen *in vivo* unabhängig vom Einsatz des angiogenetisch wirksamen VEGF nur eine peripher betonte Kapillarisation gezeigt werden (Dissertationsarbeit cand. med. U. Lenze). Die Wahl eines besser durchbluteten Implantatlagers könnte daher zielführend sein. Allerdings kann auch die nur geringe Osteoinduktivität der von uns verwendeten Leitschienen im Vergleich zu anderen Materialien eine Ursache für die ausbleibende Knochenneubildung darstellen (Harris et al. 2004; Petrovic et al. 2006).

Die Auswertung der unbesiedelten Kontroll-Leitschienen ergab zu keinem Explantationszeitpunkt einen positiven Nachweis humaner DNA. Eine Migration der Zellen zwischen den Leitschienen aufgrund der räumlichen Nähe wie auch eine Einwanderung von eventuell zirkulierenden Zellen konnte somit ausgeschlossen werden. Bareille et al. führt dies ebenfalls auf die mangelnde Vaskularisierung zurück (Bareille et al. 2000). In dieser Arbeit konnte dies jedoch auch bei einer verbesserten Blutversorgung der Leitschienen durch Einsatz von VEGF gezeigt werden.

Im Gegensatz zu anderen Studien konnte in den besiedelten Leitschienen zu beiden Explantationszeitpunkten, zwei und zwölf Wochen, humane DNA nachgewiesen werden. Dies entsprach unseren Erwartungen, da unserer Arbeitsgruppe bereits der Nachweis humaner DNA bis zwölf Wochen nach ektopter Implantation gelang (Schieker et al. 2004). Bareille et al. gelang jedoch ein Nachweis humaner Zellen lediglich 2 Wochen nach ektopter Implantation (Bareille et al. 2000) und die Arbeitsgruppe um De Bari konnte 6 Wochen nach intramuskulärer Injektion von

hMSC diese nicht mehr nachweisen (De Bari et al. 2004). Dies impliziert eine deutlich bessere Überlebenszeit gegenüber anderen Studien.

Eine zuverlässige semiquantitative Auswertung war aufgrund der relativ hoch gewählten Anzahl der PCR-Zyklen nur eingeschränkt möglich, da unser Augenmerk vor allem auf den Nachweis auch einzelner humaner Zellen im murinen Gewebe lag (Becker et al. 2002).

Nachdem in allen besiedelten Leitschienen humane DNA nachgewiesen werden konnte war der nächste Schritt die Quantifizierung der Zellen. Erst damit war eine Beurteilung der osteogenen Stimulation *in vitro* sowie des Einflusses von VEGF hinsichtlich einer verbesserten Überlebensrate der hMSCs möglich. Die Anzahl der überlebenden Zellen variierte jedoch innerhalb einer Versuchsgruppe zum Teil sehr stark. Insgesamt war eine deutliche Abnahme der Zellzahlen von der Besiedlung bis zu beiden Explantationszeitpunkten in allen Versuchsgruppen zu beobachten.

Die erste Versuchsgruppe bestand aus besiedelten Leitschienen, welche weder osteogen stimuliert noch mit VEGF behandelt wurden. Neben der bereits oben erwähnten signifikanten Abnahme der Zellzahlen bis zu beiden Explantationszeitpunkten, konnten zudem auf den nach zwölf Wochen explantierten Leitschienen weniger Zellen nachgewiesen werden als auf den nach zwei Wochen explantierten Konstrukten. Die Unterschiede der einzelnen Tubobones hinsichtlich der Zelldichte waren in dieser Gruppe relativ gering. Insgesamt waren die Ergebnisse in dieser Gruppe so zu erwarten und stehen in Einklang mit ähnlichen Studien (Kruyt et al. 2003). Einheitlich wird hierfür ein kontinuierliches Absterben der Zellen, vor allem im Zentrum der Leitschienen, aufgrund mangelnder Vaskularisierung und der damit verbundenen Hypoxie und unzureichenden Nährstoffversorgung verantwortlich gemacht (Quarto et al. 2001; Kneser et al. 2006). So konnte die Arbeitsgruppe um Volkmer in einer aktuellen Studie zeigen, dass die Sauerstoffkonzentration im Zentrum statisch kultivierter Konstrukte bereits nach 5 Tagen auf 0% abfällt, wohingegen im Zentrum dynamisch kultivierter Leitschienen noch Werte von 4% gemessen werden konnten (Volkmer et al. 2008).

In der zweiten Gruppe wurden die besiedelten Konstrukte alle osteogen stimuliert und die Hälfte mit VEGF behandelt. Die Explantation fand nach zwei Wochen statt. Hier waren insgesamt höhere Zellzahlen nachweisbar als in den unstimulierten Leitschienen der ersten Versuchsgruppe, was auf eine bessere Adhärenz von

Ostoblasten im Vergleich zu hMSCs schließen lässt (Anselme 2000). Allerdings waren auch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Konstrukten zu beobachten, was vermutlich auf eine bessere Nährstoffversorgung einzelner Leitschienen zurückzuführen ist. Des Weiteren konnten auf den mit VEGF behandelten Leitschienen mehr Zellen nachgewiesen werden als bei reiner osteogener Stimulation. Dies impliziert eine zumindest kurzfristige Wirkung des applizierten VEGF auf die Angiogenese und in der Folge eine verbesserte Versorgung der aufgebrauchten Zellen.

