

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

**Der Einfluss von Phosphaten auf die
Proliferation und die osteogene
Differenzierung humaner Stammzellen aus
Nabelschnurblut**

Dissertation

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

vorgelegt von
Isabel Schneider
2019

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Dr. Rita Depprich

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. Nikolas Stoecklein

Alles wird gut.

Zusammenfassung

Umfangreiche Kieferdefekte wie z.B. Osteochemonekrosen unter Bisphosphonat-Therapie oder nach Tumorbehandlungen stellen auch heutzutage eine therapeutische Herausforderung dar. Der Einsatz von Nabelschnurblutstammzellen (USSCs) könnte ein Ansatz sein, Kieferdefekte zu regenerieren. Das Regenerations- und Mineralisierungspotential der USSCs ist jedoch von der zuverlässigen osteogenen Induktion abhängig. Variationen bekannter Supplemente und anderer organischer Phosphatquellen in der Kultur könnten das Spektrum von geeigneten Induktoren erweitern.

USSCs wurden auf 24 Well-Platten ausgesät und von Tag 1 an mit unterschiedlich supplementierten Medien versorgt. Als Phosphatquellen wurden dem Medium 5 mM oder 10 mM β -Glyzerolphosphat (β -Gly), 5 mM Adenosintriphosphat (ATP) oder 5 mM Guanosintriphosphat (GTP) zugesetzt. Das Medium wurde an Tag 2 durch Normalmedium ersetzt. Nach insgesamt 10 Tagen in Kultur wurden die Proliferation der Zellen und deren knochenspezifische Mineralisierung untersucht. Zudem wurden die USSCs unter denselben Bedingungen in Flaschen kultiviert und der Expressionsstatus von Zellzyklusmarkern und Zell-Zell-Kontakten mittels RT-qPCR analysiert. Es zeigte sich, dass ATP und GTP als phosphatliefernde Substanzen die Proliferation geringgradig herabsetzen. GTP minderte zwar auch die Mineralisation, die spezifische Mineralisationsrate lag dennoch deutlich über den Werten ohne Phosphatzusatz. β -Gly erlaubte im Vergleich mit anderen Phosphatzusätzen die stärkste Mineralisation, wodurch die dann gering reduzierte Proliferation ausgeglichen werden konnte. Bis auf ATP waren alle Supplemente in der Lage, die Induktion der Mineralisation im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erkennbar zu verstärken. In der quantitativen Expressionsanalyse zeigte sich, dass die Phosphatquellen auf die Verankerungen der Zellen im Zellverbund keinen Einfluss haben, die Expression von Vinculin blieb unverändert. ATP und GTP führten zu einer erhöhten Expression von CyclinB2, einem Marker für die Vorbereitung der Zellteilung. Notch-3 als Stammzellregulator wurde nur unter der Zugabe von GTP hochreguliert. Dies ist umso bemerkenswerter, als unter GTP-Einfluss auch die Expression von CyclinB2 am stärksten erhöht war.

Die untersuchten Supplemente zur Induktion der Mineralisation von USSCs bieten vielversprechende Möglichkeiten der Kombination ihrer Eigenschaften. Eine Variation der Phosphatquellen zur Unterstützung der Mineralisation von USSCs *in vitro* könnte für die spezifische Remineralisierung und das Auffüllen von Defekten mit proliferierenden Zellen *in vivo* therapeutische Bedeutung erlangen. Bei der Auswahl der Zusätze zur Zellkultur könnten Proliferation und Mineralisation aufeinander abgestimmt werden. Jedoch ist eine zunehmende Proliferation kein hinreichendes Kriterium für Mineralisationsprozesse. Die Aufnahmewege in die Zellen scheinen für die einzelnen Supplemente voneinander abzuweichen. In weiteren Untersuchungen und klinischen Studien sollte untersucht werden, ob proliferierende und mineralisierende Zellkulturen in nekrotischen Knochenarealen überleben können.

Summary

Osteochemonecroses can occur as an adverse consequence of bisphosphonate- or tumor-therapy that still poses a big challenge today. The use of stem cells of umbilical cord blood (**USSCs**) may offer an solution to treat defects of the jaw. However, the regenerative and mineralization potential of **USSCs** depend on a reliable osteogenic induction. The spectrum of reliable induc-tors might be widened by providing culture media with different phosphate sources.

24-well plates were seeded with **USSCs** that had been incubated with differently supplemen-ted medium from day 1. The cell culture medium was supplemented by 5 mM or 10 mM β -glycerolphosphate (**β -Gly**), 5 mM adenosine triphosphate (**ATP**) or 5 mM guanosine triphos-phate (**GTP**). The media were replaced by standard culture media on day 2 and cells were examined regarding bone-specific mineralization and proliferative potential after 10 days in culture.

In parallel, **USSCs** were plated on 75 cm² flasks and cultured under the same conditions. Ex-pression of cell-cycle markers and cell-cell-contacts were analysed using **RT-qPCR**.

The proliferation was reduced when using **ATP** and **GTP** as phosphate sources. Adding **GTP** decreased the absolute mineralization, but it considerably increased the specific mineralization rate in comparison with cells that were incubated without additional phosphate sources. The highest mineralization rate was measured in cultures supplemented with **β -Gly**. This compen-sated the slightly reduced proliferation. Except for **ATP**, all used supplements resulted in an increased specific mineralization compared to untreated cells.

The quantitative analysis of the expression showed that the additional phosphate sources did not affect the fixation of cells in a cell cluster as the expression of vinculin stayed the same. **ATP** and **GTP** led to an increased expression of CyclinB2 that is an initial marker of cell division. Notch-3, a niched stem cell marker, was only upregulated by **GTP**. It is remarkable that the supplementation with **GTP** also led to an increase of CyclinB2.

The supplements used to induce mineralization of **USSCs** provide promising opportunities to combine their features. Modifying phosphate sources to support the mineralization of **USSCs** *in vitro* could result in therapeutic relevance to treat bone defects with proliferating cells *in vivo*. Selecting appropriate supplements for cell culture could improve proliferation and mine-ralization. However, an increased proliferation rate is not a sufficient criterion for the process of mineralization. There is good reason to believe that the intake of the supplements in the cells varies. This has to be studied in the future. Furthermore, clinical studies have to demonstrate if proliferating and mineralizing cell cultures can survive in necrotic bone.

Abkürzungsverzeichnis

1, 25 (OH)₂D	1 α – 25 – Dihydroxycholecalciferol
ALP	Alkalische Phosphatase
Asc	Ascorbinsäure
AT-MSC	<i>Adipose Tissue MSC</i>
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gly	β -Glyzerolphosphat
BM-MSC	<i>Bone Marrow MSC</i>
BMP	Bone Morphogenic Protein
CaSR	<i>Calcium-Sensing Receptor</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C_P	<i>Crossing Point</i>
CT	Calcitonin
DAG	Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glyzerolphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ESC	Embryonale Stammzelle
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat

Hsp60	Hitzeschockprotein 60
Koll 1	Kollagen Typ 1
KO	Kontrolle
LIBS	<i>Laser-Induced Breakdown Spectroscopy</i>
MPC	Mesenchymale Progenitorzelle
mRNA	<i>messenger Ribonucleid Acid</i>
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stammzelle
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OC	Osteokalzin
ON	Ostonektin
OP	Osteopontin
OPG	Osteoprotegerin
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P_i	Anorganisches Phosphat
PTH	Parathormon
PTHrP	<i>PTH related Peptide</i>
RT-qPCR	quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
RER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RFU	<i>Relative Fluorescence Unit</i> , dt. relative Fluoreszenz Einheit
RGE	Relative Genexpression
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , dt. Ribonukleinsäure, auch RNS
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
Runx2	<i>Runt-related Transcription Factor 2</i>
TE	<i>Tissue Engineering</i>
UNG	Uracil-DNA-Glycosylase
USSC	<i>Unrestricted Somatic Stem Cell</i>
Z	Zellen

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	ii
Abkürzungsverzeichnis	iii
Inhaltsverzeichnis	vi
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
1.1 Zellen für das <i>Tissue Engineering</i> von Knochen	2
1.2 Aufbau des Knochens	6
1.3 Mineralhaushalt des Knochens	9
1.3.1 Kalziumhaushalt	9
1.3.2 Phosphathaushalt	10
1.3.3 Hormonelle Regulation	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Zellen	13
2.2 Versuchsmaterialien und Hilfsmittel	13
2.2.1 Medien, Puffer und Enzyme für die Zellkultur	14
2.2.2 Verwendete Chemikalien	15
2.2.3 Test-Kits	16
2.2.4 Materialien für die cDNA-Synthese	17
2.2.5 Materialien, Primer und Sonden für die Polymerasekettenreaktion	17
2.2.6 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	19
2.3 Zellkultur USSCs	20
2.3.1 Kultivieren der Zellen	20
2.3.2 Passagieren der Zellen	21
2.3.3 Bestimmung der Zellzahl	21
2.3.4 Kryokonservierung der Zellen	22

2.3.5	Dotieren der Multi-Well-Platten mit Zellen für die Bestimmung der Verdopplungszeit	22
2.3.6	Bestimmung der Verdopplungszeiten der einzelnen Zelllinien	23
2.3.7	Dotieren der Multi-Well-Platten mit Zellen zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens bei Zugabe verschiedener Phosphat-Supplemente	23
2.3.8	Zellproliferationsassay	25
2.4	Real-Time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	26
2.4.1	Allgemeine Grundlagen der qRT-PCR	26
2.4.2	RNA-Isolierung	26
2.4.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	28
2.4.4	cDNA-Synthese	29
2.4.5	Durchführung der qRT-PCR	29
2.5	Mineralisationsnachweis	30
2.6	Bestimmung der Ratio aus Proliferation und Mineralisation	32
2.7	Statistische Auswertung	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Verdopplungszeiten der einzelnen Zelllinien	33
3.2	Einfluss der Phosphatsupplemente auf die Entwicklung der Zellzahlen der USSCs	36
3.3	Einfluss der Phosphatquellen auf das Mineralisationsverhalten der USSCs	39
3.4	Verhältnis von Mineralisation und Proliferation in Phosphat substituierten Kulturen	41
3.5	Einfluss der Phosphatquellen auf Zellzyklus und Zell-Zell-Kontakte	43
4	Diskussion	46
5	Schlussfolgerungen	57
	Literaturverzeichnis	58
	Danksagung	68

Abbildungsverzeichnis

1	Differenzierungskaskade	3
2	Knochenzellen - Schematische Darstellung	8
3	Anordnung der supplementierten Medien auf den Multiwellplatten	24
4	Verdopplungszeiten der verschiedenen Zelllinien	34
5	Zellzahlen (CyQUANT®) unter Zusatz verschiedener Medien	36
6	CyQUANT® Ergebnisse unter 24-stündiger Phosphatsupplementierung und einer Gesamtkulturdauer von 10 Tagen	38
7	Mineralisationsnachweis (OsteoImage™) unter 24-stündiger Phosphatsupplementierung und einer Gesamtkulturdauer von 10 Tagen	39
8	Detailausschnitt einer mit 10 mM β -Gly supplementierten Kultur an Tag 10, Doppelfärbung, 200-fache Vergrößerung (Leica DM5000 B)	40
9	Verhältnis von Mineralisation und Proliferation in Phosphat substituierten Kulturen	41
10	Differentielle Genexpression in Phosphat substituierten Zellkulturen	44

Tabellenverzeichnis

1	Einteilung der Zellen für das <i>Tissue Engineering</i> nach Handschel et al. (2009).	5
2	Medien, Puffer und Enzyme für die Zellkultur	14
3	Supplemente zum Zellkulturmedium	14
4	Chemikalien	15
5	Test-Kits	16
6	Materialien für die cDNA-Synthese	17
7	Materialien für die PCR	17
8	Liste der für die RT-qPCR verwendeten humanen Primer	18
9	Sonden aus der Universal Probe Library der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)	18
10	Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	19
11	Temperatur-Zeit-Profil für die quantitative Real-Time PCR im iCycler [®]	30
12	Anzahl der Zellen mit Standardabweichungen der Linien USSC 18, USSC 5/77, USSC 5/73 und USSC 8 an den Tagen 1-5 im Überblick	35
13	Verdopplungszeiten der Linien USSC 18, USSC 5/77, USSC 5/73 und USSC 8 im Überblick.	35
14	p-Werte der Proliferation im Überblick	37
15	Mediane Mineralisation und Proliferation und Quotientenbildung.	43
16	Ergebnisse der RT-qPCR	44

Einleitung

Die Behandlung von Patienten mit Knochendefekten im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich stellt auch heutzutage eine besondere Herausforderung dar. Tumorerkrankungen, Traumata, aber auch Folgen des Alterungsprozesses können teils enorme Knochendefekte zur Folge haben. Ungeachtet ihrer Ursachen führen Knochenverluste für die Patienten nicht nur zu funktionellen, sondern meist auch zu ästhetischen Beeinträchtigungen. Weitere Begleiteffekte von Knochenverlust im Kiefer- und Gesichtsbereich stellen insbesondere auch die Minderung von Lebensqualität und Sozialkompetenz bei den Patienten dar, wenn das Eingliedern von schleimhaut- oder implantatgetragenen Zahnersatz nicht mehr möglich ist.

Knochen ist zwar ein Gewebe, das sich durch narbenloses Ausheilen nach Schädigung auszeichnet, jedoch ist die Regenerationsfähigkeit bei großen Defekten begrenzt. Im Laufe der Jahre haben sich die Therapieansätze verändert. Wurden ursprünglich rein resektive Verfahren angewendet, so fokussiert man sich heutzutage zunehmend auf rekonstruierende Maßnahmen. Durch artifizielle Materialien wie Metalloxid-Keramiken (Yamamuro et al. 1990; Frenkel and Niederdellmann 1975), Polymethylmetacrylate (Pochon and Kloti 1991) oder Polyurethane (Leake and Habal 1976) konnten Form und Funktion von Knochen teils wieder hergestellt werden. Die unvollständige Integration in den Organismus sowie weitere spezifische Nachteile dieser Knochenersatzmaterialien, wie zum Beispiel Fremdkörperreaktionen, konnten aber nicht vermieden werden.

Da es sich bei Knochen um ein Gewebe handelt, das stetigen Umbauprozessen unterliegt, vermag es sich durch kontrollierte dynamische An-, Um- und Abbauprozesse den Anforderungen und der Beanspruchung, denen es ausgesetzt ist, laufend anzupassen. Dieser Aspekt ist mittlerweile zentraler Bestandteil der rekonstruktiven Therapie, deren Ziel, wann immer möglich, die *Restitutio ad integrum* ist. Auch die Heilung nach einer Fraktur oder Osteotomie sind Beispiele für eine *Restitutio* (Rodan 1992), also die Wiederherstellung des Knochens.

Im Gegensatz zu künstlichen Knochenersatzmaterialien, welche meist nur osteokonduktive Ei-

genschaften aufweisen, enthält autologer Knochen neben dem Knochengestüt auch biologisch aktive Zellen. Er besitzt osteogenetische, osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften, die einen beschleunigten Heilungsprozess ermöglichen und zudem dazu führen, dass sich das Transplantat an die lokalen Begebenheiten anpassen kann. Autologe Knochentransplantate gelten daher auch heutzutage immer noch als „Gold-Standard“ (Pretorius et al. 2005; Sen and Miclau 2007) in der rekonstruktiven Knochenchirurgie.

