Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Norbert R. Kübler

Bestimmung der Gründe für die spontane osteogene Differenzierung von Mikrogeweben aus humanen multipotenten Stammzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Michael Mathias Sus
2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:
Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Jörg Handschel
Zweitgutachter: Prof. Dr. Ulrich Germing

Gewidmet

den beiden wichtigsten

Frauen in meinem Leben

Zusammenfassung

Neben funktionellen Einschränkungen können Knochenverluste im Bereich von Gesicht, Schädel und Kiefer Auswirkungen auf die Psyche und das Sozialverhalten von Patienten haben. Hierdurch gewannen Regenerationsstrategien auf zellulärer Ebene an Bedeutung und ein Forschungsschwerpunkt verlagerte sich hin zum *Tissue Engineering*. Bei diesem laborseitigen Verfahren werden autogene Zellen *in vitro* mit artifiziellen Trägergerüsten/*Scaffolds* vereint, um anschließend transplantiert zu werden. Wegen potenzieller Immunreaktionen des Empfängers auf das künstliche Material, wird die Nutzung von *Scaffolds* kontrovers diskutiert. Die Mikromassentechnik fand hierdurch zunehmend Akzeptanz, da diese 3D-Zellkonglomerate ohne künstliche Materialien auskommen. Der Einsatz bestimmter Zellen, sog. USSCs (*Unrestricted somatic stem cells*) erwies sich als vielversprechend für aktuelle Forschungsvorhaben. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, inwieweit sich die Entwicklung von Mikrogeweben durch den Einsatz unterschiedlicher Chemikalien verändert und welche intrazellulären Signalwege verantwortlich für die osteogene Differenzierung sind. Während der Zellkultur wurden die Versuchsgruppen mit den osteogen wirksamen Substanzen DAG (Dexamethason, Ascorbinsäure, ß -Glyzerolphosphat) sowie mit den spezifisch wirkenden Inhibitoren FR180204, LY294002 und U0126 behandelt. Nach 3, 6 bzw. 7 Tagen Differenzierungszeit wurden 2D-Kryoschnittpräparate angefertigt. Bei der mikroskopischen Auswertung wurden der Grad der Mineralisation und die Größe der Mikrogewebe untersucht, um die Auswirkungen der o.g. Behandlungen während der Zellkultivierung festzustellen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine zunehmende Differenzierungsdauer bei Präparaten mit sowie ohne DAG-Behandlung eine Zunahme des Größenwachstums bewirkt. Des Weiteren bewirkte der DAG-Zusatz in beinahe allen Versuchsreihen eine stärker ausgeprägte Mineralisation. Ein Vergleich der absoluten Werte der Mineralisation und der Gewebegröße zeigt, dass diese beiden Größen miteinander korrelieren. Die Ausprägung der Mineralisation und die Zunahme der Mikromassengröße sind in Abhängigkeit von einer Behandlung mit DAG im gleichen Maße stärker ausgeprägt. Die Ergebnisse zur Behandlung mit den spezifisch wirkenden Inhibitoren zeigen, dass der Inhibitor U0126 nur eingeschränkt Schlüsse zur Veränderung der Mineralisation und Größenentwicklung zulässt. Verlässliche Resultate hingegen zeigen die Behandlungen mit FR180204 und LY294002. In beiden Fällen reagieren die jew. Versuchsgruppen bis auf einzelne Ausnahmen homogen und ermöglichen so die jew. Wirkung vorherzusagen. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sowohl der PI3K/Akt-Signalweg als auch der ERK-Signalweg eine entscheidende Bedeutung für die spontane osteogene Differenzierung von multipotenten Stammzellen haben. Die vielversprechenden Ergebnisse demonstrieren, dass eine gesteuerte Geweberegeneration durch gezielte intrazelluläre Beeinflussung möglich wird. Angesichts eines zunehmend wachsenden Kenntnisstands auf dem Gebiet des *Tissue Engineerings* könnte diese Therapieform auch in Zukunft bei der Therapie großvolumiger Knochendefekte an Relevanz zunehmen.

Summary

Besides functional restrictions, bone loss in the face, skull and jaw can also have an impact on the psyche and the social behaviour of the patient. For this reason, regeneration strategies on a cellular level have gained importance and tissue engineering (TE) has shifted into the focus of research.

The aim of TE is to merge autogenous cells with an artificial scaffold which is then transplanted. However, artificial scaffolds are controversial, due to their allergenic potential. For this reason, the technic of micromasses has gained acceptance, since it does not use artificial scaffolds. The use of USSCs (Unrestricted somatic stem cells) has proven to be successful for present research projects.

The present study examines, in how far the development of micro-tissues is altered depending on the treatment with different chemicals and which intracellular pathways are responsible for osteogenic differentiation.

During the cell culture process, the experimental groups where treated with osteogenic DAG substances (Dexamethasone, Ascorbic acid, ß – Glycerolphosphate), as well as specific inhibitors, such as FR180204, LY294002 and U0126. After 3, 6 and 7 days of cell culture, tissues where cut into 2D-slices for an analysis of growth and to determine the degree of mineralization. The analysis was done with a microscope. The goal was to determine the effects of the above described treatment during cell cultivation.

The results show that a longer period of differentiation results in an increased growth of the tissues, both with and without DAG-treatment. Moreover, in nearly every test series DAG-treatment initiates an increased mineralization.

A comparison between the growth of tissues and the dimension of mineralization shows a correlation between these two parameters.

The results of the treatment with the three specific inhibitors show that the use of U0126 merely allows limited specific control over intracellular pathways and therefore over osteogenic differentiation. The use of the chemicals FR180204 and LY294002 on the other hand, show quite different results: apart from some exceptions, both experimental groups showed homogenous results.

The results from the above described experimental series with the two inhibitors suggest that intracellular pathways such as PI3K/Akt and ERK are of great significance for spontaneous osteogenic differentiation of multipotent stem cells from umcilical cord blood. These promising results demonstrate the possibility of a guided tissue regeneration through specific intracellular interferences. Considering the development of knowledge in the area of tissue engineering, the described form of treatment could become increasingly important for the therapy of bone-defects of large volume and provides therefore reliable information about abilities of control over intracellular pathways which are responsible for osteogenic differentiation.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BMP	*Bone Morphogenetic Protein*
°C	Grad Celsius
$Ca(OH)_2$	Calciumhydroxid
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
DAG	Dexamethason + Ascorbinsäure + ß- Glyzerolphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPBS	*Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline*
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	*Epidermal Growth Factor*
EtOH	Ethanol
ESC	Embryonale Stammzellen
EZM	Extrazellularmatrix
Fa.	Firma
FGF	*Fibroblast Growth Factor*
g	Erdschwerebeschleunigung, 9,81 m/s^2
GTR	*Guided Tissue Regeneration*
HA	Hydroxylapatit
i.R.	im Rahmen
jew.	jeweils
KEM	Knochenersatzmaterial
Min.	Minute
Mio	Million
MM	Mikromassen
mRNA	*messenger RNA*
USSC	*Unrestricted somatic stem cells*
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
MAPK	MAP-Kinase
ml	Milliliter
mg	Milligramm
M	molar
Min.	Minute
mm	Milimeter

mM	Millimolar
MM	Mikromassen
mol	Einheit für mol
MPC	*Mesenchymal progenitor cell*/ Mesenchymale Progenitorzelle
MTA	*Mineral trioxide aggregate*
n	Anzahl
N/A	*not applicable*/ keine Messwertausgabe
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
OC	Osteokalzin
o.g.	oben genannt
OT	Objektträger
p.a.	*pro analysi*
Pi	Phosphat
px	Pixel
REM	Raster Elektronenmikroskop
RNA	*ribonuclein acid* (Ribonucleinsäure)
RUNX2	*Runt-related transcription factor 2*
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt(-e)
TE	*Tissue engineering*
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
USSC	*Unrestricted Somatic Stem Cells*/ Unrestringierte somatische Stammzellen/ Nabelschnurblutstammzelle
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Knochenersatzmaterialien 2
1.2 Therapiestrategien zur Gewebegewinnung auf Zellbasis 8
1.3 Mikromassen 17
1.4 Knochenbildung allgemein 18
1.5 DAG als Einflussfaktor auf die Mineralisation 20
1.6 Ziele der Arbeit 22

2 Material und Methoden 23
2.1 Material 23
2.1.1 Zellen 23
2.1.2 Auflistung der Materialien 23
2.2 Methoden 31
2.2.1 Zellkultur 31
2.2.2 Zellzahlbestimmung nach Neubauer 32
2.2.3 Mikromassenherstellung und osteogene Differenzierung der Mikromassen aus USSCs 34
2.2.4 Versuchsaufbau 35
2.2.5 DAG-Herstellung 36
2.2.6 Anfertigung von histologischen Schnitten 36
2.2.7 Mikroskopie, Photographie, Vermessung der Präparate 39
2.2.8 Graphische Auswertung und Verwendung eines Auswertungsalgorithmus 40
2.2.9 Statistische Auswertung und graphische Darstellung 40

3 Ergebnisse 41
3.1 Die Größenentwicklung von Mikromassen nach einer DAG-Behandlung der Gewebe im zeitlichen Verlauf 42
3.1.1 Die Größenentwicklung der Mikromassen in Abhängigkeit von der Kulturdauer 42
3.1.2 Der Einfluss von DAG auf die Größenentwicklung von Mikromassen 43
3.2 Die Mineralisation von Mikromassen im zeitlichen Verlauf nach einer Behandlung mit DAG während der Zelldifferenzierung 46

3.2.1 Die Mineralisation der Mikromassen in Abhängigkeit von der Kulturdauer 47
3.2.2 Der Einfluss von DAG auf die Mineralisation von Mikromassen 48
3.3 Die Relation zwischen der Größenentwicklung und der Mineralisierung von Mikromassen 51
3.4 Die Größenentwicklung der Mikromassen unter dem Einfluss von spezifischen Signalweg-Inhibitoren 54
3.4.1 Die Größenentwicklung der Mikromassen unter dem Einfluss von FR180204 als Inhibitor des ERK-Signalweges 54
3.4.2 Die Größenentwicklung der Mikromassen unter dem Einfluss von LY294002 als Inhibitor des PI3K/Akt -Signalweges 56
3.4.3 Die Größenentwicklung der Mikromassen unter dem Einfluss von U0126 als Inhibitor der MAP-Kinase 58
3.5 Die Mineralisation der Mikromassen unter dem Einfluss von spezifischen Signalweg-Inhibitoren 61
3.5.1 Die Mineralisation der Mikromassen unter dem Einfluss von FR180204 als Inhibitor des ERK-Signalweges 61
3.5.2 Die Mineralisation der Mikromassen unter dem Einfluss von LY294002 als Inhibitor des PI3K/Akt -Signalweges 63
3.5.3 Die Mineralisation der Mikromassen unter dem Einfluss von U0126 als Inhibitor der MAP-Kinase 65

4. Diskussion 69
4 .1 Erörterung der verwendeten Materialien und Methoden 70
4.1.2 Nicht feststellbare Einflüsse durch den angewendeten Zusatz DMSO in allen Versuchsreihen 71
4.1.4 Zellzahlbestimmung und Zählprotokoll 72
4.1.5 Färbung und Größenbestimmung der Präparate 73
4.1.6 Morphologie und Mineralisation 74
4.1.7 Vermessung der Felder und Benutzung eines Auswertungsalgorithmus´ 76
4.2 Diskussion der Ergebnisse 77
4.2.1 Die Wirkung von DAG auf die Differenzierung von Mikromassen 77

4.2.2 Erörterung der Eigenschaften von 2D- und 3D- Geweben zu therapeutischen Zwecken 79
4.2.3 Die Relevanz von Signalwegen für die Mineralisation 81

5 Ausblick 90
6 Literatur- und Quellenverzeichnis 92
7 Anhänge 106

1 Einleitung

Knochenverluste im Bereich von Gesicht, Schädel und Kiefer können durch Unfälle oder als Folge von Fehlbildungen und bösartigen chronischen Erkrankungen entstehen. Die operative Therapie eines solchen Knochendefizits umfasst häufig mehr als einen Eingriff und stellt für den Patienten eine beachtliche körperliche und mentale Belastung dar. Da ein intaktes Skelett im Kopf- und Halsbereich eine Grundlage für die Nahrungsaufnahme, die Phonation und für soziale Interaktionen darstellt, haben Knochendefizite in diesen Regionen umfangreiche Folgen für Patienten. Neben physischen und funktionellen Störungen können ästhetische Beeinträchtigungen zu sekundären Erkrankungen der Psyche und zu einem beeinträchtigten Sozialverhalten von betroffenen Patienten führen. Hierdurch wird deutlich, dass neben den funktionellen Einschränkungen für Betroffene umfassendere Folgen eintreten können als rein physische Veränderungen.

Ein weiterer Aspekt ist die natürliche altersbedingte Knochenatrophie. Angesichts aktueller demographischer Strukturänderungen und dem damit einhergehenden steigenden Anteil von Bürgern mit einem Lebensalter von 80 Jahren und mehr (Statistisches Bundesamt, 2015) werden Knochenaufbautechniken mit und ohne Knochenersatzmaterial im Laufe der Zeit zunehmend Gegenstand der aktuellen medizinischen Versorgung. Hierdurch nahm der Stellenwert der präprothetischen Chirurgie in Verbindung mit der Therapie von natürlich eintretenden Knochenatrophien v.a. aus zahnmedizinisch-restaurativer Sicht stetig an Bedeutung zu.

Somit sind die Wiederherstellung der ästhetischen und funktionellen Situation von Schädelpartien nach Erkrankungen, aber auch die präprothetische Chirurgie als Vorbereitung auf Zahnersatz ein essentieller Arbeitsbereich der modernen Mund-, Kiefer-, und plastischen Gesichtschirurgie. US-amerikanische Daten belegen, dass im Bereich des Bewegungsapparates ca. 650.000 Transplantationen pro Jahr in den USA durchgeführt wurden (Archibald et al., 2002). Vergleichbare

Zahlen aus Deutschland zeigen ebenfalls das gestiegene Interesse bzw. den gestiegenen Bedarf hierzulande: Während im Jahr 2004 noch 152.600 *Bone grafting*- Eingriffe durchgeführt wurden, handelte es sich im Jahr 2010 um 206.100 Operationen (Jerosch et al., 2012).

Chirurgische Behandlungsstrategien verfolgten in der Vergangenheit zum Großteil resektive Therapieziele, was die gängige kausale Behandlung der Problematik darstellte (Handschel, 2007). Großvolumige Knochendefizite wurden nach Abschluss der chirurgischen Maßnahmen häufig mit Prothesen bzw. Epithesen versorgt. Während der Weiterentwicklung von therapeutischen Maßnahmen kam es zu einer Änderung von Therapiestrategien, die sich im Anschluss von der resektiven Ausrichtung dahingehend entwickelten, Defekte zu reparieren (Handschel, 2007). Da ein verloren gegangenes Knochenvolumen ersetzt werden sollte, wurden Knochenersatzmaterialien (KEM) entwickelt, die aus unterschiedlichen Quellen gewonnen werden können.

1.1 Knochenersatzmaterialien

Generell unterscheidet man nach der Herkunft des Stoffes zwischen autogenen, allogenen, xenogenen und alloplastischen Materialien (Schwenzer und Ehrenfeld, 2010) (s. Tabelle 1).

Neben der Unterscheidung nach der Quelle für Knochenersatz divergieren in der Terminologie die Bezeichnungen „Transplantat“ und „Implantat“. Obwohl diese beiden Begriffe teilweise synonym verwendet werden, liegt der grundsätzliche Unterschied im Vorhandensein von lebenden Zellen im betreffenden Material. Während ein Implantat avital ist, enthält ein Transplantat grundsätzlich lebende Zellen.

Nomenklatur	Definition
Autogene Transplantate	Verpflanzung körpereigenen Gewebes von einer Körperregion in eine andere, Spender und Empfänger sind identisch
Allogene Transplantate	Verpflanzung von einem Organismus in einen anderen Organismus, Spender und Empfänger gehören der gleichen Spezies an
Xenogene Transplantate	Verpflanzung von Gewebe in den Organismus einer anderen Spezies
Alloplastisches Implantat bzw. Knochenersatzmaterial	Insertion von synthetischem Material in einen Organismus

Tabelle 1: **Einteilung der Transplantationsmaterialien** nach Schwenzer und Ehrenfeld (Schwenzer und Ehrenfeld, 2010)

Allogene Knochensubstanz

Der Bezug von allogener Knochensubstanz erfolgt in der Regel über darauf spezialisierte Biotechnologieunternehmen beziehungsweise sogenannte Knochenbanken, die die Knochensubstanz tiefgefroren lagern. Im Rahmen der Aufbereitung der Gewebe werden sowohl lebende Zellen als auch der Großteil der organischen Bestandteile eliminiert. In Abhängigkeit von der Spenderbereitschaft und dem Bestand an bevorratetem Knochenmaterial ist die Verfügbarkeit von allogenem Knochen im Verhältnis zu autogenem Knochen erheblich weniger stark limitiert.

Ein relevanter Gesichtspunkt ist jedoch die Aufbereitung in Verbindung mit einem Infektionsrisiko, das trotz aufwändiger Vorsichtsmaßnahmen nicht vollständig eliminiert werden kann (Simonds et al., 1992; Tugwell et al., 2005). Mögliche Aufbereitungsmethoden für gewonnene Knochensubstanz sind Gefriertrocknung, gezielte Demineralisation und die Bestrahlung des Gewebes (Meijer, 2007). Gefriergetrocknete Materialien beispielsweise haben den Vorteil einfacher Lagerungsbedingungen (Kreuz et al., 1951). Des weiteren bedingt die Gefriertrocknung eine Herabsenkung der Immunogenität des zu transplantierenden Materials (Friedlaender, 1983).

Die gezeigten Vorteile durch diesen Aufbereitungsvorgang können allerdings nicht beliebig auf andere Behandlungsmethoden übertragen werden. Da es sich bei heranreifenden Zellen immer um höchst sensibles Gewebe handelt, könnte das eigentlich angestrebte osteoinduktive Potenzial vermindert werden, während die Gefahr einer möglichen Krankheitsübertragung bestehen bleibt (Meijer, 2007).

Xenogene Knochensubstanz

Das Funktionsprinzip von xenogenem Knochen besteht im Wesentlichen in der Osteokonduktion (Reichart et al., 2002). Der häufig vom Rind gewonnene, deproteinierte Knochen bildet als Leitstruktur eine Matrix, die knöchern durchwachsen werden kann und so zum Knochenaufbau dient. Von besonderer Bedeutung für die Osteokonduktion ist die Knochenspongiosa aufgrund ihrer im Vergleich zu kompaktem Knochen porösen Konsistenz und der damit verbundenen individuellen Eigenschaften (Burchardt, 1983; Schenk, 1991).

Alloplastisches KEM

Für die Therapie von Knochendefekten können anorganische Stoffe wie Kalziumphosphate (Jensen et al., 2006; Eppley et al., 2005; Wada et al., 1989) und Keramiken verwendet werden (Eppley et al., 2005). Eine Studie von Maiorana et al. zeigte, dass alloplastisches Knochenersatzmaterial im Rahmen von Operationen zur Sinusbodenelevation nur teilweise resorbiert werden (Maiorana et al., 2006). Bis in die 1990er Jahre hinein wurden Knochendefizite ebenfalls durch artifizielle Materialien wie Polyetherurethane (Leake et al., 1978), Polymethylmetacrylate (Pochon und Klöti, 1991) und Polyethylen (Wellisz et al., 1992) ersetzt. Charakteristisch für vollständig synthetische Materialien ist die Eigenschaft der Osteokonduktion bei ausbleibender bzw. sehr geringer Resorption. Auf diese Weise verbleiben die Knochenersatzmaterialien langfristig am Insertionsort und sollen knöchern durchwachsen werden. Sie behalten über den gesamten Verbleib die Charakteristik eines teilweise resorbierten, wenig knöchern durchwachsenen Fremdkörpers bei (Maiorana et al., 2006) oder es trat gar keine

Knochenheilung ein wie im Tierversuch von Yablon (Yablon, 1976). Auch heute noch werden derartige Materialien in gewissem Umfang als Knochenersatzmaterial eingesetzt. Während allogene, xenogene und allopastische Stoffe den Vorteil haben, praktisch unbegrenzt verfügbar zu sein, weisen sie systembedingt spezifische Nachteile im Vergleich zu autogenen Geweben auf. Bei xenogenen Transplantaten ist eine evtl. auftretende Immunreaktion des Empfängers nicht von einer Immunreaktion auf allogenes Material zu unterscheiden. Allerdings kann der Grad der Immunreaktion deutlich ausgeprägter sein, da sich die Immunsysteme unterschiedlicher Spezies stärker unterscheiden als jene zwischen Organismen der gleichen Spezies. (Schwenzer und Ehrenfeld, 2010). Die Einheilung von Implantaten bzw. Transplanten könnte durch derartige Reaktionen erschwert werden und auch der Verlust der entsprechenden Gewebe könnte die Folge sein. Der Empfängerorganismus erkennt in diesem Fall das eingebrachte Material als Fremdkörper, wonach es zu einer bindegewebigen Einkapselung des Gewebe-Implantates kommt (Roesgen, 1991). Liegt eine solche Bindegewebsschicht vor, können für die Mineralisation wichtige Zellen wie Osteoblasten nicht in die betreffenden Bereiche vordringen und es zeigen sich keine Hinweise auf eine reguläre Mineralisation (Handschel et al., 2002). Eine knöcherne Durchwachsung und die Resorption des Materials sind damit ausgeschlossen.

Autogene Knochensubstanz

Zur Vermeidung derartiger materialspezifischer Nachteile und der o.g. sekundären Folgen eines therapeutischen Misserfolges für den Patienten fiel ein Forschungsschwerpunkt zunehmend auf die Verwendung von Knochenmaterialien, die nicht artifizieller Herkunft sind. Natürlicher Knochen unterliegt einem permanenten kompensatorischen Umbauprozess (sog. *Remodellation*), der gleichzeitig zum Knochenwachstum stattfindet (Schopf, 2008). Als Beispiele für diese spezifische Eigenschaft dienen die Knochenumbauvorgänge bei kieferorthopädischen Behandlungen (Schopf, 2008) und im Rahmen von Frakturheilungen (Rodan, 1992). Um sich die Dynamik dieser *Remodellation* von

Knochen zunutze zu machen, wurde dieses Charakteristikum in die Entwicklung neuer Verfahren einbezogen. Eine naheliegende Alternative zu artifiziellem, xenogenem oder allogenem Gewebe stellt autologer Knochen dar. Da es sich bei dieser Art von Knochengewebe um körpereigenes Gewebe des jeweiligen Knochenspenders handelt, entfällt die Wahrscheinlichkeit für eine immunulogische Abstoßungsreaktion (Meijer, 2007). Außerdem stellt autologes Transplantationsgewebe knochenbildende Zellen (Meijer, 2007) sowie Wachstumsfaktoren mit osteoinduktiven Eigenschaften (Lane et al., 1999) direkt am Einbringungsort bereit. (Meijer, 2007; Lane et al., 1999). Im Gegensatz zu Fremdmaterialien verfügt diese Knochenart über vitale Zellen wie aktive Osteoblasten und kann dementsprechend an dynamischen Umbauvorgängen im Transplantatsitus teilnehmen.

Unterschieden werden rein kompakte, rein spongiöse und kombiniert kortikospongiöse freie Transplantate. Schwenzer und Ehrenfeld führen an, dass reine Spongiosatransplantate aufgrund der größeren Oberfläche auch eine größere Kontaktfläche aufweisen und in der Empfängerregion prinzipiell schneller revaskularisiert werden können als Kompaktatransplantate. Transplantate aus rein kompaktem bzw. kortikospongiösem Knochen eignen sich hingegen besser für eine Fixation über Osteosytheseplatten oder -schrauben. Aufgrund der zahlreichen Vorteile autogenen Knochens im Vergleich zu alternativen Möglichkeiten, gilt diese Art des Knochenersatzes auch heute noch als „Goldstandard“ (Schwenzer und Ehrenfeld, 2002; Pretorius et al., 2005). Neben den hier genannten Vorzügen des eigenen Knochens fallen auch bei diesem Gewebe spezifische Nachteile auf, die sich am praktischen Beispiel erläutern lassen. Im Rahmen von kieferchirurgischen Eingriffen wird als Spenderregion häufig der Beckenkammknochen gewählt. Dieses Areal hat sich unter Beachtung der gut bekannten OP-Risiken als bewährte Quelle für Transplantate erwiesen. (Behairy und Al-Sebai, 2001). Wird ein Knochentransplantat entnommen, wird eigens zu diesem Zwecke ein separater Eingriff in Vollnarkose mit allen damit verbundenen Risiken durchgeführt. Das Knochenangebot ist auch bei volumenstarken Spenderarealen wie dem Beckenkamm limitiert. Selbst wenn die Knochengewinnung am Beckenkamm oder in anderen Spenderregionen des Körpers (z.B. Ramus mandibulae) seit langem

als operative Routineeingriffe einzuschätzen sind, so sind die Entnahmemorbidität (Kübler et al., 1999) und die limitierte Verfügbarkeit autologen Gewebes Charakteristiken dieser Methode zur Gewebegewinnung (Kübler et al., 1999; Nkenke et al., 2001; Nkenke et al., 2004; Sasso et al., 2005). Die Aussagen zu postoperativen Beschwerden unterschiedlicher Ausprägung und Dauer sind je nach Studie unterschiedlich (Sandor et al., 2003; Cricchio und Lundgren, 2003; Tayapongsak et al., 1994; Ahlmann et al., 2002; Kessler et al., 2005). Nach der Entnahme autologen Knochens erleiden bis zu 10% der Patienten postoperative Beschwerden. Geringe Beschwerden dieser Art sind oberflächliche Infektionen, Hämatome und die Bildung oberflächlicher Pseudozysten/ Serome. Schwerwiegende Komplikationen beinhalten die Bildung von Hernien im Abdominalbereich, Gefäßverletzungen, tiefgreifende Infektionen im Spenderareal, neurologische Beschwerden, Frakturen des Beckenknochens und tiefe Hämatome, die eine chirurgische Intervention erfordern können (Arrington et al., 1996).

In Bezug auf Bewertungsmaßstäbe für autologe Knochentransplantate ist die Langlebigkeit des versetzten Gewebes *in situ* als herausragendes Kriterium anzusehen. Der Verlust des Transplantates aber auch Rückgänge von Knochenvolumen ab einer zu definierenden Größenordnung sind als Misserfolge der rekonstruktiven Therapie zu werten. In Studien zur chirurgischen Wiederherstellung von Maxilla- und Mittelgesichtsdefekten aus dem Jahr 2005 kam es in 21% der Fälle zu einem Verlust des Transplantates. Der Hauptgrund lag in postoperativen Infektionen in Abhängigkeit von der Defektgröße. (Smolka und Iizuka, 2005). Im Jahr 2006 wurden eine Studie zum Volumenverlust nach autologer Transplantation zu zwei unterschiedlichen postoperativen Untersuchungszeitpunkten veröffentlicht. Demnach war sechs Monate nach der Transplantation autologen Knochens ein durchschnittlicher Volumenverlust von 16,2% des Ausgangsvolumens bei allen untersuchten Patienten zu verzeichnen. Weitere 6 Monate später (12 Monate post-operationem) konnte bei 33% der Patienten ein Volumenverlust von 19,2% des Ausgangsvolumens beobachtet werden (Smolka et al., 2006). Andere Studiengruppen untersuchten autologe Knochentransplantate in der *Maxilla* und im *Sinus maxillaris*. Ein halbes Jahr nach

der Transplantation wurde ein Volumenverlust von 47% bzw. 49,5% bezogen auf den Ausgangswert registriert (Johansson et al., 2001).

1.2 Therapiestrategien zur Gewebegewinnung auf Zellbasis

Da selbst bei den als „Goldstandard“ geltenden Verfahren gravierende Nachteile und Misserfolge zu verzeichnen waren, wurde ein Forschungsschwerpunkt zunehmend auf die Entwicklung von zellbasierten Therapiestrategien zur Gewinnung von Knochensubstanz gelegt. Bei dieser Art von Gewebegewinnung werden die Eigenschaften von lebenden Zellen in der Art zunutze gemacht, dass die physiologische Funktion des Gewebes wiederhergestellt werden kann (Langer und Vacanti, 1993).
Generell werden drei Techniken bei der zellbasierten Knochenregeneration unterschieden (Naujoks, 2011):

A) Knochentransplantat
B) In situ-Aktivierung von ortsständigem Knochen
C) Tissue Engineering

A) Knochentransplantat

Diese Art der Gewebegewinnung hat den Vorteil, lebende Zellen mit dem Transplantat direkt in den OP-*Situs* einzubringen. Vor allem im *intraoralen* und *cranialen* OP-Bereich sind die Gewebe aufgrund der Größe nach der Entnahme morphologisch gut aufzubereiten, sodass eine optimale Passform des Transplantates erzielt werden kann. Bei entsprechender physiologischer Belastung erfolgt eine rasche Einheilung im gut durchbluteten Transplantatbett bei minimaler Abnahmetendenz (Sailer und Pajarola, 1996). Neben diesen positiven Charakteristiken der Methode beinhaltet sie die vorhergehend beschriebenen Nachteile von autologem Knochen, sodass auch Knochentransplantate nicht die Methode mit der gewünschten Effektivität zur Knochenregeneration darstellen.

B) In-situ-Aktivierung von ortsständigem Knochen

Eine weitere Möglichkeit, zellbasiert die Knochenregeneration zu fördern ist die Aktivierung von Zellen, die sich naturgemäß im lokalen Operationsgebiet befinden. Sowohl physikalische Stimuli wie elektromechanische- (Aaron et al., 2004) oder Dehnungsreize (Meyer und Wiesmann, 2005) als auch biochemische Stimuli wie der Einsatz von Zytokinen (Depprich et al., 2005; Kübler et al., 1998) können die im Körper bereits vorhandenen Zellen zur Knochenbildung anregen.

C) Tissue Engineering

Tissue engineering (TE) wird definiert als ein laborseitiges Verfahren, bei dem autogene Zellen in vitro vermehrt und ggf. mit einer (dreidimensionalen) Matrix verbunden werden (Pschyrembel, 2014). Das so entstehende Gewebekonstrukt stellt eine transplantierbare Einheit dar, die dem Empfänger eingesetzt wird, Gewebespender und -empfänger sind bei dem gesamten Vorgang identisch. TE verfolgt das Ziel, durch die Implantation des Gewebekonstruktes verloren gegangenes natürliches Gewebe zu ersetzen und die Rekonstruktion und somit den Heilungsprozess zu fördern (s. Abb. 1).
Vorteilhaft bei diesem Verfahren ist, dass die quantitative Limitation entfällt, da praktisch eine unbegrenzte Menge Gewebe hergestellt werden kann. Für die Gewinnung von Zellen reicht eine Biopsie aus, es muss kein separater operativer Eingriff zur Gewinnung von Gewebe durchgeführt werden, sodass eine mögliche Morbidität durch die Gewebeentnahme verhältnismäßig gering ist bzw. entfällt.