In Kontrast dazu stehen jedoch die Ergebnisse der dritten Gruppe, in welcher wiederum alle Leitschienen osteogen stimuliert und die Hälfte mit VEGF behandelt wurden, aber die Explantation erst nach zwölf Wochen stattfand. Hierbei waren nämlich auf den rein osteogen stimulierten Leitschienen mehr überlebende Zellen nachweisbar als bei zusätzlicher Applikation von VEGF. Dies ist vermutlich auf die kurzfristige Wirkung von aufpipettiertem VEGF mit Ausbildung vieler kleiner, jedoch unreifer Gefäße zurückzuführen (Chen et al. 2007), die offenbar keine ausreichende Versorgung der Zellen über einen Implantationszeitraum von 12 Wochen ermöglichen.

Interessant erscheinen in diesem Zusammenhang die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen, die Leitschienen mit eingearbeitetem VEGF verwendeten. Dadurch wird über einen längeren Zeitraum VEGF freigesetzt und die Bildung größerer und reifer Blutgefäße angeregt (Kanczler et al. 2008; Chen et al. 2010).

Als äußerst kritisch für das Überleben der hMSC sind die ersten Stunden nach der Implantation in das relativ gefäßarme subkutane Gewebe zu sehen. Obwohl die in dieser Arbeit verwendeten Leitschienen die kritische Diffusionsstrecke von 3,5 mm deutlich unterschreiten (Kruyt et al. 2004), ist in dieser Zeit eine relative Mangelversorgung der Zellen anzunehmen. Dies steht im Einklang mit ähnlichen Studien und erklärt auch die signifikante Abnahme der Zellzahlen von der Besiedlung bis zur Explantation in allen Versuchsgruppen (De Bari et al. 2004; Kruyt et al. 2004).

4.4. Anregungen und Ausblick

4.4.1. Anregungen

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse geben Anlass einzelne Aspekte des Versuchsaufbaus für folgende Studien zu optimieren. So gilt es die Besiedlungseffizienz, hier 40 – 80%, zu verbessern, wodurch es zu einer besseren Zell-Matrix-Interaktion kommt (Holy et al. 2000; Alvarez-Barreto et al. 2007). Trotz weiter Verbreitung statischer Besiedlungsmethoden scheinen diese dynamischen Verfahren deutlich unterlegen zu sein, da mit Letzteren sowohl höhere Besiedlungseffizienzen als auch eine verbesserte Verteilung der Zellen innerhalb der Leitschienen erreicht werden kann (Bancroft et al. 2003; Wendt et al. 2003).

Auch die von uns gewählte statische Kultivierung der besiedelten Konstrukte erscheint nicht optimal für die Proliferation der Zellen und der damit verbundenen späteren Knochenneubildung *in vivo*. So konnten Zhao et al. nach 40 Tagen *in vitro* signifikant höhere Zellzahlen auf dynamisch kultivierten Leitschienen nachweisen als auf statisch kultivierten Kontrollen (Zhao et al. 2005). Jedoch ist die Wahl eines dynamischen Verfahrens sowohl bei der Besiedlung als auch bei der Kultivierung mit einem erheblich höheren Materialaufwand verbunden.

Ferner wäre es sinnvoll zusätzlich besiedelte Leitschienen mit den Übrigen *in vitro* zu kultivieren, diese aber anstatt einer Implantation molekularbiologisch und histologisch zu untersuchen, um ein Absterben der Zellen bereits vor der Implantation auszuschließen. Des Weiteren könnte die Zellverteilung innerhalb des Konstrukts zum Beispiel elektronenmikroskopisch evaluiert werden.

Die in dieser Arbeit angewandte Methode der Applikation von VEGF ist aufgrund der Ergebnisse nach zwölf Wochen Implantationsdauer ebenfalls als nicht optimal zu werten. Daher sollte die Wahl von Leitschienen erwogen werden, welche über einen längeren Zeitraum kontinuierlich VEGF freisetzen, um positive Effekte bezüglich der Angiogenese aber auch der Knochenneubildung zu erzielen (Murphy et al. 2004; Huang et al. 2005). Leider erschwert dies jedoch die spätere Übertragbarkeit in den klinischen Alltag aufgrund der meist fehlenden klinischen Zulassung solcher Matrizen.

4.4.2. Ausblick

Beim Tissue Engineering stellt die Vaskularisierung der Implantate eine der größten Herausforderungen dar. Ein Ansatzpunkt ist, wie in dieser Arbeit, der Einsatz von angiogenetisch wirksamen Wachstumsfaktoren. Ein äußerst vielversprechender Ansatzpunkt vor allem für große Konstrukte ist deren mikrochirurgischer Anschluss an das Gefäßsystem des Wirts mittels einer arterio-venösen Schlinge. Dabei wird eine autologe Vene um eine Leitschiene geschlungen und als arterio-venöser Shunt wieder angeschlossen. In verschiedenen neueren Studien konnte damit eine deutlich verbesserte Vaskularisierung der Konstrukte erzielt werden (Lokmic et al. 2007; Ren et al. 2008). Einen weiteren Ansatz stellt das Tissue Engineering selbst dar. So können mittels TE hergestellte Blutgefäße vor der Besiedlung in Leitschienen eingesetzt und somit eine verbesserte Versorgung der Zellen gewährleistet werden (Pelled et al. 2002).

