

**Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen und  
Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade**

vorgelegt von

Dr. med. Christoph Pautke

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Mutschler

---

**Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen und  
Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade**

**Dissertation**

**zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde**

**an der Medizinischen Fakultät der**

**Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von**

**Dr. med. Christoph Pautke**

**aus Schleswig**

**2004**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Mutschler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. St. Linder  
Prof. Dr. A. Mayerhofer  
Prof. Dr. E. Hiller

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. M. Schieker

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2004

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
1.1 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) .....	2
1.2 Die osteoblastäre Differenzierungskaskade .....	3
1.2.1 Osteoblastäre Marker .....	5
1.2.2 Steuerung der osteoblastären Kaskade <i>in vitro</i> .....	9
1.3 Aufgabenstellung .....	11
<b>2. MATERIAL UND METHODE</b> .....	<b>12</b>
2.1 Zellkultur .....	12
2.1.1 Zellen und Medien .....	12
2.1.2 Zellkulturbedingungen .....	12
2.1.2.1 <i>Passageprotokoll hMSC</i> .....	13
2.1.2.2 <i>Passageprotokoll hOB</i> .....	13
2.1.3 Osteogene Stimulation .....	14
2.1.4 Zellzählung .....	14
2.2 Morphometrie.....	15
2.3 Wachstumsverhalten .....	15
2.4 Statistische Auswertung .....	16
2.5 Immunzytochemie.....	16
2.5.1 Fixierungs- und Färbeprotokoll.....	18
2.5.2 Primärantikörper .....	19
2.6 Materialien und Geräte .....	20
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>21</b>
3.1 Morphometrie.....	21
3.1.1 Adhärente Zellen .....	21
3.1.2. Zellen in Suspension .....	22
3.2 Wachstumsverhalten .....	23
3.3 Immunzytochemie.....	25
3.3.1 Immunzytochemische Gemeinsamkeiten von hMSC und hOB .....	25
3.3.2 Immunzytochemische Unterschiede von hMSC und hOB .....	35
3.3.3 Immunzytochemische Veränderungen nach osteogener Stimulation .....	40
3.3.3.1 <i>Osteogen stimulierte hMSC</i> .....	41
3.3.3.2 <i>Osteogen stimulierte hOB</i> .....	42
3.3.4 Übersicht der immunzytochemischen Ergebnisse .....	43
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>44</b>
4.1 Diskussion der Methodik.....	44
4.2 Morphologie und Wachstumsverhalten.....	48
4.3 Immunzytochemie.....	51
4.3.1 Geeignete Unterscheidungsmarker der osteoblastären Kaskade.....	51
4.3.2 Ungeeignete Unterscheidungsmarker der osteoblastären Kaskade.....	54
4.4 Osteogene Stimulation .....	60
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>63</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>64</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

Mesenchymale Stammzellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Selbstreplikation und ihre Differenzierbarkeit in verschiedene Gewebe aus (Pittenger et al. 1999). Diese Fähigkeiten beinhalten die theoretische Möglichkeit einer unbegrenzten Zellvermehrung, an die sich eine Differenzierungsphase zu spezialisierten Zellen anschließt, z.B. zu Osteoblasten (hOB). Vor diesem Hintergrund sind hMSC besonders für das *Tissue engineering* von Knochen interessant (Bianco and Robey 2001). Denn obwohl der Bedarf eines funktionellen Knochenersatzes bei ca. 10-15% aller Wiederherstellungseingriffe am Bewegungsapparat gegeben ist, werden die Anforderungen an das Knochenersatzmaterial aus verschiedenen Gründen bisher nicht zufriedenstellend erfüllt (von Garrel and Gotzen 1998; Rueger 1998). Erfolgversprechend erscheint daher die Vorstellung, dem Patienten körpereigene hMSC zu entnehmen, sie unter optimalen Bedingungen *in vitro* zu vermehren und auf einer Leitschiene anzusetzen; anschließend werden die hMSC zu Osteoblasten differenziert und zur extrazellulären Matrixbildung induziert, so dass schließlich dieses besiedelte Konstrukt als Knochenersatz replantiert werden kann.

Ein großes Problem stellt allerdings bereits die Identifikation von hMSC dar, denn bisher ist kein charakteristischer Marker bekannt, der nur für hMSC spezifisch ist (Bianco and Gehron 2000; Conget and Minguell 1999). Deshalb wird der Nachweis von hMSC in den meisten Studien indirekt über die Fähigkeit der Differenzierbarkeit geführt (Jaiswal et al. 1997; Bruder et al. 1998; Pittenger et al. 1999). Allerdings erfüllen die so erkannten hMSC nur noch begrenzt die Anforderungen für das *Tissue engineering*, da sie durch ihre Differenzierung z.B. ihre Fähigkeit zur Selbstreplikation eingebüßt haben (Aubin 1998).

Daher ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, undifferenzierte hMSC durch ein Farbprofil von mehreren Marken mittels Immunzytochemie eindeutig zu charakterisieren und von reifen Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade abzugrenzen.

## 1.2 Die osteoblastäre Differenzierungskaskade

Die osteoblastäre Differenzierung von MSC wurde besonders im Rattenmodell sowohl *in vitro* (Liu et al. 1994; Collin et al. 1992) als auch *in vivo* (Cowles et al. 1998; Zhu et al. 2001) sehr detailliert untersucht. Im Mittelpunkt der Forschung stand dabei meist der Versuch, über die Zellmorphologie und die Änderung des Expressionsmusters verschiedene Reifungsstufen während der osteoblastären Differenzierungskaskade gegeneinander abzugrenzen. Allerdings hat sich eine derartige Unterteilung bis heute nicht durchsetzen können; im Gegenteil, denn in den letzten Jahren hat man erkennen müssen, dass die Zusammenhänge sich nicht auf ein einfaches Schema reduzieren lassen. Die osteogene Differenzierungskaskade scheint keine einfache Abfolge verschiedener Reifungsstufen zu sein, sondern vielmehr ein sehr komplexes Zusammenspiel von Differenzierung und Dedifferenzierung mit Übergängen zu anderen Zelllinien (Aubin et al. 1995; Bruder et al. 1997a; Aubin 1998; Pereira et al. 2001).

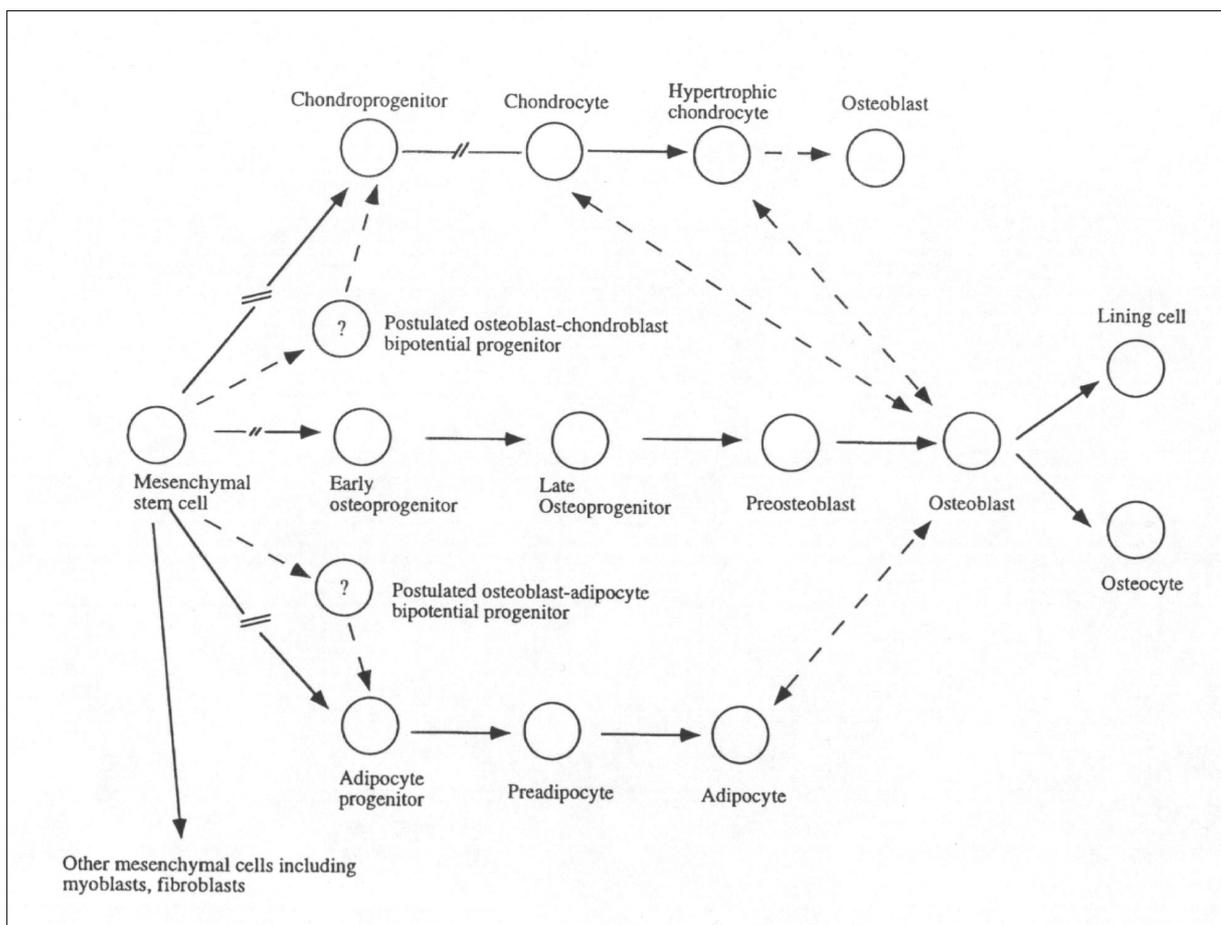


Abb. 1.1 Schematisierte Übersicht der verschiedenen Reifungsstufen innerhalb der osteoblastären Kaskade mit vermuteten Übergängen zu anderen Zelllinien nach Aubin 1998.

Ein weiteres Problem ist, dass sich die aus den Tiermodellen gewonnen Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragen lassen, da verschiedene Merkmale der *in vitro*-Osteogenese der Ratte, wie z.B. der Bildung von *bone nodules*, bei humanen MSC nicht beobachtet werden können (Siggelkow et al. 1999a; Rickard et al. 1996). Da die Erforschung der osteoblastären Differenzierungskaskade beim Menschen *in vivo* aber Grenzen unterworfen ist, sind humane *in vitro*-Modelle der Osteogenese von besonderem Interesse, auch wenn die komplexen Zusammenhänge im menschlichen Organismus schwer nachzuahmen sind. Allerdings differieren die Methoden der Zellisolation sowie der Zellkultivierung und Differenzierung zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen sehr. Diejenigen Methoden, welche als erste etabliert wurden und somit als Standard für die Gewinnung osteoblastärer Zellen dienen könnten (Beresford et al. 1984; Robey and Termine 1985; Owen 1988), wurden häufig abgewandelt und modifiziert. Dadurch ist eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien nur begrenzt gegeben. Folglich wurden z.T. widersprüchliche Ergebnisse präsentiert, wie z.B. der Einfluss von Kortikosteroiden auf die Proliferationseigenschaften und die Expression verschiedener Marker von osteoblastären Zellen (Pereira et al. 2001; Bruder et al. 1997b). Zu diesen methodischen Differenzen kommt erschwerend hinzu, dass interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern bestehen, die z.B. vom Alter und Geschlecht abhängen (Muschler et al. 2001). Aber selbst Zellen ein und des selben Spenders unterscheiden sich sowohl durch den Entnahmeort (Kasperk et al. 1995), durch die Entnahmemenge (Muschler et al. 1997) und durch die Entnahmetechnik und Isolationsmethode (Jonsson et al. 1999). Zudem ist es bisher mit keiner Isolationsmethode gelungen, eine homogene osteoblastäre Zellpopulation zu gewinnen, sei es durch die klassischen Methoden (Jonsson et al. 1999), sei es durch immunologische Auftrennungsverfahren (Encina et al. 1999; Gronthos et al. 1999). Daher ist die Schaffung eines Standards wünschenswert, der als Grundlage für weitere Untersuchungen dient und Aussagen auf dem Einzelzellniveau einer Zellpopulation erlaubt.

### 1.2.1 Osteoblastäre Marker

Der Standardnachweis einer osteoblastären Differenzierung *in vitro* umfasst zum einen den Kalknachweis in der extrazellulären Matrix (ECM), z.B. über eine histologische von-Kossa-Färbung. Zum anderen beinhaltet er den Nachweis verschiedener sog. osteoblastärer Marker, sei es direkt über die Proteinexpression oder indirekt über die Enzymaktivität, wie z.B. bei der Alkalischen Phosphatase. Neben diesem Protein gelten außerdem Kollagen-I, Osteopontin, Osteonectin, Bone Sialoprotein, und Osteocalcin als die klassischen osteoblastären Marker (Aubin et al. 1995; Bruder et al. 1997a; Beresford et al. 1993). Mit Hilfe einzelner Marker wurde in der Vergangenheit versucht, verschiedene Reifungsstufen innerhalb der osteoblastären Differenzierungskaskade voneinander zu unterscheiden. Dies ist aber aus verschiedenen Gründen bisher noch nicht gelungen. Denn man hat erkennen müssen, dass sich nicht alle Zellen während der osteoblastären Differenzierung im selben Reifungsstadium befinden. Daher ist es notwendig, die Expression der osteoblasten-assoziierten Marker auf Einzelzellniveau zu analysieren (Liu et al. 1994). Ein weiteres Problem stellt außerdem die Tatsache dar, dass die meisten der sog. osteoblasten-assoziierten Proteine nicht gewebespezifisch für Knochen sind, sondern von einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert werden. Folglich sind diese Proteine für eine eindeutige Identifikation von hMSC und osteoblastären Reifungsstufen nicht zweckmäßig. Einige dieser Marker werden außerdem von hMSC und hOB produziert, so dass sie sich nicht für eine Unterscheidung zwischen unreifen und reifen Zellen der osteoblastären Kaskade eignen. Obwohl hochspezifisch für die osteoblastäre Kaskade wird z.B. der Transkriptionsfaktor *cbfa1* bereits von Vorläuferzellen der osteoblastären Kaskade exprimiert (Ducy et al. 2000); so dass keine Unterscheidung von Vorläuferzellen und reifen Osteoblasten mit *cbfa1* möglich ist. Lediglich Osteocalcin stellt in diesem Zusammenhang einen geeigneten Unterscheidungsmarker dar, da dieses Protein nur von reifen Osteoblasten gebildet wird (Ducy et al. 2000).

Die osteoblasten-assoziierten Marker lassen sich je nach ihrer Funktion in verschiedene Gruppen unterteilen. Im Folgenden werden die wichtigsten dieser Proteine kurz beschrieben.

## Strukturproteine

Knochen entsteht über eine organische Vorläufermatrix, dem sog. Osteoid, welches sowohl aus kollagenen als auch aus nicht-kollagenen Strukturproteinen zusammengesetzt ist. Es dient den Zellen als mechanisches Stützgerüst und als Leitschiene; außerdem stellt es eine Matrix für Kalziumapatitkristalle dar, welche erst nach der Ausreifung des Osteoids eingelagert werden (Collin et al. 1992; Nefussi et al. 1997; McKee and Nanci 1996). Die kollagenen Bestandteilen überwiegen mit einem Massenanteil von ca. 90% und machen das Grundgerüst dieser Matrix aus. Ihnen werden besonders mechanische Aufgaben zugeschrieben. Während der Osteogenese können im Knochen neben Kollagen-I, welches mit 97% den Hauptbestandteil ausmacht, noch die Kollagentypen-III, -V, -VI und -X nachgewiesen werden (Chichester et al. 1993; Collin et al. 1992; Beresford et al. 1993; Aubin 1998). Mutationen des Kollagen-I führen zu unterschiedlichen Ausprägungen des Erkrankungsbildes der Osteogenesis imperfecta. Dabei kommt es zu strukturellen Abnormalitäten des Osteoids, die zu einer verminderten Stabilität des Knochens führen (Sarathchandra et al. 2000). Aus Mutationen der anderen Kollagentypen resultieren eine Vielzahl an Bindegewebsstörungen, wobei der Knochenstoffwechsel besonders durch das Fehlen von Kollagen-III im Sinne eines Ehlers-Danlos-Syndroms betroffen ist (Kuivaniemi et al. 1997).

Die nicht-kollagenen Komponenten machen ca. 10% des Osteoids aus. Am häufigsten sind Osteocalcin (OC) und Osteonectin (ON) mit jeweils 20% gefolgt von Bone sialoprotein mit 12%, Osteopontin (OPN) und Fibronectin (Anselme 2000) mit jeweils unter 8%. Ihnen werden besonders integrative Aufgaben zugeschrieben, da sie Bindungsstellen für andere Makromoleküle, Zellen sowie Kalziumapatit aufweisen (Malaval et al. 1994; McKee and Nanci 1996). Osteocalcin (OC) gilt dabei als spezifischster Marker für osteoblastäre Zellen, welcher erst spät in der Differenzierungskaskade mit Einsetzen der Mineralisation der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden kann (Bronckers et al. 1985). Die genaue Funktion von OC ist nicht bekannt, denn obwohl es Kalziumbindungsstellen aufweist, ist es nicht notwendig für den Knochenaufbau bzw. die Matrixkalzifizierung, sondern scheint diese eher zu inhibieren (Boskey 1998). Entsprechend weisen OC-defiziente *knockout* Mäuse eine unveränderte Knochenstruktur auf, bei der sogar eine vermehrte Knochenbildungsrate und eine größere Knochenmasse beobachtet werden kann (Ducy et al. 1996).

Osteopontin (OPN) besitzt genauso wie OC Bindungsstellen für Kalziumphosphat, so dass es in den Prozess der Matrixkalzifizierung eingebunden zu sein scheint. Aber auch OPN ist nicht essentiell für die Osteogenese bzw. für einen funktionellen Knochenaufbau, was anhand von OPN-defizienten *knockout*-Mäusen gezeigt werden konnte, welche keine strukturellen Unterschiede im Knochenaufbau aufwiesen (Rittling et al. 1998). Im Gegensatz dazu ist ein Fehlen von Osteonectin (ON) nicht kompensierbar. Zwar weisen auch ON-defiziente Mäuse eine normale Skelettentwicklung auf, jedoch besteht eine eingeschränkte Fähigkeit zur Knochenneubildung und zum Remodelling, was sich in einer negativen Knochenbilanz und der Entwicklung einer Osteopenie widerspiegelt. Hierfür wird besonders die Assoziation von ON mit Kollagen-I verantwortlich gemacht, welche offensichtlich von den anderen nicht-kollagenen Proteinen nur unzureichend übernommen werden kann (Delany et al. 2000).

Bone sialoprotein (BSP) besitzt wie die meisten nicht-kollagenen Proteine neben Bindungsmotiven für andere Matrixproteine und Zellen auch Bindungsstellen für Kalziumapatit (Harris et al. 2000). Entsprechend ist BSP extrazellulär besonders dort lokalisiert, wo eine Mineralisation einsetzt (Ganss et al. 1999), so dass die Anwesenheit von BSP für eine Verkalkung der Matrix notwendig ist.

Eine weitere Gruppe der Strukturproteine stellen Proteoglykane, die ca. 10% des nicht-kollagenen Bestandteils des Osteoids ausmachen. Die prominentesten Vertreter sind u.a. Versican und Decorin. Sie werden sowohl im Knochen als auch im Knorpel exprimiert und sind am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt (Barry et al. 2001). Die Bedeutung der Proteoglykane für die Osteogenese ist jedoch noch unklar. Bekannt ist, dass Decorin *in vivo* besonders im Osteoid nachgewiesen werden kann, der Nachweis mit Ausreifung der Knochenmatrix allerdings schwächer wird (Blumberg et al. 1997). Entsprechend bewirkt eine Decorindefizienz bei Mäusen keine auffälligen Veränderungen im Knochen, wohl aber im kollagenen Bindegewebe. Dort kommt es zu Veränderungen im Sinne des Erkrankungsbildes eines Ehlers-Danlos-Syndroms, wofür insbesondere die Interaktionen von Decorin mit verschiedenen Kollagentypen verantwortlich gemacht werden (Corsi et al. 2002).

## Enzyme

Anders als die erwähnten Strukturproteine katalysieren Enzyme verschiedene Auf- und Abbauprozesse im Knochenstoffwechsel. Zu dieser Gruppe gehört die alkalische Phosphatase (ALP), die offensichtlich den Prozess der Matrixkalzifizierung katalysiert. ALP gilt als klassischer Marker der osteoblastären Kaskade (Robey and Termine 1985) bzw. als Marker der Knochenneubildung (Farley and Baylink 1986). Der Nachweis von ALP wird häufig mit dem osteogenen Potential von Zellen gleichgesetzt (Pittenger et al. 1999; Halvorsen et al. 2001; Kuznetsov et al. 2001). Die alkalische Phosphatase besitzt vier Isoformen, von denen die *bone/liver/kidney* Isoform, auch als TNSALP (*tissue non specific alkaline phosphatase*) bezeichnet, u.a. im Knochen exprimiert wird (Henthorn et al. 1992). Als Homotetramer ist ALP in der Plasmamembran u.a. von Osteoblasten verankert, wo es bei einem hohen pH-Optimum verschiedene Monophosphatester hydrolysieren kann. Mutationen innerhalb des ALP-Gens bewirken beim Menschen das Erkrankungsbild einer Hypophosphatämie, bei dem es zu Verkalkungsstörungen des Knochens in unterschiedlichen Schweregraden kommt. Ursächlich dafür scheint eine Akkumulation von organischem Pyrophosphat zu sein, wodurch die Bildung von Hydroxylapatitkristallen und somit eine Verkalkung des Knochens verhindert wird (Whyte et al. 1996). Bei *in vitro*-Versuchen waren ALP-defiziente Osteoblasten der Maus zwar in der Lage *nodules*, d.h. Zellhaufen zu bilden, allerdings kam es nicht zu einer Kalzifizierung im Sinne einer *bone-nodule*-Bildung (Wennberg et al. 2000).

Im Gegensatz zu ALP gehören die Matrixmetalloproteinasen (MMP) zu Enzymen, welche die Degradation und Resorption des Knochens fördern, was für die Ausbildung eines funktionelles Knochens eine ähnlich wichtige Bedeutung hat wie die Matrixproduktion (Filanti et al. 2000). Im Rattenmodell scheinen während der Osteogenese besonders die MMP-2 und -9, auch als Gelatinase A und B bezeichnet, von unterschiedlichen Reifungsstadien der Osteoblasten exprimiert zu werden, wobei MMP-9 später als MMP-2 nachgewiesen werden kann (Bord et al. 1997; Filanti et al. 2000). Die Rolle bei der humanen Osteogenese ist allerdings noch nicht näher untersucht worden.

### Signalmoleküle

Neben verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren des Knochens, wie z.B. *bone morphogenetic proteins* (BMP) oder *transforming growth factors* (TGF), gehört auch Osteoprotegerin zu der Gruppe von Signalmolekülen (OPG), die den Knochenstoffwechsel beeinflussen. Im Gegensatz zu anderen Signalmolekülen beeinflusst das Fehlen von OPG hauptsächlich den Knochenstoffwechsel, jedoch kaum die restliche Organentwicklung. Zwar bilden OPG-defiziente Mäuse ein Skelett aus, aber es entwickelt sich sehr früh eine schwere Form der Osteoporose (Mizuno et al. 1998).

Osteoprotegerin verhindert durch kompetitive Bindung des *receptor activator of NF-kappa B Ligand* (RANKL) eine Aktivierung von RANK auf Osteoklasten. Dadurch hemmt OPG die osteoklastäre Differenzierung sowie die Aktivierung der Osteoklasten und beeinflusst seinem Namen entsprechend den Knochenstoffwechsel zu Gunsten des Knochenaufbaus (Aubin and Bonnelye 2000). Die Expression von OPG ist in besonderem Maße abhängig von hormonellen Einflüssen, so dass sich die Serumspiegel von OPG bei Patienten verschiedenen Alters und Geschlechts deutlich unterscheiden. Die höchsten OPG-Serumwerte können bei postmenopausalen Frauen gefunden werden. Zusätzlich ist die OPG-Expression auch sehr stark parakrinen Effekten unterworfen (Hofbauer et al. 2000).