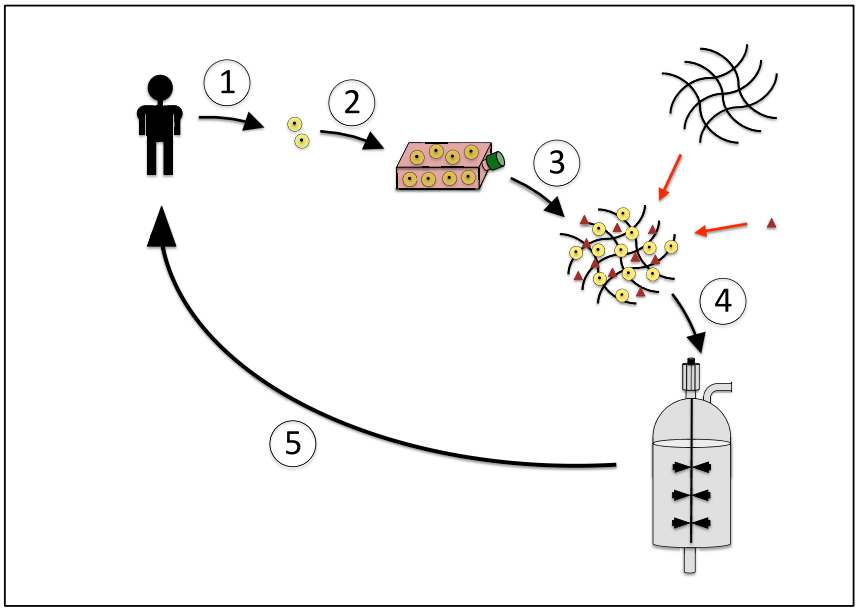


Abb. 1: **Prinzip des *Tissue Engineering*** modifiziert nach Dvir et al. (Dvir et al., 2011): Dem Spender wird Gewebe entnommen (1). Die isolierten Zellen werden in vitro kultiviert und vermehrt (2). Anschließend erfolgt die Kombination mit einem Trägergerüst und Wachstumsfaktoren (*Scaffold*) (3). Diese Zell-*Scaffold*-Kombination wird in sog. Bioreaktoren unter physiologischen Bedingungen konditioniert. Zu diesem Zwecke können bestimmte biophysikalische Reize wie elektrische Stimuli oder Drücke auf die Gewebe gezielt einwirken (4) (Depprich et al., 2008). Ein ausreichend gereiftes Gewebe wird dem Empfänger implantiert (5) (Dvir et al., 2011).

Tissue engineering hat vier wesentliche Bestandteile:

CA) ***Vaskularisation***: dient der Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen (Naujoks, 2011)

CB) **Wachstumsfaktoren** (Naujoks, 2011; Kübler et al., 1998): beeinflussen die Differenzierung der Zellen

CC) **Zellen** (Naujoks, 2011): in der Matrix werden bestimmte Zellarten integriert

CD) **Matrix** (Naujoks, 2011;): dient als Grundgerüst einer transplantierbaren Einheit

CA) *Vaskularisation*

Die Blutversorgung ist vor allem zu Beginn der Einheilung eines Knochentransplantates von ausschlaggebender Bedeutung (Carano und Filvaroff, 2003; Pelissier et al., 2003). Ein suffizientes Gefäßsystem soll eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie den Abtransport von Endprodukten des Stoffwechsels ermöglichen. Umso großvolumiger das zu transplantierende Gewebe ist, desto ausgeprägter muss die Versorgung mit Blutgefäßen sein (Rouwkema et al., 2006), da die Diffusionsreichweite für Sauerstoff aus einem versorgenden Blutgefäß lediglich zwischen 100 und 200 µm in das Gewebe hinein reicht (Rouwkema et al., 2008). Werden diese Bedingungen nicht ausreichend gewährleistet, kann es durch eine Unterversorgung zum Untergang von Zellen kommen, was eine Volumenschrumpfung und schlimmstenfalls den Verlust des Gewebes bedeuten könnte.

CB) Wachstumsfaktoren

Durch bioaktive Stoffe kann die Differenzierung auf biochemischem Wege gefördert werden (Schliephake et al., 2002; Terheyden et al., 2001). Wachstumsfaktoren haben die Eigenschaft in vivo oder in vitro Zellwachstum und -differenzierung zu induzieren. Diese Polypeptide sind als natürlich anzusehen und kommen ohne äußere Einflüsse im Gewebe vor. Im Sinne von TE wird angestrebt, dass diese osteogenen Wirkungskomponenten am Wirkort in möglichst hoher Konzentration und über einen möglichst langen Zeitraum vorliegen. Zu diesem Zwecke sollen die Denaturierung des Polypeptids und die Abdiffusion vermieden bzw. eingeschränkt werden (Richard et al., 1995). Wachstumsfaktoren wie BMP-2 können über Kontaktstellen an natürliche Bestandteile der Extrazellulärmatrix (EZM) binden. Eine Erhöhung der Konzentration am Wirkort wird möglich durch eine Erhöhung der Affinität zu EZM-Komponenten. Ein Beispiel für eine solche Bindung ist der osteogene Wachstumsfaktor BMP-2. Dieser bindet über sein N-terminales Ende an ein Glykosaminoglykan/ Heparin, das als natürlicher Bestandteil in der EZM vorkommt. Über diese natürliche Bindungstendenz hinaus

kann die Affinität gentechnisch verändert werden, sodass gezielt die Halbwärtszeit des Wachstumsfaktors am Wirkort prolongiert und die Osteoinduktivität gesteigert wird (Depprich et al., 2005). Wie oben erwähnt ist die Wirkung der Wachstumsfaktoren zeitabhängig und dosisabhängig. Bei gentechnisch veränderten Varianten von BMP-2 wurde die stärkste Wirkung in einem mittleren Dosisbereich erzielt. D.h.: Die maximale Wirkung entfaltet sich in einem Bereich, der mit einer bestimmten Schwellendosis beginnt und bei einer Sättigungsdosis endet. Oberhalb dieser Sättigungsgrenze ist die osteogene Wirkung trotz höherer Konzentrationen kaum noch zu steigern (Depprich et al., 2005).

CC) Zellen

Da TE ein gesteuertes Wachstum natürlich vorkommender Zellen darstellt, werden natürliche Zellquellen genutzt, sodass die Herkunft der genutzten Gewebe sowohl autolog, allogen als auch xenogen sein kann. Handschel et al. führten neben der Einteilung der Zellen nach dem Differenzierungsgrad zusätzlich die Einteilung in natürlich vorkommende und genetisch modifizierte Zellen ein (s. Tabelle 2) (Handschel et al., 2006).

Natürlich vorkommende Zellen	Genetisch modifizierte Zellen
Toti- und Pluripotente Zellen • Embryonale Stammzellen (ESCs) • Nabelschnurblutstammzellen (USSCs)	• Osteosarkom Zelllinien • Immortalisierte Zelllinien - spontan - transformiert • Nicht transformierte clonale Zelllinien
Multipotente Zellen • ADPC • BMPDC • PDPC • Progenitorzellen aus Gefäßwänden • Progenitorzellen aus Plazenta	
Unipotente Zellen • Präosteoblasten • „*Lining cells*“ • Osteoblasten • Osteocyten	

Tabelle 2: **Für *Tissue Engineering* nutzbare Zellen** nach Handschel (Handschel, 2007) ESC = embryonale Stammzellen, USSC =Nabelschnurblutstammzellen; ADPC= Progenitorzellen aus Fettgewebe, BMDPC = Progenitorzellen aus Knochenmark, PDPC = Progenitorzellen aus Periost (Handschel, 2007)

Mit fortschreitender Entwicklung werden die Zellen zunehmend differenzierter und spezieller, sodass das Spektrum ihrer Entwicklungsmöglichkeiten immer kleiner wird (s. Abb. 2). Anhand des Differenzierungsgrades der Zellen lässt sich schlussfolgern, welche Gewebe aus den entsprechenden Zellen gebildet werden können. In der Entwicklungsphase von der Zygote/ der befruchteten Eizelle bis zum sog. Achtzellstadium in der Embryonalentwicklung können aus den enthaltenen Stammzellen enger spezialisierte Zellen aller drei Keimblätter entstehen (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015). Diese *Totipotenz* der Zellen beschreibt die Fähigkeit einen ganzen Embryo einschließlich der Plazenta (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015) und somit einen Organismus entstehen zu lassen. *Pluripotente* Stammzellen des frühen Embryos können sich zu Zellen aller

drei Keimblätter differenzieren, haben allerdings nicht mehr die Fähigkeit Plazenta zu bilden und sind somit nicht in der Lage komplette Organismen zu generieren. Stammzellen aus Nabelschnurblut, die einem der drei Keimblätter angehören werden als *multipotent* bezeichnet. Die Bandbreite ihrer Differenzierungsmöglichkeiten ist deutlich eingeschränkter, sie können sich nur noch zu bestimmten Zellen ihres Keimblattes entwickeln. *Oligo-* bzw. *unipotente* Stammzellen sind determiniert und können nur noch wenige oder einen Zelltypen hervorbringen (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015). Im Zuge der Identifizierung der hier beschriebenen USSCs entdeckten Kögler et al. Stammzellen aus Nabelschnurblut, die in der Einordnung zur Determinierung aufgrund ihrer individuellen Eigenschaften eher den pluripotenten Stammzellen zuzuschreiben sind (Kögler et al., 2004).

Bei der Arbeit mit dem Ziel der osteogenen Differenzierung haben sich *totipotente*, *pluripotente* und *multipotente* Zellen als erfolgversprechend erwiesen. Neben der Bildung von Zellen, die letztlich zu mineralisierten Geweben bzw. Knochenzellen heranreifen, entstehen ebenfalls Zellen, die wichtige Aufgaben für die Bildung von Knochen übernehmen. Hinsichtlich der Relevanz einer suffizienten Gefäßversorgung für die Entstehung von Knochengewebe (s.o.) ist hier vor allem die Bildung von Endothelzellen bedeutsam (Naujoks, 2011). Mesenchymale Vorläuferzellen (MPCs), embryonale Stammzellen (ESCs) sowie unrestringierte somatische Stammzellen aus Nabelschnurblut (USSCs) sind Ausgangszellen mit großem Potenzial (Naujoks, 2011). Während die Entnahmemorbidität bei der Gewinnung von MPCs aus Knochenmark verhältnismäßig gering ist, ist die Ausbeute im aspirierten Knochenmark mit zwischen 1 bis 7 von 100.000 Zellen sehr gering (D'Ippolito et al., 1999), was die Gewinnung einer ausreichenden Menge an MPCs unverhältnismäßig aufwendig macht.

ESCs sowie USSCs haben ebenfalls ein für TE relevantes osteoblastäres Differenzierungspotenzial. Embryonale Stammzellen werden in einem frühen Entwicklungsstadium aus Embryonen gewonnen und haben die Eigenschaft in vitro vermehrt werden zu können und hierbei ihre für Stammzellen charakteristischen Fähigkeiten beizubehalten. Durch die präzise Beeinflussung mit bestimmten Stoffen wird die Steuerung der weiteren Differenzierung und somit die

gezielte Kultur vieler Zellarten möglich. Hintergrund für diesen Forschungsansatz ist der Therapieversuch bei Erkrankungen die bisher als unheilbar gelten (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015). Durch die aktuelle deutsche Rechtslage ist die Forschung mit embryonalen Stammzellen nur sehr eingeschränkt möglich. Menschliche Embryonen dürfen von Rechtswegen her extrakorporal nicht weiterentwickelt werden, es sei denn dieser Versuch dient der Herbeiführung einer Schwangerschaft. Die künstliche Veränderung von Keimbahnzellen ist per Gesetz ebenfalls nicht gestattet (ESchG §2 und §5).

Mesenchymale Zellen aus Nabelschnurblut haben ähnliche Eigenschaften wie ESCs (Kögler et al., 2004) und stellen aus ethischer Sicht eine weniger bedenkliche Quelle für Stammzellen dar. Diese *pluripotenten* Vorläuferzellen haben neben dem Differenzierungspotenzial für verschiedene Gewebe (z.B. Blutzellen, Fettzellen, Knorpelzellen) auch das Potenzial für eine osteogene Differenzierung. Vorteile bei dieser Art der Zellgewinnung sind die ausreichende Verfügbarkeit und die routinemäßig einfache Beschaffung des Zellmaterials ohne Risiken für den Spender (Kögler et al., 2004). Trotz der Tatsache, dass die Infektionsgefahr (bspw. Humanes Zytomegalievirus, kurz: „CMV“) nur in seltenen Ausnahmefällen auftreten kann (Kögler et al., 2004), ist das Restrisiko einer Übertragung von Pathogenen nicht auszuschließen. Das charakteristische Wachstum von Zellansammlungen ist daran gebunden, dass ausreichend viele Zellen vorhanden sind. Meyer und Wiesmann hielten fest, dass eine „krtitische Zelldichte“ als Ausdruck ausreichend vieler Zellen eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Zellkultur darstellt (Meyer und Wiesmann, 2005). Nach der Materialgewinnung aus Nabelschnurblut werden die Zellen gemäß den Verfahren im Rahmen von TE kultiviert und vermehrt.

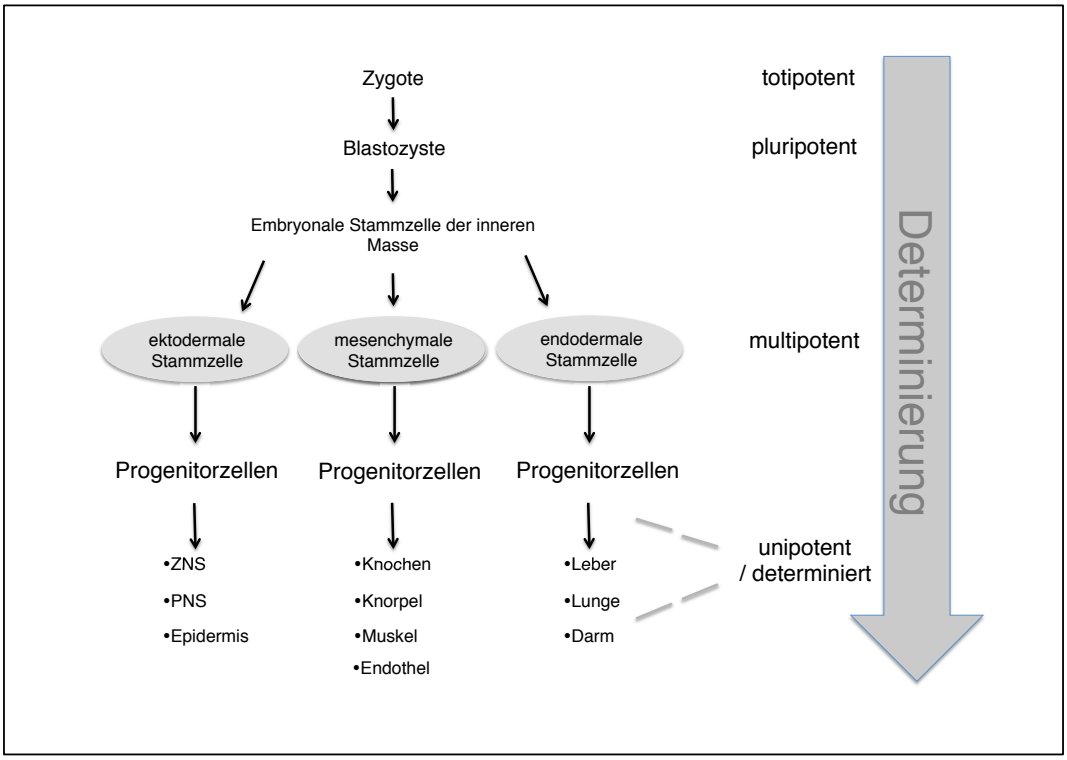


Abb. 2: **Differenzierungspotenziale** modifiziert nach Ratajczak (Ratajczak et al., 2008) und Wobus (Wobus und Boheler, 2005)

CD) Matrix

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die erfolgreiche Anwendung von TE ist das Vorhandensein eines geeigneten Trägergerüstes. Natürlicher Knochen verfügt mit seinem Osteoid über ein natürliches Trägergerüst. Osteoid ist *per definitionem* ein nicht mineralisiertes Konstrukt, das zum wesentlichen Teil ein Stützgerüst aus Kollagenfasern vom Typ 1 darstellt und im weiteren Verlauf der Knochenbildung mineralisiert wird. Es wird von Osteoblasten sezerniert und bildet die Extrazellularmatrix (EZM). Durch die Zuführung von Kalzium und Phosphationen entsteht das anorganische Hydroxylapatit, eine charakteristische Vorstufe von Knochen. Gängige Therapieansätze verfolgen das Ziel natürlichen Knochen nachzubauen bzw. osteokonduktive Leitstrukturen zu bilden. Zu diesem Zweck werden Trägergerüste (sog. *Scaffolds*) genutzt, die natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein können. Der Wissenszuwachs bei der Entwicklung von *Scaffolds* zeigte, dass die Einzelkomponenten der Gerüste die Eigenschaften wie Steifigkeit

und Bruchfestigkeit festlegen (Wiesmann et al., 2004). Ein ideales Trägergerüst sollte eine Vielzahl von Eigenschaften haben, die es ihm ermöglichen vom Empfänger möglichst ohne immunologische Reaktion angenommen zu werden: Es sollte biokompatibel und nicht toxisch sein. Nach der Implantation sollte es eine gute Zellanlagerung ermöglichen, langsam resorbieren und sich im Rahmen von *Remodelling* des Knochengewebes umbauen lassen (Wiesmann et al., 2004). Trotz vielseitiger Bestrebungen ein ideales Trägergerüst zu konzipieren ist es bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht gelungen ein *Scaffold* zu entwickeln, dass alle Anforderungen erfüllt.

1.3 Mikromassen

Um die Anforderungen an ein optimales Trägergerüst möglichst zu erfüllen, wurde ein *in vitro*- Verfahren entwickelt, bei dem dreidimensionale Zellansammlungen generiert werden, deren Trägergerüst ohne artifizielle Materialien auskommt. In diesem Verfahren kommt es mit Hilfe spezieller konischer Agarosebetten zur Ausbildung sphärischer Zellkonglomerate, sog. *Mikromassen* (Handschel et al., 2007). Die Zellen in diesem Verbund sezernieren die Komponenten für die EZM selbst. Probleme im Rahmen der Benutzung von artifiziellen *Scaffolds* sind neben einer ggf. auftretenden Immunogenität der Materialen ein unkalkulierbarer Abbau und nicht klar zu definierende Nebeneffekte aufgrund von auftretenden Abbauprodukten. Des weiteren kann es während der Resorptionsdauer der *Scaffolds* zu Unregelmäßigkeiten kommen, wenn die Zeiträume von der Resorptionsdauer für die Knochenregeneration deutlich abweichen. (Handschel et al., 2007). Der Verzicht auf fremde Trägergerüste bei der Mikromassen-Technologie soll diese Probleme überwinden und dafür Sorge tragen, dass die Situation im Gewebe eher den Verhältnissen *in vivo* entspricht (Handschel et al., 2007). Ein weiterer förderlicher Aspekt für die Generierung von Knochengewebe ist, dass osteoblastenähnliche Zellen in einer Mikromassenkultur eine stärker ausgeprägte Differenzierung in die osteogene Richtung vollziehen als in einem zweidimensionalen Konstrukt (Gerber und Gwynn, 2001; Gerber und Gwynn, 2002).

1.4 Knochenbildung allgemein

Knochen wird aufgrund seiner Eigenschaften und Aufgaben als Stützgewebe definiert, das sich aus einer Reihe spezieller Zellen und einer mineralisierten Matrix zusammensetzt (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015). In Bezug auf die Knochenentstehung unterscheidet man zwei Differenzierungswege: die desmale und die chondrale Ossifikation.

Chondrale Ossifikation

Die chondrale Ossifikation beschreibt die Bildung von Knochensubstanz über einen Zwischenschritt. Dieser beinhaltet zunächst die Bildung von Knorpel, der anschließend abgebaut und durch Knochengewebe ersetzt wird (Welsch und Deller, 2014). Der Großteil der Knochen im menschlichen Skelett entsteht durch chondrale Ossifikation. Sowie die Klavikula als auch die Anteile des flachen Schädelknochens entstehen durch desmale Ossifikation (Welsch und Deller, 2014).

Desmale Ossifikation

Die desmale Ossifikation kann synonym als direkter Weg der Knochenentstehung bezeichnet werden. Bei dieser Art der Knochenbildung entstehen aus mesenchymalen Stammzellen sog. Osteoprogenitorzellen, die eine Vorstufe der reifen, kochenbildenden Zellen darstellen. Die reifen Osteoblasten bilden das sog. Osteoid, welches als eine Art Stützgerüst für die Bildung des späteren Knochens dient und zum Großteil aus Kollagen vom Typ 1 besteht. Da neu gebildetes Osteoid immer auf die Oberfläche eines bereits mineralisierten Grundgerüstes aufgelagert wird, handelt es sich um ein appositionelles Wachstum. Osteoblasten, denen ebenfalls neues Osteoid aufgelagert wird und die somit eingemauert werden, werden als Osteozyten bezeichnet. Zu den Aufgaben der Osteoblasten gehören neben der Bildung des benötigten Kollagens zum einen die Steuerung der Mineralisation während der Knochenbildung und zum anderen die Regulation

des Knochenabbaus über die Steuerung der Osteoklasten, die dem Knochenabbau dienen. Knochenauf- sowie Knochenabbau sind letztlich abhängig von den knochenbildenden Osteoblasten, deren Aktivität wiederum abhängig von hormonellen Einflüssen ist. Durch die Wirkung lokal gebildeter Signalproteine (z.B. BMP-2) resultiert zeitlebens die Nachproduktion von Osteoblasten aus persistierenden Stammzellen.

Matrix und Mineralisation

Da die Kollagenfibrillen im unreifen Knochen als dreidimensionales Geflecht angeordnet sind, wird dieser Knochen als „Geflechtknochen“ bezeichnet. Aus mechanischer Sicht handelt es sich in diesem Entwicklungsstadium um ein mechanisch instabiles Gewebe. Im Zuge der Mineralisation kommt es zur Ausfällung von Kalziumphosphat, das sich in Verbindung mit Hydroxidionen zu Hydroxylapatit/ $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (HA) entwickelt. Diese hexagonalen Kristalle haben eine ausgeprägte Kollagenaffinität und lagern sich longitudinal an die Kollagenfibrillen des Geflechtknochens an. Die Zug- und Druckfestigkeit sind charakteristische Eigenschaften von Knochen in seiner Funktion als Stützgewebe und auf diesen Zusammenschluss der Knochenmatrix mit Hydroxylapatit zurückzuführen. Der reife Knochen wird aufgrund der Anordnung seiner Bestandteile nicht mehr als „Geflechtknochen“, sondern als „Lamellenknochen“ bezeichnet. Die Wichtigkeit dieses strukturellen Aufbaus wird deutlich anhand von Bindegewebeerkrankungen wie der *Osteogenesis imperfecta*, bei der es durch Defekte in der Biosynthese von Kollagen Typ 1 zu klinisch instabiler Knochensubstanz mit vermehrter Knochenbrüchigkeit kommt (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015; Pschyrembel, 2014).

1.5 DAG als Einflussfaktor auf die Mineralisation

Durch intrazelluläre Regulationen kann die Differenzierung in die osteogene Richtung beeinflusst werden. Ein Schlüssel-Transkriptionsfaktor, der mit osteogener Differenzierung assoziiert wird, ist RUNX2. Dieses Protein kann sowohl im phosphorylierten als auch im dephosphorylierten Zustand aktiv sein (Langenbach und Handschel, 2013).

Durch den Einfluss von Dexamethason wird die Transkription von TAZ (einem Aktivator von RUNX2), von MKP1 (einer Komponente des MAPK-Signalweges) und FHL-2 induziert. FHL-2 bindet an stabiles β - Catenin, wodurch der Transport dieses Proteins zum Zellkern deutlich gesteigert wird. Im Kern bindet es an TCF/ LEF1, was zur Transkription von RUNX2 führt. Da es sich bei TAZ um einen RUNX2-Aktivator handelt, bedeutet dies eine zusätzliche Auswirkung auf die osteogene Differenzierung der behandelten Zellen. MKP1 wird dephosphoryliert, dies aktiviert RUNX2, welches an TAZ bindet. Durch den ERK-Signalweg erfolgt die Phosphorylierung der RUNX2-TAZ-Verbindung, was eine weitere Transkription zur Folge hat.

Der Einfluss von Ascorbinsäure erleichtert die osteogene Differenzierung der Stammzellen durch eine vermehrte Sekretion von Kollagen Typ 1. Das Kollagen bindet an die α-2-β-1-Integrine in der Zellmembran. Dies bewirkt die Phosphorylierung von ERK im MAPK-Signalweg und anschließend die Translokation des phosphorylierten ERK in den Zellkern, wo es RUNX2 durch Phosphorylierung aktiviert (Langenbach und Handschel, 2013) (s. Abb. 3).

Eine Aufgabe des β-Glyzerolphosphates ist die Bereitstellung von Phosphat für die Bildung des Hydroxylapatits. Neben dieser Donorfunktion hat das anorganische Phosphat (Pi) ebenfalls regulierende Funktionen innerhalb der Zelle auf die Expression von Osteopontin (Foster et al., 2006; Fatherazi et al., 2009) und BMP-2 (Tada et al., 2011).

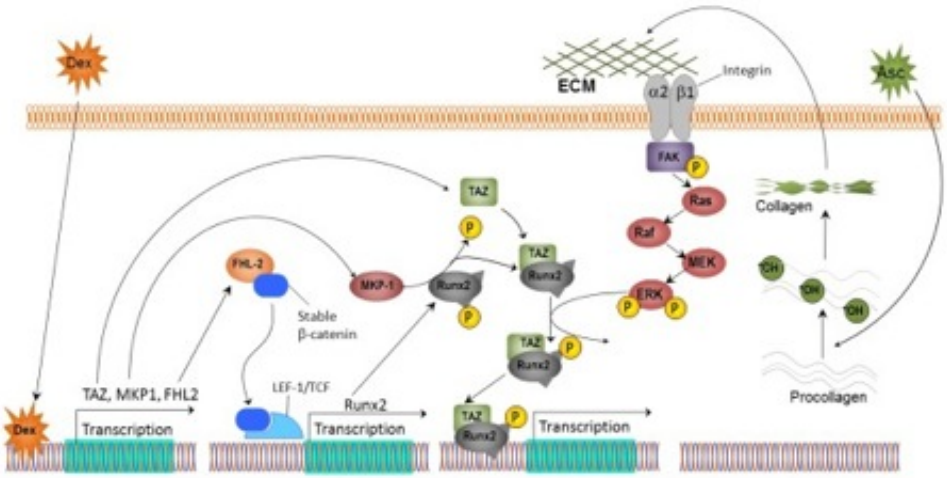


Abb. 3: **Darstellung der intrazellulären Signalwege von Stammzellen mit dem Ziel der osteogenen Differenzierung** (Langenbach und Handschel, 2013)

1.6 Ziele der Arbeit

In der Einleitung werden das Prinzip des *Tissue Engineerings* und die vielfältigen Möglichkeiten mit Materialien unterschiedlicher Herkunft erläutert. Angesichts der Vor- und Nachteile von artifiziellen Materialien haben sich in der Vergangenheit Mikrogewebe, insbesondere die oben genannten Mikromassen, als richtungsweisendes Material für ein gesteuertes Gewebewachstum erwiesen. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde untersucht, in welcher Weise sich die Entwicklung von Mikrogeweben durch den Einsatz unterschiedlicher Chemikalien verändert. Insbesondere wird hier das spontane und das induzierte Wachstum von osteogen differenzierenden Geweben untersucht, mit dem Ziel die Erkenntnisse für zukünftige Forschungsansätze im Bereich des *Tissue Engineerings* nutzbar zu machen.

Folgende Fragestellungen werden hierbei untersucht:

- In welcher Weise wirkt sich eine Behandlung mit den osteogen wirksamen Substanzen DAG auf die Größenentwicklung und die Mineralisation von Mikrogeweben aus?
- Korreliert die Mineralisation von Mikrogeweben mit ihrem Größenwachstum?
- In welcher Weise können das Größenwachstum und die Mineralisation durch eine gezielte Beeinflussung auf zellulärer Ebene gesteuert werden?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

In den Versuchen zur osteogenen Differenzierung wurden humane Nabelschnurblutstammzellen (USSC = *Unrestricted somatic stem cells*) verwendet. Die Zellen wurden vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Universitätsklinik Düsseldorf durch die Leiterin der José Carreras Stammzellbank, Frau Prof. Dr. Gesine Kögler, zur Verfügung gestellt.

Die Gewinnung erfolgte ausschließlich mit Zustimmung der Mutter.
Gewinnung und Kultivierung erfolgten standardisiert nach bekanntem Protokoll (Kögler et al, 2004).

Die Arbeit mit dem Zellmaterial wurde mit einem Ethikvotum von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität mit der Studiennummer 4121 versehen.

2.1.2 Auflistung der Materialien

Medien, Puffer, Enzyme für die Zellkultur

Name	Firma
Biozym Plaque Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf (D)
Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7,4) 10 X	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)
Trypsin (2,5%)	Lonza, Verviers (B)

Basismedium zur Herstellung von Mikromassen

Name	Firma
350 ml Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) mit 1g/L Glucose ohne L-Glutamine	Lonza, Verviers (B)
150 ml Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin (D)
5 ml L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin (D)
5 ml Mischung aus Penicillin (10000 U) und Streptomycin (10000 /µg/ml)	Biochrom AG, Berlin (D)

Mineralisationsnachweis

Name	Firma
OsteoImage™ Mineralization Assay Catalog No.: PA-1503 Lot No.: 0000255903 • OsteoImage™ Staining Reagent • Staining Reagent Dilution Buffer • OsteoImage™ Wash Buffer (10x)	Lonza, Walkersville (USA)

Chemikalien

Name	Firma
bisBenzimide H 33342 trihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Dimethyl- Sulphoxide Hybri-Max® (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Ethanol 99,5% und 96 %	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Fluoromount-G	SouthernBiotech, Birmingham (USA)
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound Kryomedium	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude (NL)
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (D)

Chemikalien für die DAG-Herstellung

Name	Firma
Ascorbinsäure	Alle verwendeten Chemikalien zur Herstellung von DAG Stammen von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (D).
Dexamethason	
β- Glyzerolphosphat	

Wenn nicht anders angegeben, weisen alle Chemikalien vom Reinheitsgrad p.a. auf.