Der Einsatz von Wachstumsfaktoren beim Tissue Engineering ist heute fast selbstverständlich. Dies ist vor allem auf das wachsende Verständnis ihrer Aufgaben und Wirkungsweisen, aber auch auf die gute Verfügbarkeit aufgrund rekombinanter Herstellungsverfahren zurückzuführen. Im Bereich der Knochenbiologie sind vor allem die *bone morphogenetic proteins* (BMPs) aufgrund ihrer Wirkung auf die Differenzierung und Proliferation von MSC zu matrixbildenden Osteoblasten (Huang et al. 2004) von großem Interesse. Klinisch wurde rhBMP-2 und rhBMP-7 von De Biase et al. erfolgreich im Rahmen experimenteller Studien zur Knochenheilung in Verbindung mit unterschiedlichen Leitschienen (De Biase et al. 2005) und von Zimmermann et al. zur Behandlung von Pseudarthrosen der langen Röhrenknochen eingesetzt (Zimmermann et al. 2006). Dennoch sind aufgrund der Vielzahl der einfließenden Faktoren nicht alle Zusammenhänge abschließend geklärt.

Die Kombination einiger oben genannter Aspekte wird durch die genetische Veränderung der verwendeten Zellen oder durch die Wahl neuentwickelter Leitschienen ermöglicht. So gelang der Arbeitsgruppe um Mosca mittels Transfektion eine Erweiterung des Genoms von MSCs, was zu einer vermehrten Bildung von speziellen Wachstumsfaktoren führte, jedoch keine Einschränkung des Stammzellcharakters zur Folge hatte (Mosca et al. 2000). In der aktuellen Literatur findet diese Methode daher bereits weite Verbreitung (Lee et al. 2006; Tang et al. 2008). Aber auch neuere Leitschienen ermöglichen neben erweiterter physikalischer

Eigenschaften von Verbundmaterialien eine kontinuierliche Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren (Basmanav et al. 2008; Kempen et al. 2009).

Vor diesem Hintergrund und dem rapide zunehmenden Kenntnisstand auf diesem Gebiet, ist, zumindest mittelfristig, von einer festen Integration des TE von Knochen in den klinischen Alltag auszugehen.

5. Zusammenfassung

In verschiedenen tierexperimentellen Studien wurde die Knochenneubildung besiedelter Biomaterialien sowohl im heterotopen als auch orthotopen Lager untersucht. Die erzielten Ergebnisse waren dabei maßgeblich von den verwendeten Zellen, der Leitschienenart und den Kultivierungsbedingungen *in vitro* sowie von der Zugabe von Wachstumsfaktoren abhängig. Die meist nur geringe Knochenneubildung in den besiedelten Konstrukten wurde von den meisten Autoren auf eine mangelnde Nährstoffversorgung infolge ausbleibender Vaskularisierung zurückgeführt.

Ziel dieser Studie war es daher, den Einfluss der osteogenen Stimulation und Beimpfung mit vaskulär-endothelialelem Wachstumsfaktor auf die Knochenneubildung besiedelter Konstrukte *in vivo* zu untersuchen. Klinisch zugelassene Leitschienen boviner Herkunft (Tutubone, l=3mm) wurden dafür mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) statisch besiedelt und danach für 2 Wochen in osteogenem Stimulationsmedium kultiviert. Die Kontrollleitschienen wurden nach der Besiedlung in normalem Stammzellmedium kultiviert. Danach wurden die Konstrukte in athymen Nacktmäuse subkutan paravertebral implantiert. Unmittelbar vor der Implantation wurde auf die Hälfte der osteogen stimulierten Konstrukte murines VEGF aufgebracht, um eine vermehrte Neoangiogenese zu induzieren und damit eine verbesserte Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten. Nach 2 und 12 Wochen erfolgte die Explantation und Euthanasie der Versuchstiere. In der molekularbiologischen Untersuchung konnte weder eine Migration einzelner humaner Stammzellen aus dem ektopen Lager in das umliegende Gewebe noch in die Organe des Empfängers nachgewiesen werden. Die Untersuchung der explantierten Tutubones zeigte sowohl nach 2 als auch nach 12 Wochen Implantationsdauer eine signifikante Reduktion der ursprünglich aufbrachten Zellen. Zwischen den beiden Explantationszeitpunkten nach 2 und 12 Wochen konnte eine weitere, jedoch nicht signifikante Reduktion der hMSCs nachgewiesen werden. Durch die Beimpfung der besiedelten Konstrukte mit VEGF konnte kein Überlebensvorteil für die aufbrachten Zellen im Vergleich zu den rein osteogen stimulierten Konstrukten sowie den unstimulierten Kontrollen erzielt werden. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die meisten Zellen bereits innerhalb der