Trotz aller Vorteile geht die Verwendung autologen Knochens mit einigen Nachteilen einher. Neben der quantitativen Limitation des zur Verfügung stehenden Knochens (Springfield 1996) sind dies die mögliche Morbidität aufgrund der Gewebentnahme (sogenannte *donorsite morbidity*) (Nkenke et al. 2001, 2002, 2004; Sasso et al. 2005; Kim et al. 2009; Scheerlinck et al. 2013) sowie der häufig auftretende Volumenverlust des Transplantates (Smolka et al. 2006; Sbordone et al. 2012) infolge von Resorptionsprozessen im Empfängergewebe.

Um langfristige Erfolge zu erzielen und den Anforderungen des komplexen Gewebes Knochen gerecht zu werden, rückt die Entwicklung von zellbasierten Transplantaten zur Knochenrekonstruktion immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung. Insbesondere das *Tissue Engineering* von Knochen scheint hierbei eine aussichtsreiche, komplikationsarme Alternative zum autologen Knochentransplantat zu sein.

Grundsätzlich werden drei verschiedene Ansätze der zellbasierten Knochenrekonstruktion unterschieden. Neben dem bereits oben erwähnten Knochentransplantat, beispielsweise in Form eines Gewebblocks, ist auch eine Aktivierung von ortsständigen Zellen möglich. Diese kann beispielsweise mithilfe von Zytokinen (Kubler et al. 1998; Depprich et al. 2005), mechanischen Stimuli wie Dehnungsreizen (Meyer et al. 2006) oder elektromechanischen Reizen (Aaron et al. 2004) erfolgen. Bei dieser Vorgehensweise ist kein zusätzlicher Spenderknochen erforderlich. Bei Erkrankungen, die mit großen knöchernen Defekten oder mit vorgeschädigten Zellen, z.B. *post radiationem* in der Malignomtherapie, einhergehen, stößt die Methode der *in-situ*-Aktivierung jedoch an ihre Grenzen (Holmes et al. 2002).

Zellen können außerdem isoliert, extrakorporal kultiviert und schließlich transplantiert werden. Letzterer Ansatz entspricht den klassischen Vorstellungen des *Tissue Engineerings*. Die Entnahmemorbidität entfällt hier. Die vier biologischen Säulen des *Tissue Engineerings* sind die Zellen (Handschel et al. 2006), die Matrix (Handschel et al. 2002; Wiesmann et al. 2004), Wachstumsfaktoren (Depprich et al. 2005; Kubler et al. 1998) und die Vaskularisation (Rouwkema et al. 2008; Krishnan et al. 2014).

1.1 Zellen für das *Tissue Engineering* von Knochen

Zellen, die für das *Tissue Engineering* von Knochen infrage kommen, können autologer, allogener oder xenogener Herkunft sein. Sie können darüber hinaus weiter unterteilt werden in Zellen mit totipotentem, pluripotentem oder multipotentem Potenzial sowie in bereits ausdifferenzier-

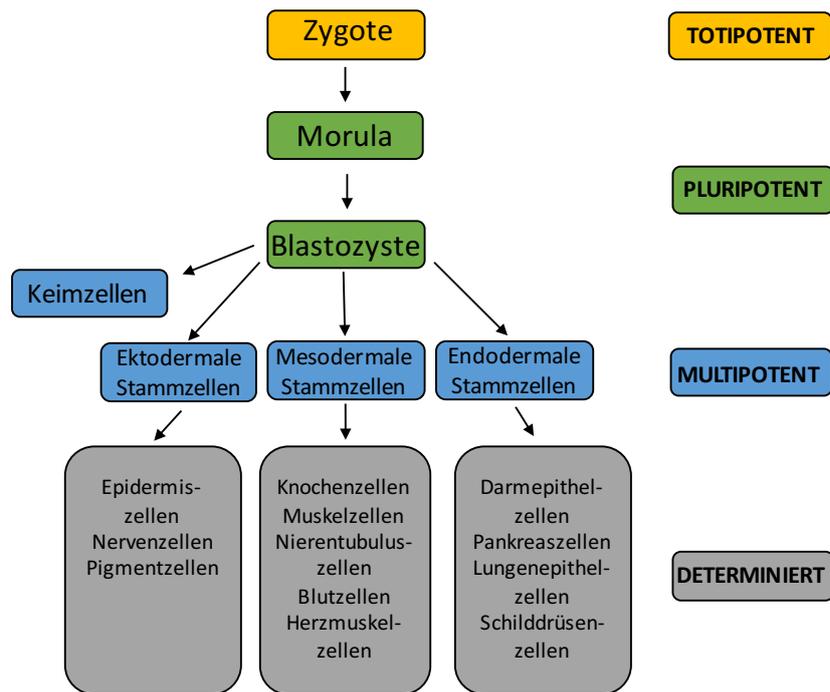


Abb. 1: Differenzierungskaskade der Zellen modifiziert nach Rohen und Wobus and Boheler

te Zellen (Osteoblasten). Während totipotente Zellen in der Lage sind, sich in alle Zellen des Organismus zu differenzieren, besteht bei pluripotenten Zellen immerhin noch die Möglichkeit, sich in Zellen aller drei Keimblätter zu entwickeln. Multipotente Zellen hingegen können verschiedene Zelltypen ausbilden, zeigen jedoch ein eingeschränkteres Differenzierungsspektrum als toti- oder pluripotente Zellen. Unipotente Zellen sind bereits endgültig determiniert. Darüber hinaus sind auch genetisch modifizierte Zelllinien erforscht, die zum Einsatz kommen können. Abbildung 1 enthält eine umfangreiche Darstellung der Differenzierungskaskade der Zellen. Die Verwendung von Zellen mit toti-, pluri- oder multipotentem Differenzierungspotenzial bringt den Vorteil mit sich, dass sich die ursprünglichen Zellen sowohl in knochenbildende als auch in Zellen entwickeln können, die an der Ausbildung von Geweben beteiligt sind (z.B. Endothelzellen).

Mesenchymale Vorläuferzellen (MPC) wurden bisher in verschiedensten Geweben nachgewiesen, beispielsweise in Knochenmark, Periost, Fettgewebe oder Pulpagewebe der Zähne (Pittenger et al. 1999; Moosmann et al. 2005; Covas et al. 2005; In 't Anker et al. 2004) und können in verschiedene mesenchymale Zelllinien differenzieren (Handschel et al. 2009). Die Stamm- und Vorläuferzellen, die embryonal entstehen, scheinen in den verschiedensten adulten Geweben bzw. Organen zu verbleiben, um dort der Erneuerung zugrunde gegangener Zellen zu dienen. Ihre Verfügbarkeit ist jedoch eingeschränkt, da sie aus dem Körper mittels Aspirationsverfahren entnommen werden müssen und ihre Anzahl in adultem Gewebe gering ist. So geht man davon aus, dass nur etwa jede hunderttausendste Zelle aus dem Knochenmark eine Mesenchymale

Progenitorzelle (MPC) ist (Quarto et al. 1995; D'Ippolito et al. 1999). Außerdem sind ihre Proliferations- und Differenzierungsmöglichkeiten im Alter begrenzt (McCulloch et al. 1991; Quarto et al. 1995; D'Ippolito et al. 1999).

Embryonale Stammzellen (ESC) (Heng et al. 2004; zur Nieden et al. 2005) und *Unrestricted Somatic Stem Cells* (USSCs) (Kogler et al. 2004) werden bereits seit einigen Jahren für das *Tissue Engineering* verwendet und besitzen totipotente beziehungsweise pluripotente Eigenschaften. Sie sind xenogener und allogener Herkunft, weshalb die Entnahmemorbidity entfällt, zudem besitzen sie ein hohes Erneuerungspotenzial.

Embryonale Stammzellen (ESC) werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste von künstlich befruchteten Eizellen isoliert. Die Blastozyste setzt sich aus einer äußeren Zellschicht, dem Trophoblasten, und einer inneren Zellschicht zusammen. Aus der inneren Zellmasse entwickelt sich später der Embryo. Die ersten ESCs wurden 1981 aus Maus-Blastozysten gewonnen (Kaufman et al. 1983; Martin 1981). 1998 wurden dann die ersten humanen ESCs erfolgreich isoliert (Thomson et al. 1998). Diskussionen über die Verwendung von humanen ESCs und deren ethisch unbedenklichen Einsatz müssen geführt werden. Dabei steht die Frage im Mittelpunkt, ob die mögliche Therapie eines erkrankten Menschen höher anzusetzen ist als das Leben eines Embryos. Es wird in der Literatur argumentiert, dass eine Therapie, die womöglich der Behandlung vieler Patienten dienen könnte, über das Wohl des Embryos gestellt wird (Cogle et al. 2003). Das Recht auf Leben und der Schutz der Menschenwürde verbieten jedoch die Forschung mit embryonalen Zellen. In Deutschland ist jegliche Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen verboten und durch das Embryonenschutzgesetz (ESchG vom 13.12.1990) festgelegt. Zusätzlich kann eine maligne Entartung von ESCs nicht ausgeschlossen werden. Trounson (2002) zeigte in Tierversuchen, dass eine erhöhte Anzahl von Teratomen und Teratokarzinomen *post transplantationem* von ESCs aufgetreten ist. Auch wenn sich in anderen *in-vivo*-Studien keine maligne Transformation andeutete (Zhang et al. 2001), sollte dieses potentielle Entartungsrisiko nicht außer Acht gelassen werden.

Im Gegensatz dazu sind die ethischen Bedenken bei der Verwendung von USSCs geringer, auch die rechtlichen Grundlagen erlauben umfangreichere Untersuchungen mit und an den Zellen. Weder in Schafsmodellen (Kogler et al. 2004) noch in weiteren Tiermodellen zur Überprüfung des Differenzierungspotenzials von USSCs (Mann 2007) konnten Entartungen nachgewiesen werden. Zwar konnten Burt et al. (2004) und Heng et al. (2004) aussichtsreiche Ergebnisse bezüglich der Immunkompetenz von ESCs vorlegen, jedoch sind auch in diesem Bereich noch Bedenken vorhanden. Demgegenüber konnten bislang bei den Untersuchungen zu USSCs nur geringgradige Immunreaktionen beobachtet werden (Benito et al. 2004; Bradstock et al. 2006; Kleen et al. 2005).

Eine mögliche Einteilung der Zellen für das *Tissue Engineering* findet sich bei Handschel et al. (2009) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung der Zellen für das *Tissue Engineering* nach Handschel et al. (2009). ADPC=Progenitorzellen aus Fettgewebe, BMDPC=Progenitorzellen aus dem Knochenmark, PDPC=Progenitorzellen aus dem Periost

Natürlich vorkommende Zellen	Genetisch modifizierte Zellen
<p>Toti- und Pluripotente Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> • Embryonale Stammzellen (ESCs) • Nabelschnurblutstammzellen (USSCs) 	<ul style="list-style-type: none"> • Osteosarkom Zelllinien • Immortalisierte Zelllinien <ul style="list-style-type: none"> – spontan – transformiert • Nicht transformierte clonale Zelllinien
<p>Multipotente Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> • ADPC • BMDPC • PDPC • Progenitorzellen aus Gefäßwänden • Progenitorzellen aus Plazenta 	
<p>Unipotente Zellen</p> <ul style="list-style-type: none"> • Präosteoblasten • <i>lining cells</i> • Osteoblasten • Osteozyten 	

1.2 Aufbau des Knochens

Knochen, der auf den ersten Blick ein starres, sehr hartes Gewebe zu sein scheint, ist eine spezielle Form von Bindegewebe, das neben der Stützfunktion weitere Aufgaben erfüllt. Gemeinsam mit Muskeln, Sehnen, Bändern und Gelenken ermöglicht Knochen nicht nur Bewegungsfreiheit, sondern schützt zudem die inneren Organe und spielt eine zentrale Rolle im Mineralhaushalt. Grundsätzlich sind im Knochen vier verschiedene Zelltypen anzutreffen: Osteoblasten, Osteozyten, *Bone lining cells* und Osteoklasten. Während die ersten drei genannten Zelltypen der knochenbildenden Gruppe zuzuordnen sind, werden die Osteoklasten der Gruppe der knochenabbauenden Zellen zugerechnet (Ducy et al. 2000). Eine weitere Unterteilung der Knochenzellen ist aufgrund ihres Ursprungs möglich. Während Osteoblasten, Osteozyten und *Bone lining cells* aus Osteoprogenitorzellen beziehungsweise mesenchymalen Stammzellen (MSC) hervorgehen (Buck and Dumanian 2012), stammen die Osteoklasten von den hämatopoetischen Stammzellen ab (Suda et al. 1992).

Osteoblasten sind kubische Zellen, die dicht aneinander gereiht auf der Knochenoberfläche liegen und die extrazelluläre Matrix bilden. Sie produzieren täglich einen Osteoidsaum von etwa $0,5 - 1 \mu\text{m}$ (Sommerfeldt et al. 2001) und nehmen in aktivem Zustand eine ovale Form an. Entsprechend ihrer Aufgabe enthalten sie viele Zellorganellen, insbesondere raues endoplasmatisches Retikulum (RER) zur Produktion von Proteinen (Downey and Siegel 2006). Die Differenzierung von Osteoblasten gilt definitionsgemäß als abgeschlossen, sobald die Zelle Knochenmatrix synthetisiert und diese mineralisiert wird (Meyer et al. 2006). Anschließend können sie entweder aktive Osteoblasten bleiben, in Matrix eingemauert zu Osteozyten werden oder in Form von relativ inaktiven, zellorganellarmen *Bone lining cells* an der Knochenoberfläche verbleiben (Downey and Siegel 2006). Unklarheit herrscht bisher noch über die Funktion der *Bone lining cells*: während zum einen vermutet wird, dass sie unter dem Einfluss von Parathormon (PTH) Enzyme sezernieren, die an der Knochenoberfläche erste Kristalle herauslösen, ehe die Osteoklasten fortfahren (Buckwalter et al. 1996), wird andererseits davon ausgegangen, dass es sich um Vorläufer der Osteoblasten handelt. Diese könnten außerdem das Wachstum der Kristalle regulieren (Marks and Popoff 1988; Marks and Hermey 1996).

Osteozyten machen im Skelett eines Erwachsenen rund 90 Prozent aller Knochenzellen aus (Downey and Siegel 2006; Buck and Dumanian 2012). Diese waren ursprünglich Osteoblasten, die, umhüllt von neu gebildeter extrazellulärer Matrix, die Rolle von Osteozyten übernehmen. Sie liegen im Inneren des mineralisierten Knochens in kleinen Hohlräumen, den Lakunen, und bilden untereinander Zytoplasma-Fortsätze aus, die ihnen eine direkte Kommunikation sowie einen Austausch von Nährstoffen innerhalb der Matrix ermöglichen (Marks and Popoff 1988; Marks and Hermey 1996). Es wird darüber hinaus angenommen, dass dieses Netzwerk mechanische Deformationen weiterleitet und so Knochenbildung und -resorption anregen kann (Buckwalter et al. 1996).

Osteoklasten sind vielkernige Zellen, die aus hämatopoetischen Stammzellen durch die Fusion

von Vorläuferzellen entstehen. Ihre Aufgabe ist es, Knochen gezielt zu resorbieren und damit dessen Umbau zu ermöglichen. Sie sind in den meisten Fällen an den Oberflächen von Knochen anzutreffen, sind sehr mobil und enthalten entsprechend ihrer Funktion viele lysosomale Enzyme. Ihre dem Knochen zugewandte Oberfläche ist durch die Ausbildung einer sogenannten *ruffled border* (Downey and Siegel 2006; Sommerfeldt et al. 2001; Jerosch et al. 2002) stark vergrößert, was einen guten Austausch zwischen extra- und intrazellulärem Milieu ermöglicht. Neben Enzymen kommen auch Protonenpumpen zum Einsatz, die im Bereich zwischen Osteoklastensaum und Knochenoberfläche den pH-Wert auf 2 bis 4 absinken lassen (Sommerfeldt et al. 2001). Es entstehen sogenannte „Howship-Lakunen“ an den Stellen, an denen die Osteoklasten aktiv waren und zur Auflösung des Gewebes geführt haben.