Chemikalien zur Signalinhibition

Name	Firma
Calbiochem InSolution™ ERK Inhibitor II, FR180204, Cat# 328010 Lot# D00140538, 500 µg	Alle verwendeten Chemikalien zur Signalinhibition stammen von der Firma EMD Chemicals. Inc., San Diego (USA).
Calbiochem InSolution™ LY 294002, Cat# 440204 Lot# D00133638, 1mg	
Calbiochem U0126, Cat# 662005, Lot# D00122919, 1 mg	

Laborhilfsmittel, Geräte

Name	Firma
Autoklav: D-65	Systec GmbH, Wettenberg (D)
Brutschrank (CO_2-Begasung) Cytoperm 2	Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)
Deckgläser für Mikroskopie, 24 x 50 mm	Engelbrecht Medizin- & Labortechnik GmbH, Edermünde (D)
Digitale Farbkamera DFC 420 C	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
Elektronisches Vorschaltgerät für Fluoreszenzlampe epq 100	Leistungselektronik Jena GmbH (LEJ), Jena (D)
Heracell 240 CO_2- Inkubator	Kendro Laboratory Products, Langenselbold (D)
Feinwaage Chyo JL-180	Hartenstein, Würzburg (D)
Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen (D)
	Thermo Fisher Scientific., Waltham (USA)
	Liebherr, Ochsenhausen (D)
Kryostat CM 1900	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch (D)

Kryotom MTE	SLEE Technik GmbH, Mainz (D)
Kulturschalen	Fa. Vitaris, Baar (CH)
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen (D)
Messzylinder, B, blau graduiert 100: 1 ml	Hirschmann, Eberstadt (D)
Messzylinder, B, blau graduiert 500: 5 ml	Hirschmann, Eberstadt (D)
Mikroliterpipette Research®	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (D)
Mikroskop DM 5000 B	Leica, Wetzlar (D)
Mikroskop-Kamera DFC 420 C	Leica, Wetzlar (D)
Mikrotome Blades (Low Profile) Leica 819	Leica Microsystems, Wetzlar (D)
Multifuge	Kendro Laboratory Products, Langenselbold (D)
Multiwellzellkulturplatten (6, 12, 24, 48 und 96 *Well*)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen (D)
Objektträger SuperFrost® Plus (geputzt, geschliffen, 26 x 76 x 1,0 mm)	VWR International GmbH, Darmstadt (D)
Pinzette	Hammacher, Solingen (D)

Pipetten aus Polysterol Stripette (5, 10 und 25 ml)	Corning Incorporated, Corning (NY/ USA)
Pipettenspitzen TipOne (0,1 – 10; 1 – 100; 101 – 1000 µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg (D)
Pipettierhilfe, Accujet	Brand, Wertheim (D)
Plexiglas-Objektträger Präparate-Mappe	dia-plus, Oststeinbek (D) Welabo VGKL, Düsseldorf (D)
Präparatekasten	Welabo VGKL, Düsseldorf (D)
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)
Steuergerät CTR 5000	Leica (genauer???)
Stoppuhr	neoLab®, Heidelberg
Tissue-Tek® Cryomold® 10 mm x 10 mm x 5 mm	Miles, Elkhart (USA)
Untersuchungshandschuhe	Mai Med, Neuenkirchen (D)
Vinitex Airflow Abzug nach DIN EN 14175	Vinitex Laboreinrichtungen GmbH und Co KG, Coswig (D)

Wasserbad	Köttermann Systemlabor, Uetze/ Hänigsen (D)
Zählkammer „Neubauer improved“	Assistent, Sondheim (D)
Zellkulturflasche (25 cm^2 und 75 cm^2)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen (D)
Zentrifuge Multifuge 1S-R mit Rotor Heraeus Sorvall 75002000 - Ausschwingrotor	Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)
Zentrifugenröhrchen Falcon	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes (NJ) (USA)

EDV-Programme zur Bildmessung und zur graphischen Auswertung

Name	Firma
Leica Application Suite v 3.7.0	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
Leica QWIN- Software V3	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Microsoft Office 2011 (Excel, Powerpoint, Word)	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
IBM SPSS Statistics for Macintosh Version 22.0, Released 2013	IBM Corp., Armonk, New York (USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kultivierung der USSCs

Nach der Aufbereitung der USSCs durch das Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Universitätsklinik Düsseldorf (José Carreras Stammzellbank) wurden die Zellen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurden aus der Kryokonservierung genommen und in einem Wasserbad bei 37 °C schonend aufgetaut. Durch Zentrifugieren wurden sie unmittelbar nach dem vollständigen Auftauen von dem Mediumgemisch getrennt (470 g, 4 °C, 7 Minuten). Nach Entnahme des Mediumüberstandes wurden sie mit einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen in einen 15 ml Falcon-Tube überführt und mit 9 ml Vollmedium versetzt. Anschließend erfolgte die Aussaat in eine 75 cm^2 Zellkulturflasche.
Das Vollmedium setzte sich folgendermaßen zusammen:

Grundmedium:

- 350 ml DMEM

Zusätze:

- 150 ml FBS
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- 5 ml Mischung aus Penicillin (10000 U) und Streptomycin (10000 /μg/ml)

Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank unter CO_2-Begasung mit 5% CO_2, bei 37 °C, einem Umgebungsdruck von 21% O_2 und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt, die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 90 % gesplittet.

Passage von Zellen

Bei einer Konfluenz von 90 % erfolgte die Aufsplittung der Zellkultur mit Hilfe von 0,25 %-igem Trypsin. Die Trypsinlösung wurde vor ihrem Einsatz auf Raumtemperatur gebracht. Das vorhandene Kulturmedium wurde behutsam abgezogen und die Zellen mit 12 ml DPBS gewaschen. Anschließend wurde die Zelllösung wieder vollständig abgepuffert. Nach Zugabe von 5 ml Trypsinlösung wurde die Kulturflasche für 10 Minuten im Inkubator belassen. In dieser Zeit fand die enzymatische Ablösung der Zellen aus dem *Monolayer* statt und sie gingen in eine Suspension über. Zellen, die trotz dieser Behandlung weiterhin anhafteten, wurden durch Klopfen gegen die Flasche vollständig abgelöst. Zum Abstoppen der Trypsinwirkung wurden 10 ml Vollmedium zugegeben und die Suspension in 50 ml Falcon-Tubes überführt. Der Serumzusatz im Vollmedium bewirkte die Deaktivierung des Trypsins. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (470 g, 4 °C, 7 Minuten), das Trypsin-Serumgemisch entfernt und das Zellsediment erneut mit frischem Medium versetzt. Es erfolgte eine Verdünnung im Verhältnis 1:3, anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium versehen und auf neue Kulturgefäße verteilt. Zur Ernährung der Zellen und zum Entfernen von abgestorbenen Zellen und Stoffwechselprodukten fand ein Mediumwechsel nach etwa 3 Tagen statt.

2.2.2 Zellzahlbestimmung nach Neubauer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die vitalen Zellen in einem definierten Volumen quantitativ erfasst. Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin abgelöst und unter Zuhilfenahme einer Zählkammer (Neubauer improved) (s. Abb. 5 und Abb. 6) und einem Durchlichtmikroskop gezählt. Die zu untersuchende Zellsuspension wurde vor der Messung mit dem Farbstoff Trypanblau im Verhältnis 1:2 versetzt, um vitale Zellen im Durchlichtmikroskop sichtbar zu machen. Avitale Zellen haben in der Regel eine defekte Zellmembran und nehmen den Farbstoff auf, vitale Zellen hingegen verfügen über eine intakte Zellmembran, nehmen den Farbstoff nicht auf und erscheinen im Durchlichtmikroskop daher nicht gefärbt (Wintermantel

et al., 2009). Durch die Färbung fand eine Verdünnung im Verhältnis von 1:2 statt. Bei der Zählkammer nach Neubauer handelt es sich um ein Hilfsmittel aus speziellem Glas, das 5 mm stark ist und die gleiche Länge und Breite wie ein Objektträger zur Durchlichtmikroskopie aufweist (76 mm x 26 mm). Sie verfügt über drei Glasstege und ist so geschliffen, dass bei Abdeckung mit einem speziellen Abdeckglas auf den seitlichen Stegen der mittlere Steg einen definierten Abstand zum Abdeckglas bildet. Bei dem so entstehenden Raum handelt es sich um die eigentliche Zählkammer. Auf der Oberfläche des mittleren Steges befinden sich eingravierte Gitternetzlinien für die Zählung der Zellen. Die Seitenlänge eines Zählquadrates beträgt 1 mm, die Höhe beträgt 0,1 mm, sodass das Volumen pro Zählquadrat 0,1 mm^3 bzw. 0,1 μL beträgt. Die Zellzahl wurde in vier Zählquadraten bestimmt. Mit einer Mikroliterpipette wurde die Zellsuspension in die Zählkammer eingebracht. Mit Hilfe der Gitternetzlinien auf dem Zählkammerboden wurden die sichtbaren Zellen bei 100-facher Vergrößerung in den vier Zählquadraten bestimmt. Anschließend wurde aus den vier Einzelwerten der Mittelwert errechnet. Da die Verdünnung mit Trypanblau im Verhältnis 1:2 stattfand, wurde der Wert mit dem Faktor 2 multipliziert. Zur Bestimmung der Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension wurde der ermittelte Wert mit dem Faktor 10^4 multipliziert (Wintermantel et al., 2009) (s. Abb. 4).

$$\text{Zellzahl/ ml} = \text{mittlere Zellanzahl pro Zählquadrat} \bullet 2\ (=\text{Verdünnung}) \bullet 10^4$$

Abb. 4: **Formel zur Errechnung der Zellzahlkonzentration pro Mililiter**

Zählprotokoll

Die Zählquadrate der Zählkammer vom Typ „Neubauer improved“ sind in 16 Einzelquadrate unterteilt und verfügen über drei äußere Grenzlinien. Bei der inneren und äußeren dieser Grenzlinien handelt es sich um Hilfslinien, die mittlere Grenzlinie stellt die eigentliche Begrenzung im Zählprotokoll dar (s. Abb. 5 und Abb. 6). Bei der mikroskopischen Betrachtung befanden sich Zellen auf diesen

Grenzlinien. Aus der Zählung ausgeschlossen wurden Zellen, welche die untere oder rechte Grenzlinie tangierten oder sich auf ihr befanden. Die ermittelte Zellzahl wurde in die Formel eingesetzt. Mit der Kenntnis der Zellzahl lassen sich beliebige Verdünnungen herstellen (Leuenberger, 1980).

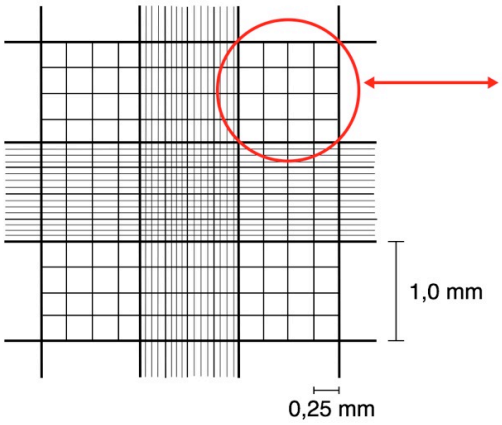


Abb. 5: **Raster in Zählkammer "Neubauer improved"**

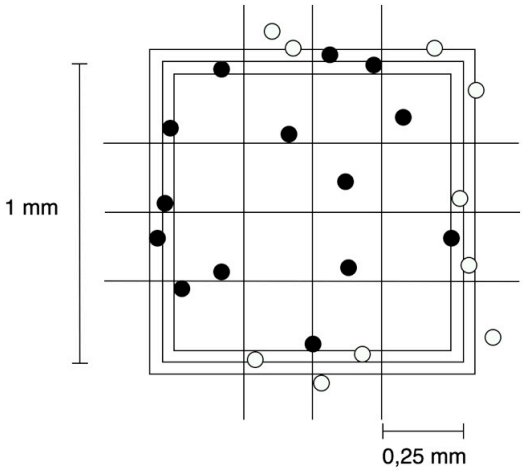


Abb. 6: **Detailansicht eines Zählquadrates**

2.2.3 Mikromassenherstellung und osteogene Differenzierung der Mikromassen aus USSCs

Die Herstellung der Mikromassen erfolgte nach einem standardisierten Protokoll (Langenbach et al., 2011). Für die Etablierung der Mikromassenkultur wurden 96 *Well* Zellkulturplatten benutzt.

Vorbereitung der Kulturplatten

Zur Herstellung von dreidimensionalen Mikromassen wurde in jedes *Well* der Kulturplatte 2%ige „*low melt*-Agarose“ in DMEM eingebracht. Zum Lösen der Agarose wurde die 2% Agarose-/ DMEM- Suspension zunächst autoklaviert, im Anschluss wurden in jedes *Well* 60 µl der noch heißen Lösung pipettiert. Vor der weiteren Nutzung kühlte die Agaroselösung in der Kulturplatte ab. Der Agarosezusatz verhindert die Zelladhäsion an den Wänden des Gefäßes und unterstützt die Bildung eines kugeligen Zellkonglomerats.

Zusatz der Zellen

Nach dem unter 2.2.1 genannten Protokoll wurden die Zellkulturen expandiert, anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellen (470 g, 4 °C, 7 Minuten) und eine Resuspendierung in frischem Medium, sodass eine Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/ ml vorlag.

In jedes *Well* der Zellkulturplatte wurden 180 µl der Zellsuspension pipettiert, dies entsprach bei einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/ ml ca. 180.000 Zellen. Da aus jedem *Well* eine Mikromasse entsteht, besteht jede Mikromasse aus 180.000 Zellen. Nach der anschließenden Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C erfolgte der erste Mediumwechsel in der Agaroseplatte. 160 µl des verbrauchten Mediums wurden nach drei Tagen teilersetzt. Das resultierende konische Agarosebett führte zur Anhäufung der Zellen in der Mitte des *Wells* und schließlich zur Ausbildung einer Mikromasse.

Unterschiedliche USSC – Zelllinien wurden in gleicher Weise mit Supplementen behandelt. Die Supplementierung des Nährmediums erfolgte ab Tag 1. Als Basismedium wurde DMEM (*Dulbeccos Modified Eagles Medium*) eingesetzt.

Das Differenzierungsmedium enthielt neben der Basislösung (DMEM) den Zusatz DAG: Im gebrauchsfertigen Medium lagen die Konzentrationen bei 100 nM Dexamethason, 50 µM Ascorbinsäure und 10 mM β- Glyzerolphosphat. Der DAG-Zusatz wurde vor der Verwendung frisch zugegeben und bewirkte die Induktion der osteogenen Differenzierung der Mikromassen. Nach drei Tagen wurden die Mikromassen aus den Zellkulturplatten genommen und mit DPBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei -193 °C.

2.2.4 Versuchsaufbau

Bis zum Fixieren und Schneiden der Mikromassen waren umfangreiche Vorversuche mit USSCs notwendig, um das Versuchsmodell zu etablieren. Es wurden von drei Zelllinien Versuche angesetzt, aus denen insgesamt fünf erfolgreiche Versuchsreihen entstanden. Da jede Probe, die mit einem Inhibitor versehen wurde auch einen DMSO-Zusatz erhielt, wurde aus Vergleichsgründen

den Proben ohne Inhibitor ebenfalls DMSO zugesetzt. Für die Untersuchung zum Einfluss von DAG auf die Größe von Mikromassen wurde deren Ausdehnung u.a. zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfasst.

2.2.5 DAG-Herstellung

Um die osteogene Differenzierung von undifferenzierten Stammzellen einzuleiten wurde ein kommerziell erhältliches Basismedium mit bestimmten Präparaten - sog. „Supplementen“ versetzt (Wintermantel et al. 2009). Für die Differenzierung in die osteogene Richtung wurden als Supplemente Dexamethason, Ascorbinsäure und ß- Glyzerolphosphat (DAG) verwendet.

Die Stammlösungen wurden in PBS hergestellt und wie folgt verdünnt:

	Stammlösung	Verdünnung
Dexamethason	50 µM	1:500
Ascorbinsäure	50 mM	1:1000
ß- Glyzerolphosphat	1 M	1:100

Tabelle 3: **Konzentrationen der Stammlösung und jew. Verdünnung für die Herstellung von DAG**

Hierdurch ergaben sich Endkonzentrationen von 100 nM Dexamethason, 50 µM Ascorbinsäure und 10 mM ß-Glyzerolphosphat (s. Tabelle 3).

2.2.6 Anfertigung von histologischen Schnitten

Kryokonservierung der Mikromassen

Nachdem die Mikromassen aus dem Kultivierungsmedium entnommen wurden, erfolgte direkt die Kryokonservierung, um morphologische Änderungen und eine Austrocknung zu verhindern.

Während einer Kryokonservierung bilden sich unvermeidlich Eiskristalle. Bedingt durch einen langsamen Abkühlvorgang würden diese Eiskristalle größer als bei einem raschen Abkühlvorgang. Umso größer die Eiskristalle sind, desto gravierender ist die Beeinträchtigung der Morphologie der Mikromassen. Durch einen möglichst raschen Abkühlvorgang wurde bewirkt, dass die Größe sich bildender Eiskristalle möglichst klein bleibt.

Durch thermophysikalische Vorgänge während des Kontaktes zu flüssigem Stickstoff kommt es zur Bildung einer Isolationsschicht auf den Mikromassen und somit zu einer längeren Abkühldauer. Hierdurch steigt die Wahrscheinlichkeit für Morphologieänderungen (sog. „Leidenfrost-Phänomen“).
Um eine gleichmäßige und rasche Abkühlung zu erreichen, wurde als Hilfsmittel ein Kryogen-Einbettmittel (Tissue-Tek® O.C.T.™) verwendet, sodass die Bildung der Isolationsschicht ausblieb. Die Einbettung erfolgte mit Tissue-Tek® O.C.T.™.
Die Mikromassen wurden kurzzeitig in Tissue-Tek® inkubiert und anschließend in Cryomold®-Behälter überführt, sodass im fixierten Zustand kleine Blöcke aus Tissue-Tek® mit darin befindlichen Mikromassen vorlagen. Für die Anfertigung von histologischen Schnitten wurden diese auf dem Boden des Behälters platziert, da dies die spätere Anschnittfläche war. Im Anschluss an die Kryokonservierung erfolgte die Lagerung bei -80 °C im Gefrierschrank.

Schneiden der Präparate

Für die Auswertung wurden aus den Tissue-Tek® -Blöcken mit den darin befindlichen dreidimensionalen Mikromassen per Feinschnittverfahren zweidimensionale Anschnitte der Zellkonglomerate hergestellt.
Die Anfertigung der histologischen Schnitte erfolgte mit Hilfe eines gekapselten Mikrotoms/ Kryostaten. Vor dem Schneidevorgang wurde das Präparat 30 Minuten im Kryostaten temperiert. Die Temperatur des Messers betrug -54°C, die Schnittdicke betrug 5µm. Jeder Schnitt wurde nach dem Schneidevorgang auf Objektträger (SuperFrost® Plus) aufgebracht. Bis zur weiteren Verwendung wurden die hergestellten Schnitte bei -30 °C im Gefrierschrank gelagert.

Schnittfärbung

Die Färbung der Präparate diente als Nachweis für die Mineralisation und für die quantitative Ausprägung der Mineralisation. Das genutzte Färbemittel OsteoImage™ bildet spezifisch eine Bindung zum Hydroxylapatit aus. Durch die Färbung konnte die Mineralisation nachgewiesen werden und durch ihre Ausprägung ein stärkerer oder schwächerer Mineralisationsgrad. OsteoImage™ besteht aus drei Komponenten, dem Waschpuffer (*Wash Buffer*), der Färbelösung (*Staining Reagent*) und einer Verdünnungslösung (*Dilution Buffer*). Zunächst erfolgte die Rehydrierung der Proben mit DPBS. Für den Färbevorgang wurde der 10-fach *Wash Buffer* im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt, das *Staining Reagent* wurde mit dem *Dilution Buffer* im Verhältnis 1:100 zu einer gebrauchsfertigen Färbelösung miteinander vermischt. Das Präparat wurde bei Raumtemperatur aufgetaut bis kein Kondenswasser mehr auf dem Objektträger war. Die Mikromassenanschnitte auf dem Objektträger wurden mit einem Fettstift eingegrenzt. Das Präparat wurde mit dem verdünnten OsteoImage™ *Wash Buffer* gewaschen. Im Anschluss wurde der Objektträger mit der gebrauchsfertigen Färbelösung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben erneut mit gebrauchsfertigem OsteoImage™ *Wash Buffer* 3 mal gewaschen. Jedes Präparat wurde mit einem Tropfen Eindeckmedium (Fluoromount-G ™) versehen und es wurde ein Deckglas aufgebracht.

2.2.7 Mikroskopie, Photographie, Vermessung der Präparate

Mikroskopie, Aufnahme der Bilder/ Photographie

Die Aufnahme der Bilder erfolgte in 100-facher Vergrößerung und wurde an einem Leica DM 5000 Fluoreszenz-Lichtmikroskop mit dazugehöriger Kamera Leica DFC 420 C und einem Leica CTR 5000 Steuergerät durchgeführt. Bei der genutzten *Software* zur Bildaufnahme handelte es sich um „Leica Application Suite“ (v 3.7.0).

Vermessung der Präparate

Die quantitative Messung der Mineralisation erfolgte mit der Verarbeitungs- und Analysesoftware Leica QWin *Image Processing & Analysis Software* Version V3 (October 2003). Dem gefärbten kreisrunden Anschnitt der Mikromassen wurde ein Quadrat umbeschrieben. Die Feststellung der Mineralisation erfolgte über die Detektion der Fluoreszenzsignale mineralisierter Bereiche in Prozent.

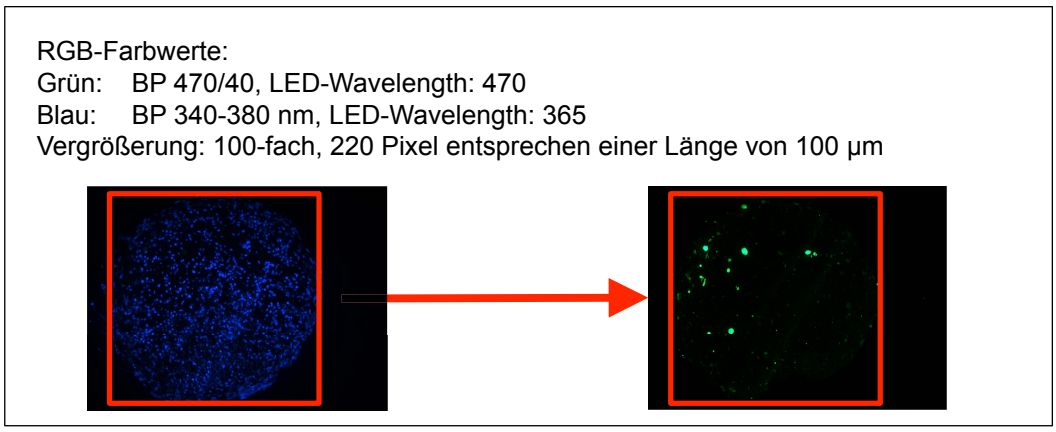


Abb. 7: **Beispiel zur Vermessungstechnik der Mikromassen**: links dargestellt ist die Kernfärbung (blaue Färbung), rechts dargestellt ist die OsteoImage™-Färbung zur Detektion mineralisierter Bereiche

Die Ausmaße des Messfeldes wurden anhand der Kernfärbung bestimmt, da diese unabhängig von der Mineralisation dargestellt wurde (s. Abb. 7). Das Messfeld wurde im Anschluss auf die Präparatbilder übertragen, die die Färbung zur Messung der Mineralisation darstellen.

Da das Messfeld in den Ecken rein schwarze Anteile enthielt, wurde das Signal gemäß eines Auswertungsalgorithmus (s. Kapitel 2.2.8) extrapoliert. Die Messung der Mikromassengröße wird in Pixeleinheiten angegeben.

2.2.8 Graphische Auswertung und Verwendung eines Auswertungsalgorithmus

Im Anschnitt erschien der mineralisierte Anteil der Mikromassen als gefärbte Fläche. Zur Auswertung wurde ein Messfeld an den kreisrunden Anschnitt angelegt. Gemessen wurde eine quadratische Fläche, die den kreisrunden Anschnitt als eigentlich zu erfassende Fläche beinhaltete. Das Messfeld wurde an die Ausmaße des zweidimensionalen Anschnittes der Mikromassen angepasst, sodass ein Korrekturfaktor einbezogen werden musste. Die präparatfreien Areale, die durch das quadratische anstatt runde Messfeld bedingt waren, wurden mit Hilfe des unten angegebenen Auswertungsalgorithmus´ in das Mineralisierungsverhältnis eingerechnet (s. Abb. 8). Der Anteil der Mineralisation wurde bestimmt, indem der mineralisierte und damit gefärbte Anteil der Fläche im Messfeld ins Verhältnis zur Gesamtfläche dieses Messfeldes gesetzt wurde. Hierbei wurde der mineralisierte Anteil des Messfeldes in Prozent mit dem Faktor 1,27 multipliziert.

(mineralisierter Anteil im Messfeld in %) x 1,27

=

Mineralisation angeglichen auf ges. Messfeld in %

Abb. 8: **Angewendeter Algorithmus zur Berechnung der Mineralisation im quadratischen Anschnitt**

2.2.9 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die Auswertung, die Berechnung der statistischen Größen und Signifikanzanalysen sowie die Erstellung der Grafiken wurden mit den EDV-

Programmen Microsoft Excel 2011 und IBM SPSS Statistics 22.0. durchgeführt. Die statistischen Analysen wurden mit der Unterstützung durch das Team der .05 Statistikberatung erstellt.

Die zweidimensionalen Schnittpräparate wurden hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede in ihrer Größe und in dem Grad ihrer Mineralisation untersucht. Die histologischen Ergebnisse wurden zum einen mit Hilfe der deskriptiv-statistischen Verfahren des Mittelwerts und der Standardabweichung ausgewertet. Des Weiteren wurden die non-parametrischen statistischen Testverfahren Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test angewendet, um die Höhe der Werte zu vergleichen. Es wurde ein Signifikanzniveau von 95% gewählt. Verglichen wurde zum einen die Wirkung der Inhibitoren innerhalb einer Gruppe von gänzlich mit DAG- behandelten Präparaten und nicht mit DAG- behandelten Präparaten. Zum anderen fand ein Vergleich zwischen den mit bzw. ohne DAG-behandelten Präparaten pro Inhibitor statt.

Die Ergebnisse wurden graphisch als Säulendiagramme dargestellt.

3 Ergebnisse

Bis zur sicheren Etablierung der Methode zur Schnitterstellung und Darstellung wurden umfangreiche Vorversuche durchgeführt, um Erfahrung mit den Präparaten zu sammeln.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse wurde die Entwicklung der Mikromassen in Bezug auf die Größe, den Grad der Mineralisation und spezifische Charakteristika hin untersucht. Hierbei wurde u.a. über einen zeitlichen Verlauf der Einfluss von Chemikalien und Inhibitoren analysiert, die eine induzierte osteogene Differenzierung beeinflussen. Zur Auswertung der Daten wurde die im Abschnitt “Material und Methoden“ in Kapitel 2.2.8 und 2.2.9 beschriebene Vorgehensweise herangezogen.

3.1 Die Größenentwicklung von Mikromassen nach einer DAG-Behandlung der Gewebe im zeitlichen Verlauf

Im Rahmen dieser Fragestellung werden die Ergebnisse aller analysierten Versuchsreihen betrachtet, bei denen keine Behandlung mit Signalweg-Inhibitoren durchgeführt wurde.

3.1.1 Die Größenentwicklung der Mikromassen in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Betrachtet werden die durchschnittlichen Größen der zweidimensionalen Anschnittflächen von Präparaten der Zelllinie SA4101. Die Präparate wurden nach jew. drei und nach sechs Tagen Entwicklungsdauer aus dreidimensionalen Mikromassen hergestellt. Die Darstellung ist unterteilt in Gewebe, die eine Behandlung mit DAG erfahren hatten und Gewebe, die nicht mit DAG behandelt wurden.

Gewebe ohne DAG-Zusatz

Bei den Präparaten, die keine DAG-Behandlung erfuhren ergibt der Vergleich der Ergebnisse von Tag drei zu Tag sechs der Mikromassenkultur durchweg eine deutliche Zunahme in der Größe der Anschnittflächen. Im Rahmen der Gesamtbetrachtung der Mittelwerte der genannten Zelllinie fällt bei Tag drei auf, dass die absoluten Größen dieser Gewebe mit einem Durchschnittswert von unter 2300 Pixeln deutlich unter dem Mittelwert der Zellkulturen an Tag sechs liegen.

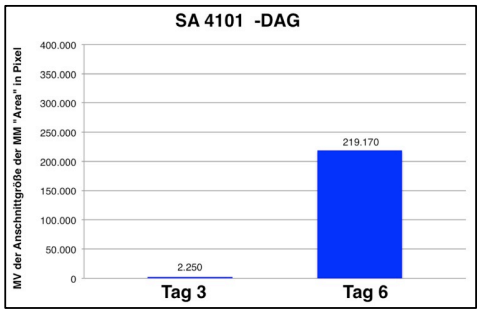


Abb. 9: **Mittelwerte der Anschnittflächen in Pixeleinheiten von Zelllinie SA4101 ohne DAG-Behandlung**
(MV = Mean value/ Mittelwert) MM = Mikromassen)

Bei Zelllinie SA4101 resultiert am sechsten Tag mit 219.170 Pixeln eine um das 97-fach größere Anschnittfläche als an Tag drei der Mikromassenentwicklung. (s. Tabelle 5 und Abb. 9)

Gewebe mit DAG-Zusatz

Eine deutliche Größenzunahme der Anschnittflächen fällt ebenfalls bei dem Vergleich der mit DAG behandelten Gewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung auf. Das Verhältnis der Mittelwerte der Mikromassen-Anschnittgrößen erreicht bei der Zelllinie SA4101 mit 319.648 Pixeln mehr als das doppelte (2,1-fache) der Größe der Anschnittfläche von Tag drei mit 150.959 Pixeln (s. Tabelle 5 und Abb. 10).

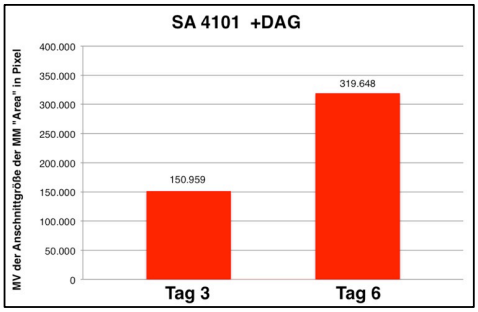


Abb. 10: **Mittelwerte der Anschnittflächen in Pixeleinheiten von Zelllinie SA4101 mit DAG-Behandlung**
(MV = Mean value/ Mittelwert) MM = Mikromassen)

Die Durchschnittswerte der Untersuchung zur Größenentwicklung zeigen deutlich, dass durch eine längere Kulturdauer sowohl bei Mikromassen mit DAG-Behandlung als auch bei Geweben ohne eine solche Behandlung ein deutlich stärkeres Größenwachstum resultiert.