### 1.2.2 Steuerung der osteoblastären Kaskade *in vitro*

Was sich zwischen dem Ausgangs- und dem Endpunkt der Differenzierungskaskade befindet, d.h. über welche Zwischenschritte die osteoblastäre Differenzierung von hMSC zu hOB abläuft, ist kaum bekannt. Man weiß jedoch, dass es sich bei der Osteogenese um einen komplexen, dynamischen Prozess handelt, bei dem *in vivo* die koordinierte Matrixbildung einer gezielten Resorption gegenübersteht. Dafür bedarf es eines abgestimmten Zusammenspiels verschiedener Zellarten, Matrixproteine sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Baylink et al. 1993; Filanti et al. 2000; Reddi 2000). Zusätzlich zur Differenzierung der Zellen findet auch eine Reifung der extrazellulären Matrix statt, was in gegenseitiger Abhängigkeit geschieht (Mizuno et al. 2000). Ziel der Knochenbildung *in vitro* ist es, die komplizierten *in vivo* Verhältnisse nachzuahmen. Allerdings ist es fraglich, ob dies in einem zweidimensionalen Kultursystem möglich ist und ob z.B. die zelluläre

Differenzierung *in vitro* über dieselben Reifungsstufen abläuft wie *in vivo* (Aubin 1998). Elektronenmikroskopische Untersuchungen von *bone nodules* als Produkt der osteoblastären Differenzierung *in vitro* weisen jedoch eine große morphologische Ähnlichkeit mit spongiösem Knochen und eine vergleichbare Proteinzusammensetzung auf (Bhargava et al. 1988; Beresford et al. 1993).

Die osteoblastäre Differenzierung von hMSC *in vitro* kann durch eine Vielzahl von Hormonen und Vitaminen beeinflusst werden, jedoch beginnt man erst allmählich die komplexen Wirkmechanismen und gegenseitigen Wechselwirkungen zu verstehen. Bezeichnend für die geringe Kenntnis der Vorgänge während der Osteogenese ist, dass eine osteogene Stimulation *in vitro* ohne die Zugabe von fötalem Rinderserum (FBS), dessen Zusammensetzung hinsichtlich der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren nicht genau definiert ist, nicht gelingt (Beresford et al. 1993). Die Kultivierung mit FBS alleine bewirkt aber noch keine osteogene Stimulation, sondern es werden weitere Faktoren benötigt. Erst nach Zugabe von  $\beta$ -Glyzerophosphat, Ascorbinsäure sowie Dexamethason, konnte eine Bildung und Verkalkung von *bone nodules* beobachtet werden (Bellows et al. 1986; Bhargava et al. 1988). Diese Art der osteogenen Stimulation wird auch heute noch von den meisten Arbeitsgruppen angewendet. Zusätzlich kann die osteoblastäre Differenzierung *in vitro* aber durch eine Vielzahl weiterer Hormone, Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren beeinflusst werden, wie z.B. durch *Transforming Growth Factors* (TGF) (Liu et al. 1999; Kale et al. 2000), Vitamin D3 (Liu et al. 1999; Rickard et al. 1996), *Fibroblast Growth Factors* (FGF) (Frank et al. 2002; Walsh et al. 2000; Kasperk et al. 1995), *Insulin-like Growth Factors* (IGF) (Kasperk et al. 1995; Thomas et al. 1999) oder *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) (Reddi 2000; Fromigue et al. 1998). Die Bedeutung dieser Faktoren ist für die humane Osteogenese aber noch nicht hinreichend aufgeklärt. Hinzu kommt, dass sie in Abhängigkeit von ihrer Konzentration bzw. in Kombination miteinander z.T. antagonistische, z.T. synergistische Effekte haben können (Pereira et al. 2001; Rickard et al. 1996). Zusätzlich haben sowohl die Oberfläche bzw. die extrazelluläre Matrix (Degasne et al. 1999), auf der die Zellen kultiviert werden, als auch die Zelldichte (Siggelkow et al. 1999b) einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung und ihre Stimulierbarkeit.

## 1.3 Aufgabenstellung

Mit zunehmendem Wissen über die Komplexität der Osteogenese wurde die Aussagekraft einzelner osteoblasten-assoziiierter Marker in den letzten Jahren immer mehr in Frage gestellt (Frank et al. 2002; Siggelkow et al. 1999b). Denn der Nachweis einzelner Marker erlaubt weder eine eindeutige Identifikation undifferenzierter hMSC noch eine Abgrenzung von hMSC zu anderen Reifungsstufen der osteoblastären Kaskade. Das Ziel dieser Untersuchung ist es daher, über die Erstellung eines immunzytochemischen Färbeprofiles mehrerer Marker gleichzeitig, undifferenzierte hMSC eindeutig zu identifizieren und sie gegenüber hOB und evtl. weiteren Differenzierungsstufen der osteoblastären Kaskade abzugrenzen.

Als Nachweismethode wurde die immunzytochemische ABC-Methode angewandt, die eine lichtmikroskopische Auswertung auf Einzelzellniveau ermöglicht. Unterstützend wurden die Morphologie sowie die Proliferationseigenschaften von hMSC im Vergleich zu hOB untersucht

## 2. Material und Methode

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Zellen und Medien

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden von der Fa. Cambrex (früher BioWhittaker) erworben. Ihre Gewinnung erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation von Knochenmarksaspiraten gesunder Spender. Der Nachweis, dass es sich um Stammzellen handelte, wurde über eine Differenzierung in Richtung der chondroblastären, adipogenen und osteoblastären Linie sowie über den Nachweis verschiedener Oberflächenantigene dokumentiert (Pittenger et al. 1999). Die Zellen wurden entsprechend der Herstellerangaben mit dem von der Fa. Cambrex gelieferten Medium kultiviert.

Humane Osteoblasten (hOB) wurden von der Fa. PromoCell bezogen. Die Anzucht der Zellen erfolgte aus Knochenstückchen, die den Spendern während orthopädischen Operationen entnommen wurden. Die Knochenzellkulturen wurden auf der Basis einer VitaminD<sub>3</sub>-stimulierten Alkalischen Phosphatase Produktion und Osteocalcin Sekretion als osteoblastäre Zellpopulationen identifiziert (Kasperk et al. 1995). Das Grundmedium wurde mit 10 % FBS (fetal bovine serum) sowie 50 µg/ml Gentamycin und Amphotericin B versetzt.

Alle verwendeten Materialien und Geräte sind im Kapitel 2.6 in Tabelle 2.2 auf Seite 21 mit Typenbezeichnung und Herstellerangaben aufgeführt.

#### 2.1.2 Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden entsprechend der Herstellerangaben bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Kultivierung wurden hMSC und HOB in einer Konzentration von ca. 0,2 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> angesetzt. Der Mediumwechsel erfolgte regelmäßig alle drei bzw. vier Tage, indem das alte Medium mittels Vakuumpumpe und sterilen Glaspipetten abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt wurde.

Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von 90% erfolgte die Passagierung der Zellen. Diese beinhaltete das Ablösen der Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung, eine Zellzählung sowie das erneute Ansetzen der Zellen in Kulturflaschen. Sowohl das Wechseln des Zellkulturmediums als auch das Passagieren der Zellen erfolgte in

einer Arbeitsbank, welche durch einen kontinuierlichen laminaren Luftstrom ein steriles Arbeiten ermöglichte. Alle beschriebenen Versuche wurden mit Zellen durchgeführt, welche die fünfte Passage nicht überschritten hatten.

Das Passagieren der hMSC und hOB beinhaltete entsprechend der Herstellerangaben unterschiedliche Arbeitsschritte:

#### 2.1.2.1 Passageprotokoll hMSC

- Medium entfernen, Zellen waschen mit 3 ml PBS (ohne Ca, Mg, Fa. GibcoBRL)
- Zellen ablösen mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. Cambrex)
- mikroskopische Kontrolle nach 5 min, max. 15 min Einwirkzeit des Trypsin/EDTA
- Zugabe von 3 ml Medium, nachdem alle Zellen gleichmäßig abgelöst waren; das Serum des Kulturmediums bewirkt die Neutralisierung des Trypsins
- Suspension zentrifugieren (600 g für 5 min), Überstand anschließend absaugen, um Trypsinreste zu entfernen
- Zellen in Kulturmedium resuspendieren und zählen (siehe 2.1.4 Zellzählung).

#### 2.1.2.2 Passageprotokoll hOB

- Medium entfernen, Zellen waschen mit 3 ml Hepes BSS (Fa. PromoCell)
- Zellen ablösen mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Fa. PromoCell)
- nach 3 min mikroskopische Kontrolle, max. 7 min Einwirkzeit des Trypsin/EDTA
- Zugabe von 2 ml Trypsin Neutralis Solution (Fa. PromoCell), nachdem Zellen homogen abgelöst waren
- Suspension zentrifugieren (220 g für 4 min), Überstand anschließend absaugen, um Trypsinreste zu entfernen
- Zellen in Medium resuspendieren und zählen.

### 2.1.3 Osteogene Stimulation

Die osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen, erfolgte nach dem Differenzierungsprotokoll von Jaiswal et al. (Jaiswal et al. 1997). Die Stimulation erfolgte mit DMEM<sup>1</sup>, welches 10 % FBS, 40 IU/ml Penicillin/Streptomycin und 4 mM L-Glutaminan, 100 nM Dexamethason, 10 mM  $\beta$ -Glyzerophosphat sowie 0,05 mM Ascorbinsäure–2–Phosphat enthielt.

### 2.1.4 Zellzählung

Die Zellzählungen erfolgten automatisiert mit Hilfe eines Cellcounters (Schärfe System). Dafür wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA Lösung abgelöst und in einem Messröhrchen auf 1:100 verdünnt, indem 60 $\mu$ l Zellsuspension mit 5,94 ml sterilem PBS versetzt wurden. Diese Verdünnung musste für die Messung unter der Funktion *Dilution* eingetragen werden. Um tote Zellen und Zelldebris von der Messung auszuschließen und nur lebende Zellen zu zählen, musste der Cellcounter vor der Messung für jede Zellpopulation kalibriert werden, indem abgetötete, methanolfixierte Zellen vermessen und so die Grenzen des Messbereiches auf die vitalen Zellen eingestellt wurden. Der ideale Messbereich war daran zu erkennen, dass die Zellen in der graphischen Größendarstellung eine Kurve im Sinne einer Normalverteilung bildeten. Sowohl für hMSC als auch für hOB wurden durchschnittliche Zellgrößen zwischen 15 und 60  $\mu$ m ermittelt. Für diesen Messbereich musste im Menü unter der Funktion *Calibrate* die Messkapillare mit dem Durchmesser 150  $\mu$ m gewählt werden. Durch die Menüauswahl *Measure* erfolgte die Messung automatisch, indem dreimal ein blasenfreies Aliquot der verdünnten Zellsuspension durch die Messkapillare angesaugt wurde. Jedes Messergebnis setzte sich somit aus drei Einzelmessungen zusammen, so dass die jeweiligen Mittelwerte und die Standardabweichungen errechnet werden konnten. Aus den Messungen resultierten die durchschnittlichen Volumina und die durchschnittlichen Durchmesser der Zellen. Im Anschluss an die Messungen musste die Messkapillare mit sterilem PBS mehrmals gereinigt werden.

---

<sup>1</sup> Dulbecco's Modified Eagle Medium (Fa. GibcoBRL, Deutschland)

## 2.2 Morphometrie

Die morphometrische Analyse erfolgte sowohl von adhärennten als auch von abgelösten Zellen.

Adhärente hMSC und hOB (jeweils  $n=100$ ) wurden bei 400-facher Vergrößerung in Phasenkontrastmikroskopie mit einer Digitalkamera fotografiert, auf dem Computerbildschirm mit der Maus markiert und mit Hilfe eines Bildanalyse-Systems (KS 400, Zeiss) ausgewertet. Die Auswertung beinhaltete die Berechnung der Zellfläche, des größten Durchmessers, sowie der größten Breite senkrecht zur Achse des größten Durchmessers. Die morphometrische Untersuchung von adhärennten Zellen war lediglich in Subkonfluenz möglich, da sich in Zellkonfluenz die Grenzen der einzelnen Zellen nicht eindeutig erkannt werden konnten und sich z.T. überlagerten.

Die Analyse der Zellen in Suspension ( $n > 500$ ) erfolgte automatisiert im Cellcounter wie im Abschnitt 2.4.1. Zellzählung beschrieben. Sie umfasste die durchschnittlichen Volumina und die mittleren Zelldurchmesser. Die morphometrische Analyse abgelöster Zellen konnte sowohl von subkonfluenten als auch von konfluenten Zellen durchgeführt werden.

## 2.3 Wachstumsverhalten

Für die Wachstumskinetik wurden sowohl hMSC als auch hOB in einer Konzentration von  $0,4 \times 10^5$  Zellen in Kulturfラスchen mit einer Fläche von  $25 \text{ cm}^2$  (T25 flasks) angesetzt und unter gleichen Zellkulturbedingungen weitergeführt wie die Basiszellkultur. An Tag 3, 4, 7, 14 und 21 erfolgte eine Zellzählung von jeweils drei T25 einer Zellpopulation, wobei die Zellen nach dem oben aufgeführten Protokoll abgelöst und im Zellzähler ausgezählt wurden.

Die Auswertung der Wachstumskinetik beinhaltete zum einen die Bestimmung der Sättigungszelldichte, d. h. die Zelldichte bei der kein Zuwachs der Zellzahl mehr stattfand und die Wachstumskurve in eine Plateauphase einmündete; zum anderen die Bestimmung der Verdopplungszeit beider Zelllinien in der frühen 'log-Phase', d.h. in der steilsten Phase des logarithmischen Wachstumsanstieges. Die Sättigungszelldichte wurde in Zellen /  $\text{cm}^2$ , die Verdopplungszeiten in Stunden [h] angegeben und nach folgender Formel errechnet:

$$PDT = \ln(N - N_0) / t$$

PDT (population doubling time) = Verdopplungszeit einer Zelllinie

$N_0$  = Ausgangszellzahl

$N$  = Zellzahl nach der Zeit  $t$

$t$  = Zeitraum zwischen den Zellzählungen

## 2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse umfasste die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes, der Standardabweichungen und der 95% Konfidenzintervalle. Die statistische Auswertung erfolgte durch visuelle Signifikanzüberprüfung innerhalb der Graphik (Altman 1991). Eine statistische Signifikanz lag danach vor, wenn sich die 95% Konfidenzintervalle bzw. die Intervalle der Standardabweichung nicht überlappten.

## 2.5 Immunzytochemie

Für die immunzytochemischen Färbungen wurden die Zellen auf sterilen, unbeschichteten Glasobjektträgern in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^5$  Zellen pro Glasobjektträger angesetzt. Dafür wurden die Zellen so konzentriert, dass sie in ca. 1 ml Zellsuspension unter sterilen Bedingungen auf die Objektträger aufgebracht und in speziellen Kulturschalen (Quadriperm plus) für vier Stunden im Brutschrank inkubiert wurden, damit sie adhären konnten. Nach Kontrolle der Adhärenz unter dem Mikroskop wurden die Kulturschalen mit 4 ml Medium aufgefüllt und unter oben genannten Zellkulturbedingungen weitergeführt. In unterschiedlichen Stadien der Zelldichte, von Siggelkow et al. (Siggelkow et al. 1999b) als Subkonfluenz (ca. 50 % dichter Zellrasen) bzw. Zellkonfluenz (100 % dichter Zellrasen) definiert, wurden die Zellen für die immunzytochemischen Färbungen mit Methanol fixiert, das mit 0,3 % Wasserstoffperoxid versetzt war. Letzteres diente dazu, die endogene Peroxidaseaktivität der Zellen zu inaktivieren und zu verhindern, dass die zelleigene Peroxidase die Nachweissubstanz DAB umsetzte (s.u.). Dadurch wurde die Spezifität der immunzytochemischen Reaktionen erhöht. Um die Zellen auf einem Objektträger gleichzeitig mit mehreren Antikörpern inkubieren zu können, erfolgte eine Unterteilung der Objektträger mit einem Fettstift je nach Zelldichte in sechs bis acht

Felder. In diese Felder konnten verschiedene Primärantikörper aufgetragen werden, ohne dass diese sich vermischten. Jeweils ein Feld auf jedem Objektträger diente als Kontrollfeld, welches nicht mit Primärantikörpern, sondern nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde.

Nach der Fixierung mussten die Zellen in PBS<sup>2</sup> (phosphate buffered saline) rehydriert werden. Im Anschluss folgte der Reaktionsschritt des Blockens, der dazu diente, negativ geladene Molekülgruppen der Zellen abzusättigen, um unspezifische Bindungen der Primärantikörper zu minimieren. Dazu wurde Pferdeserum verwendet, das mit PBS auf 1:20 verdünnt wurde. Ein Enzymverdau, um bestimmte Antigenepitope auf den Zellen zu generieren oder freizulegen, war bei den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern nicht nötig. Es wurden Primärantikörper gegen 20 verschiedene Antigene verwendet, die mit der genauen Bezeichnung, Anwendungskonzentration, Herkunftsspezies sowie Hersteller in Tabelle 2.1 auf Seite 20 aufgeführt sind. Die Verdünnung der Primärantikörper erfolgte mit einer Antikörperverdünnungslösung<sup>3</sup>, welche diese besonders durch den Bestandteil Natriumazid über längere Zeit lagerungsfähig machte.

Als Nachweissystem der gebundenen Primärantikörper diente das Vectastain *ABC-Elite Kit* (Vectorlaboratories, USA). Da die Primärantikörper z.T. aus Mäusen, z.T. aus Kaninchen stammten, wurde als Sekundärantikörper ein biotiniertes Antikörpergemisch aus anti-Maus-/anti-Kaninchen-IgG verwandt, welches mit PBS auf Anwendungskonzentration von 1:200 verdünnt wurde. Durch die Biotinkomponente besaßen die Sekundärantikörper eine sehr hohe Affinität zum Avidin/Biotin/Peroxidase-Komplex (ABC-Komplex), welcher die Nachweissubstanz DAB (Diaminobenzidin) als Substrat umsetzte und in eine unlösliche, vernetzte Form überführte, die als bräunlicher Farbniederschlag sichtbar war. Die Herstellung des ABC-Komplexes erfolgte durch die Verdünnung von jeweils 20 µm der Komponente A und B in 1 ml PBS, welche anschließend mindestens für 30 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert wurde. Die DAB-Lösung wurde entsprechend der Herstellerangaben angesetzt, indem 2,5 ml *aqua dest.* mit zwei Tropfen der Pufferlösung, zwei Tropfen der stock solution und jeweils mit einem Tropfen Wasserstoffperoxidlösung sowie Nickelkomplex versetzt wurden. Letzterer verlieh

---

<sup>2</sup> PBS (1 M): 0,32 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; 1,42 g Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O und 9,9g NaCl (alle Produkte Fa. Merck, Deutschland) gelöst in 1 l *aqua dest.*

<sup>3</sup> 0,1% BSA (Bovine Serum Albumin); 0,05% Azid; 0,1% Tween gelöst in 100 ml PBS

der Immunreaktion eine schwärzlich-violette Farbtönung. Nach 4 min wurde die DAB-Nachweisreaktion durch ausgiebige Spülung mit Leitungswasser unterbrochen.

Um die Spezifität der Primärantikörper zu überprüfen, wurden sowohl Negativ- als auch Positivkontrollen gefärbt, wozu humane Osteosarkomzellen (MG-63, Saos-2 und U2OS, Fa. ATCC, USA), Fibroblasten (HS27, Fa. ATCC, USA) sowie menschlicher Knorpel dienten. Die Kontrolle der Spezifität der Sekundärantikörper erfolgte dadurch, dass die Zellen ohne Primärantikörper nur mit Sekundärantikörper in einer Konzentration von 2 µg/ml inkubiert wurden. Alle immunzytochemischen Reaktionsschritte fanden in einer feuchten Kammer in Dunkelheit bei Raumtemperatur statt.

Im Anschluss an die Färbungen erfolgte die Entwässerung der Zellen auf den Objektträgern mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 2 x 100%) und 2 x Xylol für jeweils fünf Minuten. Schließlich wurden die Objektträger mit dem hydrophoben Harz (Eukitt) und Deckgläsern eingedeckt. Die Auswertung der immunzytochemischen Reaktionen erfolgte nach Erhärten des Harzes mikroskopisch mit einer 400-fachen Vergrößerung. Die bläuliche Farbkomponente der Abbildungen ist eine Folge der Verwendung verschiedener Graufilter (0,25 und 0,5; Zeiss), welche dazu dienen, die Kontraste zu verstärken. Alle Färbungen wurden mindestens dreimal durchgeführt. Das folgende Protokoll stellt die Arbeitsschritte der immunzytochemischen Reaktionsschritte zusammen.

### 2.5.1 Fixierungs- und Färbeprotokoll

- Zellen 10 min in PBS waschen
- Zellen 20 min fixieren in Methanol mit 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 3 x 5 min waschen in PBS
- kein Enzymvorverdau
- 60 min blocken mit Pferdeserum 1:20 in PBS verdünnt
- 30 min Inkubation der Primärantikörper
- 3 x 5 min Waschen in PBS
- 30 min Inkubation des Sekundärantikörpers
- 3 x 5 min waschen in PBS
- 30 min Inkubation mit Vectastain ABC-Kit *Elite*
- 3 x 5 min Waschen in PBS
- 4 min Inkubation mit DAB-Lösung (in Dunkelheit)

## 2.5.2 Primärantikörper

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Antikörper mit Typenbezeichnung, Antigen, Anwendungskonzentration, Spezies und Hersteller aufgeführt.

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
Alkalische Phosphatase	B4-78	1:10	Maus	DSHB
Osteocalcin	OC1	1:10	Maus	Dunn
Osteonectin	AON-1	1:5	Maus	DSHB
Osteopontin	MPIIB10(1)	1:5	Maus	DSHB
Bone sialoprotein	WVID1(9C5)	1:1	Maus	DSHB
Osteoprotegerin	H-249	1:20	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology
Prokollagen-I	M-38	1:5	Maus	DSHB
Kollagen-I	COL-1	1:2000	Maus	Sigma
Kollagen-II	CIIC1	1:5	Maus	DSHB
Kollagen-III	III-53 (4H12)	1:500	Maus	ICN Biochemicals
Kollagen-IV	M3F7	1:5	Maus	DSHB
Kollagen-V	V-3C9	1:500	Maus	ICN Biochemicals
Kollagen-VI	5C6	1:10	Maus	DSHB
Kollagen-VII	LH7.2	1:10	Maus	Biologo
Kollagen-IX	D1-9	1:5	Maus	DSHB
Kollagen-X	Col-X	1:100	Kaninchen	Biologo
Decorin	CB-1	1:5	Maus	DSHB
Versican	12C5	1:5	Maus	DSHB
Matrix-Metalloproteinase-2	AB809	1:100	Kaninchen	Chemicon
Matrix-Metalloproteinase-9	Ab-3	1:100	Maus	Oncogene

Tabelle 2.1: Verwendete Primärantikörper gegen verschiedene Antigene aufgelistet mit spezifischer Bezeichnung, Verdünnung, Herkunftsspezies sowie Hersteller.

## 2.6 Materialien und Geräte

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Geräte und Materialien mit Typen- und Herstellerbezeichnung aufgeführt.

Material	Typ	Hersteller
hOB + Kulturmedien, Trypsin	Lot Nr. 460A090201	PromoCell, Deutschland
hMSC + Kulturmedien, Trypsin	Lot Nr. 1F1061	Cambrex, USA
Brutschrank	IG 150	Jouan, Frankreich
Kulturflaschen	T25, T75 flasks	Nalge Nunc Int., USA
Osteogene Medienzusätze, FBS		Sigma-Aldrich, Deutschland
PBS (phosphate buffered saline)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O; Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O; NaCl	Fa. Merck, Deutschland
Zusätze der Antikörperverdünnungslösung	BSA (Bovine Serum Albumin); Azid; Tween	Fa. Merck, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)		GibcoBRL, Deutschland
Kulturschalen für Objektträger	Quadriperm in vitro	Schubert, Deutschland
Sterilfilter	Nalgene 150 ml	Nalge Nunc Int., USA
Autoklav	Zirbus LTA400	Apparate- und Maschinenbau GmbH, Deutschland
Glasobjektträger und Deckgläser	76 x 26 bzw. 60 x 24 mm	Menzel-Gläser, Deutschland
Sterilbank	Biohit	Antares, Deutschland
Laborwaage	Typ 770	Kern, Deutschland
Schüttler	Typ VM4	CAT, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipettus akku	Hirschmann, Deutschland
Pipetten, Pipettenspitzen	20, 100, 200 und 1000µm	Eppendorf, Deutschland
Cellcounter	Casy1	Schärfe System, Deutschland
Mikroskop	Axiophot	Zeiss, Deutschland
Bildanalysesystem	KS 400 Version 3.0	Zeiss, Deutschland
Digitalkamera	3CCD Color Video Camera	Sony, Japan
Fettstift für Immunzytochemie	DakoPen	Dako, Deutschland
Reaktionsgefäße	1,5 ml Eppendorf-Cups	Eppendorf, Deutschland
Nachweissystem Immunzytochemie	Vectastain ABC-Kit Elite	Vectorlaboratories, USA
Eindeckmedium	Eukitt	Kindler, Deutschland
Alkohole, Xylol, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Merck, Deutschland
Zentrifuge	CT 422	Jouan, Frankreich
Zentrifugenröhrchen	15 und 50 ml	Nürnbrecht, Deutschland

Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Materialien und Geräte mit Angabe der Typenbezeichnung und des Herstellers.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Morphometrie

#### 3.1.1 Adhärenente Zellen

Adhärenente hMSC besaßen eine spindelförmige, bipolare Zellmorphologie (Abb. 3. 10, 3.14) ohne prominente Zellfortsätze. Im Vergleich offenbarten Osteoblasten eine typische polygonale Zellform mit ausgeprägten Zellfortsätzen, die den Osteoblasten ein z.T. sternförmiges Aussehen verliehen. Allerdings konnten auch Zellen ohne prominente Zellfortsätze beobachtet werden, welche langgestreckt und unverzweigt den Stammzellen ähnelten (Abb. 3. 15).

