

**Aus der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
Tübingen**

**Abteilung Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und  
Gesichtschirurgie**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. S. Reinert**

**Vergleich von BMP-4 versus BMP-2 für die osteogene  
Differenzierung von Periostzellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Florian Alexander Stephan Klumpp**

**aus**

**Pforzheim**

**2010**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. J. Hoffmann

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dipl. Biochem. W. Aicher

Meinen Eltern

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Tissue Engineering	1
1.1.1	Tissue Engineering heute	1
1.1.2	Knochen Tissue Engineering	2
1.2	Humane Stammzellen	3
1.2.1	Embryonale Stammzellen	4
1.2.2	Adulte Stammzellen	4
1.2.3	Adulte mesenchymale Stammzellen	4
1.3	Knochengewebe	8
1.3.1	Anatomie und Zusammensetzung	8
1.3.2	Knochenentwicklung	12
1.3.3	Knochenumbau und -metabolismus	12
1.4	Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)	13
1.4.1	Funktionen und Wirkung von BMPs	14
1.4.2	Signalübertragung	16
1.5	Fragestellung	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Zellkultur	21
2.2	Histologisch-chemische Färbungen	23
2.2.1	Alkalische-Phosphatase-Nachweis	24
2.2.2	Qualitative Bestimmung der Kalziumphosphat-Präzipitate	25
2.2.2.1	Alizarin Färbung	25
2.2.2.2	Von Kossa Färbung	25
2.3	Quantitative Bestimmung der Kalziumphosphat-Präzipitate	26
2.4	Proliferationstest	28

---

2.5	Bestimmung der Genexpression	28
2.5.1	RNA Extraktion	29
2.5.2	c-DNA Synthese	30
2.5.3	Quantitative real-time Polymerase Ketten Reaktion	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1	Histologisch-chemische Färbungen	33
3.2	Quantitative Bestimmung der Kalziumphosphat-Präzipitate	41
3.3	Proliferationstest	45
3.4	Genexpression mittels quantitativer real-time PCR	48
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>97</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ActR-I/II	Activin receptor type I or II
ALK	Activin like kinase
AP	Alkalische Phosphatase
BMMSC	Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
BMP	Bone morphogenetic protein
BMPR	Bone morphogenetic protein receptor
Cbfa1	Core binding factor a 1
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
c-Smad	common mediator Smad
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
IGF	Insulin like growth factor
i-Smad	Inhibitorischer Smad
Koll1 $\alpha$ 1	Kollagen Typ1 $\alpha$ 1
MSC	Mesenchymal stem cells
OC	Osteokalzin
OPN	Osteopontin

OSX	Osterix
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase chain reaction)
PDGF	Platelet derived growth factor
PMSC	Periosteal mesenchymal stem cell
RNA	Ribonukleinsäure
Runx2	Runt related transcription factor 2
r-Smad	receptor regulated Smad
Smad	Small mothers against decapentaplegic
TGF	Transforming growth factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor

# 1 Einleitung

## 1.1 Tissue Engineering

Bereits 1984 beobachteten Wolter und Meyer das Wachstum von epithelähnlichen Strukturen auf der Oberfläche von Hornhautprothesen aus Polymethylmethacrylat [Wolter und Meyer 1984]. Zusammen mit anderen, wie z. B. Charles und Josef Vacanti, begründeten sie Mitte der 80er Jahre den Begriff „Tissue Engineering“. Gegenwärtig gibt es kaum noch einen Bereich in den Medizinwissenschaften, der sich nicht mit Tissue Engineering beschäftigt. Man kann es daher als ein sich schnell entwickelndes Wissenschaftsfeld im Bereich der Biomedizin bezeichnen [Bruder und Fox 1999, Minuth et al. 2002]. Mit der Bezeichnung „Tissue engineering“ beschreibt man heute im Allgemeinen ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, welches das Ziel verfolgt, Gewebefunktionen aufrecht zu erhalten, zu ersetzen, zu verbessern oder grundlegend zu erforschen [Thomson et al. 1995]. Es umfasst dabei ein Spektrum aller sich im Körper befindlichen Gewebearten. Die Entwicklung bioartifizieller dreidimensionaler Konstrukte aus lebenden Zellen, Zellmatrix und Biomaterialien steht dabei im Vordergrund [Langer 2000, Sittinger 1995].

### 1.1.1 Tissue Engineering heute

Im Bereich der Gewebeersatztechnik wurden weltweit bereits diverse Möglichkeiten zur Herstellung verschiedenster Gewebe, wie z. B. Haut, Knorpel, Knochen, Gefäße, Herzklappen, Brust und Leber erforscht. Allerdings stehen die Forschung und die Erfolge zur Herstellung von artifiziellen Knochen im Vergleich zu vielen anderen der aufgezählten Gewebe noch deutlich zurück [Minuth et al. 1998]. Vor allem die plastisch-rekonstruktive Chirurgie des Gesichtsschädels verzeichnet einen immer höheren Bedarf an Knochenersatzmaterialien, welcher oft aus autologen Quellen nicht ausreichend gedeckt werden kann. Während allogene oder xenogene Ersatzmaterialien die Gefahr sowohl von frühzeitigen Resorptions- oder immunologischen Abstoßreaktionen als auch von Infektionsrisiken mit sich bringen [Langer et al. 1993, Bujía et al. 1995,



Hammer et al. 1992], weisen anorganische Ersatzmaterialien Probleme hinsichtlich Materialermüdung, Degradation und Korrosion auf [Langer et al. 1993, Sittinger 1995].

Bei Geweben, die aus körpereigenen Zellen aufgebaut sind, sind die oben genannten Probleme nicht zu erwarten. Mit diesen Vorteilen eröffnet das Tissue Engineering neue Möglichkeiten. Notwendige Komponenten zur Züchtung artifizierender autologer Knochenersatzmaterialien sind eine ausreichende Anzahl vitaler Zellen, die unter geeigneten Bedingungen und in Anwesenheit von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren *in vitro* kultiviert werden, und ein Trägermaterial, das als Leitschiene für die wachsende Zellpopulation und die Synthese extrazellulärer Matrix dient. Mit Hilfe des Tissue Engineering könnten somit nach Bedarf definierte dreidimensionale gewebe- und organtypische Strukturen in hoher Zelldichte für die spätere *in vivo*-Implantation geformt und hergestellt werden [Bonassar et al. 1998].

### **1.1.2 Knochen Tissue Engineering**

Speziell für das Knochen Tissue Engineering haben sich in den letzten Jahren drei Methoden, die als matrixbasiert, faktorbasiert und zellbasiert bezeichnet werden können, etabliert [Bruder und Fox 1999]. Die matrixbasierte Methode beschreibt den Einsatz von synthetischen, osseokonduktiven Materialien (z. B. Tricalciumphosphat oder Hydroxylapatit-Keramiken), die entweder resorbiert oder in das neugebildete Knochengewebe inkorporiert werden. Ungünstige biophysikalische Eigenschaften und fehlende Osseoinduktivität limitieren den separaten Einsatz solcher Materialien stark [Bruder und Fox 1999, Wolff et al. 1994, Rose und Oreffo 2002]. Eine weitere Möglichkeit stellt die faktorbasierte Methode dar, bei welcher Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren (z. B. bone morphogenetic proteins - BMP) entweder direkt injiziert oder zusammen mit einer dreidimensionalen Trägersubstanz implantiert werden. Bis heute wurden bereits über 15 osseoinduktive Proteine isoliert und auch rekombinant hergestellt. Hauptproblematik dieses Verfahrens sind die Bestimmung der exakten individuellen therapeutischen Dosis sowie die Applikation eines geeigneten Dif-

ferenzierungs- bzw. Wachstumsfaktors ohne den Verlust seiner Aktivität [Bruder und Fox 1999, Reddi 1995, Reddi 1998]. Grundlegend für das Prinzip des zellbasierten Verfahrens ist, dass knochenbildende Zellen direkt in einen vorhandenen Knochendefekt eingebracht werden und dort zur Knochenneubildung führen können [Bruder und Fox 1999]. Erfolgreich konnten Kadiyala und Ko-Autoren zeigen, dass Knochendefekte kritischer Größe mit Hilfe von syngenem Stammzellen aus dem Knochenmark nach Überführung auf ein Trägermaterial ausheilen können [Kadiyala et al. 1997]. Breitbart und Ko-Autoren benutzten vordifferenzierte periostale Stammzellen und konnten ebenso positive Ergebnisse, die erfolgreiche Regeneration von Knochendefekten betreffend, aufzeigen [Breitbart et al. 1998]. Frosch und Ko-Autoren verglichen hingegen die Reossifikation von Knochendefekten an Kaninchen mit unbehandelten oder mit Dexamethason und Vitamin D vorbehandelten mesenchymalen Vorläuferzellen mit zellfreien Leerdefekten oder mit Knochendefekten, die mit autologer Spongiosa aufgefüllt wurden. Die letzteren heilten signifikant besser aus als alle anderen Defekte [Frosch et al. 2003].

Das Knochen Tissue Engineering scheint folglich nur dann erfolgreich zu sein, wenn man die oben genannten Verfahren miteinander kombiniert und sich somit die verschiedenen Vorteile zu Nutzen macht.

## 1.2 Humane Stammzellen

Geeignete Zellen für den erfolgreichen Knochenersatz stellen u. a. Zellen mit multipotenten Eigenschaften dar. Multipotenz ist definiert als die Fähigkeit physiologisch undifferenzierter Zellen, sich unter spezifischen Bedingungen in bestimmte Zellen bzw. Gewebe zu differenzieren. Ausdifferenzierte somatische Zellen lassen sich nur schlecht kultivieren und zeigen ein sehr begrenztes Proliferationspotential; zudem stehen sie nur begrenzt zur Verfügung [Haverich et al. 2002]. Multipotente humane Stammzellen stellen somit eine taugliche, nahezu unerschöpfliche Ressource dar. Man unterscheidet zwischen embryonalen, fötalen und adulten Stammzellen.

### **1.2.1 Embryonale Stammzellen**

Embryonale Stammzellen, welche gut expandier- und differenzierbar sind, sind leider schwer zu gewinnen und werden kontrovers diskutiert. Des Weiteren wurden die Bildung von Teratokarzinomen [Erdö et al. 2003] und die Gefahr von Abstoßungsreaktionen beim Empfänger [Robertson 2001] beschrieben. Dies alles führt zu erheblichen klinischen Bedenken. Darüber hinaus erübrigt die Verwendung adulter Stammzellen die nach ethischen, moralischen und rechtlichen Gesichtspunkten umstrittene Verwendung embryonaler und fötaler Stammzellen.

### **1.2.2 Adulte Stammzellen**

Adulte Stammzellen werden nach ihrer Herkunft gegeneinander abgegrenzt. Man unterscheidet u. a. zwischen hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen. Während Stammzellen der hämatopoetischen Reihe sich zu Blutzellen, wie z. B. Lymphozyten, Thrombozyten oder Erythrozyten, differenzieren, können sich mesenchymale Stammzellen zu Zellen der verschiedenen mesenchymalen Gewebe, wie z. B. Osteoblasten, Adipozyten oder Chondrozyten, entwickeln [Haverich et al. 2002].

### **1.2.3 Adulte mesenchymale Stammzellen**

Für das Knochen-Tissue-Engineering sind somit ausschließlich Stammzellen mesenchymaler Herkunft von Bedeutung. Diese können aus dem Knochenmark gewonnen, in vitro expandiert und zu verschiedenen mesenchymalen Zelltypen [Pittenger et al. 1999], wie z. B. zu Knochen [Jaiswal et al. 1997], Knorpel [Johnstone et al. 1998], Sehne [Young et al. 1998], Muskel [Wakitani et al. 1995], Fett [Sekiya et al. 2004], reifes Knochenmarkstroma [Majumdar et al. 1998] sowie zu einer Reihe weiterer Gewebe [Jiang et al. 2002] differenziert werden. Bis heute ist es schwierig mesenchymale Stammzellen isoliert zu gewinnen, da sie nur über die gleichzeitige Expression mehrerer Oberflächenantigene und weitere Eigenschaften definiert werden können [Dominici et al. 2006].

Vorläufig stellen die Expansionseigenschaften, die Adhärenz und das multipotente Differenzierungspotential die einzigen konkreten Definitionskriterien dar [Baksh et al. 2004]. In vitro kultivierte mesenchymale Stammzellen zeigen zudem einen fibroblastoiden Phänotyp [Pittenger et al. 1999] und können z. T. ohne den Verlust ihrer Fähigkeiten kryokonserviert werden, so dass eine Anlage von Zellbanken möglich wäre [Bruder et al. 1997].

Im erwachsenen menschlichen Körper sind mesenchymale Stammzellen nicht nur im Knochenmark enthalten, wo das Vorkommen mit ca. 0,001 - 0,1 % als sehr gering eingeschätzt wird [Pittenger et al. 1999] (Bruder und Fox gehen von 1:100.000 aus). Sie konnten ebenfalls in mesenchymalen und anderen Geweben isoliert werden, wie z. B. in peripherem Blut [Roufosse et al. 2004], im Periost [Nakahara et al. 1991], trabekulären Knochen, Fettgewebe, in Synovia, Skelettmuskulatur, Lunge und Nabelschnur [Baksh et al. 2004]. Um mesenchymale Stammzellen in eine bestimmte Richtung differenzieren zu können, müssen spezifische Kulturbedingungen eingehalten werden, indem geeignete Wachstums- und Differenzierungsfaktoren hinzugefügt werden. Hierzu gibt es einige gute Übersichtsarbeiten [Otto und Rao 2004, Barry und Murphy 2004, Baksh et al. 2004, Tuan 2004], die die vielfach untersuchte Differenzierbarkeit mesenchymaler Stammzellen zusammenfassen. Eine Aufstellung davon ist in Abb. 1 grafisch dargestellt ist.

Für das Knochen-Tissue-Engineering ist natürlich die Differenzierbarkeit zu Knochen von vorrangigem Interesse. Dabei ist der Einsatz von osteogen wirkenden Substanzen indiziert. Jaiswal und Ko-Autoren konnten zeigen, dass adulte mesenchymale Stammzellen nach der Behandlung mit Dexamethason,  $\beta$ -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure-2-phosphat zu Osteoblasten differenzieren [Jaiswal et al. 1997]. Die osteogene Differenzierung dieser Zellen lässt sich in mehrere Phasen untergliedern, welche in Abb. 2 schematisch dargestellt sind. Ausgehend von der mesenchymalen Stammzelle geht die Entwicklung über Osteoprogenitorzellen und Präosteoblasten bis hin zu Osteoblasten bzw. Osteozyten [Kale und Long 2000]. Die Zellen unterscheiden sich in den verschiedenen Entwicklungsstadien durch ihre Morphologie sowie durch ihr Prolife-

rationsverhalten bzw. –vermögen. Die Proliferationskapazität einer Zelle vermindert sich mit zunehmender Differenzierung [Aubin 2001].

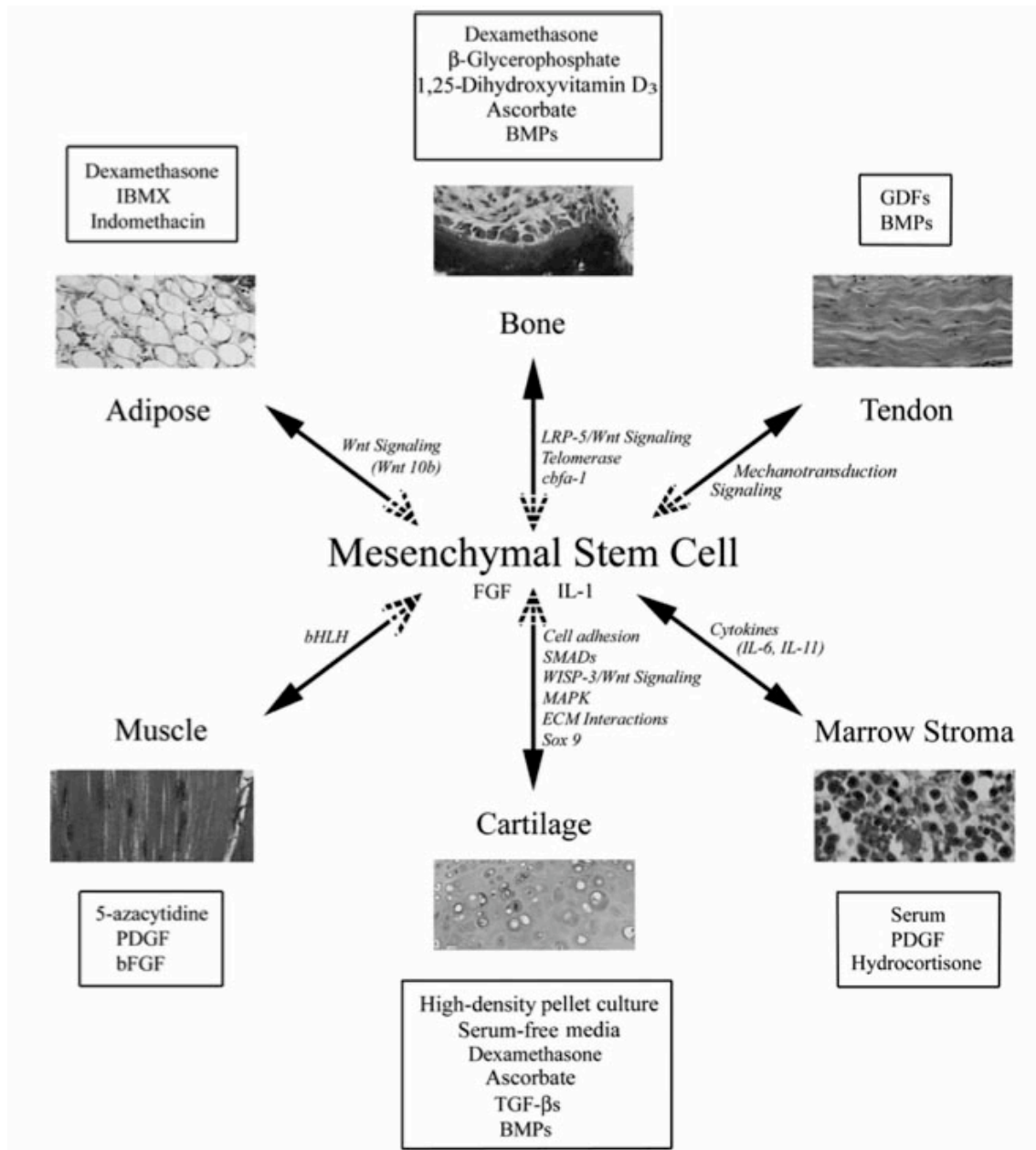


Abb. 1 Diese Grafik zeigt das Potential humaner mesenchymaler Stammzellen, sich zu Zellen verschiedenster Gewebearten, wie Fett, Knochen, Sehnen, Knorpel, Muskel und Knochenmarkstroma zu differenzieren. Die in-vitro-Bedingungen für die jeweiligen Differenzierungswege sind in den entsprechenden Kästen zusammengestellt. Bereits bekannte molekulare Mechanismen und/oder Komponenten wie Transkriptionsfaktoren sind kursiv dargestellt. Die schraffierten Pfeilspitzen zeigen, dass die Differenzierung auch rückläufig von statten gehen kann. [Quelle: Tuan 2004]

Des Weiteren wird je nach Stadium ein bestimmtes Genmuster exprimiert, das durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Cbfa-1 (Runx-2), reguliert wird [Ducy et al. 1997]. Diese Genmuster können mittels der quantitativen real-time PCR identifiziert und quantitativ gemessen werden, wodurch Rückschlüsse auf bestimmte Faktoren und somit auf den Differenzierungsgrad einer Zellpopulation möglich sind.

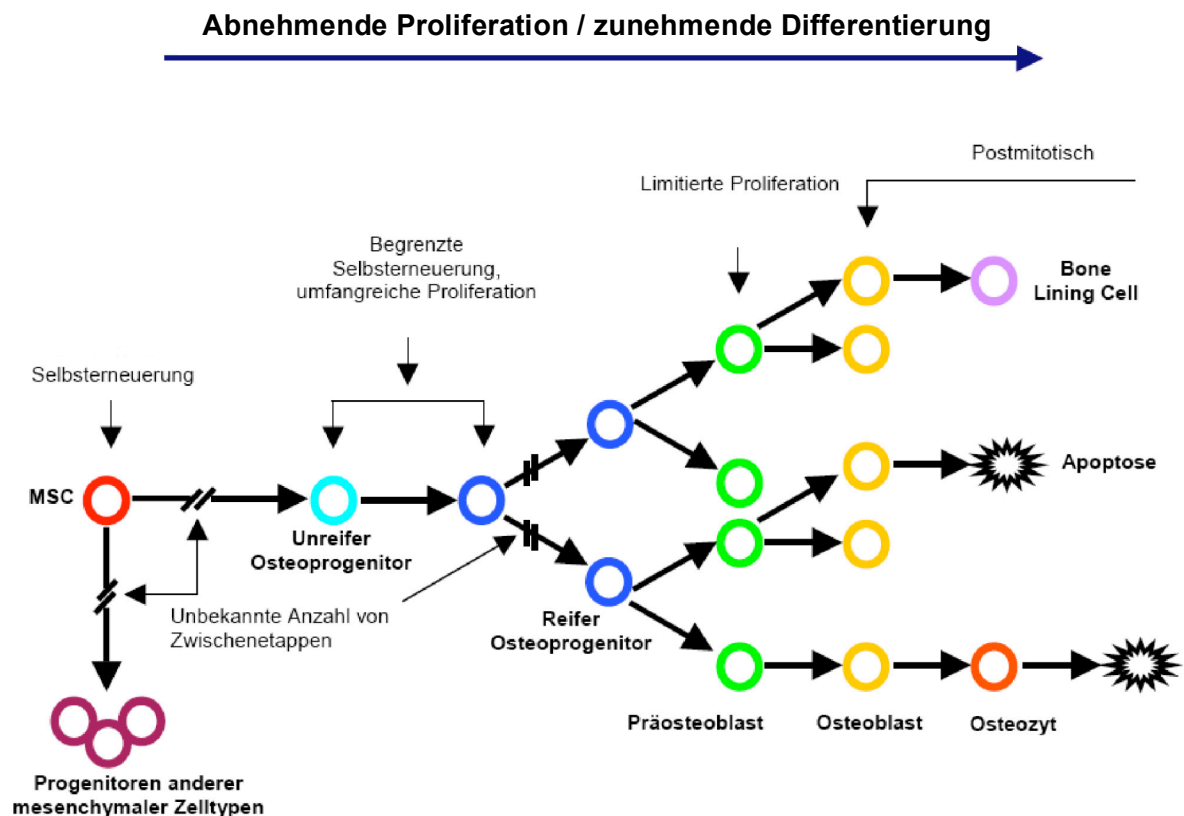


Abb. 2 Diese Grafik zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Stadien der Osteogenese mesenchymaler Stammzellen (MSC) sowie deren Differenzierungs- und Proliferationsverhalten. [Quelle: Aubin 2001]

Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen ist gegenwärtig auf der Suche nach regulatorischen Molekülen, welche die Differenzierung multipotenter mesenchymaler

Stammzellen kontrolliert. Am häufigsten untersucht werden Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie, vor allem die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).

Periostale Zellen zeigen Stammzeleigenschaften durch ihre Funktion Knochen und Knorpel sowohl in vitro als auch in vivo auszubilden. Zusammen mit den Osteoblasten treiben sie die Zelldifferenzierung bei der Knochenheilung voran [De Bari et al. 2006, Nakahara et al. 1991]. Zudem verzeichnet der Eingriff zur Gewinnung von Periostgewebe eine nur geringe Morbidität. Aus diesen Gründen und da der Anteil an mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark sehr gering ist, stellen periostale Zellen eine sehr gute und zukunftsweisende Basis für einen erfolgreichen Knochenersatz dar. Weiterhin zeigte De Bari und Ko-Autoren, dass das osteogene Differenzierungspotential der Periostzellen im Alter gleich bleibt [De Bari et al. 2006], was für die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark nicht zutrifft [D'Ippolito et al. 1999, Huibregtse et al. 2000]. Bei diesen Vorläuferzellen nimmt das osteogene Differenzierungspotential mit dem Alter zugunsten des adipogenen Differenzierungspotentials ab. Diese Erscheinung kann auch nachvollzogen werden, wenn man bedenkt, dass der Fettanteil des Knochenmarks mit steigendem Alter immer höher wird.

## **1.3 Knochengewebe**

Das Knochengewebe erfüllt im menschlichen Organismus mehrere wichtige Aufgaben: Zum einen hat es eine Stütz-, Bewegungs-, Schutz- und Formgebungsfunktion und zum anderen fungiert es als größter Kalzium- und Phosphat-speicher des Körpers [Soldner und Herr 2001, Junqueira und Carneiro 2005].

### **1.3.1 Anatomie und Zusammensetzung**

Makroskopisch kann man Knochengewebe in eine äußere kompakte Kortikalis und in eine innere schwammartig strukturierte Spongiosa unterteilen. Die Knochenzwischenräume im Bereich des spongiösen Knochens sind mit Fett- oder Blutmark gefüllt. Weiter wird zwischen Lamellen- und Geflechtknochen, welcher sich im Laufe der Entwicklung eines menschlichen Organismus in Lamellen-

knochen umbaut, unterschieden. Lediglich im Bereich des Schädels (Zahnalveolen, Schädelnähte und die pars petrosa des os temporale) ist beim Erwachsenen noch Geflechtknochen vorhanden [Lippert 2003]. Mit Ausnahme der Gelenkflächen und den Bereichen, in denen Bänder und Muskeln einstrahlen, sind alle Knochenoberflächen mit der Knochenhaut, dem sog. Periost, überzogen. Das Periost (vgl. Abb. 3) kann wiederum in zwei Schichten unterteilt werden: zum einen die äußere, faserreiche Schicht, deren kollagene Fasern, auch Sharpey-Fasern genannt, teilweise in den Knochen einstrahlen (stratum fibrosum) und zum anderen die innere, nerv- und gefäßreiche Schicht, in welcher differenzierungsfähige mesenchymale Stammzellen enthalten sind (stratum osteogenicum bzw. Kambiumschicht). Letztere spielt durch ihren Anteil an differenzierungsfähigen Zellen eine wichtige Rolle bei der Knochenneubildung und Knochenheilung [Junceira und Carneiro 2005, Lippert 2003].

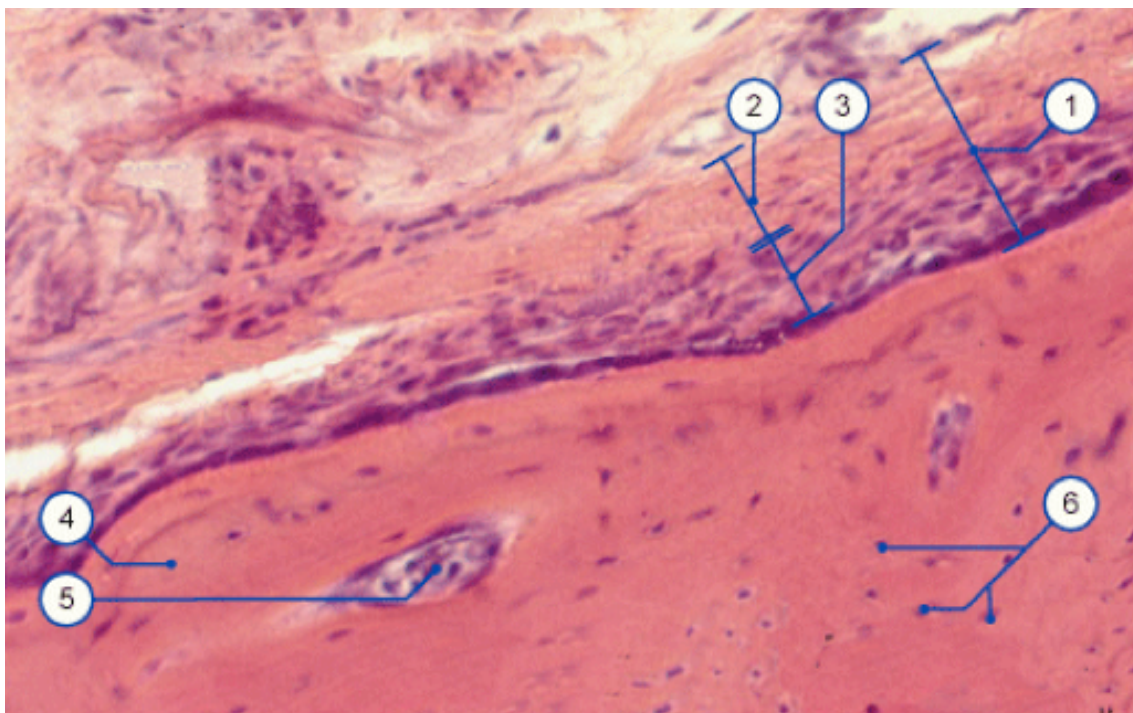


Abb. 3 Dies ist ein histologischer Schnitt von menschlichem Periost; Hämatoxylin-Eosin-Färbung: 1) Periost, 2) Stratum fibrosum, 3) Stratum osteogenicum, 4) Kortikalis, 5) Harver'scher Kanal, 6) Osteozyten. [Quelle: [http://www.unifr.ch/anatomy/learningfree/allmand/stuetzgewebe/knochen/images/periost\\_mit.gif](http://www.unifr.ch/anatomy/learningfree/allmand/stuetzgewebe/knochen/images/periost_mit.gif)]



Die Mikrostruktur des reifen Knochens besteht aus zahlreichen Osteonen. Das sind Osteozyten und kollagene Fasern, die konzentrisch um einen mit Blutgefäßen versehenen Havers-Kanal angelagert sind. Durch querverlaufende, blutgefäßenthaltende Volkmann-Kanäle stehen die längsverlaufenden Havers-Kanäle untereinander und mit dem gefäßreichen Periost in Verbindung. Dies zusammen mit dem trabekulären Netzwerk im spongiösen, inneren Teil des Knochens verleiht ihm außerordentliche Festigkeit bei geringem Gewicht [Junqueira und Carneiro 2005, Marks und Hermey 1996, Lippert 2003].

Der Knochen ist zusammen mit den Zahngeweben das einzige mineralhaltige Gewebe des menschlichen Organismus. Seine biochemische Zusammensetzung ist in Abb. 4 zusammenfassend dargestellt.

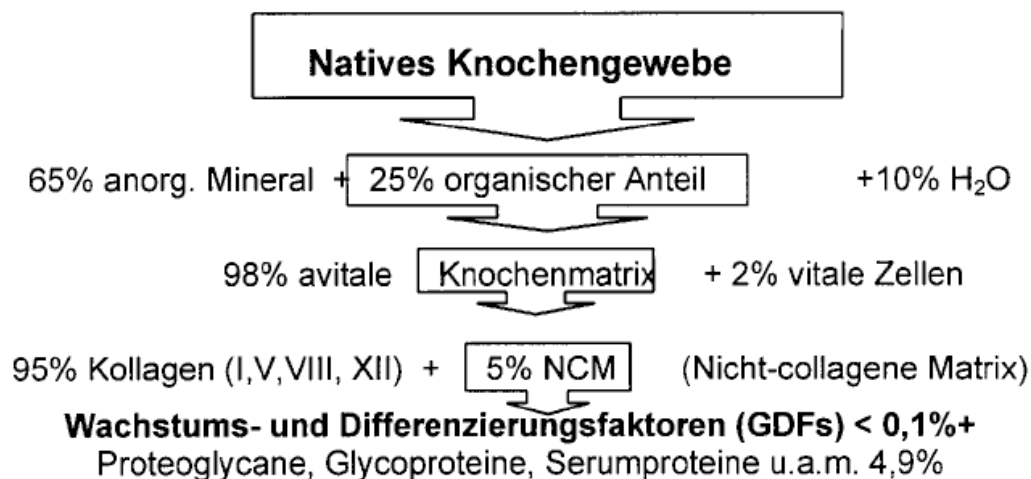


Abb. 4: Biochemische Zusammensetzung des menschlichen Knochens. Prozentangaben entsprechen Massenanteilen. [Quelle: Soldner und Herr 2001]

Während der anorganische Anteil fast ausschließlich aus Kalziumphosphaten besteht, welche hauptsächlich in Form von Hydroxylapatit vorliegen, setzt sich der weitaus kleinere organische Teil aus 98 % extrazellulärer Knochenmatrix zusammen [Soldner und Herr 2001]. Diese Knochenmatrix enthält wiederum

fast ausschließlich Kollagen Typ I [Vuorio und Crombrughe 1990] und einen nur kleinen Anteil sog. nicht-kollagener Matrix bestehend aus Proteoglykanen, Phosphoproteinen, strukturellen Glykoproteinen, Polypeptiden und Serumproteinen. Diese beinhalten z. B. die Alkalische Phosphatase, Osteopontin oder Osteokalzin [Robey 1996]. Der kleinste Massenanteil im Knochengewebe beschränkt sich auf die Gruppe der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (GDF). Zu ihnen zählen die: Transforming Growth Factors (TGF- $\beta$ 1-5), die Insuline-like Growth Factors (IGF-I/II), die Fibroblast Growth Factors (FGF-1-9), die Platelet Derived Growth Factors (PDGF AA/BB) und die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) [Soldner und Herr 2001].

Neben den hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks, befinden sich im Knochengewebe auch andere, teilweise bereits ausdifferenzierte Zellen. Dazu gehören Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und sog. Lining-Zellen. Die Lining-Zellen sind teilungsfähige sog. ruhende Vorläuferzellen, welche auf der Knochenoberfläche in der Kambiumschicht des Periosts angesiedelt sind und durch osteogene Reize zur osteogenen Differenzierung angeregt werden können. Die Osteoblasten sind die knochenbildenden Zellen, die für die Synthese der organischen Knochenmatrix verantwortlich sind und die Mineralisation des Knochens steuern. Mit zunehmendem Knochenwachstum werden die Osteoblasten in den mineralisierten Knochen vollständig eingeschlossen. Nur ca. 20 % der gesamten Osteoblasten entwickeln sich zu ihrem endgültigen Differenzierungsstadium, den Osteozyten [Aubin et al. 1995]. Der Hauptanteil mit ca. 65 % unterliegt nach Erfüllung ihrer Aufgabe der Apoptose [Manolagas 2000]. Die Osteozyten befinden sich somit in Lakunen der mineralisierten Knochenmatrix und haben Fortsätze, die sich in sog. Kanalikuli erstrecken und über Gap Junctions an die Enden anderer Osteozyten gekoppelt sind [Junqueira und Carneiro 2005]. Somit bilden sie ein umfangreiches intra- und extrazelluläres Kommunikationssystem innerhalb des Knochens und der Knochenoberfläche. Die Osteoklasten entstammen der Monozyten-Makrophagen-Linie, sind mehrkernige Riesenzellen und für die Resorption mineralisierter Knochenmatrix verantwortlich [Takahashi et al. 2002].

### 1.3.2 Knochenentwicklung

Bei der Knochenentwicklung wird zwischen zwei Arten unterschieden: Zum einen die desmale bzw. direkte Ossifikation und zum anderen die enchondrale oder indirekte Ossifikation. Die desmale Variante zeichnet sich dadurch aus, dass Osteoblasten direkt mineralisierende Matrix sezernieren. Im Gegensatz dazu entsteht bei der enchondralen Ossifikation der Knochen dadurch, dass Knorpelmatrix umgebaut bzw. von Osteoblasten durch Knochenmatrix ersetzt wird. Bei beiden Prozessen entsteht zunächst Geflechtknochen, der dann im Laufe der Zeit in Lamellenknochen umgebaut wird [Junqueira und Carneiro 2005].