3.1.2 Der Einfluss von DAG auf die Größenentwicklung von Mikromassen

Betrachtet werden die durchschnittlichen Größen der zweidimensionalen Anschnittflächen aller Versuchsreihen. Bei der Darstellung findet eine Unterteilung nach Geweben statt, die mit DAG behandelt wurden und Geweben, die nicht mit DAG behandelt wurden.

Neben der zeitlichen Entwicklung als Einflussfaktor auf die Größenentwicklung der Mikromassen zeigt sich eine spezifische Größenzunahme in Abhängigkeit von einer Behandlung der Gewebe mit DAG. Auf den Präparaten wurden die

Anschnittflächen der Mikromassen in Pixeleinheiten gemessen. Tabelle 5 und Tabelle 6 zeigen die Mittelwerte der Anschnittgröße der behandelten und unbehandelten Gewebe. Die Ergebnisse der Messungen an USSC- Mikromassen, die mit den osteogen wirksamen Substanzen DAG behandelt wurden unterscheiden sich erheblich von den Ergebnissen der jew. Kontrollgruppe. Die Werte der mit DAG behandelten Gewebe sind jew. an Tag drei und an Tag sechs bzw. an Tag sieben erheblich größer als die Werte unbehandelter Gewebe.

Besonders deutlich wird dieser Unterschied im Vergleich der Größenverhältnisse an Tag drei der Mikromassenentwicklung. Die durchschnittliche Anschnittfläche bei der Zelllinie SA4101 beträgt zu diesem Zeitpunkt mit 150.959 Pixeln bei den mit DAG behandelten Geweben das 67- Fache des Wertes von Geweben ohne DAG-Behandlung mit einem Durchschnittswert von 2.250 Pixeln.

Auch die Größen von Geweben an Tag sechs, die einer DAG Behandlung unterzogen wurden, sind deutlich ausgeprägter als die Werte der Kontrollgruppe. Die Präparatgrößen von Mikromassen der Versuchsgruppe bei SA4101 erreichen mit 319.648 Pixeln die 1,5-fache Größe der Gewebe der Kontrollgruppe mit 219.170 Pixeln. (s. Tabelle 5 und Abb. 11)

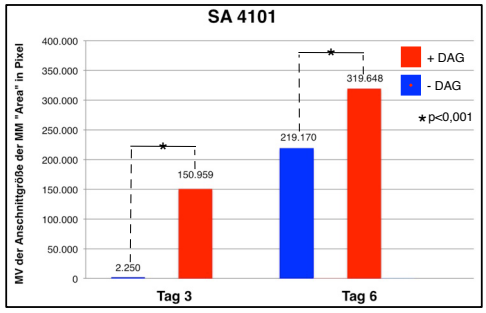


Abb. 11: **Vergleich der Mittelwerte der Anschnittflächen in Pixeleinheiten von Zelllinie SA4101 mit und ohne DAG-Behandlung** (MV = Mean value/ Mittelwert; MM = Mikromassen)

Die Ergebnisse der Zelllinien, deren Entwicklung zum Zeitpunkt an Tag 7 untersucht wurde, zeigen ein entsprechendes Verhalten beim Größenwachstum. Bei Zelllinie SA 4101 V2 unterscheidet sich die Größenausdehnung der Anschnitte zwischen mit DAG (534.685 Pixel) und ohne DAG behandelten Präparaten (12.231 Pixel) um den Faktor 43,7 (s. Tabelle 6, s. Abb. 14). Die Versuchsreihe USSC8 zeigt ein um das 53-fach stärkeres Größenwachstum von Präparaten mit einer DAG-Behandlung (724.778 Pixel : 13.677 Pixel) (s. Tabelle 6, s. Abb. 12). Versuchsreihe USSC8 F2 zeigt die höchsten absoluten Werte der Größenausdehnung sowie die am deutlichsten zu erkennende prozentuale

Steigerung der Größe. Mit 896.838 Pixeln erreichen die Präparate hier eine um das 62-fach größere mittlere Anschnittfläche als Präparate der Kontrollgruppe mit 14.479 Pixeln (s. Abb. 13).

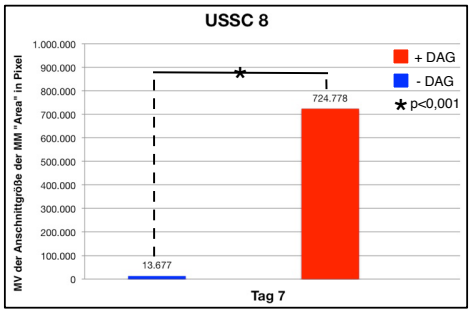


Abb. 12

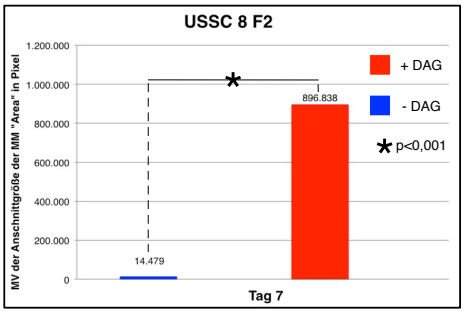


Abb. 13

Abb. 12-14: **Vergleich der Mittelwerte der Anschnittflächen in Pixeleinheiten der Zelllinien USSC8, USSC8 F2 und SA 4101 V2 jew. mit und ohne DAG-Behandlung**
(MV = Mean value/ Mittelwert; MM = Mikromassen)

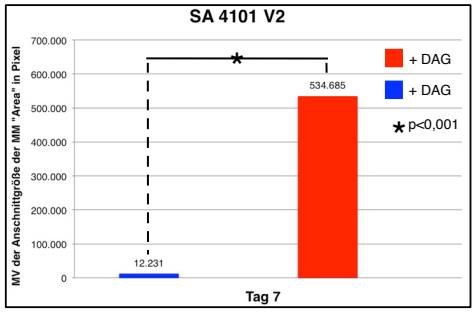


Abb. 14

Es zeigt sich hier eine eindeutige Beeinflussung der Größenzunahme der Mikromassen durch die Einwirkung der osteogen wirksamen Substanzen DAG. Die statistische Auswertung mit einem Mann-Whitney-U-Test bestätigt mit p-Werten kleiner 0,05 (Signifikanzniveau 95%) bei allen betrachteten Ergebnissen, dass die Behandlung mit DAG eine signifikant stärkere durchschnittliche Größenausdehnung der Präparate und somit der Mikromassen bewirkt (s. Tabelle 4).

Versuchsreihe	Tag	Ergebnis Mann-Whitney-U-Test
SA4101	Tag 3	U = 0.00, z = -3.55, p < .001
SA4101	Tag 6	U = 59.00, z = -3.54, p < .001
SA4101 V2	Tag 7	U = 0.00, z = -5.05, p < .001
USSC8 F2	Tag 7	U = 0.00, z = -5.55, p < .001
USSC8	Tag 7	U = 0.00, z = -5.43, p < .001

Tabelle 4: **Ergebnisse des jew. Mann-Whitney-U-Test´ im Rahmen der Untersuchung zur Größenentwicklung zwischen Geweben mit und ohne DAG-Behandlung**

Zelllinie	Behandlung	Tag 3 MW (SD)	Tag 6 MW (SD)
SA 4101	-DAG	2.250 (1.555)	219.170 (68.660)
SA 4101	+DAG	150.959 (90.029)	319.648 (76.991)

Tabelle 5

Zelllinie	Behandlung	Tag 7 MW (SD)
SA 4101 V2	-DAG	12.231 (8.649)
SA 4101 V2	+DAG	534.685 (168.576)
USSC8	-DAG	13.677 (7.959)
USSC8	+DAG	724.778 (164.613)
USSC8 F2	-DAG	14.479 (12.444)
USSC8 F2	+DAG	896.838 (240.552)

Tabelle 6

Tabellen 5 und Tabelle 6: **Mittelwerte und Standardabweichungen der Mikromassenanschnittflächen in Pixeleinheiten**

(-DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung)

3.2 Die Mineralisation von Mikromassen im zeitlichen Verlauf nach einer Behandlung mit DAG während der Zelldifferenzierung

Wie unter Punkt 3.1 erläutert fand eine Untersuchung an Präparaten ohne eine Behandlung mit Signalinhibitoren statt. An allen fünf Versuchsreihen wurden in einem definierten Messfeld die mineralisierten Flächen der Mikromassenanschnitte auf den Präparaten in Prozent gemessen. Für die Auswertung der Gewebemineralisation erfolgte eine Unterteilung der Ergebnisse nach Geweben, die mit DAG behandelt wurden und nach Geweben, die keiner

DAG-Behandlung unterzogen wurden. Die Tabellen 8 und 9 zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Mineralisation der jeweiligen Versuchsreihen mit USSC- Mikromassen.

3.2.1 Die Mineralisation der Mikromassen in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Ein Vergleich der Mineralisationsrate nach drei und nach sechs Tagen der Mikromassenentwicklung erfolgt bei der Zelllinie SA4101.
Bei Geweben, an denen keine Behandlung mit DAG erfolgte, befindet sich der Wert für die Mineralisation an Tag drei unterhalb der Nachweisgrenze. Es resultierte eine stärkere Mineralisierung bis zum sechsten Tag der Mikromassenkultur. Der durchschnittliche Wert betrug zu diesem Zeitpunkt 17 % (s. Tabelle 8).

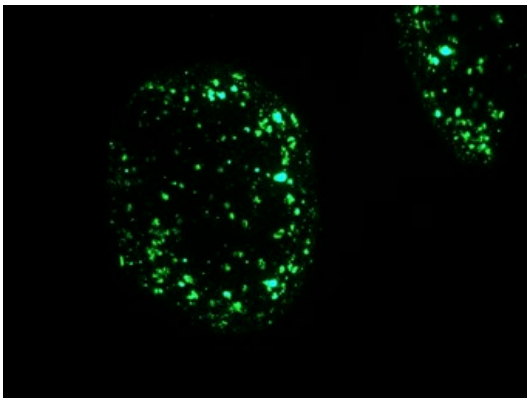


Abb. 15: **Mit DAG behandelte mineralisierte Mikromassen der Zelllinie SA4101 an Tag 3**
Aufnahme in 100-facher Vergrößerung

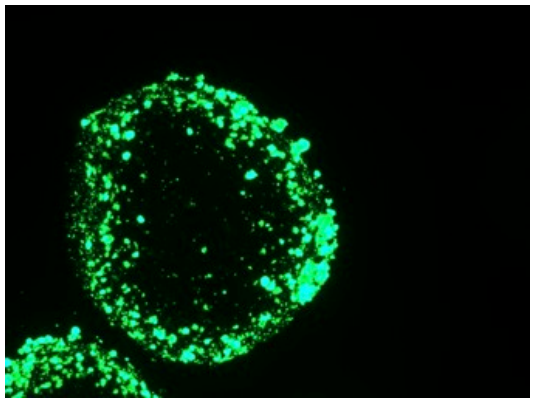


Abb. 16: **Mit DAG behandelte mineralisierte Mikromassen der Zelllinie SA4101 an Tag 6**
Aufnahme in 100-facher Vergrößerung

Bei den mit DAG behandelten Geweben der betrachteten Zelllinie veränderte sich die Mineralisation deutlich. Der durchschnittliche Wert an Tag sechs mit 27 % übersteigt den Vergleichswert an Tag drei mit 10 %. Sowohl bei den Geweben mit als auch ohne DAG-Behandlung wirkt sich eine zunehmende Kulturdauer als Einflussfaktor bei der betrachteten Versuchsreihe als förderlich auf die

Ausprägung der Mineralisation der Mikromassen aus. (s. Tabellen 8 und 9; s. Abb. 15 - Abb. 18)

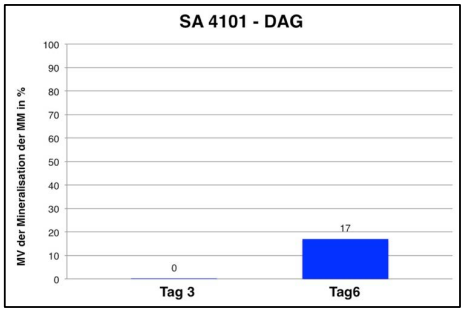


Abb. 17

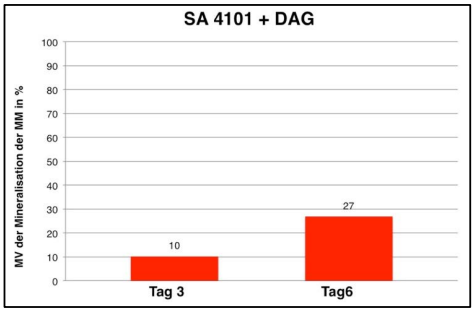


Abb. 18

Abb. 17 und Abb. 18: **Dargestellt sind die Mittelwerte der Mineralisation der Mikromassen von der Zelllinie SA4101 jew. mit bzw. ohne DAG als Flächenanteil des Messfeldes in Prozent**

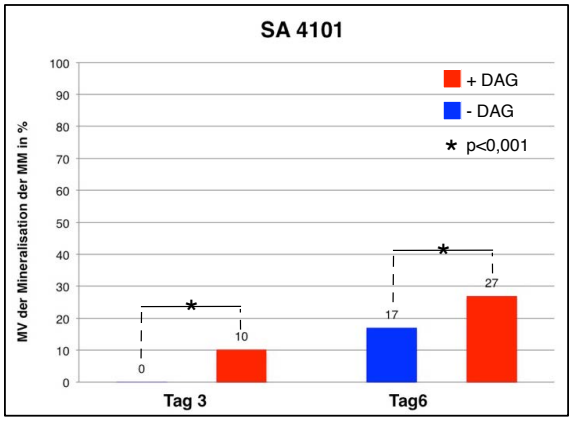
(MV = Mean value/ Mittelwert; MM = Mikromassen)

3.2.2 Der Einfluss von DAG auf die Mineralisation von Mikromassen

Betrachtet werden die durchschnittlichen Größen der zweidimensionalen Anschnittflächen aller Versuchsreihen. Bei der Darstellung findet eine Unterteilung nach Geweben statt, die mit DAG behandelt wurden und Geweben, die nicht mit DAG behandelt wurden.

Bei den unbehandelten Geweben der Zelllinie SA4101 befindet sich der Wert der Mineralisationsrate an Tag drei unterhalb der Nachweisgrenze. An Tag sechs liegt die spontane Mineralisation ohne DAG-Zusatz im Gewebe bei 17 % (s. Tabellen 8 und 9, s. Abb. 19). Bei den mit DAG behandelten Geweben zeigt sich im Vergleich die stärkste absolute Mineralisation bei Zelllinie SA4101 an Tag 6 mit 27 Prozent. Hier wird deutlich, dass mit DAG behandelte Präparate eine signifikant stärkere Mineralisationsrate aufweisen als unbehandelte Präparate (s. Tabelle 7).

Abb.19: **Mittelwerte der Mineralisation der Mikromassen von Zelllinie SA4101 an Tag 3 und an Tag 6 als Flächenanteil des Messfeldes in Prozent**
(MV = Mean value/ Mittelwert; MM = Mikromassen)



Die deutlichsten Differenzen zw. Mineralisationsraten von mit DAG behandelten und unbehandelten Geweben kann bei den Präparaten von USSC8 F2 und USSC8 festgestellt werden. Bei USSC8 F2 bewirkte die DAG-Behandlung eine Mineralisationsrate von 24 % während der Vergleichswert in der Kontrollgruppe unterhalb der Nachweisgrenze lag (s. Abb. 21). Bei USSC8 werden ähnliche Resultate beobachtet: Während in der Versuchsgruppe mit 19% bedingt durch die DAG-Behandlung eine deutliche Mineralisierung erzielt werden konnte, wurde in der Kontrollgruppe lediglich ein Mineralisierungsgrad von 1% detektiert (s. Abb. 20). Die durchschnittliche Mineralisationsrate der Versuchsgruppe von SA4101 V2 befindet sich im Größenbereich von 14%, ihr Vergleichswert ohne DAG-Behandlung befindet sich unterhalb der Nachweisgrenze (s. Abb. 22).

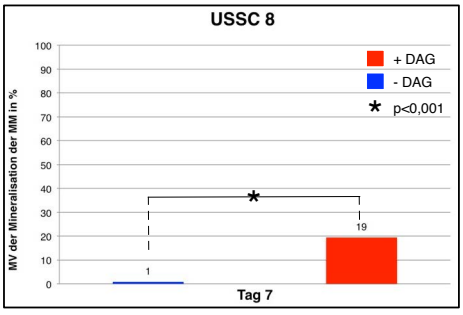


Abb. 20

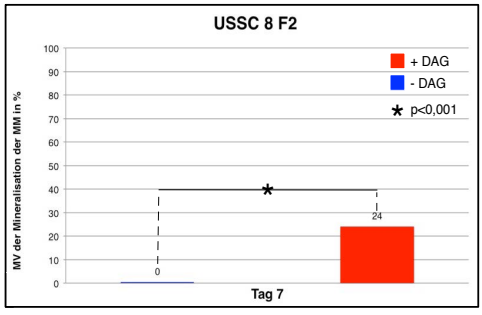


Abb. 21

Abb. 20-22: **Vergleich der Mittelwerte der Mineralisation in Prozent von den Zelllinien USSC8, USSC8 F2 und SA 4101 V2 jew. mit und ohne DAG-Behandlung**
(MV = Mean value/ Mittelwert; MM = Mikromassen)

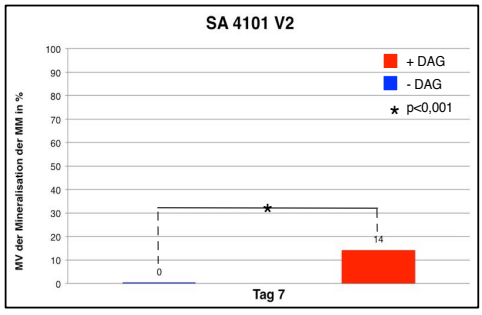


Abb. 22

Die Resultate zeigen anschaulich, dass eine Mineralisation an USSC-Mikromassen unterschiedlicher Zelllinien ohne eine Behandlung mit den osteogen wirksamen Substanzen DAG in einem Zeitraum von bis zu sieben Tagen unter der Detektionsgrenze bzw. nur in sehr geringem Maße stattfindet. Eine Behandlung der Gewebe mit DAG bewirkte in allen Versuchsreihen höhere Durchschnittwerte der Mineralisation (s. als Beispiel Abb. 23 und 24). Die statistische Auswertung per Mann-Whitney-U-Test hat mit p-Werten kleiner 0,05 (Signifikanzniveau 95%) bei allen betrachteten Ergebnissen bestätigt, dass die Behandlung mit DAG eine signifikant stärkere durchschnittliche Mineralisation der Präparate und somit der Mikromassen bewirkt (s. Tabelle 7).

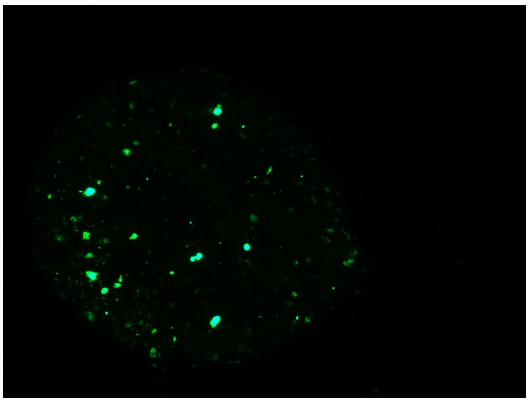


Abb. 23: **Ohne DAG behandelte mineralisierte Mikromassen der Zelllinie USSC8 F2 an Tag 7**

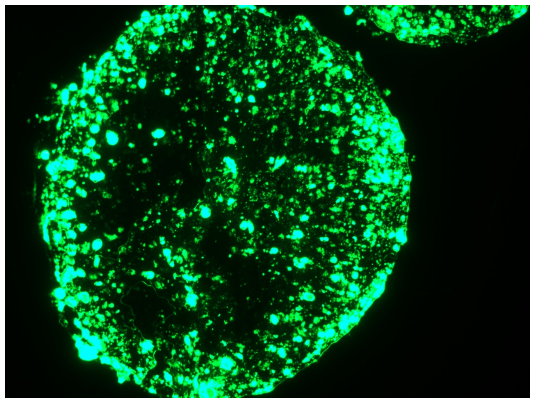


Abb. 24: **Mit DAG behandelte mineralisierte Mikromassen der Zelllinie USSC8 F2 an Tag 7**

Versuchsreihe	Tag	Ergebnis Mann-Whitney-U-Test
SA4101	Tag 3	U = 0.00, z = -3.56, p < .001.
SA4101	Tag 6	U = 34.00, z = -4.27, p < .001.
SA4101 V2	Tag 7	U = 0.00, z = -5.05, p < .001.
USSC8 F2	Tag 7	U = 0.00, z = -5.55, p < .001.
USSC8	Tag 7	U = 0.00, z = -5,43, p < .001.

Tabelle 7: **Ergebnisse des jew. Mann-Whitney-U-Test´ im Rahmen der Untersuchung zur Mineralisation zwischen Geweben mit und ohne DAG-Behandlung**

Zelllinie	Behandlung	Tag 3 MW (SD)	Tag 6 MW (SD)
SA 4101	-DAG	0 (0)	17 (6)
SA 4101	+DAG	10 (5)	27 (8)

Tabelle 8

Zelllinie	Behandlung	Tag 7 MW (SD)
SA 4101 V2	-DAG	0 (0)
SA 4101 V2	+DAG	14 (4)
USSC8	-DAG	1 (0)
USSC8	+DAG	19 (4)
USSC8 F2	-DAG	0 (0)
USSC8 F2	+DAG	24 (6)

Tabelle 9

Tabellen 8 und 9: **Mittelwerte und Standardabweichungen der Mineralisation der Mikromassen in Prozent**

(-DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung)

3.3 Die Relation zwischen der Größenentwicklung und der Mineralisierung von Mikromassen

Bei der Untersuchung von sich osteogen differenzierenden USSCs wurde deutlich, dass die Bildung der Extrazellularsubstanz ein beeinflussender Faktor für die Mineralisation ist. Eine Mikromasse stellt ein sphärisches Konglomerat aus Zellen dar, die über einen zeitlichen Verlauf Extrazellularsubstanz bilden und sezernieren. Durch den beschriebenen Versuchsaufbau entstanden kugelförmige Mikromassen, deren einzelne Zellen Extrazellularsubstanz bildeten. Eine Zunahme an Extrazellularsubstanz bewirkt auch eine Zunahme des Volumens der kugelförmigen Mikromassen. Diese dreidimensionalen sphärischen Gewebe wurden im Rahmen der Versuchsanordnung per Mikrotom geschnitten und auf Objektträgern fixiert, es wurden zweidimensionale Präparate gemessen und ausgewertet. Die Größe eines zweidimensionalen Mikromassenanschnittes lässt dementsprechend Rückschlüsse auf die Größe der dreidimensionalen Mikromassen zu. Im Zuge der Mineralisierung während der Entwicklung zu ausgereifter Knochensubstanz lagert sich Hydroxylapatit in die Matrix ein. Die

Mineralisierung der untersuchten Gewebe findet an der Extrazellularsubstanz statt, sodass ein vermehrtes Vorkommen eine günstige Voraussetzung für die Mineralisierung schafft.
Wie in den vorhergehenden Kapiteln dargestellt, führen eine Behandlung mit DAG und eine längere Differenzierungsdauer zu größeren Anschnittflächen der Präparate und zu einer stärker ausgeprägten Mineralisation von Mikromassen. Im Vergleich der absoluten Werte der Mineralisation in Prozent und der Fläche der Mikromassenanschnitte in Pixeleinheiten fällt auf, dass diese beiden Größen in Relation zueinander stehen.
Die Ausprägung der Mineralisation und die Zunahme der Mikromassengröße sind in Abhängigkeit von einer Behandlung mit DAG im gleichen Maße stärker ausgeprägt. Gut ersichtlich ist dies bei den Versuchsreihen SA4101 V2 an Tag sieben und USSC8 F2 an Tag sieben. Bei SA4101 V2 beträgt die durchschnittliche Fläche der Mikromassenanschnitte der mit DAG behandelten Gewebe an Tag sieben mit 534.685 Pixeln das 43,7-fache der Größe unbehandelter Gewebe, die durchschnittliche Mineralisation an der entsprechenden Zelllinie ist bei den mit DAG behandelten Geweben zum selben Zeitpunkt 43,5 mal so ausgeprägt wie bei unbehandelten Geweben. Ein ähnliches Verhältnis kann bei der Zelllinie mit dem stärksten absoluten Größenwachstum beobachtet werden: USSC8 F2. Hier sind bei mit DAG behandelten Geweben sowohl die Größenzunahme (Faktor 61,9) als auch die Mineralisation (Faktor 62,4) um das 62-fache stärker ausgeprägt als bei unbehandelten Geweben (s. Tabelle 10 und Tabelle 11).

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die Größe der Mikromassen und somit die Menge an Extrazellularsubstanz einen eindeutigen Einfluss auf den Grad der Mineralisation hat. Das Größenwachstum und die Mineralisation stehen dementsprechend in Relation zueinander.

Zelllinie	Tag	MW +DAG (Px)	MW -DAG (Px)	Verhältnis d. Größen von -DAG zu +DAG
SA 4101	Tag 3	150.959	2.250	67,1
SA 4101	Tag 6	319.648	219.170	1,5
SA 4101 V2	Tag 7	534.685	12.231	43,7
USSC8	Tag 7	724.778	13.677	53,0
USSC8 F2	Tag 7	896.838	14.479	61,9

Tabelle 10:

Darstellung der Mittelwerte aus den Messungen zur Größenentwicklung der Mikromassen mit bzw. ohne eine Behandlung mit DAG. Die letzte Spalte zeigt das Verhältnis der Größen zueinander als Quotient.

(-DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MW = Mittelwert der Größe der Mikromassenanschnitte in Pixeleinheiten)

Zelllinie	Tag	MW +DAG (%)	MW -DAG (%)	Verhältnis d. Größen von -DAG zu +DAG
SA 4101	Tag 3	10	0	80,5
SA 4101	Tag 6	27	17	1,6
SA 4101 V2	Tag 7	14	0	43,5
USSC8	Tag 7	19	1	26,0
USSC8 F2	Tag 7	24	0	62,4

Tabelle 11:

Darstellung der Mittelwerte aus den Messungen der Mineralisation der Mikromassen in Prozent mit bzw. ohne eine Behandlung mit DAG. Die letzte Spalte zeigt das Verhältnis der Größen zueinander als Quotient.

(-DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MW = Verhältnisse von mineralisierter zu nicht-mineralisierter Fläche dargestellt als Mittelwert)

3.4 Die Größenentwicklung der Mikromassen unter dem Einfluss von spezifischen Signalweg-Inhibitoren

Die Auswertung der Resultate zur Inhibition von Signalwegen fand anhand von zweidimensionalen Präparaten aus allen fünf Versuchsreihen statt. Bei einer dieser fünf Versuchsreihen wurden Präparate zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten der Mikromassenentwicklung hergestellt, sodass auch hier zusätzlich eine zeitliche Komponente in die Ergebnisauswertung einbezogen werden konnte. Wie in den bisherigen Kapiteln wurden die mineralisierten Flächen als Anteil eines Messfeldes in Pixeleinheiten wiedergegeben und die betroffenen Mikromassen wurden in zwei Gruppen eingeteilt: zum einen Gewebe, die eine DAG-Behandlung erfahren haben und Gewebe, die keinen Einflüssen durch DAG ausgesetzt wurden. Verglichen werden jeweils die Resultate von Mikromassen der Experimentalgruppe, die unter dem Einfluss eines spezifischen Inhibitors standen, mit der jew. Kontrollgruppe, die keine Behandlung mit Inhibitoren erfahren hat und mit „DMSO“ gekennzeichnet wurde.

3.4.1 Die Größenentwicklung der Mikromassen unter dem Einfluss von FR180204 als Inhibitor des ERK-Signalweges

Die Ergebnisse der Untersuchung über die Inhibitionswirkung des ERK-Signalweg-Inhibitors zeigt bei der Mehrheit der Zelllinien eine eindeutige Tendenz. Eine Ausnahme bildet die Zelllinie SA4101, die Aussagen über eine Größenentwicklung sowohl an Tag 3 als auch an Tag 6 zulässt. Bei Geweben mit und ohne DAG-Behandlung zeigt sie heterogene Ausprägungen bzgl. der Auswirkung auf das Größenwachstum unter dem Einfluss von FR180204. Die Größen der gemessenen Felder waren bei Präparaten mit DAG- und Inhibitorenbehandlung an Tag 3 und an Tag 6 jew. größer. Bei den jew. Vergleichsgruppen ohne Inhibitorenbehandlung fielen die durchschnittlichen Präparatgrößen kleiner aus (s. Tabelle 15, Abb. 25 und Abb. 26). Bei dem gewählten Signifikanzniveau von 95% wurden per Mann-Whitney-U-Test bei SA4101 mit Werten von $p > 0,05$ keine Signifikanten Unterschiede in der Größenausdehnung im Vergleich zur Kontrollgruppe registriert (s. Tabelle 12).