ersten 2 Wochen *in vivo* absterben. Dies ist möglicherweise auf eine zu langsame oder unzureichende Kapillarisierung trotz Applikation von VEGF zurückzuführen. Auch muss die in dieser Studie verwendete Menge sowie die Applikationsform des VEGF als mögliche Ursache für dieses Ergebnis in Betracht gezogen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abukawa H, Terai H, Hannouche D, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ (2003). "Formation of a mandibular condyle in vitro by tissue engineering." *J Oral Maxillofac Surg* 61(1): 94-100.
2. Ahsan T, Nerem RM (2005). "Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry." *Orthod Craniofac Res* 8(3): 134-40.
3. Alvarez-Barreto JF, Linehan SM, Shambaugh RL, Sikavitsas VI (2007). "Flow perfusion improves seeding of tissue engineering scaffolds with different architectures." *Ann Biomed Eng* 35(3): 429-42.
4. Anselme K (2000). "Osteoblast adhesion on biomaterials." *Biomaterials* 21(7): 667-81.
5. Baer W, Schaller P, Carl HD (2002). "Spongy hydroxyapatite in hand surgery-- a five year follow-up." *J Hand Surg [Br]* 27(1): 101-3.
6. Bancroft GN, Sikavitsas VI, Mikos AG (2003). "Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications." *Tissue Eng* 9(3): 549-54.
7. Bareille R, Lafage-Proust MH, Faucheux C, Laroche N, Wenz R, Dard M, Amedee J (2000). "Various evaluation techniques of newly formed bone in porous hydroxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extra-osseous site." *Biomaterials* 21(13): 1345-52.
8. Barralet J, Gbureck U, Habibovic P, Vorndran E, Gerard C, Doillon CJ (2009). "Angiogenesis in Calcium Phosphate Scaffolds by Inorganic Copper Ion Release." *Tissue Eng Part A*.

9. Basmanav FB, Kose GT, Hasirci V (2008). "Sequential growth factor delivery from complexed microspheres for bone tissue engineering." *Biomaterials* 29(31): 4195-204.
10. Bauer TW, Muschler GF (2000). "Bone graft materials. An overview of the basic science." *Clin Orthop Relat Res*(371): 10-27.
11. Becker M, Nitsche A, Neumann C, Aumann J, Junghahn I, Fichtner I (2002). "Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems." *Br J Cancer* 87(11): 1328-35.
12. Bensaïd W, Oudina K, Viateau V, Potier E, Bousson V, Blanchat C, et al. (2005). "De novo reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model." *Tissue Eng* 11(5-6): 814-24.
13. Bensaïd W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H (2003). "A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation." *Biomaterials* 24(14): 2497-502.
14. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (2002). *Principles of bone biology*, Academic Press.
15. Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K, et al. (2002). "Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold." *J Craniofac Surg* 13(2): 231-9; discussion 240-3.
16. Braccini A, Wendt D, Farhadi J, Schaeren S, Heberer M, Martin I (2007). "The osteogenicity of implanted engineered bone constructs is related to the density of clonogenic bone marrow stromal cells." *J Tissue Eng Regen Med* 1(1): 60-5.
17. Briem D, Linhart W, Lehmann W, Meenen NM, Rueger JM (2002). "[Long-term outcomes after using porous hydroxyapatite ceramics (Endobon) for surgical

- management of fractures of the head of the tibia]." *Unfallchirurg* 105(2): 128-33.
18. Buma P, Schreurs W, Verdonschot N (2004). "Skeletal tissue engineering--from in vitro studies to large animal models." *Biomaterials* 25(9): 1487-95.
 19. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW (2005). "Quantitative real-time RT-PCR--a perspective." *J Mol Endocrinol* 34(3): 597-601.
 20. Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R (2003). "Cell therapy for bone disease: a review of current status." *Stem Cells* 21(5): 610-9.
 21. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R (2003). "Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone." *Matrix Biol* 22(1): 81-91.
 22. Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G, Derubeis A, Muraglia A, Quarto R (2003). "Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone." *Novartis Found Symp* 249: 133-43; discussion 143-7, 170-4, 239-41.
 23. Caplan AI, Bruder SP (2001). "Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century." *Trends Mol Med* 7(6): 259-64.
 24. Chen L, He Z, Chen B, Yang M, Zhao Y, Sun W, et al. (2010). "Loading of VEGF to the heparin cross-linked demineralized bone matrix improves vascularization of the scaffold." *J Mater Sci Mater Med* 21(1): 309-17.
 25. Chen RR, Silva EA, Yuen WW, Mooney DJ (2007). "Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation." *Pharm Res* 24(2): 258-64.
 26. Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, Blyszczuk P, Cross M, Wobus AM (2003). "Potential of embryonic and adult stem cells in vitro." *Biol Chem* 384(10-11): 1391-409.

27. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP (2004). "Failure of in vitro-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo." *Arthritis Rheum* 50(1): 142-50.
28. De Biase A, Guerra F, Cipriano L, Lamazza L, Tucci E (2005). "Subantral filling by deantigenated heterologous bone and immediate fixture placement." *Minerva Stomatol* 54(1-2): 99-108.
29. Degano IR, Vilalta M, Bago JR, Matthies AM, Hubbell JA, Dimitriou H, et al. (2008). "Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells." *Biomaterials* 29(4): 427-37.
30. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R (2003). "Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates." *Blood* 101(8): 2999-3001.
31. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV (2005). "Current concepts of molecular aspects of bone healing." *Injury* 36(12): 1392-404.
32. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M (2007). "Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system." *J Cell Mol Med* 11(1): 21-38.
33. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* 8(4): 315-7.
34. Drosse I, Volkmer E, Capanna R, De Biase P, Mutschler W, Schieker M (2008). "Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach." *Injury* 39 Suppl 2: S9-20.