Adhärenente hOB waren mit einer durchschnittlichen Fläche von  $6580 \mu\text{m}^2$ , einem durchschnittlichen größten Durchmesser von  $197 \mu\text{m}$  und einer durchschnittlichen Breite von  $84 \mu\text{m}$  signifikant größer als hMSC, bei denen im Vergleich korrespondierende Werte von  $2155 \mu\text{m}^2$ ,  $140 \mu\text{m}$  bzw.  $35 \mu\text{m}$  ermittelt werden konnten (Abb. 3.1 und 3.2). Aus dem Quotienten von Länge und Breite kann man ersehen, dass hMSC (Quotient Länge/Breite =4) im Verhältnis zum größten Durchmesser eine geringere Breite besaßen als Osteoblasten, bei denen der entsprechende Quotient deutlich kleiner war (2,4), was auf eine flächigere Ausbreitung der Zellen hindeutet. Insgesamt weisen Osteoblasten eine größere Varianz ihrer Zellmorphologie auf als hMSC.

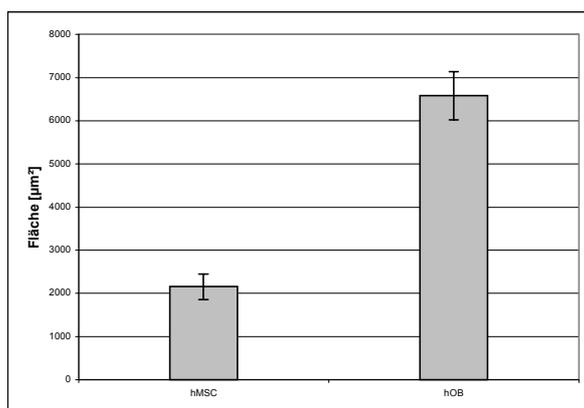


Abb. 3.1: Darstellung der durchschnittlichen Fläche adherenter hMSC und hOB in  $\mu\text{m}^2$ . Die Fehlerbalken repräsentieren das 95% Konfidenzintervall.

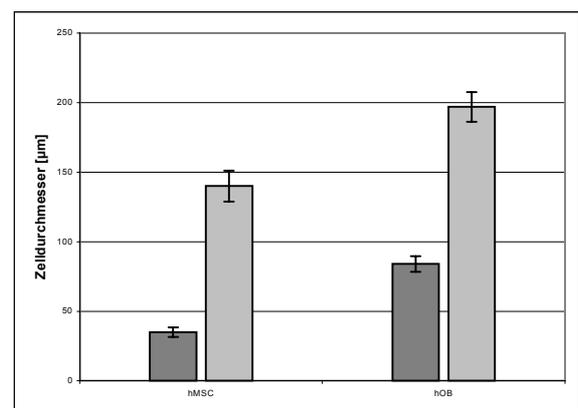


Abb. 3.2: Darstellung der durchschnittlichen maximalen Länge (hellgrau) und Breite (dunkelgrau) adherenter hMSC und hOB in  $\mu\text{m}$ . Die Fehlerbalken repräsentieren das 95% Konfidenzintervall.

### 3.1.2. Zellen in Suspension

Nach dem Ablösen rundeten sich sowohl hMSC als auch hOB ab und nahmen in Suspension eine kugelige Form an. Die Größe der Zellen in Suspension war abhängig von der Zelldichte zum Zeitpunkt des Ablöses. Dabei nahm bei beiden Zellpopulationen die Zellgröße mit zunehmender Zelldichte ab. In Subkonfluenz besaßen hMSC in Suspension ein durchschnittliches Zellvolumen von 8387 fl und einen mittleren Durchmesser von 23,09  $\mu\text{m}$ ; in Konfluenz von 7859 fl bzw. 22,56  $\mu\text{m}$  (Abb. 3.3 und 3.4). Die Veränderung des Zelldurchmessers war statistisch signifikant, nicht aber die Volumenänderung, da sich die 95% Konfidenzintervalle überlappten. Subkonfluente hOB hatten in Suspension ein durchschnittliches Zellvolumen von 8554 fl sowie einen mittleren Durchmesser von 23,32  $\mu\text{m}$ . Konfluente hOB waren signifikant kleiner als subkonfluente Zellen sowohl bezüglich des Volumens als auch des Durchmessers und besaßen korrespondierende Werte von 6843 fl bzw. 22,09  $\mu\text{m}$  (Abb. 3.3 und 3.4).

Im Vergleich der beiden Zelllinien zeigte sich, dass hOB in Subkonfluenz etwas größer waren als hMSC, in Zellkonfluenz allerdings signifikant kleiner als hMSC.

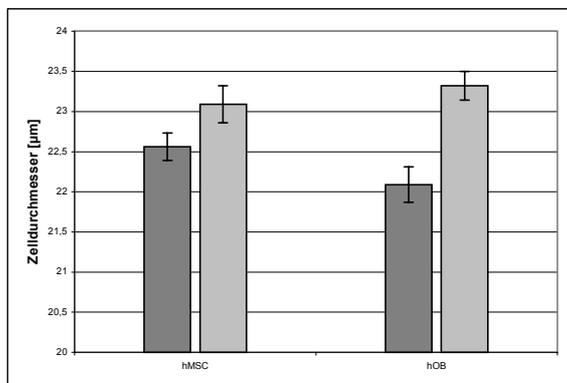


Abb. 3.3: Darstellung des mittleren Zelldurchmessers in  $\mu\text{m}$  von hMSC und hOB in Abhängigkeit von der Zelldichte (Subkonfluenz = hellgrau; Konfluenz = dunkelgrau).

Die Fehlerbalken repräsentieren die 95% Konfidenzintervalle. Die Skalierung der y-Achse ist so gewählt, dass die signifikanten Größenunterschiede der hMSC deutlich werden.

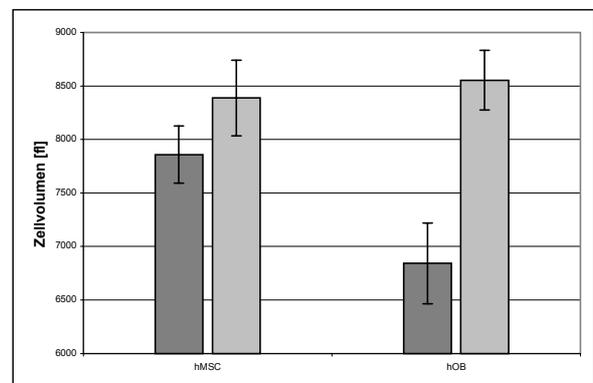


Abb. 3.4: Darstellung der durchschnittlichen Zellvolumina in  $\mu\text{m}$  von hMSC und hOB in Abhängigkeit von der Zelldichte (Subkonfluenz = hellgrau; Konfluenz = dunkelgrau).

Die Fehlerbalken repräsentieren die 95% Konfidenzintervalle. Die Skalierung der y-Achse ist so gewählt, dass die Überlappung der 95% Konfidenzintervalle der hMSC deutlich wird.

## 3.2 Wachstumsverhalten

Die Auswertung der Proliferationskinetik ergab für hMSC eine durchschnittliche Zellsättigungsdichte von  $2,8 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> und Verdopplungszeit von 47,6 h. HOB, welche eine ca. dreimal größere Fläche einnahmen, besaßen mit  $1,0 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> nur fast ein Drittel der durchschnittlichen Zellsättigungsdichte von hMSC und eine mittlere Verdopplungszeit von 68,2 h. Die Graphik zeigt, dass hMSC über einen Zeitraum von Tag 4 bis Tag 14 ein lineares Wachstum aufweisen und nach 14 Tagen das Stadium der Zellkonfluenz erreichen (man beachte die Überschneidung der Standardabweichungen am Tag 14 und 21). Hingegen wachsen hOB über einen viel kürzeren Zeitraum linear und münden nach ca. einer Woche in die Plateauphase ein, welche das Erreichen der Zellkonfluenz widerspiegelt.

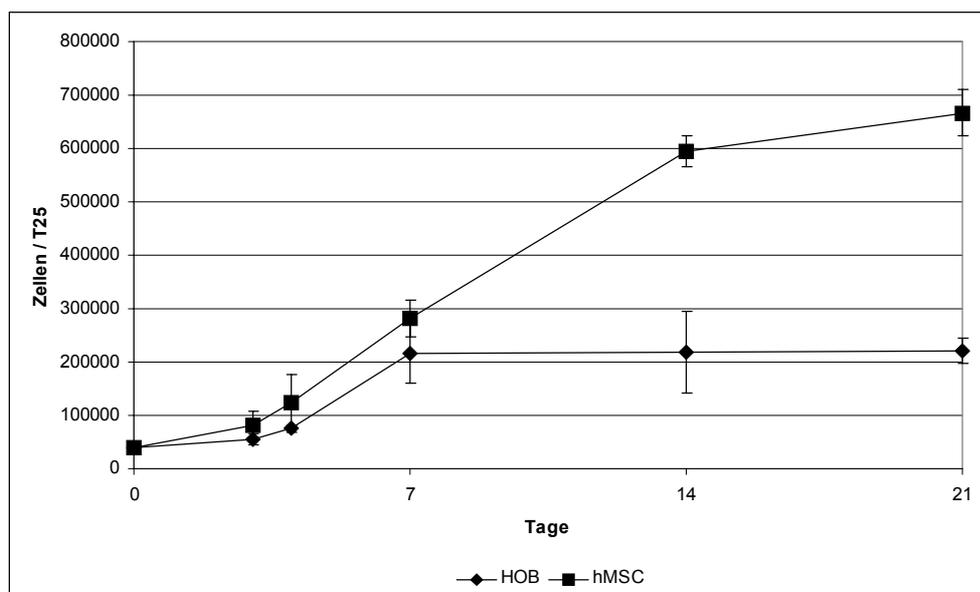


Abb. 3.5: Darstellung der Wachstumskinetik von hMSC (quadratische Messpunkte) und hOB (rautenförmige Messpunkte) über 21 Tage. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen dreier unabhängiger Messungen.

Das Wachstumsmuster der hMSC unterscheidet sich besonders in Zellkonfluenz deutlich von dem der hOB. Denn die spindelförmigen hMSC sind dicht und meist zueinander parallel angeordnet mit einem fischzug- bzw. wirbelartigen Muster (Abb. 3.5.1). Im Gegensatz dazu lagen die verzweigten hOB in Zellkonfluenz weniger dicht gedrängt und überlappten sich nicht, so dass auch nach dreiwöchiger Kulturzeit kleine Lücken im Zellrasen zu erkennen waren (Abb. 3.5.3). HOB zeigten weder eine spezielle Ausrichtung zueinander noch eine charakteristische Wachstumsformation.

Unter osteogener Stimulation ändert sich das Wachstumsverhalten von hMSC deutlich. In Subkonfluenz wuchsen stimulierte hMSC nicht gleichmäßig zu einem Zellrasen zusammen, sondern gruppierten sich zu kleinen Zellhaufen (Abb 3.32). In Zellkonfluenz waren diese Zellhaufen nicht mehr zu erkennen, sondern es bildete sich ein dichter Zellrasen der z.T. eine kopfsteinpflasterartige Multilayerstruktur aufweist (Abb. 3.5.2).

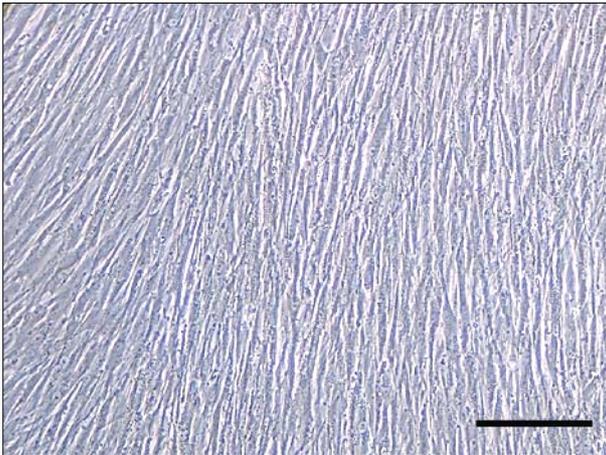


Abb. 3.5.1:  
Darstellung des fischzugartigen Wachstums von konfluenten hMSC in Phasenkontrastmikroskopie nach 14 Tagen. Man beachte die dichte, parallele Anordnung der spindelförmigen Zellen, welche die Morphologie der einzelnen Zelle kaum erkennen lässt (Messbalken = 150  $\mu\text{m}$ ).

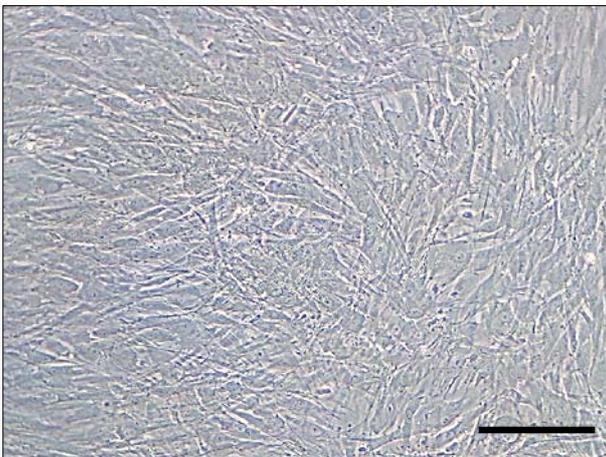


Abb. 3.5.2:  
Darstellung der Zellgruppierung konfluenten hMSC in Phasenkontrastmikroskopie nach 7-tägiger osteogener Stimulation. Man beachte im Vergleich zu Abb. 3.5.1 die veränderte Zellmorphologie, welche nicht spindelförmig sondern eher flächig ist. Das fischzugartige Wachstum ist aufgehoben, dafür ist ein kopfsteinpflasterartiges Wachstumsmuster zu erkennen. Im Gegensatz zu hOB ist der Zellrasen aber lückenlos geschlossen, es sind sogar Überlagerungen zu 'multilayern' erkennbar (Messbalken= 150 $\mu\text{m}$ ).

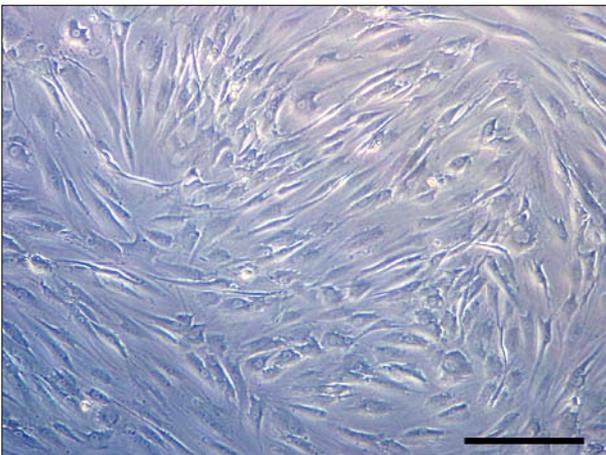


Abb. 3.5.3:  
Darstellung eines z.T. lückenhaften Zellrasens bei konfluenten hOB in Phasenkontrastmikroskopie nach 14 Tagen. Im Vergleich zu hMSC wachsen hOB weniger dicht und streng in 'monolayern'. Sie weisen eine flächigere Ausbreitung mit langen Ausläufern und Verzweigungen auf, die sich z.T. überlappen (vergleiche Abb.3.29), (Messbalken= 150 $\mu\text{m}$ ).

### 3.3 Immunzytochemie

Die Immunzytochemischen Nachweisreaktionen gegen Antigene der Proteine alkalische Phosphatase, Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin, Bone-sialoprotein, Osteoprotegerin, Prokollagen-I, Kollagen-I, -II, -III, -IV, -V, -VI, -VII, -IX, -X, Decorin, Versican, Matrixmetalloproteinase-2 und 9 wurden besonders hinsichtlich ihrer Lokalisation bzw. Verteilung sowie ihrer Homogenität beurteilt. Die Intensität der Immunreaktionen konnte mit der verwendeten Methode nicht berücksichtigt werden.

Die Präsentation der immunzytochemischen Färbeergebnisse ist danach gegliedert, welche Proteine sowohl bei hMSC als auch bei hOB nachgewiesen werden konnten, bzw. welche nur bei einer der beiden Zellpopulationen gefunden wurden. Die Auswertung der immunzytochemischen Ergebnisse nach osteogener Stimulation wird im Anschluss daran getrennt dargelegt.

Keine immunzytochemischen Nachweise konnten für Kollagen-II, -VII und -IX sowie Matrixmetalloproteinase-9 weder bei hMSC noch bei hOB entdeckt werden, weder unter basalen Zellkulturbedingungen noch unter osteogener Stimulation. Als Positivkontrollen dienten Osteosarkomzelllinien MG-63, Saos-2 und U 2-OS, bei denen positive Immunreaktionen beobachtet wurden.

#### 3.3.1 Immunzytochemische Gemeinsamkeiten von hMSC und hOB

Von den 20 nachgewiesenen Proteinen konnten zehn sowohl bei humanen mesenchymalen Stammzellen als auch bei humanen Osteoblasten nachgewiesen werden: Osteopontin, Osteonectin, Prokollagen-I, Kollagen-I, -III, -V, -VI, Osteoprotegerin, Versican sowie Matrixmetalloproteinase-2. Bei beiden Zellpopulationen färbte der überwiegende Anteil der Zellen positiv. Die Markierungsmuster dieser Antikörper unterschieden sich bei hMSC und hOB nicht voneinander.

Im folgenden Abschnitt sind die Färbeergebnisse so angeordnet, dass hMSC im oberen und hOB im unteren Bild jeweils in 400facher Vergrößerung dargestellt sind.

### Osteopontin

Die Markierungen für Osteopontin ergaben bei fast allen Zellen der hMSC und hOB ein retikuläres zytoplasmatisches Färbemuster mit paranukleärer Lokalisation, wobei nicht der gesamte Kern von der netzartigen Markierung umgeben war. Je nach Ausdehnung der Zelle waren die retikulären Immunreaktionen mehr oder weniger ausgebreitet. Extrazellulär konnten keine Reaktionen gefunden werden.

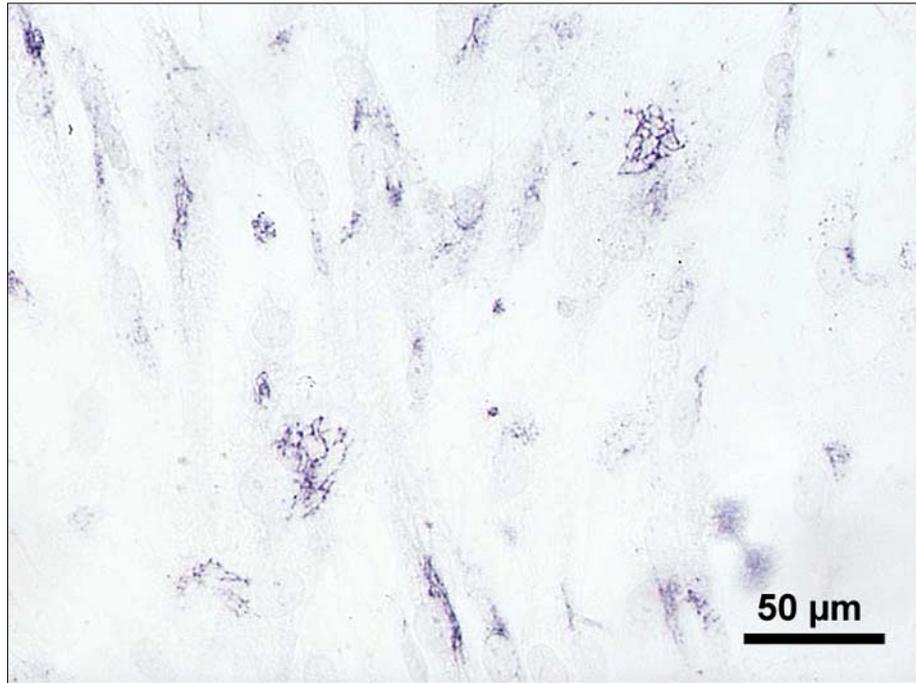


Abb. 3.6: hMSC gefärbt für Osteopontin (MPIIB10).

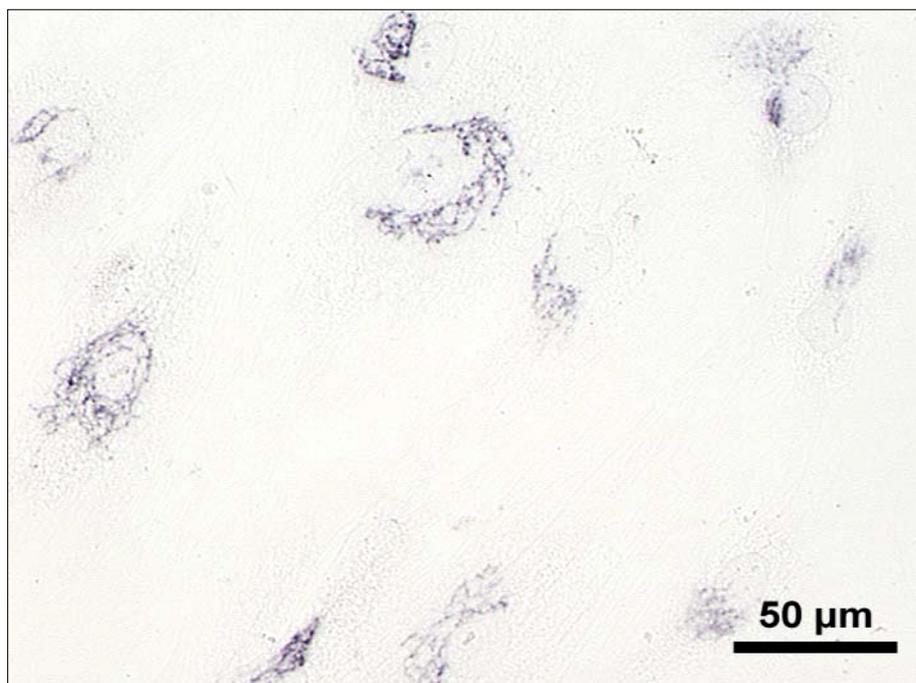


Abb. 3.7: hOB gefärbt für Osteopontin (MPIIB10).

### Osteonectin

Osteonectin wurde in einem granulärem Färbemuster nachgewiesen, wobei die Granula besonders peripher in den Zellen lokalisiert waren und das restliche Zytoplasma eine dezente retikuläre Markierung aufwies. Der Nachweis außerhalb der Zellen war negativ.

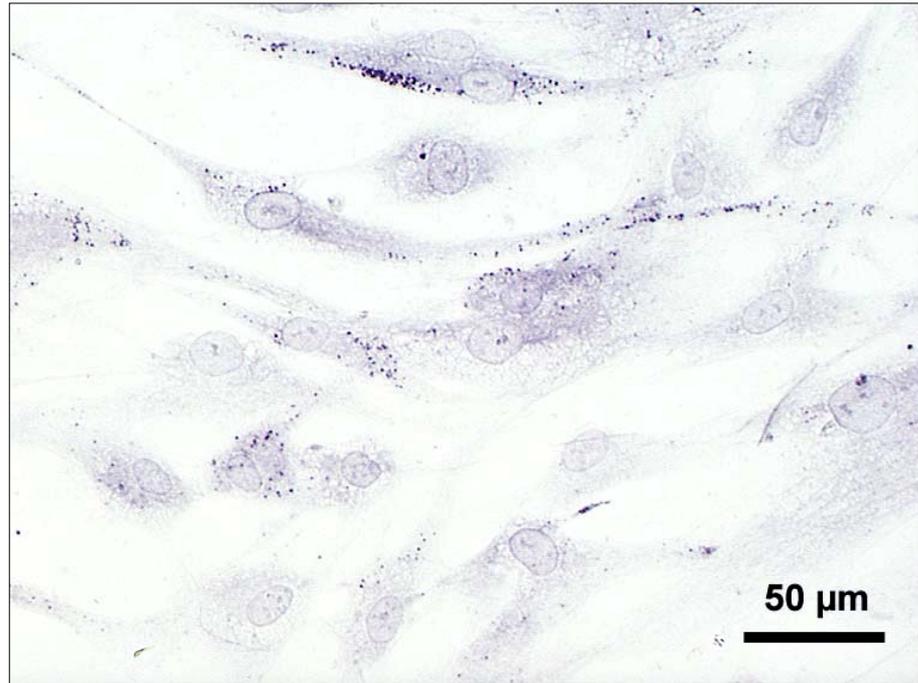


Abb. 3.8: HMSC gefärbt für Osteonectin (AON-1).