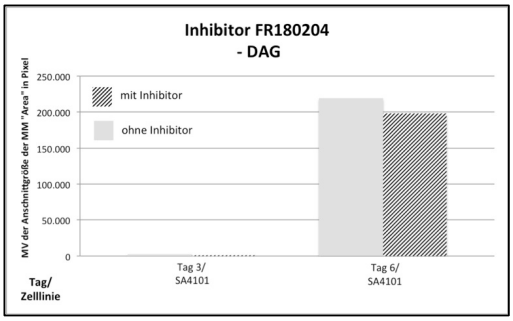


Abb. 25

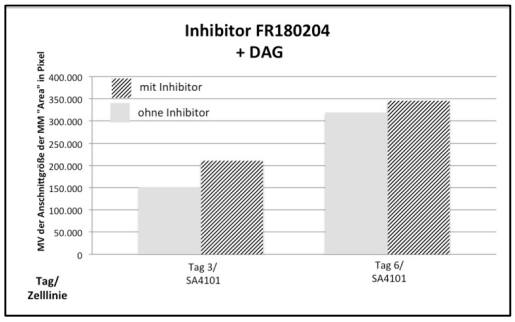


Abb. 26

Abb. 25-26**: Mittelwerte der Größenausdehnung von Mikromassenanschnittflächen in Pixeleinheiten der Versuchsreihen SA4101 an Tag 3 und an Tag 6**

(FR180204 = spezifischer Inhibitor; -DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MV = Mittelwert; MM = Mikromassen)

Eindeutige Tendenzen hingegen sind bei den Versuchsreihen SA4101 V2, USSC8 F2 und USSC8 zu erkennen. Bei allen Ergebnissen mit und ohne DAG-Behandlung erreicht die durchschnittliche Größe der Präparate unter dem Einfluss von FR180204 deutlich kleinere Werte als bei der Kontrollgruppe. Der verhältnismäßig stärkste Effekt kann bei SA4101 V2 an Geweben mit sowie ohne DAG-Behandlung beobachtet werden. Die durchschnittliche Größe von Präparaten ohne DAG-Behandlung erreicht mit 3.988 Pixeleinheiten lediglich 32% von der Größe der Kontrollgruppe mit 12.231 Pixeln. Bei Geweben mit DAG-Behandlung erreichen mit FR180204 behandelte Gewebe mit 140.453 Pixeln lediglich eine durchschnittliche Größe von 26% der Kontrollgruppe mit 534.685 Pixeln (s. Tabelle 15, Abb. 27 und Abb. 28). Die Ergebnisse des verwendeten Mann-Whitney-U-Tests ergaben bei einem gewählten Signifikanzniveau von 95% statistisch signifikante Werte (s. Tabelle 12, s. Abb. 27 - Abb. 28).

Versuchsreihe	Tag	Ergebnis Mann-Whitney-U-Test	
		-DAG	+DAG
SA4101	Tag 3	U = 29, z = -1,831, p = 0,067	U = 46, z = -0,904, p = 0,366
SA4101	Tag 6	U = 117, z = -1,188, p = 0,235	U = 150, z = -0,318, p = 0,750
SA4101 V2	Tag 7	U = 17, z = -4,049, p = 0,000	U = 6, z = -4,558, p = 0,000
USSC8 F2	Tag 7	U = 126, z = -1,775, p = 0,076	U = 97, z = -3,256, p = 0,001
USSC8	Tag 7	U = 76, z = -1,960, p = 0,050	U = 190, z = -2,701, p = 0,007

Tabelle 12: **Ergebnisse des jew. Mann-Whitney-U-Test´ im Rahmen der Untersuchung zur Größenentwicklung der Mikromassen unter dem Einfluss von FR180204 als Inhibitor des ERK-Signalweges**

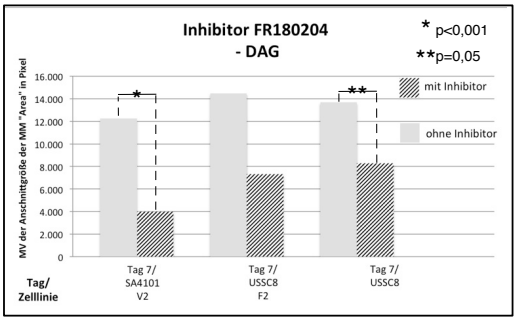


Abb. 27

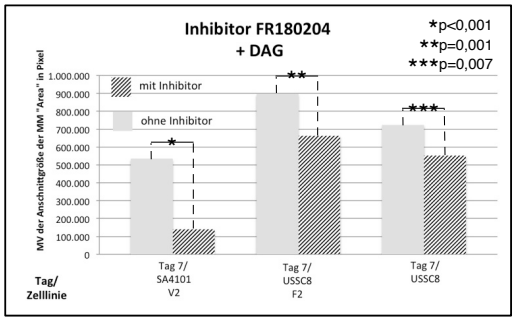


Abb. 28

Abb. 27-28**: Mittelwerte der Größenausdehnung von Mikromassenanschnittflächen in Pixeleinheiten der Versuchsreihen SA4101 V2, USSC8 F2 und USSC8**

(FR180204 = spezifischer Inhibitor; -DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MV = Mittelwert; MM = Mikromassen)

3.4.2 Die Größenentwicklung der Mikromassen unter dem Einfluss von LY294002 als Inhibitor des PI3K/Akt -Signalweges

Die Inhibition der PI3-Kinase erfolgte spezifisch durch den Inhibitor LY294002. Dieser Einfluss wirkte sich auf die mit DAG behandelten und unbehandelten Gewebe unterschiedlich aus (s. Tabelle 15, Abb. 29 - Abb. 32).

Bei allen Versuchsreihen mit Geweben ohne DAG-Einfluss wird beobachtet, dass eine Beeinflussung mit dem Inhibitor LY294002 durchschnittlich größere Mikromassen bewirkt. Dieser Einfluss des Inhibitors zeigt sich bei allen Zelllinien und zu jedem Untersuchungszeitpunkt. Die stärkste prozentuale Zunahme der durchschnittlichen Größe wird bei USSC8 F2 registriert. Hier ist die durchschnittliche Mikromassengröße mit 109.976 Pixeleinheiten ca. 8 mal so groß wie bei der Kontrollgruppe mit 14.479 Pixeleinheiten. Die absolut stärkste durchschnittliche Größenausdehnung von Geweben ohne DAG-Behandlung und mit Inhibitorenbehandlung weist Zelllinie SA4101 an Tag 6 mit 370.108 Pixeln auf. Damit ist sie um den Faktor 1,7 größer als die Größenentwicklung bei der Kontrollgruppe mit 219.170 Pixeleinheiten.

Eine Ausnahme von der genannten Tendenz der Ergebnisse zeigen Gewebe, die eine DAG-Behandlung erfahren haben bei der Zelllinie SA4101 an Tag 3, da diese durchschnittlich eine stärkere Größenausdehnung aufweisen.

Im Gegensatz dazu zeigen mit DAG behandelte Präparate der gleichen Zelllinie (SA4101) an Tag 6 sowie Präparate der Zelllinien SA4101 V2, USSC8 und USSC8 F2 eine homogene Tendenz bzgl. des Größenwachstums auf, die mit p-Werten < 0,05 beim gewählten Signifikanzniveau (95%) statistische Signifikanz aufweisen (s. Tabelle 13). Alle Mikromassen, die mit DAG behandelt wurden weisen eine geringere Größenentwicklung auf als die jew. Kontrollgruppe. Die im Verhältnis stärkste Inhibition wird bei SA4101 V2 beobachtet. Hier erreicht die Größenausdehnung mit 133.445 Pixeleinheiten lediglich 25% der durchschnittlichen Größe der unbehandelten Kontrollgruppe (s. Abb. 32).

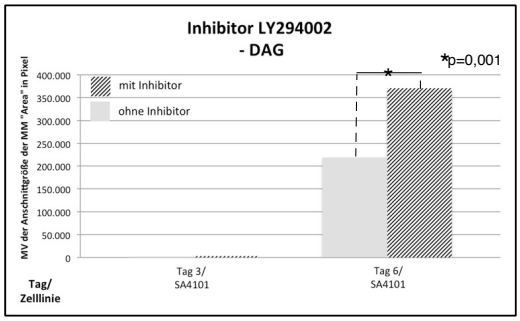


Abb. 29

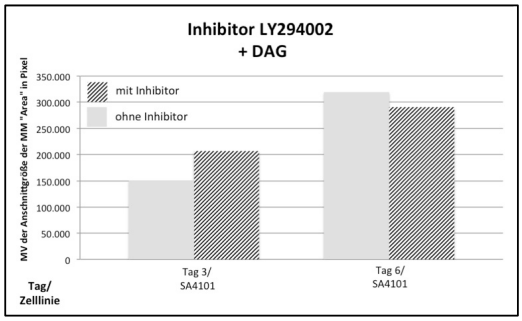


Abb. 30

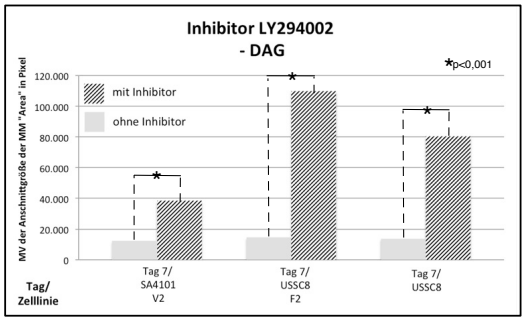


Abb. 31

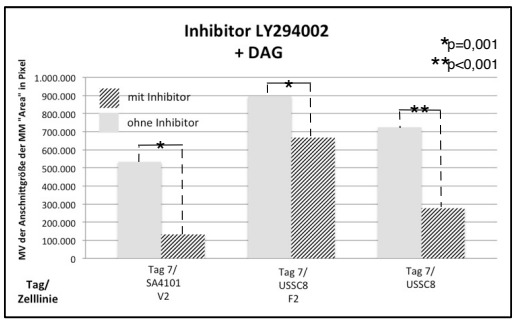


Abb. 32

Abb. 29-32**: Mittelwerte der Größenausdehnung von Mikromassenanschnittflächen in Pixeleinheiten der Versuchsreihen SA4101; SA4101 V2, USSC8 F2 und USSC8**

(LY294002 = spezifischer Inhibitor; -DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MV = Mittelwert; MM = Mikromassen)

Versuchsreihe	Tag	Ergebnis Mann-Whitney-U-Test	
		-DAG	+DAG
SA4101	Tag 3	U = 31, z = -1,143, p = 0,253	U = 43, z = -1,097, p = 0,272
SA4101	Tag 6	U = 39, z = -3,471, p = 0,001	U = 89, z = -0,867, p = 0,386
SA4101 V2	Tag 7	U = 29, z = -4,631, p = 0,000	U = 2, z = -3,467, p = 0,001
USSC8 F2	Tag 7	U = 1, z = -5,710, p = 0,000	U = 71, z = -3,324, p = 0,001
USSC8	Tag 7	U = 0, z = -5,387, p = 0,000	U = 22, z = -5,231, p = 0,000

Tabelle 13: **Ergebnisse des jew. Mann-Whitney-U-Test´ im Rahmen der Untersuchung zur Größenentwicklung der Mikromassen unter dem Einfluss von LY294002 als Inhibitor des PI3K/Akt -Signalweges**

3.4.3 Die Größenentwicklung der Mikromassen unter dem Einfluss von U0126 als Inhibitor der MAP-Kinase

Die Inhibition des MAP-Kinase-Signalweges wurde durch den spezifisch wirkenden Inhibitor U0126 bewirkt. Die Versuchsreihen SA4101 Tag 3, SA4101 Tag 6 und SA4101 V2 erreichen nur bedingt einheitliche Ergebnisse (s. Tabelle 15, Abb. 15 und Abb. 33 - 36). Gewebe ohne DAG- aber mit Inhibitorenbehandlung weisen in allen drei Versuchsreihen geringere durchschnittliche Größen auf. Deutliche Unterschiede ergeben sich hingegen in der Größenausprägung bei den Versuchsgruppen mit DAG-Behandlung. Während bei SA 4101 V2 mit dem Inhibitor behandelte Gewebe eine kleinere durchschnittliche Größe aufweisen, ist bei SA 4101 an Tag 3 die Durchschnittsgröße mit 146.927 Pixeln ähnlich hoch wie bei der Kontrollgruppe mit 150.959 Pixeln. An Tag 6 weist SA4101 eine geringere durchschnittliche Mikromassengröße auf.

Die Gewebe der Zelllinien USSC8 und USSC8 F2 reagierten hingegen in gleicher Weise. Bei Präparaten ohne eine Behandlung mit DAG ist die durchschnittliche Größenausdehnung ausgeprägter als bei der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse von Geweben ohne DAG-Behandlung zeigen bei USSC8 F2 ein um das 1,9-fach und bei USSC8 eine um das 2,5-fach stärkeres Größenwachstum.

Gewebe dieser beiden Zelllinien, die eine Behandlung mit DAG erfahren haben weisen geringere durchschnittliche Größen auf. Die Beeinflussung durch den Inhibitor fällt bei beiden Versuchsreihen sehr ähnlich aus: Die Gewebe von Zellllinie USSC8 F2 erreichen mit 692.184 Pixeleinheiten ca. 77% der

Größenausdehnung ihrer unbehandelten Kontrollgruppe. Die entsprechende Versuchsgruppe bei USSC8 erreicht mit 546.448 Pixeleinheiten ca. 75 % der Größenausdehnung in der Kontrollgruppe. DAG-behandelte Gewebe dieser beiden Zelllinien reagieren auf den MAP-Kinase-Inhibitor entsprechend mit einem um 23% - 25% schwächeren Größenwachstum (s. Tabelle 15). Mit p-Werten von jew. deutlich unter 0,05 wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und den Kontrollgruppen bei USSC8 F2 und USSC8 ermittelt (s. Tabelle 14, Abb. 35 - 36).

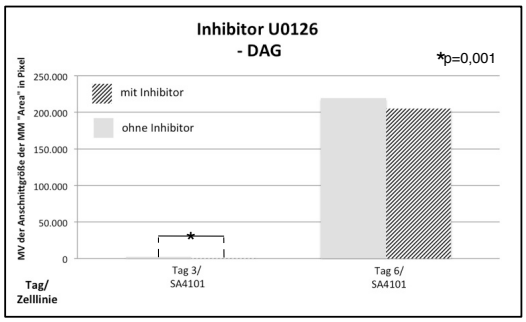


Abb. 33

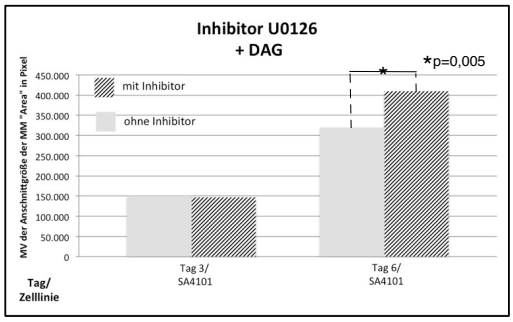


Abb. 34

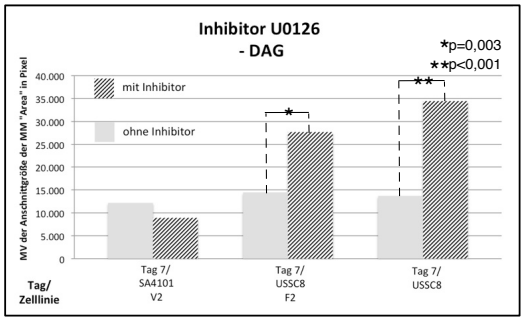


Abb. 35

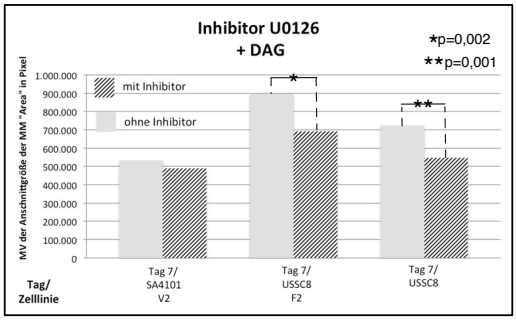


Abb. 36

Abb. 33-36**: Mittelwerte der Größenausdehnung von Mikromassenanschnittflächen in Pixeleinheiten der Versuchsreihen SA4101, SA4101 V2, USSC8 F2 und USSC8**

(U0126 = spezifischer Inhibitor; -DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MV = Mittelwert; MM = Mikromassen)

Versuchsreihe	Tag	Ergebnis Mann-Whitney-U-Test	
		-DAG	+DAG
SA4101	Tag 3	U = 15, z = -3,220, p = 0,001	U = 36, z = -0,355, p = 0,722
SA4101	Tag 6	U = 132, z = -0,693, p = 0,488	U = 77, z = -2,834, p = 0,005
SA4101 V2	Tag 7	U = 118, z = -1,378, p = 0,168	U = 165, z = -0,676, p = 0,499
USSC8 F2	Tag 7	U = 95, z = -2,999, p = 0,003	U = 112, z = -3,043, p = 0,002
USSC8	Tag 7	U = 58, z = -3,489, p = 0,000	U = 131, z = -3,337, p = 0,001

Tabelle 14: **Ergebnisse des jew. Mann-Whitney-U-Test´ im Rahmen der Untersuchung zur Größenentwicklung der Mikromassen unter dem Einfluss von U0126 als Inhibitor des MAPK-Signalweges**

A

SA 4101	Tag 3		DMSO MW (SD)	FR MW (SD)	LY MW (SD)	U0126 MW (SD)
		-DAG	2.250	1.186	3.361	729
			(1.555)	(878)	(2.181)	(367)
		+DAG	150.959	211.154	206.848	146.927
			(90.029)	(117.360)	(78.469)	(57.606)
	Tag 6		DMSO MW (SD)	FR MW (SD)	LY MW (SD)	U0126 MW (SD)
		-DAG	219.170	197.867	370.108	205.234
			(68.660)	(79.216)	(120.743)	(92.347)
		+DAG	319.648	345.386	290.837	409.597
			(76.991)	(124.663)	(87.720)	(104.720)

B

SA 4101 V2	Tag 7		DMSO MW (SD)	FR MW (SD)	LY MW (SD)	U0126 MW (SD)
		-DAG	12.231	3.988	38.352	8.869
			(8.649)	(2.172)	(29.226)	(6.295)
		+DAG	534.685	140.453	133.445	490.437
			(168.576)	(114.833)	(111.183)	(185.271)

C

USSC8 F2	Tag 7		DMSO MW (SD)	FR MW (SD)	LY MW (SD)	U0126 MW (SD)
		-DAG	14.479	7.334	109.976	27.623
			(12.444)	(3.953)	(66.142)	(19.074)
		+DAG	896.838	662.923	665.910	692.184
			(240.552)	(182.206)	(141.429)	(193.860)

D

USSC8	Tag 7		DMSO MW (SD)	FR MW (SD)	LY MW (SD)	U0126 MW (SD)
		-DAG	13.677	8.289	80.472	34.485
			(7.959)	(4.147)	(40.994)	(23.946)
		+DAG	724.778	551.371	277.509	546.448
			(164.613)	(247.295)	(182.894)	(159.929)

Tabelle 15 A-D: **Mittelwerte und Standardabweichungen der Größenausdehnung von Mikromassenanschnittflächen in Pixeleinheiten aller Versuchsreihen**

(-DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung)

3.5 Die Mineralisation der Mikromassen unter dem Einfluss von spezifischen Signalweg-Inhibitoren

Die Auswertung der Mineralisation von Mikromassen unter dem Einfluss spezifischer Signalweg-Inhibitoren fand ebenfalls an zweidimensionalen Präparaten aller fünf Versuchsreihen statt. Wie bei allen vorher beschriebenen Versuchen erfolgte die Auswertung auch hier an Präparaten mit als auch ohne DAG-Behandlung. Bei der Zelllinie SA4101 erfolgte die Untersuchung zusätzlich an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der Gewebedifferenzierung. Die mineralisierten Flächen werden analog zu Kapitel 3.2 als Anteil eines Messfeldes in Pixeleinheiten wiedergegeben. Verglichen wird jeweils die Entwicklung von Mikromassen der Experimentalgruppe, die unter dem Einfluss eines spezifischen Inhibitors standen, mit der jew. Kontrollgruppe, die keine Behandlung mit Inhibitoren erfahren hat.

3.5.1 Die Mineralisation der Mikromassen unter dem Einfluss von FR180204 als Inhibitor des ERK-Signalweges

Die Wirkung des Inhibitors FR180204 zeigt vorrangig einheitliche Tendenzen bei den verschiedenen Versuchsreihen. Die Beeinflussung hat sich in Abhängigkeit von der Versuchsreihe unterschiedlich stark ausgewirkt.

Bei fast allen Präparaten ohne DAG-Behandlung geht die Mineralisation gegen null Prozent. Die Ausnahme bildet die Versuchsreihe SA4101 an Tag 6, bei der die ohne DAG behandelten Gewebe mit einer durchschnittlichen Mineralisationsrate von 20 Prozent eine geringgradig stärkere Mineralisation als die Anschnitte der Kontrollgruppe ohne Inhibitor- und ohne DAG-Behandlung mit 17 % aufweisen (s. Tabelle 19, s. Abb. 37, 38, 39, 40).

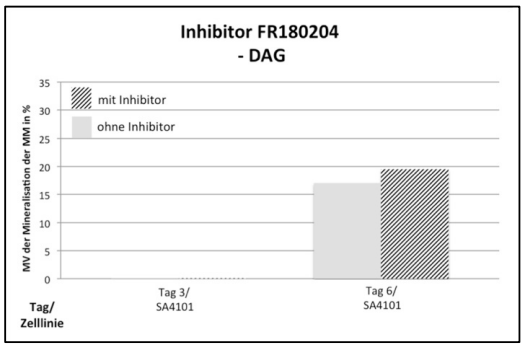


Abb. 37

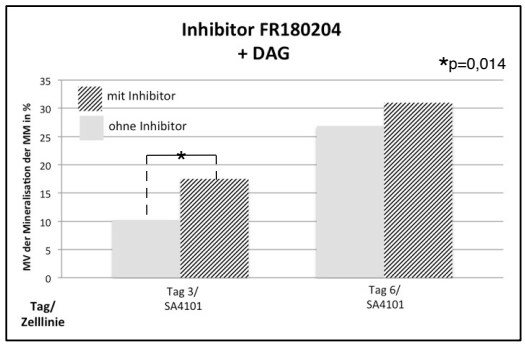


Abb. 38

Abb. 37-38**: Mittelwerte der Mineralisation der Mikromassen in Prozent, betrachtet wird die Versuchsreihe SA4101 an Tag 3 und an Tag 6**

(FR180204 = spezifischer Inhibitor; -DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MV = Mittelwert; MM = Mikromassen)

Bei Geweben, die mit DAG behandelt wurden ist bei allen Versuchsreihen außer SA4101 eine einheitliche Tendenz erkennbar. Während die Inhibitorenbehandlung bei der Zelllinie SA4101 an Tag drei und an Tag sechs eine stärker ausgeprägte Mineralisation als bei der Kontrollgruppe bewirkt, reagierten die Gewebe der übrigen Versuchsreihen different. Bei SA4101 V2, USSC8 F2 und USSC8 bewirkt die Behandlung mit FR180204 einheitlich eine Verringerung der Mineralisation der Mikromassen (s. Abb. 37, 38, 39, 40). Die Ergebnisse des verwendeten Mann-Whitney-U-Tests ergeben statistisch signifikante Differenzen (gewähltes Signifikanzniveau 95%) (s. Tabelle 16).

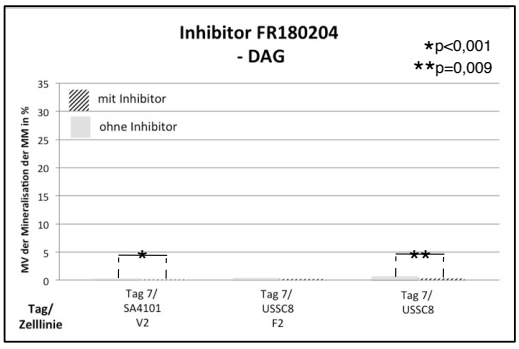


Abb. 39

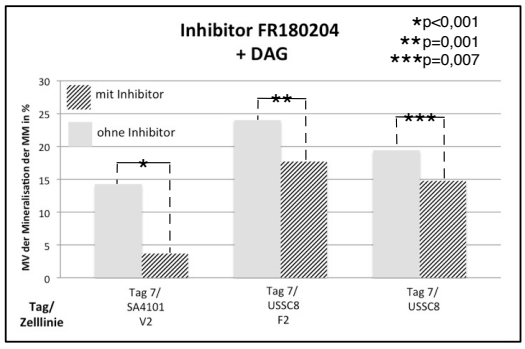


Abb. 40

Abb. 39-40**: Mittelwerte der Mineralisation der Mikromassen in Prozent, betrachtet werden die Versuchsreihen SA4101 V2, USSC8 und USSC8 F2**

(FR180204 = spezifischer Inhibitor; -DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MV = Mittelwert; MM = Mikromassen)

Versuchsreihe	Tag	Ergebnis Mann-Whitney-U-Test	
		-DAG	+DAG
SA4101	Tag 3	U = 44, z = -0,785, p = 0,432	U = 22, z = -2,453, p = 0,014
SA4101	Tag 6	U = 134, z = -0,627, p = 0,531	U = 100, z = -1,910, p = 0,056
SA4101 V2	Tag 7	U = 17, z = -4,054, p = 0,000	U = 6, z = -4,559, p = 0,000
USSC8 F2	Tag 7	U = 126, z = -1,776, p = 0,076	U = 97, z = -3,256, p = 0,001
USSC8	Tag 7	U = 59, z = -2,602, p = 0,009	U = 190, z = -2,701, p = 0,007

Tabelle 16: **Ergebnisse des jew. Mann-Whitney-U-Test´ im Rahmen der Untersuchung zur Mineralisation der Mikromassen unter dem Einfluss von FR180204 als Inhibitor des ERK-Signalweges**

3.5.2 Die Mineralisation der Mikromassen unter dem Einfluss von LY294002 als Inhibitor des PI3K/Akt -Signalweges

Der Einfluss von LY294002 wirkte sich auf die mit DAG behandelten und unbehandelten Gewebe unterschiedlich aus. Eine Ausnahme bilden die Ergebnisse von SA4101.

Als eine Gemeinsamkeit aller Versuchsreihen fiel die geringe spontane durchschnittliche Mineralisationsrate bei Präparaten ohne DAG-Behandlung auf.

Hier gehen die Mineralisationsraten gegen null bzw. überschreiten sie 5% nicht. Eine Ausnahme ist bei SA4101 an Tag sechs der Zelldifferenzierung ohne DAG-Behandlung ersichtlich. Hier entsteht unter dem Einfluss des Inhibitors mit einer Mineralisationsrate von 22% eine geringgradig stärkere Mineralisation als in der Vergleichsgruppe ohne eine entsprechende Behandlung mit 17 %. Da hinsichtlich der Mineralisierung bei der Versuchsreihe SA4101 an Tag drei mit DAG-Behandlung eine gesteigerte und an Tag sechs eine nahezu gleich bleibende Mineralisation vorliegt, kann bei dieser Zelllinie keine eindeutige Aussage hinsichtlich der inhibierenden Wirkung von LY294002 getroffen werden (s. Abb. 41-42). Die p-Werte im Rahmen eines Mann-Whitney-U-Tests weisen bei Zelllinie SA4101 keine statistischen Signifikanzen auf (s. Tabelle 17).

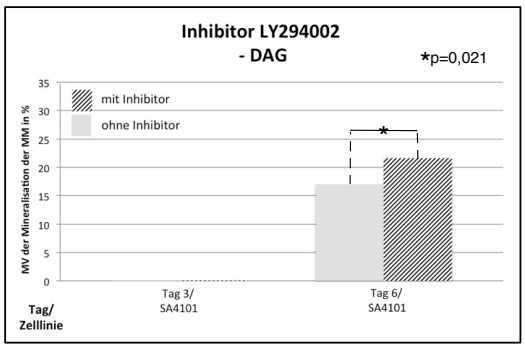


Abb. 41

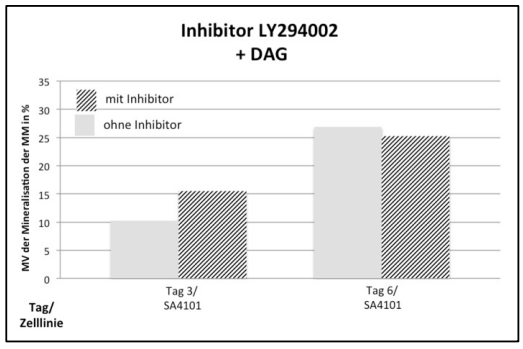


Abb. 42

Abb. 41-42**: Mittelwerte der Mineralisation der Mikromassen in Prozent, betrachtet wird die Versuchsreihe SA4101 an Tag 3 und an Tag 6**

(LY294002 = spezifischer Inhibitor; -DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MV = Mittelwert; MM = Mikromassen)

Anders verhält es sich bei den mit DAG behandelten Präparaten. Eine Gemeinsamkeit zeichnet sich bei den Zelllinien SA4101 V2, USSC8 F2 und USSC8 ab: Bei diesen drei Zelllinien fällt die Rate der durchschnittlichen Mineralisation bei Präparaten unter dem Einfluss eines Inhibitors im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne inhibierende Substanzen signifikant ab. Der Einsatz signalinhibierender Substanzen bewirkte bei diesen Versuchsgruppen eine verringerte Mineralisation (s. Abb 43, 44, 45, 46). Auch hier zeigte der angewendete Mann-Whitney-U-Test statistisch signifikante Ergebnisse (s. Tabelle 17).

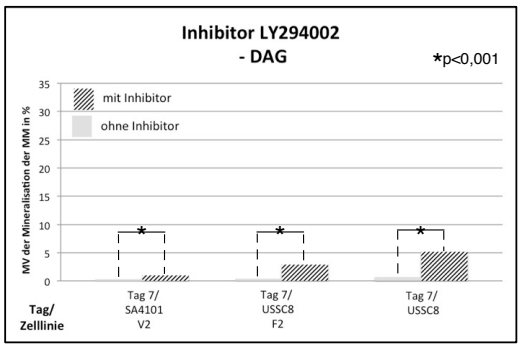


Abb. 43

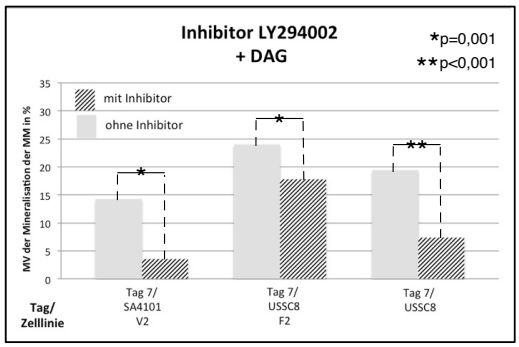


Abb. 44

Abb. 43-44**: Mittelwerte der Mineralisation der Mikromassen in Prozent, betrachtet werden die Versuchsreihen SA4101 V2, USSC8 und USSC8 F2**

(LY294002 = spezifischer Inhibitor; -DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MV = Mittelwert; MM = Mikromassen)

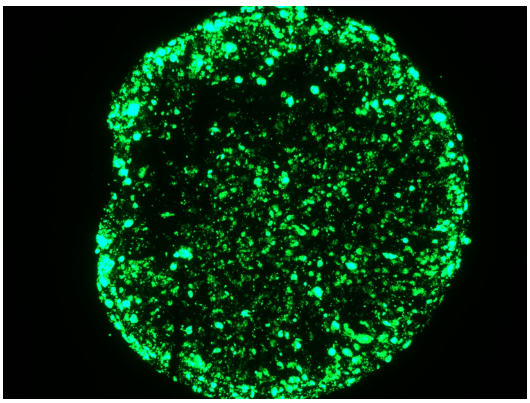


Abb. 45: **Mit DAG, ohne Inhibitor behandelte mineralisierte Mikromassen der Zelllinie USSC8 an Tag 7**

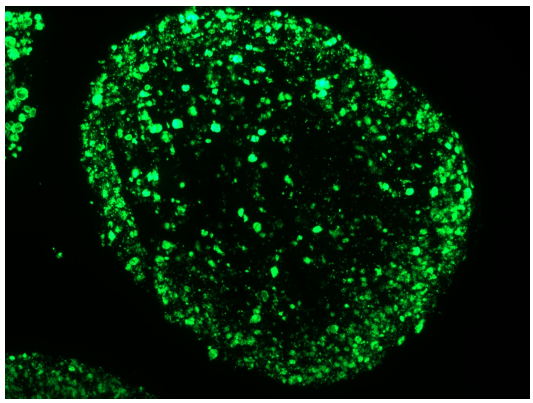


Abb. 46: **Mit DAG und mit Inhibitor LY294002 behandelte mineralisierte Mikromassen der Zelllinie USSC8 an Tag 7**

Versuchsreihe	Tag	Ergebnis Mann-Whitney-U-Test	
		-DAG	+DAG
SA4101	Tag 3	U = 25, z = -1,636, p = 0,102	U = 45, z = -0,968, p = 0,333
SA4101	Tag 6	U = 71, z = -2,314, p = 0,021	U = 76,5, z = -1,383, p = 0,167
SA4101 V2	Tag 7	U = 30,5, z = -4,593, p = 0,000	U = 2, z = -3,467, p = 0,001
USSC8 F2	Tag 7	U = 1, z = -5,711, p = 0,000	U = 71, z = -3,324, p = 0,001
USSC8	Tag 7	U = 5, z = -5,258, p = 0,000	U = 22, z = -5,231, p = 0,000

Tabelle 17: **Ergebnisse des jew. Mann-Whitney-U-Test´ im Rahmen der Untersuchung zur Mineralisation der Mikromassen unter dem Einfluss von LY294002 als Inhibitor des Pi3K/Akt-Signalweges**

3.5.3 Die Mineralisation der Mikromassen unter dem Einfluss von U0126 als Inhibitor der MAP-Kinase

Die Inhibition des MAPK-Signalweges bewirkt ähnlich wie bei der Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges in Kapitel 3.5.2 unterschiedliche Resultate in Abhängigkeit von einer DAG-Behandlung und in Abhängigkeit von der Zelllinie.