35. Drosse I, Volkmer E, Seitz S, Seitz H, Penzkofer R, Zahn K, et al. (2008). "Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective." *Tissue Eng Part C Methods* 14(1): 79-88.
36. Dumas A, Moreau MF, Gherardi RK, Basle MF, Chappard D (2009). "Bone grafts cultured with bone marrow stromal cells for the repair of critical bone defects: an experimental study in mice." *J Biomed Mater Res A* 90(4): 1218-29.
37. Ferrara N, Gerber HP (2001). "The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis." *Acta Haematol* 106(4): 148-56.
38. Ferrera D, Poggi S, Biassoni C, Dickson GR, Astigiano S, Barbieri O, et al. (2002). "Three-dimensional cultures of normal human osteoblasts: proliferation and differentiation potential in vitro and upon ectopic implantation in nude mice." *Bone* 30(5): 718-25.
39. Fisher JP, Vehof JW, Dean D, van der Waerden JP, Holland TA, Mikos AG, Jansen JA (2002). "Soft and hard tissue response to photocrosslinked poly(propylene fumarate) scaffolds in a rabbit model." *J Biomed Mater Res* 59(3): 547-56.
40. Friedlaender GE (2000). "Appropriate screening for prevention of infection transmission by musculoskeletal allografts." *Instr Course Lect* 49: 615-9.
41. Gentile P, Chiono V, Boccafoschi F, Baino F, Vitale-Brovarone C, Verne E, et al. (2010). "Composite films of gelatin and hydroxyapatite/bioactive glass for tissue-engineering applications." *J Biomater Sci Polym Ed* 21(8-9): 1207-26.
42. Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996). "A novel method for real time quantitative RT-PCR." *Genome Res* 6(10): 995-1001.

43. Glowacki J (2005). "A review of osteoinductive testing methods and sterilization processes for demineralized bone." *Cell Tissue Bank* 6(1): 3-12.
44. Goldstein SA (2002). "Tissue engineering: functional assessment and clinical outcome." *Ann N Y Acad Sci* 961: 183-92.
45. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, et al. (2002). "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients." *J Bone Joint Surg Am* 84-A(12): 2123-34.
46. Hak DJ (2007). "The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma." *J Am Acad Orthop Surg* 15(9): 525-36.
47. Haras D, Amoros JP (1994). "[Polymerase chain reaction, cold probes and clinical diagnosis]." *Sante* 4(1): 43-52.
48. Harris CT, Cooper LF (2004). "Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis." *J Biomed Mater Res A* 68(4): 747-55.
49. Hartman EH, Vehof JW, de Ruijter JE, Spauwen PH, Jansen JA (2004). "Ectopic bone formation in rats: the importance of vascularity of the acceptor site." *Biomaterials* 25(27): 5831-7.
50. Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ (2001). "Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis." *Bone* 29(6): 560-4.
51. Hollinger JO, Kleinschmidt JC (1990). "The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials." *J Craniofac Surg* 1(1): 60-8.

52. Holy CE, Shoichet MS, Davies JE (2000). "Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period." *J Biomed Mater Res* 51(3): 376-82.
53. Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ (2008). "Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds." *J Anat* 213(1): 66-72.
54. Huang W, Carlsen B, Wulur I, Rudkin G, Ishida K, Wu B, et al. (2004). "BMP-2 exerts differential effects on differentiation of rabbit bone marrow stromal cells grown in two-dimensional and three-dimensional systems and is required for in vitro bone formation in a PLGA scaffold." *Exp Cell Res* 299(2): 325-34.
55. Huang YC, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ (2005). "Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration." *J Bone Miner Res* 20(5): 848-57.
56. Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG (1997). "Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery." *J Biomed Mater Res* 36(1): 1-8.
57. Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, Yu SF, Dusich J, Purchio T, Contag PR (2003). "Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis." *Clin Exp Metastasis* 20(8): 733-44.
58. Joshi A (2004). "An investigation of post-operative morbidity following chin graft surgery." *Br Dent J* 196(4): 215-8; discussion 211.
59. Kaigler D, Wang Z, Horger K, Mooney DJ, Krebsbach PH (2006). "VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects." *J Bone Miner Res* 21(5): 735-44.