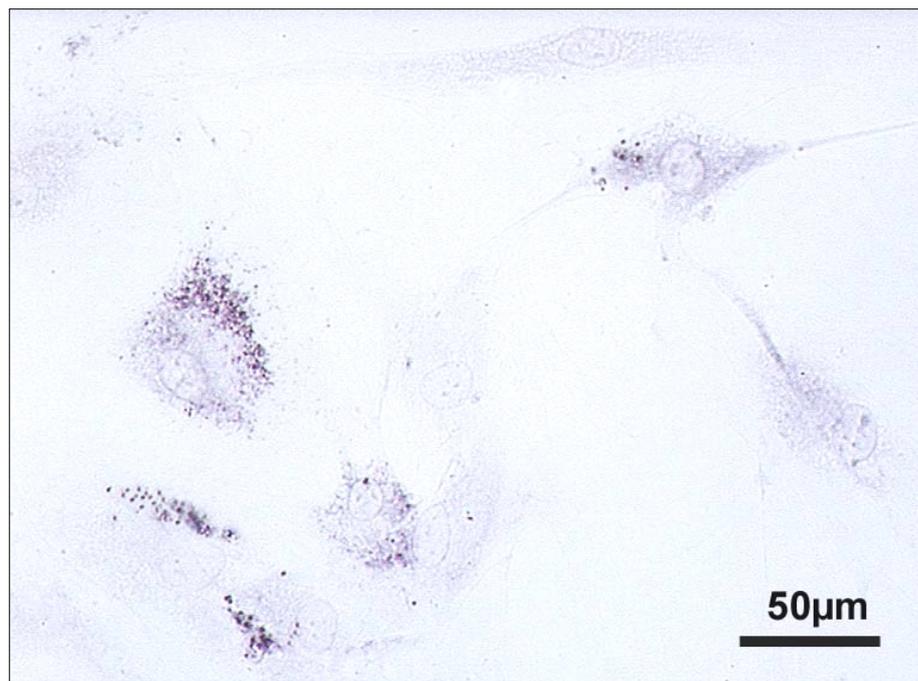


Abb. 3.9: HOB gefärbt für Osteonectin (AON-1).

Prokollagen-I und Kollagen-I:

Die Färbemuster von Prokollagen-I unterschieden sich qualitativ nicht von Kollagen-I, so dass hier lediglich die Ergebnisse für Prokollagen-I präsentiert werden. Prokollagen-I zeigte ein homogenes Muster mit kleinen bis mittelgroßen Granula, die im gesamten Zytoplasma verteilt waren, wobei eine paranukleäre Aufhellung erkennbar war. Extrazellulär waren die Nachweise geflechtartig zwischen den Zellen ausgebildet und ausgeprägter bei den hOB zu finden als bei hMSC.

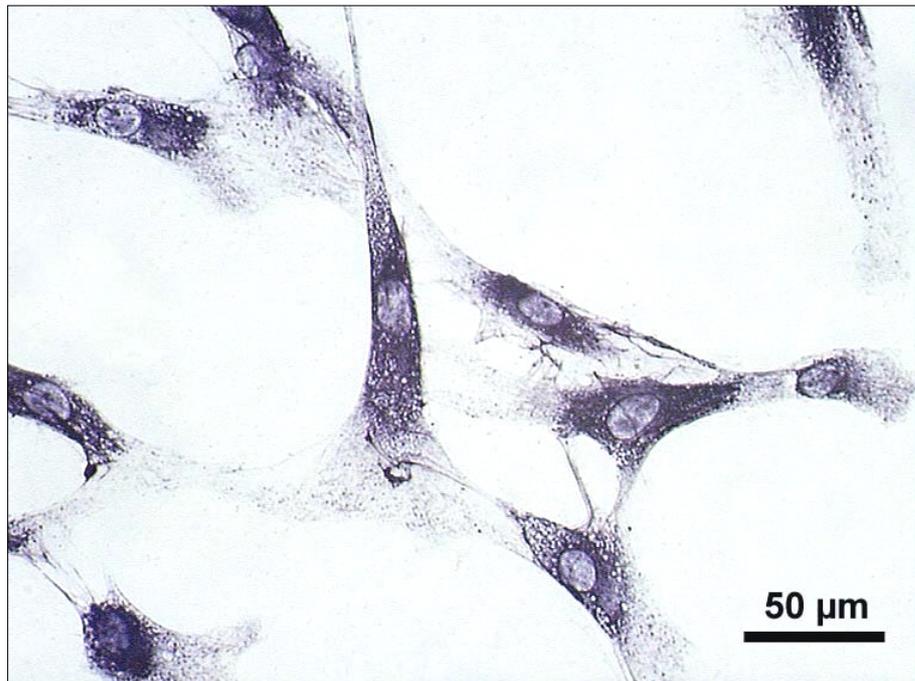


Abb. 3.10: hMSC gefärbt für Prokollagen-I (M-38).

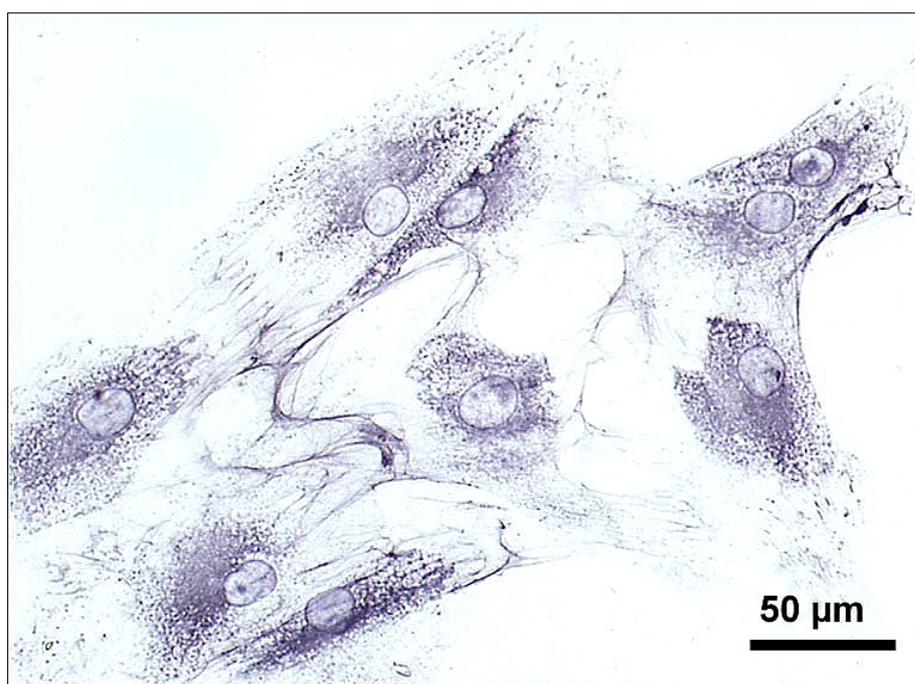


Abb. 3.11: hOB gefärbt für Prokollagen-I (M-38).

### Kollagen-III

Die Markierungen für Kollagen-III zeigten eine ähnliche Charakteristik wie Prokollagen-I mit einer panzytoplasmatischen Verteilung der Granula und paranukleärer Aufhellung. Obwohl die Nachweisstärke bei den hOB variierte, konnten im überwiegenden Anteil der Zellen eine positive Reaktion gefunden werden. HMSC zeigten dagegen weniger regelmäßige Markierungen, sondern waren besonders in Zellklustern positiv. Extrazellulär waren die Nachweisreaktionen negativ.

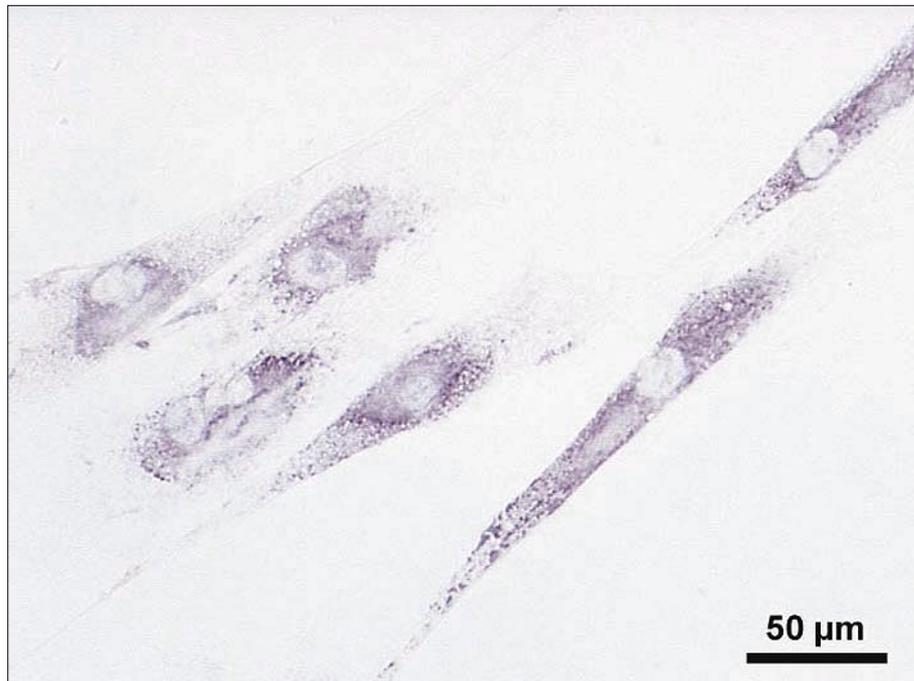


Abb. 3.12: HMSC gefärbt für Kollagen-III (III-53 (4H12)).

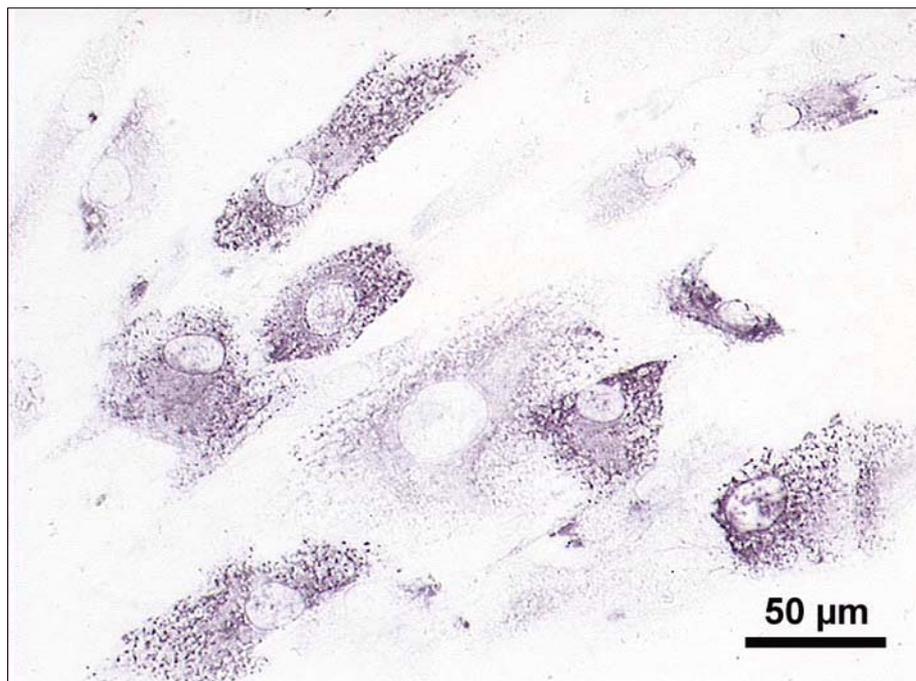


Abb. 3.13.: hOB gefärbt für Kollagen-III (III-53 (4H12)).

### Kollagen V

Die Nachweise für Kollagen-V ergaben ein in allen Zellen gleichmäßiges, feinretikuläres zytoplasmatisches Färbemuster, welches die Ausdehnung des Zelleibes gut erkennen ließ. Die Zellausläufer enthielten zusätzlich Granula. Extrazellulär war keine Markierung erkennbar.

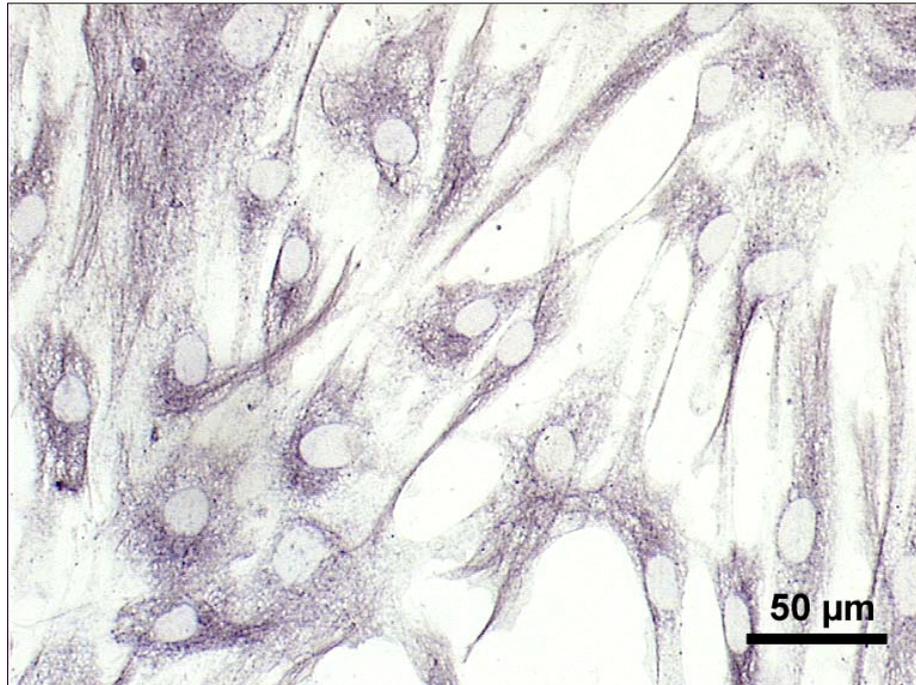


Abb. 3.14: HMSC gefärbt für Kollagen-V (V-3C9).

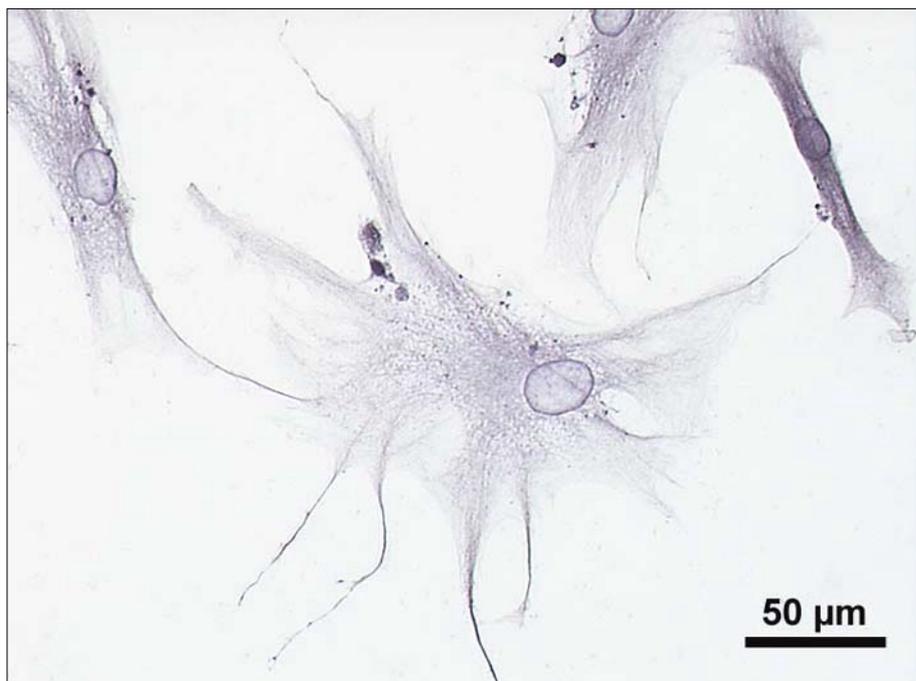


Abb. 3.15: HOB gefärbt für Kollagen-V (V-3C9).

### Kollagen-VI

Kollagen-VI zeigte ein Färbemuster, das dem von Prokollagen-I und Kollagen-III ähnelte und eine granuläre zytoplasmatische Verteilung aufwies. Extrazellulär konnten fibrilläre Nachweise gefunden werden, die allerdings anders als bei Prokollagen-I kein Netzwerk bildeten.

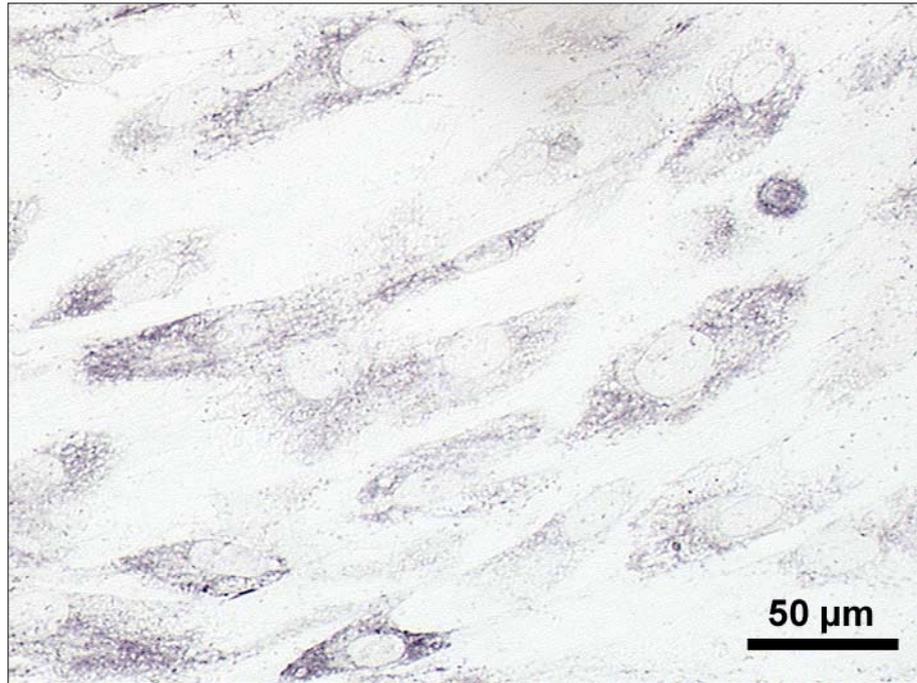


Abb. 3.16: HMSC gefärbt für Kollagen-VI (5C6).

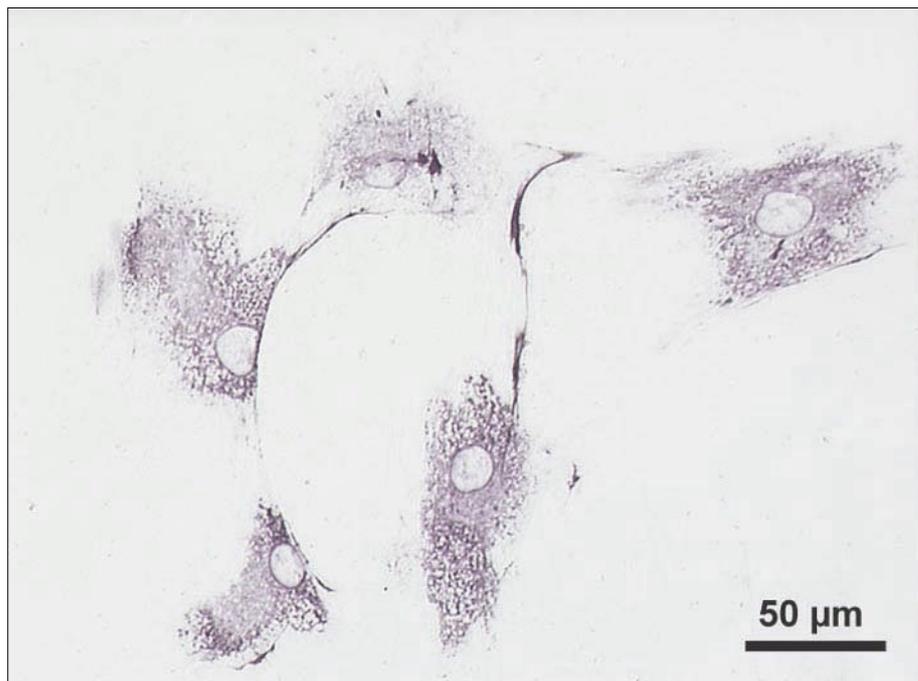


Abb. 3.17: HOB gefärbt für Kollagen-VI (5C6).

### Osteoprotegerin

Osteoprotegerin zeigte bei allen Zellen ein homogenes, feingranuläres Färbemuster, welches auf das Zytoplasma begrenzt war. Extrazellulär waren keine Nachweise zu finden. Man beachte, dass die Nachweisreaktionen in den hOB größere Granula aufwiesen als in den hMSC.



Abb. 3.18: HMSC gefärbt für Osteoprotegerin (H-249).



Abb. 3. 19: hOB gefärbt für Osteoprotegerin (H-249).

### Versican

Das Färbemuster von Versican ergab eine retikuläre panzytoplasmatische Verteilung bei allen Zellen beider Zellpopulationen, wobei eine paranukleäre Akzentuierungen der Nachweise deutlich wurde. Extrazellulär wurde eine diffuse Markierung mit milchglasartigem, hyalinem Charakter sichtbar.



Abb. 3.20: HMSC gefärbt für Versican (12C5).

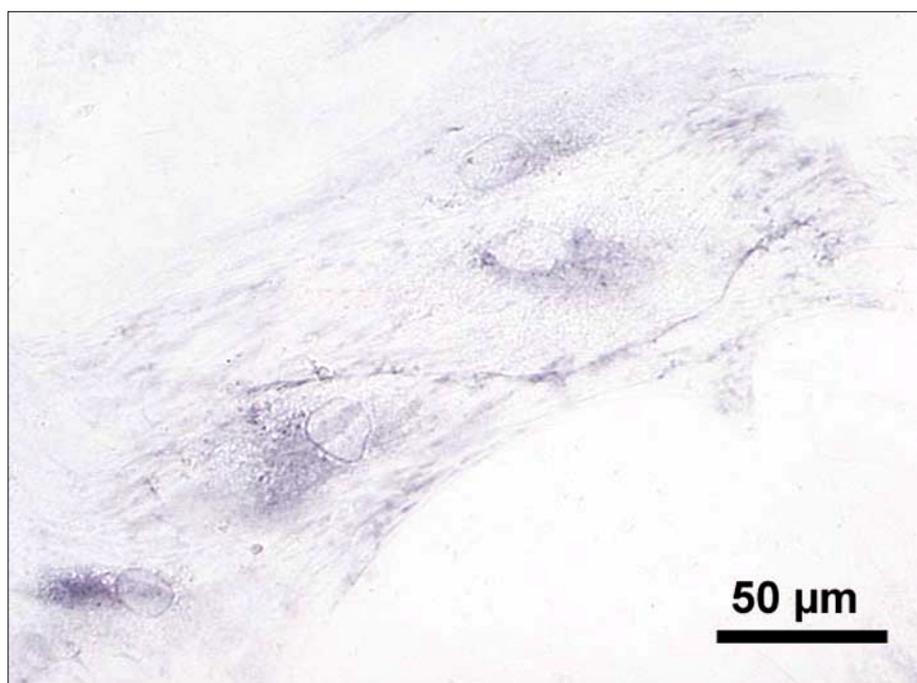


Abb. 3.21: HOB gefärbt für Versican (12C5).

### Matrixmetalloproteinase-2

Die Matrix-Metalloproteinase-2 konnte in allen Zellen mit einem feinretikulärem Muster mit einer paranukleären Betonung besonders bei hOB gefunden werden. Eine schwache extrazelluläre Markierung konnte beobachtet werden.

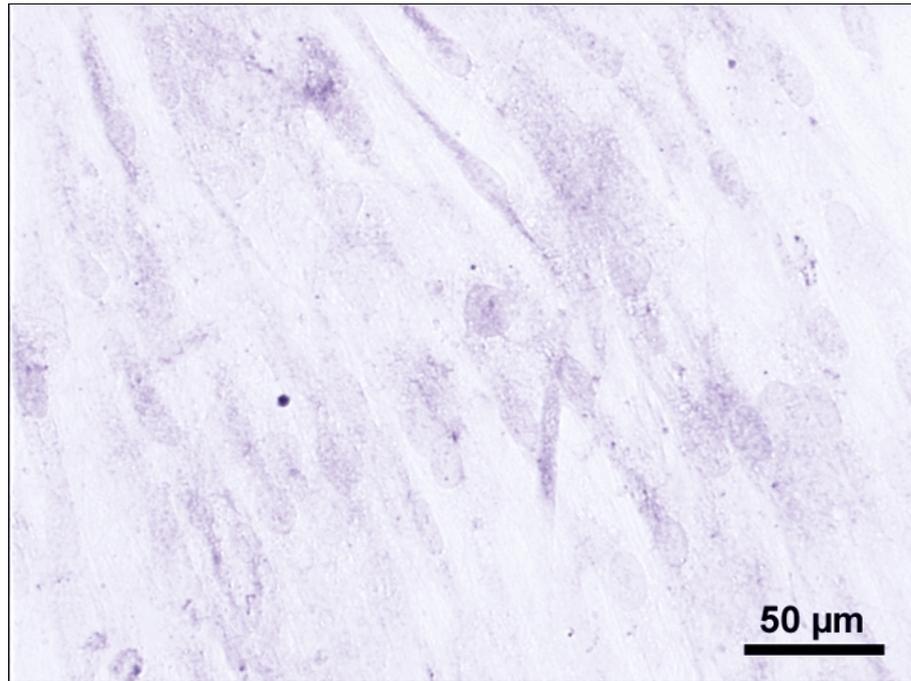


Abb. 3.22: HMSC gefärbt für Matrixmetalloproteinase-2 (AB809).