Die Mittelwerte der Mineralisation in den Versuchsgruppen aller Versuchsreihen ohne DAG-Behandlung betragen zwischen 0-1% und weichen bei beinahe allen Versuchsreihen nicht bzw. nur minimal von den Vergleichsergebnissen in der jew. Kontrollgruppe ohne die Behandlung mit einem Inhibitor ab. Ähnlich wie in dem vorhergehenden Kapitel bildet SA4101 eine Ausnahme von dieser Tendenz. Die Mineralisationsrate beträgt in der Versuchsgruppe ohne DAG-Behandlung an Tag

sechs 14% und liegt somit deutlich oberhalb der Mineralisation der anderen Versuchsreihen. Die Mineralisationsrate der Kontrollgruppe ohne Inhibitor-Behandlung liegt mit 17% geringfügig höher, sodass ein geringer inhibierender Effekt auf die Mineralisation durch U0126 in dieser Versuchsreihe vorliegt (s. Tabelle 19, s. Abb. 47).

Anders verhält es sich bei den Ergebnissen von Geweben, die eine DAG-Behandlung erfahren haben. Eine interessante Entdeckung ist beim Vergleich der Resultate von Tag drei und Tag sechs der Mikromassendifferenzierung zu beobachten. Bei Präparaten der Zelllinie SA4101 bewirkt die Behandlung mit Signalweginhibitoren an Tag drei mit 8% eine geringere Mineralisationsrate als bei der Kontrollgruppe, die mit 10% ohnehin einen vergleichsweise geringen Durchschnittswert der Mineralisation aufweist. Nach sechs Tagen Dauer der Zelldifferenzierung unter Beeinflussung durch U0126 hingegen kann mit 30% im Vergleich zur Kontrollgruppe (27% Mineralisationsrate) eine stärkere Mineralisierung ausgemacht werden (s. Tabelle 19, s. Abb. 48).

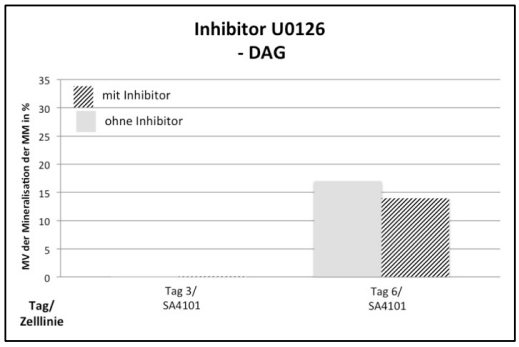


Abb. 47

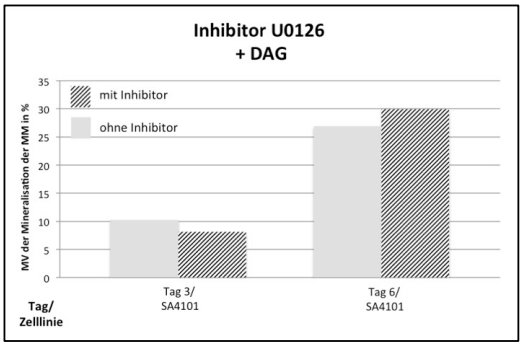


Abb. 48

Abb. 47-48**: Mittelwerte der Mineralisation der Mikromassen in Prozent, betrachtet werden die Versuchsreihen SA4101, SA4101 V2, USSC8 und USSC8 F2**

(U0126 = spezifischer Inhibitor; -DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MV = Mittelwert; MM = Mikromassen)

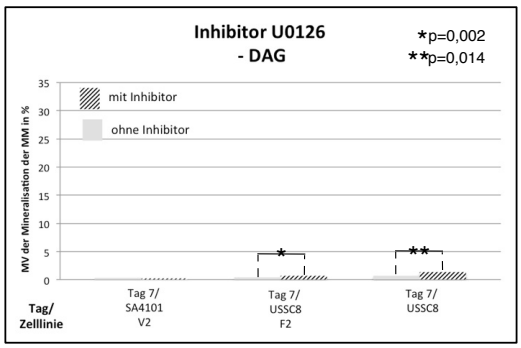


Abb. 49

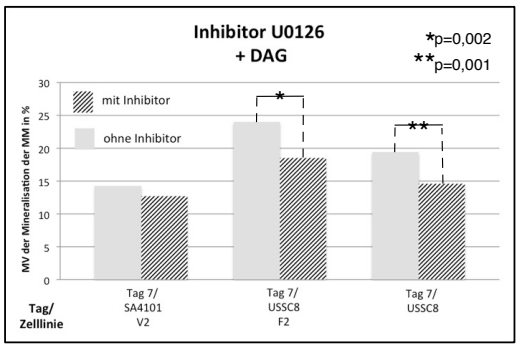


Abb. 50

Abb. 49-50**: Mittelwerte der Mineralisation der Mikromassen in Prozent, betrachtet werden die Versuchsreihen SA4101, SA4101 V2, USSC8 und USSC8 F2**

(U0126 = spezifischer Inhibitor; -DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MV = Mittelwert; MM = Mikromassen)

Die Ergebnisse der Versuchsreihen SA4101 V2, USSC8 F2 und USSC8 tendieren einheitlich in eine andere Richtung. Hier kommt es durch die Einflussnahme des Inhibitors einheitlich zu empfindlich geringer mineralisierten Präparaten. Statistisch signifikante Ergebnisse werden bei den Versuchsreihen USSC8 und USSC8 F2 erreicht (s. Abb. 49-50). Die statistische Relevanz der Beeinflussung von U0126 wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests geprüft und wird in Tabelle 18 zusammengefasst (s. Tabelle 18).

Versuchsreihe	Tag	Ergebnis Mann-Whitney-U-Test	
		-DAG	+DAG
SA4101	Tag 3	U = 42, z = -1,657, p = 0,097	U = 30 , z = -0,889, p = 0,374
SA4101	Tag 6	U = 111, z = -1,386, p = 0,166	U = 138, z = -0,975, p = 0,329
SA4101 V2	Tag 7	U = 117,5, z = -1,395, p = 0,163	U = 165, z = -0,676, p = 0,499
USSC8 F2	Tag 7	U = 93, z = -3,053, p = 0,002	U = 112, z = -3,043, p = 0,002
USSC8	Tag 7	U = 93, z = -2,454, p = 0,014	U = 131,5, z = -3,327, p = 0,001

Tabelle 18: **Ergebnisse des jew. Mann-Whitney-U-Test´ im Rahmen der Untersuchung zur Mineralisation der Mikromassen unter dem Einfluss von U0126 als Inhibitor des MAPK-Signalweges**

		Fluoreszenzsignal (in %) bzw. Mineralisation (in %)			
		DMSO MW (SD)	FR MW (SD)	LY MW (SD)	U0126 MW (SD)
SA 4101	Tag 3				
	-DAG	0	0	0	0
		(0)	(0)	(0)	(0)
	+DAG	10	17	16	8
		(5)	(7)	(9)	(4)
	Tag 6				
	-DAG	17	20	22	14
		(6)	(8)	(5)	(7)
	+DAG	27	31	25	30
		(8)	(10)	(10)	(17)

		Fluoreszenzsignal (in %) bzw. Mineralisation (in %)			
		DMSO MW (SD)	FR MW (SD)	LY MW (SD)	U0126 MW (SD)
SA 4101 V2	Tag 7				
	-DAG	0	0	1	0
		(0)	(0)	(1)	(0)
	+DAG	14	4	4	13
		(4)	(3)	(3)	(5)

		Fluoreszenzsignal (in %) bzw. Mineralisation (in %)			
		DMSO MW (SD)	FR MW (SD)	LY MW (SD)	U0126 MW (SD)
USSC8 F2	Tag 7				
	-DAG	0	0	3	1
		(0)	(0)	(2)	(1)
	+DAG	24	18	18	19
		(6)	(5)	(4)	(5)

		Fluoreszenzsignal (in %) bzw. Mineralisation (in %)			
		DMSO MW (SD)	FR MW (SD)	LY MW (SD)	U0126 MW (SD)
USSC8	Tag 7				
	-DAG	1	0	5	1
		(0)	(0)	(4)	(1)
	+DAG	19	15	7	15
		(4)	(7)	(5)	(4)

Tabelle 19: **Mittelwerte und Standardabweichungen der Mineralisation von Mikromassenanschnittflächen in Pixeleinheiten aller Versuchsreihen**

(-DAG = Präparat ohne Zusatz von DAG; +DAG = Präparat mit Zusatz von DAG; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung)

4. Diskussion

Im Zuge der fortwährenden Forschung zur Entwicklung und Verbesserung von Therapiealternativen bei der Behandlung umfangreicher Gewebeverluste hat die gesteuerte Geweberegeneration/ *Guided Tissue Regeneration* (GTR) zunehmend an Bedeutung gewonnen. Bei der Therapie großvolumiger Knochendefekte hat das *Tissue Engineering* von osteogenen Strukturen einen wichtigen Stellenwert erreicht, da regenerative Therapieformen vor allem im ästhetischen Mund- Kiefer- und Gesichtsbereich eine fortschrittliche Behandlungsweise ermöglichen (Handschel, 2007). Studien mit Stammzellen, die aus Nabelschnurblut gewonnen wurden haben im Verlauf der letzten Jahre zunehmend Beachtung gefunden (Liu et al., 2010). Um die Effizienz dieser GTR-Methoden zu optimieren ist u.a. die Steuerung der Gewebedifferenzierung auf zellulärer Ebene von stetigem Interesse. Aus diesem Grunde wurden im Rahmen der vorliegenden Studie die Möglichkeiten der gezielten Beeinflussung der osteogenen Differenzierung durch die Zugabe bestimmter Chemikalien betrachtet. Die Untersuchung fand an humanen pluripotenten Stammzellen aus Nabelschnurblut (sog. „USSCs“) statt. Im Zuge der Bestrebungen bei Tissue Engineerung ohne artifizielle Trägergerüste auszukommen, wurden diese Zellen durch labortechnische Methoden zu dreidimensionalen sphärischen Zellkonglomeraten kultiviert. Aus diesen Mikromassen wurden laborseitig nach drei, sechs bzw. sieben Tagen Schnittpräparate hergestellt. Durch hydroxylapatit-affine Färbeverfahren wurden das Größenwachstum sowie der Grad der Mineralisierung visualisiert. Die Präparate wurden im Lichtmikroskop fotografiert, die Analyse der osteogenen Differenzierung erfolgte anhand der mineralisierten Bereiche in einem definierten Messfeld.

Die Möglichkeiten zum gesteuerten Wachstum von Knochengewebe zu restaurativ- therapeutischen Zwecken sind bisher nicht abschließend erforscht worden. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde gezielt das Differenzierungsverhalten von USSC-Mikromassen beeinflusst, um neue Erkenntnisse über das gesteuerte Wachstumsverhalten von Mikrogeweben zu

erhalten. Diese Erkenntnisse bilden neue Grundlagen für die Entwicklung von Strategien zur Gewinnung von Knochengewebe.

4 .1 Erörterung der verwendeten Materialien und Methoden

4.1.1 Auswahl der Zellen

Studien wie die hier vorliegende haben das mittel- bis langfristige Ziel Therapiestrategien zu entwickeln, die in der Praxis Verwendung finden. Bereits hierdurch entstehen bestimmte Voraussetzungen, die die verwendeten Zellen erfüllen müssen, um für die vorliegenden Versuchsreihen verwendet werden zu können. Hierzu zählen eine möglichst weitreichende Multipotenz in Bezug auf das Differenzierungspotenzial sowie die Unbedenklichkeit in rechtlicher und ethischer Hinsicht.

Obwohl Embryonale Stammzellen (ESC) das breiteste Differenzierungspotenzial aufweisen, ist deren Nutzung für Therapiestrategien auf zellulärer Ebene aus verschiedenen Gründen nicht geeignet. Neben einer ggf. auftretenden Entstehung von Teratomen und Degenerationen im Verlauf der Entwicklung verbieten ethische Kernpunkte deren Nutzung (Kögler et al., 2004).

Bei unrestringierten somatischen Stammzellen (USSC) handelt es sich um Spenderzellen. Ihre Verwendung wurde als ethisch unbedenklich eingestuft, da sie nicht gleichzusetzen sind mit embryonalen Stammzellen (Kögler et al., 2004). Auch aus anwendungsbezogener Sicht bieten USSCs mehrfach Vorteile: Die Ernte geeigneter Zellen aus Nabelschnurblut ist ein Routineverfahren und für den Spender risikofrei. USSCs sind praktisch unbegrenzt verfügbar und lassen sich laborseitig in großen Mengen kultivieren. Sie behalten die Potenz sich zu unterschiedlichen Zelltypen zu differenzieren vergleichsweise lange bei und in ihrem Differenzierungsspektrum ist die Entwicklung in die osteogene Richtung enthalten. In Tierversuchen kam es an keiner Stelle zu tumorösen Entartungen (Kögler, 2004). Weitere Studiengruppen kamen zu ähnlichen Ergebnissen, die für spätere Therapieformen von Relevanz sein könnten: Allay et al. zeigten im Tierversuchsmodell, dass in Calciumphosphat-Keramikzylindern transplantierte

humane mesenchymale Vorläuferzellen in vivo die knöcherne Integration der Transplantate anregen können (Allay et al., 1997).
Weitere Vorteile zeigte eine chinesische Studie: Große Defekte an der Kalotte von athymischen Ratten wurden durch eine Kombination von Knochen als Resultat von Tissue Engineering und osteogen induzierten humanen Nabelschnurblutstammzellen behandelt. Die Resultate zeigten, dass 12 Wochen nach der Implantation im Gegensatz zur Kontrollgruppe bereits 78,19% des Defektvolumens ausgeheilt waren (Liu et al., 2010).
Diese vielseitigen Untersuchungen zeigen durch eindeutige Vorteile der Gewebe eine hohe Relevanz der USSCs für das osteogene Tissue Engineering.

4.1.2 Nicht feststellbare Einflüsse durch den angewendeten Zusatz DMSO in allen Versuchsreihen

DMSO findet weitgehend Verwendung als Lösungsmittel in der medikamentösen Therapie. Der Grund hierfür liegt in einer polaren Sulfinylgruppe und zwei nicht-polaren Methylgruppen (s. Abb. 51), durch die Substanzen unterschiedlicher Polarität gelöst werden können (de Abreu Costa et al., 2017). Auch bei der Erstellung von Zellkulturen hat sich aus der Gruppe der Sulfoxide diese Verbindung als Zusatz bewährt. Aus Vergleichsgründen wurden sowohl den Experimentalgruppen als auch den Kontrollgruppen jeweils DMSO zugesetzt. Beim Anlegen einer Zellkultur werden die o.g. Funktionen von DMSO benötigt. Dennoch muss an dieser Stelle methodenkritisch betrachtet werden, dass ein evtl. eintretender Einfluss auf die Größenausdehnung oder die Mineralisation der Mikromassen durch die Verbindung nicht überprüft werden kann, da alle Versuchsgruppen einen DMSO-Zusatz erhielten und somit für einen evtl. Einfluss durch die Substanz keine Kontrollgruppe vorliegt.

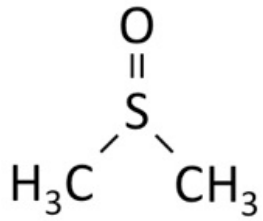


Abb. 51: **Strukturformel Dimethylsulfoxid/ DMSO**

4.1.3 DAG als Einflussfaktor

Die Auswirkungen auf die osteogene Differenzierung von multipotenten Stammzellen durch eine Vorbehandlung mit DAG und die anschließende Behandlung mit intrazellulär wirkenden Inhibitoren wurde bislang nicht abschließend erforscht.
Neben der spontanen osteogenen Differenzierung an unbehandelten Geweben wird im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls die Differenzierung an Geweben untersucht, die mit den osteogen wirksamen Substanzen Dexamethason, Ascorbinsäure und β-Glyzerolphosphat behandelt wurden.

Die Benutzung von DAG zur Differenzierung von multipotenten Stammzellen in die osteogene Richtung hat sich auch im Rahmen von Tissue Engineering als Standardprozedur etabliert (Langenbach und Handschel, 2013). Um die Steuerbarkeit der Zell-Differenzierung therapeutisch nutzbar zu machen, ist der Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Geweben unerlässlich für eine effektive Entwicklung von Knochenersatzmaterialien.

4.1.4 Zellzahlbestimmung und Zählprotokoll

Bei der Passagierung von Zellen im Rahmen der Zellkultur fand die Aufsplittung mit 0,25%igem Trypsin statt, sodass die Ablösung der Zellen durch eine enzymatische Reaktion stattfand. Zellen des *Monolayers*, die dennoch auf ihrer Unterlage verblieben wurden durch vorsichtiges Klopfen gegen die Kulturflasche

abgelöst. Obwohl es sich um ein übliches Verfahren handelt, besteht verfahrensbedingt immer das Risiko, dass ein Rest kultivierter Zellen mit hohem Haftvermögen auf ihrer Unterlage verbleibt und somit nicht weiter verwendet wird. Des Weiteren befinden sich unter den abgelösten Zellen auch Exemplare mit sehr niedrigem Haftvermögen, die durch die beschriebene Verfahrensweise ungewollt mitselektiert und schließlich in die Auswertung einbezogen werden.
Bei der Bestimmung der Zellzahl kam ein bewährtes Zählprotokoll zum Einsatz (s. Kapitel 2.2.2). Verfahrensbedingt kommt es hierbei zu Fehlern in der Zellzahlbestimmung. Die Zellen sind naturgemäß ungleichmäßig verteilt, sodass sich auch auf den Grenzlinien der Zählkammer i.d.R. Zellen befinden. Um diesen Umstand vergleichbar zu machen, muss ein Zählprotokoll verwendet werden, das bei allen zu zählenden Zellen im Rahmen der Studie strikt angewendet wird. Bei dem angewandten Vorgehen unter zur Hilfenahme der Zählkammer vom Typ „Neubauer improved“ werden Zellen auf der unteren und rechten Grenzlinie nicht in die Zählung aufgenommen. Befinden sich auf den unteren und rechten Grenzlinien deutlich mehr Zellen als auf den in die Zählung einbezogenen Grenzlinien, kommt es zum Missverhältnis und die Zellzahl wird systembedingt verfälscht. Aus Gründen der Vereinheitlichung und der Vergleichbarkeit ist die Einbeziehung dieser Normierung jedoch zwingend notwendig.

4.1.5 Färbung und Größenbestimmung der Präparate

Da im Verlauf der Knochenentwicklung aus Osteoid durch die Einlagerung von Kalziumphosphat und Hydroxidionen sog. Hydroxylapatit entsteht, handelt es sich um ein Vorläufergewebe ausgereiften Knochens (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015). Während des Mineralisierungsprozesses der sich osteogen differenzierenden Mikromassen kommt es ebenfalls zur Einlagerung von Hydroxylapatit in das Kollagengerüst. Ein Nachweis für das Vorkommen von diesem Vorläufergewebe ist somit ein Anzeichen von Mineralisierung. Der Nachweis wurde in der vorliegenden Studie über ein Färbemittel erbracht, das spezifisch an Hydroxylapatit bindet (s. Kapitel 2.2.6). Diese Herangehensweise ermöglichte eine sehr genaue Messung der Mineralisation der Präparate im

Durchlichtmikroskop. Die Feststellung der Größenausdehnung war nicht auf diese Weise möglich, da eine Messung der Präparatgröße abhängig von einer ausreichend starken Mineralisation gewesen wäre. Schwach mineralisierte Präparate hätten auf diese Weise nicht erfolgreich gemessen werden können. Um dieses Problem zu umgehen wurde zusätzlich zu der Färbung mineralisierter Bereiche eine Kernfärbung durchgeführt. Auf diese Weise konnte die Größe des zu vermessenden Präparates unabhängig von der jeweiligen Mineralisation erfasst werden.

4.1.6 Morphologie und Mineralisation

Morphologie von Mikromassen

Mikromassen stellen Konglomerate aus einer Vielzahl einzelner Zellen dar. Wie bei allen lebenden biologischen Geweben, die einer Vielzahl von äußeren Faktoren unterliegen sind nicht alle Mikromassen in ihrer Form zu 100 % identisch. Wie in Kapitel 1.3 erwähnt, wird durch die bewährte Benutzung konischer Agarosebetten den dreidimensional wachsenden Mikromassen eine sphärische Form vorgegeben.
Auch wenn eine zu 100 % exakte Form nicht generell nicht vorhersagbar ist, wird auf diese Weise eine Vereinheitlichung unterschiedlicher Mikromassen und somit die Vergleichbarkeit der Gewebe erreicht.

Mineralisation innerhalb der Mikromassen

Ebenfalls nicht vorhersagbar ist die genaue Lokalisation mineralisierter Bereiche innerhalb der Mikromassen. Bei der Betrachtung der einzelnen Anschnitte fiel auf, dass die Mineralisation in den randständigen Arealen der kreisrunden Mikromassen- Anschnitte häufig stärker ausgeprägt ist als die Mineralisationsrate in zentralen Bereichen (s. Abb. 52).
Die Mittelwerte der Mineralisation setzen sich aus den Messergebnissen der einzelnen Präparate zusammen. Die Mineralisation innerhalb der Mikromassen ist

nicht vollständig homogen. Wie o.g. fallen bei den Präparaten randständig stärker mineralisierte Bereiche auf. Eine unvorhersehbare Schwäche bei der hier angewendeten Methode wird deutlich, da bei ungleichmäßig mineralisierten Geweben bedeutsam wird, wo eine kugelförmige Mikromasse beim Anschneiden getroffen wird (s. Abb. 23). Wird sie an der äußersten Stelle angeschnitten, resultiert daraus im Schnittpräparat randständig sowie zentral ein stark mineralisiertes Areal mit vergleichsweise kleinem Durchmesser. Wird die Mikromasse genau zentral angeschnitten, resultiert daraus ein Schnittpräparat mit zentral geringerer und randständig stärker ausgeprägter Mineralisation. Statistisch gesehen ist die Wahrscheinlichkeit die Mikromasse genau zentral anzuschneiden geringer bzw. ist es wahrscheinlicher, dass Areale angeschnitten werden, die zwischen der äußersten und der zentralen Schicht der Mikromasse liegen.

Zusammengefasst handelt es sich um ein für die vorliegende Situation methodenspezifisches Problem, das alle Gewebe gleichermaßen betrifft. Durch die Zusammenfassung der Mineralisationsgrade der einzelnen Anschnitte innerhalb der jew. Versuchsgruppen werden die Mittelwerte miteinander vergleichbar. Diese Mittelwerte der verschiedenen Versuchsgruppen werden im Rahmen der Ergebnisauswertung den Mittelwerten anderer Versuchsgruppen, die der gleichen Problematik unterliegen, gegenübergestellt.

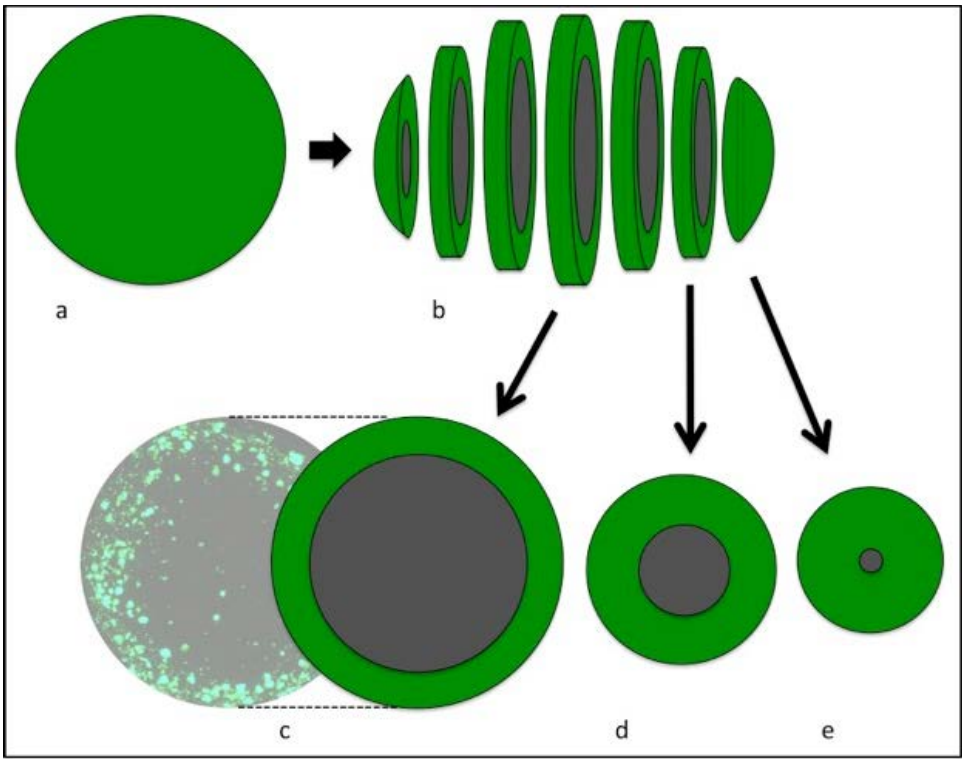


Abb. 52: **Schema zur Anfertigung von zweidimensionalen Schnittpräparaten aus dreidimensionalen Mikromassen –** Darstellung wie aus einer sphärischen Mikromasse (a) Schnittpräparate (b) angefertigt werden; man unterscheidet zentrale Anschnitte (c), randständige Anschnitte (e) und dazwischen liegende (d)
grün = mineralisierter Bereich, grau = nicht mineralisierter Bereich

4.1.7 Vermessung der Felder und Benutzung eines Auswertungsalgorithmus´

Die Vermessung der Präparate in Bezug auf Größe und Mineralisation erfolgte EDV-gestützt mit Hilfe von vorgegebenen Messfeldern. Systembedingt wurden runde Anschnitte von Mikromassen mit einem quadratischen Messfeld erfasst. Die mineralisierten Bereiche erscheinen in der Aufnahme gefärbt. Methodenkritisch ist anzumerken, dass es zu rein dunklen Anteilen in den vier Ecken des Messfeldes kommt. Sämtliche Daten wurden nach Erfassung mit Hilfe eines Auswertungsalgorithmus extrapoliert, damit die Werte aller Anschnitte vergleichbar bleiben.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Die Wirkung von DAG auf die Differenzierung von Mikromassen

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass die DAG-Gabe bei Kulturen, die aus embryonalen Stammzellen bestehen eine osteogene Differenzierung auslösen (Bielby et al., 2004; Handschel, et al., 2008). Gemeinhin wird angenommen, dass die Bildung von Osteocalcin als Zeichen für eine osteogene Differenzierung der Zellen zu werten ist (Buttery et al., 2001; zur Nieden et al., 2003).

Kögler et al. generierten multipotente Stammzellen aus Nabelschnurblut (Kögler et al., 2004), die als „USSCs“ (*Unrestringed somatic stemm cells*) benannt wurden. Handschel et al. zeigten, dass die gezielte Zugabe von DAG zur Mineralisation dieser Zellen führen kann (Langenbach und Handschel, 2013). In vitro-Versuche von Langenbach und Handschel zeigten auch, dass dreidimensional organisierte Zellen neben einer induzierten Mineralisation ebenfalls spontan mineralisieren können. Durch diese Beobachtung ist der Vergleich zwischen induzierter und nicht induzierter Mineralisation an Mikromassen von gesteigerter Bedeutung.

Besonders anschauliche Resultate der DAG-Wirkung entstanden bei der Versuchsgruppe USSC8 F2. Hier befindet sich die Mineralisation ohne eine Beeinflussung mit DAG nach 7 Tagen Zellkultur unterhalb der Nachweisgrenze. Gewebe der Versuchsgruppe, die eine DAG-Behandlung erfahren haben weisen hingegen eine Mineralisationsrate von 24% nach 7 Tagen Kulturdauer auf. Alle anderen Versuchsgruppen wiesen ähnliche Ergebnisse mit einer etwas schwächeren Ausprägung auf. Bei der Versuchsgruppe USSC 8 fiel ebenfalls nach 7 Tagen Differenzierungsdauer die Mineralisierung der Mikromassen mit 19% unter DAG- Einfluss im Vergleich zu 1% ohne den beschriebenen Einflussfaktor ebenfalls deutlich ausgeprägter aus. Den geringsten Unterschied in der Mineralisierung zwischen Geweben mit und ohne DAG-Behandlung bildet die Versuchsreihe SA4101. Hier war die spontane Mineralisation mit 17% am 6. Tag der Zelldifferenzierung bereits deutlicher ausgeprägt als bei anderen

Versuchsgruppen. Unter DAG-Einfluss zeigte sich nach der gleichen Differenzierungsdauer eine Mineralisationsrate von 27%.