Die von den Osteoblasten sezernierte Matrix macht etwa 90 Prozent des gesamten Knochenvolumens aus (Buck and Dumanian 2012). Sie setzt sich aus einem organischen und einem anorganischen Teil zusammen. Der organische Teil macht ca. 65 Prozent der Matrix aus und besteht wiederum zu rund 90 Prozent aus Kollagen Typ I. Darüber hinaus sind Proteoglykane, Glykoproteine und Wachstumsfaktoren als weitere Bestandteile bekannt. Zu den Wachstumsfaktoren gehören Vertreter der BMP-Familie (Bone Morphogenic Protein), Interleukin-1, Interleukin-6, Osteokalzin (OC), Osteonektin (ON) und *Bone sialoprotein*. Sie haben einen starken Einfluss auf die Osteogenese und die Mineralisations- bzw. *Remodeling*-Prozesse (Jerosch et al. 2002). Die Typ-I Kollagen Moleküle formen zunächst Kollagenfibrillen, die präzise ausgerichtet und überlappend angeordnet sind (Downey and Siegel 2006). Bezüglich der zeitlichen Abfolge der initialen Mineralisation der Matrix gehen die Ansichten auseinander: während Downey and Siegel (2006) beschreiben, dass 60 Prozent innerhalb weniger Stunden mineralisiert werden, gehen andere Wissenschaftler davon aus, dass der Mineralisationsprozess erst 10 bis 15 Tage nach der Sekretion der Matrix beginnt, die ersten 70 Prozent der Matrix dann aber auch innerhalb kürzester Zeit mineralisiert werden (Sommerfeldt et al. 2001; Buck and Dumanian 2012). Der anorganische Teil setzt sich aus Hydroxylapatit-Kristallen zusammen und macht den Hauptspeicher des Organismus für Kalzium, Phosphat, Natrium und Magnesium aus. Wurde früher noch von reinem Hydroxylapatit ausgegangen, so werden heute auch spezifischen sauren Phosphatgruppen eine Beteiligung an dem anorganischen Teil zugesprochen (Downey and Siegel 2006).

Abbildung 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Zellen des Knochens sowie deren Lokalisation und Organisation.

Die Knochenstruktur betrachtend wird kortikaler (kompakter) von spongiösem Knochen unterschieden. Beide Formen besitzen Anteile primären Geflechtknochens und sekundären Lamellenknochens. Ihre Struktur ist ähnlich, jedoch ist das Masse-Volumen-Verhältnis in der Kompakta höher als in der Spongiosa (Buckwalter et al. 1996). Die Kortikalis verleiht dem Knochen Kompressionskraft und Widerstand gegen Torsionskräfte. Sie ist in Röhrenknochen vorzugsweise im Bereich der Diaphysen verstärkt ausgeprägt, im Bereich der Metaphysen und Epiphysen über-

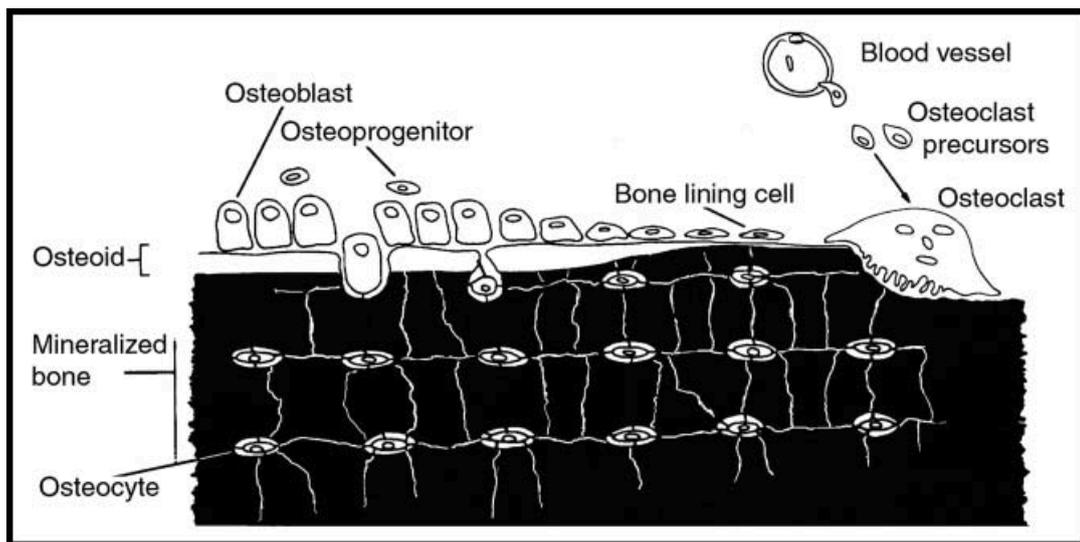


Abb. 2: Knochenzellen - Schematische Darstellung

Verwendung mit Genehmigung von Steven N. Popoff aus "Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton" (Marks and Popoff 1988)

wiegt der Anteil der Spongiosa. Im Bereich platter Knochen, insbesondere an den Schädelknochen, macht die Spongiosa der Kompakta gegenüber einen deutlich größeren Anteil aus (Buck and Dumanian 2012), was auch dem Leichtbauprinzip des Schädels zuzuordnen ist. Weiterhin unterscheiden sich die beiden Typen in ihrer metabolischen Aktivität. Da die Knochenzellen in der Spongiosa durch ihre Lage an der Oberfläche engeren Kontakt zu zirkulierenden Zytokinen und Wachstumsfaktoren haben, können Umbauprozesse hier schneller stattfinden als in der Kortikalis, wo die Zellen dicht in die Matrix eingebettet sind (Buckwalter et al. 1996).

Ein weiterer Unterschied besteht zwischen Geflecht- und Lamellenknochen. Geflechtknochen, als primärer Knochen, entsteht während der embryonalen Entwicklung, im Wachstum und bei der Frakturheilung über einen Kallus, wird jedoch normalerweise im weiteren Verlauf komplett durch Lamellenknochen ersetzt. Die Anordnung der Kollagen-Fibrillen im Geflechtknochen ist wenig organisiert und ungleichmäßig. Er ist dadurch noch sehr biegsam, aber auch weniger tragfähig. Demgegenüber zeichnet sich der Lamellenknochen durch eine klar strukturierte Anordnung von dicht gepackten Fibrillen aus. Er tritt in zwei Hauptformen, als Trabekel- und als Osteon-System, auf.

Die Osteone sind vor allem in der Kortikalis vorhanden. In ihrem Inneren liegt ein Hohlraum, der Blut- und Lymphgefäße und gelegentlich Nervenfasern enthält, der sogenannte „Havers-Kanal“. Rings herum orientieren sich parallel angeordnete Kollagenfibrillen. Viele Zellfortsätze ermöglichen die Kommunikation und den Austausch von Nährstoffen zwischen den Osteonen und den Zentralkanälen. Zwischen den Osteonen gibt es definierte Grenzlinien, die Zementlinien (Downey and Siegel 2006; Buck and Dumanian 2012).

In der Spongiosa tritt der Lamellenknochen vornehmlich in Form von Trabekeln auf. Hier neh-

men die Kollagenfibrillen halbrunde Formen an. Diese andere Struktur führt vor allem dazu, dass die Oberfläche deutlich größer ist als bei den Osteonen. Der Anteil an Zellen und Gefäßen fällt größer aus, statt „Harvers-Kanälen“ gibt es viele kleine Sinusoide (Jepsen 2009), was dazu führt, dass der metabolische Umsatz im trabekulären Knochen im Vergleich zu Knochen, der aus Osteonen besteht, höher ist.

1.3 Mineralhaushalt des Knochens

Wie bereits oben erwähnt, nimmt der Knochen nicht nur eine Schutz- und Stützfunktion ein, sondern ist auch zu einem erheblichen Anteil an der Regulierung des Mineralhaushaltes beteiligt. Vor allem der Kalzium- und der Phosphathaushalt sind dies betreffend eng miteinander gekoppelt. Auch bei der Regulierung des Magnesium-Haushaltes spielt der Knochen eine, wenn auch untergeordnete, Rolle.

1.3.1 Kalziumhaushalt

Der Körper eines erwachsenen Menschen enthält etwa 1000 – 1200 g Kalzium (Schmidt et al. 2010; Allgrove et al. 2009). Der Anteil des im Knochen gespeicherten Kalziums liegt bei 99 Prozent, es liegt dort vor allem in Form von Hydroxylapatit-Kristallen ($\text{Ca}^{10}\text{PO}_4\text{}^6\text{OH}^2$) vor. Diese bestehen aus schwer löslichen, alkalischen Kalziumphosphat- und Kalziumkarbonatsalzen. Der Rest verteilt sich auf das Plasma und auf intrazelluläre Räume. Während intrazellulär vornehmlich ionisiertes Kalzium vorhanden ist, lassen sich im Plasma im Wesentlichen drei verschiedene Fraktionen finden. Während die ionisierte Form auch hier etwa 50 Prozent ausmacht, sind rund 40 Prozent an Proteine gebunden (vor allem an Albumin) und weitere 10 Prozent bilden Komplexe mit Citrat, Sulfaten oder Phosphaten (Ghosh and Joshi 2008).

Kalzium ist an vielen biochemischen Prozessen im Körper beteiligt. Es wird einerseits als Transmitter benötigt und ist damit in Prozesse wie Muskelkontraktion, Transport und Ausschüttung von Hormonen und anderen Botenstoffen involviert, spielt aber andererseits auch in der Blutgerinnung oder bei der Regulation der Permeabilität von Zellmembranen eine Rolle. Das ionisierte Kalzium des Plasmas wird streng reguliert (1,1 – 1,3 mmol/l), um insbesondere die neuromuskulären Aktivitäten kontrollieren zu können (Allgrove et al. 2009).

Parathormon (PTH), 1α – 25 – Dihydroxycholecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) und Calcitonin (CT) sind die wichtigsten Regulatoren des ionisierten Plasma-Kalziums.

Die Kalziumkaskade wird durch die Bindung von Kalzium an einen spezifischen Rezeptor, den „*Calcium-Sensing Receptor*“ (CaSR) initiiert. Er ist überwiegend in den Zellmembranen der Epithelzellen der Nebenschilddrüse exprimiert, kann aber auch im Knochen und der Niere nachgewiesen werden (Rassow et al. 2012; Allgrove et al. 2009). Kalzium bindet an die extrazelluläre Domäne und löst intrazellulär eine *second messenger*-gekoppelte Signalabfolge aus, die die Ausschüttung von PTH ändert. Unter normalen Umständen wird PTH tonisch aus-

geschüttet, in Phasen akuter Plasma-Kalzium-Schwankungen wird die Sekretion entsprechend angepasst.

PTH ist ein einkettiges Polypeptid-Hormon, das in der Nebenschilddrüse aus dem Vorläufer „Prepro-PTH“ synthetisiert wird. Durch Abspalten der vorgeschalteten Sequenzen entsteht schlussendlich die aktive Form des **PTH** (Habener and Kronenberg 1978; Habener et al. 1979). Ein kleiner Teil des **PTH** wird in Vesikeln gespeichert, der Großteil wird jedoch laufend neu synthetisiert. Die **PTH**-Rezeptoren sind vor allem im Knochen und den Nieren vorhanden. Beim Absinken des Plasma-Kalziums und damit verminderter Bindung von Kalzium-Ionen an den *Calcium-Sensing Receptor* (**CaSR**), wird **PTH** vermehrt ausgeschüttet und wirkt im Knochen vorwiegend an Osteoblasten. Die Wirkung des **PTH** an den Osteoklasten erfolgt hauptsächlich durch Mediatoren, z.B. das „RANKL/RANK-System“, das zur Osteoklastendifferenzierung beiträgt. Während **PTH** tonisch ausgeschüttet sogar eher den Knochenaufbau fördert (und deshalb auch in der Therapie von Osteoporose von Bedeutung ist), überwiegt bei kontinuierlicher Ausschüttung der Knochenabbau (Mayer 2007). In der Niere vermittelt **PTH** die Synthese von $1\alpha - 25 - \text{Dihydroxycholecalciferol}$, außerdem wird die Rückresorption von Kalzium gefördert, genauso wie die Ausscheidung von Phosphat. Letzteres führt netto trotz gleichzeitiger Phosphatfreisetzung aus dem Knochen und $1\alpha - 25 - \text{Dihydroxycholecalciferol}$ -vermittelter erhöhter Phosphatresorption im Darm zu einer negativen Phosphatbilanz (Ghosh and Joshi 2008).

1.3.2 Phosphathaushalt

Von den etwa 700 Gramm Phosphat im Körper eines Erwachsenen sind knapp 80 Prozent im Knochen gebunden, 9 Prozent in der Muskulatur gespeichert, 10,9 Prozent in den Organen enthalten und nur 0,1 Prozent befindet sich in den extrazellulären Flüssigkeitsräumen (Allgrove et al. 2009; Ghosh and Joshi 2008). Es wird an vielen Stellen des Organismus benötigt, so ist es in Form von Phospholipiden unerlässlich zur Aufrechterhaltung von Zellmembranen, es ist Bestandteil der Energielieferanten Adenosintriphosphat (**ATP**) und Guanosintriphosphat (**GTP**), ist Baustein der Nukleinsäuren, übernimmt in verschiedenen Verbindungen Pufferfunktion zur Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Werts und ist darüber hinaus auch an der Funktion vieler Proteine beziehungsweise an der zellulären Signalkaskade beteiligt (Schmidt et al. 2010; Klinker et al. 2009).

Im Plasma findet sich Phosphat vorwiegend in Form von Phospholipiden, Phosphateestern oder als freies anorganisches Phosphat (**P_i**). Die Plasma **P_i**-Konzentration unterliegt nicht so strengen Kontrollmechanismen wie die Kalziumkonzentration (s. Kap. 1.3.1), außerdem erlebt sie im Laufe des Lebens große Schwankungen: sie sinkt vom Säuglingsalter an kontinuierlich ab und erreicht ihr tiefstes Level im jungen Erwachsenenalter.

Die Resorption von Phosphat wird aktiv durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ gefördert, indirekten Einfluss haben **PTH** und hypokalzämische Zustände. Außerdem wurde im Jahr 2000 ein neues Mitglied aus der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren **FGF** entdeckt (Yamashita et al. 2000),

das ebenfalls eine Rolle im Phosphatstoffwechsel spielt. **FGF-23** stammt vorwiegend aus Osteozyten und wirkt in seiner aktiven Form vor allem in der Niere. Dort fördert es die Ausscheidung von Phosphat. Ein zusätzlicher indirekter Effekt tritt über die Hemmung der $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -Aktivierung ein. Die Sekretion von **FGF-23** wiederum wird über einen negativen Rückkopplungsprozess auch bei Hypophosphatämie verhindert (Allgrove et al. 2009; Juppner 2007). 70 Prozent des Phosphats werden aktiv über Natrium-Phosphat-Cotransporter vom Typ 2b und passiv im Dünndarm resorbiert (Wilz et al. 1979).