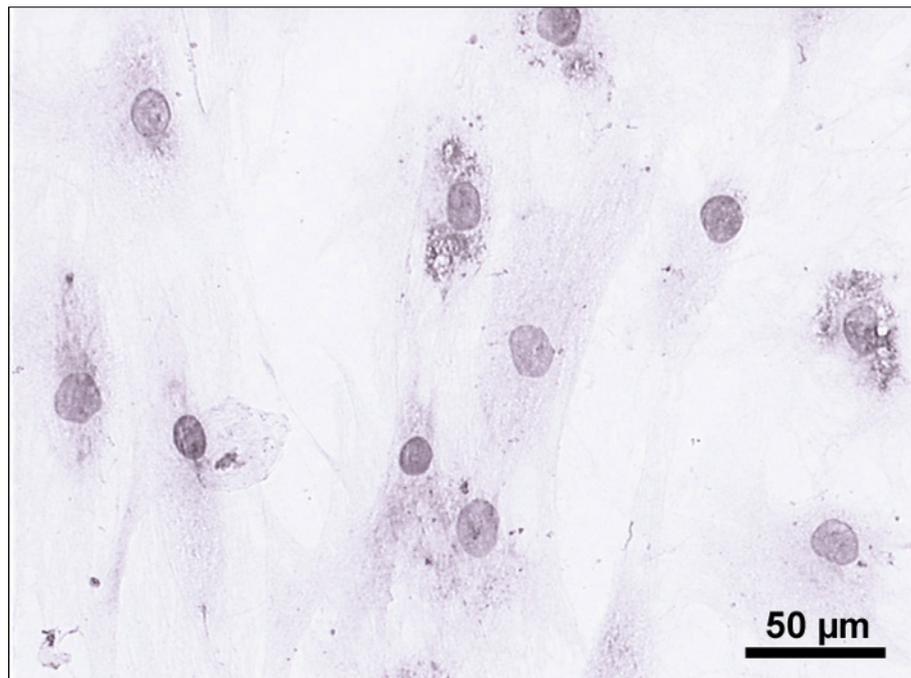


Abb. 3.22: hOB gefärbt für Matrixmetalloproteinase-2 (AB809).

### 3.3.2 Immunzytochemische Unterschiede von hMSC und hOB

Für fünf der 20 untersuchten Proteine konnten unterschiedliche immunzytochemische Färbeargebnisse bei hMSC und hOB ermittelt werden: Kollagen-IV, Kollagen X, Bone Sialoprotein, Osteocalcin und Decorin.

Kollagen-IV und -X waren bei hMSC positiv. Dagegen zeigten hOB für Kollagen-IV und -X keine Markierungen, lediglich eine Fraktion von ca. 10 % der Zellen wiesen positive Reaktionen mit einem vergleichbaren Färbemuster wie hMSC auf (Kollagen-IV: Abb. 3.23 und 3.24; Kollagen-X Abb. 3.25 und 3.26).

Im Gegensatz dazu zeigten Antikörper gegen die Proteine Osteocalcin, Decorin und Bone Sialoprotein nur bei Osteoblasten positive Markierungen (Bone sialoprotein Abb. 3.27 und 3.28). hMSC waren für diese Proteine durchweg negativ.

Innerhalb der hOB konnte darüber hinaus für die Proteine Osteocalcin und Decorin ein Zelldichte-abhängiger Nachweis gefunden werden, denn für diese Proteine zeigten sich ausschließlich in Zellkonfluenz positive Reaktionen. Subkonfluente Osteoblasten zeigten keine positive Immunreaktion (Osteocalcin Abb. 3.29; Decorin Abb. 3.30). Die Markierungen für Bone Sialoprotein zeigten keine Abhängigkeit von der Zelldichte und waren in allen Stadien der Zellkonfluenz positiv für hOB.

### Kollagen-IV

Der Nachweis von Kollagen-IV war bei hMSC im überwiegenden Teil der Zellen positiv mit einem granulären zytoplasmatischen Färbemuster mit paranukleärer Aufhellung ähnlich wie für die Kollagene-I, -III, und -VI. Extrazellulär konnte keine Reaktionen detektiert werden.

Im Gegensatz dazu waren nur 10% der hOB positiv. Das Färbemuster der positiven Zellen unterschied sich nicht von dem der hMSC.

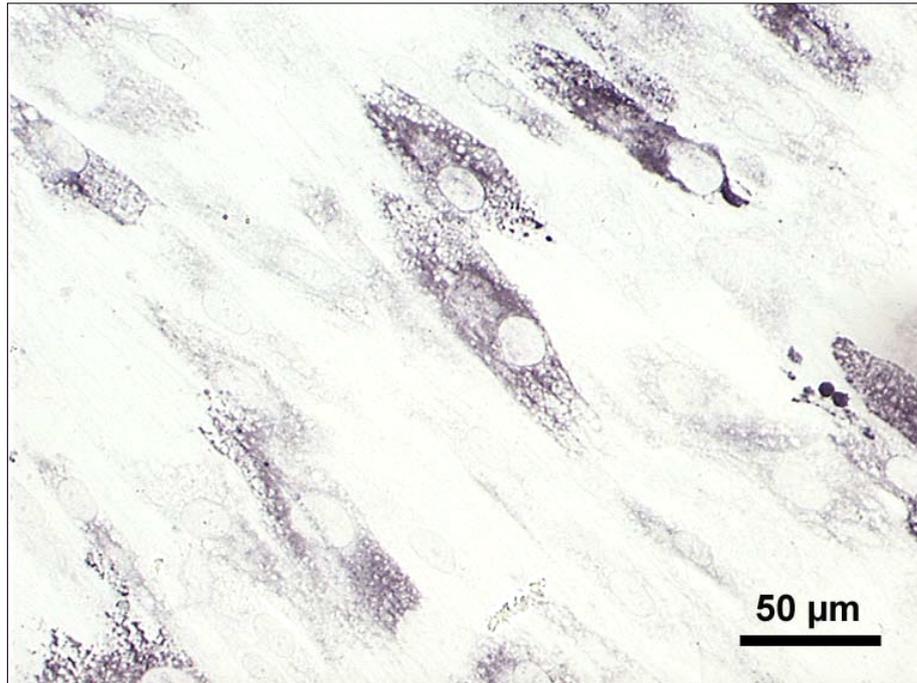


Abb. 3.23: hMSC gefärbt für Kollagen-IV (M3F7).



Abb. 3.24: hOB gefärbt für Kollagen-IV (M3F7). Zellkerne der ungefärbten hOB sind mit Sternen gekennzeichnet.

### Kollagen-X

Die Nachweisreaktionen von Kollagen-X waren bei hMSC schwach aber eindeutig positiv mit einem feinretikulären zytoplasmatischen Muster mit paranukleären Akzentuierung ohne einen extrazellulären Nachweis. HOB waren überwiegend negativ für Kollagen-X, lediglich eine Fraktion von ca. 10% der Zellen wiesen positive Reaktionen auf.

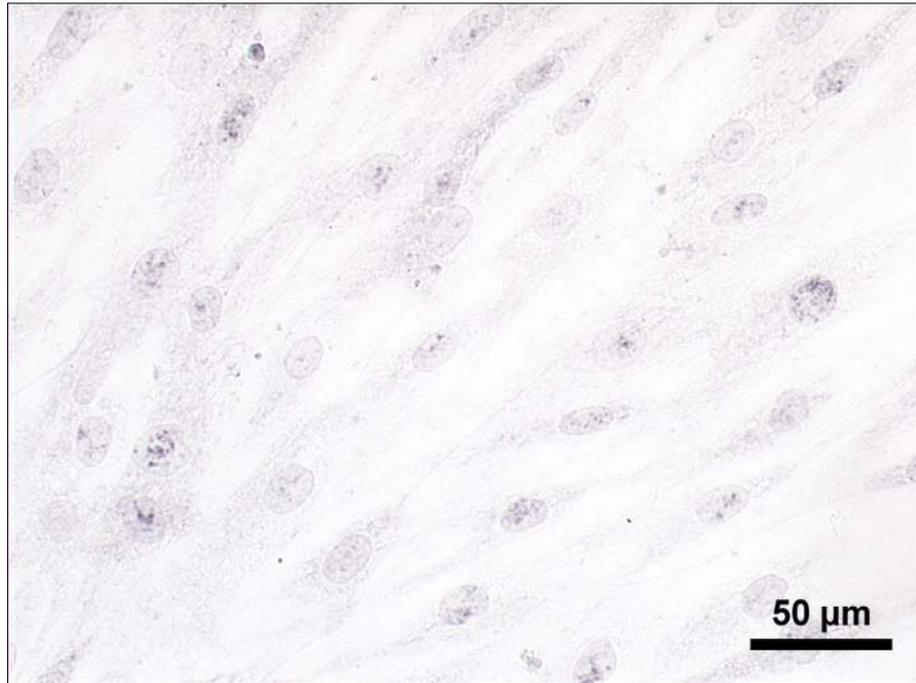


Abb. 3.25: hMSC gefärbt für Kollagen-X (Col-X).

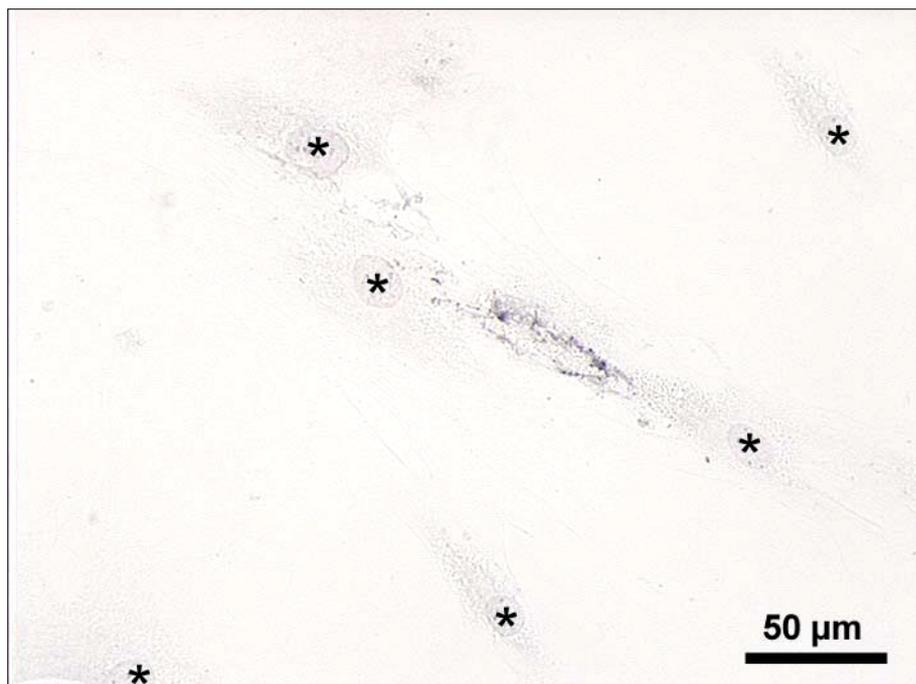


Abb. 3.26: hOB gefärbt für Kollagen-X (Col-X). Zellkerne der ungefärbten hOB sind mit Stern gekennzeichnet

### Bone Sialoprotein

Positive Markierungen für BSP wurden nur bei den hOB gefunden unabhängig von der Zelldichte, mit einem zytoplasmatisches Färbemuster mit kleinen Granula sowie dezenten extrazellulären Nachweisen. In hMSC konnte Bone sialoprotein dagegen nicht detektiert werden.

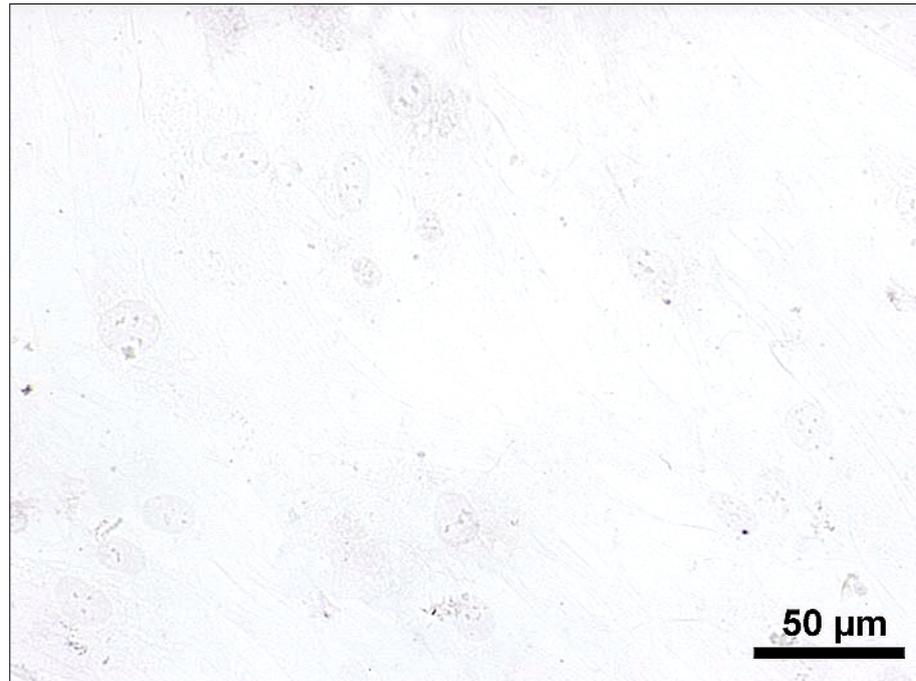


Abb. 3.27: hMSC gefärbt für Bone Sialoprotein (WVID1(9C5)).



Abb. 3.28: hOB gefärbt für Bone Sialoprotein (WVID1(9C5)).

### Osteocalcin und Decorin

Osteocalcin und Decorin waren nur in konfluenten hOB positiv, dagegen negativ in subkonfluenten hOB (Insets mit Messbalken = 50µm) und hMSC.

Osteocalcin wies eine homogene zytoplasmatische Markierung vereinzelt mit Granula auf (Abb. 3.29).

Decorin zeigte in konfluenten hOB eine feines zytoplasmatisches Muster, das paranukleärer deutlicher ausgeprägt war (Abb. 3.30).

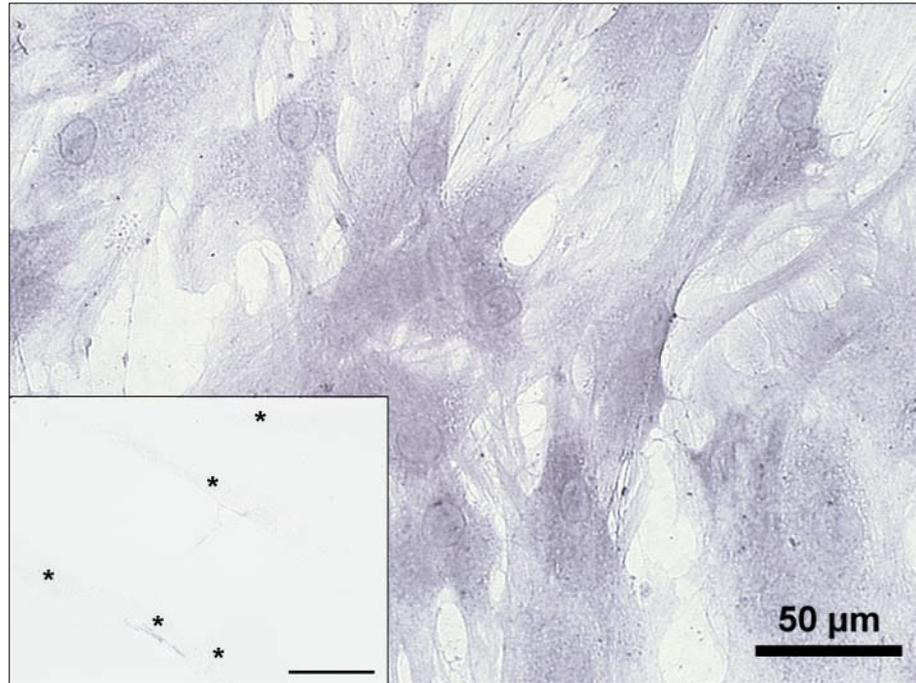


Abb. 3.29: Konfluente hOB gefärbt für Osteocalcin (OC-1). Das Inset zeigt negative Färbeargebnisse für subkonfluente hOB (Zellkerne mit Stern gekennzeichnet).

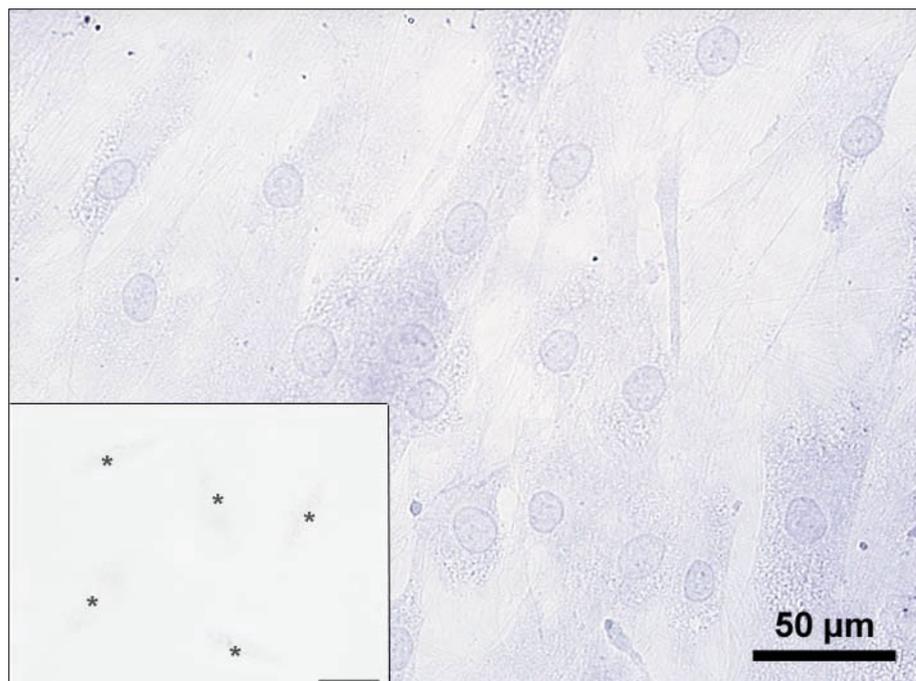


Abb. 3.30: hOB gefärbt für Decorin (CB-1) in Zellkonfluenz. Das Inset zeigt negative Färbeargebnisse für subkonfluente hOB (Zellkerne mit Stern gekennzeichnet).

### 3.3.3 Immunzytochemische Veränderungen nach osteogener Stimulation

Nach osteogener Stimulation veränderten besonders hMSC ihr äußeres Erscheinungsbild sowie ihre Wachstumsformation (siehe Abschnitt 3.20). Zusätzlich dazu veränderte sich auch das Färbemuster unter osteogener Stimulation für die Proteine Alkalische Phosphatase, Bone Sialoprotein, Decorin, Osteocalcin, Osteopontin sowie für Kollagen-X.

Osteopontin, Osteoprotegerin und Kollagen-X konnten unter osteogener Stimulation nicht sicher immunzytochemisch nachgewiesen werden. Die Nachweise der Proteine Bone Sialoprotein und Decorin wurden nach Stimulation positiv, die Markierungen waren jedoch nur sehr schwach. Die Immunreaktionen für Alkalische Phosphatase (Abb. 3.29) und für Osteocalcin (Abb. 3.30) wurden unter Stimulation positiv, besonders in Bereichen, in denen die Zellen eine Multilayerstruktur ausgebildet hatten und extrazelluläre Matrix bildeten.

### 3.3.3.1 Osteogen stimulierte hMSC

Für Alkalische Phosphatase zeigten sich bei stimulierten hMSC vereinzelt ein zytoplasmatisches Färbemuster und extrazelluläre Nachweise. (Abb. 3.31).

Die Färbung für Osteocalcin waren ebenfalls zytoplasmatisch und besonders ausgeprägt in mehrschichtigen Zellhaufen, wo auch extrazellulär Nachweisreaktionen gefunden wurden (Abb. 3.32).

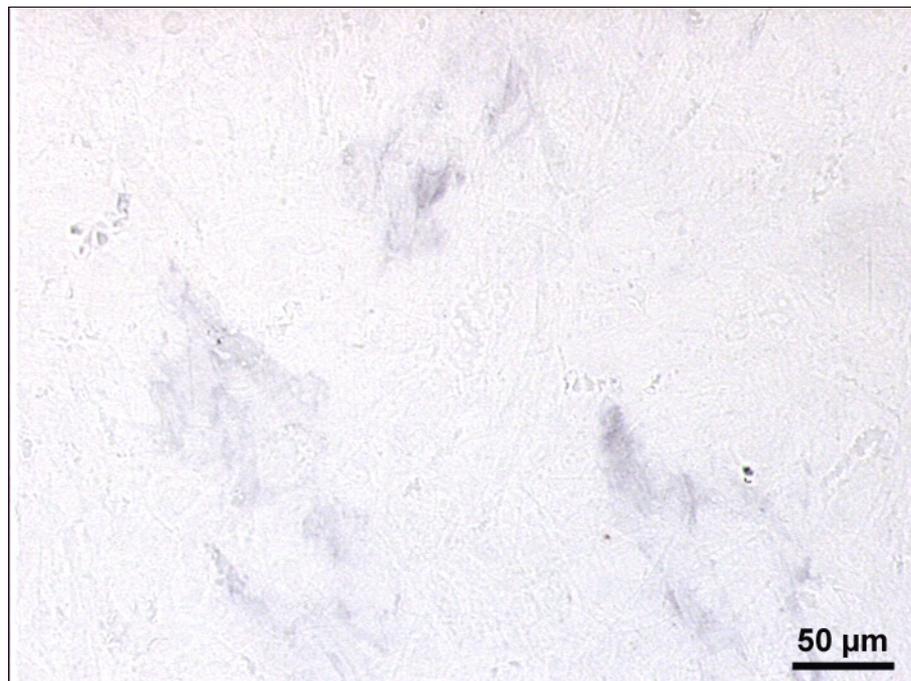


Abb. 3.31: hMSC gefärbt für Alkalische Phosphatase (B4-78) nach osteogener Stimulation. Der Bildausschnitt zeigt einen konfluenten Zellrasen mit vereinzelt positiven Zellen.

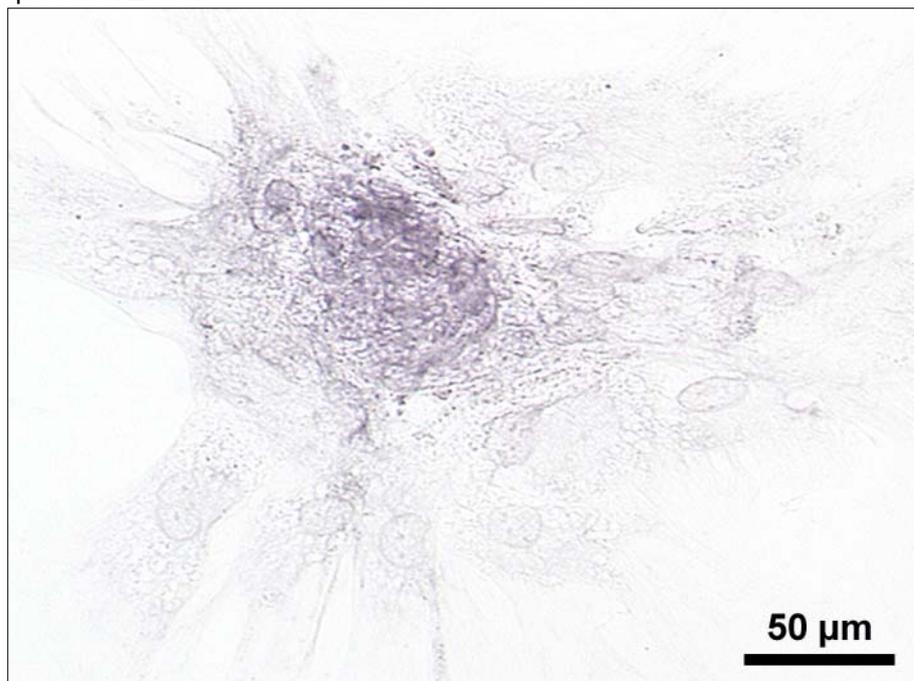


Abb. 3.32: hMSC gefärbt für Osteocalcin (OC-1) nach osteogener Stimulation. Der Bildausschnitt zeigt einen mehrschichtigen Zellhaufen, in dem der Osteocalcin Nachweis besonders deutlich war.