Die hier ausgewerteten Versuche zeigen, dass eine Beeinflussung durch die Zusätze Dexamethason, Ascorbinsäure und ß-Glyzerolphosphat in allen Versuchsgruppen zu signifikant stärker mineralisierten Mikromassen führt.

Zu interessanten Ergebnissen kamen Lammers et al. in einer Studie im Jahr 2012, die u.a. die Mineralisation an Mikromassen hinsichtlich der Ortständigkeit untersuchte. Unterschieden wurde zwischen der Mineralisation an der Oberfläche von Mikromassen und in zentralen Bereichen. Gewebe ohne DAG-Behandlung zeigten nach 14 und nach 28 Tagen Zellkultivierung lediglich geringe Anzeichen von Mineralisation auf der Oberfläche der Zellkonglomerate. Im Gegensatz hierzu waren nach 28 Tagen die Zellkonglomerate von Geweben mit DAG-Behandlung auf der Oberfläche nahezu vollständig mineralisiert. Ein überraschender Aspekt kam bei der Mineralisation in zentralen Bereichen zum Vorschein: Mineralisierte Areale von Geweben ohne DAG-Behandlung mit einer randständig schwachen Mineralisation zeigten im Innern eine eher homogene Verteilung mit einer mikrokristallinen Struktur. Gewebe mit DAG-Behandlung hingegen zeigten kleinere miteinander verbundene Mineralglobuli und zunächst eine fast ausschließlich im Randbereich ausgeprägte Mineralisation. Außerdem zeigen ohne DAG behandelte Gewebe Nach 28 Tagen Zellkultivierung zeigten sowohl mit als auch ohne DAG behandelte Gewebe intensive Mineralisation (Lammers et al., 2012).

Wie auch bei Lammers et al. fiel im Rahmen dieser Arbeit bei der Betrachtung der Mikromassen auf, dass in randständigen Gebieten der Präparate eine stärkere Mineralisation vorherrscht als zentral. Ein möglicher Grund hierfür kann ein vergleichsweiser Ernährungsmangel des Gewebes in zentralen Bereichen sein, der die randständigen Bereiche nicht betrifft. Zellen an der Oberfläche der Zellkonglomerate werden i.d.R. direkt von DAG erreicht, sodass diese drei Substanzen ungehindert Einfluss ausüben können. Da die Substanzen per Diffusion in zentrale Bereiche vordringen, kommt es in weiter innen liegenden Bereichen zu einem geringeren Kontakt und somit zu einer geringeren Beeinflussung durch DAG.

Ein weiterer Faktor, der zentral in Mikromassen eine geringere Mineralisation bewirkt als in randständigen Bereichen ist, dass bei einer zunehmenden Induktion in die osteogene Richtung durch DAG zusätzlich eine verminderte Zellmigration resultieren kann (Langenbach et al., 2010). Dies bedeutete eine weitere Verringerung des Kontaktes zentral liegender Zellen zu den beeinflussenden Substanzen DAG, die sich außerhalb des Zellkonglomerates befinden.
Die Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Versuchsreihen zeigten somit ähnliche Ausprägungen bezogen auf die Orte der Mineralisation innerhalb von sphärischen Zellkonglomeraten wie in vergleichbaren Studien.

4.2.2 Erörterung der Eigenschaften von 2D- und 3D- Geweben zu therapeutischen Zwecken

Aktueller Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen ist noch immer die Frage, ob für das osteogene Tissue-Engineering weiterhin artifizielle Matrizes als Trägergerüst und Zellen aus einer Monolayer-Zellkultur genutzt werden sollen oder ob die vielseitigen Vorteile von dreidimensionalen Mikromassen für den Einsatz bei gesteuerter Geweberegeneration überwiegen. Die Ergebnisse bisheriger Studien zu dieser Themenstellung zeigen, dass zahlreiche Nachteile, die durch umstrittene künstliche Trägergerüste aufkamen bei deren Substitution durch natürliches Gewebe entfallen. Allen voran sind Immunreaktionen zu nennen: Große Knochenverluste sind vielfach traumatisch bedingt (z.B. durch Unfallfolgen) oder Resektionsdefekte nach bösartigen Erkrankungen. Der großvolumige Knochenverlust kann durch primäre Knochenschäden aufgrund der Erkrankung per se bedingt sein sowie durch chirurgisch-resektive Therapiemaßnahmen. Der Transplantations-Situs stellt aufgrund seines individuellen Krankheitsverlaufes einen häufig vorgeschädigten Bereich dar. Eine nicht vorhersagbare Immunreaktion in einem derart sensiblen und vorgeschädigten Gebiet würde den durchgeführten Therapieversuch zunichte machen oder zumindest eine erhebliche Komplikation ausmachen. Ein transplantiertes Gewebe müsste nach einem missglückten Einheilungsversuch ggf. entfernt werden, wodurch ein knöcherner

Verlust zusätzlich zu dem ohnehin vorhandenen Schaden entstünde. Neben der schwindenden Bereitschaft des Patienten für weitere Therapieansätze würde das ohnehin vorgeschädigte Gewebe auf diese Weise zusätzlichen Schaden erleiden. Die Mikromassentechnik bringt durch die dreidimensionale Zellkultur ohne künstliche Trägergerüste für die Therapie beträchtliche Vorteile mit sich. Zum einen ähnelt das Verhalten der Zellen im Vergleich zu zweidimensionalen Zellkulturen eher den in vivo-Bedingungen (Handschel, 2007). Zum anderen ist auch förderlich, dass die Bereitschaft der Zellkonglomerate zur Mineralisation vergleichsweise hoch ist, wofür die erhöhte Aktivität von alkalischer Phosphatase ein Grund sein kann (Gerber und Gwynn, 2002). Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen aber auch, dass im Aussprossungsversuch eine stärker ausgeprägte Zellmigration in zweidimensionalen Zellkulturen vorherrscht. Durch deren Nutzung könnte die Generierung von Knochengewebe am Transplantationsort verbessert werden (Langenbach et al., 2010).

Einfluss einer Vorbehandlung mit DAG auf 2D- und 3D-Gewebe

Die Untersuchung von Langenbach et al. ergab, dass eine zunehmende Dauer der Vordifferenzierung von Zellen mit DAG eine stärker ausgeprägte Mineralisation bewirkt. Distanzmessungen von aussprossenden Zellen bei Geweben mit einer verhältnismäßig langen Dauer der Vordifferenzierung im osteogen induktiven Medium zeigten aber auch, dass eine erheblich geringere Strecke im Rahmen der Zellaussprossung zurückgelegt wird (Langenbach et al., 2010). Roeb gab als mögliche Gründe an, dass aufgrund der randständig ausgeprägten Mineralisation in Mikromassen die zentral liegenden Zellen eingeschlossen und daher an der Migration zunehmend gehindert werden (Roeb, 2012).

4.2.3 Die Relevanz von Signalwegen für die Mineralisation

Die statistische Auswertung erbrachte interessante Ergebnisse für die Steuerung von Geweben zu therapeutischen Zwecken. Bei der Interpretation der Resultate wurden die Einflüsse durch die Behandlung bzw. Nichtbehandlung mit DAG untersucht sowie die Einflüsse auf die Entwicklung von Größe und Mineralisation von Mikromassen durch drei jew. unabhängig voneinander eingesetzte Inhibitoren. Der Vergleich der Effekte von DAG und den Inhibitoren zeigte interessante Resultate. Insbesondere zwei von drei Inhibitoren lieferten erstaunliche Erkenntnisse hinsichtlich der Steuerbarkeit der Mikromassengrößenentwicklung und -mineralisation.

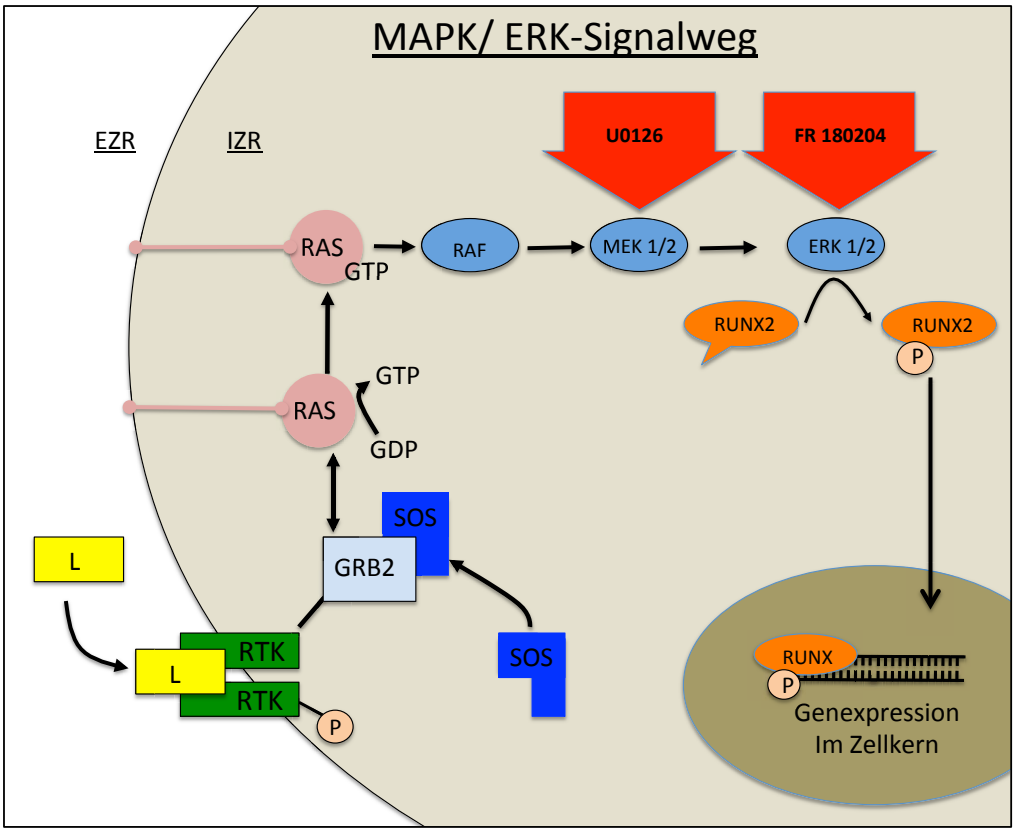


Abb. 53: **MAPK-Signalweg mit Regulationsmöglichkeit durch die Inhibitoren U0126 und FR180204** modifiziert nach Alberts et al. (Alberts et al., 2017) (MAPK = Mitogen aktivierte Protein-Kinase; EZR=Extrazellularraum; IZR=Intrazellularraum; L= Ligand; RTK= Rezeptor-Tyrosinkinase; P=Phosphat; GRB2=*Growth factor receptor-bound protein* 2; SOS=*Son Of sevenless*/ GTP-Austauschfaktor; RAS=*Rat sarcoma*/ ein Proto-Onkogen; GDP=Guanosindiphosphat; GTP=Guanosintriphosphat; RAF=*Rat Fibrosarcoma*/ eine Proteinkinase; MEK1/2=eine MAP-Kinase; ERK1/2=Extracellular-signal regulated Kinases; RUNX2=*Runt-related transcription factor 2*; U0126= spezifischer Inhibitor für MEK1/2; FR180204= spezifischer Inhibitor für ERK1/2)

FR180204 als Inhibitor des ERK-Signalweges

Ohori et al. konstatierten, dass es sich bei FR180204 um einen kompetitiven ATP-Hemmer mit guter Zellmembranpermeabilität handelt, der selektiv an ERK bindet (Ohori et al., 2005) (s. Abb. 53). Die Inhibition des ERK-Signalweges wird im Rahmen dieser Studie sehr deutlich u.a. in der Beeinträchtigung des Größenwachstums der Mikrogewebe. Ohne eine Behandlung mit DAG findet in der Kontrollgruppe, die nur mit DMSO behandelt wurde, sowie in fast allen Versuchsgruppen mit Inhibitorenbehandlung praktisch keine Mineralisation statt. Die DAG-Behandlung erbringt in diesen Fällen keine Änderung der Mineralisation. Eine Ausnahme bildet die Versuchsgruppe SA4101 an Tag 6: in der Kontrollgruppe wird mit einer Mineralisationsrate von 17% ein verhältnismäßig hoher Wert erreicht, der i.R. der Inhibitorenbehandlung im Gegensatz zu allen anderen Resultaten auf einen Wert von 20% ansteigt. Signifikante und besonders ausgeprägte Ergebnisse sind hier vor allem bei der Versuchsgruppe SA4101 V2 zu beobachten, bei der die durchschnittliche Größe der inhibierten Gewebe nur 32% von der Größe der Gewebe der Kontrollgruppe beträgt. Dementsprechend fielen in allen Fällen die Größenausdehnung der Präparate deutlich kleiner aus als in der Kontrollgruppe. Im Verlauf der Untersuchung wurde deutlich, dass DAG einen ausschlaggebenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung haben kann. Hildebrandt et al. konstatierten, dass vor allem Dexamethason als Zusatz zum Kulturmedium den führenden osteoinduktiven Faktor bei der osteogenen Differenzierung darstellt (Hildebrandt et al., 2009). Gewebe, die eine DAG-Behandlung erfahren haben, weisen wie in vorhergehenden Kapiteln gezeigt generell höhere Werte bei der Größenausdehnung und Mineralisation auf. Auch bei diesen Geweben zeigen sich wie bei den unbehandelten Geweben auch ähnliche Beeinflussungen durch den Inhibitor FR180204. Die durchschnittlichen Präparatgrößen von fast allen Versuchsgruppen fielen deutlich kleiner aus als bei der Kontrollgruppe ohne Inhibitorenbehandlung. Die o.g. Korrelation von Größe und Mineralisation der Mikromassen kann hier ebenfalls anschaulich beobachtet werden. Alle Versuchsgruppen deren Größe durch die Inhibitorenbehandlung verringert wurde weisen entsprechend geringere Werte bei der Mineralisation auf. Besonders anschaulich wird dies bei der Versuchsgruppe SA4101 V2 und USSC8.

Während die durchschnittliche Größe der Präparate bei USSC8 durch den Einfluss des Inhibitors lediglich 76% des Vergleichswertes in der Kontrollgruppe beträgt, fällt die Mineralisation mit 7% im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe mit 19% ebenfalls signifikant geringer aus. Ähnlich verhält es sich bei der Versuchsgruppe SA4101 V2: FR180204 bewirkt hier eine Größenausdehnung auf lediglich 26% der Größe von ihrer Kontrollgruppe. Die Mineralisation fällt mit 4% in der Versuchsgruppe erheblich geringer aus als mit 14% in der Kontrollgruppe ohne Inhibitorbehandlung. Die Relevanz von ERK wurde in vergleichbaren Studien auch in der Vergangenheit diskutiert. Als kompetitiver ATP-Hemmer wirkt FR180204 direkt auf ERK ein. Paula-Silva et al. untersuchten den indirekten Einfluss von $Ca(OH)_2$ auf die Mineralisation und fanden heraus, dass die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von ERK in Abhängigkeit von $Ca(OH)_2$ geschieht. Durch die Blockade von Kalziumkanälen wurde die Phosphorylierung von ERK indirekt vermindert, was eine Inhibition der Cementogenese zur Folge hatte. Auf diese Weise kam die Studiengruppe ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Inhibition des ERK-Signalweges eine verminderte Mineralisation zur Folge hat, was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt (Paula-Silva et al., 2010). Ein wesentlicher Unterschied liegt in der Unmittelbarkeit des verwendeten Inhibitors: Während die Blockade von Kalziumkanälen und die darauf folgende verminderte Phosphorylierung indirekt auf ERK einwirkt, handelt es sich bei FR180204 um einen direkten Inhibitor von ERK. Kritisch fällt hierbei auf, dass eine sehr gute Membrangängigkeit für den Inhibitor gewährleistet sein muss, ohne die eine Hemmung nicht möglich ist. Die Wirkung von FR180204 ist entsprechend abhängig von der Permeabilität der Zellmembran für den Inhibitor.

Die vorwiegend homogenen Reaktionen zeigen eine deutliche Reduktion von Mikromassengröße und Mineralisation durch eine Behandlung mit dem Inhibitor FR180204. Dadurch wird die Steuerbarkeit sowohl der Größenentwicklung der Gewebe als auch ihrer Mineralisation durch eine Signalinhibition mit Hilfe von FR180204 möglich. Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse wird die besondere Rolle von ERK1/ERK2 bei der osteogenen Differenzierung deutlich, sodass FR180204 als wichtiger Faktor für die gesteuerte Knochenentwicklung eingeordnet werden kann.

U0126 als Inhibitor des ERK-Signalweges

Bei U0126 handelt es sich um einen Inhibitor, der selektiv an MEK1/MEK2 bindet (s. Abb. 53) und dadurch die Signalweiterleitung im MAPK-Signalweg inhibiert (Yu et al., 2018). Im Rahmen aktueller Studien zur Wirkung bestimmter Hormone auf odontogene Differenzierungsvorgänge und auf die Ausbildung einer Mineralisation (Han et al., 2017) sowie in Versuchsreihen zur MTA-abhängigen (*Mineral trioxide aggregate*) osteogenen Differenzierung (Wang et al., 2018) wird die zuverlässige Wirkung von U0126 als Inhibitor im MAPK-Signalweg bestätigt.

Die Wirkung des Inhibitors auf die durchschnittliche Größe der Mikromassen ohne eine Behandlung mit DAG zeigt in den Versuchen unterschiedliche Ausprägungen: Bei zwei von fünf Versuchsgruppen führt die Behandlung mit dem spezifischen Inhibitor zu einer Absenkung der durchschnittlichen Mikromassengröße. Die Größe von Geweben der anderen beiden Versuchsgruppen USSC8 und USSC8 F2 steigt dagegen im Rahmen der Inhibitorbehandlung signifikant an. Die Anwendung des Inhibitors ohne eine Behandlung mit DAG bewirkt bei diesen beiden Versuchsgruppen eine Steigerung der durchschnittlichen Mikromassengröße. Kritisch anzusehen ist der unerwartete Anstieg der durchschnittlichen Mikromassengröße unter dem Einfluss von U0126 ausschließlich bei den beiden Versuchsgruppen USSC8 und USSC8 F2. Ein möglicher Grund hierfür kann in den verwendeten Zelllinien bzw. an den Zellen selbst liegen. Als natürliches Gewebe unterliegen die verwendeten Gewebe naturgemäß auftretenden Unregelmäßigkeiten. Diese könnten z.B. eine veränderte Zellmembran beinhalten, sodass intrazellulär wirkende Inhibitoren die Zellmembran nicht oder nicht in ausreichendem Maße passieren können.

Wie bei den meisten Fällen ohne DAG-Behandlung fällt die Mineralisation auch bei Geweben nach einer Behandlung mit dem Inhibitor U0126 sowohl in den Versuchsgruppen als auch in der Kontrollgruppe gering aus bzw. geht gegen 0. Eine Ausnahme bildet auch hier die Versuchsgruppe SA4101 an Tag 6, da hier wie bei vielen anderen Versuchsgruppen auch eine verhältnismäßig hohe Spontanmineralisation vorliegt, deren Rate auch bei einer Verringerung durch den Inhibitor immer noch 14% ausmacht.

Auffällig ist, dass sich die durchschnittliche Mikromassengröße bei den Zelllinien USSC8 und USSC8 F2 vergrößerte während sich diese bei anderen Zelllinien verringerten. Vor dem Hintergrund, dass eine Signalinhibition im MAPK-Signalweg in der Vergangenheit sowie in aktuellen Studien durch U0126 zuverlässig möglich war (Han et al., 2017; Wang et al., 2018), könnten die heterogenen Reaktionen der Zelllinien auf den Inhibitor U0126 auf Unregelmäßigkeiten oder Fehler in den Zelllinien selbst zurückzuführen sein.

Auch bei Geweben mit DAG- Behandlung erreichen die Ergebnisse unterschiedliche Ausprägungen: Bei den Versuchsgruppen USSC8 und USSC8 F2 erreichen sowohl die Größenausdehnung als auch die Mineralisation eine geringere Ausprägung als in den jew. Kontrollgruppen. Die Mineralisation bei USSC8 beträgt bei Geweben mit einer U0126-Behandlung noch 75% des Vergleichswertes in der Kontrollgruppe. Die Versuchsgruppe USSC8 F2 erreicht mit einer Mineralisationsrate von 77% des Kontrollwertes unter dem Einfluss von U0126 einen ähnlich geringen Wert. Die anderen drei Versuchsgruppen SA4101 Tag 3, SA4101 Tag 6 und SA4101 V2 reagieren unterschiedlich auf die signalinhibierende Behandlung und lassen keine einheitliche Aussage zu.

Da in den Versuchen mit den anderen betrachteten Inhibitoren LY294002 und FR180204 die beiden Versuchsreihen USSC8 und USSC8 F2 ähnliche Tendenzen aufweisen, könnte hier die eingeschränkte Aussage getroffen werden, dass durch den Inhibitor U0126 in Verbindung mit einer DAG-Behandlung sowohl die durchschnittliche Mikromassengröße als auch die durchschnittliche Mineralisation gesenkt werden können. Eine definitive Aussage über die Auswirkungen einer Behandlung mit dem Inhibitor U0126 ist aufgrund der Heterogenität der Ergebnisse zwischen den hier vorliegenden Versuchsgruppen allerdings nur eingeschränkt möglich.

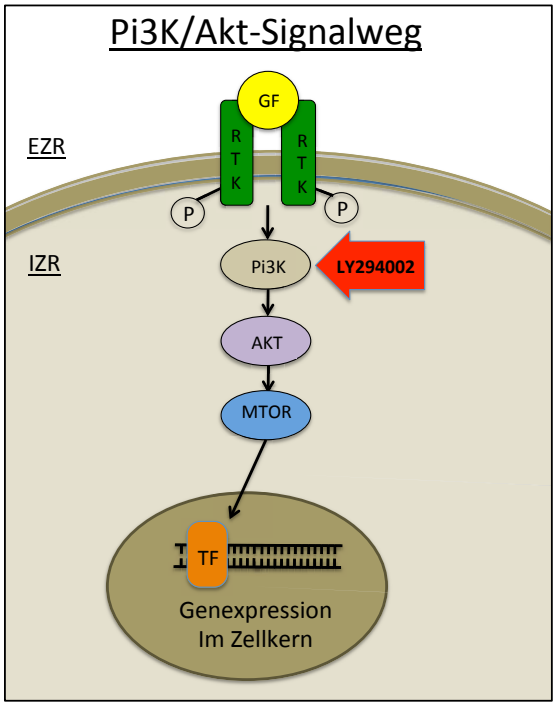


Abb. 54: **Pi3K-Signalweg mit Regulationsmöglichkeit durch den Inhibitor LY294002** modifiziert nach Alberts et al. (Alberts et al., 2017) (EZR=Extrazellularraum; IZR=Intrazellularraum; LY294002 = spezifischer Inhibitor für Pi3K; P=Phosphat; Pi3K=Phosphoinositid-3-Kinase; AKT = Protein-Kinase-B/ eine Serin-Threonin-Kinase; MTOR = „mechanistic Target of Rapamycin“/ eine Serin-Threonin-Kinase;TF = Translationsfaktor)

Die Wirkung von LY294002 als Inhibitor des Pi3K-Signalweges

Der Pi3K-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der osteoblastären Differenzierung (s. Abb. 54). Der spezifische Inhibitor LY294002 bindet reversibel an die ATP-Bindungsstelle von Pi3K, wodurch dieser Signalweg gehemmt wird (Ma et al., 2014). Die Relevanz der Steuerbarkeit des Knochenstoffwechsels wird in einer aktuellen Veröffentlichung von Chen et al. deutlich: Hyperglykämie wirkt sich beim Diabetiker nachteilhaft auf den Knochenstoffwechsel aus. Der Transkriptionsfaktor Runx2 ist essentiell für die osteoblastäre Differenzierung. Die Forschungsgruppe evaluierte die Wirkung von Runx2 auf den Knochenstoffwechsel bei einer hohen Glucosekonzentration. Die Resultate zeigten zum einen, dass Hyperglykämie die osteoblastäre Differenzierung signifikant verringert. Zum anderen ließen sie die Schlussfolgerung zu, dass die Glucose-bedingte Verringerung der osteogenen Differenzierung durch die Überexpression von Runx2 abgeschwächt werden kann. Runx2 hat dementsprechend eine protektive Wirkung auf den Knochenstoffwechsel. Durch

den Einsatz von LY294002 kann die osteoblastäre Differenzierung inhibiert und dieser protektive Einfluss aufgehoben werden, sodass eine gezielte Steuerung für therapeutische Zwecke möglich wird. (Chen et al., 2017).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass diese gezielten Eingriffe in den Knochenstoffwechsel vorhersagbare Effekte erzielen. Eine Behandlung mit dem Inhibitor LY294002 erbrachte interessante Erkenntnisse für die praktische Nutzung im Rahmen von zellbasierten Therapieformen. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass in Abhängigkeit von einer Behandlung mit DAG die Gewebe gegensätzliche Reaktionen zeigen. In ausnahmslos allen Versuchsgruppen, die nicht mit DAG behandelt wurden fiel die durchschnittliche Größe der Mikromassen unter dem Einfluss des Inhibitors erheblich stärker aus. Am deutlichsten wurde dieser Unterschied in der Versuchsgruppe USSC8 F2, da hier die durchschnittliche Größe der Präparate an Tag 7 der Zelldifferenzierung mit 109.976 Pixeleinheiten auf das 8-fache des Wertes der Kontrollgruppe anstieg. Eine ähnliche Tendenz erschien bei der Versuchsgruppe USSC8: der Anstieg der durchschnittlichen Mikromassengröße betrug mit 80.472 Pixeln ca. das 6-fache des Vergleichswertes in der Kontrollgruppe. Die Mineralisation von Geweben ohne DAG-Behandlung stieg vergleichsweise empfindlich an. Die deutlichste Steigerung der Mineralisation machte sich bei Zelllinie SA4101 an Tag 6 mit einer Mineralisationsrate von 22% (Vergleichswert in der Kontrollgruppe = 17%) und bei USSC8 an Tag 7 mit 5% (Vergleichswert in der Kontrollgruppe = 1%) bemerkbar. Diese geringen Werte zeigen deutlich, dass die Mineralisation bei Geweben ohne DAG-Behandlung unter dem Einfluss von LY294002 nur geringen absoluten Änderungen unterliegt.

Bei einer Änderung der Größenausdehnung der Mikromassen unter dem Einfluss eines Inhibitors ändert sich ebenfalls die Mineralisation mit ähnlicher Ausprägung. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse in Kapitel 3.3 verhalten sich die Gewebe also vorhersagbar. Offen hingegen bleibt die Frage nach dem Grund für die stärker ausgeprägte Größenentwicklung und Mineralisation bei Geweben ohne DAG-Behandlung. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Zeiträume bis einschließlich Tag 7 der Zelldifferenzierung beobachtet. Interessant wäre daher

eine Langzeitbetrachtung. Bei dieser Fragestellung könnte evaluiert werden, ob inhibierte Gewebe ohne DAG-Behandlung bei einer längeren Differenzierungsdauer ebenfalls eine geringere Größenausdehnung und Mineralisation aufweisen oder ob die stärker ausgeprägte Entwicklung über weitere Entwicklungsstadien erhalten bleibt.

Die Gewebe mit DAG-Behandlung zeigen andere Ausprägungen auf: Mit Ausnahme einer Versuchsgruppe fällt die Durchschnittsgröße der Präparate unter dem Einfluss eines Inhibitors deutlich kleiner aus als in der jeweiligen Kontrollgruppe. Die stärkste Veränderung tritt bei der Versuchsgruppe SA4101 V2 auf, da hier mit 133.445 Pixeleinheiten nur noch ca. 25% der Vergleichsgröße aus der Kontrollgruppe ohne Inhibitorenbehandlung (534.685 Pixeleinheiten) erreicht wurde. Die gleiche Reaktion wird bei der Versuchsgruppe USSC8 erreicht. Die Durchschnittsgröße der Mikromassen erreicht mit 277.509 Pixeleinheiten lediglich 38% des Vergleichswertes in der Kontrollgruppe. Wu et al. zeigen in einer aktuellen Studie über Einflussfaktoren auf die osteogene Differenzierung auf, dass LY294002 negative Auswirkungen auf die Proliferation und Differenzierung von Knochenzellen hat. Im Rahmen der Studie wurde durch den Einsatz eines GLP-1-Rezeptoragonisten u.a. der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert, was einen positiven Effekt auf die Differenzierung, die Proliferation und die Osteoblasten-Mineralisation bewirkte. Mit dem Einsatz von LY294002 wurde diese förderliche Wirkung auf die Entwicklung von Knochensubstanz vermindert (Wu et al., 2017). Im Vergleich zwischen Wu et al. und der hier vorliegenden Studie ergibt sich eine interessante Parallele: Der mineralisations-fördernde Einfluss von DAG wird durch den Inhibitor LY294002 ebenfalls vermindert. Neben der Mikromassengröße sinkt durch die Behandlung mit LY294002 ebenfalls die Intensität der Mineralisation. Die stärksten Auswirkungen sind hier ebenfalls bei den Zelllinien USSC8 und SA4101 V2 erkennbar. Die Mineralisation von USSC8-Geweben erreicht in der Versuchsgruppe lediglich 7% während in der Vergleichsgruppe eine Mineralisation von 19% gemessen wurde. Der gleiche Effekt ist bei Geweben von SA4101 V2 erkennbar: in der Versuchsgruppe wurde eine Mineralisationsrate von 4% detektiert, während in der Vergleichsgruppe 14% gemessen wurden.

Die Gewebe unter dem Einfluss von LY294002 zeigen in unterschiedlichen Versuchsgruppen innerhalb einer Behandlung mit oder ohne DAG identische Reaktionen auf den Inhibitor: Während die Gewebe ohne DAG nach einer Inhibitorenbehandlung eine geringfügig stärkere Mineralisation aufweisen, resultiert bei Geweben mit DAG- und Inhibitorenbehandlung eine geringere Mineralisation als in der Kontrollgruppe. In der Studie fielen nur einzelne, wenige Gewebe als Ausnahmen aus dieser Regel auf. Hierdurch wird der Einsatz des Inhibitors gut vorhersagbar und eine Steuerung der Gewebedifferenzierung zu therapeutischen Zwecken wird ermöglicht.

Schlussfolgerungen

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass jeder der drei Inhibitoren konstruktive Ansätze für therapeutische Zwecke enthält. Im Vergleich wird allerdings auch deutlich, dass nicht jeder Inhibitor zuverlässig vorhersehbare Effekte erzielt. Der Inhibitor U0126 lässt nur eingeschränkte Schlüsse zur Veränderung der Mineralisation und Größenentwicklung zu, da die Versuchsgruppen überwiegend unterschiedlich auf den Inhibitor reagierten.