### 1.3.3 Knochenumbau und -metabolismus

Knochen ist ein sehr aktives Gewebe, das lebenslang einem ständigen Umbau unterliegt („Bone remodelling“). Darin liegt auch das enorme Regenerationsvermögen begründet, welches es ihm ermöglicht, sich wechselnden Belastungen anzupassen und traumatische oder krankheitsbedingte Veränderungen meist sogar vollständig („Restitutio ad integrum“) zu beseitigen [Soldner und Herr 2001]. Durch dieses immerwährende „Remodelling“ werden zudem auch das Knochenvolumen und die Kalzium-Homöostase im Körper stabil gehalten. Dafür sind zwei Arten spezialisierter Knochenzellen notwendig: einerseits die Osteoblasten, die den inneren und äußeren Oberflächen des Knochens anliegen und verantwortlich für den Knochenaufbau sind, indem sie Kollagen Typ I und weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Osteokalzin, Osteopontin, Osteonektin und Proteoglykane bilden; andererseits die multinukleären Osteoklasten, die mit Hilfe spezieller  $H^+$ -ATPasen die Knochenoberfläche ansäuern und somit für eine kontrollierte Knochenresorption, die beim Knochenumbau dem Knochenaufbau vorausgeht, verantwortlich sind [Schwarz und O’Keefe 2000].

Knochenzellen werden von vielen Faktoren beeinflusst. Ein Beispiel hierfür stellt das Parathormon dar. Es wird in der Nebenschilddrüse hergestellt und ist für

eine Proliferationssteigerung von Osteoprogenitorzellen verantwortlich. Eine weitere Wirkung des Parathormons auf den Knochen und seine Zellen ist seine Beteiligung an der Kalziumregulation, indem es durch Aktivierung von Osteoklasten zur Freisetzung von Kalzium aus dem Knochen führt. Östrogene hingegen inhibieren Osteoklasten und stimulieren Osteoblasten, was zu einer vermehrten Mineralisation des Knochens führt und den Kalziumspiegel im Blut sinken lässt. Der Gegenspieler des Parathormons ist das Hormon Kalzitinin, das in der Schilddrüse hergestellt wird und dafür sorgt, dass die Tätigkeit der Osteoklasten wieder abgebremst wird. Dieses Hormon verhindert den übermäßigen Abbau der Kalziumsubstanz und dient somit dem Knochenaufbau [Deutzmann et al. 2003]. Lokale Faktoren, wie z. B. BMPs, TGFs oder FGFs, sind vor allem beim Knochenwachstum und bei der Knochenheilung bzw. -regeneration beteiligt. Primär die BMPs, die heutzutage rekombinant hergestellt werden können, scheinen ein großes Potential für das Knochen Tissue Engineering zu haben.

#### **1.4 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)**

Urist untersuchte 1965 die außergewöhnliche regenerative Fähigkeit des Knochens zum ersten Mal mit der Idee, dass der Grund dafür im Knochen selbst zu finden sei. Er zeigte, dass im adulten Knochen isolierte osteoinduktiven Substanzen eine Knochenneubildung an ektopischen Stellen in Nagern induzieren konnten [Urist 1965]. Diese osteoinduktiven Faktoren wurden als Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) bezeichnet. Nach weiteren Untersuchungen von Wang und Ko-Autoren und Wozney und Ko-Autoren konnten die BMPs aufgrund ihres Molekulargewichts von 30 kD und ihrer Molekularstruktur der TGF- $\beta$ -Superfamilie multifunktionaler Zytokine und Wachstumsfaktoren zugeordnet werden [Wang et al. 1988, Wozney et al. 1988]. Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind die Growth and Differentiation Factors (GDFs). Allen gemeinsam sind die hoch homologe Aminosäuresequenz und die molekulare Struktur eines Dimers aus zwei identischen Untereinheiten, welche über eine Cysteinbrücke verbunden sind. Drei weitere Cysteinbrücken aus Cysteinen der beiden Untereinheiten führen zu einem komplexen dreidimensionalen Fal-

tungsmuster des Moleküls [Kübler 2002]. BMPs unterliegen einem Reifungsprozess. Sie werden zunächst als Vorläufer-Proteine synthetisiert, vor der Sekretion in Dimere prozessiert und dann proteolytisch zu reifen Dimeren gespalten. Dabei kontrolliert die aminoternale Region die Stabilität der reifen Proteine [Kübler 2002]. Ausser BMP-1, einer Metalloproteinase, zählen alle bekannten BMPs zur TGF- $\beta$ -Superfamilie und repräsentieren mit 30 Mitgliedern ca. ein Drittel dieser. Die BMPs können entsprechend ihrer strukturellen Übereinstimmung in 3 Untergruppen unterteilt werden. So werden die hoch homologen BMP-2 und BMP-4, sowie *Drosophila* Decapentaplegic (dpp) zur ersten Untergruppe der BMPs zusammengefasst. BMP-5, BMP-6, BMP-7, auch als Osteogenic protein-1 (OP-1) bezeichnet, BMP-8 (OP-2) sowie *Drosophila* 60A stellen die Mitglieder der zweiten Untergruppe dar. Eine dritte Untergruppe beinhaltet ausschließlich das auch Osteogenin genannte BMP-3 [Wozney 2002].

#### 1.4.1 Funktionen und Wirkung von BMPs

BMPs konnten nicht nur in Knochengewebe, sondern auch in vielen anderen Organen des menschlichen Körpers nachgewiesen werden. Demnach spielen sie nicht nur bei der Steuerung der Knorpel- und Knochenmorphogenese eine Rolle, sondern sind auch bei anderen Vorgängen, wie z. B. der Embryogenese und der Organentwicklung, beteiligt [Winnier et al. 1995, Vukicevic et al. 1994]. Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Neurogenese und die Bildung des Mesoderms ebenso wie die Entwicklung von der Niere, der Lunge, des Herzens, des Gehirns, des Darms, der Zähne, der Extremitäten und der ursprünglichen Geschlechtszellen werden von BMPs beeinflusst und u. a. von diesen gesteuert [Kingsley 1994; Dudley et al. 1995; Hogan 1996; Graff 1997; Ebendal et al. 1998; Wozney 1998]. Bei der Wundheilung z. B. konnte ein zeitlicher Unterschied im Erscheinen einzelner BMPs beobachtet werden [Bostrom et al. 1995; Yu et al. 2002]. Mit diversen Knockout-Experimenten konnte die Beteiligung verschiedener BMPs nicht nur bei der Skelettentwicklung aufgezeigt werden. Mäuse mit vollständigem BMP-2 und BMP-4 Defekten starben bereits im Uterus [Winnier et al. 1995; Zhang und Bradley 1996]. BMP-7 Nullmäuse

überlebten bis kurze Zeit nach der Geburt und zeigten nur schwache Abnormalitäten das Extremitätenskelett betreffend, jedoch Augen- und Nierenfehlbildungen [Dudley et al. 1995, Luo et al. 1995]. Nach Deletion des Gens für BMP-5 konnte eine sog. „short ear mouse“ beobachtet werden, was auf eine Reduktion der Knorpelbildungsrate zurückzuführen war. Diese Tiere waren jedoch lebensfähig und fruchtbar [Kingsley et al. 1992]. Ein bei der Geburt normales Skelett wiesen BMP-6 Nullmäuse auf, was ein Zeichen dafür ist, dass BMP-6 keinen Einfluss auf die enchondrale Ossifikation hat [Solloway et al. 1998]. Daraus lässt sich also folgern, dass BMPs eine zentrale Rolle bei Differenzierungsvorgängen in verschiedenen Abschnitten der Entwicklung eines Organismus übernehmen.

Wie wirkt aber nun ein BMP speziell auf die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen? Im Detail sind diese Mechanismen bis heute nicht bekannt und es bedarf weiterer Forschung. Man weiß bereits, dass BMPs und Faktoren der FGF- und TGF- $\beta$ -Familie von Osteoblasten sezerniert werden und als exogene Faktoren Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen haben [Ducy et al. 1997]. BMPs induzieren die Bildung von Knochengewebe durch enchondrale Ossifikation. Primär entsteht knorpeliges Gewebe, welches im weiteren Verlauf kalzifiziert und zu Knochengewebe umstrukturiert wird [Hogan 1996, Wozney et al. 1998, Gitelman et al. 1994]. Im Gegensatz zur regulierenden und proliferationsfördernden Wirkung verschiedener Mitogene, wie z. B. IGF-1 und IGF-2, TGFs, PDGFs und FGFs, verfügen BMPs über osteoinduktive Eigenschaften. Somit können sie eine Knochenneubildung (de novo Osteoinduktion) sogar in Gewebe induzieren, das normalerweise nicht ossifiziert [Lecoeur und Ouhayoun 1997]. Die Untersuchungen wurden mit rekombinanten BMPs durchgeführt. BMP-2, BMP-4, BMP-7 und BMP-9 konnten als hochpotente knocheninduktive Substanzen identifiziert werden [Kübler 2002, Wozney et al. 1988]. Kübler 2002: „Bisher konnte die Osteoinduktivität für die Proteine von BMP-2 bis BMP-7 nachgewiesen werden, wobei die Bedeutung der einzelnen Vertreter variiert.“ Marker-Gene wie Osteopontin, Osteokalzin, Typ-I-Kollagen und die Alkalische Phosphatase werden u. a. nach

BMP-induzierter Osteogenese exprimiert. Die Untersuchung der Genexpression konzentrierte sich in dieser Arbeit neben den Transkriptionsfaktoren Runx2 und Osterix vor allem auf die o. g. Gene.

### 1.4.2 Signalübertragung

Im Grunde verläuft die Signalübertragung der BMPs genau wie jede andere Signalübertragung einer Zelle ab. Ein Protein bindet an einen spezifischen Rezeptor der Zellmembran. Dieser löst dadurch eine intrazelluläre Kaskade von Reaktionen aus, die schlussendlich spezifische Gene aktiviert und somit z. B. eine bestimmte Proteinsynthese induziert. Ein Schema zur Signaltransduktion zeigt Abb. 5.

Die BMP-Rezeptoren gehören der Gruppe der transmembranären Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren an. Man unterscheidet zwischen zwei Grundtypen: den Typ I und den Typ II Rezeptoren [Yamashita et al. 1996, Kawabata et al. 1998]. Diese werden weiter in je 3 Subtypen unterteilt, die ein oder mehrere BMPs binden können. Bezeichnet werden sie als BMPR-IA, BMPR-IB und ActR-I (ALK-2) (Typ I Rezeptor) bzw. BMPR-II, ActR-II und ActR-IIB (Typ II Rezeptor). Während BMP-4 ausschliesslich mit den Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB eine Bindung eingehen kann, ist BMP-2 in der Lage zusätzlich den Typ I Rezeptor ActR-I zu nutzen [ten Dijke et al. 1994, Koenig et al. 1994]. Für alle 3 Subtypen der Typ II Rezeptoren kommt BMP-2 als Ligand in Frage; BMP-4 hingegen nur bei Typ II Rezeptor BMPR-II [Liu et al. 1995, Nohno et al. 1995, Rosenzweig et al. 1995, Hoodless et al. 1996]. Das Bestreben der BMPs an einen der Rezeptoren zu binden wird sowohl von der Zellart als auch von der Rezeptordichte beeinflusst [ten Dijke et al. 1994, Yamashita et al. 1996]. Für eine erfolgreiche Signalübertragung ist sowohl ein Typ I Rezeptor als auch ein Typ II Rezeptor erforderlich [Liu et al. 1995]. Nach Binden des BMP an einen Typ II Rezeptor wird der Typ I Rezeptor durch Phosphorylierung aktiviert, was wiederum zur Aktivierung der R-Smads (Receptor regulated small mothers against decapentaplegic 1, 5 und 8) führt.

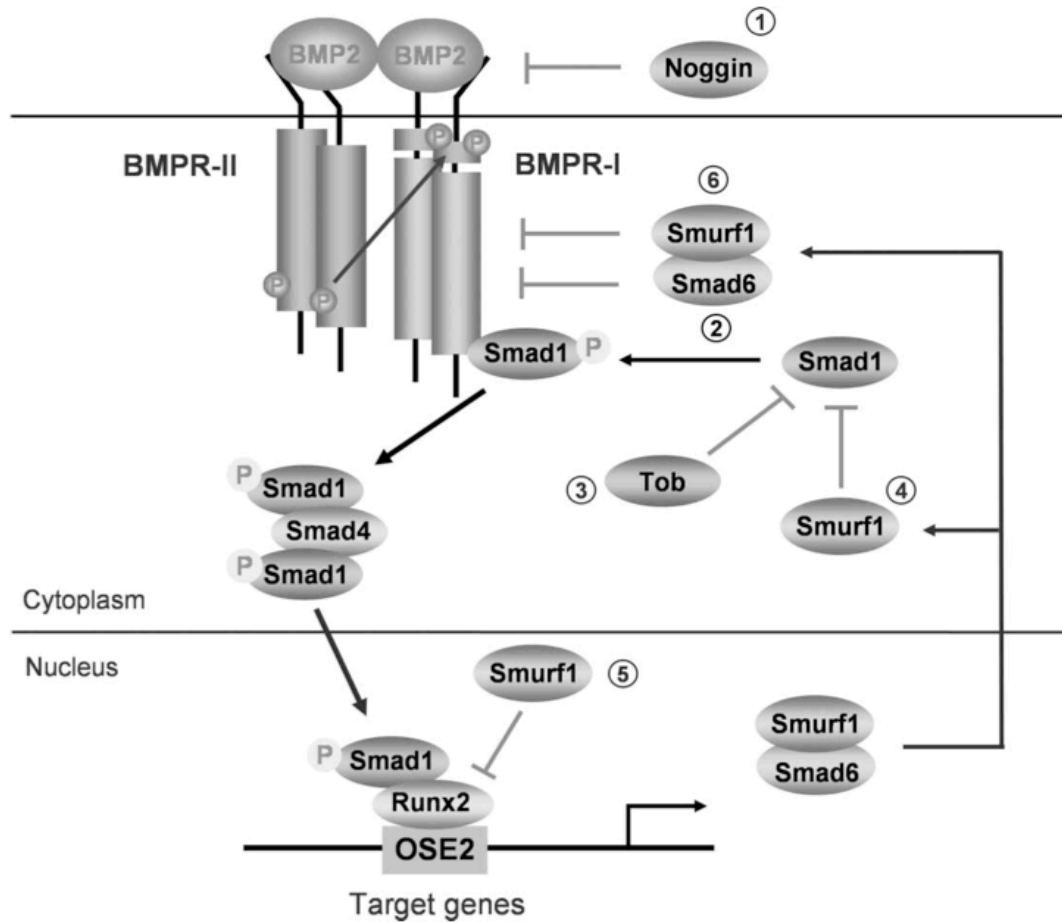


Abb. 5 Schema der BMP-Signaltransduktion:

- 1) Noggin bindet an BMPs und antagonisiert bereits extrazellulär die Signalkaskade
- 2) Smad6 bindet an den BMPR-I-Rezeptor und verhindert somit die Aktivierung von Smad1.
- 3) Tob interagiert mit BMP-aktivierten Smad Proteinen und antagonisiert die Signaltransduktion intrazellulär.
- 4) Smurf1 interagiert mit Smad1 und Smad5 und vermittelt deren Abbau.
- 5) Smurf1 vermittelt ebenso den Abbau von Runx2 im Nukleus.
- 6) Smurf1 kann mit Smad6 einen Komplex eingehen und im Zytoplasma den BMPR-I degenerieren.

[Quelle: Chen et al. 2004]



Die nun durch die Rezeptor-Kinase phosphorylierten R-Smads binden an die C-Smads (Smad 4), wodurch sie als Komplex in den Zellkern translozieren und mit Hilfe von Koaktivatoren an bestimmte Gene binden können. Auf diese Weise sind sie als Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Expression verschiedener Gene beteiligt [Heldin et al. 1997, Miyazono et al. 2001, Yamamoto et al. 1997]. Die intrazelluläre Weiterleitung des Signals unterliegt weiteren Mechanismen. Sogenannte i-Smads (inhibitorische Smads: Smad 6 und Smad 7) können an phosphorylierte R-Smads binden und somit die Weiterleitung in den Zellkern verhindern [Yamaguchi et al. 2000, Sakou et al. 1999, Imamura et al. 1997, Nakao et al. 1997]. Im Zellkern selbst existieren Korepressoren, die die Bindung des Smad-Komplexes an ein Gen blockieren können. Extrazellulär gibt es weitere Moleküle die mit unterschiedlich hoher Affinität an BMPs binden können und somit eine Rezeptorbindung bzw. eine Wirkung inhibieren. Zu den BMP-Antagonisten gehören Noggin, Chordin, Sclerostin, Follistatin und die Mitglieder der DAN-Familie. Im Gegensatz dazu kann die Wirksamkeit der BMPs wiederum gesteigert werden, indem extrazelluläre Matrixbestandteile wie Heparansulfat oder Kollagen IV das BMP stabilisieren bzw. das Wegdiffundieren in umliegendes Gewebe verzögern [Balemans und van Hul 2002, Hsu et al. 1998, Kusu et al. 2003, Winkler et al. 2004, Zimmerman et al. 1996, Piccolo et al. 1996, Iemura et al. 1998].

Die Wirkungen, die durch das BMP-vermittelte Signal induziert werden, führen letztlich zur Differenzierung von Osteoprogenitorzellen oder mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten und damit zur Bildung von Knochengewebe.

## 1.5 Fragestellung

Um Knochendefekte in allen Bereichen des menschlichen Organismus und der Medizin zu rekonstruieren, ist bis heute das autologe Knochentransplantat das Mittel der Wahl. Im Gegensatz zu alloplastischen und xenogenen Materialien ruft patienteneigener Knochen nie immunologische Reaktionen hervor und enthält in seiner Matrix regenerationsfördernde Substanzen, die ein schnelles Einheilen unterstützen. Leider birgt die Knochenregeneration mit autologen Transplantaten auch Probleme in sich. Zum einen kann nur eine begrenzte Menge an Knochen gewonnen werden und zum anderen kann die Morbidität der Entnahmestelle postoperative Schmerzen und Sensibilitätsstörungen mit sich bringen. Somit stellt das Knochen Tissue Engineering mit Hilfe von patienteneigenen mesenchymalen Stammzellen eine ernstzunehmende Methode zur Knochenregeneration dar. Dies erfordert jedoch, dass verschiedenen Stammzelltypen und deren Differenzierungswege eingehend untersucht, charakterisiert und verstanden werden, um den Erfolg von Tissue Engineering Applikationen zu verbessern.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Zellen aus der Kambium-Schicht des Periosts Stammzeleigenschaften besitzen. Es gibt Vorteile, die die Verwendung periostaler Stammzellen gegenüber Stammzellen aus dem Knochenmark favorisieren. Da MSCs im Knochenmark nur zu einem geringen Prozentsatz vorhanden sind, ist ein großes Entnahmevolumen nötig, um ausreichend MSCs zu gewinnen. Im Gegensatz dazu ist die Zellausbeute schon bei einem kleinen Gewebestück Periost ausreichend, um die Zellen erfolgreich kultivieren und differenzieren zu können. Des Weiteren ist die operative Entnahme eines periostalen Gewebestücks ein weitaus kleinerer Eingriff mit geringen Risiken für den Patienten als die für die Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark notwendige Knochenmarkspunktion. Zudem besteht die Möglichkeit eine notwendige Operation mit der Entnahme eines Perioststücks zu kombinieren, was nicht nur ein Vorteil für den Patienten darstellt, sondern auch heutzutage immer wichtiger werdenden betriebswirtschaftlichen Anforderungen genügt.

---

Ein weiteres Problem zeigt sich bei der Kultivierung der Zellen. Je länger Zellen in vitro kultiviert werden, desto mehr verändern sich ihre ursprünglichen Eigenschaften. Es stellt sich nun die Frage, wie man die Zeit, die die Zellen in vitro verbringen, verkürzen kann. Also müssen wir uns fragen, wie und ob die osteogene Differenzierung der periostalen Stammzellen beschleunigt oder verbessert werden kann. Da nachgewiesen wurde, dass BMP-2 und BMP-4 wichtige Regulatoren und Faktoren während der Frakturheilung darstellen [Bostrom et al. 1995, Nakase et al. 1994], haben wir uns dazu entschieden, diese vergleichend einzusetzen. Ziel der Arbeit war es nun zu eruieren, welche Wirkung BMP-2 und BMP-4 auf die Genexpression periostaler Zellen während der osteogenen Differenzierung bezüglich der osteogenen Marker haben, und ob es diesbezüglich bzw. bezüglich der Kalzifizierung Unterschiede zwischen der BMP-2- und BMP-4-Induktion gibt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

Zum Spenden des Periostgewebes wurden geeignete Patienten vor einer Operation in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgischen Abteilung der BG-Unfallklinik Tübingen über die Entnahme eines ca. 1 cm<sup>2</sup> großen Perioststückes aufgeklärt. Hierfür lag ein Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen (Nr. 1671-0-0) vor. Je nach Lokalisation der Operation stammte das Periostgewebe von verschiedenen Teilen des Gesichtsschädels. Nach der vorsichtigen Präparation mit Skalpell und Raspatorium wurde das Gewebestück zum Transport in ein dicht verschließbares und mit physiologischer Kochsalzlösung gefülltes Behältnis gegeben.

Unter sterilen Bedingungen des molekularbiologischen Labors (Sterilbank, Firma BDK Luftraum-Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, Germany) wurde das frisch gewonnene Periostgewebe aufgearbeitet. Hierzu wurde es in eine sterile Petrischale überführt und mit 1 ml PBS (Phosphate Buffered Saline (140 mM NaCl; 27 mM KCl; 7,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 14,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,0095 M (PO<sub>4</sub>); Firma BioWhittaker, USA) zum Schutz vor Austrocknung versehen. Nun wurde das Gewebestück mit sterilen Einmalskalpellen (Firma Martin, Tuttlingen, Germany) mechanisch zerkleinert, in ein 50 ml Röhrchen pipettiert und bei 1400 rpm abzentrifugiert (Zentrifuge 5804 R, Firma Eppendorf, Hamburg, Germany). Jetzt folgte der Vorverdau des Periostgewebes, wozu es mit 2 ml Dispase II (2,4 U/ml, Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany) und 2 ml Collagenase (1500 U/ml, Firma Sigma, Steinheim, Germany) bei 37°C für 30 Minuten im Wasserbad (Firma Memmert, Schwabach, Germany) inkubiert wurde. Danach wurde der Gewebebrei erneut abzentrifugiert und es folgte der Hauptverdau, bei dem das Gewebe mit 4 ml Collagenase für 90 Minuten bei 37°C inkubiert wurde. Nach wiederholtem Abzentrifugieren wurde das Pellet in DMEM-Normalmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt, um es im Brutschrank (Firma Haereus Typ Hera Cell 150, Hanau, Germany) unter Standardbedingungen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> zu kultivieren. Das DMEM-Normalmedium bzw. Kontrollmedium setzte sich immer aus 440 ml DMEM (In-

vitrogen-Bio-Source Europe, Nivelles, Belgium), 50 ml FCS (fötales Kälberse- rum, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 5 ml Penicillin-Streptomycin (Cambrex, Walkersville, USA) und 5 ml Fungizone (Biochrom AG, Berlin, Ger- many) zusammen.

Die nun gewonnen Zellen wurden zweimal pro Woche einem Mediumwechsel unterzogen und bei Bedarf 1:2 umgesetzt. Hierzu wurden sie nach dem Wa- schen mit PBS durch die Zugabe von 0,05 %-igem Trypsin (3 ml Trypsin (200 mg/l Versene (EDTA), 500 mg/l Trypsin 1:250), Cambrex, Walkersville, USA) vom Boden der Kulturflasche abgelöst, bei 1400 rpm abzentrifugiert und ent- sprechend auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

Um die Zellen für einen längeren Zeitraum aufzubewahren, wurden sie in Flüs- sigstickstoff kryokonserviert. Hierzu wurde ein Medium verwendet, das zu 70 % aus DMEM-Normalmedium, 20 % FCS und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid, Fir- ma Sigma, Steinheim, Germany) bestand. Nachdem die Zellen wie gewohnt mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und bei 1400 rpm abzentrifugiert worden waren, wurden sie mit dem oben beschriebenen Medium resuspendiert und zu glei- chen Teilen von ca. 1,8 ml auf Kryoröhrchen aufgeteilt. Dabei entsprach die Zellmenge einer Kulturflasche derer eines Kryoröhrchens. Das nun mit Zellsus- pension befüllte Kryoröhrchen wurde für 2 Stunden bei -20°C, für 24- 72 Stunden bei -70°C aufbewahrt und danach in Flüssigstickstoff überführt.

#### *Induktion der osteogenen Differenzierung*

Für die Induktionsversuche wurden Periostzellen der fünften bis zur siebten Passage verwendet. Um die Differenzierung der Periostzellen zu knochenbil- denden Zellen einzuleiten, wurden 3 Medien verwendet. Das sogenannte OB- Medium (Osteoblastenmedium) bestand aus der benötigten Menge DMEM- Normalmedium, 100 µl L-Ascorbinsäure-2-phosphat (100 µM, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) pro 100 ml OB-Medium, 1000 µl β-Glycerophosphat (10mM, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) pro 100 ml OB-Medium und 40 µl Dexamethason (4 µM, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) pro 100 ml OB- Medium. Zum direkten Vergleich der Wirkung von BMP-2 und BMP-4 wurden zwei weitere Medien verwendet. Zum einen das sogenannte OB/BMP-2-

Medium, welches sich aus der benötigten Menge an OB-Medium und 100  $\mu$ l BMP-2 (100 ng/ml, Cell Systems, St Katharinen, Germany) pro 100 ml OB/BMP-2-Medium zusammensetzte, und zum anderen das sogenannte OB/BMP-4-Medium, das sich entsprechend aus der benötigten Menge an OB-Medium und 87  $\mu$ l BMP-4 (50 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA) pro 100 ml OB/BMP-4-Medium ergab. Als Kontrollmedium diente immer das DMEM-Normalmedium ohne osteogenen Substanzen.

Für die Versuchsansätze wurden die Zellen nach kurzem Waschen mit PBS abtrypsiniert, bei 1400 rpm abzentrifugiert und mit DMEM-Normalmedium resuspendiert, um das verwendete Trypsin zu deaktivieren. Für die Zellzählung wurde die Trypanblau-Färbung verwendet. Dieser Farbstoff färbt die abgestorbenen Zellen, deren Zellmembran beschädigt und dadurch porös ist. Anschließend konnte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop (Firma Hund, Wetzlar, Germany) die absolute Zellzahl ermittelt und die entsprechende Zelldichte ausgesät werden. Es kamen 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen, 96-, 24- und 6-Well Platten zur Verwendung. Die Zellkulturflaschen bzw. -Platten wurden also mit der entsprechenden Menge an Zellsuspension versehen und mit DMEM-Normalmedium auf 10 ml (für Zellkulturflaschen), auf 2 ml (für 6-Well Platten) und auf 1 ml (für 24-Well Platten) aufgefüllt. Die 96-Well Platte kam nur bei der Bestimmung der Proliferation zu Anwendung und wird deshalb erst später näher erläutert. 24 Stunden nach der Aussaat fand die Induktion, welche dem Tag 0 der Differenzierung entspricht, statt. Hierzu wurde das DMEM-Normalmedium abgesaugt und die Zellkulturflaschen bzw. -Platten mit Kontroll-, OB-, OB/BMP-2- bzw. OB/BMP-4-Medium versehen. Der Beobachtungs- und Untersuchungszeitraum der Differenzierung endete mit dem Tag 21. Die Zeitpunkte der Untersuchungen werden bei den verschiedenen Verfahren erläutert.

## **2.2 Histologisch-chemische Färbungen**

Die Versuchsansätze für die histologisch-chemischen Färbungen wurden in 6-Well Platten vorgenommen, wovon 4 Wells mit je 40.000 Zellen beimpft wurden. Untersuchungszeitpunkte waren Tag 5, Tag 10 und Tag 20 für den Alkalische-

Phosphatase-Nachweis und lediglich Tag 20 für die Alizarin- bzw. von Kossa Färbung, da zu früheren Zeitpunkten (Tag 5, Tag 10) keine Kalzifizierung sichtbar wurde. Alle Färbungen wurden bei Raumtemperatur und unsterilen Bedingungen durchgeführt.

### **2.2.1 Alkalische-Phosphatase-Nachweis**

Die alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das u. a. am Knochenstoffwechsel beteiligt ist und einen frühen Marker der Osteogenese darstellt. Die Aktivität dieses Enzyms ist bei osteogen differenzierten mesenchymalen Stammzellen im Gegensatz zu unbehandelten mesenchymalen Stammzellen deutlich erhöht. Das Prinzip der Färbung beruht darauf, dass die Alkalische Phosphatase das Naphthol AS-MX von dem Substrat Naphthol AS-MX Phosphat abspaltet, welches sich mit einem Diazoniumsalz (Fast Violet B Salt) verbindet und an Stellen hoher Aktivität der Alkalischen Phosphatase als unlösliches Pigment ausfällt. Es wurde das Alkalische Phosphatase-Kit der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) verwendet.

Zunächst wurden die Fixierlösung und die Färbelösung hergestellt. Um die Fixierlösung herzustellen wurden 2 Volumina der 2 %igen Zitratlösung (2 ml Zitratkonzentratlösung und 100 ml Aqua dest.) mit 3 Volumina Azeton verdünnt. Für die Färbelösung wurde der Inhalt einer Fast Violet B Kapsel in 18 ml Aqua dest. aufgelöst und mit 0,75 ml Naphthol AS-MX Phosphat Alkalilösung gemischt. Nun wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und für 30 Sekunden mit Fixierlösung (1 ml pro Well) versehen. Nach dem Waschen mit Aqua dest. (45 Sekunden) wurden die Zellen mit der Färbelösung für 30 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Darauf folgte nochmals eine gründliche Waschung mit Aqua dest. (2 Minuten) und die Färbung der Zellkerne mit Mayer's Hämatoxylin-Lösung (1 ml pro Well) für 10 Minuten. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit Leitungswasser gewaschen und unter dem Mikroskop fotografiert. Bereiche mit hoher Alkalischer Phosphatase Aktivität stellten sich rot, die Zellkerne blau dar.

## **2.2.2 Qualitative Bestimmung der Kalziumphosphat-Präzipitate**

Die Von Kossa sowie die Alizarin Färbung sind Standardverfahren, die die Kalziumphosphatablagerungen osteogen differenzierter mesenchymaler Stammzellen einfärben und diese somit qualitativ nachweisen können.

### **2.2.2.1 Alizarin Färbung**

Die einzelnen Reagenzien wurden in einer Menge von ca. 2 ml pro Well verwendet. Zunächst wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Tris-HCl (1:1 mit NaCl verdünnt) versehen. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen mit Methanol für 2 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Nach vorsichtigem Abpipettieren des Methanols, 5 Minuten Lufttrocknen und 2 Minuten Waschen mit Ampuwa-Wasser, wurden die Zellen mit 1,37 %-igem Alizarinrot S (pH 4) für 20 Minuten inkubiert. Nun folgte ein 5-minütiger Waschgang mit 4 ml destilliertem Wasser, eine 15-minütige Inkubation mit PBS und erneutes Fixieren mit Ethanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 2 Minuten. Anschliessend ließ man die Zellen lufttrocknen und es folgte die fotografische Dokumentation.

### **2.2.2.2 Von Kossa Färbung**

Ebenso wie bei der Alizarin-Färbung kamen die einzelnen Reagenzien in einer Menge von ca. 2 ml pro Well zu Verwendung. Nach dem Absaugen des Mediums und dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Ethanol abs. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten fixiert. Danach folgten 2 Waschgänge mit destilliertem Wasser. Unter Lichtausschluss wurden die Zellen dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5 %-iger Silbernitratlösung inkubiert. Nach wiederholtem zweimaligen Waschen mit destilliertem Wasser erfolgte die Zugabe einer Natrium-Carbonat-Lösung (bestehend aus 5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gelöst in 75 ml Wasser und 25 ml 36%-iger Formaldehydlösung), die nach 2 Minuten wieder abgesaugt wurde. Nach einem erneuten Waschschrift schloss sich eine zweiminütige Inkubation mit Natrium-Thiosulfat (5 g Na-Thiosulfat gelöst in 100 ml Wasser) an. Nun wurde nochmals zweimal ausgiebig mit destilliertem Wasser gespült, die Zellkerne mit Eosin für



3 Minuten gegengefärbt, erneut zweimal mit destilliertem Wasser gespült und die Färbeergebnisse fotografisch dokumentiert.

### **2.3 Quantitative Bestimmung der Kalziumphosphat-Präzipitate**

Die Versuchsansätze für die quantitative Bestimmung der Kalziumphosphatpräzipitate wurden in 24- und in 6-Well Platten vorgenommen. 4 Wells der 6-Well Platten wurden hierbei wie bei den histologischen Färbungen mit je 40.000 Zellen und 12 (in Triplikaten) Wells der 24-Well Platten wurden entsprechend ihrer Fläche mit je 7900 Zellen versehen, wobei immer 3 Wells mit demselben Medium versehen wurden. Zeitpunkte der Untersuchung waren Tag 14, Tag 17 und Tag 21 der Osteogenese, da Kalziumablagerungen erst im späten Abschnitt der Differenzierung vorzufinden sind. Grundlage des Versuchs ist die Färbung der Kalziumphosphatpräzipitate mit Alizarin. Der nach erfolgter Färbung im Zellrasen enthaltene Farbstoff wird mit Essigsäure herausgelöst und mit Hilfe einer Standardreihe desselben Farbstoffes photometrisch quantifiziert. Auf diese Weise kann man Rückschlüsse auf den Kalziumgehalt und somit über den Grad der osteogenen Differenzierung der periostalen Stammzellen ziehen. Für diese Methode wurde das Osteogenesis Quantitation Kit (Firma Chemicon International Deutschland, Hofheim, Germany) verwendet. Beinhaltete Komponenten waren die Alizarin Rot S Lösung (40 mM), 10 %-ige Essigsäure, 10 %-iges Ammoniumhydroxid und 10X ARS Puffer.

Nach Entfernen des Mediums und dem Waschen mit PBS (1 ml pro Well der 24-Well Platte, 2 ml pro Well der 6-Well Platte) wurden die Zellen mit 4 %-igem Formaldehyd 15 Minuten lang bei Raumtemperatur fixiert. Nun folgte das vorsichtige Absaugen des Formaldehyds und dreimaliges Waschen für je 5 Minuten mit destilliertem Wasser (1 ml pro Well der 24-Well Platte, 2 ml pro Well der 6-Well Platte). Nach dem letzten Waschgang wurde das destillierte Wasser abgesaugt und die Zellen mit Alizarin Rot S Lösung (1 ml pro Well der 24-Well Platte, 1,5 ml pro Well der 6-Well Platte) für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die nun rot gefärbten Bereiche zeigten die Kalzi-

umphosphatpräzipitate. Daraufhin wurde die Lösung vorsichtig abpipettiert und die Zellen viermal für 5 Minuten mit destilliertem Wasser (1 ml pro Well der 24-Well Platte, 2 ml pro Well der 6-Well Platte) bei leichtem Schwenken auf einem Schüttler bei 100 rpm gewaschen.