1.3.3 Hormonelle Regulation

Ein ausgeglichener Phosphathaushalt ist essenziell für den Organismus, da ein anhaltender Mangel an Phosphat langfristig zu Störungen der Knochenmineralisation bis hin zu Osteomalzie und Rachitis führt. Daneben sind aber ebenso kardiovaskuläre, neurologische oder auch respiratorische Komplikationen möglich. Umgekehrt kann eine Hyperphosphatämie, die beispielsweise im Endstadium von Nierenerkrankungen auftritt, zu einem sekundären Hyperparathyreodismus führen. Dies kann wiederum eine Osteodystrophie mit sich bringen oder aber Verkalkungen im Bereich des Gefäßsystems verursachen (Sommer et al. 2007). Der Einfluss von **PTH** und *Fibroblast Growth Factor* (**FGF**) auf den Kalzium- und Phosphatstoffwechsel wurde bereits in den Abschnitten 1.3.1 und 1.3.2 beschrieben. Weitere Einflussgrößen sind $1\alpha - 25 - \text{Dihydroxycholecalciferol}$, *PTH related Peptide* und Calcitonin.

Die aktive Form des Vitamin D, das Calcitriol, entsteht aus einem Produkt des Cholesterinstoffwechsels. Durch Ultraviolettbestrahlung der Haut wird die Reaktion in Gang gesetzt, es folgen Hydroxylierungsprozesse in der Leber und in der Niere. **PTH** seinerseits fördert diesen Schritt in der Niere. Außerdem wird im Darm die Resorption von Kalzium erhöht; Kalzium-Kanäle werden aktiviert, der Plasma-Kalzium-Gehalt steigt an und in direkter Konsequenz wird die **PTH**-Sekretion wiederum gedrosselt. Mit steigendem Plasma-Kalzium ergibt sich auch eine erhöhte Aktivität der Osteoblasten. Parallel stimuliert Calcitriol auch die Phosphatresorption im Darm und die Kalzium-Rückgewinnung in der Niere (Klinke et al. 2009).

PTH related Peptide (**PTHrP**) ist ein Peptid, das **PTH** strukturell ähnelt und dessen Existenz 1985 erstmals von Allgrove et al. (1985) vermutet wurde. Es bindet an den gleichen Rezeptor wie **PTH** mit Ausnahme des Rezeptors, der im zentralen Nervensystem existiert. Seine Rolle in der enchondralen Osteogenese, vor allem bei Heranwachsenden sowie bei der Proliferation und Reifung der Chondrozyten (Allgrove et al. 2009), wird diskutiert. Aufgrund der Tatsache, dass bei Patienten mit Tumorerkrankungen Hyperkalzämien beobachtet wurden, die zwar mit einem normalen **PTH**-Level, jedoch mit einem Anstieg von **PTHrP** einher gingen, wird dem **PTHrP** eine entsprechende Rolle im Kalziumstoffwechsel zugeschrieben (Allgrove et al. 2009; Rassow et al. 2012).

Calcitonin ist ein Peptidhormon, das vorwiegend von den C-Zellen der Schilddrüse gebildet wird. Die Freisetzung erfolgt als Antwort auf hyperkalzämische Zustände im Plasma. Die Wir-

kung von **CT** und **PTH** am Knochen sind gegenläufig, **CT** fördert den Einbau von Kalzium in die Matrix.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das *Tissue Engineering* (**TE**) stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Knochenregeneration dar. Durch die Verwendung verschiedener Phosphatsupplemente bei der Kultivierung von **USSCs** soll geklärt werden, welche Reaktionen dadurch bei der osteogenen Differenzierung der **USSCs** hervorgerufen werden.

Insbesondere soll untersucht werden,

1. ob die Verdopplungszeit verschiedener **USSC**-Zelllinien abhängig ist von der Passage und dem Geschlecht der Spenderzellen und welche Zelllinie sich besonders für den geplanten Versuchsaufbau eignet.
2. ob die Zellen ihr Wachstumsverhalten unter der Zugabe verschiedener alternativer Phosphat-Supplemente verändern.
3. ob die **USSCs** unter Zugabe verschiedener Phosphate ein verändertes Mineralisationsmuster zeigen.

Ein möglicher Einfluss soll zudem auf molekularbiologischer Ebene untersucht und mögliche Auswirkungen auf Zellzyklusmarker und Zell-Zell-Kontakte analysiert werden.

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Die verwendeten *Unrestricted Somatic Stem Cells* (USSCs) wurden freundlicherweise vom Institut für Transplantationsmedizin und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Prof. Dr. rer. nat. G. Kögler, Leiterin der José Carreras Stammzellbank Düsseldorf) als anonymisierte Zell-Linien zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden dort aus Nabelschnurblut gewonnen (Kogler et al. 2004) und anschließend zu je ca. 1×10^6 Zellen kryokonserviert.

Ein Ethikvotum unter der Registrierungsnummer 3376 wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Arbeiten und deren Zellen erstellt.

2.2 Versuchsmaterialien und Hilfsmittel

In den nachfolgenden Tabellen sind alle verwendeten Materialien und Geräte aufgelistet.

In Tabelle 2 sind alle Reagenzien für die Zellkultur aufgelistet, in Tabelle 3 die Zusätze, die für die einzelnen Zellkulturversuche benutzt wurden. Tabelle 4 umfasst Chemikalien, die im Laborbetrieb immer wieder benötigt wurden. In Tabelle 5 sind alle Test-Kits aufgeführt, die für die einzelnen Versuche benutzt wurden. Die Tabellen 6 und 7 umfassen die Reagenzien, die zur *complementary DNA* (cDNA)-Synthese sowie zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet wurden. In Tabelle 10 sind schließlich alle Laborgeräte aufgeführt.

2.2.1 Medien, Puffer und Enzyme für die Zellkultur

Tabelle 2: Medien, Puffer und Enzyme für die Zellkultur

Name	Firma	Ort	Land
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 1g/l Glucose und ohne L-Glutamin	Lonza	Verviers	B
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D
Foetales bovines Serum (10%) (FBS) aus Südamerika	PAN Biotech GmbH	Aidenbach	D
L-Glutamin (200mM)	Biochrom AG	Berlin	D
Penicillin/Streptomycin (10.000U/10.000 μ g/ml)	Biochrom AG	Berlin	D
Trypsin (2,5%)	Lonza	Verviers	B

Tabelle 3: Supplemente zum Zellkulturmedium

Supplemente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Versuch
β -Glyzerolphosphat (in PBS angesetzt)	1M	5 mM
β -Glyzerolphosphat (in PBS angesetzt)	1M	10 mM
Dexamethason (in 100% Ethanol angesetzt)	$10^{-4}M$	$10^{-7}M$
Ascorbinsäure (in PBS angesetzt)	50 mM	50 μ M
DAG		50 μ M Ascorbinsäure $1 \times 10^{-7}M$ Dexamethason 10 mM β -Glyzerolphosphat
GTP	5 mM	pur
ATP	5 mM	pur

2.2.2 Verwendete Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Name	Firma	Ort	Land
Dimethyl Sulphoxide Hybri-Max (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Ethanol	Merck KGaA	Darmstadt	D
Formaldehydlösung 4% (gepuffert, pH 6,9)	Merck KGaA	Darmstadt	D
Isopropanol	Merck KGaA	Darmstadt	D
Methanol	Merck KGaA	Darmstadt	D
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D

2.2.3 Test-Kits

Tabelle 5: Test-Kits

Kit	Firma	Ort	Land
CyQUANT [®] Cell Proliferation Assay Kit <ul style="list-style-type: none"> • CyQUANT[®] GR dye • Cell-lysis buffer 	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D
RNeasy [®] Mini Kit <ul style="list-style-type: none"> • RNeasy[®] Mini Spin Columns • Collection Tubes • Buffer RWT • Buffer RPE • RNase-Free Water 	Qiagen	Hilden	D

2.2.4 Materialien für die cDNA-Synthese

Tabelle 6: Materialien für die cDNA-Synthese

Name	Firma	Ort	Land
Oligo (dt) _{12–18} (5000 μ g/ml)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D
Ultra PURE TM Distilled Water DNase / RNase free	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D
SuperSkript TM II Reverse Transkriptase (200U/ μ l)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D
<ul style="list-style-type: none"> • 5x First Strand Buffer • 0,1 M DTT (Dithiothreitol) • SuperSkriptTM II RT 			
10 mM dNTP Mix	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D

2.2.5 Materialien, Primer und Sonden für die Polymerasekettenreaktion

Tabelle 7: Materialien für die PCR

Name	Firma	Ort	Land
96 Well qPCR Natural Plates with flat caps	Eurogentec Deutschland GmbH	Köln	D
Ultra PURE TM Distilled Water DNase / RNase free	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	D
qPCR MasterMix	Eurogentec Deutschland GmbH	Köln	D
Sonden	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim	D
Primer	Eurofins MWG Operon	Ebersberg	D

Tabelle 8: Liste der für die RT-qPCR verwendeten humanen Primer

Primer	Primersequenz
GAPDH	5'-GCT CTC TGC TCC TCC TGT TC-3' 3'-ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC-5'
Vinculin	5'GCA AAT GGT CCA GCA AGG-3' 3'-CCT CTT ACC AGC CGA GAC AT-5'
Notch3	5'-CAA TGC TGT GGA TGA GCT TG-3' 3'-AAG TGG CTT CCA CGT TGT TC-5'
CCNB2	5'-TGG AAA AGT TGG CTC CAA AG-3' 3'-TCA GAA AAA GCT TGG CAG AGA-5'
CyclinE	5'-GCC ATT GAT TCA TTA GAG TTC CA-3' 3'-CTG TCC CAC TCC AAA CCT G-5'

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon. Die jeweiligen Sequenzen sind in Tabelle 8 aufgelistet. Die Auslieferung erfolgte in einem lyophilisierten Zustand, das Produkt wurde mithilfe eines mitgelieferten Synthesereports in DNase/RNase-freiem Wasser gelöst, um eine Konzentration von 100 pmol/ μ l zu erreichen. Diese Stammlösung wurde vor dem Gebrauch abermals verdünnt, um eine Konzentration von 20 nmol/ml zu erzielen. Die dazugehörenden Sonden sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Sonden aus der Universal Probe Library der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (D)

Gen	Sondennummer
GAPDH	60
Vinculin	21
Notch3	26
CCNB2	7
CyclinE	74

2.2.6 Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

Name	Firma	Ort	Land
Autoklav D-65	Systec GmbH	Wettenberg	D
BioPhotometer	Eppendorf AG	Hamburg	D
Brutschrank (CO ₂ -Begasung) Cytoperm 2	Heraeus Holding GmbH	Hanau	D
Heracell 240			
Deckgläser für Mikroskopie 24 x 50 mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH	Edermünde	D
Feinwaage Chyo IL-180	Hartenstein	Würzburg	D
Gefrierschränke	Liebherr	Ochsenhausen	D
	Thermo Fisher Scientific	Waltham (MA)	USA
iCycler [®] Thermal Cycler Base, iQ5 (Real Time PCR Detection System)	Bio-Rad Laboratories GmbH	München	
Küvetten UVetten	Eppendorf AG	Hamburg	D
Kühlschränke	Liebherr	Ochsenhausen	D
Magnetrührstäbe	Thermo Fisher Scientific	Waltham (MA)	USA
Mikroliterpipette (10,20,100,250 und 1000 µl) Research	Eppendorf	Wesseling- Erzdorf	D
Mikroskop DM5000 B	Leica Microsystems	Wetzlar	D
Multiwellzellkulturplatten (12,24,48,96 Well)	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen	D
Neubauerzählkammer, improved	Assistant	Sondheim	D
BioPhotometer	Eppendorf AG	Hamburg	D
Pipetten aus Polysterol (5, 10 und 25 ml)	Corning Incorporated	Corning (NY)	USA
Pipettenspitzen TipOne (0, 1 – 10, 1 – 100, 101 – 1000 µl)	Starlab GmbH	Ahrensburg	D
Pipettierhelfer, Accujet	Brand	Wertheim	D
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH	Hanau	D
Thermomixer comfort	Eppendorf AG	Hamburg	D
Untersuchungshandschuhe	Mai Med	Neuenkirchen	D
Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH	Freiburg i. Br.	D

Weiter auf nächster Seite

Tabelle 10: Fortführung von vorheriger Seite

Name	Firma	Ort	Land
Vinitex Airflow Abzug nach DIN EN 14175	Vinitex Laboreinrichtungen GmbH & CO KG	Coswig	D
Wasserbad	Köttermann Systemlabor	Uetze / Hänigsen	D
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm ²)	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen	D
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus Holding GmbH	Hanau	D
Zentrifugenröhrchen Falcon	Becton Dickinson Labware	Franklin Lakes (NJ)	USA

2.3 Zellkultur USSCs

2.3.1 Kultivieren der Zellen

Die Gewinnung und Aufbereitung der Zellen erfolgte nach dem etablierten Protokoll in der José Carreras Stammzellbank der Universitätsklinik Düsseldorf ([Kogler et al. 2004](#)). Anschließend wurden sie in speziellen Kyro-Röhrchen mit 1×10^6 Zellen im Stickstofftank bei -196°C gelagert. Unmittelbar nach der Entnahme der Zellen aus dem Stickstofftank wurden sie im Wasserbad bei ca. 37°C einige Sekunden angetaut, bis nur noch ein kleiner Eiskristall sichtbar war.

Die Zellen wurden dann in ein 50 ml Falcon Tube überführt, in das bereits 9 ml kaltes Medium vorgelegt war. Die Trennung vom Einfriermedium erfolgte durch Zentrifugation ($470 \times g$, 7 Minuten, 4°C). Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und das verbleibende Zellsediment in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann auf 75 cm² Zellkulturflaschen aufgeteilt und bei 37°C (5% CO₂, 21% O₂, 95% Luftfeuchtigkeit) in den Inkubator zur Kultivierung gestellt.

Das sterile Medium setzte sich wie folgt zusammen:

- 350 ml DMEM
- 5 ml L-Glutamin (200 mM)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml / 10.000 µg/ml)
- 150 ml FCS

Die verwendeten Reagenzien sowie Hersteller und Herkunft sind in Tabelle 2 aufgeführt. Etwa 24 Stunden nach dem Auftauvorgang erfolgte ein Mediumwechsel. Dabei wurde die komplette

Menge Medium vorsichtig aus den Zellkulturflaschen abpipettiert und durch die gleiche Menge frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium ersetzt. Dieser Vorgang diente der Entfernung toter Zellen und der Dimethylsulfoxid-Reste des Einfriermediums (Abschn. 2.3.4). Weitere Mediumwechsel erfolgten alle 3 Tage, um die Zellen mit frischen Nährstoffen zu versorgen.

2.3.2 Passagieren der Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen sollten eine Konfluenz von 80 Prozent nicht überschreiten, um in ihrem undifferenzierten Zustand zu verbleiben. Um das Ausmaß der Konfluenz zu bestimmen, wurden die Zellkulturflaschen unter einem Lichtmikroskop betrachtet. Bei entsprechender Konfluenz wurde das komplette Medium aus der Flasche entfernt und der Flaschenboden mit der gleichen Menge PBS gespült. Dieses wurde dann wieder abgenommen und durch frisches PBS ersetzt, das dann für 7 Minuten bei 37°C inkubiert wurde. Das PBS wurde abermals entfernt und es folgte die Zufuhr von 1:10-verdünntem Trypsin (2,5%). Die Flasche verblieb im Anschluss etwa 8 Minuten im Inkubator. Unter dem Lichtmikroskop ließ sich dann gut beurteilen, ob sich der Zellrasen vom Flaschenboden gelöst hatte. Durch dezentes Klopfen wurden schließlich auch die fester haftenden Zellen abgelöst. Es wurde dann Zellmedium hinzugegeben, um die Aktivität des Trypsins zu stoppen. Um möglichst alle Zellen aus der Flasche zu entfernen, wurde der Flaschenboden mehrfach mit dem Trypsin-Medium-Gemisch abgespült, das im Anschluss in ein 50 ml Falcon überführt wurde. Die Trennung von Zellen und Gemisch erfolgte mittels Zentrifugation ($470 \times g$, 7 Minuten, 4°C). Je nach vorausgegangener Konfluenz wurden die Zellen zunächst in frisches Medium aufgenommen und in einem Verhältnis von 1:3 oder 1:4 auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt und inkubiert.