### 3.3.3.2 Osteogen stimulierte hOB

Auch hOB veränderten ihr Färbeprofil unter osteogener Stimulation ähnlich wie für hMSC dargestellt, denn die Nachweise für Osteopontin, Osteoprotegerin und Decorin konnten nicht sicher detektiert werden. Besonders auffällig war der Unterschied im Gegensatz zu nicht stimulierten, konfluenten hOB für die Alkalische Phosphatase, welche nur nach osteogener Stimulation positiv färbte (Abb. 3.33), dagegen waren die Nachweise in konfluenten, unstimulierten hOB negativ (Inset Abb. 3.33). Das Färbemuster war granulär, wobei die Nachweisreaktionen besonders in der Peripherie des Zytoplasmas an der Zellmembran lokalisiert waren. Extrazellulär waren die Nachweise teilweise positiv.

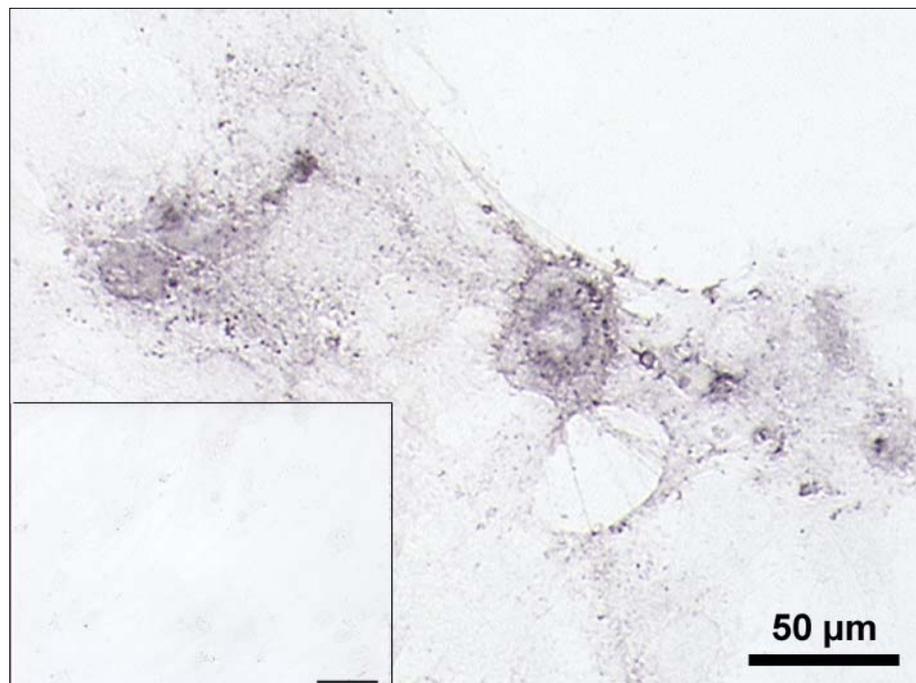


Abb. 3.33: hOB gefärbt für ALP (B4-78) nach osteogener Stimulation. Das Inset zeigt negative Färbeargebnisse für konfluente, unstimulierte hOB. Messbalken im Inset = 50 µm.

### 3.3.4 Übersicht der immunzytochemischen Ergebnisse

Die Tabelle 3.1 stellt die Ergebnisse der immunzytochemischen Ergebnisse von hMSC ohne und mit osteogener Stimulation, sowie von hOB in Abhängigkeit von der Zelldichte zusammen.

	hMSC	hMSC osteogen stim.	hOB subkonfluent	hOB konfluent
Alkalische Phosphatase	-	(+)	-	-
Osteocalcin	-	(+)	-	+
Osteonectin	+	+	+	+
Osteopontin	+	-	+	+
Bone Sialoprotein	-	(+)	+	+
Osteoprotegerin	+	-	+	+
Prokollagen-I	+	+	+	+
Kollagen-I	+	+	+	+
Kollagen-II	-	-	-	-
Kollagen-III	+	+	+	+
Kollagen-IV	+	+	-	-
Kollagen-V	+	+	+	+
Kollagen-VI	+	+	+	+
Kollagen-VII	-	-	-	-
Kollagen-IX	-	-	-	-
Kollagen-X	+	(+)	-	-
Decorin	-	(+)	-	+
Versican	+	+	+	+
Matrix-Metalloproteinase-2	+	+	+	+
Matrix-Metalloproteinase-9	-	-	-	-

Tabelle 3.1 Darstellung der immunzytochemischen Färbeergebnisse. += positive Markierung, -= keine Markierung, (+) = sehr schwache Markierung, kaum dokumentierbar.

## 4. Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methodik

#### Zellen und Marker

Aus den gebräuchlichen Techniken der Zellisolation osteogener Zellen resultieren heterogene Gemische, die aus verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten, mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten, oder Endothelzellen bestehen (Jonsson et al. 1999). Die einzelnen Zellen unterscheiden sich sowohl morphologisch (Colter et al. 2001) als auch immunhistochemisch voneinander (Vogel et al. 2003; Wilkins and Jones 1998). Ein Standardprotokoll für die Isolierung von hOB bzw. hMSC hat sich nicht durchgesetzt und die ursprünglichen Protokolle wurden in vielfältiger Hinsicht variiert. Eine Vergleichbarkeit von Studien, die Zellen auf unterschiedliche Weise gewonnen haben, ist daher nur begrenzt möglich. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit kommerziell erhältliche Zellen ausgewählt. Diese wurden standardisiert nach etablierten Methoden gewonnen und enthalten zum einen großen Anteil hMSC als Ausgangspunkt (Pittenger et al. 1999; Owen 1988) bzw. hOB als Endpunkt der osteoblastären Kaskade (Robey and Termine 1985; Kasperk et al. 1995).

Die in dieser Arbeit verwendeten Marker wurden nach ausführlicher Literaturrecherche ausgewählt. Bei der Auswahl wurden die Marker bevorzugt, welche in der Literatur als immunzytochemische Standardmarker der osteoblastären Differenzierung gelten wie z.B. Prokollagen-I, Bone Sialoprotein, Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin, Osteoprotegerin, Alkalische Phosphatase (Aubin 1998; Bruder et al. 1997b; Beresford et al. 1993). Desweiteren wurden die Kollagene I, III, IV, V, VI, und X ausgesucht, welche während der Osteogenese bzw. im reifen Knochen vorkommen (Poliard et al. 1999; Becker et al. 1986; Aubin 1998). Mit den Kollagenen II und IX ist außerdem eine Abgrenzung gegenüber der chondroblastären Differenzierungskaskade möglich (Barry et al. 2001). Da Proteoglycane und Matrixmetalloproteinasen (MMP) für den Knochenstoffwechsel eine bedeutende Rolle spielen wurden mit Decorin und Versican zwei Hauptvertreter der Proteoglycane (Blumberg et al. 1997), bzw. mit MMP-2 und -9 zwei für die Rattenosteogenese wichtige MMPs ausgewählt (Filanti et al. 2000).

Obwohl *cbfa1* als einer der spezifischsten Marker der osteoblastären Differenzierung gilt (Ducy et al. 2000), wurden *cbfa1* und auch andere Transkriptionsfaktoren in dieser Untersuchung aus verschiedenen Gründen nicht verwendet. Zum einen werden in der Literatur die Nachweise der Transkriptionsfaktoren nicht mittels Immunzytochemie, sondern standardmässig über den mRNA-Nachweis, z.B. mittels RT-PCR, durchgeführt (Ducy et al. 1997; Nakashima et al. 2002). Zum anderen sind *cbfa1* oder Osterix (*Osx*), welches *cbfa1* während der Transkription untergeordnet und nachgeschaltet ist (Nakashima et al. 2002), bereits positiv auf Vorläuferzellen. Da hMSC, sobald sie auf einer Oberfläche adhärirt sind, bereits keine Stammzellen sondern Vorläuferzellen sind (Zohar et al. 1997), ist kein Unterschied zu reifen Osteoblasten zu erwarten. Schließlich kommen diese Transkriptionsfaktoren nicht ausschließlich während der Osteogenese vor, sondern können auch bei der Chondrogenese in Knorpelzellen nachgewiesen werden (Kim et al. 1999; Lian et al. 1998). Daher wurde auf den immunzytochemischen Nachweis der Transkriptionsfaktoren in dieser Arbeit verzichtet. Denn das Ziel dieser Arbeit war es, ein geeignetes Färbeprofil etablierter immunzytochemischer Marker auf standardisiert gewonnenen Zellpopulationen zu etablieren, welches als Standard bzw. als Referenz dient und Vergleiche verschiedener Untersuchungen ermöglicht.

#### Immunzytochemie

Als Methoden zur Charakterisierung von hMSC und Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade wurden mit der Morphometrie und besonders mit der Immunzytochemie Techniken gewählt, die eine Untersuchung auf Einzelzellniveau erlauben. Eine Untersuchung einzelner Zellen ist eine Voraussetzung dafür, bestimmte Zellen in heterogenen Zellgemischen zu identifizieren und für die Kultivierung isolieren zu können. Andere Methoden, welche die Zellpopulation als Ganzes betrachten und eine Homogenisierung der Zellpopulation beinhalten, wie z.B. der RT-PCR, lassen keinen Rückschluss zu, welcher Anteil der Zellen ein Protein bildet (Bilbe et al. 1996). Zwar bieten diese Verfahren in gewissem Maße den Vorteil der Quantifizierbarkeit, jedoch können die Ergebnisse lediglich rechnerisch der einzelnen Zelle zugeordnet werden. Denn eine Identifikation einzelner Zellen, welche die mRNA exprimieren, ist mittels dieser Methoden nicht möglich. Ebenso wenig kann eine Korrelation zwischen der nachgewiesenen Menge mRNA und der Menge des tatsächlich vorhandenen Menge Proteins hergestellt werden. Dadurch

können keine Rückschlüsse gezogen werden, ob und wieviel Protein von einem Zellgemisch gebildet wird, das ein positives Ergebnis in der RT-PCR aufweist.

Die Untersuchung der einzelnen Zelle ist darüber hinaus von Bedeutung, um die charakteristische Lokalisation von Antigenen zu beurteilen, d.h. welcher zytoplasmatischen Struktur sie zugeordnet werden können. Damit könnten eventuell auch unterschiedliche Reifungsgrade einzelner Zellen von einander abgegrenzt werden. Beispielsweise färbte Osteopontin in einem retikulären Färbemuster, welches von der Lokalisation dem Golgiapparat entspricht. Osteonectin wies hingegen eine für Sekretionsvesikel typische Färbung auf. Es kann außerdem beurteilt werden, ob ein Protein sezerniert wird und am Aufbau einer extrazellulären Matrix beteiligt ist, wie z.B. Kollagen-I, welches eine faserartige extrazelluläre Färbung aufwies.

Im Gegensatz dazu können bei anderen immunologischen Methoden, welche die Lysierung und Homogenisierung der Zellen beinhalten, wie z. B. Western blot oder Immunpräzipitation, keine Aussage darüber getroffen werden, welche Zellen das Antigen produzieren bzw. wo das Antigen lokalisiert ist. Gleiches gilt für Methoden auf mRNA-Ebene, wie z.B. RT-PCR oder Northern Blot Analyse.

Besonders wichtig ist die Analyse der einzelnen Zelle während der osteoblastären Differenzierung, denn nicht alle Zellen befinden sich im gleichen Differenzierungsstadium. Auch kommt es durch osteogene Stimulation nicht zu einer Synchronisation der Differenzierungsstadien der verschiedenen Zellen, d.h. nicht alle Zellen werden von der Stimulation in gleichem Masse beeinflusst. In diesem Zusammenhang konnten Liu et al. (Liu et al. 1994) mittels single cell PCR zeigen, dass stimulierte Rattencalvariazellen abhängig von ihrer Lage innerhalb eines *bone nodules* ein unterschiedliches Expressionsmuster von osteoblasten-assoziierten Proteinen und folglich unterschiedliche Reifungsstufen aufweisen. Vergleichbare Hinweise auf das Vorliegen verschiedener Reifungsstufen konnten auch in dieser Arbeit ermittelt werden, denn die Färbungen für Alkalische Phosphatase und Osteocalcin (OC) waren bei osteogen stimulierten hMSC nicht homogen verteilt. OC-Färbungen waren besonders in den Bereichen deutlich, wo sich Zellen zu mehrschichtigen Zellhaufen zusammenlagerten. In den Randbereichen der Zellhaufen bzw. dort, wo sich stimulierte hMSC in *monolayern* angeordnet waren, konnte keine positive Reaktion detektiert werden.

Als Detektionsmethode der immunzytochemischen Färbungen wurden mit der ABC-Methode ein Verfahren gewählt, bei dem ein Komplex von Avidin, Biotin und Peroxidase an biotinierten Sekundärantikörper bindet. Dieser Komplex setzt dort die Nachweissubstanz DAB als Substrat um, in dem es zu Polymeren vernetzt wird und als dunkelvioletter Niederschlag ausfällt. Die ABC-Nachweismethode bietet gegenüber anderen Detektionssystemen der Immunzytochemie verschiedene Vorteile. Zum einen handelt es sich um eine sehr sensitive Methode, da zwischen Avidin und Biotin eine sehr hohe Bindungsaffinität herrscht, welche von anderen Systemen kaum übertroffen wird (Hsu and Raine 1981). Zum anderen wird eine hohe Spezifität durch verschiedene Amplifikationsschritte der Nachweisreaktion erreicht: Bindung von Primär- und Sekundärantikörper, ABC-Komplexbildung (d.h. der Komplexgröße), Komplexbindung an den Sekundärantikörper, bzw. der Zugabe des Metallkomplexes. Dadurch werden auch sehr schwache Immunreaktionen erkennbar. Nachteilig an der Amplifikation ist allerdings, dass keine Korrelation zwischen der Intensität der Immunreaktion und dem tatsächlich vorhandenen Antigen herzustellen ist und folglich keine quantitativen Aussagen getroffen werden können. Eine Quantifizierung wäre mit der Immunfluoreszenz in gewissen Rahmen möglich, da ein fixes Verhältnis zwischen gebundenem Antikörper und Fluorochrom vorliegt. Mit dieser Methode können außerdem mehrere Antigene gleichzeitig nachgewiesen werden, was in der vorliegenden Arbeit dadurch erreicht wurde, dass mehrere Antikörper auf einem Objektträger aufgetragen wurden. Die angewandte ABC-Methode bietet jedoch gegenüber der Immunfluoreszenz besonders praktikable Vorteile. Die Auswertung der Immunreaktionen ist mit der ABC-Methode technisch sehr einfach und setzt neben einem Mikroskop keine weiteren Geräte voraus. Im Gegensatz dazu werden für die Immunfluoreszenz ein Fluoreszenzmikroskop mit verschiedenen Filtersystemen benötigt, ein abgedunkelter Raum, sowie eine Kamera mit hoher Empfindlichkeit bzw. einem Nachtaufnahmemodus. Außerdem weist die ABC-Methode eine geringere Hintergrundfärbung auf, welche bei der Immunfluoreszenz u.a. eine gewisse Eigenfluoreszenz des Eindeckmediums bedingt ist. Der entscheidende Vorteil ist aber besonders die lange Beständigkeit der Präparate, die mit der ABC-Methode markiert wurden. Nach Eindecken mit einem hydrophoben Harz sind die Immunreaktionen über Jahre haltbar und können somit als Referenz herangezogen werden (Hsu and Raine 1981; Vectorlabs 2002). Hingegen kann das Problem der Ausbleichung bei der Immunfluoreszenz mit

bestimmten *anti-fade* Reagenzien nur minimiert, nicht aber verhindert werden, so dass die Präparate nach wenigen Monaten keine Auswertung mehr ermöglichen. Da mit dem in dieser Arbeit erstellten Färbeprofil eine Referenz für hMSC und hOB erstellt werden sollte, wurde die ABC-Immuncytochemie als Nachweismethode ausgewählt.

## 4.2 Morphologie und Wachstumsverhalten

Eine morphologische Abgrenzung der einzelnen Zellen innerhalb der Population von hMSC bzw. hOB ist durch eine Bestimmung der Zellgröße bzw. eine Charakterisierung der Zellmorphologie nicht eindeutig möglich. Zwar unterscheiden sich hMSC statistisch signifikant hinsichtlich ihrer durchschnittlichen Größe von hOB, jedoch weisen hOB eine große morphologische Varianz auf, so dass auch Zellen gefunden werden können, welche eine den hMSC typische langgestreckte, bipolare Spindelform offenbaren. Aber auch innerhalb der hMSC können unterschiedlichen Zellmorphologien beobachtet werden, wobei die spindelförmigen Zellen überwiegen. Ob es sich bei diesen Zellen noch um undifferenzierte hMSC oder bereits um Vorläuferzellen handelt ist umstritten (Colter et al. 2001; Zohar et al. 1997).

Beide Zellpopulationen verändern ihre Morphologie in Abhängigkeit von der Zelldichte kaum. Dies ist besonders gut bei den zytoplasmatischen Färbungen zu erkennen. Dieser Befund lässt den Rückschluss zu, dass besonders bei hMSC weder die allgemeinen Zellkulturbedingungen noch die Zelldichte aus morphologischer Sicht eine osteoblastäre Differenzierung induzieren, denn konfluente hMSC nehmen in Zellkonfluenz nicht die flächige und verzweigte Form wie die hOB an. Die Spindelform ermöglicht ein enges Aneinanderliegen der hMSC, so dass ein dichter, fischzugartiger Zellverband ohne interzelluläre Freiräume entsteht.

Im Gegensatz dazu weist der Zellrasen konfluenter hOB Lücken auf, die unabhängig von der Kultivierungszeit bestehen bleiben, wodurch sie ein amorphes Wachstumsmuster aufweisen. Dieses Phänomen ist u.a. auf eine Inhibition des Zellwachstums durch Zellkontakte der weitverzweigten Fortsätze der hOB zurückzuführen, die durch ihre Ausdehnung früher das Wachstum der hOB einschränken als bei den spindelförmigen hMSC. Insgesamt bedingen die

unterschiedlichen Zellmorphologien von hMSC und hOB offensichtlich auch die jeweils charakteristischen Wachstumsmuster.

Bei den abgelösten Zellen ist zu erkennen, dass mit zunehmender Zelldichte die durchschnittlichen Zellvolumina in beiden Zellpopulationen abnehmen. Dies könnte sowohl ein Zeichen einer Differenzierung als auch die Folge der Kontaktinhibition darstellen. Die Kontaktinhibition ist physiologischen Grenzen unterworfen und verläuft in beiden Zellpopulationen vergleichbar ab. Dies ist daran zu erkennen, dass adhärente hMSC bei nur einem Drittel der Zellfläche von hOB eine dreifach höhere Sättigungszelldichte erreichen. Überraschenderweise unterscheiden sich die durchschnittlichen Zellvolumina abgelöster hMSC aber nur wenig von denen der hOB, obwohl adhärente hOB in Subkonfluenz durchschnittlich eine dreimal so große Fläche aufweisen wie hMSC. Eine mögliche Erklärung könnte darin gefunden werden, dass hMSC nicht so flächig und ausgebreitet wachsen wie hOB, sondern eine kugeliger Ausdehnung besitzen, was eher ein Zeichen unreifer Zellen ist (Reddi 1995). Darüber hinaus könnten diese Beobachtungen auch ein Hinweis für die unterschiedlich zusammengesetzten Zelloberfläche der hMSC und hOB darstellen, woraus andere Zelleigenschaften resultieren, besonders im Kontakt mit anderen Materialien (Gronthos et al. 2001; Gronthos et al. 1997; Sinha and Tuan 1996) oder Reagenzien, wie z.B. Trypsin.

Die Wachstumsgeschwindigkeiten der beiden Zellpopulationen unterscheiden sich zwar deutlich voneinander, was jedoch zu erwarten war, da sich unreifere Zellen der osteogenen Kaskade definitionsgemäß schneller teilen als differenzierte Osteoblasten (Bruder et al. 1997b). Allerdings ist der Unterschied um den Faktor 1,5 relativ gering, wenn man berücksichtigt, dass hMSC im Gegensatz zu hOB theoretisch ein unbegrenztes Teilungsvermögen besitzen. Ein mögliche Erklärung dafür wäre, dass sich hMSC, sobald sie auf einer Zellkulturplastikoberfläche adhären, bereits in einem Differenzierungsprozess befinden und als Vorläuferzellen bereits einen Teil ihres Wachstumspotentials eingebüßt haben (Zohar et al. 1997; Aubin 1998).

Die Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit bei hOB mit dem Erreichen der Zellkonfluenz bezeichnet das Ende der Proliferationsphase und den Beginn der Differenzierungsphase (Owen et al. 1990; Siggelkow et al. 1999b; Strehl et al. 2002), was sich besonders in den immunzytochemischen Befunden der hOB widerspiegelt. Dieses Phänomen kann bei hMSC dagegen nicht beobachtet werden.

Die osteogene Stimulation beeinflusst hMSC sowohl in ihrer Morphologie als auch in ihrem Wachstumsmuster sehr stark. Die Zellen verlieren ihre Spindelform und breiten sich flächiger aus, wodurch sie eine den hOB ähnliche Morphologie einnehmen. Bezüglich des Wachstumsmusters lagern sie sich hMSC unter Stimulation in Subkonfluenz zu kleinen Zellhaufen zusammen. Ob es sich bei diesen Zellhaufen um eine sog. *nodule*-Bildung handelt ist fraglich, zumal sie bei hMSC nur unter osteogener Stimulation in Subkonfluenz zu erkennen sind. In Konfluenz wachsen stimulierte hMSC dagegen in einer kopfsteinpflasterartigen 'multilayer'-Struktur, in der keine *nodules* mehr zu erkennen sind. Damit unterscheiden sich menschliche hMSC von anderen Spezies, wie z.B. der Ratte, bei denen die Ausbildung von *bone nodules* unter osteogener Stimulation ein Charakteristikum darstellt (Bellows et al. 1986; Siggelkow et al. 1999a; Rickard et al. 1996).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hMSC durch osteogene Stimulation den hOB in morphologischer Hinsicht ähnlicher werden, jedoch unterscheidet sich das Wachstumsverhalten der hMSC im Zellverband auch nach Stimulation deutlich von dem der hOB. Insgesamt eignen sich morphologische Kriterien und Wachstumseigenschaften allein somit nicht für eine eindeutige Unterscheidung von hMSC und hOB. Lediglich in Kombination mit anderen Untersuchungen wie z.B. der Immunzytochemie können die genannten Methoden unterstützend zur Charakterisierung von hMSC und Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade herangezogen werden.

## 4.3 Immunzytochemie

Die immunzytochemischen Nachweisreaktionen von hMSC und hOB unterscheiden sich für fünf Proteine, so dass eine Unterscheidung der beiden Zelllinien anhand des Färbeprofiles dieser Marker eindeutig möglich ist. Im folgenden werden die Färbeargebnisse in verschiedene Gruppen zusammengefasst mit dem Schwerpunkt, ob sie eine Unterscheidung von hMSC und hOB zulassen und sich somit als Unterscheidungsmarker eignen.

### 4.3.1 Geeignete Unterscheidungsmarker der osteoblastären Kaskade

Unterschiedliche Färbeargebnisse zwischen hMSC und hOB konnten für die Proteine Osteocalcin (OC), Decorin, Bone Sialoprotein sowie Kollagen-IV und -X ermittelt werden, so dass diese Proteine geeignete Unterscheidungsmarker der osteoblastären Kaskade darstellen.

#### Bone Sialoprotein, Osteocalcin und Decorin

Bone sialoprotein (BSP) konnte nur bei hOB nachgewiesen werden, wobei die Färbungen sowohl in proliferierenden als auch in differenzierten hOB positiv waren. Damit ist BSP ein geeigneter Marker, um hMSC von proliferierenden hOB abzugrenzen. Die immunzytochemischen Ergebnisse von BSP korrelieren mit Befunden von Cooper et al., die in hMSC ebenfalls keine BSP-Expression mittels RT-PCR nachweisen konnten (Cooper et al. 2001). Darüber hinaus eignet sich BSP offensichtlich auch als ein Verlaufsmarker der Knochenneubildung *in vitro*, denn die BSP-Expression wird unter osteogener Stimulation signifikant gesteigert (Frank et al. 2002). Allerdings ist BSP nicht spezifisch für osteoblastäre Zellen, sondern es kommt auch in anderen mineralisierenden Geweben vor, wie z.B. im Knorpel oder in artherosklerotischen Plaques. Da seine Expression aber auf mineralisierenden Geweben begrenzt ist und es dort zeitgleich mit einsetzender Kalzifizierung gefunden wird, scheint BSP bei diesem Prozess eine wichtige Rolle einzunehmen (Bianco et al. 1991; Ganss et al. 1999).