Um die Quantifizierung durchführen zu können, musste der Alizarin Farbstoff herausgelöst werden. Hierzu wurde 10 %-ige Essigsäure (400  $\mu$ l pro Well der 24-Well Platte, 1.924  $\mu$ l pro Well der 6-Well Platte) dazugegeben und für 30 Minuten bei 180 rpm geschwenkt. Die jetzt nur noch leicht am Boden der Wells haftende Zellschicht konnte mit einem Zellschaber abgelöst und samt der Essigsäure in ein Eppendorf-Röhrchen überführt werden. Nach 30-sekündigem Mischen auf einem Vortexer, wurde der meist noch zusammenhängende Zellverband gelöst. Um den Farbstoff endgültig aus dem Zellverband zu lösen, wurde das Gemisch für 10 Minuten bei 85°C und 700 rpm inkubiert (Thermo Shaker, Firma Eppendorf, Hamburg, Germany). Nach dem Kühlen auf Eis für 5 Minuten wurden die Zellen für 15 Minuten bei 14.000 rpm abzentrifugiert.

In dieser Zeit wurde die Standardkurve vorbereitet. Hierzu wurde zunächst der im Kit enthaltene 10X ARS Puffer 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Dieser Puffer fungierte im Folgenden als Verdünnungsmedium. Zunächst wurde die Alizarin Rot S Lösung 1:20 verdünnt, um eine 2 mM Lösung zu erhalten. Ausgehend von dieser Konzentration wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe bis zu einem Bereich von ca. 0,98  $\mu$ M hergestellt. Die Standardreihe wurde je nach Farbintensität in einem niedrigen oder hohen Konzentrationsbereich gewählt.

Nach dem Abzentrifugieren wurde der den Farbstoff enthaltende Überstand in neue Eppendorf Gefäßen überführt und mit ca. 150  $\mu$ l bzw. ca. 722  $\mu$ l 10 %-igen Ammoniumhydroxid neutralisiert. Diese nun gewonnenen Samples wurden ebenso wie der Blank und die Standards auf dieselbe 96-Well Platte (2 Wells pro Sample, 150  $\mu$ l pro Well) überführt. Mit Hilfe des Elisa-Readers (Modell ELX 800, Firma BioTek, Bad Friedrichshall, Germany) wurden die Extinktionen bei einer Wellenlänge von  $\lambda=405$  nm gelesen und anhand der Standardkurve von der KC4-Software in Konzentrationen umgerechnet. Die somit erhaltenen Werte wurden in eine Excel-Tabelle überführt und gespeichert.

## 2.4 Proliferationstest

Für den Proliferationstest wurden die Zellen zunächst in 6-Well Platten ausgesät. Ein Tag vor der Messung der Proliferation (an Tag 4, 9 und 19) wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 3000 Zellen pro Well in eine 96-Well Platte umgesetzt. Zeitpunkte der Untersuchung waren Tag 5, Tag 10 und Tag 20 der Osteogenese. Zur Verwendung kam der Proliferationstest EZ4U (Firma Biozol, Eching, Deutschland). Diese Methode beruht darauf, dass vitale Zellen über vitale Mitochondrien verfügen, die in der Lage sind, die hinzugegebenen schwach gefärbten Tetrazoliumsalze aufzunehmen und in intensiv gefärbte Formazanderivate umzuwandeln. Das zur Reduktion der Tetrazoliumsalze benötigte intramitochondriale System wird wenige Minuten nach dem Zelltod ebenso inaktiv. Eine Verringerung der Reduktionsrate des Testsubstrates hat somit eine Abnahme der gemessenen Absorption zur Folge.

Am Tag der Messung (Tag 5, 10 und 20) wurde das Medium abgesaugt, 200 µl frisches Medium und 20 µl Substrat hinzupipettiert. Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda=450$  nm (mit einer Referenzwellenlänge von  $\lambda=630$  nm) gemessen. Gemessen wurden je 15 Wells pro Versuchsbedingung (KO, OB, OB/BMP-2 und OB/MP-4) und je 5 Wells mit DMEM-Normalmedium und OB-Medium (ohne Zellen) für den Blank. Die mit Hilfe der KC4-Software errechneten Mittelwerte (abzüglich der Blanks) wurden in eine Excel-Tabelle überführt und gespeichert.

## 2.5 Bestimmung der Genexpression

Der Versuchsansatz für die Bestimmung der Genexpression wurde in Zellkulturflaschen (je 1 Zellkulturflasche für KO-, OB-, OB/BMP-2-, OB/BMP-4-Medium) vorgenommen. Untersuchungszeitpunkte waren entsprechend den Färbungen und den Proliferationstests die Tage 5, 10 und 20. Für Tag 5 wurden  $1 \times 10^6$  Zellen, für Tag 10  $0,75 \times 10^6$  Zellen und für Tag 20  $0,5 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Die Extraktion der RNA fand unter unsterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur statt.

### 2.5.1 RNA Extraktion

Für die RNA-Extraktion kam das RNeasy Minikit (Firma Qiagen, Hilden, Germany) zum Einsatz. Nach Absaugen des Mediums und Zugabe von 10 ml PBS (pro Flasche) wurde der Zellrasen unter dauernder Eiskühlung mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Dem Abzentrifugieren der Zellen bei 1400 rpm und Entfernen des Überstandes schloss sich die Zellyse mit Hilfe von 350  $\mu$ l des gebrauchsfertigen RLT-Puffers (1 ml des im Kit enthaltenen RLT-Puffers wurde mit 10  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol versehen) an. Um die DNA/RNA auszufällen, wurden 350  $\mu$ l 70 %-iges Ethanol hinzugefügt und zum Homogenisieren dreimal mit einer Insulinspritze auf- und abpipettiert. Das Gesamtvolumen von 700  $\mu$ l wurde auf ein im Kit enthaltenes Säulchen pipettiert und bei 10.000 rpm für 15 Sekunden abzentrifugiert. Die ausgefällten Nukleinsäuren blieben in der Membran der Säule gebunden, der Durchfluss wurde verworfen. Zum Waschen der sich auf der Membran befindenden Nukleinsäuren wurde je Säule 350  $\mu$ l RW1-Puffer (gebrauchsfertig im Kit enthalten) zugegeben, wiederum bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun folgte die Elimination der DNA, indem 80  $\mu$ l einer gebrauchsfertigen DNase-Lösung (70  $\mu$ l RDD-Puffer + 10  $\mu$ l DNase-Stocklösung) hinzupipettiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach dieser Inkubation folgte ein weiterer Waschschrift mit 350  $\mu$ l RW1-Puffer und zwei Waschriffe mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer (im Kit enthaltener RPE-Puffer wurde mit 220 ml Ethanol absolut aufgefüllt). Nun schloss sich die Elution der RNA an, wobei die die RNA enthaltende Membran vorsichtig mit 40  $\mu$ l RNase-freiem Wasser (im Kit enthalten) überschichtet und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach dem Abzentrifugieren bei 10.000 rpm für 1 Minute, wurde die nun im Wasser gelöste RNA in ein frisches Eppendorf-Röhrchen abgefangen und bei -70°C gelagert.

## 2.5.2 c-DNA Synthese

Um die RNA in c-DNA umschreiben zu können, musste zunächst die RNA-Konzentration mit Hilfe eines Photometers (GeneQuant, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Great Britain) ermittelt werden. Grundlegend hierfür ist die Tatsache, dass RNA ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm zeigt. Die Extinktion wird ebenso bei  $\lambda=280$  nm gemessen, um den Proteinanteil zu bestimmen. Der Quotient dieser beiden Werte (260/280) sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen; unter 1,5 liegt eine Kontamination mit Proteinen, über 2,0 mit Salzen vor. Somit dient dieser Quotient als Maß für die Reinheit der RNA-Probe. Die RNA-Konzentration wird ermittelt, indem das Produkt aus Extinktion, Verdünnung und Extinktionskoeffizient (für RNA=40) gebildet wird. Als Leerwert dient das Lösungsmittel (in unserem Fall Ampuwa-Wasser).

Für die c-DNA Synthese fand das Advantage RT-for-PCR Kit der Firma Clontech (CA, USA) Verwendung. Dafür wurde die RNA-Probe 1:50 verdünnt (2  $\mu$ l der RNA-Probe + 98  $\mu$ l RNase-freies Wasser), in eine Küvette überführt und die RNA-Konzentration (in  $\mu$ g pro ml) photometrisch bestimmt. Die für 1  $\mu$ g RNA benötigte Menge wurde aus der RNA-Probe genommen, mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12,5  $\mu$ l aufgefüllt, mit 1  $\mu$ l Oligo-dT Primer versehen und für 2 Minuten bei 70°C im Thermo-Cycler (Firma PeqLab, Erlangen, Germany) inkubiert. Nach sofortigem Kühlen auf Eis für 2 Minuten wurden 6,5  $\mu$ l Mastermix, bestehend aus 4  $\mu$ l 5x Reaktionspuffer, 0,5  $\mu$ l rekombinanter RNase Inhibitor, 1  $\mu$ l dNTP-Mix und 1  $\mu$ l reverser Transkriptase hergestellt wurde (alles im Kit enthalten), zu den 13,5  $\mu$ l Gemisch aus RNA, RNase-freiem Wasser und Oligo-dT Primern hinzugegeben. Dieses Volumen von 20  $\mu$ l wurde nun für 1 Stunde bei 42°C inkubiert, danach für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und letztendlich auf 4-8°C gekühlt. Zum Schluss wurde die Probe mit 80  $\mu$ l RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 100  $\mu$ l aufgefüllt. Bis zur Durchführung der quantitativen PCR wurden die Proben bei -20°C gelagert.

### 2.5.3 Quantitative real-time Polymerase Ketten Reaktion

Mit Hilfe der Methode der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) kann DNA vervielfältigt werden, indem spezifische Primer an komplementäre Bereiche der DNA binden und somit den zu amplifizierenden Bereich der DNA flankieren. Die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte, thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) synthetisiert den neuen DNA-Strang dadurch, dass sie entsprechende Bausteine (Desoxynukleotid-triphosphate) einbaut. Die sich wiederholenden Zyklen einer PCR bestehen immer aus drei Schritten. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen denaturiert und somit in Einzelstränge aufgetrennt. Danach folgt die Hybridisierung der Primer (Primer Annealing) durch Senkung auf die für die jeweilige Primer-spezifische Temperatur. So können die Primer an komplementäre Stellen binden. Anschliessend füllt die Taq-Polymerase die neuen Stränge mit freien Nukleotiden auf, was als Elongation oder Verlängerung bezeichnet wird. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich somit die entstandene DNA, woraus ein exponentieller Anstieg der Ziel-DNA resultiert. Um einen quantitativen Nachweis erbringen zu können, wurde das LightCycler<sup>®</sup> 2.0 System (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) eingesetzt. Somit war es möglich Veränderungen der Genexpression der aus peristalen Stammzellen gewonnenen Zellkulturen exakt zu quantifizieren und darzustellen. Grundlegend für die Quantifizierung ist die Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I an doppelsträngige DNA. Die zunehmenden Fluoreszenzintensitäten spiegeln somit die aktuellen Mengen an doppelsträngiger DNA in den jeweiligen Proben. Am Ende jeder Elongationsphase wird die Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von  $\lambda=530$  nm gemessen und in einem Diagramm, in dem die Fluoreszenz gegen die Zyklen aufgetragen wird, dargestellt. Anhand dessen kann die Menge an PCR-Produkt zyklusweise verfolgt werden.

Für die einzelnen PCR Reaktionen wurde zu 14  $\mu$ l RNase-freiem Wasser 2  $\mu$ l c-DNA (generiert von 0,02  $\mu$ g RNA), 2  $\mu$ l Primermix (Search-LC, Heidelberg, Germany) und 2  $\mu$ l DNA Master Sybr Green I mix (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) hinzugegeben. Für alle untersuchten Zielgene wurden

spezifische Primer der Firma Search-LC (Heidelberg, Germany) verwendet, die speziell für den LightCycler entwickelt wurden. Die Amplifikation der Ziel-DNA erfolgte nach dem folgendem PCR-Protokoll: nach einem ersten 10-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C folgten 35-38 Zyklen, bei denen jeweils für 10 Sekunden auf 95°C erhitzt, dann für 10 Sekunden auf 68°C abgekühlt und für 16 Sekunden auf 72°C erhitzt wurde. Die Temperaturveränderungsrate betrug dabei 20°C pro Sekunde. Die Annealingtemperatur wurde von anfänglichen 68°C schrittweise (0,5°C pro Zyklus) auf 58°C gesenkt (Touch-down PCR). Die Analysen der Schmelzkurven von Primerdimeren bzw. spezifischen PCR Produkten erfolgten bei 95°C 10 Sekunden, 65°C 15 Sekunden, 95°C 10 Sekunden, die Temperatur-Veränderungsrate betrug 0,1°C pro Sekunde. Die amplifizierten PCR Produkte wurden anschließend im 1,5 %-igem Agarose-Gel aufgetrennt und auf die richtige Länge überprüft. Als externen Standard wurde ein Haushaltsgen, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), von dem angenommen wird, dass es in relativ konstanten Mengen exprimiert wird, gewählt. Die Kopienzahl des untersuchten Gens wurde auf die Kopienzahl des Haushaltsgens (GAPDH) bezogen, so dass die Quantifizierung als das Verhältnis Zielgen/Haushaltsgen ausgedrückt wurde. Für die Erstellung der Standardkurve dienten ebenfalls GAPDH-Standards (Search LC) mit bekannter Kopienzahl, aus denen man jeweils 3 Verdünnungsreihen herstellte (1:10 bis 1:1000).

Untersucht wurde die Genexpression der Alkalischen Phosphatase (AP), des Osterix Gens (OSX), des Runx2 Gens (Cbfa1), des Insulin like growth factor-2 (IGF-2), des Cartilage oligomeric matrix protein (COMP), des Osteopontin Gens (OPN), des Osteokalzin Gens (OC) und des Kollagen-I- $\alpha$ 1 Gens (Koll1 $\alpha$ 1).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Histologisch-chemische Färbungen

Mit Hilfe der histologisch-chemischen Färbungen war es möglich das Patientenmaterial zu strukturieren. Es wurde dahingehend unterschieden, ob unter den jeweiligen Bedingungen eine erfolgreiche osteogene Differenzierung der Periostzellen stattgefunden hat oder nicht. Hierzu diente der qualitative Nachweis von Kalziumphosphatablagerungen mittels der Von Kossa und Alizarin Färbung. Das untersuchte Patientenmaterial konnte somit in vier Gruppen unterteilt werden:

Gruppe A: Die Periostzellen sind unter OB, OB/BMP-2 und OB/BMP-4 Bedingungen kalzifiziert.

Gruppe B: Eine Kalzifizierung der Periostzellen konnte unter keiner der oben genannten Bedingungen nachgewiesen werden.

Gruppe C: Eine Kalzifizierung konnte nur unter Zugabe des OB-Mediums beobachtet werden.

Gruppe D: Eine Kalzifizierung der Periostzellen konnte nur unter der Zugabe des OB/BMP-2- und/oder des OB/BMP-4-Mediums nachgewiesen werden.

Dadurch dass Gruppe C nur das Material von zwei Patienten und Gruppe D eines Patienten umfasste, wurden ausschließlich die Gruppen A und B weiter untersucht. Als Beispiel für die Alizarin und Von Kossa Färbung der Gruppe A und B sollen die Abbildungen 6 und 7 dienen, auf denen jeweils die Proben eines repräsentativen Patienten dargestellt sind.





Abb. 6 Beispiel für eine Alizarin- (links) und eine Von Kossa Färbung (rechts) der Gruppe A. Die Zellen befanden sich hierbei in der sechsten Passage. Die Färbung wurde in einer 6-Well Platte an Tag 20 durchgeführt.

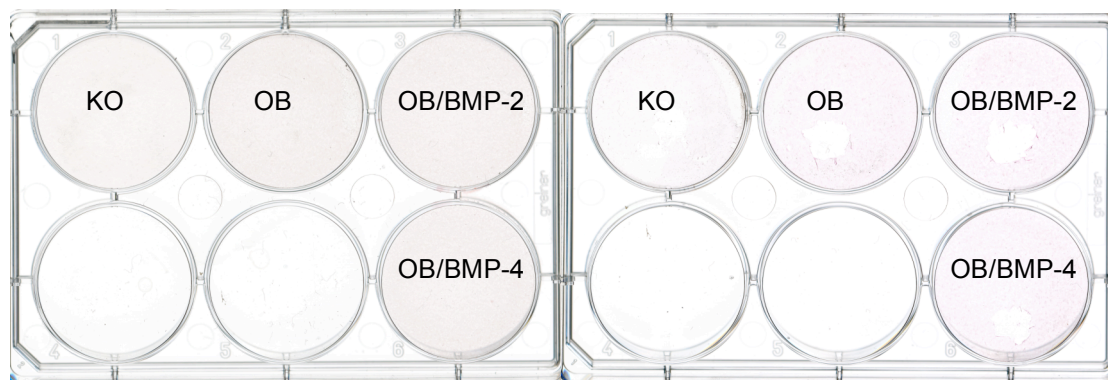


Abb. 7 Beispiel für eine Alizarin- (links) und eine Von Kossa Färbung (rechts) der Gruppe B. Die Zellen befanden sich hierbei in der sechsten Passage. Die Färbung wurde in einer 6-Well Platte an Tag 20 durchgeführt.

Bei der Alizarin Färbung färben sich die Kalziumphosphatpräzipitate rot, bei der Von Kossa Färbung entsprechend schwarz-braun. Dies zeigte sich deutlich bei den Patienten der Gruppe A (vgl. Abb. 6). Im Gegensatz dazu konnte bei dem Zellmaterial der Gruppe B eine deutlich negative Färbung beobachtet werden (vgl. Abb. 7). Bei Gruppe A waren rein makroskopisch keine die Intensität der Färbung betreffenden Unterschiede zwischen den Differenzierungsmedien (OB, OB/BMP-2, OB/BMP-4) zu erkennen.

In den Abbildungen 8 und 9 sind Aufnahmen der verschiedenen Proben des jeweils selben Beispielpatienten der Gruppe A und B in 4-facher Vergrößerung zu sehen. Der Zellrasen mit Zellen fibroblastärer Morphologie war deutlich zu erkennen. Mit Alizarin färbten sich die Kalziumphosphat-Präzipitate rot, bei der Von Kossa Färbung entsprechend schwarz-braun, wie oben bereits erwähnt.

Auf den Aufnahmen der Gruppe A (vgl. Abb. 8) waren gefärbte bzw. kalzifizierte Areale sehr gut bei den Proben zu erkennen, die mit OB-, OB/BMP-2- und OB/BMP-4-Medium behandelt worden waren. Ein qualitativer Unterschied zwischen diesen war jedoch kaum auszumachen. Bei allen drei Proben konnten Areale mit stärkerer und schwächerer Färbung und somit stärkerer oder schwächerer Kalzifizierung beobachtet werden.

Die Bilder für den Beispielpatienten der Gruppe B (Vgl. Abb. 9) zeigten keinerlei gefärbte Bereiche. Man sah aber entsprechend der Proben der Gruppe A einen Zellrasen mit Zellen fibroblastischer Morphologie. Lediglich bezüglich der Dichte des Zellrasens konnte man leichte Unterschiede erkennen. Bei den Proben, die mit OB-, OB/BMP-2- und OB/BMP-4-Medium behandelt worden waren, gab es einige dichter besiedelte und somit stärker proliferierende Bereiche als bei der entsprechenden unbehandelten Kontrolle.

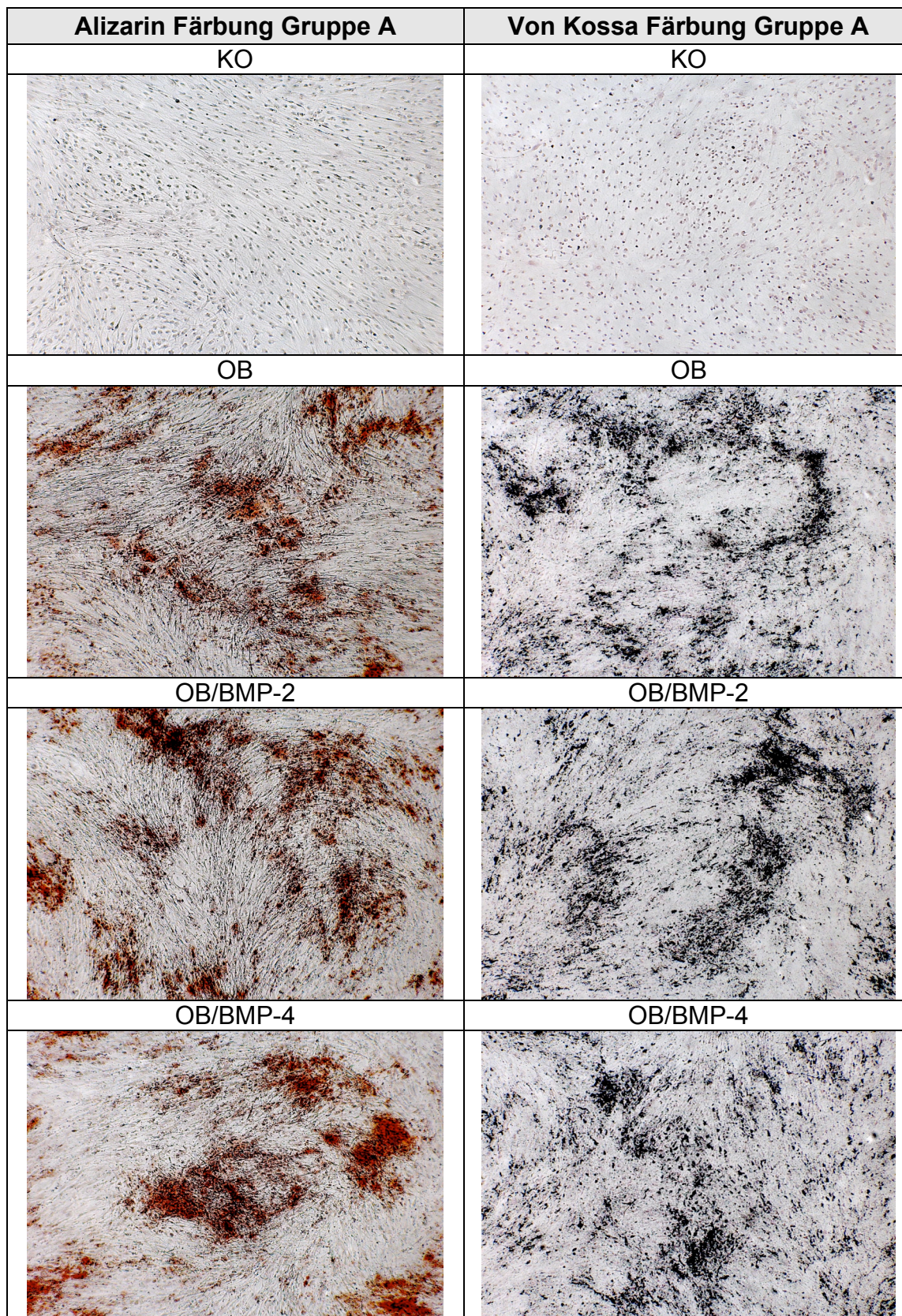


Abb. 8 Alizarin- und Von Kossa Färbung der Gruppe A an Tag 20. Darstellung in vierfacher Vergrößerung. Die Zellen befanden sich in der sechsten Passage.

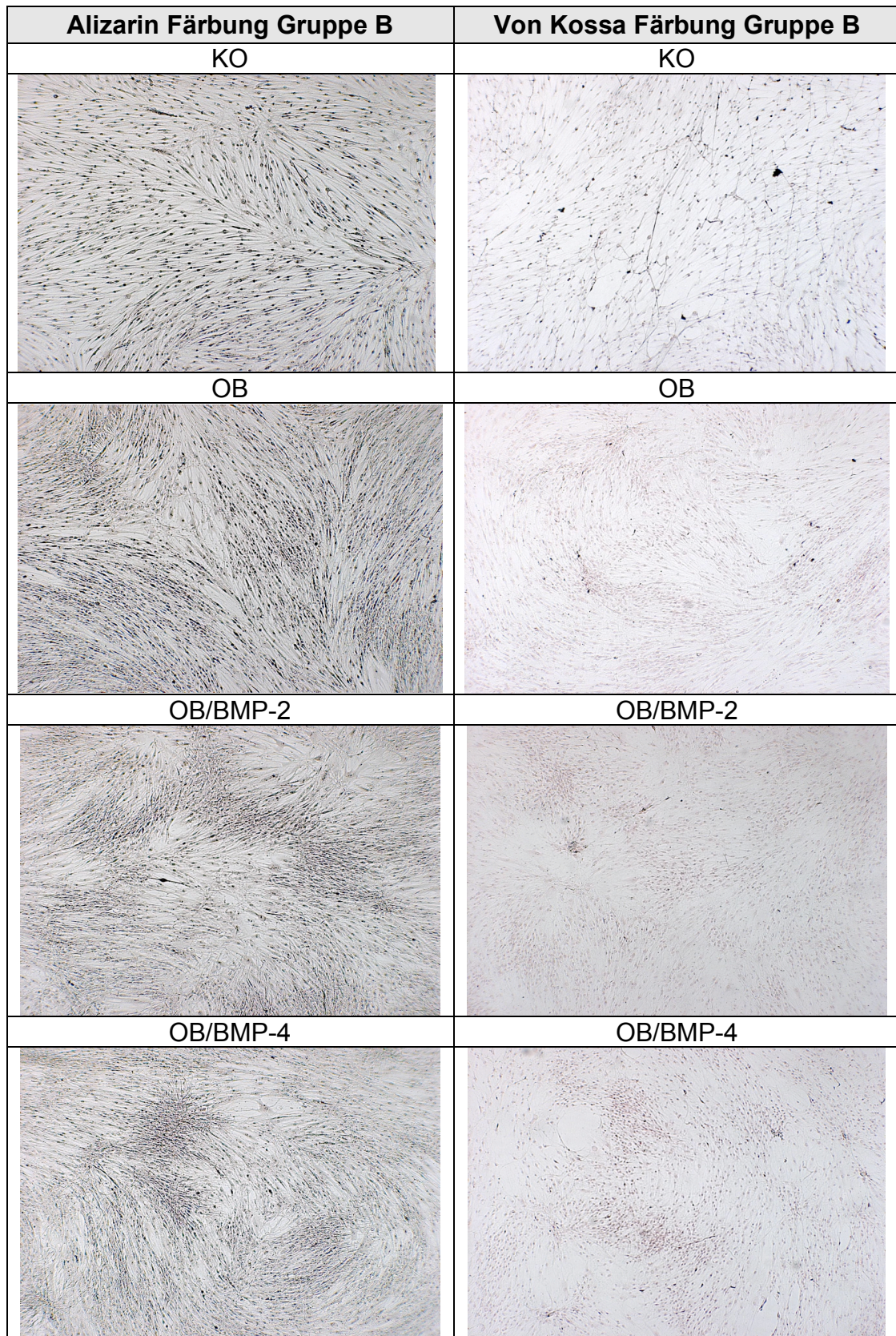


Abb. 9 Alizarin- und Von Kossa Färbung der Gruppe B an Tag 20. Darstellung in vierfacher Vergrößerung. Die Zellen befanden sich in der sechsten Passage.

Im Gegensatz zur Von Kossa und Alizarin Färbung, die ausschließlich an Tag 20 durchgeführt wurde, wurde der qualitative Nachweis der alkalischen Phosphatase zusätzlich an den Tagen 5 und 10 der Differenzierung mittels spezifischer Färbung durchgeführt. Somit konnte überprüft werden, wie sich die Aktivität bzw. die Expression der Alkalischen Phosphatase im Laufe der Differenzierung geändert hat. Die Abbildung 10 stellt eine Übersicht über die verschiedenen Aufnahmen nach erfolgter Färbung dar. Es handelt sich hier wieder um denselben Beispielpatienten der Gruppe A entsprechend der Abbildungen 6 und 8. Die Proben, die mit OB-, OB/BMP-2- und OB/BMP-4-Medium kultiviert wurden, zeigten im Gegensatz zur Kontrolle eine deutlich stärkere Färbung zu allen Zeitpunkten der Untersuchung. Ebenso konnte man eine Intensivierung der Färbung bei jeder Probe im Bezug auf den zeitlichen Verlauf von Tag 5 bis Tag 20 erkennen.

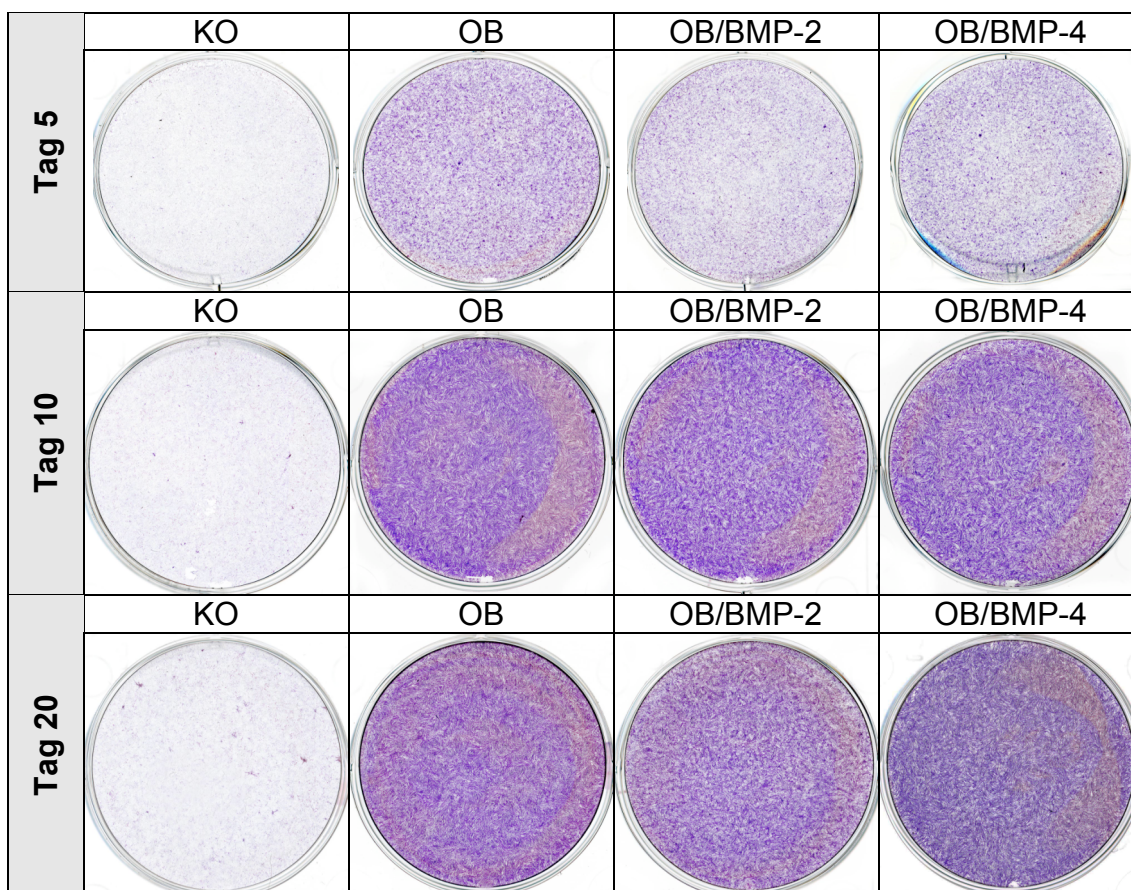


Abb. 10 Nachweis der Alkalischen Phosphatase in der Gruppe A. Die Zellen befanden sich in der sechsten Passage.

Die Färbung der alkalischen Phosphatase ist auch bei den Proben der Gruppe B zu sehen. Die Art und Weise der Färbung entspricht der der Gruppe A, nur deutlich weniger intensiv. Die Abbildung 11 zeigt hierzu die entsprechenden Aufnahmen. Als Beispielpatient diente wiederum derselbe wie auch schon bei den Abbildungen 7 und 9.

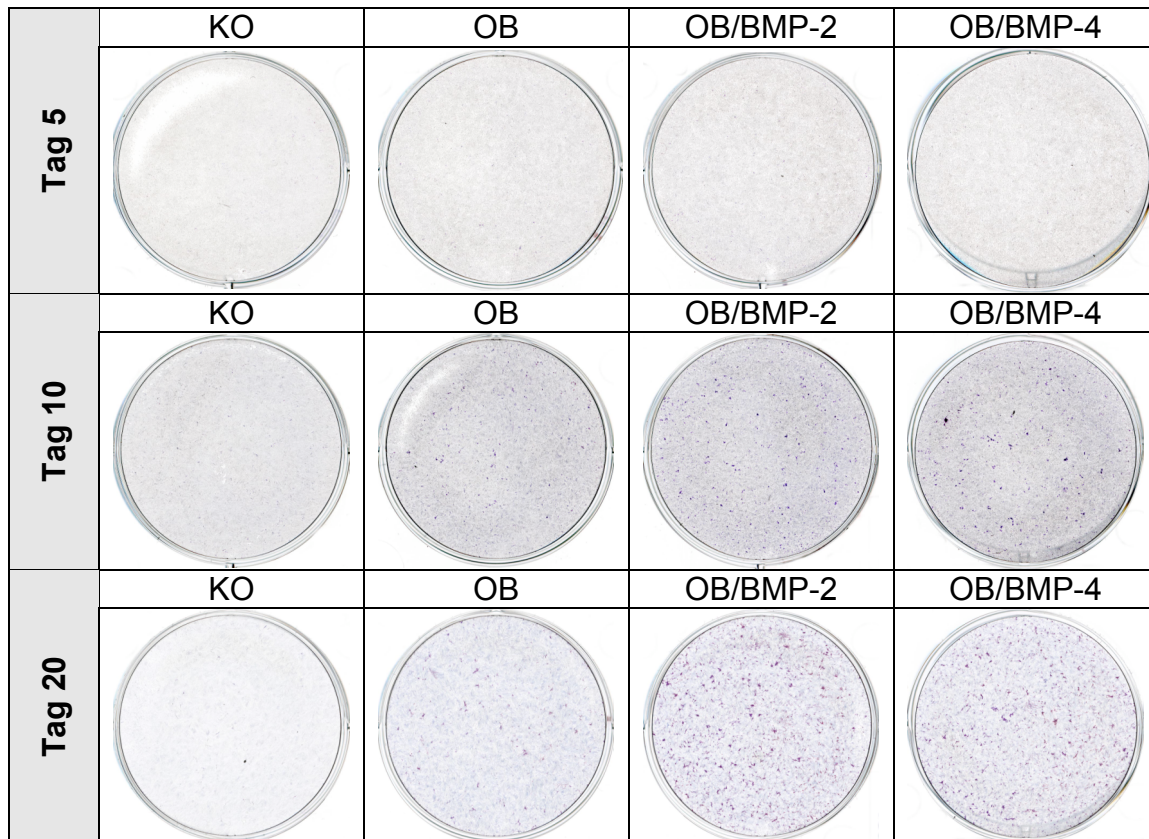


Abb. 11 Nachweis der Alkalischen Phosphatase in der Gruppe B. Die Zellen befanden sich in der sechsten Passage.

In der 4-fachen Vergrößerung (Abb.12) sieht man, dass sich Zellkerne und Zytoplasma blau, die Bereiche, in denen die Alkalische Phosphatase Aktivität nachweisbar war, rot färbten.