60. Kanczler JM, Oreffo RO (2008). "Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone." *Eur Cell Mater* 15: 100-14.
61. Kempen DH, Lu L, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, et al. (2009). "Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration." *Biomaterials*.
62. Kessler S, Mayr-Wohlfart U, Ignatius A, Puhl W, Claes L, Gunther KP (2001). "Solvent dehydrated bone transplants to bridge segmental bone defects: histomorphological and biomechanical investigations in an animal model." *Arch Orthop Trauma Surg* 121(8): 472-5.
63. Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT (2008). "Tissue engineering of bone: material and matrix considerations." *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1: 36-42.
64. Kneser U, Stangenberg L, Ohnolz J, Buettner O, Stern-Straeter J, Mobest D, et al. (2006). "Evaluation of processed bovine cancellous bone matrix seeded with syngenic osteoblasts in a critical size calvarial defect rat model." *J Cell Mol Med* 10(3): 695-707.
65. Koepp HE, Schorlemmer S, Kessler S, Brenner RE, Claes L, Gunther KP, Ignatius AA (2004). "Biocompatibility and osseointegration of beta-TCP: histomorphological and biomechanical studies in a weight-bearing sheep model." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 70(2): 209-17.
66. Kohn DH, Sarmadi M, Helman JI, Krebsbach PH (2002). "Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: implications for tissue engineering of bone." *J Biomed Mater Res* 60(2): 292-9.
67. Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH (2006). "Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms,

- standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences." *Am J Hematol* 81(10): 735-46.
68. Kraus KH, Kirker-Head C (2006). "Mesenchymal stem cells and bone regeneration." *Vet Surg* 35(3): 232-42.
69. Kruyt M, de Bruijn J, Rouwkema J, Clemens VB, Oner F, Verbout A, Dhert W (2008). "Analysis of the Dynamics of Bone Formation, Effect of Cell Seeding Density, and Potential of Allogeneic Cells in Cell-Based Bone Tissue Engineering in Goats." *Tissue Eng Part A*.
70. Kruyt MC, de Bruijn JD, Wilson CE, Oner FC, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, Dhert WJ (2003). "Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats." *Tissue Eng* 9(2): 327-36.
71. Kruyt MC, Dhert WJ, Oner C, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD (2004). "Optimization of bone-tissue engineering in goats." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 69(2): 113-20.
72. Kruyt MC, Dhert WJ, Oner FC, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD (2007). "Analysis of ectopic and orthotopic bone formation in cell-based tissue-engineered constructs in goats." *Biomaterials* 28(10): 1798-805.
73. Kruyt MC, Dhert WJ, Yuan H, Wilson CE, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD (2004). "Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat." *J Orthop Res* 22(3): 544-51.
74. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. (2006). "The real-time polymerase chain reaction." *Mol Aspects Med* 27(2-3): 95-125.

75. Kuboki Y, Jin Q, Takita H (2001). "Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis." *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1(Pt 2): S105-15.
76. Langer R, Vacanti JP (1993). "Tissue engineering." *Science* 260(5110): 920-6.
77. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF (2006). "Bone graft substitutes." *Expert Rev Med Devices* 3(1): 49-57.
78. Lee TC, Ho JT, Hung KS, Chen WF, Chung YH, Yang YL (2006). "Bone morphogenetic protein gene therapy using a fibrin scaffold for a rabbit spinal-fusion experiment." *Neurosurgery* 58(2): 373-80; discussion 373-80.
79. Li Y, Ma T, Kniss DA, Lasky LC, Yang ST (2001). "Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices." *Biotechnol Prog* 17(5): 935-44.
80. Liebschner MA (2004). "Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone." *Biomaterials* 25(9): 1697-714.
81. Lode A, Bernhardt A, Gelinsky M (2008). "Cultivation of human bone marrow stromal cells on three-dimensional scaffolds of mineralized collagen: influence of seeding density on colonization, proliferation and osteogenic differentiation." *J Tissue Eng Regen Med* 2(7): 400-7.
82. Lokmic Z, Stillaert F, Morrison WA, Thompson EW, Mitchell GM (2007). "An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct." *FASEB J* 21(2): 511-22.
83. Luginbuehl V, Wenk E, Koch A, Gander B, Merkle HP, Meinel L (2005). "Insulin-like growth factor I-releasing alginate-tricalciumphosphate composites for bone regeneration." *Pharm Res* 22(6): 940-50.

84. Matsushima A, Kotobuki N, Tadokoro M, Kawate K, Yajima H, Takakura Y, Ohgushi H (2009). "In vivo osteogenic capability of human mesenchymal cells cultured on hydroxyapatite and on beta-tricalcium phosphate." *Artif Organs* 33(6): 474-81.
85. McFarland CD, Mayer S, Scotchford C, Dalton BA, Steele JG, Downes S (1999). "Attachment of cultured human bone cells to novel polymers." *J Biomed Mater Res* 44(1): 1-11.
86. Mellonig JT, Prewett AB, Moyer MP (1992). "HIV inactivation in a bone allograft." *J Periodontol* 63(12): 979-83.
87. Mistry AS, Mikos AG (2005). "Tissue engineering strategies for bone regeneration." *Adv Biochem Eng Biotechnol* 94: 1-22.
88. Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, Davis-Sproul J, Chuang LC, Majumdar MK, et al. (2000). "Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery." *Clin Orthop Relat Res*(379 Suppl): S71-90.
89. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R (2000). "Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model." *J Cell Sci* 113 (Pt 7): 1161-6.
90. Muramatsu K, Bishop AT (2002). "Cell repopulation in vascularized bone grafts." *J Orthop Res* 20(4): 772-8.
91. Muramatsu K, Bishop AT, Sunagawa T, Valenzuela RG (2003). "Fate of donor cells in vascularized bone grafts: identification of systemic chimerism by the polymerase chain reaction." *Plast Reconstr Surg* 111(2): 763-72; discussion 773-4.