Im Vergleich zu BSP wiesen OC und Decorin ein konfluenzabhängiges Färbemuster bei hOB auf, so dass sie zusammen mit BSP zusätzlich eine Abgrenzung von proliferierenden und differenzierten hOB zulassen. Besonders OC ist ein

hochspezifischer Marker der osteoblastären Kaskade, der zusammen mit dem Transkriptionsfaktor *cbfa1* als einziger charakteristischer Marker der osteoblastären Differenzierung gilt (Ducy et al. 2000). OC ist dabei ein später Marker innerhalb der osteoblastären Differenzierungskaskade, welcher nur von reifen Osteoblasten und Osteozyten exprimiert wird (Gronthos et al. 1999; Kasai et al. 1994). Extrazellulär kann OC erst mit Beginn der Mineralisation nachgewiesen werden, dagegen ist unmineralisiertes Osteoid negativ für OC (Bronckers et al. 1985). Die Expression dieses Markers scheint zum einen von einer Stimulation mit Vitaminen, wie Vitamin D3 (Beresford et al. 1984) und Vitamin K (Koshihara and Hoshi 1997), zum anderen von der Zelldichte abhängig zu sein. So konnten Siggelkow et al. (Siggelkow et al. 1999b) mittels Northern Blot Analyse zeigen, dass die Expression von OC in Abhängigkeit von der Zelldichte hochreguliert wird. Diese Ergebnisse konnten mittels Immunzytochemie auf Proteinebene bestätigt werden, denn hOB zeigten lediglich in Zellkonfluenz positive Färbungen für OC. Während der Proliferationsphase in Subkonfluenz sind hOB negativ. Unter osteogener Stimulation färbten auch hMSC besonders in den Bereichen positiv für OC, wo die Zellen zu mehrschichtigen Zellhaufen gruppiert waren. Diese Beobachtungen lassen den Rückschluss zu, dass die OC-Expression besonders auch von interzellulärer Kommunikation beeinflusst wird und eine Reifung bzw. Differenzierung von hOB anzeigt. OC stellt somit einen sehr spezifischen immunzytochemischen Marker der späten Phase der osteoblastären Kaskade dar, der eine Unterscheidung von hMSC und hOB, darüber hinaus aber auch von proliferierenden und differenzierten hOB erlaubt.

Gleiches gilt für den Marker Decorin, denn die Färbeergebnisse entsprachen denen von OC. Allerdings stimmen diese Ergebnisse nicht so eindeutig mit anderen in der Literatur beschriebenen überein. Demnach wird Decorin nämlich während der Osteogenese bereits von jungen Osteoblasten exprimiert (Kamiya et al. 2001), und extrazellulär besonders vor dem Einsetzen der Matrixkalzifizierung detektiert (Bianco et al. 1990). Trotzdem waren positive immunzytochemische Nachweise in dieser Arbeit erst nach Abschluss der Proliferationsphase mit dem Beginn der Differenzierung detektierbar, was sich mit den Beobachtung anderer Arbeitsgruppen deckt (Kimoto et al. 1994; Yamaguchi and Ruoslahti 1988). Damit ist Decorin zeitlich innerhalb der Differenzierung zu hOB erst nach BSP sicher immunzytochemisch nachweisbar. Mit beginnender Kalzifizierung wird der Decorinnachweis *in vivo* schwächer (Lecanda et al. 1997; Kamiya et al. 2001). *In vitro* scheint die Decorin-

Expression osteoblastärer Zellen durch die einzelnen osteogenen Stimulantien unterschiedlich reguliert zu werden, denn unter  $\beta$ -Glyzerophosphat und Ascorbinsäure wird die Expression vermindert (Blumberg et al. 1997), wohingegen die Expression unter Dexamethason gesteigert wird (Kimoto et al. 1994). Die Kombination aller Stimulantien resultiert in einer kaum detektierbaren Färbung der hMSC.

#### Kollagen-IV und -X

Im Gegensatz zu BSP, OC und Decorin können Kollagen-IV und -X fast nur bei hMSC nachgewiesen werden. HOB färben lediglich zu einem kleinen Prozentsatz positiv für diese Proteine. Damit eignen sich diese beiden Kollagene zur Identifikation von hMSC sowie sehr frühen Differenzierungsstufen innerhalb der osteoblastären Kaskade. Es ist bekannt, dass Kollagen-IV von hMSC exprimiert wird und das in dieser Arbeit ermittelte immunzytochemische Färbemuster stimmt mit dem von anderen Arbeitsgruppen überein (Deschaseaux and Charbord 2000; Chichester et al. 1993). Zwar kommt Kollagen-IV auch im Knochen vor, seine Herkunft ist jedoch nicht bekannt. Möglicherweise wird es von hMSC oder von Endothelzellen gebildet, jedenfalls nicht von hOB (Becker et al. 1986). Die positiven Färbeergebnisse innerhalb der hOB geben möglicherweise einen Hinweis auf das Vorhandensein einer Subpopulation. Einerseits könnte es sich um frühe osteoblastäre Differenzierungsstufen handeln, welche noch in der Lage sind, Kollagen-IV zu bilden (Chichester et al. 1993). Andererseits könnte es ein Zeichen auf das Vorhandensein eines anderen Zelltyps sein, wie z.B. Endothelzellen (Sandberg et al. 1988). Da das Färbeprofil der hOB für die restlichen Proteine dem reifer Osteoblasten entspricht und nicht Endothelzellen, ist es wahrscheinlicher, dass es sich um frühe Osteoprogenitoren handelt.

Der immunzytochemische Befund von Kollagen-X war überraschend, denn es wird postuliert, dass die Expression von Kollagen-X auf hypertrophe Chondroblasten beschränkt ist (Barry et al. 2001). Somit stellt es eigentlich einen typischer Marker innerhalb der chondroblastären Differenzierungskaskade dar. Allerdings können Übergänge zwischen verschiedenen Differenzierungsstufen der chondro- und osteoblastären Kaskade beobachtet werden (Aubin 1998). Auch innerhalb des Knochens kommt Kollagen-X vor besonders dort, wo sich Knorpelreste befinden bzw. wo eine enchondrale Ossifikation stattfindet (Nerlich et al. 1992). Ob der

Nachweis von Kollagen-X also ein Zeichen einer *in vitro*-Osteogenese über ein Knorpelmodell ist (Bianco et al. 1998), ein Hinweis auf die Existenz chondroblastärer Zellen darstellt oder Folge der *in vitro*-Zellkultivierung ist, kann nicht geklärt werden. Gegen die erste Überlegung spricht allerdings die Tatsache, dass der Nachweis für Kollagen-II und -IX, welche typische Bestandteile von hyalinem Knorpel sind, zu keiner Zeit in hMSC bzw. hOB positiv war. Dass Kollagen-X eventuell ein Artefakt als Folge der Zellkultur sein könnte, widerspricht Ergebnissen von Gronthos und Mitarbeitern. Sie konnten in aufgereinigten Stromazellen des Knochenmarks mittels RT-PCR zeigen, dass eine deutliche Expression von Kollagen-X direkt nach der Isolierung sowie unter regulären Zellkulturbedingungen stattfindet (Gronthos et al. 2003). Eventuell wird Kollagen-X daher nicht ausschließlich nur von hypertrophen Chondrozyten sondern auch von hMSC exprimiert.

#### 4.3.2 Ungeeignete Unterscheidungsmarker der osteoblastären Kaskade

Diejenigen Proteine, die sich immunzytochemisch sowohl in hMSC als auch in hOB darstellen lassen, sind für eine Unterscheidung dieser beiden Zellpopulation ungeeignet. Gleiches gilt für Proteine, die sich in keiner der beiden Zelllinien darstellen lassen.

##### Alkalische Phosphatase

Besonders interessant sind die ermittelten Ergebnisse für die Alkalische Phosphatase (ALP). Denn die *bone/liver/kidney* Isoform der ALP gilt als klassischer Marker der osteoblastären Differenzierung und wird von einem großen Teil der Studien in der Literatur zum Nachweis der osteogenen Potenz von Zellen verwendet (Robey and Termine 1985; Owen 1988; Kasperk et al. 1995; Pittenger et al. 1999; Kuznetsov et al. 2001; Halvorsen et al. 2001).

Allerdings sind in den letzten Jahren zunehmend Ergebnisse präsentiert worden, welche ALP als Standardmarker der osteoblastären Differenzierungskaskade in Frage stellen (Siggelkow et al. 1999b; Frank et al. 2002; Gronthos et al. 1999). Diesen Behauptungen liegen verschiedene Beobachtungen zu Grunde. Dabei muss der Nachweismethode von ALP besondere Aufmerksamkeit zugewendet werden. In der Mehrzahl der Studien erfolgt der Nachweis überwiegend indirekt über die Enzymaktivität mittels p-Nitrophenol (Bennett et al. 2001; Byers et al. 1999; Bruder et

al. 1997b; Jaiswal et al. 1997; Halvorsen et al. 2001) oder histologisch über Naphtol/Diazoniuimsalz-Färbungen (Pittenger et al. 1999; Kasperk et al. 1995; Martinez et al. 1999; Rickard et al. 1996; Sell et al. 1998). Diese Methoden weisen aber nicht das Protein direkt, sondern lediglich die Enzymaktivität nach. Enzymaktivitätsmessungen haben zwar den Vorteil, dass sie hochspezifisch sind, jedoch können sie nicht mit der Menge des tatsächlich vorhandenen Proteins korreliert werden. Auch lassen Enzymaktivitätssteigerungen, wie sie z.B. unter mineralisierenden Bedingungen in Anwesenheit von  $\beta$ -Glyzerophosphat und Dexamethason beobachtet werden (Jaiswal et al. 1997), keinen Rückschluss auf eine gesteigerte Proteinexpression zu. Ein weiterer Punkt ist, dass ALP oder auch TNSALP, *tissue non specific alkaline phosphatase*, von einer Vielzahl von Zelltypen außerhalb der osteoblastären Kaskade exprimiert wird (Harris 1990). Bezeichnenderweise lautet die Produktbezeichnung des histologischen ALP Nachweises (Sigma Kit 85), welcher von Pittenger et al. und anderen Arbeitsgruppen verwendet wurde, *Alkaline Phosphatase (Leucocyte)*. Falsch positive Ergebnisse durch andere Enzyme, die das gleiche Substrat umsetzen, können zudem nicht ausgeschlossen werden. Schließlich sollte in Betracht gezogen werden, dass die Zellen in den meisten Studien mit ca. 10 % Serumgehalt kultiviert werden, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen könnte, da im Serum ALP enthalten ist (Farley and Baylink 1986).

Nur wenige Arbeitsgruppen haben beim Menschen die Expression von ALP-mRNA mittels Northern Blot oder RT-PCR (Siggelkow et al. 1999b; Frank et al. 2002; Rickard et al. 1996) bzw. das Protein direkt über FACS-Analyse (Stewart et al. 1999; Walsh et al. 2000) oder Immunzytochemie (Long et al. 1999; Long et al. 1995) nachgewiesen. Die beiden letztgenannten Studien haben zwar Immunzytochemie angewandt, zeigen jedoch keine Abbildungen der ALP-Färbungen. Die FACS-Analysen, welche den gleichen Antikörper verwenden wie in dieser Arbeit (Lawson et al. 1985), konnten einen prozentualen Anteil von 9–30% ALP positiver Zellen ermitteln. Jedoch liegt die Sensitivitätsgrenze des FACS-Nachweises um ein Vielfaches niedriger als für die Immunzytochemie. Daher sind diese Studien nicht mit den immunzytochemischen Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar.

Besonders die Untersuchungen, welche ALP auf der mRNA-Ebene analysiert haben, kamen zu dem Ergebnis, dass sich ALP nicht als ein Marker osteoblastärer Reifung (Gronthos et al. 1999), bzw. als Verlaufsmarker der osteoblastären Kaskade eignet.

Denn die Expression von ALP wird nicht hochreguliert, weder durch osteogene Stimulation noch durch die Zelldichte (Siggelkow et al. 1999b; Frank et al. 2002). Die Zelldichte besitzt allerdings einen Einfluss auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Goldstein 2001), was jedoch nicht mit der Expression des Proteins korreliert werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen, welche keinen signifikanten Einfluss der Zelldichte auf ALP-Expression postulieren (Siggelkow et al. 1999b). Denn unabhängig von der Zelldichte waren die Färbungen für ALP sowohl in hMSC als auch in hOB unterhalb der immunzytochemischen Nachweisgrenze. Entgegen den Ergebnissen von Frank und Mitarbeitern (Frank et al. 2002), zeigten hMSC besonders aber hOB unter osteogener Stimulation positive immunzytochemische ALP-Nachweise. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der immunzytochemische ALP-Nachweis stark von einer Stimulation mit  $\beta$ -Glyzerophosphat, Ascorbinsäure und Dexamethason abhängt und damit von einer Aktivitätssteigerung des Proteins abhängt (Siggelkow et al. 1999b; Lecanda et al. 1997). Außerdem scheint ein geeignetes Mikromilieu, z.B. mit anderen Zelltypen (Aubin and Bonnelye 2000; Rickard et al. 1995; Kasperk et al. 1997; Gerstenfeld et al. 2002) sowie einer bestimmten extrazellulären Matrix (Mizuno et al. 1997) Voraussetzung für eine ALP-Expression *in vitro* zu sein.

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchung geht hervor, dass sich ALP nicht als ein geeigneter immunzytochemischer Marker weder zur Unterscheidung von hMSC und hOB, noch von verschiedener Reifungsstufen der hOB untereinander erweisen hat.

#### Kollagen-I, Osteonectin und Osteopontin

Kollagen-I, Osteonectin (ON) und Osteopontin (OPN) gelten ebenso wie ALP als klassische osteoblastäre Marker (Aubin et al. 1995; Candelieri et al. 1999; Bruder et al. 1997b; Frank et al. 2002). Denn zum einen können sie im Knochengewebe reichhaltig nachgewiesen werden, zum anderen verursacht ihr Fehlen – mit Ausnahme von OPN – Störungen im Knochenstoffwechsel. Allerdings werden sie innerhalb der osteoblastären Kaskade sowohl von hMSC als auch von hOB exprimiert und weisen zudem gleiche Färbemuster auf, so dass sie sich nicht für die Unterscheidung der beiden Zellpopulationen eignen. Auch gegenüber anderen Zelltypen, wie z.B. den als Kontrolle dienenden Fibroblasten, erlauben diese Proteine keine Abgrenzung.

Obwohl OPN durch seine azidischen Bindungsstellen inhibitorisch auf den Prozess der Matrixverkalkung einwirkt (McKee and Nanci 1996; Boskey 1998), kann dieses Protein trotzdem als ein Verlaufsmarker der *in vitro*-Osteogenese herangezogen werden. Denn im Gegensatz zu den meisten anderen untersuchten Proteinen wird die Expression von OPN ebenso wie die von BSP unter osteogener Stimulation gesteigert (Chen et al. 1996; Frank et al. 2002). Diese Befunde können allerdings in dieser Arbeit mittels Immunzytochemie nicht nachvollzogen werden, denn unter osteogener Stimulation wurden die Nachweise sowohl bei hMSC als auch bei hOB schwächer. Eventuell ist dieses Ergebnis ein Hinweis darauf, dass die Expression bzw. die Menge der vorhandenen mRNA nicht mit der Menge des tatsächlich vorhandenen Proteins in Beziehung gesetzt werden kann. Die Lokalisation von OPN in unstimulierten Zellen, welche mit einem netzförmigen, paranukleären Muster typisch für eine Färbung des Golgiapparates sind, korreliert mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen anderer Arbeitgruppen (McKee and Nanci 1996).

#### Versican und Matrixmetalloproteinase-2

Auf den ersten Blick haben das Proteoglykan Versican und die Matrixmetalloproteinase-2 nichts miteinander gemein. Während der Osteogenese werden diese Proteine von beiden Zellpopulationen exprimiert (Rifas et al. 1994; Lee et al. 1998), so dass sie keine Unterscheidung verschiedener Reifungsstufen zulassen. Trotzdem lieferten die beiden Proteine einen interessanten Nebenbefund. Denn Versican und MMP-2 färbten in osteoblastären Zellen positiv, waren jedoch negativ in Fibroblasten. Damit sind sie im Gegensatz zu klassischen osteoblastären Markern, wie Kollagen-I, OP, ON, oder anderen Proteinen wie OPG sowie Kollagen-III, -V, -VI, geeignet, osteoblastäre Zellen von Fibroblasten zu unterscheiden. Diese Beobachtung stellt eine wichtige Erkenntnis dar, denn um hMSC z.B. im Knochenmark identifizieren zu können, muss auch eine Abgrenzung gegenüber anderen Zellen als denen der osteoblastären Kaskade möglich sein. Dafür scheinen Versican und MMP-2 nützliche Marker zu sein. Dieser Befund verdeutlicht, dass sich die Matrix osteoblastärer Zellen *in vitro* über die hinlänglich bekannten Marker hinaus von anderen Zelltypen unterscheidet. Besonders interessant erscheinen hierfür die Proteoglykane. Bekannt ist zwar, dass Proteoglykane wie Versican (Lee et al. 1998), Decorin (Blumberg et al. 1997) oder Lumican (Raouf and Seth 2002) während der

Osteogenese zu bestimmten Zeitpunkten von Zellen der osteoblastären Kaskade gebildet und in die umgebene Matrix sezerniert werden. Ihre Bedeutung für den Aufbau der ECM, bzw. für den Prozess der Osteogenese, ist bisher aber noch unbekannt. Eventuell können die Proteoglykane dazu beitragen, weitere osteoblastäre Reifungsstufen zu identifizieren, die mit den bisher erwähnten Markern nicht unterschieden werden können (Raouf et al. 2002).

#### Kollagen-III, -V, -VI, und Osteoprotegerin

Kollagen-III,-V und -VI sind bekannte Bestandteile des Knochens (Becker et al. 1986; Beresford et al. 1993; Collin et al. 1992), werden aber nicht selektiv von osteoblastären Zellen produziert, sondern auch von anderen Zelltypen, wie z.B. Fibroblasten. Auffallend war besonders das inhomogene Färbemuster für Kollagen-III, welches bei hMSC nicht in allen Zellen bei hOB mit sehr wechselnder Intensität beobachtet wurde. Diese unregelmäßige Kollagen-III-Expression konnte auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden. Eventuell stellt Kollagen-III einen besonders früheren osteoblastären Marker dar (Zohar et al. 1997), so dass die unregelmäßigen Markierungen bestimmte osteoblastäre Reifungsstufen charakterisieren. Gegen diese Überlegung sprechen die Ergebnisse anderer Studien, die Kollagen-III auch in hMSC nachweisen konnten (Poliard et al. 1999; Chichester et al. 1993). Die Bedeutung von Kollagen-III für die Osteogenese ist unklar. Denn im Knochen scheint Kollagen-III besonders in Bereichen lokalisiert zu sein, wo ein Remodelling des Knochens stattfindet (Becker et al. 1986). Mutationen dieses Kollagens betreffen allerdings weniger den Aufbau des Knochens als das kollagene Bindegewebe (Kuivaniemi et al. 1997).

Ebenso wie die oben genannten Kollagene konnte Osteoprotegerin (OPG) sowohl in osteoblastären Zellen als auch in Fibroblasten detektiert werden. Die eingangs erwähnte starke Abhängigkeit von hormonellen Einflüssen der OPG-Expression konnte daran beobachtet werden, dass die OPG Nachweise unter osteogener Stimulation deutlich schwächer wurden (Hofbauer et al. 2000).

### Kollagen-II, -VII, -IX und Matrixmetalloproteinase-9

Die Nachweise der Proteine Kollagen-II, -VII, IX und Matrixmetalloproteinase(MMP)-9 waren in dieser Arbeit durchgehend negativ. Kollagen-II und -IX stellen typische Bestandteile des Knorpels dar. Dagegen waren andere Komponenten des hyalinen Knorpels, wie z.B. die Proteoglykane Decorin und Versican oder Kollagen-X, positiv in den Untersuchungen. Daraus allerdings den Rückschluss zu ziehen, dass die *in vitro*-Osteogenese über ein Knorpelmodell abläuft (Bianco et al. 1998), ist nicht gerechtfertigt, da die typischen Kollagene fehlen. Andererseits bestätigen die negativen Nachweise für Kollagen-II und -IX jedoch, dass sich hMSC bei einer Kultivierung auf Glas, bzw. unter osteogener Stimulation, nicht in Richtung der chondroblastären Kaskade differenzieren.

Kollagen-VII kann nicht im Knochengewebe nachgewiesen werden und spielt auch für den Knochenstoffwechsel keine entscheidende Rolle.

Im Gegensatz dazu dient MMP-9 in der Ratte als Marker der osteoblastären Differenzierung, der erst bei Erreichen einer bestimmten Reifungsstufe der Zellen, bzw. der ECM, positiv wird (Filanti et al. 2000). Beim Menschen wird MMP-9 zwar in Osteophyten *in vivo* (Bord et al. 1997), nicht in humanen Osteoblasten *in vitro* exprimiert (Rifas et al. 1994). Diese Ergebnisse können mittels Immunzytochemie auf Proteinebene bestätigt werden. Ob MMP-9 für den normalen Knochenstoffwechsel notwendig ist, kann mittels Immunzytochemie in dieser Untersuchung nicht beantwortet werden. Diese Befunde verdeutlichen aber zum einen die Unterschiede bei der Osteogenese human gegenüber anderen Spezies, zum anderen von *in vivo* und *in vitro*-Verhältnissen.

## 4.4 Osteogene Stimulation

Die Osteogenese ist ein dynamischer Prozess von Matrixbildung und Matrixresorption mit einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Baylink et al. 1993; Filanti et al. 2000; Reddi 2000). Vor diesem Hintergrund erscheint es logisch, dass dem dynamischen Prozess der Matrixreifung in Form einer angepassten Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen an verschiedenen Faktoren zu verschiedenen Zeitpunkten Rechnung getragen werden müsste. Erstaunlicherweise wurden jedoch verschiedenste Protokolle der osteogenen Stimulierung etabliert, welche eine fixe Konzentration der Stimulantien beinhalten und nicht mit verschiedenen Stufen der Matrix- und Zelldifferenzierung abgestimmt sind (Jaiswal et al. 2000; Pittenger et al. 1999; Banfi et al. 2000; Beresford et al. 1993; Cheng et al. 1994; Rickard et al. 1994; Liu et al. 1999). Eine besondere Bedeutung kommt daher offensichtlich fötalem Kälberserum (FCS) zu, denn in serumfreier Kultur konnte keine Knochenbildung *in vitro* induziert werden (Beresford et al. 1993). Zusätzlich werden aber weitere Stimulantien für die osteogene Stimulation benötigt, welche sich gegenseitig beeinflussen und die Matrixbildung unterstützen. Allerdings sind die Wirkungen der verschiedenen osteogenen Stimulantien für die Matrixbildung und deren Reifung vielschichtig und noch nicht genau bekannt. Auch sind offensichtlich nicht alle Faktoren, welche eine *bone nodule*-Bildung der Ratte fördern, für die menschliche Osteogenese essentiell, wie z.B. Vitamin D3 (Rickard et al. 1996).

Eine zentrale Bedeutung nimmt offensichtlich Dexamethason ein, ohne dessen Anwesenheit eine Kalzifizierung der extrazellulären Matrix *in vitro* nicht zu Stande kommt (Rickard et al. 1996). Diese Beobachtung erscheint auf den ersten Blick paradox, da Glukokortikoide klinisch das Gegenteil bewirken, die Knochenmasse verringern und zu einer Osteoporose führen bzw. diese verstärken (Canalis 1996). Auch auf Zellebene führen Glukokortikoide innerhalb der osteoblastären Kaskade eher zu einer Dedifferenzierung (Pereira et al. 2002), indem sie u.a. die Expression des Transkriptionsfaktors *cbfa1* unterdrücken, welcher eine Schlüsselrolle in der Osteoblastogenese einnimmt und die Expression der Hauptbestandteile der organischen Knochenmatrix fördert (Ducy et al. 1999). Zusätzlich zum inhibitorischen Einfluss auf die Differenzierung bewirken Glukokortikoide eine reduzierte Replikationsrate und eine Zunahme der Apoptose von Osteoblasten. In Anwesenheit

von  $\beta$ -Glyzerophosphat kann dieses Phänomen allerdings nicht beobachtet werden (Pereira et al. 2001). Trotzdem scheint Dexamethason unter bestimmten Bedingungen, besonders im Zusammenspiel mit  $\beta$ -Glyzerophosphat, die *in vitro*-Osteogenese zu fördern. Ein mögliches Erklärungsmodell basiert u.a. auf der Eigenschaft des Dexamethasons, die Enzymaktivität von ALP zu steigern, woraus in Anwesenheit von organischem Phosphat eine extrazelluläre Matrixkalkifizierung mit Kalziumappatit resultiert (Bellows et al. 1986; Bhargava et al. 1988). Methodisch wird die Verkalkung hauptsächlich mittels von-Kossa-Färbung, die gesteigerte ALP-Enzymaktivität über den Umsatz von p-Nitrophenol nachgewiesen (Jaiswal et al. 1997; Pittenger et al. 1999). Neben einer Steigerung der Enzymaktivität bewirkt Dexamethason in geringem Ausmaß auch eine Steigerung der ALP-Expression (Frank et al. 2002; Pereira et al. 2002), was durch die schwach positiven Immunreaktionen unter osteogener Stimulation bestätigt werden kann.