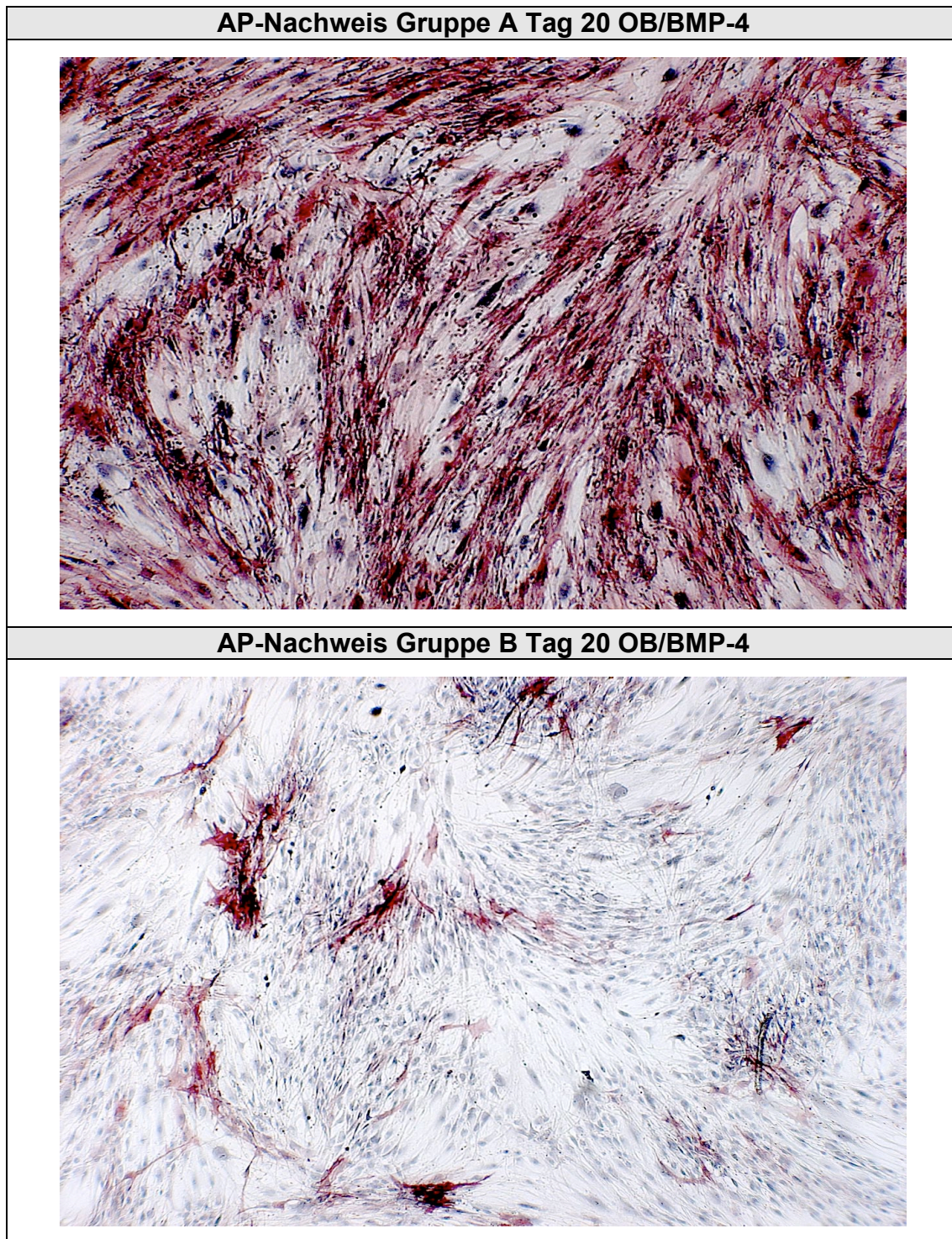


Abb. 12 Nachweis der Alkalischen Phosphatase bei 4-facher Vergrößerung. Der obere Ausschnitt zeigt eine Probe der Gruppe A am Tag 20 der Differenzierung unter Einfluss des OB/BMP-4-Mediums. Der untere Ausschnitt zeigt eine Probe der Gruppe B am Tag 20 der Differenzierung unter Einfluss des OB/BMP-4-Mediums.

### 3.2 Quantitative Bestimmung der Kalziumphosphat-Präzipitate

Für die quantitative Bestimmung des Kalziumphosphatgehaltes wurde das Patientenmaterial der Gruppen A und B vergleichend untersucht.

Zunächst wurde das Material der Gruppe B betrachtet. Da durch die Alizarin und Von Kossa Färbung bekannt war, dass die Zellen dieser Patientengruppe keine Kalziumphosphatpräzipitate bildeten, konnte man mit niedrigen Messwerten rechnen, die in diesem Fall nur die Hintergrundfärbung des Zellrasens widerspiegeln. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, zeigten die Zellen, die mit Ko-Medium behandelt wurden, nur sehr geringe Werte mit  $6,85 \pm 3,95 \mu\text{M}$  an Tag 14,  $7,11 \pm 3,18 \mu\text{M}$  an Tag 17 und  $8,66 \pm 6,38 \mu\text{M}$  an Tag 21. Die mit OB-Medium behandelten Proben wiesen Konzentrationen von  $13,56 \pm 6,73 \mu\text{M}$  an Tag 14,  $12,01 \pm 3,64 \mu\text{M}$  an Tag 17 und  $16,54 \pm 6,49 \mu\text{M}$  an Tag 21 auf, was näherungsweise eine Verdopplung der Werte im Vergleich zur Kontrolle bedeutet.

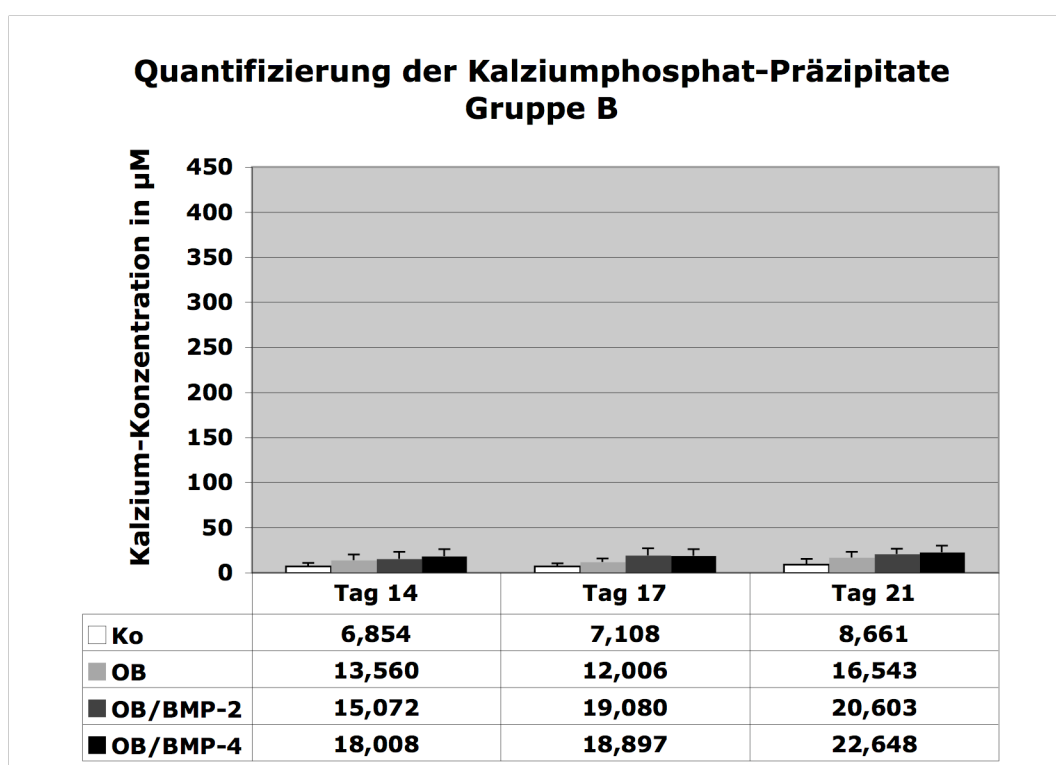


Abb. 13 Quantitativer Nachweis der Kalziumkonzentration der Gruppe B; n=5; 24-Well Platten



Die Zellen, die mit OB/BMP-2- bzw. OB/BMP-4-Medium versetzt wurden, zeigten Werte von  $15,07 \pm 7,99 \mu\text{M}$  bzw.  $18,01 \pm 7,83 \mu\text{M}$  an Tag 14,  $19,08 \pm 7,94 \mu\text{M}$  bzw.  $18,90 \pm 6,93 \mu\text{M}$  an Tag 17 und  $20,60 \pm 6,15 \mu\text{M}$  bzw.  $22,65 \pm 7,29 \mu\text{M}$  an Tag 21. Dies stellt bezogen auf die Kontrolle ungefähr eine Verdopplung bis Verdreifachung der Messwerte dar. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Zellen, die zusätzlich mit BMP-2 und BMP-4 behandelt wurden, war in der Gruppe B jedoch nicht zu beobachten.

Die Quantifizierung der Kalziumphosphatpräzipitate wurde für beide Zellgruppen wie in der Gebrauchsanleitung des Kits beschrieben, in 24-Well Platten durchgeführt. Leider zeigte sich, dass die Zellen der Gruppe A in den 24-Well Platten keine Kalziumphosphatpräzipitate hervorbrachten. Somit fiel auch die für dieses Verfahren benötigte Färbung mit Alizarin negativ aus. Da aber durch die Alizarin und Von Kossa Färbung, die im Rahmen der histologisch-chemischen Färbungen durchgeführt wurden, bereits bekannt war, dass das Patientenmaterial der Gruppe A unter den Induktionsbedingungen in der Lage war in vitro zu kalzifizieren, wurde bei diesen Proben die quantitative Bestimmung der Kalziumphosphatpräzipitate vergleichend in 24-Well und in 6-Well Platten durchgeführt.

Mit der Abbildung 14 und 15 wurden die gemessenen Konzentrationswerte der Proben der Gruppe A, die in 6-Well Platten kultiviert wurden (vgl. Abb. 15), denen, die in 24-Well Platten kultiviert wurden (vgl. Abb. 14), gegenübergestellt. Die Entwicklung der Messwerte für die Zellen in 6-Well Platten von Tag 14 bis Tag 21 ist deutlich erkennbar. Am Tag 21 der Differenzierung wurden in den 6-Well Platten Messergebnisse gefunden, die im Vergleich zu denen in den 24-Well Platten ca. sechsmal für OB-behandelte Zellen, achtmal für OB/BMP-2-behandelte Zellen und sogar fast zehnmal für OB/BMP-4-behandelte Zellen höher lagen.

Wie in Abbildung 14 zu sehen, zeigten die Zellen, die in 24-Well Platten untersucht wurden, keine wesentliche Entwicklung sowohl die zeitliche Achse als auch die verschiedenen Differenzierungsmedien betreffend. Die Werte der un-behandelten Kontrollzellen, wiesen mit  $11,26 \pm 3,55 \mu\text{M}$  an Tag 14,  $18,82 \pm 11,29 \mu\text{M}$  an Tag 17 und  $15,26 \pm 3,73 \mu\text{M}$  an Tag 21 einen relativ unregel-

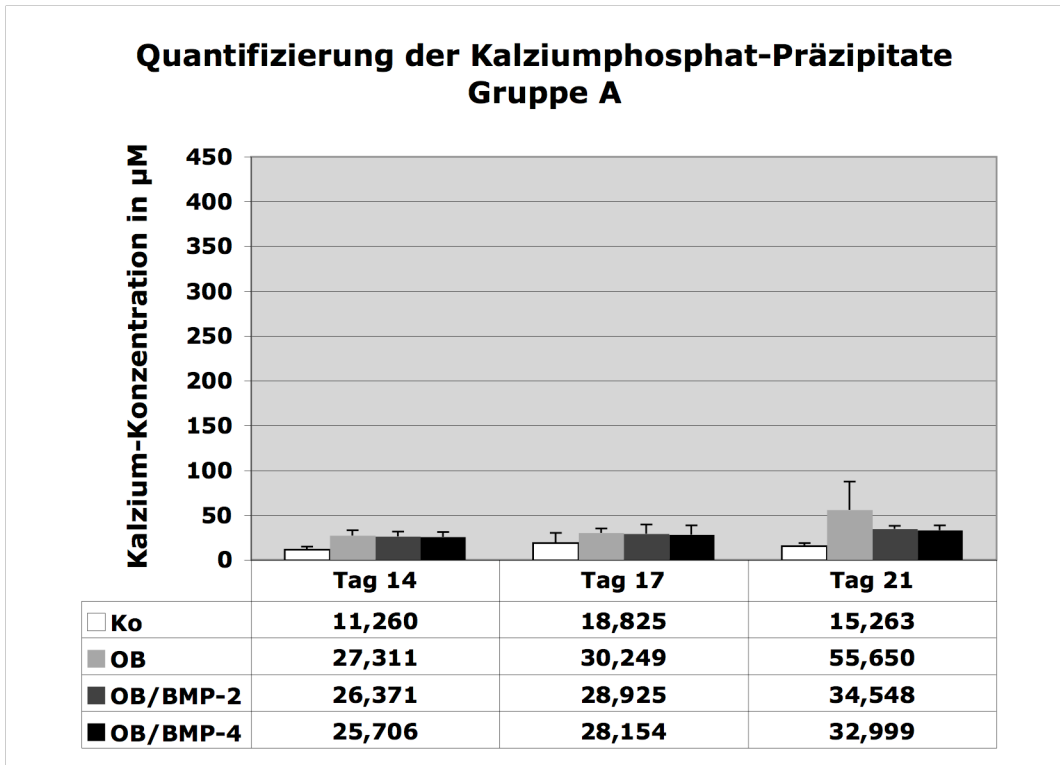


Abb. 14 Quantitativer Nachweis der Kalziumkonzentration der Gruppe A; n=4; 24-Well Platten

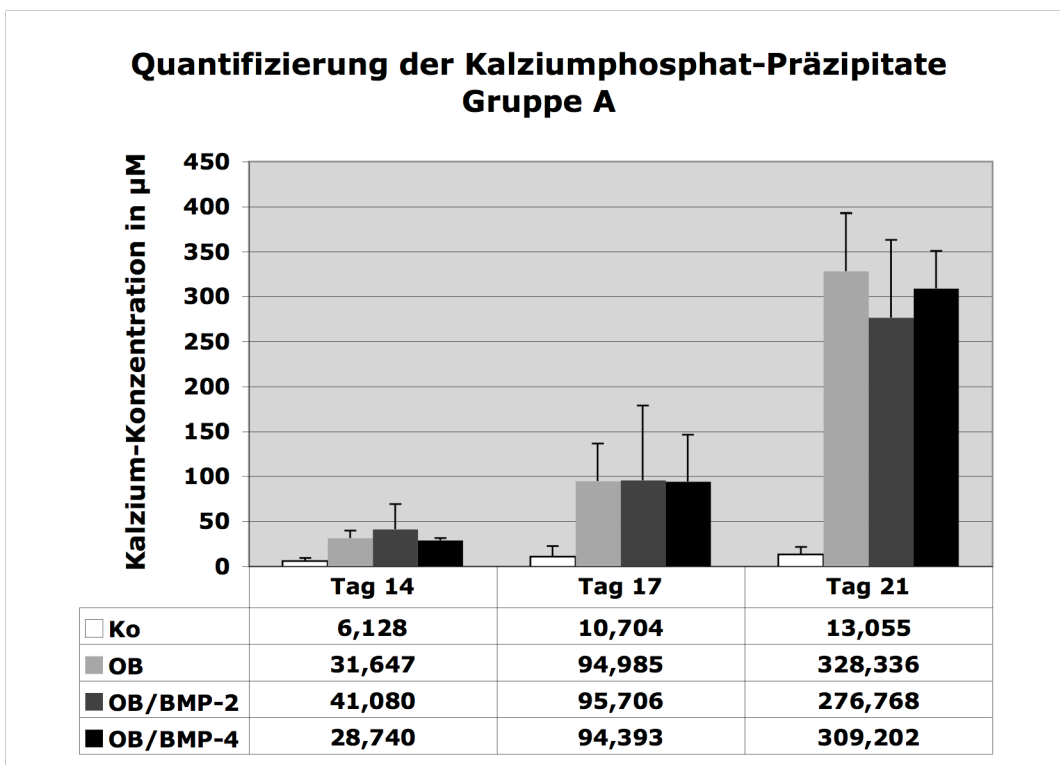


Abb. 15 Quantitativer Nachweis der Kalziumkonzentration der Gruppe A; n=4; 6-Well Platten

mäßigen Verlauf auf. Die Konzentrationswerte für die osteogen induzierten Proben, waren etwa doppelt so hoch. Somit verhielten sich die Zellen der Gruppe A ähnlich wie die der Gruppe B in 24-Well Platten.

Somit konnten für diese Zellen Werte von  $25,71 \pm 5,20 \mu\text{M}$  (OB/BMP-4-Medium) über  $26,37 \pm 5,17 \mu\text{M}$  (OB/BMP-2-Medium) bis  $27,31 \pm 5,60 \mu\text{M}$  (OB-Medium) an Tag 14,  $28,15 \pm 10,16 \mu\text{M}$  (OB/BMP-4-Medium) über  $28,93 \pm 10,52 \mu\text{M}$  (OB/BMP-2-Medium) bis  $30,25 \pm 5,06 \mu\text{M}$  (OB-Medium) an Tag 17 und  $33,00 \pm 5,74 \mu\text{M}$  (OB/BMP-4-Medium) über  $34,55 \mu\text{M}$  (OB/BMP-2-Medium) bis  $55,65 \pm 31,95 \mu\text{M}$  (OB-Medium) an Tag 21 erzielt werden. Einzig der letztgenannte Messwert für die mit OB-Medium behandelten Zellen an Tag 21 fiel aus dem Rahmen (Vgl. Abb. 14). Ein Unterschied zwischen den Werten der Zellen, die mit OB/BMP-2- und OB/BMP-4-Medium behandelt wurden, konnte nicht festgestellt werden.

Deutlich interessanter sind die Ergebnisse der Zellgruppe A, die in 6-Well Platten erzielt wurden. Sie sind in Abbildung 15 graphisch dargestellt. Die Messwerte für die Kontrolle entsprachen mit  $6,13 \pm 3,20 \mu\text{M}$  an Tag 14,  $10,70 \pm 11,73 \mu\text{M}$  an Tag 17 und  $13,06 \pm 8,66 \mu\text{M}$  an Tag 21 etwa den Werten der Kontrolle der Gruppe B in 24-Well Platten. Im Gegensatz dazu zeigten die mit Differenzierungsmedien kultivierten Zellen eine deutlich positive Entwicklung entlang der Zeitachse von Tag 14 bis Tag 21. An Tag 14 lagen die Werte mit  $31,65 \pm 8,19 \mu\text{M}$  (OB-Medium),  $41,08 \pm 28,10 \mu\text{M}$  (OB/BMP-2-Medium) und  $28,74 \pm 2,58 \mu\text{M}$  (OB/BMP-4-Medium) bereits etwas über den entsprechenden Werten der Gruppe A und deutlich über den entsprechenden Werten der Gruppe B ebenfalls in 24-Well Platten. Die drei Werte, die an Tag 17 ermittelt wurden, waren ausgeglichen etwa auf demselben Niveau und betragen  $94,39 \pm 52,10 \mu\text{M}$  (OB/BMP-4-Medium),  $94,98 \pm 41,76 \mu\text{M}$  (OB-Medium) und  $95,71 \pm 82,89 \mu\text{M}$  (OB/BMP-2-Medium). Dies bedeutet schon mehr als eine Verdreifachung der Ergebnisse im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Gruppe-A in 24-Well Platten (Vgl. Abb. 14). Die höchsten Farbstoffkonzentrationen und somit der höchste Kalziumphosphatgehalt wurde an Tag 21 ermittelt. Die OB-behandelten Zellen wiesen Kalziumkonzentrationen von  $328,34 \pm 64,73 \mu\text{M}$  auf, bei den OB/BMP-2- bzw. OB/BMP-4-behandelten Zellen konnten Konzentrationen von  $276,77 \pm 86,38 \mu\text{M}$  bzw.  $309,20 \pm 41,74 \mu\text{M}$  nach-

gewiesen werden. Im Vergleich zu Tag 17 stellt dies eine Verdreifachung und im Vergleich zu Tag 14 sogar eine Verzehnfachung (OB und OB/BMP-4) bzw. fast eine Versiebenfachung (OB/BMP-2) der Messwerte dar. Stellt man nur die Konzentrationwerte der BMP-2- und BMP-4- behandelten Zellen gegenüber, fällt auf, dass an keinem der drei Messzeitpunkte deutliche Unterschiede zwischen diesen bestanden.

### 3.3 Proliferationstest

Bei diesem Test wurde die Proliferationsfähigkeit der Zellen während der Osteogenese untersucht. Wenn Stammzellen ausdifferenzieren, bedeutet dies mit steigendem Differenzierungsgrad eine Verringerung der Proliferationsfähigkeit und letztendlich den Zelltod, also die Apoptose. Der in diesem Versuchsaufbau verwendete Test basiert auf der Messung der mitochondrialen Aktivität der Zellen. Die Mitochondrien der zu testenden Zellen verlangsamten mit abnehmender Proliferationsrate bzw. zunehmender Differenzierung ihre Funktion, was zu niedrigeren Messwerten (ausgedrückt als optische Dichte) führt.

Betrachtet man nun Abbildung 16, welche die Proliferationsergebnisse der Gruppe A graphisch darstellt, erkennt man, dass die Werte der Kontrolle über den Untersuchungszeitraum relativ konstant blieben, jedoch die Werte der mit Differenzierungsmedien behandelten Zellen eine deutliche Entwicklung entlang der Zeitachse aufzeigten. Die Kontrolle wies mit  $0,58 \pm 0,11$  OD an Tag 5,  $0,54 \pm 0,16$  OD an Tag 10 und  $0,59 \pm 0,14$  OD an Tag 20 relativ hohe und sehr konstante Werte auf. Dies war zu erwarten, da die Zellen unter Einfluss des Kontrollmediums nicht differenziert wurden und somit die Proliferationsrate gleich bleiben sollte. An Tag 5 zeigten die Zellen, die mit Differenzierungsmedien behandelt worden waren, mit  $0,45 \pm 0,14$  OD (OB-Medium),  $0,59 \pm 0,25$  OD (OB/BMP-2-Medium) und  $0,59 \pm 0,21$  OD (OB/BMP-4-Medium) relativ hohe, der Kontrolle entsprechenden Werte. An Tag 10 lagen die Werte für dieses Zellmaterial mit  $0,45 \pm 0,20$  OD (OB-Medium),  $0,42 \pm 0,08$  OD (OB/BMP-2-Medium) und  $0,40 \pm 0,19$  OD (OB/BMP-4-Medium) bereits etwas unter dem

Niveau der Kontrolle. Dies bedeutet eine Reduktion der Messwerte um 17 % (OB) bis 26 % (OB/BMP-4). Diese Entwicklung wurde mit den Ergebnissen für Tag 20 bestärkt. Zu diesem Zeitpunkt ergaben sich Werte von  $0,18 \pm 0,05$  OD (OB-Medium),  $0,26 \pm 0,12$  OD (OB/BMP-2-Medium) und  $0,17 \pm 0,10$  OD (OB/BMP-4-Medium). Hier ergibt sich eine prozentuale Reduktion der Messungen im Verhältnis zur Kontrolle um 56 % bei OB/BMP-2, 69,5 % bei OB und sogar 71 % bei OB/BMP-4. Vergleicht man ausschliesslich die Ergebnisse der Proben, die zusätzlich mit BMP-2 und BMP-4 behandelt worden waren, kann man eine analoge Entwicklung entlang der Zeitachse von Tag 5 bis Tag 20 erkennen. Lediglich an Tag 20 kann eine geringe Differenz OB/BMP-2 und OB/BMP-4 von 0,09 OD festgestellt werden.

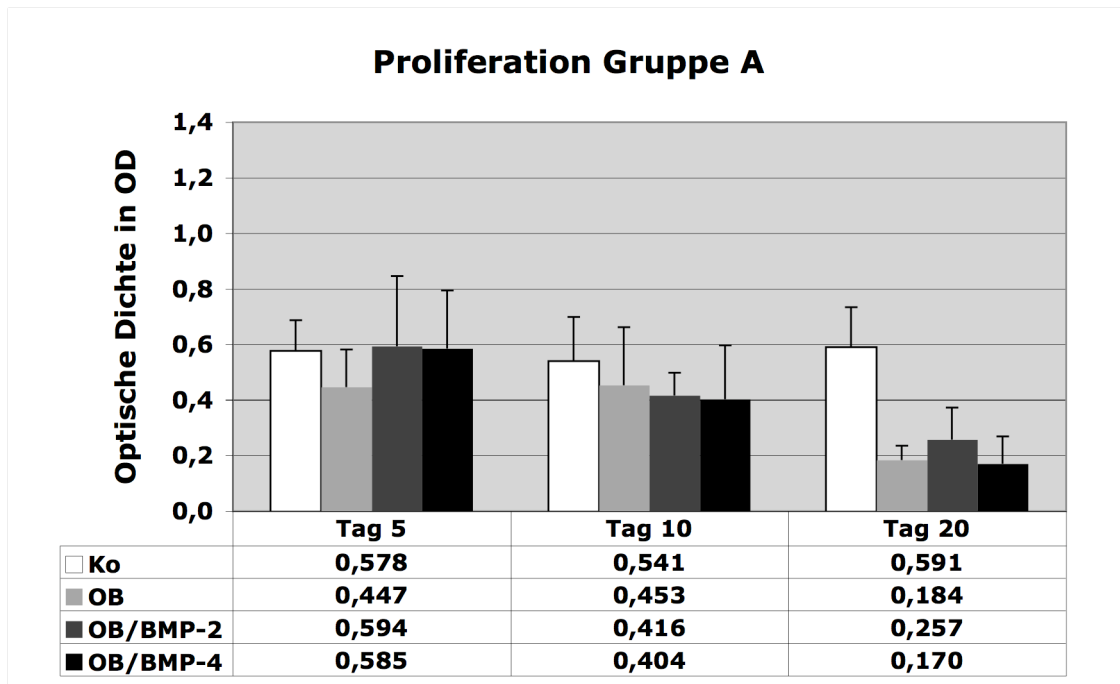


Abb. 16 Nachweis der mitochondrialen Aktivität/Proliferationsrate der Gruppe A; n=5.

Die Ergebnisse der Gruppe B sind in Abbildung 17 graphisch dargestellt. Die Messwerte der Kontrollen fielen nicht so gleichmäßig aus wie die der Gruppe A. An Tag 5 lag der Wert mit  $0,76 \pm 0,46$  OD etwas über den Werten für Tag 10 bzw. Tag 20, die mit  $0,60 \pm 0,12$  OD bzw.  $0,52 \pm 0,18$  OD etwa den Resultaten der Gruppe A entsprachen. Die ermittelten Werte an Tag 5 für die Proben, die mit OB-, OB/BMP-2- und OB/BMP-4-Medium kultiviert wurden, lagen mit

0,75±0,10 OD, 0,68±0,25 OD und 0,67±0,22 OD erwartungsgemäß etwa auf dem Level der Kontrolle. An Tag 10 entsprachen die Ergebnisse für die mit OB-Medium bzw. OB/BMP-4-Medium behandelten Zellen (0,55±0,16 OD bzw. 0,59±0,11 OD) etwa ihrer Kontrolle. Die Probe, die mit OB/BMP-2-Medium behandelt wurde, wies mit 0,38±0,15 OD eine Reduktion von 37,7 % gegenüber der Kontrolle an Tag 10 auf. An Tag 20 zeigten sich die Ergebnisse der mit Differenzierungsmedien behandelten Proben wieder gleichmäßig auf einem Niveau. Mit Werten von 0,36±0,08 OD (OB-Medium) über 0,38±0,12 OD (OB/BMP-2-Medium) bis 0,38±0,11 OD (OB/BMP-4-Medium) bedeutet dies gegenüber dem entsprechenden Kontrollwerte an Tag 20 eine Abnahme um 26,9 % (OB/BMP-2 bzw. OB/BMP-4) bis 30,8 % (OB).

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den entsprechenden Resultaten der Gruppe A, fällt auf, dass an Tag 20 die Proben der Gruppe A eine mehr als doppelt so hohe Reduktion der Proliferationsraten im Vergleich zu den Proben der Gruppe B aufwiesen. Einen deutlichen Unterschied zwischen den Zellen, die zusätzlich mit BMP-2 und BMP-4 behandelt wurden, konnte jedoch auch bei Gruppe B nicht festgestellt werden.

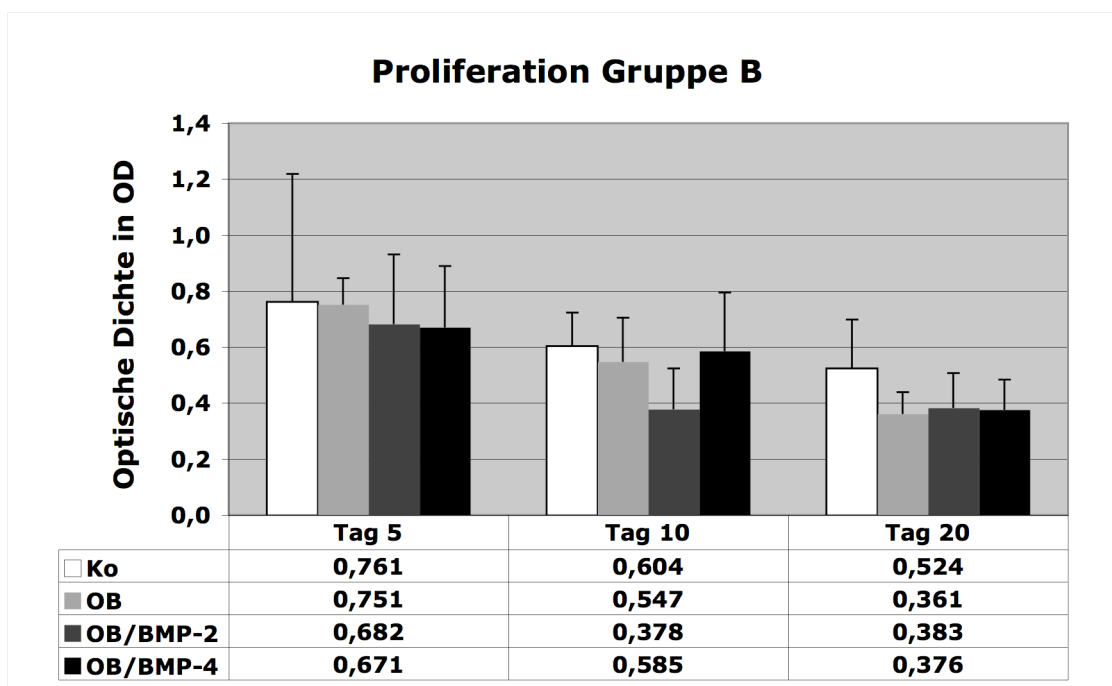


Abb. 17 Nachweis der mitochondrialen Aktivität/Proliferationsrate der Gruppe B; n=

### 3.4 Genexpression mittels quantitativer real-time PCR

Die Methode der quantitativen real-time PCR basiert auf der Amplifikation von Gensequenzen, die in der Zelle aktiv in m-RNA umgeschrieben werden. Je mehr Template von der jeweiligen gesuchten m-RNA in der Zelle vorliegt, desto höher wird das translatierte Protein in der Zelle exprimiert. Für die Quantifizierung lagert sich ein Fluoreszenzfarbstoff an doppelsträngige DNA. Da die vorliegende DNA-Menge mit jedem PCR-Zyklus exponentiell zunimmt, kann über die Messung der Fluoreszenzintensität Rückschlüsse auf die DNA-Mengen gezogen werden. Für die relative Quantifizierung wird das Verhältnis der Kopienzahl des untersuchten Gens zu dem Haushaltsgen GAPDH genommen. Die RNA-Ausbeute der Gruppe A fiel aufgrund der ausgeprägten Mineralisation sehr gering aus und reichte z. T. nicht für die c-DNA Umschreibung aus. Aus dem Grund betrug die Probenanzahl  $n=3$  für die Gruppe A und  $n=4$  für die Gruppe B. Durch die geringe Patientenzahl entstanden hohe interindividuelle Standardabweichungen. Der Induktionsfaktor im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wurde als 1 gesetzt. Aus diesem Grund ist zu jedem Messzeitpunkt der Kontrollwert  $1\pm 0$ . Untersucht wurde die Genexpression der Alkalischen Phosphatase (AP), des Kollagens I  $\alpha 1$  (Koll1 $\alpha 1$ ), des Insulin like growth factors 2 (IGF2), des Osteopontins (OPN), des Osteokalzins (OC), der Transkriptionsfaktoren Runx2/CBF $\alpha 1$  (Core binding factor  $\alpha 1$ ) und Osterix (OSX) und des Cartilage oligomeric matrix proteins (COMP). Die Zeitpunkte der Untersuchung waren entsprechend der histologisch-chemischen Färbungen und des Proliferationstestes die Tage 5, 10 und 20 der osteogenen Differenzierung. Die Ergebnisse der Gruppe A und der Gruppe B wurden in einem jeweils separatem Diagramm vergleichend dargestellt. Die Messwerte für die Proben, die mit OB-, OB/BMP-2- und OB/BMP-4-Medium kultiviert worden waren, beziehen sich in jeder Darstellung auf die entsprechende unbehandelte Kontrolle und stellen die x-fache Kopienzahl dar.

Auf den Abbildungen 18 und 19 sind die Ergebnisse der Genexpression der Alkalischen Phosphatase für die Gruppe A und B zu sehen. Die untersuchte Probenzahl betrug jeweils  $n=3$ .

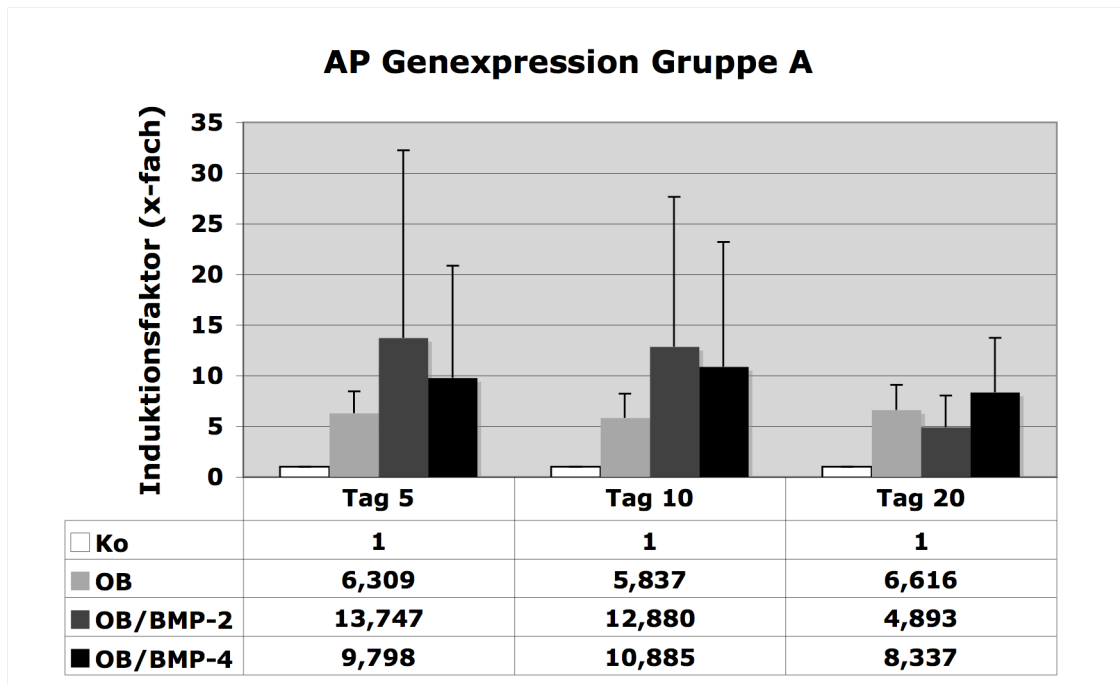


Abb. 18 Quantitativer Nachweis der Genexpression der Alkalischen Phosphatase, Gruppe A, n=3.