2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen wurde jeweils während des Passagiervorgangs (Abschn. 2.3.2) mithilfe einer Trypan-Blau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei war besonders darauf zu achten, dass beim Aufbringen des Deckglases die „Newtonschen Ringe“ sichtbar wurden. Dieses Interferenzphänomen zeigt an, dass das korrekte Volumen in der Kammer eingestellt ist. Es wurden 20 µl Zellsuspension zusammen mit 20 µl Trypan-Blau in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben und gut durch Pipettieren gemischt. Die Kapillarkräfte zwischen der Zählkammer und dem Deckglas führen dazu, dass die Kammer beim vorsichtigen Ansetzen der Pipettenspitze an den Rand der Messkammer gefüllt wird. Anschließend wurden unter dem Lichtmikroskop vier Großquadrate mäanderförmig ausgezählt, wobei nur die blaugefärbten Zellen berücksichtigt wurden. Diese Methode minimiert die Gefahr, randständige Zellen doppelt zu zählen. Außerdem wurden Zellen, die auf einer Trennlinie zwischen zwei kleinen Quadraten liegen, nach dem „L-Prinzip“ immer gleichermaßen behandelt und einem bestimmten Quadrat zugeordnet.

Die Gesamtzellzahl N_{tot} wurde dann mit folgender Formel berechnet:

$$N_{\text{tot}} = n_{\text{tot}} V_{\text{tot}} = f_m \frac{\sum_i N_i}{4V_z} V_{\text{tot}}. \quad (1)$$

Dabei ist n_{tot} die Zelldichte pro Milliliter und V_{tot} das Gesamtvolumen, das zur Messung herangezogen wurde. Werden zunächst alle vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt, so resultiert $\sum_i N_i$. Mittels Division durch 4, wird der Mittelwert kalkuliert. Durch anschließende Division durch das Volumen der Zählkammer V_z , wird die Zelldichte ermittelt. Da die Verdünnung der Zellsuspension mit dem Färbereagenz nicht vernachlässigt werden darf, wird mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor f_m (hier = 2) multipliziert. Durch weitere Multiplikation mit dem Gesamtvolumen der Probe V_{tot} resultiert die Gesamtzahl N_{tot} der lebenden Zellen.

2.3.4 Kryokonservierung der Zellen

Die USSC können über einen längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196°C gelagert werden. Über einen kürzeren Zeitraum von einigen Tagen ist auch eine Lagerung im Gefrierschrank bei -80°C möglich. Die Zellen können nicht in normalem Kulturmedium eingefroren werden, da die Zellmembranen durch die entstehenden Eiskristalle zerstört würden. Es wurde deshalb ein spezielles Einfriermedium mit Dimethylsulfoxid (**DMSO**) hergestellt, das die Bildung von Eiskristallen minimiert. Das Einfriermedium besteht zu 80 Prozent aus Kulturmedium, zu 10 Prozent aus **DMSO** und zu 10 Prozent aus **FCS**. Da das **DMSO** bei Raumtemperatur für die Zellen toxisch ist, wurde es erst unmittelbar vor dem Einfrieren mit der Zellsuspension in Kontakt gebracht. Es wurden $100\mu\text{l}$ **DMSO** im Einfrierröhrchen vorgelegt und $900\mu\text{l}$ der Zellsuspension darauf pipettiert.

Das Absinken der Temperatur beim Einfrieren durfte nicht zu schnell erfolgen, da das **DMSO** in die Zellen diffundieren muss. Dort verdrängt es das vorhandene Wasser und kann somit seiner Schutzfunktion nachkommen und die Bildung von Eiskristallen verhindern ([Schrödel 2009](#)). Als Faustregel hatte sich eine Einfriertrate von -1°C pro Minute ergeben. Um dies zu ermöglichen, wurden spezielle Einfrierboxen verwendet (Mr. Frosty Freezing Container, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

2.3.5 Dotieren der Multi-Well-Platten mit Zellen für die Bestimmung der Verdopplungszeit

Zum Vergleich der Verdopplungszeiten verschiedener Zelllinien wurden je vier Wells einer 24-Well-Platte mit je 19.000 Zellen in einem Arbeitsvolumen von 1,5 ml (entsprechend 10.000 Zellen pro cm^2) besiedelt. Die Zellzahlen sollten in einem Zeitraum von fünf Tagen bestimmt werden, entsprechend wurde für jeden Messtag eine Platte vorbereitet. Die Zellen wurden nach dem Auftauen (Abschn. [2.3.1](#)) in entsprechenden 75 cm^3 -Zellkulturflaschen vorkultiviert und beim Passagiervorgang (Abschn. [2.3.2](#)) gezählt (Abschn. [2.3.3](#)). Im Anschluss wurden sie auf

die Multiwellplatten verteilt, die übrigen Zellen wurden auf frische Zellkulturflaschen aufgeteilt und erreichten die nächst höhere Passage. Am jeweiligen Messtag wurde das Zellkulturmedium ganz vorsichtig am Rand eines jeden Wells abpipettiert, die Kammer mit PBS gespült und auch dieses wiederum vorsichtig abgenommen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Pipettenspitze immer möglichst an der gleichen Stelle angesetzt wird und beim Absaugen und Spülen langsam vorgegangen wurde, um ein Ablösen der Zellen vom Boden zu vermeiden. Nur Wells mit intaktem Zellrasen nach dem Spülen wurden mit einem Permanent-Marker auf dem Plattendeckel markiert und die Platten bis zur analytischen Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren.

2.3.6 Bestimmung der Verdopplungszeiten der einzelnen Zelllinien

Das Wachstumsverhalten der USSCs folgt bei optimalen Bedingungen einer exponentiellen Kurve. Die jeweiligen Verdopplungszeiten wurden anhand der ermittelten Werte der einzelnen Zellpassagen bestimmt. Die Zellzahl $Z(t)$ zum Zeitpunkt t wurde dann durch

$$Z(t) = Z_0 \cdot \exp \left[\ln 2 \cdot \frac{t}{t_2} \right] \quad (2)$$

kalkuliert. Hierbei ist Z_0 die Anzahl der Zellen zum Ausgangszeitpunkt und t_2 die Verdopplungszeit. Dieses Wachstumsgesetz wurde dann mittels der Methode kleinster Quadrate an die Messreihen angepasst. Dabei sind die Zellzahl zum Ausgangszeitpunkt Z_0 und die Verdopplungszeit t_2 freie Parameter.

2.3.7 Dotieren der Multi-Well-Platten mit Zellen zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens bei Zugabe verschiedener Phosphat-Supplemente

Für diesen Versuchsabschnitt wurden Zellen der Zelllinie USSC 18 in Basismedium und 75 cm^3 -Zellkulturflaschen bis in Passage 10 vordifferenziert und anschließend auf Multiwellplatten verteilt. 20 Wells einer 24-Well-Multiwellplatte wurden an Tag 0 mit 12.000 Zellen in einem Volumen von 1,5 ml Basismedium pro Well besät. An Tag 1 wurde dann das Basismedium vorsichtig abgesaugt und durch frisches, supplementiertes Medium ersetzt. In der Abbildung 3 ist die Anordnung der supplementierten Medien auf den einzelnen Multiwellplatten schematisch dargestellt. Das Medium wurde so angesetzt, dass letztendlich je 25 ml 5 mM β -Glyzerolphosphat-, 10 mM β -Glyzerolphosphat-, 5 mM ATP- und 5 mM GTP-supplementiertes Medium vorhanden waren. Diese Ansätze wurden erst unmittelbar vor Verwendung fertig gestellt (s. Tabelle 3).

Je vier Wells einer Platte wurden mit 1 ml frischem Medium versetzt, außerdem wurden weitere vier Wells als Referenz mit Basismedium weiter kultiviert. Auf diese Art und Weise wurden insgesamt sechs Multiwellplatten präpariert.

Einen Tag später (Tag 1) wurden die ersten drei Platten geerntet. Das Medium wurde abermals vorsichtig abgesaugt, die Wells mit 1 ml PBS gespült und anschließend bei -80°C eingefroren.

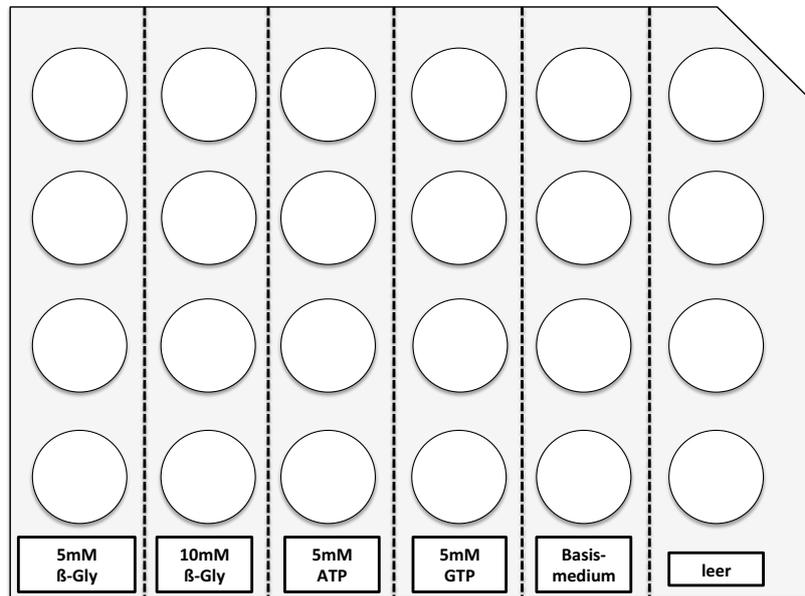


Abb. 3: Anordnung der supplementierten Medien auf den Multiwellplatten

Wichtig dabei war, dass auf den Deckeln der Wells nochmals markiert wurde, welches Supplement enthalten war. Beim Spülvorgang war darauf zu achten, dass die Flüssigkeiten nur ganz vorsichtig am Rand eingetröpft wurden, um ein Ablösen und damit verbundenes Absaugen von Zellen zu vermeiden.

Weitere zwei Tage später (Tag 3) wurden die restlichen drei Platten auf gleiche Art und Weise geerntet.

Für einen weiteren Versuch zur Analyse des Wachstumsverhaltens der USSCs wurden Zellen abermals auf 24-Well-Multiwellplatten ausgesät. Die Voraussetzungen wurden gleich gewählt, 12.000 Zellen pro Well, entsprechend 10.000 Zellen pro cm^2 wurden in einem Arbeitsvolumen von 1,5 ml an Tag 0 auf die Platten gebracht. Nach 24 Stunden (Tag 1) wurde das Medium gewechselt und die Zellen erhielten das Phosphat-supplementierte Medium oder Medium, dem Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glyzerolphosphat (DAG) zugefügt wurde. Eine Kontrollgruppe mit Basismedium wurde parallel weiter kultiviert. Abermals 24 Stunden später (Tag 2) wurde das Medium wieder abgesaugt und durch Basismedium ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 8 Tage (Tag 10) kultiviert, dann wurde das Medium abgenommen, die Platten gespült und zur weiteren Auswertung ebenfalls bei -80°C eingefroren.

2.3.8 Zellproliferationsassay

Die Zellproliferation wurde mithilfe des CyQUANT® Cell Proliferation Assays Kit (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt. Die Methode basiert darauf, dass der fluoreszierende Farbstoff (CyQUANT GR dye) unspezifisch an Nukleinsäuren bindet. Nach Lyse der Zellen und Einwirken des Farbstoffes kann eine Zellzahlbestimmung im Vergleich zu einem Zellstandard erfolgen, da der Nukleinsäure-Farbstoff-Komplex nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 485 nm Licht der Wellenlänge 535 nm emittiert. Mit einem Fluorometer kann die Lichtemission quantifiziert werden. Dieser Wert wird dann in Relation zum Zellstandard gesetzt und somit die Zellzahl zwischen 10 und 50.000 gemessen (Jones et al. 2001). Um eine entsprechende Messung mit dem Kit durchzuführen, wurde zunächst das Reagenz angesetzt. Dazu wurde die *Cell Lysis Buffer Stock Solution* 20-fach mit *Aqua dest.* verdünnt, mit der eine 400-fache Verdünnung der *CyQUANT GR Working Solution* hergestellt wurde. Um den Zellstandard zu erstellen, wurden 500.000 Zellen gezählt (Abschn. 2.3.3), pelletiert und für mindestens 30 Minuten bei -70°C eingefroren (Lu et al. 2009). Nach dem Auftauen wurde das Pellet in 1.000 µl Reagenz resuspendiert und 5-10 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden jeweils im 3-fachen Ansatz 0 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl, 60 µl und 80 µl der Zellsuspension auf eine 96-Well-Platte pipettiert, entsprechend einer Zellzahl von 0 bis 40.000, und dann jeweils auf 200 µl Gesamtvolumen pro Well mit dem Reagenz aufgefüllt. Die Platte wurde erneut abgedeckt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 485 nm durch Detektion der Emission bei einer Wellenlänge von 535 nm. Aus der gemessenen Fluoreszenz und den bekannten Zellmengen wurde eine lineare Kalibrier-Funktion ermittelt.

Die Zellkulturen in den 24-Well-Platten wurden vom Medium befreit und vorsichtig mit PBS gewaschen. Danach mussten auch sie für mindestens 30 Minuten bei -70°C eingefroren werden. Nach dem Auftauen wurden 500 µl Reagenz in jedes zu analysierende Well pipettiert und für 5 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert. Im Anschluss wurden je 200 µl in doppeltem Ansatz auf die 96-Well-Platte pipettiert. Es folgte abermals eine Messung im Fluorometer. Mithilfe der ermittelten linearen Kalibrier-Funktion wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte in Zellzahlen umgerechnet. Um die Messwerte unterschiedlicher Platten ohne die Umrechnung in Zellzahlen miteinander vergleichen zu können, wurden diese mithilfe der zugehörigen Eichgeraden normiert. Damit konnten die Messwerte dann mit einem Normierungsfaktor versehen werden. Die Werte müssen innerhalb der gemessenen Eichgerade liegen, da Extrapolationen wegen der Nichtlinearität von Fluoreszenzsignalen nicht zulässig sind.

2.4 Real-Time Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

2.4.1 Allgemeine Grundlagen der qRT-PCR

Die **PCR** ist eine Methode zur Vervielfältigung bestimmter Abschnitte der Desoxyribonukleinsäure (**DNS**; *Deoxyribonucleic Acid*, **DNA**), sie wurde 1983 von Kary Banks Mullis entwickelt. Mithilfe von Nukleotiden und speziellen thermostabilen **DNA**-Polymerasen, können diese Abschnitte exponentiell in mehreren Zyklen vermehrt werden.

Bei der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (**RT-PCR**) werden hingegen Abschnitte der Boten-Ribonukleinsäure (**mRNS**; *messenger Ribonucleid Acid*, **mRNA**) vervielfältigt, nachdem sie durch das Enzym **RNA**-abhängige **DNA**-Polymerase in **cDNA** umgeschrieben wurden. Mit dieser Methode gelingt also ein Nachweis über die Auswirkungen verschiedener Behandlungen auf das Expressionsmuster der Zellen. Die aus dem Probenmaterial extrahierte **RNA** kann entweder in einem separaten Schritt in **cDNA** umgeschrieben werden, alternativ kann dieser Prozess auch im selben Reaktionsgefäß der **PCR** vorangestellt werden.