Darüber hinaus beeinflusst Dexamethason auch die Migrations- und Adhäsionseigenschaften der Zellen (Frosch et al. 2002), was sich sowohl in der Zellmorphologie als auch im Wachstumsmuster widerspiegelt. Obwohl in Übereinstimmung mit anderen Studien (Siggelkow et al. 1999a; Cheng et al. 1994; Rickard et al. 1996) auch in dieser Arbeit keine Ausbildung von *bone nodules* beobachtet werden konnte, lagerten sich die hMSC im Gegensatz zu hOB unter osteogener Stimulation aber zu kleinen Zellhaufen zusammen, welche aber in Zellkonfluenz nicht mehr zu sehen waren.

$\beta$ -Glyzerophosphat ist kein essentieller Bestandteil für eine osteogene Stimulation, denn die Aufgabe des organischen Phosphatdonors kann auch von Ascorbinsäurephosphat übernommen werden (Beresford et al. 1993). Allerdings scheint  $\beta$ -Glyzerophosphat im Zusammenspiel mit Dexamethason zu bewirken, dass der negative Effekt der Einzelsubstanzen auf die Zellreplikation bzw. auf die Apoptoserate, egalisiert wird. Unter gemeinsamer Applikation beider Substanzen kann eine Zunahme des DNA-Gehaltes sowie der Zellzahl beobachtet werden kann (Pereira et al. 2001). Diese Ergebnisse bestätigen den Eindruck der Proliferationseigenschaften in der vorliegenden Arbeit, stehen allerdings im Widerspruch mit den Ergebnissen von Bruder et al. (Bruder et al. 1997b), in denen postuliert wird, dass die osteogene Stimulation die Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Es handelt es sich jedoch dabei um die Darstellung der Ergebnisse eines einzelnen Spenders.

Die Bedeutung von Ascorbinsäure für die Knochenbildung ist ebenfalls noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheint sie ein notwendiger Bestandteil für eine Bildung von *bone nodules* bei Rattenzellen zu sein. Da eine Bildung vergleichbarer Strukturen nicht bei hMSC Kulturen beobachtet wird, ist es fraglich, ob sie auch essentiell für die osteogene Stimulation beim Menschen sind. Wahrscheinlich fördert Ascorbinsäure die Osteogenese aber besonders dadurch, dass es eine Hydroxilierung von Kollagen, besonders von Kollagen-I, fördert. Dadurch wird die Bildung der organischen und besonders der kollagenen extrazellulären Matrix gesteigert, deren Vorhandensein für eine Mineralisierung Voraussetzung ist (Bellows et al. 1986).

Die ermittelten Färbeergebnisse in dieser Arbeit lassen den Rückschluss zu, dass eine Stimulation mit Dexamethason,  $\beta$ -Glyzerophosphat und Ascorbinsäure nicht ausreicht, um hMSC in reife hOB zu differenzieren. Denn unter osteogener Stimulation unterschied sich das hMSC-Färbeprofil bezüglich OPG, OP sowie Kollagen-IV und -X von dem der hOB. Ebenso veränderten auch hOB die Expression für diese Proteine unter Stimulation. Diese Unterschiede können durch Methoden, wie z.B. den einfachen Kalknachweis bzw. eine Aktivitätssteigerung der ALP, nicht herausgestellt werden, obwohl diese von der Mehrzahl der Arbeitsgruppen als Standardnachweis verwendet werden. Um die komplexen *in vivo*-Verhältnisse der osteoblastären Differenzierung *in vitro* zu imitieren, scheinen weitere Wachstums- und Differenzierungsfaktoren notwendig zu sein. Außerdem erscheint eine dem Differenzierungsgrad und -zeitpunkt angepasste Stimulation sinnvoller zu sein als eine fixe Kombination der Stimulantien (Jiang et al. 2002). Darüber hinaus spielt die Anwesenheit anderer Zelltypen durch interzelluläre Kontakte und parakrine Effekte offensichtlich ebenfalls eine wichtige Rolle, ein Mikromilieu zu erzeugen, das eine *in vitro* Knochenbildung unterstützt (Aubin and Bonnelye 2000; Rickard et al. 1995; Kasperk et al. 1997; Gerstenfeld et al. 2002).

## 5. Zusammenfassung

Durch die Erstellung eines immunzytochemischen Färbeprofiles ist es möglich, heterogene Zellpopulationen auf Einzelzellniveau zu charakterisieren und sie voneinander zu unterscheiden. Diese Untersuchung stellt einen sehr erfolgversprechenden Ansatz dar, undifferenzierte humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) zu identifizieren und sie von Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade sowie anderen Zelltypen abgrenzen zu können. Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass humane MSC und humane Osteoblasten jeweils spezifische Färbeprofile aufweisen, die eine eindeutige Diskriminierung der beiden Zellpopulationen erlauben.

Für eine spezifische Unterscheidung auf Einzelzellniveau ist eine intensive Suche nach spezifischen Markern oder die Kombination mehrerer Marker notwendig. Von den in dieser Arbeit ausgewählten Proteinen ergaben Bone Sialoprotein, Osteocalcin, Decorin sowie Kollagen-IV und Kollagen-X unterschiedliche Färbemuster. Kollagen-IV und -X waren besonders in hMSC positiv, weswegen sie sich für eine Erkennung unreifer osteoblastärer Zellen anbieten. Bone Sialoprotein, Osteocalcin und Decorin eignen sich dagegen für einen Nachweis reifer osteoblastärer Zellen, denn sie waren nur in hOB positiv. Osteocalcin und Decorin erlaubten außerdem eine Abgrenzung differenzierter hOB. Die Proteine Versican und Matrixmetalloproteinase-2 erscheinen darüber hinaus für eine Unterscheidung von osteoblastären und fibroblastären Zellen nützlich zu sein.

Die klassischen osteoblastären Marker alkalische Phosphatase, Kollagen-I, Osteopontin oder Osteonectin waren für eine Unterscheidung von hMSC und hOB nicht geeignet, da sie in beiden Zellpopulationen gleiche Ergebnisse lieferten. Insbesondere der Wert der alkalische Phosphatase als immunzytochemischer Marker der osteoblastären Kaskade wird in dieser Untersuchung in Frage gestellt.

Eine osteogene Stimulation von hMSC mit Dexamethason,  $\beta$ -Glyzerophosphat und Ascorbinsäure bewirkte eine deutliche Veränderung der Morphologie, der Wachstumseigenschaften und des Färbeprofiles. Allerdings konnte durch eine osteogene Stimulation kein immunzytochemischer Phänotyp von hMSC induziert werden, welcher identisch mit dem der hOB war. Daher ist es unwahrscheinlich, dass eine Stimulation *in vitro* mit den oben aufgeführten Zusätzen die komplizierten Verhältnisse der Osteogenese *in vivo* nachahmen kann.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Altman GD (1991) Practical statistics for medical research. Chapman & Hall, London
2. Anselme K (2000) Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21:667-681
3. Aubin JE (1998) Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 30-31:73-82.:73-82
4. Aubin JE, Bonnelye E (2000) Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* 11:905-913
5. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK (1995) Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17:77S-83S
6. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R (2000) Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 28:707-715
7. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM (2001) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 268:189-200
8. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S (1993) Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 8 Suppl 2:S565-72.:S565-S572
9. Becker J, Schuppan D, Benzian H, Bals T, Hahn EG, Cantaluppi C, Reichart P (1986) Immunohistochemical distribution of collagens types IV, V, and VI and of pro-collagens types I and III in human alveolar bone and dentine. *J Histochem Cytochem* 34:1417-1429

10. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME (1986) Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 38:143-154
11. Bennett JH, Carter DH, Alavi AL, Beresford JN, Walsh S (2001) Patterns of integrin expression in a human mandibular explant model of osteoblast differentiation. *Arch Oral Biol* 46:229-238
12. Beresford JN, Gallagher JA, Poser JW, Russell RG (1984) Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, parathyroid hormone, and glucocorticoids. *Metab Bone Dis Relat Res* 5:229-234
13. Beresford JN, Graves SE, Smoothy CA (1993) Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation? *Am J Med Genet* 45:163-178
14. Bhargava U, Bar-Lev M, Bellows CG, Aubin JE (1988) Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvaria cells. *Bone* 9:155-163
15. Bianco P, Cancedda FD, Riminucci M, Cancedda R (1998) Bone formation via cartilage models: the "borderline" chondrocyte. *Matrix Biol* 17:185-192
16. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG (1990) Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 38:1549-1563
17. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG (1991) Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int* 49:421-426
18. Bianco P, Gehron RP (2000) Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105:1663-1668

19. Bianco P, Robey PG (2001) Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414:118-121
20. Bilbe G, Roberts E, Birch M, Evans DB (1996) PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. *Bone* 19:437-445
21. Blumberg P, Brenner R, Budny S, Kresse H (1997) Increased turnover of small proteoglycans synthesized by human osteoblasts during cultivation with ascorbate and beta-glycerophosphate. *Calcif Tissue Int* 60:554-560
22. Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE (1997) Distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitor, TIMP-1, in developing human osteophytic bone. *J Anat* 191:39-48
23. Boskey AL (1998) Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. *J Cell Biochem Suppl* 30-31:83-91.:83-91
24. Bronckers AL, Gay S, Dimuzio MT, Butler WT (1985) Immunolocalization of gamma-carboxyglutamic acid containing proteins in developing rat bones. *Coll Relat Res* 5:273-281
25. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE (1997a) Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 21:225-235
26. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997b) Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64:278-294
27. Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S (1998) Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop* S247-S256

28. Byers RJ, Brown J, Brandwood C, Wood P, Staley W, Hainey L, Freemont AJ, Hoyland JA (1999) Osteoblastic differentiation and mRNA analysis of STRO-1-positive human bone marrow stromal cells using primary in vitro culture and poly (A) PCR. *J Pathol* 187:374-381
29. Canalis E (1996) Clinical review 83: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3441-3447
30. Candelieri GA, Rao Y, Floh A, Sandler SD, Aubin JE (1999) cDNA fingerprinting of osteoprogenitor cells to isolate differentiation stage-specific genes. *Nucleic Acids Res* 27:1079-1083
31. Chen J, Thomas HF, Sodek J (1996) Regulation of bone sialoprotein and osteopontin mRNA expression by dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in rat bone organ cultures. *Connect Tissue Res* 34:41-51
32. Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV (1994) Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134:277-286
33. Chichester CO, Fernandez M, Minguell JJ (1993) Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. *Cell Adhes Commun* 1:93-99
34. Collin P, Nefussi JR, Wetterwald A, Nicolas V, Boy-Lefevre ML, Fleisch H, Forest N (1992) Expression of collagen, osteocalcin, and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture. *Calcif Tissue Int* 50:175-183
35. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001) Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7841-7845

36. Conget PA, Minguell JJ (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181:67-73
37. Cooper LF, Harris CT, Bruder SP, Kowalski R, Kadiyala S (2001) Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis. *J Dent Res* 80:314-320
38. Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, Sommer B, Iozzo RV, Eichstetter I, Robey PG, Bianco P, Young MF (2002) Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res* 17:1180-1189
39. Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA (1998) Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif Tissue Int* 62:74-82
40. Degasne I, Basle MF, Demais V, Hure G, Lesourd M, Grolleau B, Mercier L, Chappard D (1999) Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif Tissue Int* 64:499-507
41. Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E (2000) Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest* 105:915-923
42. Deschaseaux F, Charbord P (2000) Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive. *J Cell Physiol* 184:319-325
43. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382:448-452

44. Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289:1501-1504
45. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G (1999) A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 13:1025-1036
46. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747-754
47. Encina NR, Billotte WG, Hofmann MC (1999) Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stroma. *Lab Invest* 79:449-457
48. Farley JR, Baylink DJ (1986) Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro. *Metabolism* 35:563-571
49. Filanti C, Dickson GR, Di Martino D, Ulivi V, Sanguineti C, Romano P, Palermo C, Manduca P (2000) The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14. *J Bone Miner Res* 15:2154-2168
50. Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schafer D, Bendik I, Dick W, Heberer M, Martin I (2002) Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 85:737-746
51. Fromigue O, Marie PJ, Lomri A (1998) Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem* 68:411-426
52. Frosch KH, Barvencik F, Lohmann CH, Viereck V, Siggelkow H, Breme J, Dresing K, Sturmer KM (2002) Migration, matrix production and lamellar bone formation of human osteoblast-like cells in porous titanium implants. *Cells Tissues Organs* 170:214-227

53. Ganss B, Kim RH, Sodek J (1999) Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 10:79-98
54. Gerstenfeld LC, Cruceta J, Shea CM, Sampath K, Barnes GL, Einhorn TA (2002) Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 17:221-230
55. Goldstein AS (2001) Effect of seeding osteoprogenitor cells as dense clusters on cell growth and differentiation. *Tissue Eng* 7:817-827
56. Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE, Robey PG (2001) Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* 28:174-181
57. Gronthos S, Stewart K, Graves SE, Hay S, Simmons PJ (1997) Integrin expression and function on human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 12:1189-1197
58. Gronthos S, Zannettino AC, Graves SE, Ohta S, Hay SJ, Simmons PJ (1999) Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res* 14:47-56
59. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116:1827-1835
60. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimble JM (2001) Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 7:729-741

61. Harris H (1990) The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta* 186:133-150
62. Harris NL, Rattray KR, Tye CE, Underhill TM, Somerman MJ, D'Errico JA, Chambers AF, Hunter GK, Goldberg HA (2000) Functional analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis. *Bone* 27:795-802
63. Henthorn PS, Raducha M, Fedde KN, Lafferty MA, Whyte MP (1992) Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9924-9928
64. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL (2000) The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15:2-12
65. Hsu SM, Raine L (1981) Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 29:1349-1353
66. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64:295-312
67. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF (2000) Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275:9645-9652
68. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-49

69. Jonsson KB, Frost A, Nilsson O, Ljunghall S, Ljunggren O (1999) Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison. *Acta Orthop Scand* 70:365-373
70. Kale S, Biermann S, Edwards C, Tarnowski C, Morris M, Long MW (2000) Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone. *Nat Biotechnol* 18:954-958
71. Kamiya N, Shigemasa K, Takagi M (2001) Gene expression and immunohistochemical localization of decorin and biglycan in association with early bone formation in the developing mandible. *J Oral Sci* 43:179-188
72. Kasai R, Bianco P, Robey PG, Kahn AJ (1994) Production and characterization of an antibody against the human bone GLA protein (BGP/osteocalcin) propeptide and its use in immunocytochemistry of bone cells. *Bone Miner* 25:167-182
73. Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H, Ziegler R, Baylink DJ (1995) Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2511-2517
74. Kasperk CH, Borcsok I, Schairer HU, Schneider U, Nawroth PP, Niethard FU, Ziegler R (1997) Endothelin-1 is a potent regulator of human bone cell metabolism in vitro. *Calcif Tissue Int* 60:368-374
75. Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S (1999) Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev* 80:159-170
76. Kimoto S, Cheng SL, Zhang SF, Avioli LV (1994) The effect of glucocorticoid on the synthesis of biglycan and decorin in human osteoblasts and bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 135:2423-2431
77. Koshihara Y, Hoshi K (1997) Vitamin K2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro. *J Bone Miner Res* 12:431-438

78. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ (1997) Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum Mutat* 9:300-315
79. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG (2001) Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 153:1133-1140
80. Lawson GM, Katzmann JA, Kimlinger TK, O'Brien JF (1985) Isolation and preliminary characterization of a monoclonal antibody that interacts preferentially with the liver isoenzyme of human alkaline phosphatase. *Clin Chem* 31:381-385
81. Lecanda F, Avioli LV, Cheng SL (1997) Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Biochem* 67:386-396
82. Lee I, Ono Y, Lee A, Omiya K, Moriya Y, Takagi M (1998) Immunocytochemical localization and biochemical characterization of large proteoglycans in developing rat bone. *J Oral Sci* 40:77-87
83. Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ (1998) Osteocalcin gene promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem Suppl* 30-31:62-72.:62-72
84. Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE (1994) Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev Biol* 166:220-234
85. Liu P, Oyajobi BO, Russell RG, Scutt A (1999) Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: interaction between transforming growth factor-beta and 1,25(OH)(2) vitamin D(3) In vitro. *Calcif Tissue Int* 65:173-180

86. Long MW, Ashcraft EK, Normale D, Mann KG (1999) Age-related phenotypic alterations in populations of purified human bone precursor cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54:B54-B62
87. Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG (1995) Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* 95:881-887
88. Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE (1994) Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 158:555-572
89. Martinez ME, del Campo MT, Medina S, Sanchez M, Sanchez-Cabezudo MJ, Esbrit P, Martinez P, Moreno I, Rodrigo A, Garces MV, Munuera L (1999) Influence of skeletal site of origin and donor age on osteoblastic cell growth and differentiation. *Calcif Tissue Int* 64:280-286
90. McKee MD, Nanci A (1996) Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech* 33:141-164
91. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H (1998) Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 247:610-615
92. Mizuno M, Imai T, Fujisawa R, Tani H, Kuboki Y (2000) Bone sialoprotein (BSP) is a crucial factor for the expression of osteoblastic phenotypes of bone marrow cells cultured on type I collagen matrix. *Calcif Tissue Int* 66:388-396

93. Mizuno M, Shindo M, Kobayashi D, Tsuruga E, Amemiya A, Kuboki Y (1997) Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels in vivo. *Bone* 20:101-107
94. Muschler GF, Boehm C, Easley K (1997) Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am* 79:1699-1709
95. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA (2001) Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res* 19:117-125
96. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17-29
97. Nefussi JR, Bami G, Modrowski D, Oboeuf M, Forest N (1997) Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. *J Histochem Cytochem* 45:493-503
98. Nerlich AG, Kirsch T, Wiest I, Betz P, von der MK (1992) Localization of collagen X in human fetal and juvenile articular cartilage and bone. *Histochemistry* 98:275-281
99. Owen M (1988) Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10:63-76.:63-76
100. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990) Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143:420-430

101. Pereira RC, Delany AM, Canalis E (2002) Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression. *Bone* 30:685-691
102. Pereira RM, Delany AM, Canalis E (2001) Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone* 28:484-490
103. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147
104. Poliard A, Ronziere MC, Freyria AM, Lamblin D, Herbage D, Kellermann O (1999) Lineage-dependent collagen expression and assembly during osteogenic or chondrogenic differentiation of a mesoblastic cell line. *Exp Cell Res* 253:385-395
105. Raouf A, Ganss B, McMahon C, Vary C, Roughley PJ, Seth A (2002) Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix. *Matrix Biol* 21:361-367
106. Raouf A, Seth A (2002) Discovery of osteoblast-associated genes using cDNA microarrays. *Bone* 30:463-471
107. Reddi AH (1995) Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells. Maureen Owen revisited. *Clin Orthop* 115-119
108. Reddi AH (2000) Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng* 6:351-359
109. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL (1996) Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res* 11:312-324

110. Rickard DJ, Kazhdan I, Leboy PS (1995) Importance of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and the nonadherent cells of marrow for osteoblast differentiation from rat marrow stromal cells. *Bone* 16:671-678
111. Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I (1994) Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 161:218-228
112. Rifas L, Fausto A, Scott MJ, Avioli LV, Welgus HG (1994) Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human osteoblast-like cells: differentiation is associated with repression of metalloproteinase biosynthesis. *Endocrinology* 134:213-221
113. Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M, Denhardt DT (1998) Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res* 13:1101-1111
114. Robey PG, Termine JD (1985) Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 37:453-460
115. Rueger JM (1998) [Bone substitution materials. Current status and prospects]. *Orthopade* 27:72-79
116. Sandberg M, Autio-Harminen H, Vuorio E (1988) Localization of the expression of types I, III, and IV collagen, TGF-beta 1 and c-fos genes in developing human calvarial bones. *Dev Biol* 130:324-334
117. Sarathchandra P, Pope FM, Kayser MV, Ali SY (2000) A light and electron microscopic study of osteogenesis imperfecta bone samples, with reference to collagen chemistry and clinical phenotype. *J Pathol* 192:385-395
118. Sell S, Gaissmaier C, Fritz J, Herr G, Esenwein S, Kusswetter W, Volkmann R, Wittkowski KM, Rodemann HP (1998) Different behavior of

- human osteoblast-like cells isolated from normal and heterotopic bone In vitro. *Calcif Tissue Int* 62:51-59
119. Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, Niedhart C, Engel I, Schulz H, Atkinson MJ, Hufner M (1999a) Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 75:22-35
120. Siggelkow H, Schulz H, Kaesler S, Benzler K, Atkinson MJ, Hufner M (1999b) 1,25 dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> attenuates the confluence-dependent differences in the osteoblast characteristic proteins alkaline phosphatase, procollagen I peptide, and osteocalcin. *Calcif Tissue Int* 64:414-421
121. Sinha RK, Tuan RS (1996) Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone* 18:451-457
122. Stewart K, Walsh S, Screen J, Jefferiss CM, Chainey J, Jordan GR, Beresford JN (1999) Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 14:1345-1356
123. Strehl R, Schumacher K, de Vries U, Minuth WW (2002) Proliferating Cells versus Differentiated Cells in Tissue Engineering. *Tissue Eng* 8:37-42
124. Thomas T, Gori F, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL, Conover CA (1999) Response of bipotential human marrow stromal cells to insulin-like growth factors: effect on binding protein production, proliferation, and commitment to osteoblasts and adipocytes. *Endocrinology* 140:5036-5044
125. Vectorlabs. Vector Laboratories Product Information. 2002.  
Ref Type: Internet Communication, [www.vectorlaboratories.com](http://www.vectorlaboratories.com)
126. Vogel W, Grunebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Buhning HJ (2003) Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 88:126-133

127. von Garrel T, Gotzen L (1998) [Allogenic bone transplantation and bone banking]. *Unfallchirurg* 101:713-727
128. Walsh S, Jefferiss C, Stewart K, Jordan GR, Screen J, Beresford JN (2000) Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1-4. *Bone* 27:185-195
129. Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, Millan JL (2000) Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res* 15:1879-1888
130. Whyte MP, Walkenhorst DA, Fedde KN, Henthorn PS, Hill CS (1996) Hypophosphatasia: levels of bone alkaline phosphatase immunoreactivity in serum reflect disease severity. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2142-2148
131. Wilkins BS, Jones DB (1998) Immunophenotypic characterization of stromal cells in aspirated human bone marrow samples. *Exp Hematol* 26:1061-1067
132. Yamaguchi Y, Ruoslahti E (1988) Expression of human proteoglycan in Chinese hamster ovary cells inhibits cell proliferation. *Nature* 336:244-246
133. Zhu JX, Sasano Y, Takahashi I, Mizoguchi I, Kagayama M (2001) Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats. *Histochem J* 33:25-35
134. Zohar R, Sodek J, McCulloch CA (1997) Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. *Blood* 90:3471-3481

# Danksagung

Für die Vergabe des Themas sowie für die überaus freundliche Förderung dieser Arbeit danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wolf Mutschler, sehr herzlich.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Matthias Schieker für die intensive und äußerst konstruktive Betreuung meiner Arbeit bedanken. Seine Unterstützung stellte eine wichtige Stütze in der Durchführung der Arbeit dar und trug damit maßgeblich zum Gelingen bei.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Putz und Herrn PD Dr. Stefan Milz danke ich für die große Unterstützung von Seiten der Anatomischen Anstalt und für die gute Zusammenarbeit.

Desweiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tissue Engineering Knochen bzw. des Chirurgischen Forschungslabors im Besonderen Claudia Geißler, Dr. Thomas Tischer und Dr. Peter Neth.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Dr. Heike Pfau für das unermüdliche Korrekturlesen meiner Entwürfe sowie meiner Familie, ohne deren finanzielle und vor allem moralische Unterstützung diese Doktorarbeit niemals zu Stande gekommen wäre; ihnen widme ich diese Arbeit.

# Lebenslauf

Am 24.10.72 wurde ich als zweites Kind der Lehrerin Ingeborg Pautke, geb. Reichardt, und dem Zahnarzt Dr. Uwe Pautke in Schleswig geboren. Die Schulzeit beendete ich mit der allgemeinen Hochschulreife im Mai 1992 auf dem Klaus-Harms-Gymnasium in Kappeln. Nach dem zwölfmonatigen Wehrdienst bei der Marine begann ich zum Wintersemester 93/94 mit dem Zahnmedizinstudium an der Georg-August-Universität zu Göttingen. Nach bestandenem Physikum wechselte ich im Sommersemester 1996 zum Humanmedizinstudium, welches ich im November 2000 mit dem Erwerb der vorläufigen Approbation als Arzt und der medizinischen Promotion abschloss.

Im Oktober 2000 setzte ich das Zahnmedizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München fort und beendete es im April 2003 erfolgreich mit dem zahnmedizinische Staatsexamen. Von April bis September 2001 war ich als Arzt im Praktikum in der Anatomischen Anstalt tätig; seit Oktober 2001 bin ich als AiP der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt der LMU München angestellt.