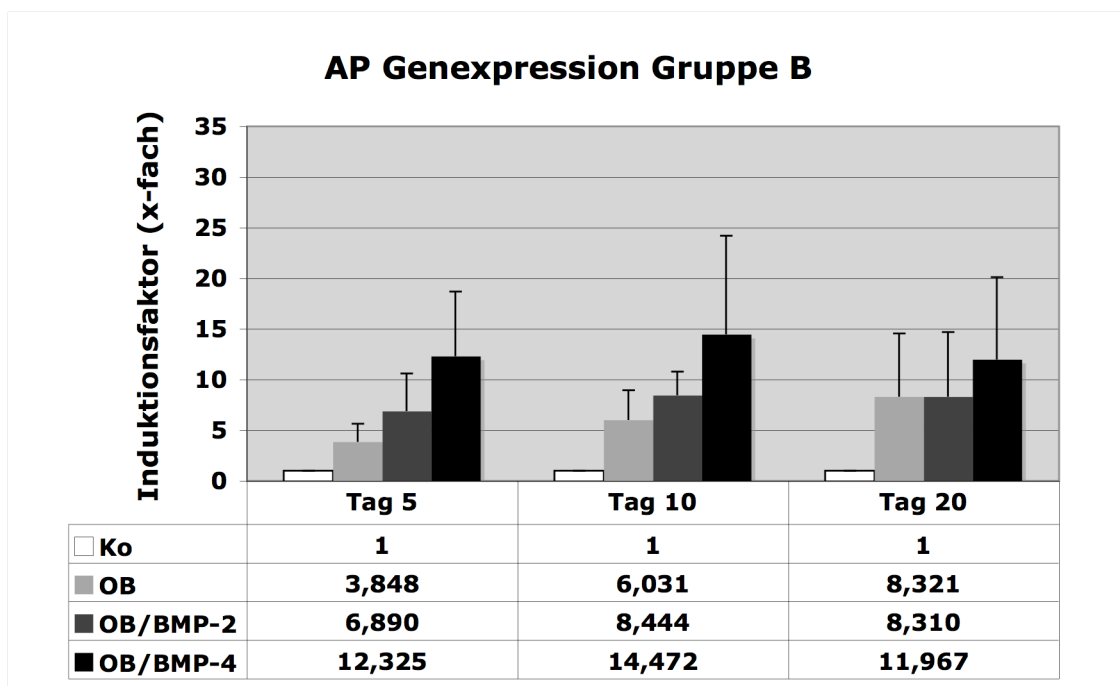


Abb. 19 Quantitativer Nachweis der Genexpression der Alkalischen Phosphatase, Gruppe B, n=3.



In der Gruppe A zeigten die OB-behandelten Proben entlang der Zeitachse gleichmäßig hohe Werte (in Bezug auf die jeweilige Kontrolle) von  $6,31 \pm 2,14$  an Tag 5,  $5,84 \pm 2,38$  an Tag 10 und  $6,62 \pm 2,49$  an Tag 20. Die Zellen, die mit OB/BMP-2-Medium und OB/BMP-4-Medium behandelt wurden, zeigten an Tag 5 mit Induktionsfaktoren von  $13,75 \pm 18,50$  bzw.  $9,80 \pm 11,06$  und an Tag 10 von  $12,88 \pm 14,77$  bzw.  $10,885 \pm 12,32$  deutlich höhere Transkriptionsraten als die entsprechenden Proben, die mit Kontrollmedium bzw. mit OB-Medium behandelt wurden. Die Standardabweichungen waren jedoch sehr hoch. An Tag 20 waren diese Proben mit einem Induktionsfaktor von  $4,89 \pm 3,14$  (OB/BMP-2-Medium) und  $8,34 \pm 5,40$  (OB/BMP-4-Medium) etwa auf dem Niveau der OB-behandelten Proben.

Die Ergebnisse der Gruppe B (vgl. Abb. 19) waren für die Proben, die mit OB-Medium kultiviert wurden, mit  $3,85 \pm 1,81$  an Tag 5,  $6,03 \pm 2,92$  an Tag 10 und  $8,32 \pm 6,26$  an Tag 20 mit den entsprechenden Ergebnissen der Gruppe A vergleichbar. Die mit OB/BMP-2- und OB/BMP-4-Medium behandelten Proben wiesen an Tag 5 Induktionsfaktoren von  $6,89 \pm 3,71$  bzw.  $12,33 \pm 6,38$ , an Tag 10 von  $8,44 \pm 2,34$  bzw.  $14,47 \pm 9,74$  und an Tag 20 von  $8,31 \pm 6,39$  bzw.  $11,97 \pm 8,15$  auf. Es konnte bei beiden Gruppen kein deutlicher Unterschied zwischen den Proben ermittelt werden, die zusätzlich mit BMP-2 und BMP-4 kultiviert wurden.

Auf den Abbildungen 20 und 21 ist die Genexpression von Kollagen I  $\alpha 1$  dargestellt. Die Anzahl der untersuchten Proben lag auch bei jeweils  $n=3$ .

Die Kollagen I  $\alpha 1$  Kopienzahlen in der Gruppe A nahmen von Tag 5 bis zu Tag 20 im Verhältnis zur Kontrolle deutlich ab. An Tag 5 konnten leichte Induktionsfaktoren von  $1,21 \pm 0,19$  (OB-Medium),  $1,29 \pm 0,29$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,32 \pm 0,32$  (OB/BMP-4-Medium) ermittelt werden. An Tag 10 waren die Messwerte mit  $0,78 \pm 0,21$  (OB-Medium),  $0,92 \pm 0,39$  (OB/BMP-2-Medium) und  $0,80 \pm 0,23$  (OB/BMP-4-Medium) sogar unter der Transkriptionsrate der Kontrolle. Noch stärker wurden die Kollagen I  $\alpha 1$  Kopienzahlen an Tag 20 inhibiert: die Expressionsraten betragen  $0,40 \pm 0,10$  für OB-behandelte Zellen,  $0,19 \pm 0,15$  für OB/BMP-2-behandelte Zellen und  $0,28 \pm 0,15$  für Zellen, die zusätzlich mit BMP-4 induziert wurden.

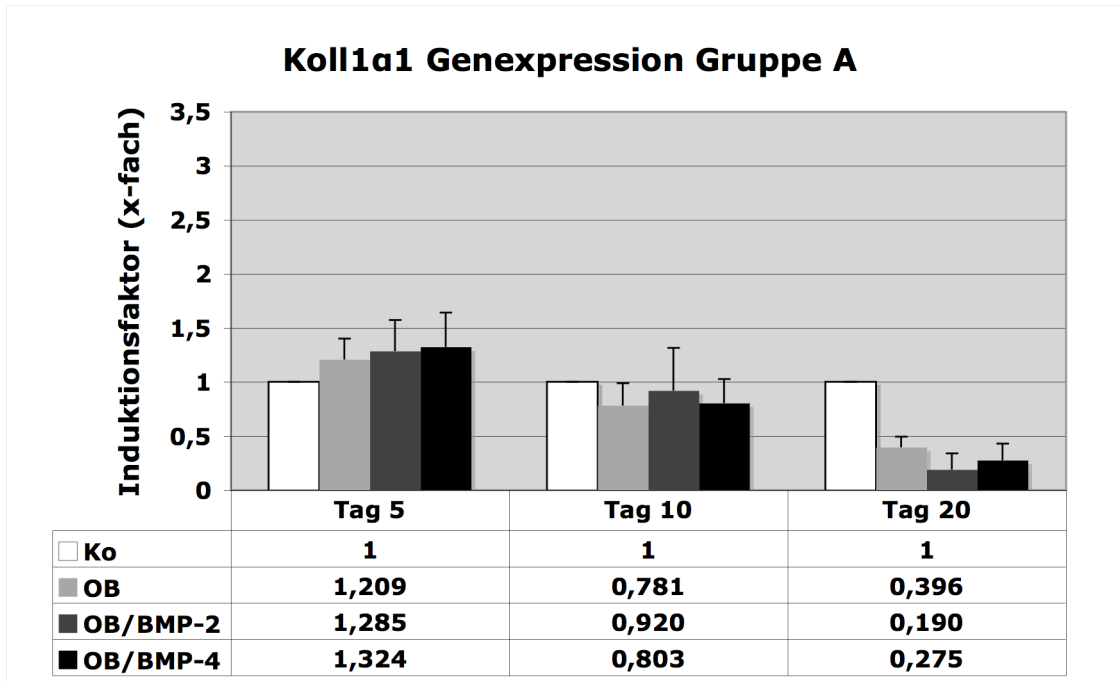


Abb. 20 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Kollagen I  $\alpha$ 1, Gruppe A, n=3.

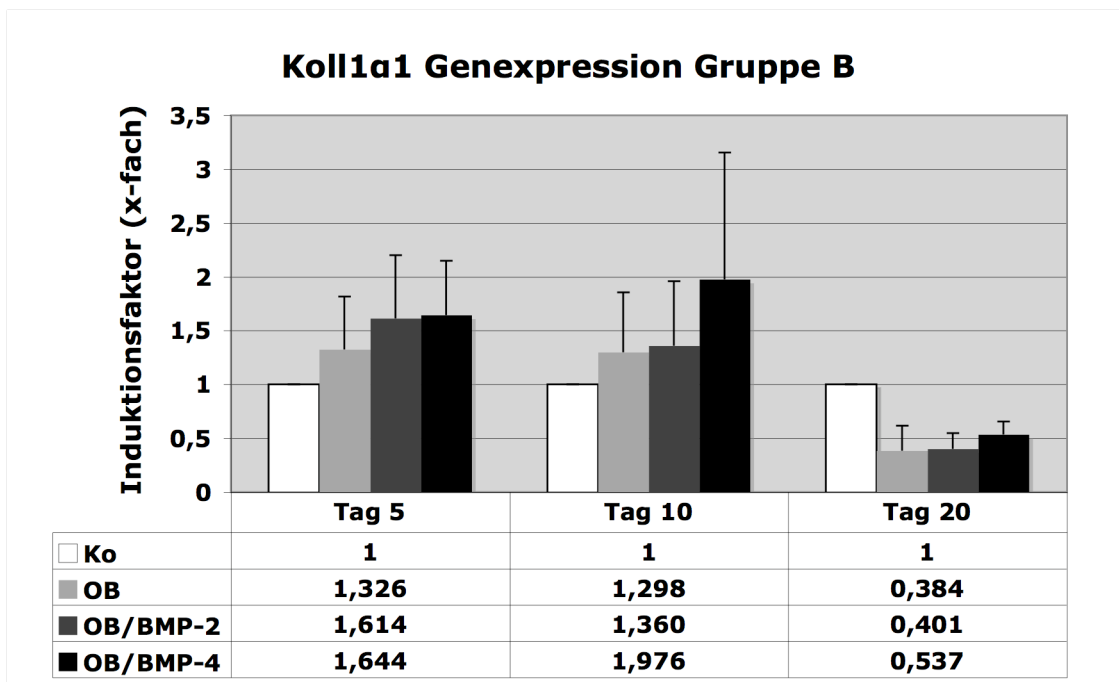


Abb. 21 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Kollagen I  $\alpha$ 1, Gruppe B, n=3.

Die Ergebnisse der Gruppe B (vgl. Abb. 21) zeigten eine leicht abgewandelte Tendenz. Während die Induktionsfaktoren etwas höher ausfielen als in Gruppe A, konnte erst nach Tag 20 eine Koll1 $\alpha$ 1 Suppression detektiert werden. An Tag 5 wurden Induktionsfaktoren von  $1,32 \pm 0,49$  (OB-Medium),  $1,61 \pm 0,59$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,64 \pm 0,51$  (OB/BMP-4-Medium) festgestellt. An Tag 10 waren die Werte mit  $1,30 \pm 0,56$  (OB-Medium),  $1,36 \pm 0,60$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,98 \pm 1,18$  (OB/BMP-4-Medium) mit den Resultaten von Tag 5 vergleichbar. Weitaus geringer fielen die Ergebnisse mit  $0,38 \pm 0,23$  (OB-Medium),  $0,40 \pm 0,15$  (OB/BMP-2-Medium) und  $0,54 \pm 0,12$  (OB/BMP-4-Medium) an Tag 20 aus.

Aufgrund der insgesamt sehr geringen Probenanzahl und der dadurch bedingten hohen Standardabweichungen, konnte für diese Quantifizierung keine Aussage über den Einfluss von BMP-2 vs. BMP-4 gemacht werden.

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen die Ergebnisse der IGF2 (Insuline-like-Growth-factor 2) Expression im Laufe der Osteogenese. Die Probenanzahl betrug  $n=4$  (Gruppe A) und  $n=3$  (Gruppe B). Die Untersuchungen zeigten bei beiden Gruppen einen deutlichen Anstieg der Messwerte entlang der Zeitachse von Tag 5 bis Tag 20.

Die Induktionsfaktoren für die Proben der Gruppe A, die mit OB-Medium, OB/BMP-2-Medium und OB/BMP-4-Medium behandelt worden waren, entsprachen an Tag 5 einem Faktor von  $3,62 \pm 4,40$  (OB-Medium) bzw.  $2,88 \pm 2,70$  (OB/BMP-2-Medium) bzw.  $3,35 \pm 3,21$  (OB/BMP-4-Medium) in Bezug auf die Kontrolle. An Tag 10 konnte eine weitere Steigerung der IGF2 Expression um nahezu 100 % auf  $5,15 \pm 6,59$  (OB-Medium),  $5,23 \pm 4,89$  (OB/BMP-2-Medium) und  $5,48 \pm 5,28$  (OB/BMP-4-Medium) ermittelt werden. Am Untersuchungstag 20 stiegen die ermittelten Induktionsfaktoren nochmals an. Für die OB-behandelten Proben, ergab sich ein Faktor von  $8,11 \pm 13,90$ , für die, die mit OB/BMP-2-Medium kultiviert wurden,  $5,51 \pm 4,47$  und für die, die mit OB/BMP-4-Medium behandelt worden waren,  $10,19 \pm 12,85$ . Die Standardabweichungen waren an allen Untersuchungszeitpunkten sehr hoch, vor allem aber an Tag 20, an welchem sie sogar größer als die eigentlichen Werte waren.

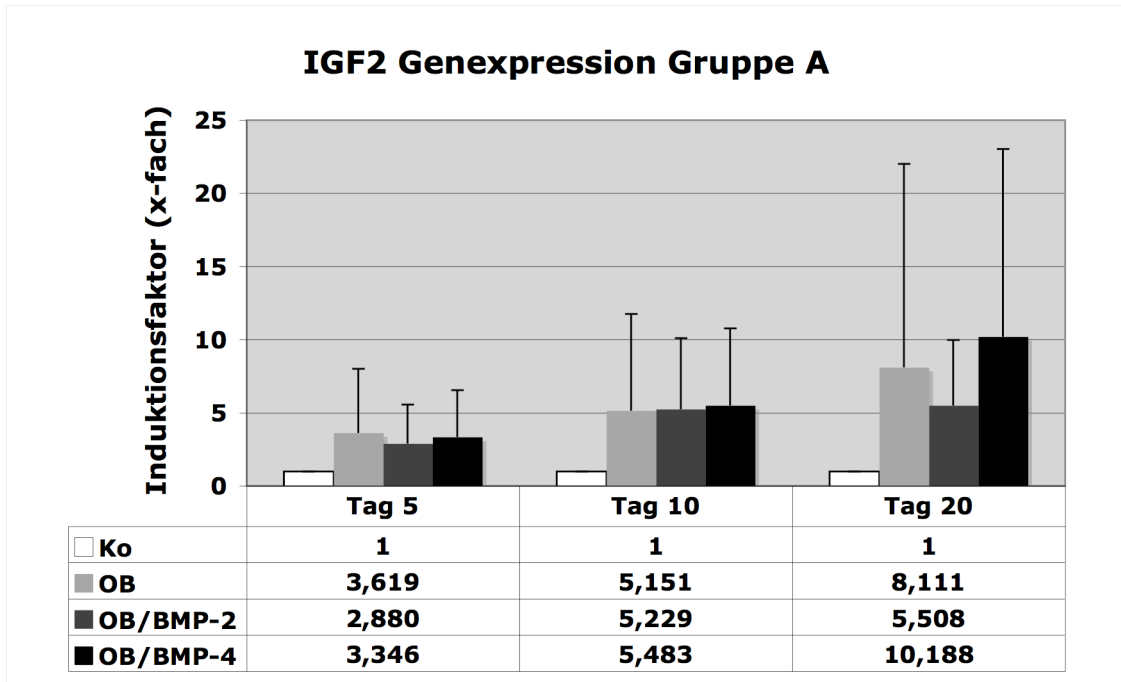


Abb. 22 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Insuline-like-Growth-Factor-2 (IGF2), Gruppe A, n=4.

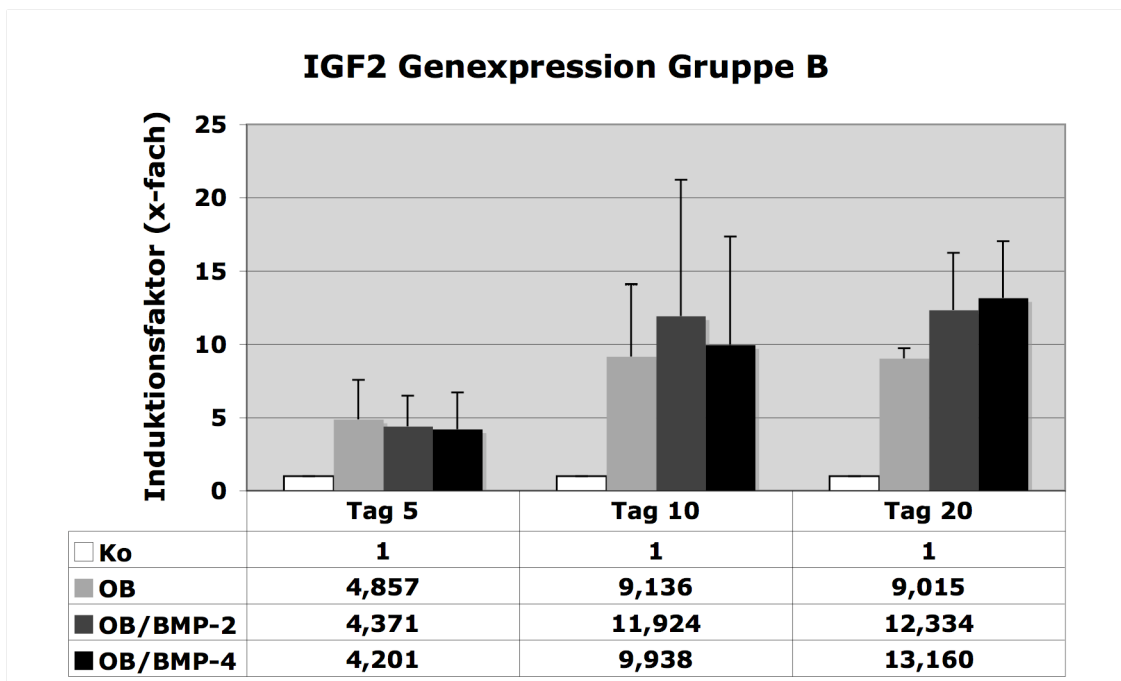


Abb. 23 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Insuline-like-Growth-Factor-2 (IGF2), Gruppe B, n=3.

Tendenziell höhere Werte erreichten die Proben der Gruppe B. An Tag 5 zeigten sich mit  $4,86 \pm 2,69$  (OB-Medium),  $4,37 \pm 2,12$  (OB/BMP-2-Medium),  $4,20 \pm 2,49$  (OB/BMP-4-Medium) ähnliche Werte wie bei Gruppe A. Zum Untersuchungstag 10 stiegen die Faktoren auf das 2,5 bis 3-fache an (bezogen auf Tag 5). Für die Proben, die mit OB-Medium kultiviert wurden, ergab sich ein Faktor von  $9,14 \pm 4,95$ , für die, die mit OB/BMP-2-Medium versehen worden waren,  $11,92 \pm 9,28$  und für die, die mit OB/BMP-4-Medium behandelt worden waren,  $9,94 \pm 7,42$ . An Tag 20 stiegen die Induktionsfaktoren auf maximale Werte von  $9,02 \pm 0,70$  (OB-Medium),  $12,33 \pm 3,90$  (OB/BMP-2-Medium) und  $13,16 \pm 3,87$  (OB/BMP-4-Medium).

Bei beiden Gruppen war aufgrund der hohen Standardabweichungen kein deutlicher Unterschied zwischen den Proben, die zusätzlich mit BMP-2 und mit BMP-4 behandelt worden waren, zu eruieren.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Osteopontin Expression sind in den Abbildungen 24 und 25 zusammengefasst. Die Probenanzahl betrug jeweils  $n=3$ . Bei den Untersuchungen zu diesem Gen fielen die Standardabweichungen bedeutend niedriger aus (bis auf Gruppe B, OB/BMP-2, Tag 5) als bei den Untersuchungen zur IGF2 Expression.

Die Induktionsfaktoren der Gruppe A waren an Tag 5 mit denen der Gruppe B vergleichbar, an Tag 10 ca. 1,5-fach höher und an Tag 20 nahezu doppelt so hoch. Die Werte der Gruppe A für die Proben, die mit Differenzierungsmedien kultiviert wurden, lagen an Tag 5 bei  $1,63 \pm 0,29$  (OB-Medium),  $1,93 \pm 0,72$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,58 \pm 0,15$  (OB/BMP-4-Medium), an Tag 10 bei  $2,34 \pm 0,98$  (OB-Medium),  $2,15 \pm 0,58$  (OB/BMP-2-Medium) und  $2,36 \pm 0,53$  (OB/BMP-4-Medium) und an Tag 20 bei  $2,06 \pm 0,64$  (OB-Medium),  $1,97 \pm 0,67$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,90 \pm 0,29$  (OB/BMP-4-Medium).

Die Werte der Gruppe B waren insgesamt sehr niedrig, ausgenommen der OB/BMP-2 behandelten Proben an Tag 5. Sie ergaben einen Induktionsfaktor von 3,76 und lagen somit deutlich über allen anderen Werten dieser Gruppe, allerdings war die Standardabweichung etwa genauso hoch (STABW  $\pm 3,53$ ). Die Ergebnisse der Gruppe B für die Proben, die mit Differenzierungsmedien behandelt wurden, lagen an Tag 5 bei  $1,62 \pm 0,33$  (OB-Medium) und  $1,72 \pm 0,64$

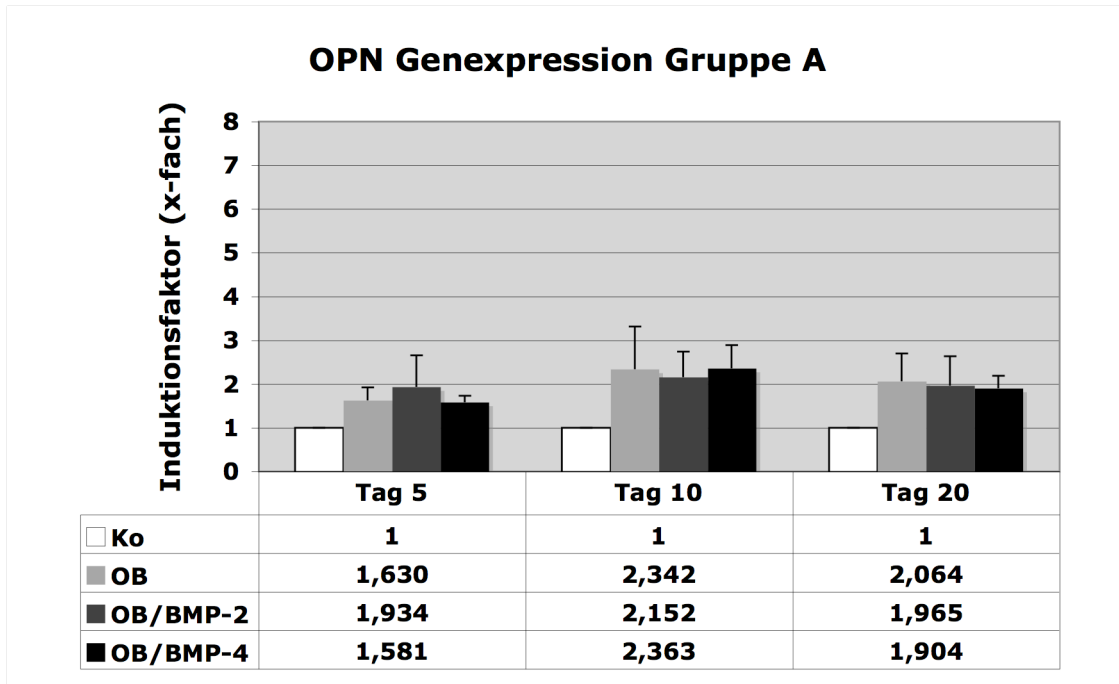


Abb. 24 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Osteopontin, Gruppe A, n=3.

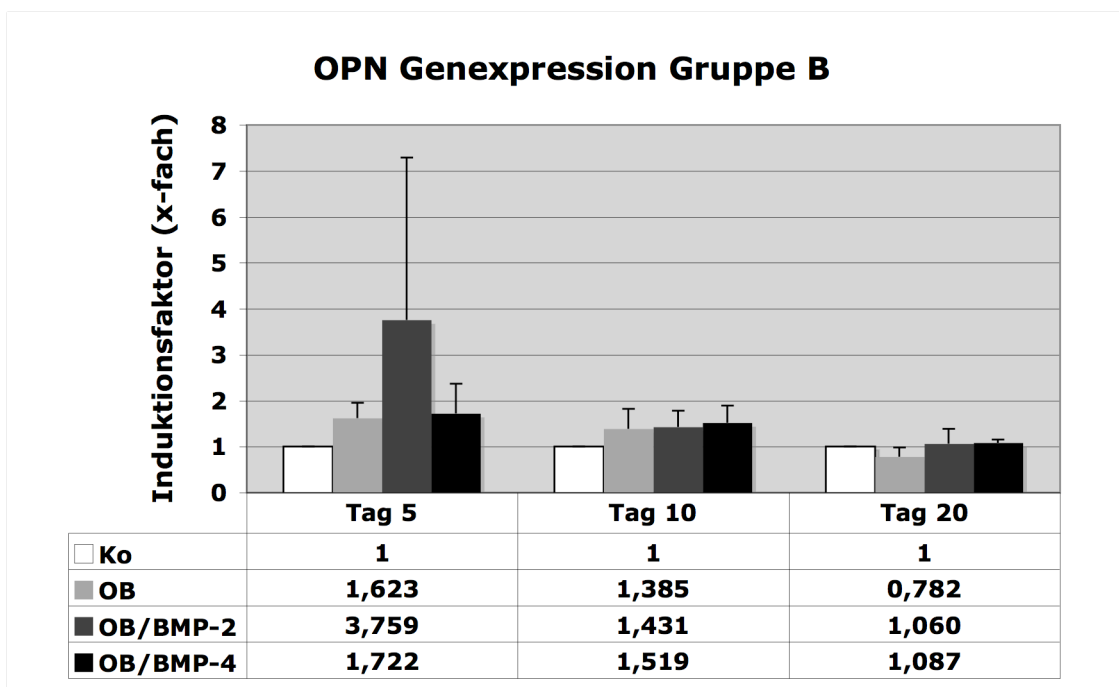


Abb. 25 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Osteopontin, Gruppe B, n=3.

(OB/BMP-4-Medium), an Tag 10 bei  $1,39 \pm 0,44$  (OB-Medium),  $1,43 \pm 0,35$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,52 \pm 0,38$  (OB/BMP-4-Medium) und an Tag 20 bei  $0,78 \pm 0,20$  (OB-Medium),  $1,06 \pm 0,33$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,09 \pm 0,06$  (OB/BMP-4-Medium).

Auch bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass BMP-2 im Vergleich zu BMP-4 keinen positiven Einfluss auf die Genexpression dieses osteogenen Markers hatte.

Bezüglich der Osteokalzin Expression konnte im Laufe der Differenzierung eine deutlich höhere Genexpression auf Seiten der Gruppe A ermittelt werden. Vergleicht man die Abbildungen 26 und 27 fällt auf, dass die Induktionsfaktoren im Verhältnis zur entsprechenden Kontrolle an Tag 20 bei Gruppe A ca. doppelt so hoch wie die der Gruppe B sind.

Die Werte für die Gruppe B, die mit Differenzierungsmedien kultiviert wurden, zeigten keine Entwicklung entlang der Zeitachse und blieben bis zu Tag 20 auf dem Level der entsprechenden Kontrolle. An Tag 5 konnten Induktionsfaktoren von  $1,09 \pm 0,11$  (OB-Medium),  $1,06 \pm 0,17$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,16 \pm 0,17$  (OB/BMP-4-Medium), an Tag 10 von  $1,14 \pm 0,21$  (OB-Medium),  $0,99 \pm 0,26$  (OB/BMP-2-Medium) und  $0,94 \pm 0,27$  (OB/BMP-4-Medium) und an Tag 20 von  $0,89 \pm 0,15$  (OB-Medium),  $0,79 \pm 0,29$  (OB/BMP-2-Medium) und  $0,88 \pm 0,32$  (OB/BMP-4-Medium) ermittelt werden. Diese niedrigen Werte waren zu erwarten, da die Proben der Gruppe B nicht kalzifiziert sind und keine osteogene Differenzierung stattgefunden hat. Somit war auch keine erhöhte Genexpression des osteogenen Markers Osteokalzin zu erwarten.

Die Untersuchung der Osteokalzin Expression der Gruppe A ergab in Induktionsfaktoren ausgedrückt an Tag 5 Werte von  $0,96 \pm 0,32$  (OB-Medium),  $0,75 \pm 0,33$  (OB/BMP-2-Medium) und  $0,82 \pm 0,30$  (OB/BMP-4-Medium), an Tag 10  $1,34 \pm 0,72$  (OB-Medium),  $1,27 \pm 0,29$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,10 \pm 0,59$  (OB/BMP-4-Medium) und an Tag 20 von  $1,85 \pm 0,83$  (OB-Medium),  $1,68 \pm 0,92$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,95 \pm 0,59$  (OB/BMP-4-Medium).

Die Wachstums- und Differenzierungsfaktoren BMP-2 und BMP-4 hatten jedoch auch hier keinen deutlichen Unterschied hervorgerufen und hatten etwa den gleichen Effekt wie die OB-Behandlung der Periostzellen.

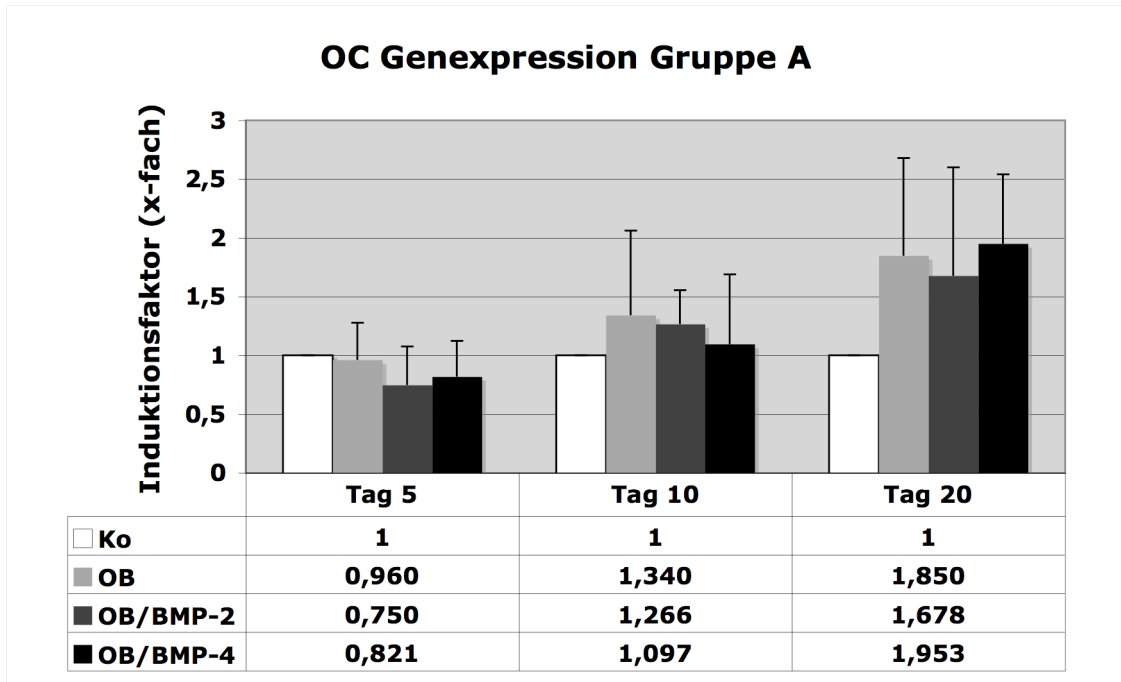


Abb. 26 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Osteokalzin, Gruppe A, n=3.

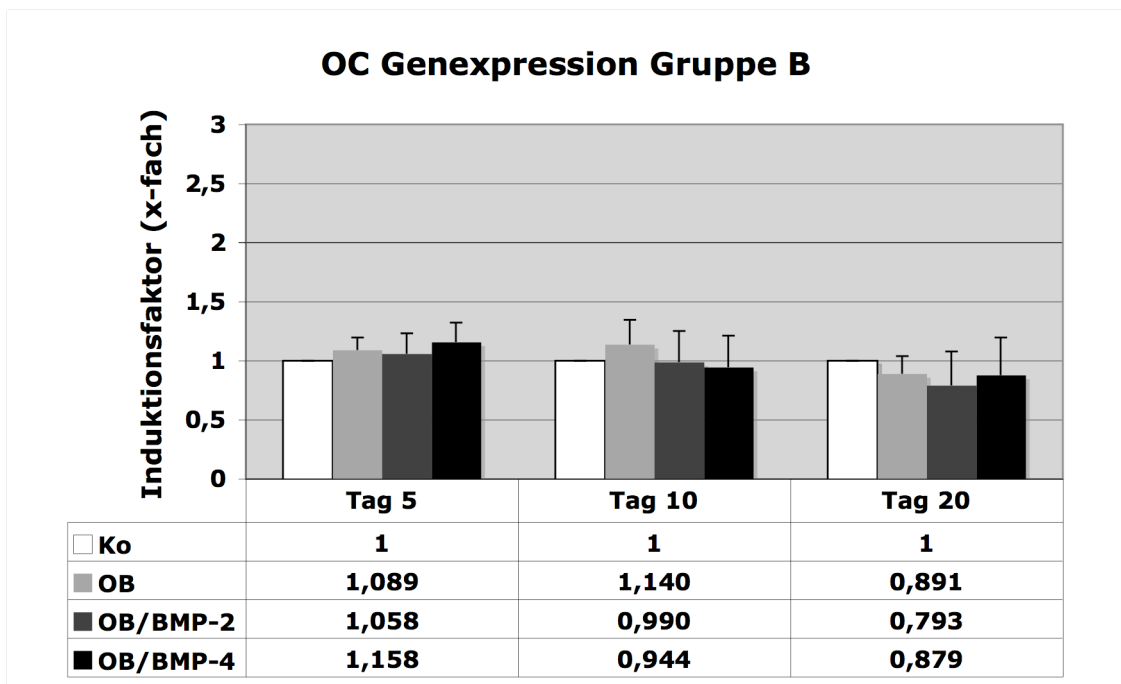


Abb. 27 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Osteokalzin, Gruppe B, n=3.