Die quantitative oder real-time PCR wiederum ist eine Methodik, die eine Mengenbestimmung der enthaltenen **DNA** ermöglicht. Dabei werden Fluoreszenzfarbstoffe angewendet, deren Freisetzung aus Sonden mit zunehmendem Reaktionsprodukt ansteigt. Bei den verwendeten Sonden handelt es sich um für die Ziel-**DNA** sequenzspezifische Oligonukleotide, an die der Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wird. An einem Ende ist ein Donor-Fluorochrom (FAM) angehängt, an dem anderen Ende ein sogenannter *Quencher*. Während der Synthese des Gegenstrangs bindet eine Polymerase an die Oligonukleotid-Sonde und baut sie am 5'-Ende ab. Das Signal des Reporterfarbstoffes wird durch den Verlust des *Quenchers* detektierbar und kann am Ende des Elongationsvorgangs in jedem Zyklus gemessen werden (Huggett et al. 2005; Nolan et al. 2006). Das genspezifische Sondenverfahren zeichnet sich im Gegensatz zu anderen Methoden der quantitativen **RT-PCR** durch eine hohe Spezifität aus. Andere Farbstoffe sind beispielsweise nicht sequenzgekoppelt und binden unspezifisch an doppelsträngige **DNA**.

2.4.2 RNA-Isolierung

Die **RNA**-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen (Hilden) sowie mit dem easy-spinTM (DNA free) Total RNA Extraction Kit der Firma iNtRON Biotechnology (Korea). Das Säulensystem von Qiagen basiert auf dem Grundprinzip, dass nach Zugabe von Ethanol zum Zellysats die **RNA** selektiv an die Silica-Gel-Membran bindet, wohingegen Verunreinigungen, **DNA** und andere unerwünschte Bestandteile in mehreren Waschstritten entfernt werden können. Die gebundene **RNA** wird schließlich mittels RNase-freiem Wasser eluiert. Im Einzelnen sehen die Arbeitsschritte wie folgt aus:

1. Der Lysepuffer RLT wird pro benötigtem Marker mit 10 µl β-Mercaptoethanol versetzt.
2. Zu jeder zuvor schonend auf Eis aufgetauten Probe werden 350 µl mercaptoethanolhal-

tiger Lysepuffer pipettiert und das Gemisch wird für eine Minute gevortext, um es zu homogenisieren.

3. Nun kommen je 350 μl 70%-Ethanol dazu und das Lysat wird gut durchpipettiert.
4. Es folgt das Auftragen des Probenmaterials auf die mitgelieferte Säule. Die Probe wird dann für 15 Sekunden bei $8000 \times g$ zentrifugiert, der Durchlauf wird verworfen.
5. Es werden dann 700 μl Waschpuffer RW1 zugeführt und die Probe wird für 15 Sekunden bei $8000 \times g$ zentrifugiert.
6. Auch der nun verwendete Waschpuffer RPE wurde vorab vorbereitet, indem 44 ml 100%-Ethanol zur Stammlösung beigefügt wurden. Nach Austausch des Durchlauftubes werden dann 500 μl des RPE-Puffers aufgetragen und erneut für 15 Sekunden bei $8000 \times g$ zentrifugiert.
7. Schritt 6 wird einmal wiederholt.
8. Nach einem weiteren Wechsel des Durchlauftubes erfolgt ein Trocknungsschritt, indem die Probe für 1 Minute bei $14000 \times g$ zentrifugiert wird.
9. Die Säule wird in ein neues 1,5 ml-Tube gestellt und 40 μl DNA/RNA-freies Wasser werden auf die Säule gegeben. Ein abermaliges Zentrifugieren für 1 Minute bei $8000 \times g$ ist nötig.
10. Das so gewonnene Eluat wird in ein 2 ml-Tube überführt, es enthält Gesamt-RNA, deren Konzentration noch bestimmt werden muss (s. Kapitel 2.4.3).

Demgegenüber basiert das Kit der Firma iNtRON Biotechnology auf dem Prinzip der Chloroformextraktion. Die Methode beruht auf der Phasentrennung von chloroformhaltiger und wässriger Phase. Proteine sammeln sich in der organischen Phase, die RNA befindet sich in der oberen, wässrigen Phase und die DNA sammelt sich im Grenzbereich zwischen den beiden Schichten. Die Arbeitsschritte für diese Methode gliedern sich folgendermaßen auf:

1. Jede ebenfalls schonend auf Eis aufgetaute Probe wird mit 1 ml Lysepuffer (easy-BLUE ReagenzTM) versehen.
2. Die Probe wird nun für mindestens 10 Sekunden gevortext bzw. so lange, bis sich das Pellet komplett aufgelöst hat.
3. Es werden nun 200 μl Chloroform zugegeben und abermals gevortext.
4. Die Probe wird anschließend für 10 Minuten bei $13000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Dabei entstehen zwei Phasen im Tube. Eine obere, wässrige Phase, die die RNA enthält sowie

eine untere, bläuliche Phase, die neben Phenol denaturierte Proteine sowie andere Zellabfälle enthält. Darüber hinaus wird eine weißliche Interphase sichtbar, die eine Mischung aus Proteinen und DNA enthält.

5. Es werden 400 µl der wässrigen Phase abgenommen und in ein sauberes 1,5 ml Tube überführt. Dabei ist sorgsam darauf zu achten, keine Bestandteile der Interphase oder aber der unteren Phase aufzunehmen.
6. Nun fügt man 400 µl des Bindepuffers hinzu, pipettiert das Gemisch gut durch und lässt es für eine Minute bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Die obere Phase wird nun auf die Säule gegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass das Maximalvolumen für die Säule bei 800 µl liegt und nicht überschritten werden darf. Die Probe wird für 30 Sekunden bei $13000 \times g$ zentrifugiert.
8. Der Durchlauf wird verworfen und dieser Schritt so oft wiederholt, bis die komplette wässrige Phase die Säule durchlaufen hat.
9. Mithilfe des Waschpuffers A folgt dann der erste Waschschrift. Es werden 700 µl des Puffers auf die Säule pipettiert und für 30 Sekunden bei $13000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule zurück in das gleiche 2 ml Tube gestellt.
10. Der Waschpuffer B wird zu Beginn mit 40 ml 100%-Ethanol verdünnt. 700 µl werden auf die Säule gegeben und die Probe wird erneut für 30 Sekunden bei $13000 \times g$ zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen und die Säule zurück in das gleiche Tube gestellt.
11. Nun folgt ein Trocknungsschritt, indem das Tube für 1-2 Minuten bei $13000 \times g$ zentrifugiert wird.
12. Die Säule wird schließlich in ein sauberes 1,5 ml Tube gegeben und es werden 50 µl des Elutionspuffers auf die Säule pipettiert. Diese wird für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und zuletzt für 1 Minute bei $13000 \times g$ zentrifugiert, um die RNA zu eluieren.

2.4.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA basiert auf dem Lambert-Beer-Gesetz. Im Photometer kann die Konzentration eines gelösten Stoffes aufgrund der Absorption von Licht bei einer bestimmten Wellenlänge (λ) bestimmt werden. Dies ist möglich, da es für verschiedene Stoffe verschiedene Absorptionsmaxima gibt. Dieses Absorptionsmaximum liegt für RNA bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Es gilt

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d. \quad (3)$$

In der Formel ist E die Extinktion, I_0 die Intensität vor Durchtritt durch die Küvette, I die Intensität nach Durchtritt durch die Küvette, ϵ der Extinktionskoeffizient, c die Konzentration der Probe und d die Dicke der Küvette.

Der mittlere molare Extinktionskoeffizient von RNA liegt bei 11.100 (Greene and Rao 1998).

2.4.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit der SuperScriptTM II RT der Firma Invitrogen. Dabei wurden 3 μg Total-RNA mit 1 μl Oligo (dt)₁₂₋₁₈ (5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und 1 μl dNTP Mix versetzt, anschließend mit DNase/RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 μl aufgefüllt und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Tube direkt auf Eis gestellt, zudem wurde das Röhrchen kurz zentrifugiert, um den Gefäßinhalt zu sammeln.

Dann wurden 4 μl 5x Strand Buffer, 2 μl 0.1M DTT (Dithiothreitol) und 1 μl RNase OutTM zugefügt und das Gemisch für 2 Minuten bei einer Temperatur von 42°C inkubiert. Mit der Zugabe von 1 μl der SuperScriptTM II RT und der Inkubation bei 42°C für 50 Minuten begann der Prozess der Umschreibung. Schließlich wurde der Ansatz für 15 Minuten auf einer Temperatur von 70°C gehalten, um das Enzym zu inaktivieren. Das Tube wurde umgehend bei -20°C eingefroren.

Die so gewonnene cDNA konnte nun als Matrize für die PCR dienen.

2.4.5 Durchführung der qRT-PCR

Die cDNA wurde auf das Vorhandensein folgender Gene hin untersucht: Cyclin B, Cyclin E, Notch3 und Vinculin. Die dafür ausgewählten Primersequenzen stammen aus der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) und sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma MWG Biotech AG Ebersberg. Die entsprechenden Sonden wurden aus der Universal ProbeLibrary (Fa. Roche) ausgewählt und sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Für die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) wurde vorab ein Mastermix angesetzt. Pro Reaktionsansatz wurden 6,4 μl DNase/RNase freies Wasser, 0,3 μl Primer „forward“, 0,3 μl Primer „reverse“, 0,5 μl Sonde und 12,5 μl Master Mix (Fa. Eurogentec) benötigt. Die für alle Reaktionsansätze benötigten Mengen inklusive eines Überschusses von etwa 5-10 Prozent wurden in ein großes Eppendorf Cup pipettiert. Danach wurden davon je 20 μl in jedes Well einer 96 Well-Platte pipettiert. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 5 μl cDNA (1:10 in DNase/RNase freiem Wasser gelöst). Anschließend wurde die Platte mit 8er Stripes dicht verschlossen.

Die RT-qPCR erfolgte in dem iCycler[®] Thermal Cycler Base, iQ5 (Tabelle 10) und durchlief ein spezifisches Temperatur-Zeit-Profil, das in Tabelle 11 aufgeführt ist.

Die Auswertung der Ergebnisse der RT-qPCR erfolgte mithilfe der relativen Quantifizierung nach Pfaffl (Pfaffl 2001). Pfaffls Methode führt dazu, dass Fehler innerhalb einer Probe so-

Tabelle 11: Temperatur-Zeit-Profil für die quantitative Real-Time PCR im iCycler[®]

Zyklen Nr.	Anzahl d. Zyklen	Steps innerhalb d. Zyklen	Temperatur	Dauer
1	1	Step 1:	50°C	10 min
2	1	Step 1:	95°C	10 min
3	35	Step 1:	95°C	10 sec
		Step 2:	60°C	45 sec
4	1	Step 1:	4°C	HOLD

wohl auf das Zielgen als auch auf das Referenzgen bezogen werden und damit die Varianz der Expressionsergebnisse reduziert wird. Die Expression des Referenzgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) wird in der Literatur als konstant beschrieben (Thellin et al. 1999). Zunächst wurden sowohl für das Zielgen als auch für das Referenzgen die jeweiligen *Crossing-Point*-Werte (C_P -Werte) ermittelt.

Es handelt sich dabei jeweils um den Zyklus während einer PCR, in dem das gewünschte Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal signifikant überschreitet und damit vom iCycler[®] detektiert wird.

Zur Bestimmung des ΔC_P Wertes wurde dann der *Crossing Point* (C_P)-Wert des Zielgens auf den C_P -Wert des Referenzgens (in der vorliegenden Untersuchung *GAPDH*) bezogen:

$$\Delta C_P = C_P(\text{Zielgen}) - C_P(\text{Referenzgen}). \quad (4)$$

Um nun die relative Expression des Zielgens in den behandelten Proben zu bestimmen, wurde es auf eine Kontrollprobe bezogen. Die Proben, die mit Standard-Zellkulturmedium ohne Zusatz von Phosphat kultiviert wurden, dienten als Kontrollgruppe, so dass

$$\Delta\Delta C_P = \Delta C_P(\text{Behandlung}) - \Delta C_P(\text{Kontrolle}). \quad (5)$$

Der relative Expressionsunterschied R einer Probe zwischen Behandlung und Kontrolle errechnete sich dann aus der Formel:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_P}. \quad (6)$$

2.5 Mineralisationsnachweis

Im Verlauf der Differenzierung und Maturation der Zellen bildet sich Hydroxylapatit. Der Nachweis wurde in der vorliegenden Untersuchung mithilfe des OsteoImage[™] Mineralization Assays der Firma Lonza (Walkersville, USA) erbracht. Für diesen Versuchsabschnitt wurden die USSCs auf 24-Well-Platten kultiviert. Sie wurden dazu analog zu den vorher beschriebenen Abläufen in Normalmedium (s. Kapitel 2.3) mit einer Dichte von 1.000 Zellen pro cm^2 ausgesät. Am Fol-

getag wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und durch supplementiertes Medium ersetzt. Die verschiedenen Supplemente sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Das phosphathaltige Medium wurde nach 24 Stunden wieder durch Normalmedium ersetzt, die Zellen wurden für weitere 8 Tage kultiviert. Während dieser Zeit wurde das Normalmedium noch einmal frisch hinzugegeben, um den Zellen neue Nährstoffe zu liefern und gleichzeitig Zellabfälle von den Platten zu eliminieren. Die Messung für den Mineralisationsnachweis erfolgte dann an Tag 10.

Das Kit enthält ein Färbereagenz sowie dessen Lösungsmittel und einen Waschpuffer. Die benötigten Mengen sind von der Ausdehnung der Zellrasen abhängig, da die gesamte Oberfläche der verwendeten Kulturen benetzt werden muss. Zunächst wurden die Reagenzien für den Gebrauch vorbereitet. Es erfolgten insgesamt 5 Waschschritte, pro Waschschritt wurden pro Well 1 ml 1:10-verdünnter Waschpuffer benötigt. Der Waschpuffer wurde zunächst mit destilliertem Wasser verdünnt. Das Färbereagenz hingegen wurde 1:100 mit dem zugehörigen Puffer angesetzt, hier sollten nur die benötigte Menge (0,5 ml) pro Well sowie ein kleiner Pipettierüberschuss bereit gestellt und die Chemikalie dann vor Licht geschützt gelagert werden. Die einzelnen Arbeitsschritte gliederten sich dann folgendermaßen:

1. Die Multiwellplatten werden aus dem Inkubator entnommen und kühlen auf Raumtemperatur ab.
2. Das Zellkulturmedium wird abgenommen und die Wells einmalig mit PBS gewaschen.
3. Mithilfe von eiskaltem Ethanol werden die Zellen für 5 Minuten fixiert.
4. Die Zellen werden anschließend mit je 1 ml des verdünnten Waschpuffers gespült.
5. Nun wird das angesetzte Färbereagenz auf die Wells gegeben und für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert.
6. Das Färbereagenz wird wieder abgenommen und es folgen 3 Waschschritte. Der Waschpuffer soll pro Waschvorgang 5 Minuten im Well verbleiben.
7. Es wird nun abermals Waschpuffer zugefügt und die Platten werden im Fluorometer bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 535 nm ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte, indem die vom Reader ermittelten Werte in einen relativen Bezug gebracht wurden. Absolute Vergleiche waren im vorliegenden Versuchsaufbau nicht möglich, da sich auch die Zellen, die von vorn herein mit Normalmedium versorgt wurden, verändern. Als Positivkontrolle dienten mit DAG substituierte Kulturen, deren Mineralisation in der Literatur bereits detailliert beschrieben wurde.