Verlässliche Ergebnisse liefern hingegen die Resultate um die Inhibitoren FR180204 und LY294002. In beiden Fällen reagieren die verschiedenen Versuchsgruppen bis auf einzelne Ausnahmen homogen und ermöglichen so eine vorhersagbare Wirkung auf USSC-Mikromassen zu definieren. Interessant ist, dass die Gewebe unter dem Einfluss der beiden genannten Inhibitoren in Verbindung mit einer DAG-Behandlung zu einer verringerten Mikromassengröße und Mineralisation im Vergleich zur Kontrollgruppe führen und somit identisch reagieren. Ohne eine Behandlung mit DAG hingegen weisen die Ergebnisse Inhibitor-abhängig Unterschiede in der Wirkung auf: Während FR180204 durchschnittlich kleinere Mikromassen bei einer gleich bleibend gegen 0 gehenden Mineralisation bewirkt, führt eine Behandlung mit LY294002 zu durchschnittlich größeren Mikromassen und einer empfindlich gesteigerten Mineralisation.

Diese charakteristischen Auswirkungen durch die Behandlung mit den spezifischen Inhibitoren LY294002 und FR180204 lassen den Schluss zu, dass sowohl der PI3K/Akt-Signalweg als auch der ERK-Signalweg eine entscheidende Bedeutung für die spontane osteogene Differenzierung als auch für die osteogen induzierte Differenzierung von multipotenten Stammzellen haben. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse, könnte die Steuerung der Gewebedifferenzierung sowohl durch eine Vorbehandlung der Zellkultur mit FR180204 als auch mit LY294002 vielversprechende Ansätze für die praktische Therapie mit Hilfe von gesteuerter Geweberegeneration begründen.

5 Ausblick

Bei den Resultaten dieser Forschungsarbeit sowie in voran gegangenen Arbeiten fiel eine besonders ausgeprägte Mineralisation im Randbereich von Mikromassen auf. Langenbach et. al zeigten, dass eine längere Vorbehandlung mit DAG eine verringerte Zellmigration bewirkt (Langenbach et al., 2010). Roeb vermutete, dass durch den Mineralisierungsvorgang zentral liegende Zellen in den Mikromassen eingesperrt werden und es hierdurch zu einer verringerten Zellaussprossung in die Umgebung kommt (Roeb, 2012). Derartige Einschränkungen könnten eine erfolgreiche Therapie in situ behindern. Die definitiven Ursachen für die randständig starke Mineralisation sowie die Gründe für die verringerte Zellmigration nach einer intensiven Vorbehandlung mit DAG sind noch immer nicht vollständig erschlossen und könnten Gegenstand kommender Untersuchungen sein.

Die vorliegenden Resultate zeigen anschaulich, dass die DAG-Vordifferenzierung förderlich für eine rasche und intensive osteogene Entwicklung ist. Gleichzeitig werfen die bisherigen Forschungsergebnisse die Frage auf, ob der Vorteil einer stärkeren Mineralisation durch die Vorbehandlung mit Dexamethason, Ascorbinsäure und ß-Glyzerolphosphat überwiegt oder ob die damit

einhergehende verringerte Migrationspotenz der Zellen einen entscheidenden Nachteil birgt.

Hinsichtlich der Bestrebung einen raschen Therapieerfolg herbeizuführen könnten sich Studiengruppen künftig mit der Frage beschäftigen, wieviel Zeitersparnis durch den Einsatz von DAG erreicht werden kann, um dem Patienten schnellstmögliche Therapieerfolge zu sichern. Die Frage nach der generellen Nutzung von DAG bzw. eine nähere Analyse der optimalen Dauer einer Vorbehandlung mit den osteogen induktiven Substanzen für eine erfolgreiche Therapie könnten ebenfalls Forschungsschwerpunkte werden.

Ebenfalls ist die Frage nach der Nutzung dreidimensionaler Mikromassen für die Therapie großer Knochendefekte bisher noch nicht abschließend beantwortet. Obwohl zweidimensionale Gewebe hinsichtlich der Zellmigration am Implantationsort als vielversprechende Lösung erscheinen, ist deren Einsatz an die etablierten Verfahren gebunden, die auf die Nutzung von künstlichen Scaffolds/ Trägergerüsten zurückgreifen. Wie alle bisher verwendeten Trägergerüste bergen künstliche Materialien naturgemäß Nachteile bei einer Transplantation. Gegenstand zukünftiger Forschungsvorhaben könnte die Frage sein, ob die deutlich stärkere Mineralisation durch eine ausgeprägte DAG-Vorbehandlung oder eine deutlicher ausgeprägte Zellaussprossung in Verbindung mit einer weniger starken osteogen induktiven Vorbehandlung und mit entsprechend geringerer Mineralisation der wesentlich förderliche Aspekt für die Therapie am Patienten darstellt.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

Aaron R.K., Boyan B.D., Ciombor D.M., Schwartz Z., Simon B.J. (**2004**). *Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields.* Clin Orthop Relat Res (419):30-37.

Ahlmann E., Patzakis M., Roidis N., Shepherd L., Holtom P. (**2002**). *Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes.* J Bone Joint Surg Am, 2002. 84(5): 716-20.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P., Schäfer U., Häcker B. (**2017**). *Molekularbiologie der Zelle.* 6. Auflage, Wiley-VCH- Verlag, Weinheim, Deutschland.

Allay J.A., Dennis J.E., Haynesworth S.E., Majumdar M.K., Clapp D.W., Shultz L.D., Caplan A.L., Gerson S.L. (**1997**). *LacZ and Interleukin-3 Expression In Vivo after Retroviral Transduction of Marrow-Derived Human Osteogenic Mesenchymal Progenitors.* Hum Gene Ther. 1997 Aug 10; 8(12):1417-27.

Archibald, L.K., Jernigan D.B., Kainer, M.A., (**2002**) Centers of disease control *Update: Allograft- Associated Bacterial Infections.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002 Mar 15; 51(10): 207-10.

Arrington E.D., Smith W.J., Chambers H.G., Bucknell A.L., Davino N.A. (**1996**). *Complications of iliac crest bone graft harvesting.* Clin Orthop Relat Res, 300-309.

Behairy Y.M., Al-Sebai W. (**2001**). *A modified technique for harvesting full-thickness iliac crest bone graft.* Spine, 2001. 26(6): p. 695-7.

Bielby R. C., Boccaccini A. R., Polak J. M., Buttery L.D.K.(**2004**). *In Vitro Differentiation and In Vivo Mineralization of Osteogenic Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells.* Tissue Eng. 2004 Sep-Oct;10(9-10):1518-25.

Burchardt H. (**1983**). *The biology of bone graft repair.* Clin Orthop Relat Res. 1983 Apr; (174):28-42.

Buttery L.D.K., Bourne S., Xynos J.D., Wood H., Hughes F.J.,Hughes S.P.F., Episkopou V., Polak J.M. (**2001**). Differentiation of Osteoblasts and in Vitro Bone Formation from Murine Embryonic Stem Cells.

Carano R.A., Filvaroff E.H. (**2003**). *Angiogenesis and bone repair.* Drug Discov Today 8(21):980-989.

Chen Y., Hu Y., Yang L., Zhou J., Tang Y., Zheng L., Qin P. (**2017**). *Runx2 alleviates high glucose-suppressed osteogenic differentiation via Pi3K/AKT/GSK3ß/ß-catenin pathway.* Cell Biol Int. 2017 Aug; 41(8):822-832.

Cricchio G., Lundgren S. (**2003**). *Donor site morbidity in two different approaches to anterior iliac crest bone harvesting.* Clin Implant Dent Relat Res, 2003. 5(3): p. 161- 9.

D'Ippolito G., Schiller P.C., Ricordi C., Roos B.A., Howard G.A. (**1999**). *Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow.* J Bone Miner Res 14(7):1115-1122.

de Abreu Costa L., Henrique Fernandes Ottoni M., dos Santos M.G., Meireles A.B., Gomes de Almeida V., de Fátima Pereira W., Alves de Avelar-Freitas B., Eustáquio Alvim Brito-Melo G. (**2017**). *Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF-α, IFN-γ, and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes.* Molecules. 2017 Nov 10;22(11). pii: E1789.

Depprich R., Handschel J., Sebald W., Kübler N.R., Würzler K.K. (**2005**). *Vergleich der osteogenen Potenz gentechnisch modifizierter BMP.* Mund Kiefer GesichtsChir 2005 · 9:363–368 DOI 10.1007/s10006-005-0644-2.

Depprich R., Handschel J., Wiesmann H.P., Jäsche-Meyer J., Meyer U. (**2008**) *Use of bioreactors in maxillofacial tissue engineering.* Br J Oral Maxillofac Surg. 2008 Jul; 46(5):349-54.

Dvir T., Timko B.P., Kohane D.S., Langer R. (**2011**). *Nanotechnological strategies for engineering complex tissues.* Published in final edited form as: Na Nanotechnol. 2011 January ; 6(1): 13–22. doi:10.1038/nnano.2010.246.

Eppley B.L., Pietrzak W.S., Blanton M.W. (**2005**). *Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon.* J Craniofac Surg, 2005. 16(6): p. 981-9.

Embryonenschutzgesetz vom 13. Dezember **1990** (BGBI. I S. 2746), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 21. November 2011 (BGBI. I S. 2228) geändert worden ist. §2- Mißbräuchliche Verwendung menschlicher Embryonen und §5- Künstliche Veränderung menschlicher Keimbahnzellen.

Fatherazi S., Matsa-Dunn D., Foster B.L., Rutherford R.B., Somerman M.J., Presland R.B. (**2009**). *Phosphate regulates osteopontin gene transcription.* J Dent Res 2009, 88:39–44.

Foster B.L., Nociti F.H. Jr, Swanson E.C., Matsa-Dunn D., Berry J.E., Cupp C.J., Zhang P., Somerman M.J. (**2006**). *Regulation of cementoblast gene expression by inorganic phosphate in vitro*. Calcified Tissue Int 2006, 78:103–112.

Friedlaender G.E. (**1983**). *Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions.* Clin Orthop Relat Res, 1983(174): p. 58-68.

Gerber I., ap Gwynn I. (**2001**). *Influence of cell isolation, cell culture density, and cell nutrition on differentiation of rat calvarial osteoblast-like cells in vitro.* Eur Cell Mater 2:10-20.

Gerber I., ap Gwynn I. (**2002**). *Differentiation of rat osteoblast-like cells in monolayer and micromass cultures.* Eur Cell Mater 3:19-30.

Han J.W., Lee B.N., Kim S.M., Koh J.T., Min K.S. Hwang Y.C. (**2017**). *Odontogenic Potential of Parathyroid Hormone-related Protein (107-111) Alone or in Combination with Mineral Trioxide Aggregate in Human Dental Pulp Cells.* J Endod. 2017 Dec; 43(12):2054-2060.

Handschel J., Wiesmann H.P., Stratmann U., Kleinheinz J., Meyer U., Joos U. (**2002**). *TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model.* Biomaterials 23, 1689-1695.

Handschel J., Wiesmann H.P., Depprich R., Kübler N.R., Meyer U. (**2006**). *Cell-based bone reconstruction therapies--cell sources.* Int J Oral Maxillofac Implants 21(6):890-8.

Handschel J.G., Depprich R.A., Kubler N.R., Wiesmann H.P., Ommerborn M., Meyer U. (**2007**). *Prospects of micromass culture technology in tissue engineering.* Head Face Med 3:4.

Handschel J. (**2007**). *Untersuchung zur Eignung embryonaler Stammzellen für das Tissue Engineering von Knochen.* Hochschulschrift (Habilitation). Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität. URN Urn:ndn:de:hbz:061-20080422-135927-8.

Handschel J., Berr K., Depprich R.A., Kübler N.R., Naujoks C., Wiesmann H.P., Ommerborn M.A. Meyer U. (**2008**). *Induction of osteogenic markers in differentially treated cultures of embryonic stem cells.* Head & Face Medicine 2008, 4:10.

Hildebrandt C., Büth H., Thielecke H. (**2009**). *Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells.* Ann Anat. 2009 Jan;191(1):23-32.

Jensen S.S., Broggini N., Hjorting-Hansen E., Schenk R., Buser D. (**2006**). *Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and b-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs.* Clin. Oral Impl. Res. 17, 2006; 237–243.

Jerosch J., Katthagen B.-D., Pruß A. (**2012**) *Knochentransplantation: Knochenbank und klinische Anwendung von Bankknochen*. Deutscher Ärzte-Verlag; Auflage: 1.

Johansson B., Grepe A., Wannfors K., Hirsch J.M. (**2001**). *A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla.* Dentomaxillofac Radiol. 2001 May; 30(3):157-61.

Kessler P., Thorwarth M., Bloch-Birkholz A., Nkenke E., Neukam F.W. (**2005**). *Harvesting of bone from the iliac crest--comparison of the anterior and posterior sites.* Br J Oral Maxillofac Surg, 2005. 43(1): p. 51-6.

Kögler G., Sensken S., Airey J.A., Trapp T., Muschen M., Feldhahn N., Liedtke S., Sorg R.V., Fischer J., Rosenbaum C., Greschat S., Knipper A., Bender J., Degistirici O., Gao J., Caplan A.I., Colletti E.J., Almeida-Porada G., Muller H.W., Zanjani E., Wernet P. (**2004**). *A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential.* J Exp Med 200(2):123-135.

Kreuz F.P., Hyatt G.W., Turner T.C., Bassett A.L. (**1951**). *The preservation and clinical use of freeze-dried bone.* The Journal of Bone & Joint Surgery. 33(4):863-888,OCT 1951.

Kübler N.R., Wil C., Depprich R., Betz T., Reinhart E., Bill J.S., Reuther J.F. (**1999**). *Comparative studies of sinus floor elevation with autologous or allogenic bone tissue.* Mund Kiefer Gesichtschir 3 Suppl 1, S53-60.

Kübler N.R., Reuther J.F., Faller G., Kirchner T., Ruppert R., Sebald W. (**1998**). *Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system.* Int J Oral Maxillofac Surg. 27(4):305-9.

Lammers L., Naujoks C., Berr K., Depprich R., Kübler N.R., Meyer U., Langenbach F., Lüttenberg B., Kögler G., Wiesmann H.P., Handschel J. (**2012**).*Impact of DAG stimulation on mineral synthesis, mineral structure and osteogenic differentiation of human cord blood stem cells*.

Lane J.M., Tomin E., Bostrom M.P. (**1999**). *Biosynthetic bone grafting.* Clin Orthop Relat Res, S107-117.

Langenbach F., Naujoks C., Kersten-Thiele P.V., Berr K., Depprich R.A.,Kübler N.R., Kögler G., Handschel J. (**2010**). *Osteogenic differentiation influences stem cell migration out of scaffold-free microspheres.* Tissue Eng Part A. 2010 Feb;16(2):759-66.

Langenbach F., Berr K., Naujoks C.,Hassel A., Hentschel M., Depprich R., Kübler N.R., Meyer U., Wiesmann H.P., Kögler G., Handschel J. (**2011**). *Generation and differentiation of microtissues from multipotent precursor cells for use in tissue engineering.* Nature Protocols. Jan 01, 2011 6(11):1726-1735.

Langenbach F., Handschel J. (**2013**). *Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro.* Stem cell research & Therapy 2013, 4:117.

Langer R., Vacanti J.P. (**1993**). *Tissue engineering.* Science 260(5110):920-926.

Leake, D., Habal, M., Maniscalco, J. (**1978**) *Neurocranial Reconstruction Using an Elastomer-Coated Cloth Mesh and Bone Grafting*. J Biomed Mater Res. 1978 Jan;12(1):83-7.

Leuenberger E. (**1980***). Blut und Blutuntersuchungen*. In: Koelbing H. M. und Boschung U. (Hrsg.): *Labor und Medizin – einst und jetzt.* Schweizerischer Dachverband des medizinisch-technischen Laborpersonals, Basel, 9-53.

Liu G.P., Li Y.L., Sun J., Cui L., Zhang W.J., Cao Y.L. (**2010**). *Repair of calvarial defects with human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells and demineralized bone matrix in athymic rats.* Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi. 2010 Jan;26(1):34-8.

Lüllmann-Rauch R., Asan E. (**2015**). *Taschenlehrbuch Histologie 5. Auflage.* Thieme-Verlag S. 91, S. 92, S. 157-160, S. 164, S. 568, S. 570

Ma P., Gu B., Xiong W., Tan B., Geng W., Li J., Liu H. (**2014**) *Glimepiride Promotes Osteogenic Differentiation in Rat Osteoblasts via the PI3K/Akt/eNOS Pathway in a High Glucose Microenvironment.* PLoS One. 2014 Nov. 12;9(11):e112243.

Maiorana C., Sigurta D., Mirandola A., Garlini G., Santoro F. (**2006**). *Sinus elevation with alloplasts or xenogenic materials and implants: an up-to-4-year clinical and radiologic follow-up.* Int J Oral Maxillofac Implants, 2006. 21(3): p. 426-32.

Meijer G.J., de Bruijn J.D., Koole R., van Blitterswijk C.A. (**2007**). *Cell-based bone tissue engineering.* PLoS Med 4, e9.

Meyer U., Wiesmann H.P. (**2005**). *Bone and cartilage tissue engineering.* Heidelberg, Berlin, Tokyo, New York: Springer.

Naujoks C. D. (**2011**). *Untersuchung zur Biokompatibilität osteogen vordifferenzierter humaner Nabelschnurstammzellen auf verschiedenen Biomaterialien und zum Einfluss der Biomaterialien auf den Differenzierungsprozess.* Hochschulschrift (Dissertation). Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität. URN urn:nbn:de:hbz:061-20110316-092003-0.

Nkenke E., Schultze-Mosgau S., Radespiel-Troger M., Kloss F., Neukam F.W. (**2001**). *Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study.* Clin Oral Implants Res 12, 495-502.

Nkenke E., Weisbach V., Winckler E., Kessler P., Schultze-Mosgau S., Wiltfang J., Neukam F.W. (**2004**). *Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study.* Int J Oral Maxillofac Surg 33, 157-163.

Ohori M., Kinoshita T., Okubo M., Sato K., Yamazaki A., Arakawa H., Nishimura S., Inamura N., Nakajima H., Neya M., Miyake H., Fujii T. (**2005**). *Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor - ERK2 complex.* Biochem Biophys Res Commun. 2005 Oct 14; 336 (1): 357-63.

Paula-Silva F.W., Ghosh A., Arzate H., Kapila S., da Silva L.A., Kapila Y.L. (**2010**). *Calcium hydroxite promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of mesenchymal periodontal ligament cells in a CEMP1-and ERK-dependent manner.* Calcif Tissue Int. 2010 Aug; 87(2):144-57.

Pelissier P., Villars F., Mathoulin-Pelissier S., Bareille R., Lafage-Proust M.H., Vilamitjana-Amedee J. (**2003**). *Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a madreporic ceramic in rats.* Plast Reconstr Surg 111(6):1932-1941.

Pochon, J.P., Klöti, J. (**1991**). *Cranioplasty for acquired skull defects in children - a comparison between autologous material and methylmethacrylate 1974-1990*. Eur J Pediatr Surg. 1(4)*:*199-201.

Pretorius J.A., Melsen B., Nel J.C., Germishuys P.J. (**2005**). *A histomorphometric evaluation of factors influencing the healing of bony defects surrounding implants.* Int J Oral Maxillofac Implants 20(3)*:*387-98.

Pschyrembel® *(***2014***)., Klinisches Wörterbuch.* 266. Auflage. Verlag: Walter de Gruyter GmbH & CoKG, Berlin - New York.

Ratajczak M. Z., Zuba-Surma E. K., Wysoczynski M., Wan W., Ratajczak J., Kucia M. (**2008**). *Hunt for Pluripotent Stem Cell – Regenerative Medicine Search for Almighty Cell.* J Autoimmun. 2008 May ; 30(3): 151–162. doi:10.1016/j.jaut.2007.12.003.

Reichart P.A., Hausamen J.E., Becker J., Neukam F.W., Schliephake H., Schmelzeisen R. (**2002**). *Curriculum zahnärztliche Chirurgie : chirurgische Grundlagen, Anästhesie, allgemeine Operationsprinzipien, spezielle Operationslehre.* Quintessenz-Verl.-GmbH, Band 1, S. 444-445.

Richard C., Liuzzo J.P., Moscatelli D. (**1995**). *Fibro- blast growth factor-2 (FGF-2) can mediate cell attachment by linking receptors and heparan sulfate proteoglycans on neighbouring cells.* J Biol Chem 270: 24188–24196.

Rodan G.A. (**1992**). *Introduction to bone biology.* Bone 13 Suppl 1(S3-6).

Roeb M. J. (**2012**). *Untersuchungen zur stammzellinduzierten Knochenbildung in vivo.* Hochschulschrift (Dissertation). Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität. URN Urn:nbn:de:hbz:061-20120308-075903-3.

Roesgen M., (**1991**). *Regeneration capacity of the iliac crest after spongiosa removal in humans--induction by phosphate ceramics?*. Unfallchirurgie, 1991. 17(1): p. 44-59.

Rouwkema J., de Boer J., Van Blitterswijk C.A. (**2006**). *Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct.* Tissue Eng 12(9):2685-2693.

Rouwkema J., Rivron N.C., von Bitterswijk C.A. (**2008**). *Vascularization in tissue engineering.* Trends Biotechnol. 2008 Aug;26(8):434-41.

Sailer H.F., Pajarola G.F. (**1996**). *Orale Chirurgie.* Stuttgart [u.a.]: Thieme. S. 306 S. 308.

Sandor G.K., Nish I.A., Carmichael R.P. (**2003**). *Comparison of conventional surgery with motorized trephine in bone harvest from the anterior iliac crest.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2003. 95(2): p. 150-5.

Sasso R.C., LeHuec J.C., Shaffrey C. (**2005**). *Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment.* J Spinal Disord Tech 18 Suppl, S77-81.

Schenk R.K. (**1991**) *Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen.* Aktueller Stand beim Knochenersatz, Hefte zur Unfallheilkunde 216. Berlin Heidelberg New York, 1991, S. 23-35.

Schliephake H., Scharnweber D., Dard M., Rossler S., Sewing A., Meyer J., Hoogestraat D. (**2002**). *Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest. An experimental pilot study in dogs.* Clin Oral Implants Res 13(3):312-319.

Schopf P. (**2008**). *Curriculum Kieferorthopädie: Schädel- und Gebissentwicklung, Prophylaxe, Kieferorthopädische Diagnostik, Herausnehmbare Behandlungsgeräte.* 4. überarb. und erw. Aufl., S. 27.

Schwenzer N., Ehrenfeld M. (**2010**). *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie.* 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York.

Simonds, R. J., Scott D., Holmberg M. D., Richard L., Hurwitz R. L., Coleman T. R., Bottenfield S., Conley L. J., Kohlenberg S. H., Castro K. G., Dahan B. A., Schable C. A., Rayfield M. A., Rogers M. F.. (**1992**) *Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor.* N Engl J Med, 1992. 326(11): p. 726-32.

Smolka W., Eggensperger N., Carollo V., Ozdoba C., Iizuka T. (**2006**). *Changes in the volume and density of calvarial split bone grafts after alveolar ridge augmentation.* Clin Oral Implants Res. 17:149-55.

Smolka W., Iizuka T. (**2005**). *Surgical reconstruction of maxilla and midface: clinical outcome and factors relating to postoperative complications.* J Craniomaxillofac Surg. 33(1):1-7.

Statistisches Bundesamt (**2015**). *Bevölkerung Deutschlands bis 2060 – 13. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung*. Schaubild 5 Bevölkerung nach Altersgruppen.

Tada H., Nemoto E., Foster B.L., Somerman M.J., Shimauchi H. (**2011**). *Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells.* Bone 2011, 48:1409–1416.

Tayapongsak P., Wimsatt J.A. , LaBanc J.P., Dolwick M.F. (**1994**). *Morbidity from anterior ilium bone harvest. A comparative study of lateral versus medial surgical approach.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1994; 78(3): p. 296-300.

Terheyden H., Knak C., Jepsen S., Palmie S., Rueger D.R. (**2001**). *Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs.* Part I: Prefabrication. Int J Oral Maxillofac Surg 30(5):373-379.

Tugwell B. D., Patel P. R., Williams I. T., Hedberg K., Chai F., Nainan O. V., Thomas A. R., Woll J. E., Bell B. P., Cieslak P. R. (**2005**) Transmission of hepatitis C virus to several organ and tissue recipients from an antibody-negative donor. Ann Intern Med, 2005. 143(9): p. 648-54.

Wada T., Wu C.H., Sugita H., Sugita N., Katagiri S., Shimizu M., Hara K. (**1989**). *Autogenous, allogenic, and beta-TCP grafts: comparative effectiveness in experimental bone furcation defects in dogs*. J Oral Implantol, 1989. 15(4): p. 231-6.

Wang Y., Zhou Y., Jin L., Pang X., Lu Y., Wang Z., Yu Y., Yu J. (**2018**). *Mineral trioxide aggregate enhances the osteogenic capacity of periodontal ligament stem cells via NF- B and MAPK signaling pathways.* J Cell Physiol. 2018 Mar; 233(3):2386-2397.

Wellisz, T., Dougherty, W., Gross J. (**1992**). *Craniofacial applications for the Medpor porous polyethylene flexblock implant*. J Craniofac Surg. 1992 Sep;3(2):101-7.

Welsch U., Deller T. (**2014**). *Lehrbuch Histologie* (4. Aufl.) München: Elsevier, Urban & Fischer-Verlag S. 122 ff.

Wiesmann H.P., Joos U., Meyer U. (**2004**). *Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering.* Part II. Int J Oral Maxillofac Surg 33(6):523- 530.

Wintermantel E., Ha S. (**2009**). *Medizintechnik Life Science Engineering.* (5. überarbeitete und erweiterte Auflage.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Wobus A.M., Boheler K.R. (**2005**). *Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy.* Physiological Reviews Published 1 April 2005 Vol. 85 no. 2, 635-678 DOI: 10.1152/physrev.00054.2003.

Wu X., Li S., Xue P., Li Y. (**2017**). *Liraglutide, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, facilitates osteogenic proiferation and differentiation in MC3T3-E1 cells through phosphoinositide 3-kinase (Pi3K)/ protein kinase B (AKT), extracellular signal-related kinase (ERK)1/2, and cAMP/ protein kinase A (PKA) signaling pathways involving ß-Catenin*. Exp Cell Res. 2017 Nov 15; 360(2):281-291.

Yablon, I.G. (**1976**). *The effect of methylmethacrylate on fracture healing.* Clin Orthop Relat Res, 1976(114): p. 358-63.

Yu Z., Cai M., Li X., Zhang J., Wu T., Yang F., Zhu W., Xiang Y., Zhang W., Xiang J., Cai D. (**2018**). *Neuroprotective effects of Tongxinluo on focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats associated with the activation of the MEK1/2/ERK1/2/p90RSK signaling pathway.* Brain Res. 2018 Feb 6.

zur Nieden N.I, Kempka G., Ahr H.J. (**2003**). *In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts.* Differentiation 2003 Jan;71(!):18-27.

7 Anhänge

Ergebnisse der Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Analyse für Mikromassen-Größe

KW	-DAG					+DAG				
	SA4101		SA4101 V2	USSC8 F2	USSC8	SA4101		SA4101 V2	USSC8 F2	USSC8
	Tag 3	Tag 6	Tag 7	Tag 7	Tag 7	Tag 3	Tag 6	Tag 7	Tag 7	Tag 7
	,000	,000	,000	,000	,000	,178	,009	,000	,001	,000
MWU	-DAG					+DAG				
	SA4101		SA4101 V2	USSC8 F2	USSC8	SA4101		SA4101 V2	USSC8 F2	USSC8
	Tag 3	Tag 6	Tag 7	Tag 7	Tag 7	Tag 3	Tag 6	Tag 7	Tag 7	Tag 7
DMSO-FR	,067	,235	,000	,076	,050	,366	,750	,000	,001	,007
DMSO-LY	,253	,001	,000	,000	,000	,272	,386	,001	,001	,000
DMSO-U0126	,001	,488	,168	,003	,000	,722	,005	,499	,002	,001

Tabelle 20: **Ergebnisse der statistischen Verfahren „Kruskal-Wallis-Analyse“ und „Mann-Whitney-U-Analyse“ zur Mikromassen-Größe**
(KW = Kruskal-Wallis-Analyse; MWU = Mann-Whitney-U-Analyse)

Ergebnisse der Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Analyse für Mineralisation

KW	-DAG					+DAG				
	SA4101		SA4101 V2	USSC8 F2	USSC8	SA4101		SA4101 V2	USSC8 F2	USSC8
	Tag 3	Tag 6	Tag 7	Tag 7	Tag 7	Tag 3	Tag 6	Tag 7	Tag 7	Tag 7
	,002	,016	,000	,000	,000	,007	,136	,000	,001	,000
MWU	-DAG					+DAG				
	SA4101		SA4101 V2	USSC8 F2	USSC8	SA4101		SA4101 V2	USSC8 F2	USSC8
	Tag 3	Tag 6	Tag 7	Tag 7	Tag 7	Tag 3	Tag 6	Tag 7	Tag 7	Tag 7
DMSO-FR	,432	,531	,000	,076	,009	,014	,056	,000	,001	,007
DMSO-LY	,102	,021	,000	,000	,000	,333	,167	,001	,001	,000
DMSO-U0126	,097	,166	,163	,002	,014	,374	,329	,499	,002	,001

Tabelle 21: **Ergebnisse der statistischen Verfahren „Kruskal-Wallis-Analyse“ und „Mann-Whitney-U-Analyse“ zur Mikromassen-Mineralisation**
(KW = Kruskal-Wallis-Analyse; MWU = Mann-Whitney-U-Analyse)

Danksagung

An erster Stelle danke ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Dr. Jörg Handschel für die Überlassung des Themas, für sein stetiges Engagement sowie für die fachliche und persönliche Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten und während der Anfertigung der Dissertationsschrift.
Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Karin Berr für ihre stetige Bereitschaft zur Beratung bei Fragen zur Laborarbeit, zur Anfertigung der Dissertation sowie als Beistand und Ratgeber.
Außerdem danke ich ganz herzlich dem weiteren Laborteam um Herrn Dr. Fabian Langenbach und Frau Marianne Hölbling für ihre stetige Bereitschaft und Unterstützung.
Großer Dank gebührt meiner Familie, allen voran meiner Mutter, die aus eigener Kraft und mit unermüdlichem Engagement und mit Hingabe grundlegend für meine bisherigen Erfolge verantwortlich ist. Ich danke meiner lieben Frau für viel Geduld und ihre permanente Unterstützung und Begleitung bei der Erstellung dieser Arbeit.
Ebenfalls bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Freunden und Kollegen, die mich unterstützt haben und mir zur Seite standen.

Dankeschön!