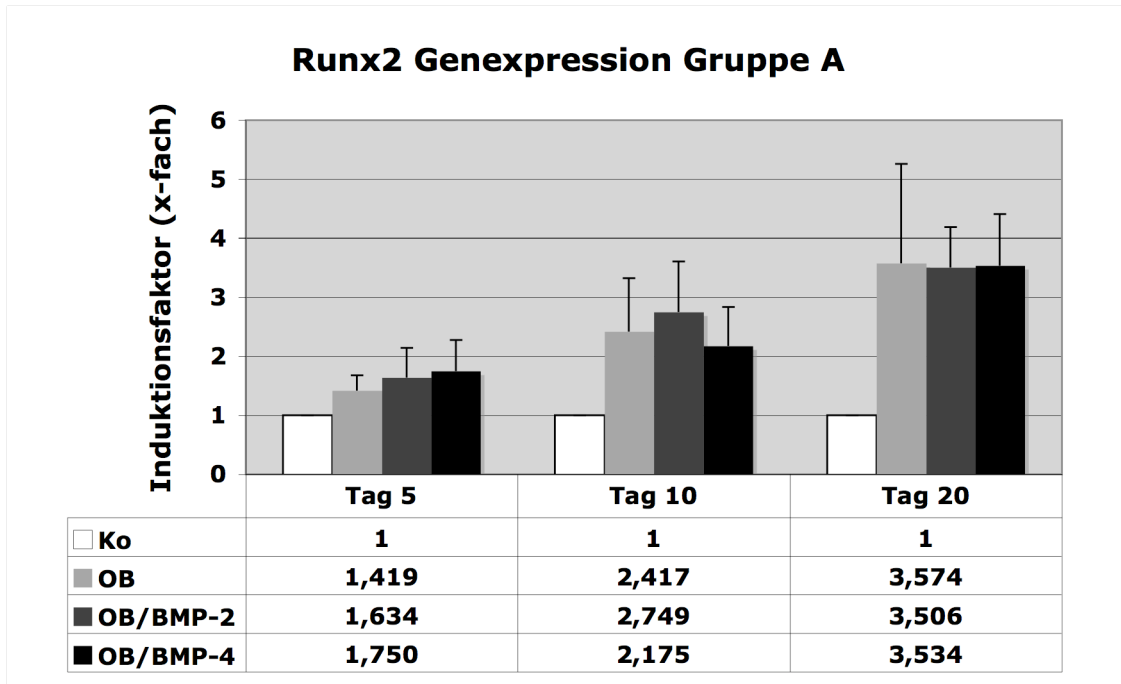


Abb. 28 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Runx2 (Cbf $\alpha$ 1), Gruppe A, n=4.

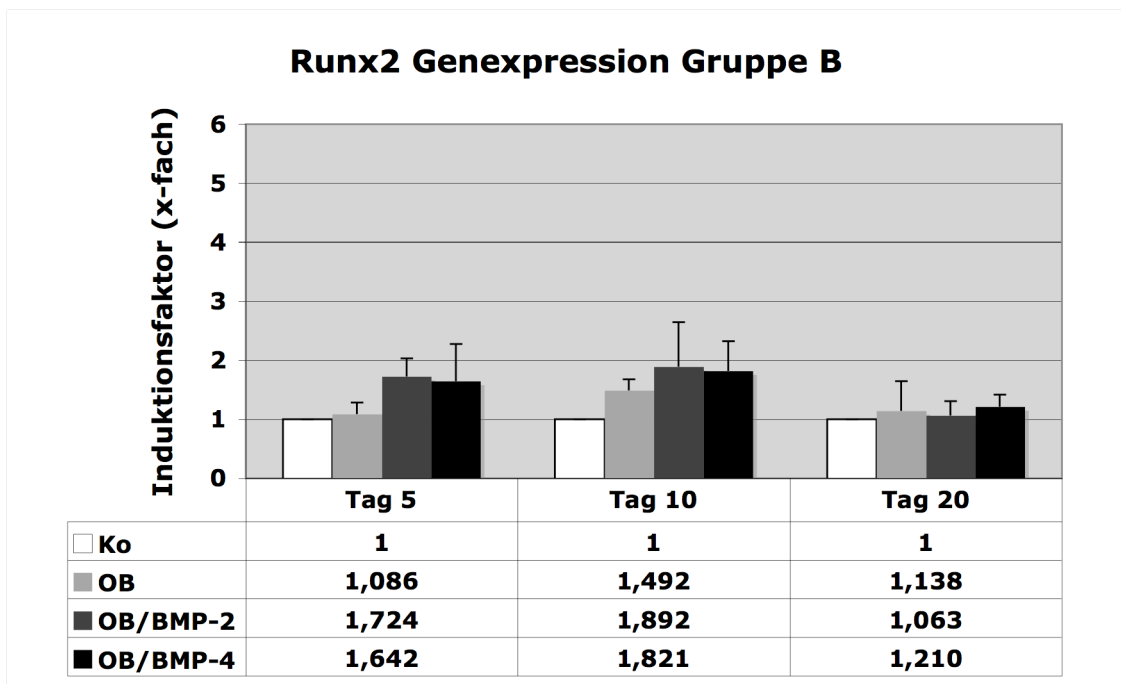


Abb. 29 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Runx2 (Cbf $\alpha$ 1), Gruppe B, n=3.

Die Genexpression des Transkriptionsfaktors Runx2 ist in den Abbildungen 28 und 29 zusammengefasst. Die Probenanzahl der Gruppe A betrug  $n=4$ , die der Gruppe B  $n=3$ . Wie es zu erwarten war, zeigten die Zellproben der Gruppe A deutlich höhere Transkriptionsraten als die der Gruppe B.

An Tag 5 waren die Messergebnisse gegenüber ihrer Kontrolle um den Faktor  $1,42\pm 0,26$  (OB-Medium),  $1,63\pm 0,51$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,75\pm 0,52$  (OB/BMP-4-Medium) für die Gruppe A und um den Faktor  $1,09\pm 0,20$  (OB-Medium),  $1,72\pm 0,31$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,64\pm 0,63$  (OB/BMP-4-Medium) für die Gruppe B erhöht. Mit Induktionsfaktoren von  $2,42\pm 0,91$  (OB-Medium),  $2,75\pm 0,86$  (OB/BMP-2-Medium) und  $2,18\pm 0,66$  (OB/BMP-4-Medium) zeigte die Gruppe A an Tag 10 bereits höhere Werte als die Gruppe B mit  $1,49\pm 0,18$  (OB-Medium),  $1,89\pm 0,75$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,82\pm 0,51$  (OB/BMP-4-Medium). An Tag 20 zeigten alle Proben der Gruppe A, die mit Differenzierungsmedien kultiviert wurden, mit einem Faktor von  $3,57\pm 1,69$  (OB-Medium),  $3,51\pm 0,68$  (OB/BMP-2-Medium) und  $3,53\pm 0,87$  (OB/BMP-4-Medium) ein ca. 3,5-fach höheres Ergebnis als die entsprechenden Proben der Gruppe B, die mit  $1,14\pm 0,51$  (OB-Medium),  $1,06\pm 0,24$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,21\pm 0,21$  (OB/BMP-4-Medium) in etwa auf dem Level ihrer Kontrolle lagen.

Zwischen den Proben, die zusätzlich mit BMP-2 und BMP-4 behandelt wurden, konnte auch bezüglich der Runx2 Genexpression kein Unterschied festgestellt werden.

Die Abbildungen 30 und 31 veranschaulichen das Ergebnis der Untersuchung des Transkriptionsfaktors Osterix. Die Probenanzahl war jeweils  $n=3$ . Entgegen der Erwartung auf Seiten der Gruppe A eine deutlich höhere Osterix Expression zu erhalten, zeigten die Proben der Gruppe B höhere Induktionsfaktoren.

Besonders die Zellproben der Gruppe B, die mit OB/BMP-2- und mit OB/BMP-4-Medium behandelt worden waren, zeigten an Tag 5 Faktoren von  $18,24\pm 13,13$  (OB/BMP-2-Medium) bzw.  $30,52\pm 26,80$  (OB/BMP-4-Medium), an Tag 10 ein Faktor von  $31,93\pm 34,34$  (OB/BMP-2-Medium) bzw.  $60,94\pm 31,23$  (OB/BMP-4-Medium) und an Tag 20 ein Faktor von  $7,09\pm 5,72$  (OB/BMP-2-Medium) bzw.  $25,34\pm 25,15$  (OB/BMP-4-Medium).

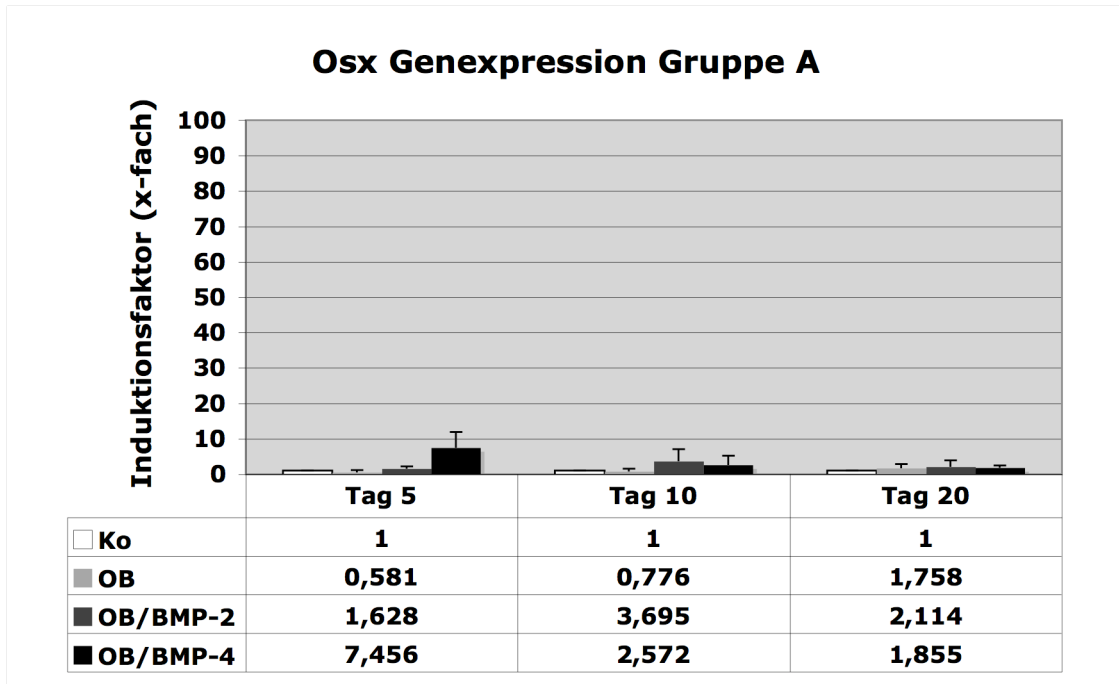


Abb. 30 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Osterix, Gruppe A, n=3.

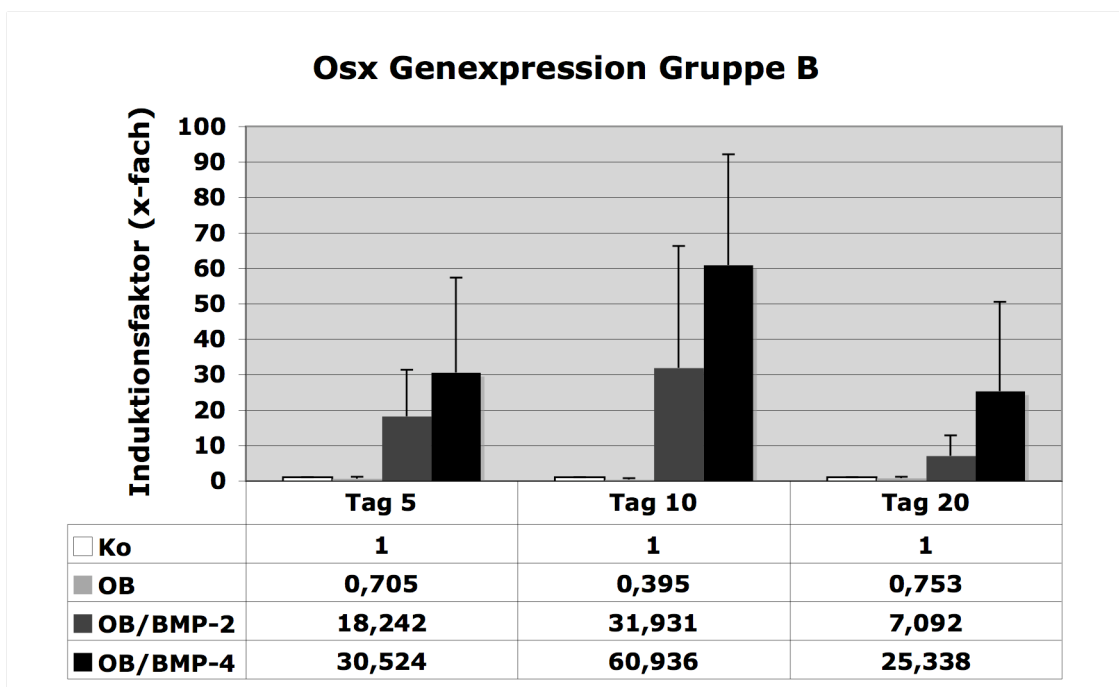


Abb. 31 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Osterix, Gruppe B, n=3.

Die Resultate für die Proben der Gruppe B, die mit OB-Medium behandelt wurden, lagen sowohl an Tag 5 ( $0,71 \pm 0,49$ ) als auch an Tag 10 ( $0,40 \pm 0,38$ ) sowie an Tag 20 ( $0,75 \pm 0,37$ ) unterhalb ihrer unbehandelten Kontrolle.

Die Osterix Expression der Gruppe A lautete in Induktionsfaktoren ausgedrückt an Tag 5  $0,58 \pm 0,62$  (OB-Medium),  $1,63 \pm 0,64$  (OB/BMP-2-Medium) und  $7,46 \pm 4,45$  (OB/BMP-4-Medium), an Tag 10  $0,78 \pm 0,78$  (OB-Medium),  $3,70 \pm 3,43$  (OB/BMP-2-Medium) und  $2,57 \pm 2,62$  (OB/BMP-4-Medium) und an Tag 20 von  $1,76 \pm 1,15$  (OB-Medium),  $2,11 \pm 1,86$  (OB/BMP-2-Medium) und  $1,86 \pm 0,62$  (OB/BMP-4-Medium). Durch die extrem hohen Werte der Gruppe B verglichen mit den Werten der Gruppe A ist es nicht möglich eine fundierte Aussage über die Wirkung von BMP-2 vs. BMP-4 bezüglich der Genexpression des Transkriptionsfaktors Osterix zu treffen.

Die Expression des COMP-Gens wurde in den Abbildungen 32 und 33 dargestellt. Die Probenanzahl betrug sowohl für die Gruppe A als auch für die Gruppe B  $n=3$ .

Die Induktionsfaktoren für die OB-behandelten Proben, waren mit  $2,25 \pm 0,40$  an Tag 5,  $3,61 \pm 2,42$  an Tag 10 und  $2,18 \pm 2,22$  an Tag 20 für die Gruppe A niedriger als diejenigen der Gruppe B mit  $6,18 \pm 1,64$  an Tag 5,  $10,62 \pm 5,59$  an Tag 10 und  $4,10 \pm 0,76$  an Tag 20. Die Proben der Gruppe B, die zusätzlich mit BMP-2 bzw. BMP-4 induziert wurden, zeigten mit  $11,90 \pm 2,82$  bzw.  $12,40 \pm 1,42$  an Tag 5,  $17,45 \pm 6,50$  bzw.  $15,51 \pm 1,16$  an Tag 10 und  $7,63 \pm 4,26$  bzw.  $12,59 \pm 7,14$  an Tag 20 keine bedeutende Entwicklung entlang der Zeitachse. Eine deutliche Erhöhung der COMP Expression konnte bei den Proben der Gruppe A ermittelt werden, die zusätzlich mit BMP-2 bzw. BMP-4 behandelt wurden. Hier erhielt man Induktionsfaktoren von  $17,14 \pm 8,75$  (OB/BMP-2-Medium) bzw.  $18,45 \pm 8,36$  (OB/BMP-4-Medium) an Tag 5,  $40,13 \pm 24,12$  (OB/BMP-2-Medium) bzw.  $31,29 \pm 20,37$  (OB/BMP-4-Medium) an Tag 10 und  $37,21 \pm 16,60$  (OB/BMP-2-Medium) bzw.  $25,89 \pm 21,72$  (OB/BMP-4-Medium) an Tag 20. Die Standardabweichungen waren an den Untersuchungstagen 10 und 20 relativ hoch, was in der geringen Probenanzahl ( $n=3$ ) begründet sein kann.

Bezugnehmend auf die Ergebnisse der Gruppe A scheint BMP-2 und BMP-4 die COMP-Expression stark zu induzieren.

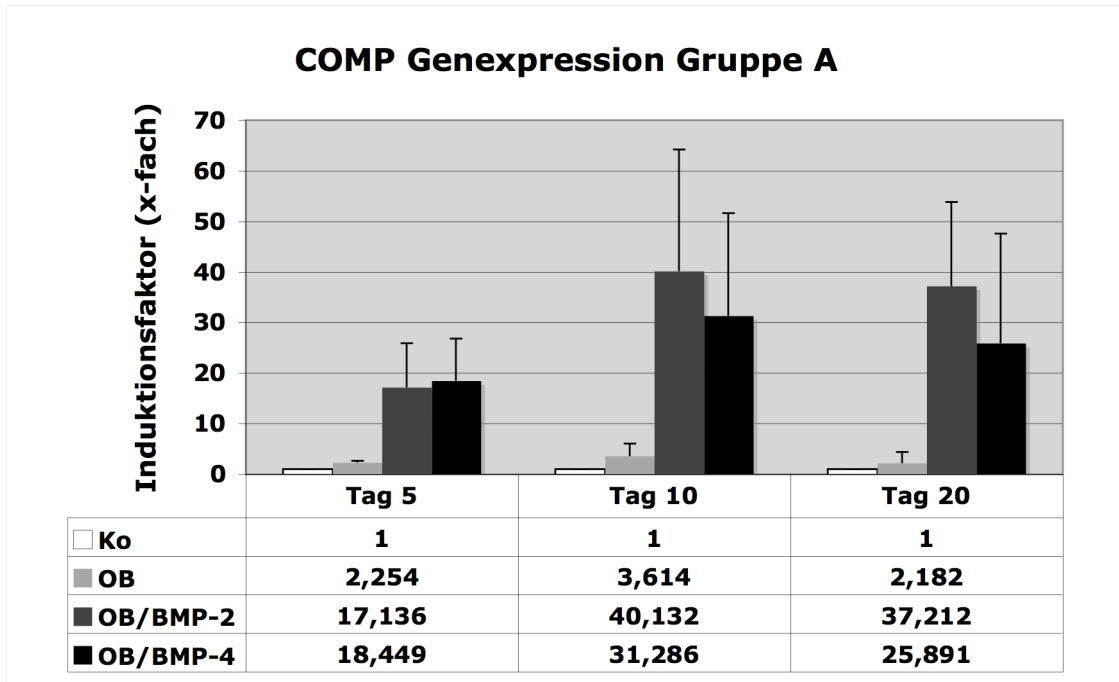


Abb. 32 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Cartilage oligomeric matrix protein (COMP), Gruppe A, n=3.

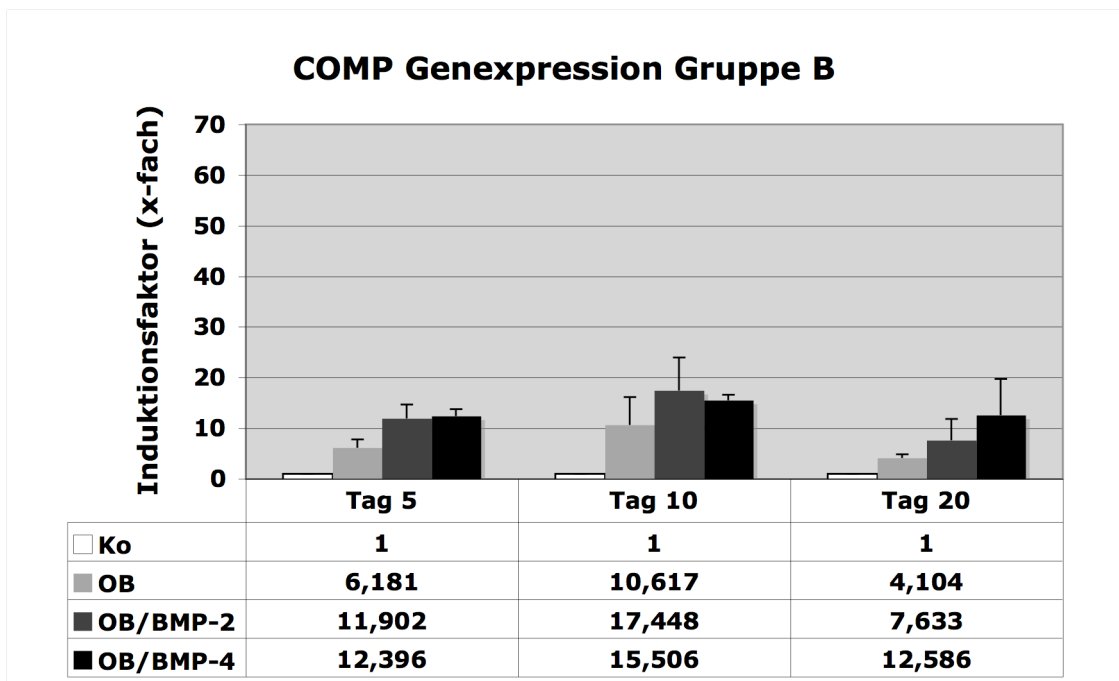


Abb. 33 Quantitativer Nachweis der Genexpression von Cartilage oligomeric matrix protein (COMP), Gruppe B, n=3.

## 4 Diskussion

Trotz weitreichender und zum Teil auch relativ erfolgreicher Entwicklungen im Bereich der Knochenersatzmaterialien ist auch heute noch das autologe Knochentransplantat das Mittel der Wahl für augmentative und restaurative Verfahren in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Die Entnahmemöglichkeiten solcher Transplantate sind jedoch begrenzt und die notwendigen Operationen mit einer relativ hohen Morbidität verbunden. Hierfür birgt das Knochen Tissue Engineering große Möglichkeiten. Einer der wichtigsten Punkte ist dabei die Beschaffung geeigneter autologer Vorläuferzellen, die *in vitro* zu knochenbildenden Zellen reifen können. Hierzu wurden bereits einige Zelltypen, darunter auch Zellen aus dem Knochenmark und dem Periost, untersucht und verwendet [Hutmacher und Sittinger 2003, Jaiswal et al. 1997, Hayashi et al. 2008].

Aktuell sind BMMSCs (bone marrow mesenchymal stem cells) der verbreitetste Forschungsgegenstand im Bereich des Knochen Tissue Engineering. Die Fähigkeit Knochen und Knorpel zu bilden wurde auch bei Zellen aus dem Periost sowohl *in vitro* und als auch *in vivo* festgestellt [Breitbart et al. 1998, Hutmacher und Sittinger 2003, de Bari et al. 2001, de Bari et al. 2006, Nakahara et al. 1991]. Beim Vergleich von Stammzellen aus dem Knochenmark, Periost und Fett adulter Ratten zeigten die aus dem Knochenmark und Periost isolierten Zellen ein den adipogenen Zellen überlegenes chondrogenes Potential [Park et al. 2006]. Nach einer neueren Untersuchung, in welcher das osteogene Potential untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass BMMSCs und PMSCs (periosteal mesenchymal stem cells) den Zellen aus dem Fettgewebe sowohl *in vitro* und als auch *in vivo* überlegen sind. Im Rattenmodell konnten Hayashi und Ko-Autoren Knochenneubildungen nachweisen, wobei in dieser Studie die PMSCs den BMMSCs wiederum unterlegen waren [Hayashi et al. 2008]. Ebenso konnten Jaquierey und Ko-Autoren osteogene Vorteile zu Gunsten der BMMSCs nachweisen, indem sie die Alkalische Phosphatase Aktivität, Kalziumablagerungen und die Genexpression osteoblastärer Marker sowie Knochenbildungsraten an Mäusen gemessen haben [Jaquierey et al. 2005]. Sakaguchi und Ko-Autoren kommen zu dem Resultat, dass das osteogene Differenzierungspo-

tential gleichermaßen bei BMSCs wie auch bei PMSCs vorzufinden ist. Beide zeigten jedoch ein schwächeres Potential als synoviale Stammzellen [Sakaguchi et al. 2005]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte hingegen im Rattenmodell durch Untersuchungen der Genexpression und der Alkalischen Phosphatase Aktivität ein größeres osteogenes Potential auf Seiten der PMSCs im Vergleich zu BMSCs feststellen [Yoshimura et al. 2007]. Ebenso kamen Agata und Ko-Autoren zu dem Ergebnis der Überlegenheit der PMSCs gegenüber den BMSCs. Sie erreichten eine Steigerung des osteogenen Differenzierungsvermögens der PMSCs durch eine Vorbehandlung mit bFGF (basic fibroblast growth factor) und einer zusätzlichen Behandlung mit BMP-2 [Agata et al. 2007]. Zhu und Ko-Autoren gehen sogar davon aus, dass Periostzellen die bessere Wahl darstellen um Knochenbildungsraten im Tissue Engineering zu verbessern [Zhu et al. 2006].

Klinische Anwendungen mit Periostzellen sind noch relativ rar. Indes gelang es Schimming und Schmelzeisen in einer klinischen Studie, bei Kieferhöhlenaugmentationen (sog. Sinuslift) zur Insertion dentaler Titanimplantate mit Hilfe von resorbierbarem Trägermaterial versetzt mit patienteneigenen PMSCs, die über mehrere Wochen in vitro kultiviert und osteogen differenziert worden waren, bereits nach drei Monaten trabekulärer Knochen histologisch nachzuweisen [Schimming und Schmelzeisen 2003]. Diese Methode wurde schon in einer früheren Veröffentlichung am Hasenmodell vorgestellt. Hierbei kamen Perka und Ko-Autoren zu dem Ergebnis, dass PMSCs auf einem resorbierbaren Trägermaterial Knochendefekte kritischer Größe besser regenerieren können als Trägermaterialien ohne Zellen bzw. unbehandelte Knochendefekte [Perka et al. 2000].

Ein entscheidender Vorteil bei der Verwendung periostaler Stammzellen ist der für den Patienten gut zu ertragende und leicht durchzuführende Eingriff zur Entnahme eines kleinen Perioststückes [Jaquiéry et al. 2005, Park et al. 2007, Park et al. 2008]. Dies kann z. B. im Rahmen einer operativen Zahnentfernung unter Lokalanästhesie durchgeführt werden und ist somit mit einer deutlich geringeren Morbidität der Entnahmestelle im Vergleich zur Knochenmarkspunktion verbunden. Zudem ist eine Entnahme von Periost betriebswirtschaftlich gese-

hen effektiver als eine Knochenmarkpunktion. Dieser Aspekt gewinnt in Zukunft immer mehr an Bedeutung.

Ein weiterer Diskussionspunkt stellt das Alter der Spender dar. Dies spielt wohl keine bedeutende Rolle, da nachgewiesen werden konnte, dass Periostzellen älterer Patienten durchaus ein hohes Proliferations- und osteogenes Differenzierungspotential besitzen [De Bari et al. 2006, D'Ippolito et al. 1999, Hutmacher und Sitterling 2003, Jaquiere et al. 2005, Perka et al. 2000, Koshihara et al. 1991]. Im Gegensatz dazu nimmt man aber an, dass das Vorkommen von Vorläuferzellen im Knochenmark mit dem Alter der Patienten abnimmt [D'Ippolito et al. 1999, Huibregtse et al. 2000]. Des Weiteren bleibt das osteogene Differenzierungsvermögen von PMSCs auch in höheren Passagen bestehen, wohingegen BMMSCs mit zunehmendem Zellalter dieses Potential z. T. einbüßen [De Bari et al. 2006].

Bei der Durchführung einer Studie wie dieser kann die Entnahme des Perioststückes Einfluss auf das Ergebnis haben. Wie bereits bekannt befinden sich die Zellen mit Stammzeleigenschaften in der dem Knochen zugewandten Kabi-um-Schicht, wovon aus auch die Frakturheilung ihren Lauf nimmt. Wird bei der Operation nicht darauf geachtet, das Periosttransplantat sehr vorsichtig vom Knochen abzuheben, kann die Kabi-umschicht verletzt oder auf dem Knochen zurückbleiben. Daher ist der Vergleich verschiedener Patienten schwierig, da man sich einer gleichen Qualität des Periostgewebes nie sicher sein kann.

Warum verwendeten wir zur Differenzierung zusätzlich BMPs? Es konnte schon vielfach gezeigt werden, dass der Einfluss von Dexamethason, Vitamin C und  $\beta$ -Glycerophosphat zu einer erfolgreichen osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen führt [Jaiswal et al. 1997, Park et al. 2007]. Diese Med-umzusammensetzung wird in vielen Forschungsarbeiten verwendet. Darüber hinaus haben einige Arbeitsgruppen auch schon BMP-2 als zusätzlichen Faktor für die osteogene Differenzierung untersucht [Agata et al. 2007, Alexander et al. 2008, Iwasaki et al. 1994]. Da aber bereits sehr viele BMPs beschrieben wurden – u. a. BMP-4 –, war es unsere Aufgabe festzustellen, inwiefern sich BMP-2 vs. BMP-4 auf die osteogene Differenzierung der PMSCs auswirkt bzw. ob eins von beiden in der Lage ist, die Osteogenese stärker zu beschleunigen.



### Histologisch-chemische Färbungen als Nachweis der osteogenen Differenzierung

Das Forschungsmaterial, welches für diese Arbeit zur Verfügung stand, konnte man in mehrere Gruppen unterteilen (vgl. 3.1). Untersucht wurden die Gruppen A und B. Gruppe A zeichnete sich dadurch aus, dass die Zellen unter Einfluss aller drei Differenzierungsmedien mineralisiert sind und sich somit extrazelluläre Kalziumphosphat-Präzipitate gebildet haben. In der Gruppe B zeigten die Proben hingegen bei keinem der verwendeten osteogenen Kulturmedien die Fähigkeit zur Mineralisation. Dokumentierbare Unterscheidungsmerkmale zwischen diesen Gruppen stellten zum einen die Kalziumphosphatablagerungen und zum anderen die Sezernierung der Alkalischen Phosphatase dar. Beide Merkmale waren mit ihren spezifischen Färbungen festzustellen.

Die Alkalische Phosphatase (AP) wird von Osteoblasten sezerniert, während diese aktiv sind. Die Aktivität der AP korreliert dabei mit der Menge, in der sie freigesetzt wird. Im menschlichen Organismus wird sie vor allem bei der Frakturheilung und während Wachstumsphasen freigesetzt [Hessle et al. 2002, Johnson et al. 2000]. Entsprechend unserer Erwartungen verstärkte sich die Farbintensität der AP Färbung bei Gruppe A von Tag 5 über Tag 10 bis zu Tag 20 sehr deutlich (vgl. Abb. 10). Gruppe B zeigte hingegen an Tag 5 keine und an Tag 10 und Tag 20 nur eine ganz schwache Färbung, die mit einer sehr geringen Steigerung der Farbintensität verbunden war (vgl. Abb. 11).

Der wichtigste Parameter, um ausgereifte Osteoblasten zu identifizieren, ist jedoch die Deposition von Kalziumphosphat-Präzipitaten [Declercq et al. 2005]. Bei der Untersuchung und Bewertung der osteogenen Differenzierung von peristalen Zellen ist also die Entstehung von mineralisierten Knötchen ein sehr verlässliches Zeichen. Bei der Begutachtung der Gruppe A Proben für die Alizarin und von Kossa Färbungen waren schon an Tag 14 schwarze Knötchen zu erkennen, die über den Untersuchungszeitraum bis zum Tag 20 deutlich zunahmen. Vergleichende Ergebnisse liefern Untersuchungen von Park und Ko-Autoren, die die Zellen jedoch nicht zusätzlich mit BMPs behandelt und einen Untersuchungszeitraum von sechs Wochen angesetzt haben [Park et al. 2007,

Park et al. 2008]. Die Alizarin Färbung verwendeten in ihren Studien u. a. auch De Bari und Ko-Autoren (2006) und Uchimura und Ko-Autoren (2003). Die Von Kossa Färbung wurde u. a. von Park und Ko-Autoren (2007) verwendet. Um mit Sicherheit behaupten zu können, dass die nach der Von Kossa gefärbten Areale auch wirklich eine Kalziumphosphatdeposition und somit eine Knochenbildung in vitro darstellten [Bonewald et al. 2003], führten wir bei allen Patientenproben an Tag 20 sowohl eine Von Kossa als auch eine Alizarin Färbung (vgl. Abb. 6-9) durch.

Mit Hilfe eines Mikroskops ist die Zellmorphologie sehr gut zu beurteilen. Es wurde schon einige Male das fibroblastäre Erscheinungsbild der PMSCs beschrieben [Pittenger et al. 1999, Park et al. 2007]. Park und Ko-Autoren konnten in Untersuchungen feststellen, dass ausschließlich die undifferenzierten Zellproben einen fibroblastären Phenotyp aufzeigten. Die mit Differenzierungsmedium behandelten Zellen zeichneten sich im Gegensatz dazu durch eine kuboidale Form aus. Des Weiteren zeigten die differenzierten Zellen die Eigenschaft Kolonien zu bilden. Nach zwei Wochen waren zum ersten Mal die Kalziumphosphatpräzipitate als schwarze Knötchen erkennbar [Park et al. 2007]. Die Umwandlung in eine kuboidale Form konnten wir stärker ausgeprägt bei Proben der Gruppe A als bei denen der Gruppe B feststellen. Außerdem konnten wir die Bildung von Zellkolonien und auch von schwarzen Knötchen beobachten. Diese Präzipitate sind, wie in den Abb. 8 und 9 zu erkennen, anfärbbar und stellen aufgrund der mineralisierten Matrix generell das Erscheinungsbild osteogen differenzierter Zellen nach spezifischer Färbung dar.

#### Quantitative Bestimmung der Kalziumphosphat-Präzipitate

Da man mittels histologisch-chemischer Färbung ausschliesslich Aussagen über die Qualität, aber nicht die Quantität machen kann, wurde zum erstenmal in unserer Arbeitsgruppe die quantitative Bestimmung des Kalziumphosphatgehaltes etabliert. Die gleiche Methode zur Quantifizierung wurde auch schon von Stanford und Ko-Autoren angewandt, die Mineralisationen einer osteoblastären Zelllinie aufgezeigt haben [Stanford et al. 1995]. Sie ist ebenso in der Tumor-

forschung erfolgreich eingesetzt worden, um Kalzifizierungen nach osteogener Differenzierung von MSCs quantitativ nachzuweisen. Die Ergebnisse dieser Tests untermauerten die Annahme, dass das Fehlen des p53-tumor-suppressor-Gens fördernden Einfluss auf die Entstehung von Osteosarkomen bei Kindern hat [Tataria et al. 2006]. Des Weiteren wurde die Genauigkeit und Sensibilität dieses Verfahrens untersucht. Gegenüber anderen Methoden, die zur Zellextraktion Cetylpyridiniumchlorid (CPC) benutzten, wurde es als genauer und reproduzierbarer befunden [Gregory et al. 2004].