2.6 Bestimmung der Ratio aus Proliferation und Mineralisation

Zur Bestimmung der Verhältnisse zwischen Mineralisation und Proliferation innerhalb der einzelnen Proben, wurden zunächst die Mediane der einzelnen Teilversuche bestimmt. Als erstes wurden die Mediane der Fluoreszenzen aus den CyQUANT[®]-Versuchen für die Proliferation berechnet. In einem zweiten Schritt erfolgte die Bestimmung der Mediane der Fluoreszenzen aus den OsteoImage[™]-Versuchen für die Mineralisation.

Für beide Versuchsreihen wurde dann die Behandlung, die ausschließlich mit Basismedium erfolgte, als Referenz gesetzt. Anschließend wurden innerhalb des CyQUANT[®]-Versuches die prozentualen Abweichungen der anderen Proben von der Kontrolle bestimmt. Analog wurden auch die Abweichungen in der Versuchsreihe der Mineralisation (OsteoImage[™]) ermittelt.

Schlussendlich wurde aus den errechneten Abweichungen je Probe der Quotient zwischen Mineralisation und Proliferation gebildet (*Ratio*).

2.7 Statistische Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurden in verschiedenen Abschnitten die Zellzahlen ermittelt und verglichen. Zur Beurteilung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen zwei Messwerten wurden die mittleren Zellzahlen N_1 und N_2 samt ihrer Standardabweichungen ΔN_1 und ΔN_2 betrachtet. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen der Zellzahlen wurde dann die Wahrscheinlichkeit P berechnet, mit der eine der beiden Zellzahlen größer ist als die andere. Falls diese Wahrscheinlichkeit ein Signifikanzniveau von 95% überschritt, wurde die Nullhypothese, derer nach beide Zellzahlen gleich waren, verworfen. Stattdessen wurde angenommen, dass sich die beiden Zellzahlen statistisch signifikant unterscheiden. In der Arbeit wurden diese Wahrscheinlichkeiten und die entsprechenden p-Werte, $p = 1 - P$, angegeben.

Die Wahrscheinlichkeit P , mit der eine der beiden Zellzahlen größer ist als die andere, wurde mittels

$$P = \frac{1}{2} \operatorname{erfc} \left(\frac{d}{2\Delta d} \right) \quad (7)$$

berechnet. Hier bezeichnet $d = N_1 - N_2$ die Differenz der beiden Zellzahlen und $\Delta d = \sqrt{\Delta N_1^2 + \Delta N_2^2}$ die 1σ Unsicherheit der Differenz d , die mittels Gauß'scher Fehlerfortpflanzung aus den Standardabweichungen der Zellzahlen bestimmt wurde.

Die Funktion $\operatorname{erfc}(x)$ ist die komplementäre Fehlerfunktion, die beispielsweise in allen üblichen Computeralgebra Programmen verfügbar ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Implementierung der komplementären Fehlerfunktion aus dem Perl Modul Cephes (Version 0.5305) verwendet. Die Daten wurden tabellarisch mit Microsoft Excel 2011 zusammen gestellt. Die graphische Aufbereitung erfolgte mit der Software Gnuplot (Version 5.0).

Ergebnisse

3.1 Verdopplungszeiten der einzelnen Zelllinien

Zur Bestimmung der Verdopplungszeit wurde die Proliferation von je drei Passagen der Zelllinien USSC 18, USSC 8/77, USSC 5/73 und USSC 8 über fünf Tage analysiert. Die einzelnen Zellkulturen wurden zunächst bis Passage 8 in Normalmedium vorkultiviert. Ab Passage 8 wurden sie dann weiter kultiviert und gleichzeitig für die Analyse der Verdopplungszeit in Kultur genommen.

Für jeden Messtag wurde der Versuch in vierfachem Ansatz durchgeführt, Mittelwert und Standardabweichung wurden bestimmt.

Abbildung 4 zeigt sowohl die gemittelten Zellzahlen sowie deren Standardabweichungen pro Messtag, Passage und Zelllinie als auch die jeweilige Verdopplungszeit und den 1σ -Fehler des Fits (s. Abschnitt 2.3.6).

Die Panel (a)-(c) der Abbildung 4 beziehen sich auf das Wachstumsverhalten der USSC 18, die Panel (d)-(f) auf die USSC 8/77, (g)-(i) auf die USSC 5/73 und die Panel (j)-(l) auf die USSC 8. Während die Verdopplungszeiten der Zelllinien USSC 18, USSC 8/77 und USSC 5/73 in ähnlichen Dimensionen liegen, lief die Proliferation bei den USSC 8 deutlich langsamer ab. Darüber hinaus zeigen sich Unterschiede in der Entwicklung der Gesamtzellzahlen nach 5 Versuchstagen. Die USSC 18 und USSC 8/77 vermehrten sich ähnlich, die USSC 5/73 proliferierten in diesem Zeitraum deutlich stärker und die USSC 8 insgesamt deutlich weniger. Von Passage 8 nach 10 aufsteigend lässt sich kein eindeutiger Trend bezüglich der Proliferationsbereitschaft der einzelnen Zelllinien ableiten. An Tag 0 wurden jeweils 19.000 Zellen pro Well ausgesät, an Tag 1 zeigen sich Unterschiede sowohl zwischen den verschiedenen Zelllinien als auch zwischen den einzelnen Passagen ein und derselben Zelllinie. So liegt die Zahl der gemessenen Zellen an Tag 1 in der Passage 9 der USSC 18, allen Passagen der USSC 8/77, der Passage 9 der Linie USSC 5/73 und der Passage 10 der USSC 8 unterhalb der an Tag 0 ausgesäten Zellen.

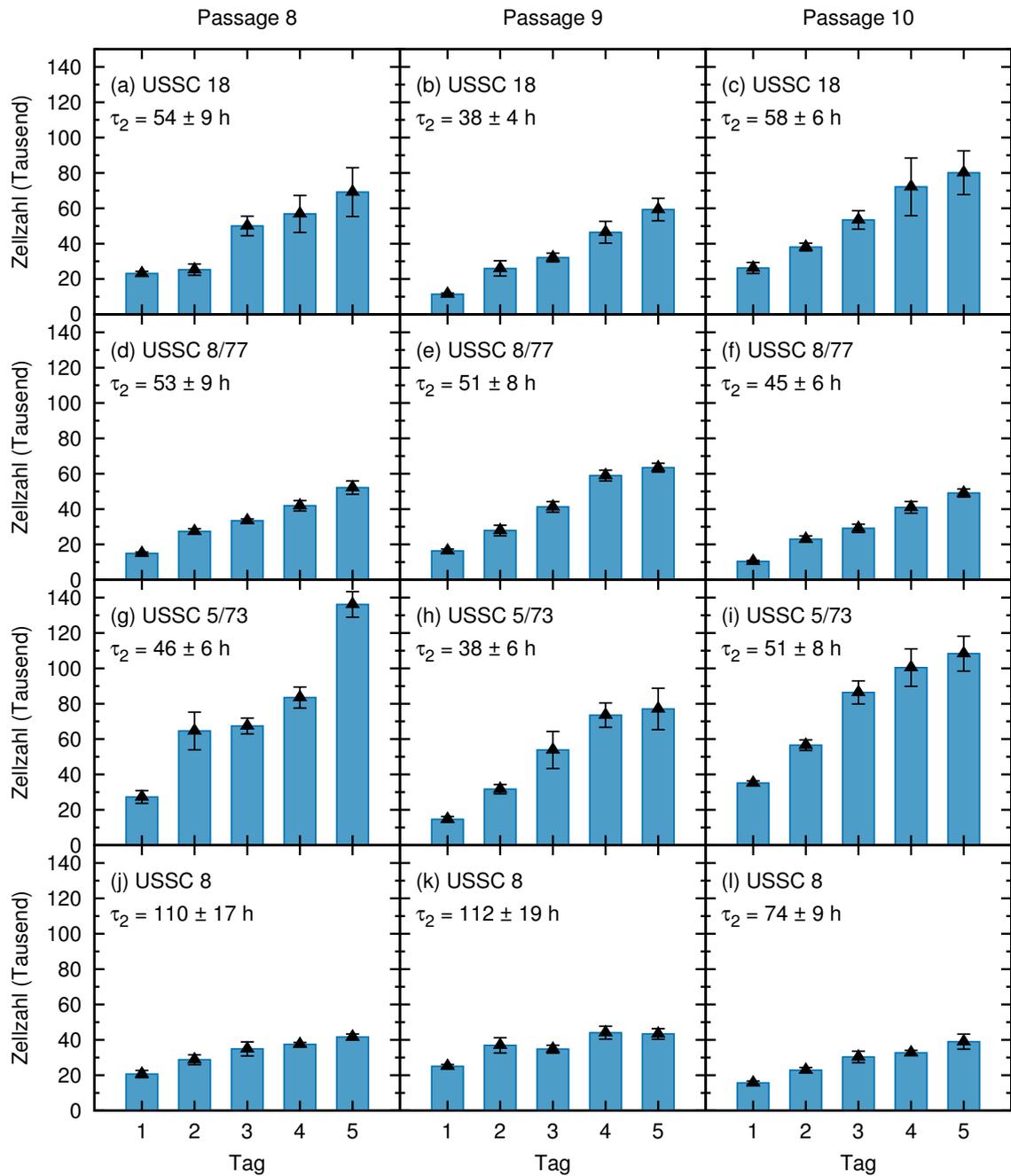


Abb. 4: Verdopplungszeiten der verschiedenen Zelllinien

Tabelle 12: Anzahl der Zellen mit Standardabweichungen der Linien USSC 18, USSC 5/77, USSC 5/73 und USSC 8 an den Tagen 1-5 im Überblick.

Zelllinie	Passage	Zellen (Tausend)				
		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
USSC 18	8	23,1 ± 1,2	25,2 ± 3,2	50,0 ± 5,5	56,8 ± 10,5	69,1 ± 13,8
	9	11,4 ± 0,6	26,0 ± 4,3	32,1 ± 2,5	46,4 ± 6,2	59,3 ± 6,4
	10	26,2 ± 3,1	38,1 ± 2,2	53,4 ± 5,2	72,1 ± 16,3	80,1 ± 12,4
USSC 8/77	8	15,0 ± 0,7	27,4 ± 1,5	33,4 ± 1,0	41,9 ± 2,9	52,2 ± 3,8
	9	16,3 ± 1,1	27,9 ± 3,0	41,2 ± 3,0	59,0 ± 3,0	63,4 ± 2,5
	10	10,4 ± 0,6	23,0 ± 1,8	29,1 ± 2,3	41,0 ± 3,3	49,1 ± 2,3
USSC 5/73	8	27,2 ± 3,6	64,6 ± 10,6	67,4 ± 4,5	83,5 ± 6,0	136,1 ± 7,2
	9	14,6 ± 1,6	31,7 ± 2,6	53,8 ± 10,5	73,5 ± 6,9	77,0 ± 11,7
	10	35,2 ± 1,2	56,6 ± 3,0	86,4 ± 6,5	100,4 ± 10,6	108,3 ± 9,8
USSC 8	8	20,7 ± 2,0	28,8 ± 2,8	34,9 ± 4,0	37,4 ± 1,1	41,6 ± 1,7
	9	25,1 ± 1,0	36,9 ± 4,3	34,7 ± 2,2	44,1 ± 3,7	43,3 ± 3,0
	10	15,6 ± 1,0	22,9 ± 1,5	30,3 ± 3,2	32,7 ± 1,4	39,0 ± 4,2

Tabelle 13: Verdopplungszeiten der Linien USSC 18, USSC 5/77, USSC 5/73 und USSC 8 im Überblick. Angegeben sind die Verdopplungszeiten der einzelnen Passagen jeder Zelllinie sowie zusätzlich die gemittelte Verdopplungszeit über die drei Passagen einer Zelllinie.

Zelllinie	Passage	Verdopplungszeit in h	Mittlere Verdopplungszeit in h
USSC 18	8	54 ± 9	50 ± 4
	9	38 ± 4	
	10	58 ± 6	
USSC 8/77	8	53 ± 9	50 ± 4
	9	51 ± 8	
	10	45 ± 6	
USSC 5/73	8	46 ± 6	45 ± 4
	9	38 ± 6	
	10	51 ± 8	
USSC 8	8	110 ± 17	99 ± 9
	9	112 ± 19	
	10	74 ± 9	

Das Wachstumsverhalten der Zelllinie USSC 18 zeigt sich über den Beobachtungszeitraum von 5 Kulturtagen als günstig für die folgenden Versuche. Die Zellzahlen nahmen stetig über den Messzeitraum zu, daher sollte eine Beeinflussung der Proliferation durch Supplemente ein gut quantifizierbares Mess-Signal über den gesamten Zeitraum erwarten lassen. Die einzelnen Messwerte sind in Tabelle 12 aufgeführt. Tabelle 13 zeigt zur besseren Übersicht die Verdopplungszeiten sowie die mittleren Verdopplungszeiten der einzelnen Zelllinien und Passagen.

3.2 Einfluss der Phosphatsupplemente auf die Entwicklung der Zellzahlen der USSCs

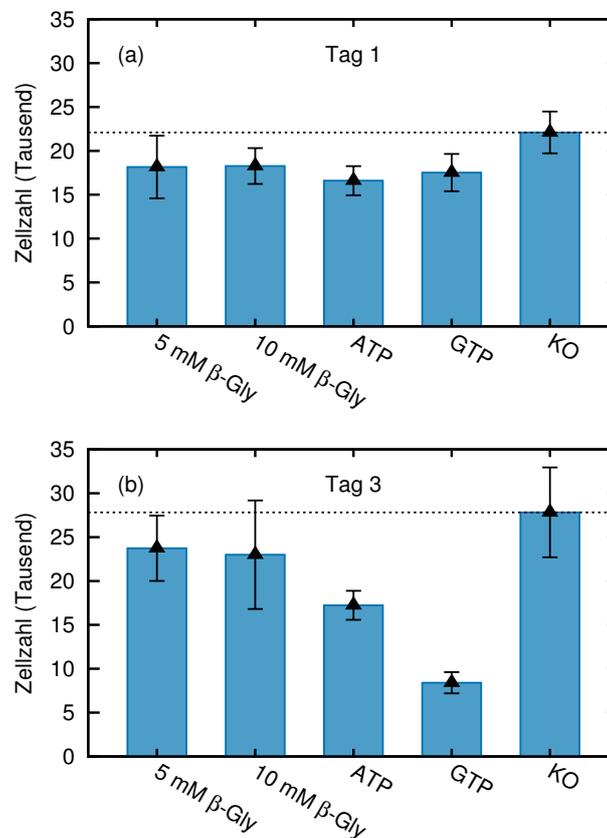


Abb. 5: Zellzahlen (CyQUANT®) unter Zusatz verschieden modifizierter Medien. Dargestellt ist die Entwicklung der Zellzahlen unter dem Einfluss verschieden supplementierter Medien an Tag 1 (a) und Tag 3 (b). x-Achse: verschiedene Zusätze. y-Achse: absolute Zellzahl. Gestrichelten Linie: Mittelwert der Kontrollgruppe. Dreiecke: Mittelwerte der einzelnen Proben. Fehlerindikatoren: Standardabweichung.

Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse der CyQUANT®-Analyse der Platten an Tag 1 und Tag 3 nach Zusatz der Supplemente.

Der Vergleich derjenigen Zellen, die jeweils mit einem supplementierten Medium behandelt wurden mit denen, die weiterhin mit Basismedium versorgt wurden, ergibt an Tag 1 lediglich einen

Tabelle 14: p-Werte der Proliferation im Überblick.