92. Muramatsu K, Kurokawa Y, You-Xin S, Bishop AT, Doi K (2005). "Cell traffic between donor and recipient following rat limb allograft." *J Orthop Res* 23(1): 181-7.
93. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ (2010). "The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering." *Biomaterials* 31(3): 461-6.
94. Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ (2004). "Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis." *J Dent Res* 83(3): 204-10.
95. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG (2004). "Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering." *J Bone Joint Surg Am* 86-A(7): 1541-58.
96. Naidoo R, Chetty R (1998). "The application of microsatellites in molecular pathology." *Pathol Oncol Res* 4(4): 310-5.
97. Niemeyer P, Kasten P, Simank HG, Fellenberg J, Seckinger A, Kreuz PC, et al. (2006). "Transplantation of mesenchymal stromal cells on mineralized collagen leads to ectopic matrix synthesis in vivo independently from prior in vitro differentiation." *Cytotherapy* 8(4): 354-66.
98. Niemeyer P, Vohrer J, Schmal H, Kasten P, Fellenberg J, Suedkamp NP, Mehlhorn AT (2008). "Survival of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice." *Cytotherapy* 10(8): 784-95.
99. Nussbaum R, McInnes R, Willard H (2001). *Genetics in Medicine*, W.B. Saunders Company.

100. Olivier V, Faucheux N, Hardouin P (2004). "Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery." *Drug Discov Today* 9(18): 803-11.
101. Ozturk A, Yetkin H, Memis L, Cila E, Bolukbasi S, Gemalmaz C (2006). "Demineralized bone matrix and hydroxyapatite/tri-calcium phosphate mixture for bone healing in rats." *Int Orthop* 30(3): 147-52.
102. Parikh SN (2002). "Bone graft substitutes: past, present, future." *J Postgrad Med* 48(2): 142-8.
103. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG (2008). "Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model." *Bone* 43(5): 931-40.
104. Pelled G, G T, Aslan H, Gazit Z, Gazit D (2002). "Mesenchymal stem cells for bone gene therapy and tissue engineering." *Curr Pharm Des* 8(21): 1917-28.
105. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. (2000). "Tissue-engineered bone regeneration." *Nat Biotechnol* 18(9): 959-63.
106. Petrovic L, Schlegel AK, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J (2006). "Different substitute biomaterials as potential scaffolds in tissue engineering." *Int J Oral Maxillofac Implants* 21(2): 225-31.
107. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* 284(5411): 143-7.
108. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. (2001). "Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells." *N Engl J Med* 344(5): 385-6.

109. Raina A, Dogra TD (2002). "Application of DNA fingerprinting in medicolegal practice." *J Indian Med Assoc* 100(12): 688-94.
110. Rath B, Nam J, Knobloch TJ, Lannutti JJ, Agarwal S (2008). "Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts." *J Biomech* 41(5): 1095-103.
111. Raucci MG, D'Anto V, Guarino V, Sardella E, Zeppetelli S, Favia P, Ambrosio L (2010). "Biomaterialized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration." *Acta Biomater.*
112. Ren LL, Ma DY, Feng X, Mao TQ, Liu YP, Ding Y (2008). "A novel strategy for prefabrication of large and axially vascularized tissue engineered bone by using an arteriovenous loop." *Med Hypotheses* 71(5): 737-40.
113. Rueger JM (1998). "[Bone substitution materials. Current status and prospects]." *Orthopade* 27(2): 72-9.
114. Rueger JM, Linhart W, Sommerfeldt D (1998). "[Biologic reactions to calcium phosphate ceramic implantations. Results of animal experiments]." *Orthopade* 27(2): 89-95.
115. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL, Davies JE (2007). "In vivo response to starch-based scaffolds designed for bone tissue engineering applications." *J Biomed Mater Res A* 80(4): 983-9.
116. Schantz JT, Hutmacher DW, Chim H, Ng KW, Lim TC, Teoh SH (2002). "Induction of ectopic bone formation by using human periosteal cells in combination with a novel scaffold technology." *Cell Transplant* 11(2): 125-38.
117. Schieker M, Heiss C, Mutschler W (2008). "[Bone substitutes]." *Unfallchirurg* 111(8): 613-20.

118. Schieker M, Mutschler W (2006). "[Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods]." *Unfallchirurg* 109(9): 715-32.
119. Schieker M, Pautke C, Haasters F, Schieker J, Docheva D, Bocker W, et al. (2007). "Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence." *J Anat* 210(5): 592-9.
120. Schieker M, Seitz S, Gulkan H, Nentwich M, Horvath G, Regauer M, et al. (2004). "[Tissue engineering of bone. Integration and migration of human mesenchymal stem cells in colonized constructs in a murine model]." *Orthopade* 33(12): 1354-60.
121. Schilling AF, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, Amling M (2004). "Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts." *Biomaterials* 25(18): 3963-72.
122. Schmitz JP, Hollinger JO (1986). "The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions." *Clin Orthop Relat Res*(205): 299-308.
123. Seitz S, Ern K, Lamper G, Docheva D, Drosse I, Milz S, et al. (2007). "Influence of in vitro cultivation on the integration of cell-matrix constructs after subcutaneous implantation." *Tissue Eng* 13(5): 1059-67.
124. Smith TF, Espy MJ, Mandrekar J, Jones MF, Cockerill FR, Patel R (2007). "Quantitative real-time polymerase chain reaction for evaluating DNAemia due to cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and BK virus in solid-organ transplant recipients." *Clin Infect Dis* 45(8): 1056-61.
125. Solomon EP, Berg LR, Martin DW (1999). *Biology, Barrosse, E.*
126. Speel EJ (1999). "Robert Feulgen Prize Lecture 1999. Detection and amplification systems for sensitive, multiple-target DNA and RNA in situ