Unsere Ergebnisse zeigten durchweg niedrige Werte für die Gruppe B und für die Gruppe A in 24-Well-Platten (vgl. Abb. 13 und 14). Lediglich an Tag 21 konnte ein relativ hoher Wert unter dem Einfluss des OB-Mediums bei einer Probe der Gruppe A in 24-Well Platten gemessen werden. Bei den restlichen Proben fiel die Alizarin Färbung negativ aus. Dadurch entstand die hohe Standardabweichung. Die Analyse der Proben der Gruppe A in 6-Well Platten (vgl. Abb. 15) hingegen ergab sehr hohe Messwerte für die osteogen differenzierten Proben. Diese Ergebnisse spiegeln die erwartungsgemäß gesteigerte Knochenmatrixproduktion ausdifferenzierter Osteoblasten wieder. Auch der zeitliche Verlauf der Werte zeigt die Entwicklung der Zellen während der osteogenen Differenzierung auf. Nun stellt sich die Frage, aus welchem Grund die gleichen Zellen unter gleichen Bedingungen in 24-Well und in 6-Well Platten nicht die gleichen Ergebnisse liefern. Eine mögliche Ursache könnten unterschiedliche Herstellungsverfahren der 24-Well und der 6-Well Platten sein. Ebenso könnte die Beschichtung der Well-Böden differieren und ungleichmäßig verteilt sein. Da das Verhältnis zwischen Well-Fläche und Zellzahl immer gleich war, stellt die absolute Zellzahl eine weitere denkbare Ursache dar. Eventuell ist eine absolute Mindestzahl von Zellen notwendig, um eine sichere osteogene Differenzierung zu gewährleisten. Derartige Probleme wurden in den Studien, die diese Methode verwendeten jedoch bisher nicht beschrieben.

De Bari und Ko-Autoren untersuchten ebenso die Osteogenese von PMSCs mit Hilfe einer quantitativen Bestimmung des Kalziumgehaltes (andere Methode). Wie wir konnten sie zeigen, dass die Zellproben, die mit osteogenem Medium behandelt wurden, nach drei Wochen einen vielfach höheren Kalziumgehalt im

Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. BMPs kamen dabei jedoch nicht zum Einsatz [De Bari et al. 2006]. Eine Quantifizierung der Mineralisation wurde auch von Hayashi und Ko-Autoren und Uchimura und Ko-Autoren durchgeführt. Erstere konnten zeigen, dass periostale Stammzellen eine deutlich geringere Mineralisation aufwiesen als Zellen aus dem Knochenmark. Die Kulturbedingungen entsprachen unserem OB-Medium. Leider wurden keine BMPs hinzugezogen [Hayashi et al. 2008]. Zweitere wiesen bei einer Osteoblastenzelllinie unter dem Einfluss eines osteogenen Mediums nach 13 Tagen eine deutlich gesteigerte Kalziumkonzentration nach [Uchimura et al. 2003].

Die zusätzlichen Faktoren BMP-2 und BMP-4, die sich positiv auf die Differenzierung unserer PSCMs auswirken sollten, hatten bei dieser Untersuchung keinen nennenswerten Einfluss auf die extrazelluläre Ablagerung von Kalziumphosphat. An Tag 21 waren die Messwerte durch diese Substanzen gegenüber den Zellen, die lediglich mit OB-Medium behandelt wurden, sogar leicht reduziert (vgl. Abb. 15).

Agata und Ko-Autoren untersuchten zum einen den Einfluss verschiedener BMP-2 Konzentrationen und zum anderen die Auswirkungen einer Vorbehandlung von PMSCs mit bFGF auf die osteogene Differenzierung. Die Vorbehandlung mit bFGF verbesserte die Wirkung von BMP-2 eindeutig [Agata et al. 2007]. Die ermittelte effektivste BMP-2 Konzentration wurde auch für die vorliegenden Versuche verwendet. Hanada und Ko-Autoren konnten schon in den neunziger Jahren im Rattenmodell eine Verbesserung des osteogenen Potentials durch diese Kombination erreichen. Sie benutzten jedoch BMMSCs als Forschungsgrundlage [Hanada et al. 1997]. Eine Verbesserung des osteogenen Potentials durch kurze Vorbehandlung mit FGF-2 und FGF-9 und anschließendem Stimulieren mit BMP-2 wurde auch von Fakhry und Ko-Autoren in einer in vitro Studie beschrieben. Sie erreichten damit erhöhte Transkriptionslevel des BMP-2 Gens. Die dafür verwendeten Zellen wurden dem Schädeldach von Hühnerembryos entnommen [Fakhry et al. 2005].

Unseren Ergebnissen zufolge haben BMP-2 und BMP-4 keinen positiven Effekt auf die Osteogenese der Periostzellen. Wenn BMPs keine deutliche Verbesserung im Vergleich zu üblichen osteogen wirkender Substanzen (s. Zusammen-

setzung des OB-Mediums) mit sich bringen, so kann die Verwendung dieser in Frage gestellt werden und es sollte weiter erforscht werden, ob eine Kombination verschiedener BMPs oder aber diverse Vorbehandlungen mit anderen (Wachstums-) faktoren wie bFGF positive Auswirkungen auf die Differenzierung haben. Auch der Einsatz verschiedener BMP-Konzentrationen könnte einen weiteren Ansatz für folgende Forschungsarbeiten darstellen. Die Tatsache, dass manche (wenn auch sehr wenige) Patientenzellen nur unter der Zugabe des OB-Mediums mit BMP-2 oder BMP-4 in der Lage sind osteogen zu differenzieren, deutet darauf hin, dass interindividuelle Unterschiede bezüglich der Signaltransduktion auftreten können. Umso wichtiger erscheint eine Testung der Patientenzellen (bezüglich ihres osteogenen Potentials) vor einer in Frage kommenden Tissue Engineering Applikation.

#### Proliferationsverhalten von PMSCs

Des Weiteren untersuchten wir die Entwicklung der Proliferationsfähigkeit der Zellen während der osteogenen Differenzierung (vgl. 2.4). Die während der Osteogenese ausdifferenzierten Osteoblasten sezernieren extrazelluläre Knochenmatrix aus Kollagenen und Kalziumphosphat und gehen im Laufe dieses Prozesses in Apoptose. Dies bedeutet ebenso, dass die mitochondriale Aktivität nachlässt bzw. schlussendlich verloren geht. Der Differenzierungsgrad der Zellen nimmt daher auf Kosten der Proliferationsfähigkeit zu [Aubin 2001].

Das verwendete Versuchskit basiert, wie in 2.4 beschrieben, auf der Verstoffwechslung eines den Zellen zugeführten Substrates. Je langsamer die Proliferationsraten der Zellen sind, desto weniger Substrat wird in den Zellen umgesetzt, was letztendlich zu einem niedrigeren Messergebnis führt. Zellen, die ausschließlich mit Kontrollmedium behandelt wurden, sollten also sowohl bei Patientenmaterial der Gruppe A als auch der Gruppe B keiner osteogenen Differenzierung unterliegen und somit hohe bzw. etwa gleiche Proliferationsraten aufweisen. Dies zeigt sich im kontinuierlichen Verlauf der Messwerte von Tag 5 bis Tag 20 (vgl. Abb. 16). Im Gegensatz dazu zeigen die Zellproben, die mit Differenzierungsmedien behandelt wurden, eine im Vergleich zu den entspre-

chenden Kontrollen deutliche Minderung der Werte entlang der Zeitachse. Dieses Phänomen konnte auch bereits in der Dissertationsarbeit von P. Kalkreuter, derselben Arbeitsgruppe angehörend, beobachtet werden (hier wurde jedoch nicht zwischen kalzifizierenden und nicht kalzifizierenden Zellen unterschieden). Die deutlich reduzierten Proliferationsraten an Tag 20 korrelieren mit einem höheren Differenzierungsgrad der PMSCs, der bereits durch den quantitativen Nachweis einer hohen Kalziumphosphat-Deposition an Tag 21 dargelegt werden konnte (vgl. Abb. 15). Bei den Ergebnissen der Gruppe B (vgl. Abb. 17) zeigten die mit Differenzierungsmedien kultivierten Proben im Vergleich zu ihren Kontrollen wider Erwarten auch eine Reduktion der Messwerte. Dies bedeutet, dass die Zellen eine geringere Zellaktivität bzw. Proliferationsrate aufwiesen als ihre Kontrollen, obwohl mit entsprechenden Färbungen nachgewiesen werden konnte, dass sie unter den gegebenen Bedingungen nicht zur osteogenen Differenzierung fähig waren. Die Reduktion der Proliferation fiel bei den mineralisierenden Periostzellen der Gruppe A jedoch deutlich ausgeprägter aus als bei der Gruppe B.

Einige Studien haben die Proliferation der Zellen während der osteogenen Differenzierung untersucht. Beim Vergleich von Periostzellen mit Knochenmarkszellen konnte eine deutlich höhere Proliferationsrate seitens der Periostzellen beobachtet werden. Um dies festzustellen wurde jedoch die Methode des direkten Auszählens gewählt [Agata et al. 2007]. Auch konnte bereits beobachtet werden, dass die Fähigkeit zur Proliferation zwischen Zellproben verschiedener Spender stark variieren kann. Im und Ko-Autoren untersuchten *in vitro* humane BMMSCs und Zellen einer Osteoblastenzelllinie [Im et al. 2004]. Bei unseren Untersuchungen waren die Unterschiede diesbezüglich nicht sehr groß, was aber aufgrund der kleinen Stichprobenzahl doch zu relativ großen Standardabweichungen geführt hat, wie z. B. an Tag 5 bei der Kontrolle der Gruppe B (Abb. 17) zu sehen ist. Wie bereits erwähnt besitzen PMSCs von Beginn der Kultivierung an ein großes Proliferationsvermögen, das bis in hohe Passagen erhalten bleibt [Sakaguchi et al. 2005, De Bari et al. 2006]. Da die Zellproben der verschiedenen Spender (wie oben beschrieben) kein gleich großes Proliferationspotential aufwiesen und die Zellen z. T. nicht für alle Versuchsansätze

ausreichen, flossen automatisch Zellen verschiedener Passagen mit in den Versuch ein (Passage 5-7 wurde verwendet). Auch wenn sich die Proben bereits in der siebten Passage befanden, zeigten sie ein immer noch hohes Proliferationspotential auf. Die Reduktion der Proliferation bei den Proben der Gruppe B, die mit Differenzierungsmedien behandelt worden waren, war aus o. g. Gründen nicht zu erwarten. Zudem konnte eine osteogene Differenzierung dieser Proben durch eine negative Alizarin- und Von Kossa Färbung sicher ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 9). Die Ergebnisse lassen also vermuten, dass die verwendeten osteogenen Faktoren einen hemmenden Effekt auf die Proliferationsrate haben, obwohl diese anfänglich die Proliferation der Zellen ankurbeln. Entsprechendes konnte bei der Vorbehandlung periostaler Zellen mit bFGF [Agata et al. 2007] und durch den Einfluss von BMP-2 beobachtet werden [Iwasaki et al. 1994]. Weiterhin spielt sicherlich durch die hohe Dichte des Zellrasens die Kontaktinhibition eine wichtige Rolle.

Alexander und Ko-Autoren, derselben Arbeitsgruppe angehörend, untersuchten die Proliferationsfähigkeit der auf OPLA-Scaffolds ausgesäten Periostzellen mit derselben Methode. Die Zellen wurden ausschließlich BMP-4 mit den gleichen Differenzierungsmedien behandelt. Die Untersuchungszeitpunkte waren die Tage 3, 8 und 14 [Alexander et al. 2008]. Über den Zeitraum der Differenzierung der 3D-Kultur konnte man erkennen, dass die Proliferationsfähigkeit der mit Differenzierungsmedien behandelten Zellen an Tag 8 und Tag 14 im Vergleich zur Kontrolle leicht reduziert war. Ebenso wie bei unseren Ergebnissen, konnte kein deutlicher Unterschied durch den Zusatz von BMP-2 erzielt werden. An Tag 3 konnte im Vergleich zur Kontrolle eine Erhöhung der Proliferation mit dem OB-Medium und nochmals durch den Zusatz von BMP-2 erzielt werden. Diesen Effekt konnten wir in der 2D-Kultur trotz gleicher Methodik nicht beobachten. Dies ist jedoch schwierig zu bewerten, da die Untersuchungszeitpunkte und die Kultivierungsmethode (3D- vs. 2D-Kultur) nicht identisch waren.

Ein Limitation dieser Methode ist es, dass ausschließliche die metabolische Zellaktivität gemessen wird und man nur Rückschlüsse auf die Proliferationsfähigkeit bzw. die Proliferationsrate ziehen kann. Diese Problematik wurde auch schon in einer früheren Untersuchung festgestellt [Alexander et al. 2008]. Ob-

wohl eine absolute Zellzählung repräsentativere Ergebnisse die Proliferation betreffend erzielen kann, wurde diese Methode bewusst gewählt. Problematisch bei der Auszählmethode ist die Tatsache, dass die 2D-Kultur mit zunehmendem Differenzierungsgrad extrem stark am Wellboden haftete. Die Zellen ließen sich mit Trypsin vom Boden der Wells ablösen, sie waren jedoch schlecht voneinander trennbar. Die Trennung der Zellen ist allerdings unabdingbar, da die absolute Zellzählung mittels Zählkammer nur dann repräsentativ ist, wenn eine Einzelzellsuspension vorliegt. Diese Schwierigkeit trat auch bei unserer Methode bei der Zählung der Zellen ein Tag vor der Messung (siehe 2.4) auf. Da es sich aber bei 3000 Zellen pro Well um eine verhältnismäßig kleine Zellzahl handelt, hat der dadurch entstandene Fehler kaum Relevanz.

BMP-2 und BMP-4 hatten, entgegen der Erwartungen, keinen bis nur wenig Einfluss auf die Proliferation der Zellen. Daraus kann man folgern, dass keine der beiden morphogenen Proteine sich im Vergleich zum anderen besonders positiv oder negativ auf die Proliferationsfähigkeit von PMSCs während der osteogenen Differenzierung auswirkt.

#### Genexpression während der osteogenen Differenzierung

In unserer Studie galt es außerdem herauszufinden, ob die Induktion mit BMP-4 vs. BMP-2 einen fördernden oder einen hemmenden Einfluss auf die Genexpression der Periostzellen mit sich brachte. Bei den quantitativen Bestimmungen des Kalziumphosphatgehaltes und den histochemischen Färbungen konnte kein ausgeprägter Unterschied zwischen beiden Wachstums- und Differenzierungsfaktoren erkannt werden. Beide führten entgegen den Erwartungen sogar eher zu einer Verschlechterung der Ergebnisse im Gegensatz zu den Proben, die nur mit OB-Medium behandelt wurden.

Untersucht wurde die Genexpression der Alkalischen Phosphatase (AP) und des Kollagen I  $\alpha 1$  (Koll1 $\alpha 1$ ), welche Frühmarker der Osteogenese darstellen [Igarashi et al. 2004, Kim et al. 2003], sowie die Genexpression des Osteopontin (OPN) und Osteokalzin (OC), die auch als sog. Spätmarker der osteogenen Differenzierung bekannt sind [Park et al. 2007, Park et al. 2008]. Zudem waren



auch die Transkriptionsfaktoren Runx2 und Osterix (OSX), Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) und Isuline like growth factor 2 (IGF-2) Forschungsgegenstand.

AP wird bei Osteoblasten, die Knochenmatrix produzieren, vermehrt synthetisiert, so dass eine erhöhte Expression dieses Enzyms auf eine beginnende Mineralisation hindeutet. Schon Anfang der neunziger Jahre konnten Ono und Ko-Autoren im Hasenmodell eine deutliche Steigerung der AP Aktivität nach Behandlung mit BMP, welches aus dem langen Röhrenknochen des Kaninchens gewonnen wurde, erkennen. Hierbei wurde jedoch die Genexpression noch nicht quantifiziert [Ono et al. 1992]. Von BMP-2 weiß man, dass es einen stimulierenden und zeitverkürzenden Effekt auf die Osteogenese periostaler Zellen hat, zudem wird die Proliferation der Zellen nachweislich inhibiert. Die AP-Expression wird durch BMP-2 gesteigert. [Iwasaki et al. 1994]. Dies können wir nach unseren Untersuchungen auch vermuten. Durch die Zusätze BMP-2 und BMP-4 konnte eine 1,5 bis 2-fach (bezogen auf die Mittelwerte) höhere AP Expression an Tag 5 und Tag 10 im Vergleich zu den Proben, die mit OB-Medium behandelt wurden, gemessen werden (vgl. Abb. 18). BMP-2 schien diesen Effekt etwas mehr als BMP-4 zu verstärken. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Werten der Gruppe B (vgl. Abb. 19), konnte eine höhere Tendenz von BMP-4 im Vergleich zu BMP-2 auf die AP Expression festgestellt werden. Vedingt durch die hohen Standardabweichungen kann jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Zu einem erhöhten Expressionslevel von AP in der frühen Phase der Osteogenese kamen auch Frank und Ko-Autoren, die BMMSCs mittels FGF-2 und OB-Medium differenzierten [Frank et al. 2002], und Agata und Ko-Autoren, die PMSCs mit bFGF und BMP-2 zur osteogenen Differenzierung anregten [Agata et al. 2007]. Ebenso beschrieben Park und Ko-Autoren eine erhöhte AP Expression in der zweiten Woche der Osteogenese. Sie differenzierten PMSCs mit OB-Medium ohne zusätzliche Faktoren [Park et al. 2007]. In einer Untersuchung von Alexander und Ko-Autoren konnte dargelegt werden, wie sich die Genexpression periostaler Zellen in der 3D-Kultur an Tag 12 der osteogenen

Differenzierung gegenüber einer unbehandelten Kontrolle verhielt. BMP-4 wurde hier nicht eingesetzt, jedoch konnte durch BMP-2 als Zusatz zum OB-Medium eine deutlich gesteigerte Expression der Gene für *Osx*, *Runx2* und *IGF-2* erzielt werden. Bezüglich der AP Genexpression konnte in der 3D-Kultur keine Steigerung durch BMP-2 erzielt werden. Deutliche Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe konnten durchgehend festgestellt werden. Alle Daten wurden mittels quantitativer PCR erhoben [Alexander et al. 2008]. In einer späteren Publikation konnten die Ergebnisse betreffend der Wirkung von BMP-2 auf die AP Genexpression in der 2D-Kultur bestätigt werden [Alexander et al. 2009].

Der Transkriptionsfaktor *Osx* ist entscheidend für die Skelettentwicklung und für die osteoblastäre Differenzierung [Levi et al. 2002, Lee et al. 2003, Nakashima et al. 2002]. Während der Skelettentwicklung reguliert er die Transkription unterhalb des Transkriptionsfaktors *Runx2* [Lee et al. 2003, Nakashima et al. 2002]. Des Weiteren wurde die Wirkung von *Osx* während der Osteogenese dadurch belegt, dass *Osx*-transfizierte Stammzellen aus dem Fettgewebe der Maus in der Lage waren osteogen zu differenzieren [Wu et al. 2007]. *Runx2* ist ein von Osteoblasten exprimierter Transkriptionsfaktor, der u. a. die Osteokalzinsynthese reguliert [Ducy et al. 1997]. Im Verlauf der osteoblastären Differenzierung wird die *Runx2* Expression hochreguliert und wird im Osteozyten wieder herunterreguliert. *Runx2* fördert die Osteogenese der MSCs bei gleichzeitiger Inhibition der adipozytären Differenzierung, indem er die Produktion von Knochenmatrix-Proteinen in reifen Osteoblasten kontrolliert [Komori T. 2000]. Im Mausmodell konnte zudem gezeigt werden, dass eine fehlende *Runx2* Expression dazu führt, dass die Zellen nicht in der Lage sind zu mineralisieren. Mäuse mit einem deletiertem *Runx2* Gen waren nicht zur Skelettogenese befähigt [Komori et al. 1997, Ducy et al. 1997]. Bei einer Untersuchung an einer murinen Osteoblastenzelllinie konnte mit Hilfe der PCR demonstriert werden, dass BMP-7 einen positiven Einfluss auf die *Runx2* Genexpression hatte [Gu et al. 2004]. Wir konnten zeigen, dass mit fortschreitender Osteogenese die Expression von *Runx2* bei der Gruppe A bis zu Tag 20 deutlich gegenüber den unbehandelten

Kontrollen und den entsprechenden nicht kalzifizierten Proben der Gruppe B erhöht war (vgl. Abb. 28 und 29). Die Zugabe von BMP-2 und BMP-4 hatte keinen fördernden oder hemmenden Einfluss auf die Runx2 Expression. Die Ergebnisse der quantitativen PCR bezüglich der Osx Expression (vgl. Abb. 30 und 31) zeigten wider Erwarten durchgehend niedrige Induktionsfaktoren der Gruppe A und relativ hohe bei den Proben der Gruppe B. Hierbei schien die BMP-2/BMP-4 Behandlung der Zellen die Osx Expression stark zu induzieren. Diese Ergebnisse sind jedoch fraglich aufgrund der extrem geringen detektierten Kopienzahlen, die eine genaue Quantifizierung der Osx Genexpression stark erschweren.

Alexander und Ko-Autoren beschrieben deutlich erhöhte Transkriptionslevel der Transkriptionsfaktoren Osx und Runx2 bei den Proben, die zusätzlich mit BMP-2 in der 3D-Kultur aktiviert wurden [Alexander et al. 2008]. Frank und Ko-Autoren konnten durch die FGF-2 und OB Behandlung nur schwach erhöhte Expressionslevel von Runx2 nachweisen [Frank et al. 2002]. Eine andere Publikation demonstrierte mittels quantitativer PCR, dass mit OB-induzierte PMSCs nur leicht erhöhte Expressionslevel sowohl von Osx als auch von Runx2 zeigten [De Bari et al. 2008].

Der organische Anteil des menschlichen Knochens besteht zu 98 % aus extrazellulärer Knochenmatrix, die wiederum fast ausschließlich Kollagen Typ I enthält [Soldner und Herr 2001, Vuorio und Crombrughe 1990]. Kollagen Typ I soll Untersuchungen zu Folge eine hohe Vorhersagekraft für das osteogene Potential mesenchymaler Stammzellen darstellen. Diese Erkenntnis basiert auf einem mathematischen Modell, welches zeigt, dass die Expression von Kollagen Typ I mit einer hohen Kalziumdeposition korreliert [De Bari et al. 2008]. Ebenso wie die AP stellt das Kollagen Typ I ein Frühmarker der Osteogenese dar [Igarashi et al. 2004, Kim et al. 2003].

Entgegen der allgemein vertretenen Meinung, zeigten die differenzierten Periozyten eine nur leichte Induktion der Kollagen I Expression in Gruppe A an Tag 5 und in Gruppe B an Tag 5 und 10. An Tag 20 der Osteogenese war die Kollagen I Expression in beiden Gruppen eher herunterreguliert. BMP-2 sowie

BMP-4 zeigten auch bei dieser Untersuchung keinen bedeutenden Einfluss auf die Genexpression. Hierbei ist zu bemerken, dass die Grundexpressionslevel von Koll $\alpha$ 1 in den Periostzellen extrem hoch waren und die Expressionslevel des Haushaltsgens GAPDH z. T. überstiegen. Aus dem Grund ist es fraglich, ob eine weitere Induktion der Kollagen I Expression sich auf die Zelle nicht eher schädlich auswirken würde. Außerdem wurden die Kollagen I Untersuchungen nur auf Gen- und nicht auf Proteinebene durchgeführt, sodass wir keine Rückschlüsse auf die Proteinexpression von Kollagen I ziehen können.

Bei der Analyse humaner PMSCs konnten Samee und Ko-Autoren in Proben, die mit BMP-2 und der Kombination von BMP-2 und VEGF behandelt wurden gegenüber, Proben, die ausschließlich mit OB-Medium behandelt wurden, eine signifikant höhere Transkriptionsrate von Koll $\alpha$ 1 nach vier und acht Wochen ermitteln [Samee et al. 2008]. Im Gegensatz dazu beschreiben einige Publikationen, übereinstimmend mit unseren Daten, eine Herunterregulierung der Kollagen I Expression während der Osteogenese der Periostzellen. Eine ausgeprägte Reduktion der Koll $\alpha$ 1 Genexpression über den Zeitraum vom siebten bis zum 28. Untersuchungstag zeigt eine Analyse, in der humane PMSCs mittels osteogenem Medium in Scaffolds differenziert wurden und die Genexpression mit Hilfe der quantitativen PCR gemessen wurde [Zheng et al. 2006]. Eine Studie von Agata und Ko-Autoren belegte, dass eine Vorbehandlung mit bFGF die Koll $\alpha$ 1 Expression gegenüber der unbehandelten Kontrollen nicht positiv beeinflusste [Agata et al. 2007]. In einer weiteren Studie an humanen PMSCs konnte bis zu Tag 9 der osteogenen Differenzierung eine deutliche Reduktion der Koll $\alpha$ 1 Transkriptionslevels gegenüber der unbehandelten Kontrolle detektiert werden [Ringe et al. 2008].

Aktive Osteoblasten synthetisieren nicht nur Kollagen Typ I, das Protein der Knochenmatrix, sondern auch weitere Proteine wie Osteokalzin und Osteopontin. Zudem sezernieren sie Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , BMPs, PDGF und IGF, die in der Knochenmatrix gespeichert werden [Hauschka et al. 1986]. OPN ist dabei nicht nur für die Knochenbildung notwendig, sondern hat ebenfalls ei-

nen regulierenden Einfluss auf die Hämatopoese [Haylock und Nilsson 2006, Nilsson et al. 2005].

Betrachtet man unsere Ergebnisse bezüglich der OPN und OC Genexpression so ist zu erkennen, dass die differenzierten Proben der Gruppe A ca. 2-fach höhere Expressionslevel an Tag 10 und 20 für OPN und an Tag 20 für OC auswiesen (vgl. Abb. 24 und 26) als in den Proben der Gruppe B. Alle entsprechenden Proben der Gruppe B (vgl. Abb. 25 und 27) befanden sich in etwa auf dem Niveau der unbehandelten Kontrollen. Lediglich bei der Untersuchung von OPN konnte an Tag 5 für OB/BMP-2 ein herausstechend hoher Wert mit entsprechend hoher Standardabweichung ermittelt werden. Dieser ist vermutlich auf ein Messfehler und/oder die geringe Stichprobenzahl zurückzuführen und hat somit keine Relevanz und Aussagekraft. Die Zusätze BMP-2 und BMP-4 stellten auch für die Genexpression der Marker OC und OPN keinen beeinflussenden Faktor dar.

Agata und Ko-Autoren fanden mittels nicht quantitativer PCR heraus, dass OPN bei PMSCs sowohl unter BMP-2 als auch unter bFGF Behandlung induziert wurde, aber nicht bei der Kombination beider Faktoren. Eine erhöhte OC Genexpression konnte bei differenzierenden PMSCs nicht festgestellt werden, sondern nur bei entsprechenden Untersuchungen der BMSCs [Agata et al 2007]. Diese Erkenntnisse basieren auf Messungen am sechsten Tag der Differenzierung. Fraglich ist natürlich, ob nach bereits sechs Induktionstagen erhöhte Transkriptionslevel eines Spätmarkers der Osteogenese (Osteokalzin) erwartet werden kann. Entsprechend der Ergebnisse in diesem zeitlichen Rahmen zeigte OPN an Tag 5 unserer Untersuchungen bereits leicht erhöhte Expressionslevel sowohl unter OB, OB/BMP-2 als auch OB/BMP-4 Behandlung. Die analogen Werte für OC waren zu diesem Zeitpunkt noch unterhalb ihrer Kontrolle. Park und Ko-Autoren konnten zeigen, dass die OC Expression mit dem Fortschreiten der Osteogenese korreliert. Deutlich gesteigerte Expressionslevel konnten, übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, schon ab der zweiten und dritten Woche beobachtet werden [Park et al. 2007]. Auch De Bari und Ko-Autoren untersuchten mit Hilfe der quantitativen PCR die Knochenmarker OPN und OC im Laufe der osteogenen Differenzierung von PMSCs. Diese konnten in

in vitro untersuchten Kulturen kaum nachgewiesen werden, zeigten jedoch in vivo (subkutane Zell-Kollagen-Transplantate in Mäusen) nach vier und acht Wochen eine deutlich erhöhte Genexpression. Morphogene Substanzen wie BMPs wurden nicht eingesetzt [De Bari et al. 2006]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte erhöhte Expressionslevel von OC, AP und Koll $\alpha$ 1 in mit BMP-2 und VEGF transfizierten PMSCs in vitro und eine erhöhte Knochenbildung in vivo nachweisen [Samee et al. 2008].

Der Wachstumsfaktor IGF wurde zum einen bereits als Regulator für die anabolische Aktivität des parathyroidalen Hormons (PTH) in der Maus beschrieben [Bikle et al. 2002], zum anderen beeinflusst IGF aber auch die Proliferation von Osteoblasten [Kasukawa et al. 2002]. Die Arbeitsgruppe um Wang und Bikle veröffentlichte zudem eine Publikation, die in Tierversuchen mit Mäusen zeigt, dass IGF eine wichtige Rolle während der embryonalen Skelettentwicklung spielt [Wang et al. 2006].

Nach unseren Untersuchungen steigerten sich die Expressionslevel von IGF-2 über den zeitlichen Verlauf von Tag 5 bis Tag 20 deutlich sowohl bei der Gruppe A als auch bei der Gruppe B (vgl. Abb. 22 und 23). Vergleicht man die beiden Gruppen miteinander, erkennt man an Tag 5 näherungsweise gleich große Werte, jedoch an Tag 10 deutlich höhere Werte auf Seiten der Gruppe B (ca. 2-fach erhöht im Vergleich zu Gruppe A). An Tag 20 lagen die Werte beider Gruppen für die Proben, die mit OB-Medium und mit OB/BMP-4-Medium behandelt wurden, auf gleichem Niveau. Lediglich BMP-2 hatte in der Gruppe A an Tag 20 einen hemmenden Einfluss auf die IGF-2-Transkriptionsraten.

Palermo und Ko-Autoren untersuchten in vitro an Osteoblasten der Ratte die Genexpression von IGF-1 und IGF-2 während der Osteogenese und konnten mittels semiquantitativer PCR für beide Proteine gesteigerte Transkriptionslevel an Tag 3 und 6 der Differenzierung nachweisen [Palermo et al. 2004]. Eine andere Arbeitsgruppe, die die Genexpression von IGF-1 während der osteogenen Differenzierung von MSCs aus Ratten untersuchte, fand mittels quantitativer PCR jedoch wiederum heraus, dass sowohl an Tag 8 als auch an Tag 14 und 20 die Expression von IGF-1 gegenüber der Kontrolle vermindert war [Jia und

Heersche 2002]. Eine weitere Publikation unserer Arbeitsgruppe zeigt, dass der Einfluss von BMP-2 (als Zusatz zum OB-Medium) auf PMSCs ausgesät in OPLA-Scaffolds eine deutlich gesteigerte Genexpression von IGF-2 mit sich bringt. Für diese Untersuchungen wurden nur Periostzellproben verwendet, die in der Lage waren *in vitro* zu mineralisieren [Alexander et al. 2008]. Nach unseren Ergebnissen ist die Genexpression von IGF-2 kein deutliches Unterscheidungsmerkmal zwischen den PMSCs der Gruppen A und B. Ebenso haben die Morphogene BMP-2 und BMP-4 keinen nennenswerten Einfluss auf die IGF-2 Expression unserer Zellen.

Zuletzt wurde die Genexpression des COMP untersucht. COMP ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix des Gelenkknorpels und ein Protein, welches nachweislich ein Marker für die Chondrogenese ist [Mehlhorn et al 2006, Zaucke et al. 2001]. Auf dem Feld der osteogenen Differenzierung haben Jeong und Ko-Autoren im Mausmodell gezeigt, dass COMP-Ang1, eine Angiopoietin-Variante, die BMP-2 induzierte Osteogenese steigern kann. Nachgewiesen wurde dies durch die Messung erhöhter AP-Aktivität und OC Genexpression [Jeong et al. 2010].

Unsere Ergebnisse zeigten eine deutlich erhöhte COMP Genexpression bei den Proben der Gruppe A, die zusätzlich mit BMP-2- und BMP-4- behandelt wurden, und zwar an Tag 5, 10 und 20 (vgl. Abb. 32). Die Supplementierung von BMP-2 scheint zudem einen etwas größeren Einfluss als BMP-4 auf die Genexpression vom COMP zu haben. Diese starke Induktion war in Gruppe B weniger ausgeprägt (vgl. Abb. 33). Die reine OB Behandlung der Zellen brachte eine viel schwächere COMP-Induktion mit sich mit einem Expressionsmaximum an Tag 10. Die Induktionsfaktoren der Gruppe A blieben während des gesamten Untersuchungszeitraums unter denjenigen der Gruppe B. COMP stellt, wie bereits erwähnt, einen Marker für die Chondrogenese dar. Aus dem Grund ist es nicht verwunderlich, dass dieses Protein während der Osteogenese exprimiert wird, da die Osteogenese über eine anfängliche chondrale Differenzierung abläuft. Die höheren Induktionsfaktoren der Gruppe B könnten evtl. auf ein hö-

heres chondrogenes Potential dieser Zellen hindeuten, was jedoch rein spekulativ ist.

Publikationen, die die Genexpression dieses Proteins während der osteogenen Differenzierung von PMSCs untersuchen, gibt es bis heute nicht.

Studien, in welchen die Wirkung von verschiedenen BMPs vergleichend gegenübergestellt wird, sind rar. Beim Vergleich des Effekts verschiedener BMPs auf die in vitro Chondrogenese von BMMSCs konnten Skiya und Ko-Autoren Vorteile zu Gunsten von BMP-2 im Gegensatz zu BMP-4 und BMP-6 darlegen [Sekiya et al. 2005]. Arosarena und Collins verglichen den Einfluss von BMP-2 und BMP-4 auf die Regeneration verschieden großer Knochendefekte im Rattenmodell. Wie wir konnten auch sie keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen Faktoren ermitteln. Leichte Unterschiede waren lediglich in der Qualität der Knochenbildung bezüglich der Ausbildung von kortikalen und trabekulärem Knochen zu Gunsten von BMP-4 auszumachen [Arosarena und Collins 2005]. In einer anderen Publikation wurden rhBMP-4 (recombinant human BMP-4), bovines BMP und Platelet-rich plasma (PRP) vergleichend analysiert. Auch hier kam man zu keinem nennenswerten positiven oder negativen Ergebnis für BMP-4 gegenüber den anderen Faktoren [Hu et al. 2009]. Des Weiteren hat keine Forschungsgruppe bisher den gesundheitlichen Zustand der Spender für PMSCs mit in die Ergebnisse einfließen lassen. Dies wäre ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen und auch Metastudien.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit durch die zusätzlichen Differenzierungsfaktoren BMP-2 bzw. BMP-4 keine relevanten Auswirkungen auf die osteogene Differenzierung periostaler Stammzellen nachgewiesen werden. Dies konnte sowohl durch histologisch-chemische Färbungen, quantitative Nachweise des Kalziumgehaltes und der Genexpression sowie Proliferationstests belegt werden.



## 5 Zusammenfassung

Es ist heute bereits bekannt, dass humane periostale mesenchymale Stammzellen (PMSCs) eine verheissungsvolle und aussichtsreiche Grundlage für ein erfolgreiches Knochen Tissue Engineering darstellen. In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sowie in der zahnärztlichen Chirurgie stellt bis heute das autologe Knochentransplantat das Mittel der Wahl dar, um Knochendefekte zu rekonstruieren. Da die Entnahmemöglichkeiten hierfür begrenzt sind, gibt es im Bereich des Tissue Engineerings Anstrengungen, die osteogene Differenzierung genauer zu charakterisieren, um diese Erkenntnisse gewinnbringend einsetzen zu können. Da BMP-2 und BMP-4 nachweislich Regulatoren der Osteogenese sind, bestand die Aufgabe der vorliegenden Arbeit darin, die Wirkung derer auf die osteogene Differenzierung humaner PMSCs zu untersuchen. Diese Analyse umfasste die Genexpression, das Proliferationsverhalten und die Fähigkeit der Periostzellen zur Kalzifizierung unter dem Einfluss beider Faktoren.

Nach der Entnahme eines Perioststückes wurden daraus die Zellen isoliert und mit Hilfe von osteogenem Medium, mit oder ohne BMPs kultiviert und differenziert. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde an Tag 5, 10 und 20 der Osteogenese, die Alizarin- und von Kossa Färbungen für den Nachweis der Kalziumphosphatablagerungen an Tag 20 der Differenzierung durchgeführt. Die Proliferationsfähigkeit und der Kalzifizierungsgrad wurden ebenso wie die Genexpression über den Verlauf der Differenzierung untersucht und quantitativ bestimmt.

Aus diesen Untersuchungen heraus konnten wir zwei Gruppen von PMSCs unterscheiden: eine Zellgruppe, die in vitro erfolgreich kalzifiziert ist, und eine Gruppe, die zur Mineralisation nicht befähigt war. Diese beiden Gruppen wurden vergleichend in Hinblick auf den Einfluss von BMP-2 und BMP-4 analysiert.

Das Proliferationsverhalten nahm im Laufe der Differenzierung ab, die Mineralisation zu. Dies konnte für die Proben, die kalzifiziert sind, mit Hilfe der beschriebenen Tests und Färbemethoden eindeutig nachgewiesen werden. Ge-

genteilige Ergebnisse lieferte die andere Zellgruppe. Die Genexpression bekannter osteogener Marker wie Runx2, Osteopontin, Osteokalzin und der Alkalischen Phosphatase konnten mittels quantitativer real-time PCR verstärkt bei den mineralisierten Proben nachgewiesen werden. Kollagen Typ I, IGF-2 und Osterix zeigten dies wider Erwarten nicht. Einzig bezogen auf die Analyse der COMP Genexpression konnte ein positiver Effekt der Morphogene BMP-2 und BMP-4 nachgewiesen werden, jedoch stellt COMP keinen eindeutigen osteogenen Marker dar, auch wenn er während der Osteogenese eine Rolle spielen könnte. Beim Vergleich dieser beiden Faktoren zeigte sich bei allen durchgeführten Untersuchungen, dass weder BMP-2 noch BMP-4 eine vorteilhafte Wirkung auf die osteogene Differenzierung unserer Periostzellen ausübte.

Weitere Forschungen sollten in Hinblick auf Konzentrationen und diverse Kombinationen bzw. Vorbehandlungen mit anderen Faktoren durchgeführt werden. Des Weiteren sollte eruiert werden, warum nicht alle Zellproben aus Periost kalzifizierbar sind. Unterscheidungsmerkmale sollten untersucht werden, um homogenere Zellpopulationen für weitere Untersuchungen generieren zu können. Zudem wäre es sinnvoll eine standardisierte Methode zur Periostentnahme am Patienten zu etablieren, um reproduzierbarere Ergebnisse erzielen zu können und um den Erfolg von Tissue Engineering Applikationen zu steigern.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Agata H., Asahina I., Yamazaki Y., Uchida M., Shinohara Y., Honda M.J., Kagami H., Ueda M.: *Effective bone engineering with periosteum-derived cells*. J Dent Res 2007; 86(1): 79-83
- 2 Alexander D., Hoffmann J., Munz A., Friedrich B., Geis-Gerstorfer J., Reinert S.: *Analysis of OPLA scaffolds for bone engineering constructs using human jaw periosteal cells*. J Mater Sci Mater Med 2008; 19(3): 965-974
- 3 Alexander D., Schäfer F., Munz A., Friedrich B., Klein C., Hoffmann J., Bühring H.J., Reinert S.: *LNGFR induction during osteogenesis of human jaw periosteum-derived cells*. Cell Physiol Biochem 2009; 24(3-4): 283-290
- 4 Arosarena O., Collins W.: *Comparison of BMP-2 and -4 for rat mandibular bone regeneration at various doses*. Orthod Craniofac Res 2005; 8(4): 267-276
- 5 Aubin J.E.: *Regulation of osteoblast formation and function*. Rev Endocr Metab Disord 2001; 2(1): 81-94
- 6 Aubin J.E., Liu F., Malaval L., Gupta A.K.: *Osteoblast and chondroblast differentiation*. Bone 1995; 17(2 Suppl): 77S-83S
- 7 Baksh D., Song L., Tuan R.S.: *Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy*. J Cell Mol Med 2004; 8: 301-316
- 8 Balemans W., Van Hul W.: *Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators*. Dev Biol 2002; 250: 231-250
- 9 Barry F.P., Murphy J.M.: *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization*. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36: 568-584
- 10 Bikle D.D., Sakata T., Leary C., Elalieh H., Ginzinger D., Rosen C.J., Beamer W., Majumdar S., Halloran B.P.: *Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone*. J Bone Miner Res 2002; 17(9): 1570-1578
- 11 Bonassar L.J., Vacanti C.A.: *Tissue Engineering: The first decade and beyond*. J Cell Biochem Suppl 1998; 30/31: 297-303
- 12 Bonewald L.F., Harris S.E., Rosser J., Dallas M.R., Dallas S.L., Camacho N.P., Boyan B., Boskey A.: *von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation*. Calcif Tissue Int 2003; 72(5): 537-547
- 13 Bostrom M.P., Lane J.M., Berberian W.S., Missri A.A., Tomin E., Weiland A., Doty S.B., Glaser D., Rosen V.M.: *Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing*. J Orthop Res 1995; 13: 357-367

- 14 Breitbart A.S., Grande D.A., Kessler R., Ryaby J.T., Fitzsimmons R.J., Grant R.T.: *Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells*. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101: 567-574
- 15 Bruder S.P., Fox B.S.: *Tissue engineering of bone. Cell based strategies*. *Clin Orthop Relat Res* 1999; 367: 68-83
- 16 Bruder S.P., Jaiswal N., Haynesworth S.E.: *Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation*. *J Cell Biochem* 1997; 64: 278-294
- 17 Bujía J., Rotter N., Minuth W., Burmester G., Hammer C., Sittlinger M.: *Cultivation of human cartilage tissue in a 3-dimensional perfusion culture chamber: characterization of collagen synthesis*. *Laryngorhinootologie* 1995; 74: 559-563
- 18 Chen D., Zhao M., Mundy G.R.: *Bone morphogenetic proteins*. *Growth Factors* 2004; 22(4): 233-241
- 19 De Bari C., Dell'Accio F., Karystinou A., Guillot P.V., Fisk N.M., Jones E.A., McGonagle D., Khan I.M., Archer C.W., Mitsiadis T.A., Donaldson A.N., Luyten F.P., Pitzalis C.: *A biomarker-based mathematical model to predict bone-forming potency of human synovial and periosteal mesenchymal stem cells*. *Arthritis Rheum* 2008; 58(1): 240-250
- 20 De Bari C., Dell'Accio F., Luyten F.P.: *Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age*. *Arthritis Rheum* 2001; 44(1): 85-95
- 21 De Bari C., Dell'Accio F., Vanlauwe J., Eyckmans J., Khan I.M., Archer C.W., Jones E.A., McGonagle D., Mitsiadis T.A., Pitzalis C., Luyten F.P.: *Mesenchymal Multipotency of Adult Human Periosteal Cells Demonstrated by Single-Cell Lineage Analysis*. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1209-1221
- 22 Declercq H.A., Verbeeck R.M., De Ridder L.I., Schacht E.H., Cornelissen M.J.: *Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures*. *Biomaterials* 2005; 26(24): 4964-4974
- 23 Deutzmann R., Bruckner-Tudermann L., Bruckner P.: *Binde- und Stützgewebe*. In: Löffler G., Petrides E. (Hrsg.): *Biochemie & Pathobiochemie*. Springer Verlag 2003; Berlin, Heidelberg, New York: 776-778
- 24 D'Ippolito G., Schiller P.C., Ricordi C., Roos B.A., Howard G.A.: *Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow*. *J Bone Miner Res* 1999; 14(7): 1115-1122
- 25 Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E.: *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-317

- 26 Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A.L., Karsenty G.: *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*. Cell 1997; 89: 747-754
- 27 Dudley A.T., Lyons K.M., Robertson E.J.: *A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye*. Genes Dev 1995; 9: 2795-2807
- 28 Ebendal T., Bengtsson H., Söderström S.: *Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain*. J Neurosci Res 1998; 51: 139-146
- 29 Erdö F., Bührle C., Blunk J., Hoehn M., Xia Y., Fleischmann B., Föcking M., Küstermann E., Kolossov E., Hescheler J., Hossmann K.A., Trapp T.: *Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke*. J Cereb Blood Flow Metab 2003; 23: 780-785
- 30 Fakhry A., Ratisoontorn C., Vedhachalam C., Salhab I., Koyama E., Leboy P., Pacifici M., Kirschner R.E., Nah H.D.: *Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential*. Bone 2005; 36(2): 254-266
- 31 Frank O., Heim M., Jakob M., Barbero A., Schäfer D., Bendik I., Dick W., Heberer M., Martin I.: *Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro*. J Cell Biochem 2002; 85(4): 737-746
- 32 Frosch K.H., Gröll C., Dresing K., Viereck V., Stürmer K.M.: *Knochendefektheilung mit mesenchymalen Vorläuferzellen. Hat die osteogene Differenzierung der Zellen einen Einfluss auf die Heilung?* In: Haas N., Neugebauer E., Bauer H. (Hrsg.): Chirurgisches Forum 2003 für experimentelle und klinische Forschung. Springer Verlag 2003; Berlin, Heidelberg, New York: 209-211
- 33 Gitelman S.E., Kobrin M.S., Ye J.Q., Lopez A.R., Lee A., Derynck R.: *Recombinant Vgr-1/BMP-6-expressing tumors induce fibrosis and enchondral bone formation in vivo*. J Cell Biol 1994; 126: 1595-1609
- 34 Graff J.M.: *Embryonic Patterning: To BMP or Not to BMP, That Is the Question*. Cell 1997; 89: 171-174
- 35 Gregory C.A., Gunn W.G., Peister A., Prockop D.J.: *An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cerium chloride extraction*. Anal Biochem 2004; 329(1): 77-84
- 36 Gu K., Zhang L., Jin T., Rutherford R.B.: *Identification of potential modifiers of Runx2/Cbfa1 activity in C2C12 cells in response to bone morphogenetic protein-7*. Cells Tissues Organs 2004; 176(1-3): 28-40
- 37 Hammer C., Bujía J.: *Immunology of vital and preserved transplants*. Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl 1992; 1: 3-26

- 38 Hanada K., Dennis J.E., Caplan A.I.: *Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. J Bone Miner Res 1997; 12(10): 1606-1614
- 39 Hauschka P.V., Mavrakos A.E., Iafrazi M.D., Doleman S.E., Klagsbrun M.: *Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose*. J Biol Chem 1986; 261(27): 12665-12674
- 40 Haverich A., Mertsching H., Martin U.: *Differentiation potential of human stem cells – approaches to tissue engineering and to cell transplantation*. Z Ärztl Fortbild Qualitätssich 2002; 96: 440-448
- 41 Hayashi O., Katsube Y., Hirose M., Ohgushi H., Ito H.: *Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue*. Calcif Tissue Int 2008; 82(3): 238-247
- 42 Haylock D.N., Nilsson S.K.: *Osteopontin: a bridge between bone and blood*. Br J Haematol 2006; 134(5): 467-474
- 43 Heldin C.H., Miyazono K., ten Dijke P.: *TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins*. Nature 1997; 390: 465-471
- 44 Hessle L., Johnson K.A., Anderson H.C., Narisawa S., Sali A., Goding J.W., Terkeltaub R., Millan J.L.: *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization*. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(14): 9445-9449
- 45 Hogan B.L.: *Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development*. Genes Dev 1996; 10: 1580-1594
- 46 Hoodless P.A., Haerry T., Abdollah S., Stapleton M., O'Connor M.B., Attisano L., Wrana J.L.: *MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways*. Cell 1996; 85: 489-500
- 47 Hsu D.R., Economides A.N., Wang X., Eimon P.M., Harland R.M.: *The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities*. Mol Cell 1998; 1: 673-683
- 48 Hu Z.M., Peel S.A., Ho S.K., Sándor G.K., Clokie C.M.: *Comparison of platelet-rich plasma, bovine BMP, and rhBMP-4 on bone matrix protein expression in vitro*. Growth Factors 2009; 27(5): 280-288
- 49 Huibregtse B.A., Johnstone B., Goldberg V.M., Caplan A.I.: *Effect of age and sampling site on the chondro-osteogenic potential of rabbit marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. J Orthop Res 2000; 18(1): 18-24
- 50 Hutmacher D.W., Sittinger M.: *Periosteal cells in bone tissue engineering*. Tissue Eng 2003; 9 Suppl 1: 45-64

- 51 Iemura S., Yamamoto T., Takagi C., Uchiyama H., Natsume T., Shimasaki S., Sugino H., Ueno N.: *Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early Xenopus embryo*. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 9337-9342
- 52 Igarashi M., Kamiya N., Hasegawa M., Kasuya T., Takahashi T., Takagi M.: *Inductive effects of dexamethasone on the gene expression of Cbfa1, Osterix and bone matrix proteins during differentiation of cultured primary rat osteoblasts*. J Mol Histol 2004; 35(1): 3-10
- 53 Im G.I., Qureshi S.A., Kenney J., Rubash H.E., Shanbhag A.S.: *Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates*. Biomaterials 2004; 25(18): 4105-4115
- 54 Imamura T., Takase M., Nishihara A., Oeda E., Hanai J., Kawabata M., Miyazono K.: *Smad6 inhibits signaling by the TGF- $\beta$  superfamily*. Nature 1997; 389: 622-626
- 55 Iwasaki M., Nakahara H., Nakase T., Kimura T., Takaoka K., Caplan A.I., Ono K.: *Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteogenesis but does not affect chondrogenesis in osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells*. J Bone Miner Res 1994; 9(8): 1195-1204
- 56 Jaiswal N., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Bruder S.P.: *Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro*. J Cell Biochem 1997; 64: 295-312
- 57 Jaquiéry C., Schaeren S., Farhadi J., Mainil-Varlet P., Kunz C., Zeilhofer H.F., Heberer M., Martin I.: *In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone-forming capacity of human isogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells*. Ann Surg 2005; 242(6): 859-867
- 58 Jeong B.C., Kim H.J., Bae I.H., Lee K.N., Lee K.Y., Oh W.M., Kim S.H., Kang I.C., Lee S.E., Koh G.Y., Kim K.K., Koh J.T.: *COMP-Ang1, a chimeric form of Angiopoietin 1, enhances BMP2-induced osteoblast differentiation and bone formation*. Bone 2010; 46(2): 479-486
- 59 Jia D., Heersche J.N.: *Expression of insulin-like growth factor system constituents in differentiating rat osteoblastic cell populations*. Growth Horm IGF Res 2002; 12(6): 399-410
- 60 Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M.: *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature 2002; 418: 41-49
- 61 Johnson K.A., Hessle L., Vaingankar S., Wennberg C., Mauro S., Narisawa S., Goding J.W., Sano K., Millan J.L., Terkeltaub R.: *Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000; 279(4): R1365-1377

- 62 Johnstone B., Hering T.M., Caplan A.I., Goldberg V.M., Yoo J.U.: *In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. Exp Cell Res 1998; 238: 265-272
- 63 Junqueira L.C., Carneiro J.: *Histologie*. 6. Auflage, Springer Verlag 2005; Berlin, Heidelberg, New York: 92-105
- 64 Kadiyala S., Jaiswal N., Bruder S.P.: *Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect*. Tissue Eng 1997; 3: 173-185
- 65 Kale S., Long M.W.: *Osteopoiesis: the early development of bone cells*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 2000; 10: 259-271
- 66 Kasukawa Y., Stabnov L., Miyakoshi N., Baylink D.J., Mohan S.: *Insulin-like growth factor I effect on the number of osteoblast progenitors is impaired in ovariectomized mice*. J Bone Miner Res 2002; 17(9): 1579-1587
- 67 Kawabata M., Imamura T., Miyazono K.: *Signal transduction by bone morphogenetic proteins*. Cytokine Growth Factor Rev 1998; 9: 49-61
- 68 Kim H., Iwasaki K., Miyake T., Shiozawa T., Nozaki S., Yajima K.: *Changes in bone turnover markers during 14-day 6 degrees head-down bed rest*. J Bone Miner Metab. 2003; 21(5): 311-315
- 69 Kingsley D.M., Bland A.E, Grubber J.M., Marker P.C., Russell L.B., Copeland N.G., Jenkins N.A.: *The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily*. Cell 1992; 71(3): 399-410
- 70 Kingsley D.M.: *What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation*. Trends Genet 1994; 10: 16-21
- 71 Koenig B.B., Cook J.S., Wolsing D.H., Ting J., Tiesman J.P., Correa P.E., Olson C.A., Pecquet A.L., Ventura F., Grant R.A., Chen G.-X., Wrana J.L., Massagué J., Rosenbaum J.S.: *Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells*. Mol Cell Biol 1994; 14: 5961-5974
- 72 Komori T.: *A fundamental transcription factor for bone and cartilage*. Biochem Biophys Res Commun 2000; 276(3): 813-816
- 73 Komori T., Yagi H., Nomura S., Yamaguchi A., Sasaki K., Deguchi K., Shimizu Y., Bronson R.T., Gao Y.H., Inada M., Sato M., Okamoto R., Kitamura Y., Yoshiki S., Kishimoto T.: *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts*. Cell 1997; 89(5): 755-764
- 74 Koshihara Y., Hirano M., Kawamura M., Oda H., Higaki S.: *Mineralization ability of cultured human osteoblast-like periosteal cells does not decline with aging*. J Gerontol 1991; 46(5): B201-206



- 75 Kübler N.R.: *Osteoinduktion: Ein Beispiel für die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen durch Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)*. Heinrich Heine Uni Düsseldorf Jahrbuch 2002: 91-103
- 76 Kübler N.R., Würzler K.K., Reuther J.F., Sieber E., Kirchner T., Sebald W.: *Effect of different factors on the bone forming properties of recombinant BMPs*. Mund Kiefer Gesichtschir 2000; 4: 465-469
- 77 Kusu N., Laurikkala J., Imanishi M., Usui H., Konishi M., Miyake A., Thesleff I., Itoh N.: *Sclerostin is a novel secreted osteoclast-derived bone morphogenetic protein antagonist with unique ligand specificity*. J Biol Chem 2003; 278: 24113-24117
- 78 Langer R.: *Tissue engineering*. Mol Ther 2000; 1: 12-15
- 79 Langer R., Vacanti J.P.: *Tissue Engineering*. Science 1993; 260: 920-926
- 80 Lecoeur L., Ouhayoun J.P.: *In vitro induction of osteogenic differentiation from non-osteogenic mesenchymal cells*. Biomaterials 1997; 18: 989-993
- 81 Lee M.H., Kwon T.G., Park H.S., Wozney J.M., Ryoo H.M.: *BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2*. Biochem Biophys Res Commun 2003; 309(3): 689-694
- 82 Levi G., Geoffroy V., Palmisano G., de Vernejoul M.C.: *Bones, genes and fractures: workshop on the genetics of osteoporosis: from basic to clinical research*. EMBO Rep 2002; 3(1): 22-26
- 83 Lippert H.: *Lehrbuch Anatomie*. 6. Auflage, Urban & Fischer Verlag 2003; München: 29-43
- 84 Liu F., Ventura F., Doody J., Massagué J.: *Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): Extension of the two-kinase receptor model to the BMPs*. Mol Cell Biol 1995; 15: 3479-3486
- 85 Luo G., Hofmann C., Bronckers A.L., Sohocki M., Bradley A., Karsenty G.: *BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning*. Genes Dev 1995; 9: 2808-2820
- 86 Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D., Moorman M., Gerson S.L.: *Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells*. J Cell Physiol 1998; 176: 57-66
- 87 Manolagas S.C.: *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis*. Endocr Rev 2000; 21(2): 115-137
- 88 Marks S.C., Hermey D.C.: *The structure and development of bone*. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A. (Hrsg.): *Principales of bone biology*. Academic Press 1996; San Diego: 3-14

- 89 Mehlhorn A.T., Niemeyer P., Kaiser S., Finkenzeller G., Stark G.B., Südkamp N.P., Schmal H.: *Differential expression pattern of extracellular matrix molecules during chondrogenesis of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue*. Tissue Eng 2006; 12(10): 2853-2862
- 90 Minuth W.W., Sittinger M., Kloth S.: *Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications*. Cell Tissue Res 1998; 291: 1-11
- 91 Minuth W.W., Strehl R., Schumacher K.: *Von der Zellkultur zum Tissue engineering*. Papst Science Publishers 2002; Lengerich: 73-109
- 92 Miyazono K., Kusanagi K., Inoue H.: *Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling*. J Cell Physiol 2001; 187: 265-276
- 93 Nakahara H., Goldberg V.M., Caplan A.I.: *Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo*. J Orthop Res 1991; 9: 465-476
- 94 Nakao A., Afrakhte M., Morén A., Nakayama T., Christian J.L., Heuchel R., Itoh S., Kawabata M., Heldin N.E., Heldin C.H., ten Dijke P.: *Identification of Smad7, a TGF-beta-inducible antagonist of TGF-beta signaling*. Nature 1997; 389: 631-635
- 95 Nakase T., Nomura S., Yoshikawa H., Hashimoto J., Hirota S., Kitamura Y., Oikawa S., Ono K., Takaoka K.: *Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing*. J Bone Miner Res 1994; 9: 651-659
- 96 Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., de Crombrughe B.: *The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation*. Cell 2002; 108(1): 17-29
- 97 Nilsson S.K., Johnston H.M., Whitty G.A., Williams B., Webb R.J., Denhardt D.T., Bertoncello I., Bendall L.J., Simmons P.J., Haylock D.N.: *Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells*. Blood 2005; 106(4): 1232-1239
- 98 Nohno T., Ishikawa T., Saito T., Hosokawa K., Noji S., Wolsing D.H., Rosenbaum J.S.: *Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors*. J Biol Chem 1995; 270: 22522-22526
- 99 Ono I., Ohura T., Murata M., Yamaguchi H., Ohnuma Y., Kuboki Y.: *A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein*. Plast Reconstr Surg 1992; 90(5): 870-879
- 100 Otto W.R., Rao J.: *Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage*. Cell Prolif 2004; 37: 97-110

- 101 Palermo C., Manduca P., Gaggero E., Foppiani L., Segat D., Barreca A.: *Potentiating role of IGFBP-2 on IGF-II-stimulated alkaline phosphatase activity in differentiating osteoblasts*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2004; 286(4): E648-657
- 102 Park B.W., Hah Y.S., Kim D.R., Kim J.R., Byun J.H.: *Osteogenic phenotypes and mineralization of cultured human periosteal-derived cells*. Arch Oral Biol 2007; 52(10): 983-989
- 103 Park B.W., Hah Y.S., Kim D.R., Kim J.R., Byun J.H.: *Vascular endothelial growth factor expression in cultured periosteal-derived cells*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008; 105(5): 554-560
- 104 Park J., Gelse K., Frank S., von der Mark K., Aigner T., Schneider H.: *Transgene-activated mesenchymal cells for articular cartilage repair: a comparison of primary bone marrow-, perichondrium/periosteum- and fat-derived cells*. J Gene Med 2006; 8(1): 112-125
- 105 Perka C., Schultz O., Spitzer R.S., Lindenhayn K., Burmester G.R., Sittinger M.: *Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits*. Biomaterials 2000; 21(11): 1145-1153
- 106 Piccolo S., Sasai Y., Lu B., De Robertis E.M.: *Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4*. Cell 1996; 86: 589-598
- 107 Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Rama K.J., Douglas R., Mosca J.D., Moormann M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R.: *Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells*. Science 1999; 284: 143-147
- 108 Reddi A.H.: *Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells*. Clin Orthop Relat Res 1995; 313: 115-119
- 109 Reddi A.H.: *Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration*. Nat Biotechnol 1998; 16: 247-252
- 110 Ringe J., Leinhase I., Stich S., Loch A., Neumann K., Haisch A., Häupl T., Manz R., Kaps C., Sittinger M.: *Human mastoid periosteum-derived stem cells: promising candidates for skeletal tissue engineering*. J Tissue Eng Regen Med 2008; 2(2-3): 136-146
- 111 Robertson J.A.: *Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues*. Nat Rev Genet 2001; 2: 74-78
- 112 Robey P.G.: *Bone matrix proteoglycans and glycoproteins*. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A. (Hrsg.) Principales of bone biology. Academic Press 1996; San Diego: 155-166
- 113 Rose F.R., Oreffo R.O.: *Bone tissue engineering: hope vs. hype*. Biochem Biophys Res Commun 2002; 292: 1-7

- 114 Rosenzweig B.L., Imamura T., Okadome T., Cox G.N., Yamashita H., ten Dijke P., Heldin C.H., Miyazono K.: *Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins*. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 7632-7636
- 115 Roufosse C.A., Direkze N.C., Otto W.R., Wright N.A.: *Circulating mesenchymal stem cells*. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36: 585-597
- 116 Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K., Muneta T.: *Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source*. Arthritis Rheum 2005; 52(8): 2521-2529
- 117 Sakou T., Onishi T., Yamamoto T., Nagamine T., Sampath T., ten Dijke P.: *Localization of Smads, the TGF-beta family intracellular signaling components during endochondral ossification*. J Bone Miner Res 1999; 14: 1145-1152
- 118 Samee M., Kasugai S., Kondo H., Ohya K., Shimokawa H., Kuroda S.: *Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation*. J Pharmacol Sci 2008; 108(1): 18-31
- 119 Schimming R., Schmelzeisen R.: *Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation*. J Oral Maxillofac Surg 2004; 62(6): 724-729
- 120 Schwarz E.M., O'Keefe R.J.: *Breakthrough in bone: the molecular mechanism of osteoclast/osteoblast coupling revealed*. Current opinion in orthopaedics 2000; 11: 329-335
- 121 Sekiya I., Larson B.L., Vuoristo J.T., Cui J.G., Prockop D.J.: *Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs)*. J Bone Miner Res 2004; 19: 256-264
- 122 Sekiya I., Larson B.L., Vuoristo J.T., Reger R.L., Prockop D.J.: *Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma*. Cell Tissue Res 2005; 320(2): 269-276
- 123 Sittinger M.: *Tissue engineering: artificial tissue replacement containing vital components*. Laryngorhinootologie 1995; 74: 695-699
- 124 Soldner E., Herr G.: *Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien*. Trauma Berufskrankh 2001; 3: 256-269
- 125 Solloway M.J., Dudley A.T., Bikoff E.K., Lyons K.M., Hogan B.L., Robertson E.J.: *Mice lacking Bmp6 function*. Dev Genet 1998; 22: 321-339
- 126 Stanford C.M., Jacobson P.A., Eanes E.D., Lembke L.A., Midura R.J.: *Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP)*. J Biol Chem 1995; 270(16): 9420-9428

- 127 Takahashi N., Udagawa N., Takami M., Suda T.: *Cells of Bone: Osteoclast Generation*. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A. (Hrsg.) *Principles of bone biology*. Second edition. Academic Press 2002; San Diego, Vol 1: 109-126
- 128 Tataria M., Quarto N., Longaker M.T., Sylvester K.G.: *Absence of the p53 tumor suppressor gene promotes osteogenesis in mesenchymal stem cells*. J Pediatr Surg 2006; 41(4): 624-632
- 129 ten Dijke P., Yamashita H., Sampath T.K., Reddi A.H., Estevez M., Riddle D.L., Ichijo H., Heldin C.H., Miyazono K.: *Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4*. J Biol Chem 1994; 269: 16985-16988
- 130 Thomson R.C., Yaszemski M.J., Powers J.M., Mikos A.G.: *Fabrication of bio-degradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone*. J Biomater Sci Polym Ed 1995; 7: 23-38
- 131 Tuan R.S.: *Biology of Developmental and Regenerative Skeletogenesis*. Clin Orthop Relat Res 2004; 427: 105-117
- 132 Uchimura E., Machida H., Kotobuki N., Kihara T., Kitamura S., Ikeuchi M., Hirose M., Miyake J., Ohgushi H.: *In-situ visualization and quantification of mineralization of cultured osteogenic cells*. Calcif Tissue Int 2003; 73(6): 575-583
- 133 Urist M.R.: *Bone: formation by autoinduction*. Science 1965; 150: 893-899
- 134 Vukicevic S., Latin V., Chen P., Batorsky R., Reddi A.H., Sampath T.K.: *Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: high affinity binding to basement membranes*. Biochem Biophys Res Commun 1994; 198: 693-700
- 135 Vuorio E., Crombrughe B.: *The family of collagen genes*. Annu Rev Biochem 1990; 59: 837-872
- 136 Wakitani S., Saito T., Caplan A.I.: *Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine*. Muscle Nerve 1995; 18: 1417-1426
- 137 Wang E.A., Rosen V., Cordes P., Hewick R.M., Kriz M.J., Luxenberg D.P., Sibley B.S., Wozney J.M.: *Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors*. Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85: 9484-9488
- 138 Wang Y., Nishida S., Sakata T., Elalieh H.Z., Chang W., Halloran B.P., Doty S.B., Bikle D.D.: *Insulin-like growth factor-1 is essential for embryonic bone development*. Endocrinology 2006; 147(10): 4753-4761
- 139 Winkler D.G., Yu C., Geoghegan J.C., Ojala E.W., Skonier J.E., Shpektor D., Sutherland M.K., Latham J.A.: *Noggin and sclerostin bone morphogenetic protein antagonists form a mutually inhibitory complex*. J Biol Chem 2004; 279: 36293-36298

- 140 Winnier G., Blessing M., Labosky P.A., Hogan B.L.M.: *Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse.* Genes Dev 1995; 9: 2105-2116
- 141 Wolff D., Goldberg V.M., Stevenson S.: *Histomorphometric analysis of repair of a segmental diaphyseal defect with ceramic and titanium fibermetal implants: effects of bone marrow.* J Orthop Res 1994; 12: 439-446
- 142 Wolter J.R., Meyer R.F.: *Sessile macrophages forming clear endothelium-like membrane on inside of successful keratoprosthesis.* Trans Am Ophthalmol Soc 1984; 82: 187-202
- 143 Wozney J.M.: *The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult.* Eur J Oral Sci 1998; 106: 160-166
- 144 Wozney J.M.: *Overview of bone morphogenetic proteins.* Spine 2002; 27(16 Suppl1): 2-8
- 145 Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J., Mitscock L.M., Whitters M.J., Kriz R.W., Hewick R.M., Wang E.A.: *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.* Science 1988; 242: 1528-1534
- 146 Wu L., Wu Y., Lin Y., Jing W., Nie X., Qiao J., Liu L., Tang W., Tian W.: *Osteogenic differentiation of adipose derived stem cells promoted by overexpression of osterix.* Mol Cell Biochem 2007; 301(1-2): 83-92
- 147 Yamaguchi A., Komori T., Suda T.: *Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1.* Endocr Rev 2000; 21: 393-411
- 148 Yamamoto N., Akiyama S., Katagiri T., Namiki M., Kurokawa T., Suda T.: *Smad 1 und Smad 5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts.* Biochem Biophys Res Commun 1997; 238: 574-580
- 149 Yamashita H., ten Dijke P., Heldin C.H., Miyazono K.: *Bone Morphogenetic Protein Receptors.* Bone 1996; 19: 569-574
- 150 Yoshimura H., Muneta T., Nimura A., Yokoyama A., Koga H., Sekiya I.: *Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle.* Cell Tissue Res 2007; 327(3): 449-462
- 151 Young R.G., Butler D.L., Weber W., Caplan A.I., Gordon S.L., Fink D.J.: *Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair.* J Orthop Res 1998; 16: 406-413
- 152 Yu Y., Yang J.L., Chapman-Sheath P.J., Walsh W.R.: *TGF-beta, BMPs, and their signal transducing mediators, Smads, in rat fracture healing.* J Biomed Mater Res 2002; 60: 392-397

- 
- 153 Zaucke F., Dinser R., Maurer P., Paulsson M.: *Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes*. *Biochem J* 2001; 358(1): 17-24
- 154 Zhang H., Bradley A.: *Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development*. *Development* 1996; 122: 2977-2986
- 155 Zheng Y.X., Ringe J., Liang Z., Loch A., Chen L., Sittinger M.: *Osteogenic potential of human periosteum-derived progenitor cells in PLGA scaffold using allogeneic serum*. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006; 7(10): 817-824
- 156 Zhu S.J., Choi B.H., Huh J.Y., Jung J.H., Kim B.Y., Lee S.H.: *A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101(2): 164-169
- 157 Zimmermann L.B., De Jesús-Escobar J.M., Harland R.M.: *The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4*. *Cell* 1996; 86: 599-606

## 7 Anhang

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „**Vergleich von BMP-4 versus BMP-2 für die osteogene Differenzierung von Periostzellen**“ selbstständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit einer Geldstrafe bestraft wird.



## Danksagung

In erster Linie gilt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. J. Hoffmann Dank dafür, dass er mir die Möglichkeit einer Dissertation gegeben hat und mir immer mit Interesse und Vertrauen begegnet ist.

Frau Dr. D. Alexander-Friedrich möchte ich ganz besonders für die außerordentlich gute Betreuung, das tolle Arbeitsklima, ihr Engagement und die Korrektur dieser Arbeit danken.

Den Mitarbeitern der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. S. Reinert danke ich für die Patientenaufklärung und Periostentnahme, ohne welche diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Frau A. Munz danke ich für ihre Hilfsbereitschaft während meiner praktischen Phase im molekularbiologischen Labor.

Meiner Freundin S. Bauerle gilt mein Dank für ihr Verständnis und ihre seelische und moralische Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Zum Schluss möchte ich noch meinen Eltern danken, die mir erst das Studium der Zahnheilkunde ermöglicht und die mich immer in meinem Tun unterstützt haben.

# Lebenslauf

Name Florian Alexander Stephan Klumpp  
Geburtstag 11.07.1982  
Geburtsort Pforzheim

## Schulbildung:

09/1993-06/2002 Reuchlin Gymnasium Pforzheim  
06/2002 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife mit  
der Gesamtnote 1,4

## Zivildienst:

10/2002-07/2003 Zivildienst beim Arbeiter-Samariter-Bund  
Pforzheim

## Hochschulbildung:

10/2003-11/2008 Studium der Zahnheilkunde an der Eberhard  
Karls Universität Tübingen  
18/11/2008 Staatsexamen im Fach Zahnheilkunde mit  
der Gesamtnote „sehr gut“  
12/2008 Approbation als Zahnarzt

## Berufliche Laufbahn:

12/2008-heute Zahnärztliche Tätigkeit in der väterlichen  
Zahnarztpraxis Dr. H. Klumpp