- hybridization: looking inside cells with a spectrum of colors." *Histochem Cell Biol* 112(2): 89-113.
127. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP (2000). "Is human fracture hematoma inherently angiogenic?" *Clin Orthop Relat Res*(378): 224-37.
128. Tadic D, Epple M (2004). "A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone." *Biomaterials* 25(6): 987-94.
129. Tang Y, Tang W, Lin Y, Long J, Wang H, Liu L, Tian W (2008). "Combination of bone tissue engineering and BMP-2 gene transfection promotes bone healing in osteoporotic rats." *Cell Biol Int* 32(9): 1150-7.
130. Thorwarth M, Wehrhan F, Srour S, Schultze-Mosgau S, Felszeghy E, Bader RD, Schlegel KA (2007). "Evaluation of substitutes for bone: comparison of microradiographic and histological assessments." *Br J Oral Maxillofac Surg* 45(1): 41-7.
131. Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, Manske P, Lou J (2003). "Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats." *J Orthop Res* 21(1): 44-53.
132. Urist MR (1965). "Bone: formation by autoinduction." *Science* 150(698): 893-9.
133. Vacanti CA, Bonassar LJ (1999). "An overview of tissue engineered bone." *Clin Orthop Relat Res*(367 Suppl): S375-81.
134. Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shufflebarger J (2001). "Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone." *N Engl J Med* 344(20): 1511-4.

135. van den Dolder J, Spauwen PH, Jansen JA (2003). "Evaluation of various seeding techniques for culturing osteogenic cells on titanium fiber mesh." *Tissue Eng* 9(2): 315-25.
136. Vanis S, Rheinbach O, Klawonn A, O. P, Epple M "Numerical computation of the porosity of bone substitution materials from synchrotron micro computer tomographic data." *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*.
137. Vanis S, Rheinbach O, Klawonn A, O. P, Epple M (2006). "Numerical computation of the porosity of bone substitution materials from synchrotron micro computer tomographic data." *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 37(6): 469 - 73.
138. Volkmer E, Drosse I, Otto S, Stangelmayer A, Stengele M, Kallukalam BC, et al. (2008). "Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone." *Tissue Eng Part A* 14(8): 1331-40.
139. Warburton PE, Greig GM, Haaf T, Willard HF (1991). "PCR amplification of chromosome-specific alpha satellite DNA: definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis." *Genomics* 11(2): 324-33.
140. Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M, et al. (2004). "Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man." *Lancet* 364(9436): 766-70.
141. Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I (2003). "Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity." *Biotechnol Bioeng* 84(2): 205-14.
142. Yu H, VandeVord PJ, Mao L, Matthew HW, Wooley PH, Yang SY (2009). "Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization." *Biomaterials* 30(4): 508-17.

143. Zhao F, Ma T (2005). "Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development." *Biotechnol Bioeng* 91(4): 482-93.
144. Zhao Z, Yang D, Ma X, Zhao H, Nie C, Si Z (2009). "Successful repair of a critical-sized bone defect in the rat femur with a newly developed external fixator." *Tohoku J Exp Med* 219(2): 115-20.
145. Zimmermann G, Moghaddam A, Wagner C, Vock B, Wentzensen A (2006). "[Clinical experience with bone morphogenetic protein 7 (BMP 7) in nonunions of long bones]." *Unfallchirurg* 109(7): 528-37.

Abkürzungsverzeichnis

BMP	Bone morphogenetic protein
CSD	Critical size defect
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	Fetal bovine serum
hMSC	Human mesenchymal stem cell
IGF	Insulin like growth factor
MSCGM	Mesenchymal stem cell growth medium
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PCR	Polymerase chain reaction
STR	Short tandem repeat
TE	Tissue engineering
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Abteilung für experimentelle Medizin und regenerative Chirurgie der chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München. Für die Überlassung des Themas möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schieker sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Denitsa Docheva und Herrn Dr. med. Sebastian Seitz, die mich immer tatkräftig unterstützt und maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Bei Frau Dr. rer. nat. Denitsa Docheva möchte ich mich zudem herzlichst für die intensive Unterstützung, besonders im Bereich der Molekularbiologie, bedanken.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors, die während der Entstehung dieser Dissertation durch Erläuterungen und Anregungen zur erfolgreichen Promotion beigetragen haben.

Ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen, ohne deren Unterstützung ein erfolgreiches Studium sowie die Promotion nicht möglich gewesen wären.