Medium	Zellen (Tausend)		Tag1/Tag3	p-Werte	
	Tag 1	Tag 3		Tag1/Basism.	Tag3/Basism.
5 mM β -Gly	18,1 \pm 3,6	23,7 \pm 3,7	0,140	0,179	0,259
10 mM β -Gly	18,3 \pm 2,0	23,0 \pm 6,2	0,234	0,111	0,274
ATP	16,6 \pm 1,7	17,2 \pm 1,7	0,394	0,029	0,024
GTP	17,5 \pm 2,1	8,4 \pm 1,2	<0,001	0,076	<0,001
Basismedium	22,0 \pm 2,4	27,8 \pm 5,1	0,155	-	-

signifikanten Unterschied zwischen Basismedium und den ATP-supplementierten Zellen. Die Anzahl der Zellen, deren Medium ATP enthielt, ist signifikant niedriger ($p=2,9\%$). An Tag 3 gibt es signifikant weniger Zellen, die mit ATP ($p=2,4\%$) und GTP ($p=0,1\%$) supplementiert wurden im Vergleich zu den Zellen, die mit Basismedium inkubiert wurden. Zwischen Basismedium und 5 mM β -Glyzerolphosphat sowie Basismedium und 10 mM β -Glyzerolphosphat wurde kein signifikanter Unterschied im Bezug auf die Anzahl der Zellen an Tag 3 ermittelt. Der Vergleich der einzelnen Werte zwischen Tag 1 und Tag 3 ergab einen signifikanten Abfall der Zellzahl bei den GTP-supplementierten Zellen ($p=0,1\%$). Weder unter den β -Glyzerolphosphat-behandelten Zellen noch unter den mit GTP-behandelten Zellen sowie unter den mit Basismedium inkubierten Zellen konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Zur besseren Übersicht sind alle Werte nebeneinander in Tabelle 14 aufgeführt.

Die Messwerte liefern nur in Einzelfällen statistisch signifikante Unterschiede. Ein Trend lässt sich dennoch ablesen, der in Abbildung 5 dargestellt ist. Sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 wurden unter allen Behandlungen weniger Zellen nachgewiesen als in der Vergleichsgruppe, die mit Standardmedium kultiviert wurde. Darüber hinaus scheinen die Zellzahlen der Kulturen, die unter ATP-Einfluss waren, ebenfalls von Tag 1 zu Tag 3 abzufallen. Auch diese Beobachtung ist nur als Trend anzusehen, sie konnte nicht signifikant nachgewiesen werden.

In einem weiteren Proliferationsversuch wurden Zellen zunächst für einen Tag in Normalmedium ausgesät, dann für 24 Stunden mit Phosphat-substituierten Medien inkubiert und schließlich für weitere 8 Tage mit Normalmedium gefüttert. Die Unterschiede im Teilungsverhalten wurden dann nach Tag 10 abermals mithilfe des CyQUANT®-Kits ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 in Form von RFU-Werten dargestellt. Insgesamt wurden sieben Wiederholungen durchgeführt, die auf 3 Messplatten verteilt gemessen und anschließend ausgewertet wurden. Daraus ergibt sich, dass die Medianwerte aller Proben unterhalb dessen der Kontrollgruppe liegen. Etwas mehr als 50% aller Messwerte, die aus den 5 mM β -Glyzerolphosphat Proben stammen, liegen in sehr ähnlichen Dimensionen wie die oberen 75% der Kontrollgruppe, einzelne Werte gehen sogar noch darüber hinaus. Nur 25% der Werte sind kleiner als in der Kontrollgruppe.

Für Proben, die mit 10 mM β -Glyzerolphosphat supplementiert wurden, lassen sich ähnliche

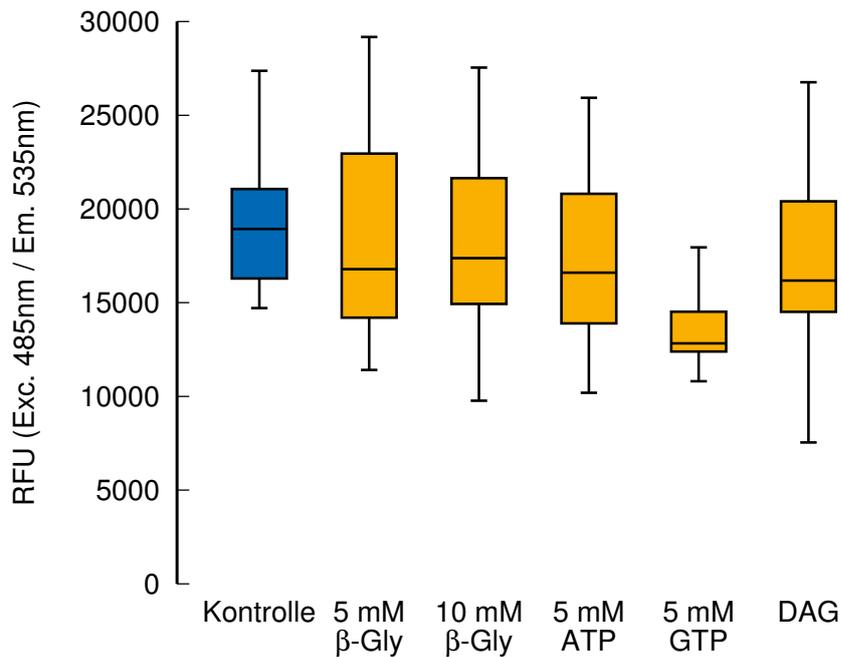


Abb. 6: Proliferationsnachweis (CyQUANT®) unter 24-stündiger Supplementierung und einer Gesamtkulturdauer von 10 Tagen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Behandlungen aufgelistet, auf der y-Achse die Fluoreszenz in RFU (Exc. 485 nm / Em. 535 nm). Die farbigen Boxen zeigen die Interquartilsabstände.

Ergebnisse ablesen. Die oberen 75% der Messwerte liegen im Gesamtmessbereich der Kontrolle. Lediglich die unteren 25% der Messwerte sind kleiner als sämtliche Werte der Kontrollgruppe. Die oberen 50% der Werte, die nach Zugabe von **ATP** gemessen wurden, liegen in vollem Ausmaß in den oberen 75% aller Messdaten der Kontrolle. Demgegenüber sind es etwas mehr als 25%, die unter dem Minimalwert der Kontrolle zurückbleiben.

Die einmalige Zugabe von **GTP** führte zu Messdaten, die zu 75% unter den niedrigsten Fluoreszenzwerten der Kontrollgruppe liegen. Die oberen 25% bleiben unter dem Medianwert der Kontrolle zurück.

Die oberen 75% der Resultate aus den Proben, denen **DAG** zugesetzt wurde, liegen im vollen Umfang im Bereich aller Ergebnisse der Kontrollgruppe. Die unteren 25% bleiben hinter diesen zurück.

Darüber hinaus lässt sich ablesen, dass die Medianwerte aller Proben, einzig mit Ausnahme von **GTP**, sehr nahe beieinander liegen. Auch im Vergleich mit dem Median der Kontrolle sind keine nennenswerten Abweichungen festzustellen.

Die oberen 25% der **RFU**-Werte für 10 mM β -Glyzerolphosphat und **DAG** fallen ähnlich aus. **ATP** bleibt in den oberen 25% geringgradig dahinter zurück, die Behandlung mit 5 mM β -Glyzerolphosphat führte im Bereich der oberen 25% zu gering höheren Werten.

Die unteren 75% aller Daten, die unter Zugabe von **GTP** gemessen wurden, liegen außerdem auch noch unterhalb der oberen 75% von 10 mM β -Glyzerolphosphat und **DAG**. Als ein Maß

der Streuung wurde zusätzlich noch die sogenannte „Spannweite“ oder auch *range* aus dem Boxplot abgelesen, die sich aus der Differenz zwischen Maximum und Minimum ergibt. Diese ist in der Messreihe um **DAG** am größten dimensioniert. Die Behandlungen mit 5 mM β - und 10 mM β -Glyzerolphosphat führten zu ähnlich großen Streuungen der Messwerte. Diese *range* ist in der Kontrollgruppe deutlich kleiner. Der geringste Abstand zwischen Maximalwert und Minimalwert ist in der Gruppe von **GTP** abzulesen.

3.3 Einfluss der Phosphatquellen auf das Mineralisationsverhalten der USSCs

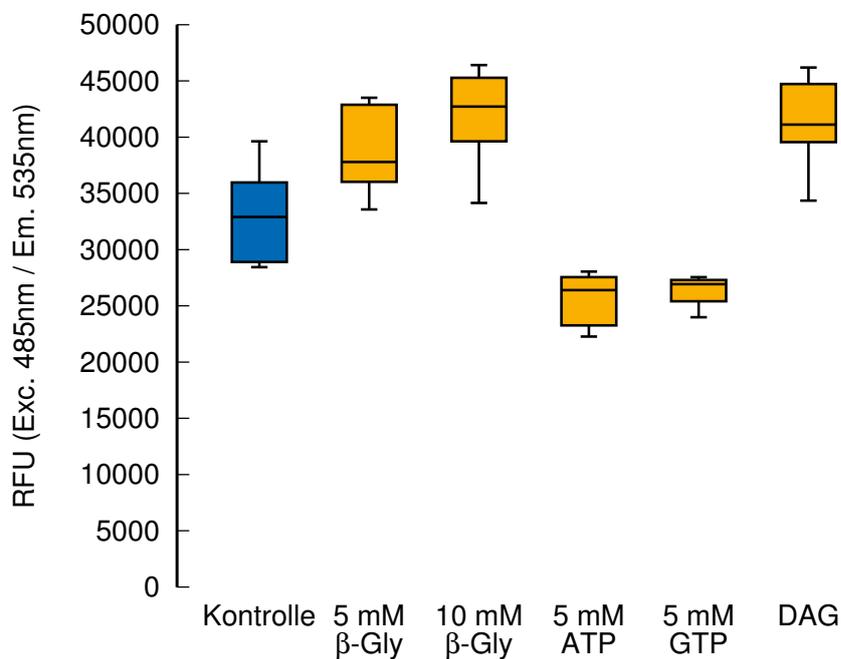


Abb. 7: Mineralisationsnachweis (OsteoImage™) unter 24-stündiger Phosphatsupplementierung und einer Gesamtkulturdauer von 10 Tagen. Auf der x-Achse sind die einzelnen Behandlungen aufgelistet, auf der y-Achse die Fluoreszenz in RFU (Exc. 485 nm / Em. 535 nm). Die farbigen Boxen zeigen die Interquartilsabstände.

Die Analyse des Mineralisationsverhaltens der USSCs erfolgte an Tag 10. Zur Darstellung der relativen Mineralisierung wurde ein Boxplot der Fluoreszenzwerte (RFU) aus dem OsteoImage™-Versuch erstellt (Abbildung 7). Es zeigen sich deutliche Unterschiede im Vergleich der Zellen, die ausschließlich mit Normalmedium behandelt wurden, zu denjenigen, denen einmalig ein Phosphat-supplementiertes Medium zugefügt wurde.

So fällt zunächst auf, dass die Medianwerte der Proben, die einmalig 5 mM β - oder 10 mM β -Glyzerolphosphat erhielten, signifikant größer sind als in der Kontrollgruppe. Gleiches resultiert auch aus der Behandlung mit Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glyzerolphosphat (**DAG**).

Demgegenüber sind die Medianwerte der Messungen, die infolge der Behandlung mit **ATP** und **GTP** ermittelt wurden, signifikant niedriger als der Medianwert der Kontrollgruppe.

Die oberen 75% der Messdaten aus den Kulturen, die 5 mM β -Glyzerolphosphat erhielten, sind größer als die unteren 75% der Kontrollkulturen. Die unteren 25% der Probe sind außerdem größer als die unteren 50% der Kontrolle.

Die relative Mineralisierung, die infolge der Supplementierung mit 10 mM β -Glyzerolphosphat gemessen wurde, überschreitet in 75% der Messwerte die gesamte *range* der Kontrollgruppe. Die unteren 25% der Werte liegen zudem noch im Ausmaß der oberen 50% der Kontrollgruppe. Die Behandlung mit **ATP** führte auf der Ebene der Mineralisierung zu Messwerten, die alle unterhalb der Fluoreszenzwerte der Kontrollgruppe liegen.

Das gleiche Bild zeigt sich bei der Behandlung mit **GTP**. Auch unter **GTP** ist die relative Mineralisierung signifikant niedriger als in der Kontrolle.

Demgegenüber sind 75% aller gemessenen Werte in der Gruppe, die für 24 Stunden mit **DAG** supplementiert wurden, größer als die der Referenzgruppe. Auch hier liegen, wie unter beiden Konzentrationen β -Glyzerolphosphat, die unteren 25% der Daten im Bereich der oberen 50% der Kontrolle.

Beim Vergleich der Proben untereinander lässt sich feststellen, dass die Messwerte in den Kulturen, die 10 mM β -Glyzerolphosphat und **DAG** erhielten, in den oberen 75% nahezu identisch sind.

Bei der Analyse der *range* fällt auf, dass diese für 10 mM β -Glyzerolphosphat am größten ist, in der Kontrollgruppe sowie in den **DAG**-Kulturen nahezu identisch ist und in den Kulturen, die als Supplement **GTP** zugesetzt bekamen, am geringsten ausgeprägt ist.

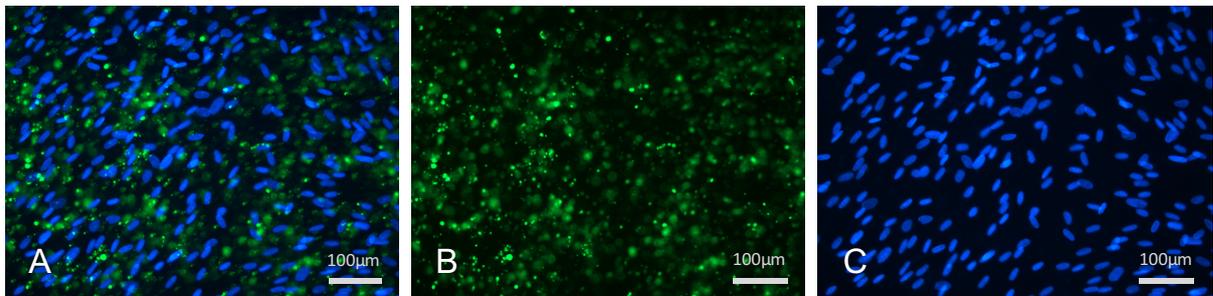


Abb. 8: Detailausschnitt einer mit 10 mM β -Gly supplementierten Kultur an Tag 10, Doppelfärbung, 200-fache Vergrößerung (Leica DM5000 B). (A) Induzierte mineralisierte Zellkultur (Overlay aus Abbildung (B) und (C)) an Tag 10; 200-fache Vergrößerung. (B) Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Mineralisierung mit dem OsteoImage™ Assay an Tag 10; 200-fache Vergrößerung. (C) Darstellung der Proliferation, Zellkerne, DAPI-Färbung an Tag 10; 200-fache Vergrößerung. Die Grünfärbung resultiert aus der Reaktion des Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein und weist mineralisierte Bereiche nach. Die Blaufärbung ist Folge der Bindung des Farbstoffes DAPI an die doppelsträngige DNA der Zellkerne.

Abbildung 8 zeigt beispielhaft Detailausschnitte einer mit 10 mM β -Glyzerolphosphat supplementierten Zellkultur an Tag 10. Die Zellkerne in der Kultur wachsen an Tag 10 entlang von

Vorzugsrichtungen. Folglich handelt es sich um eine mehrschichtige Kultur, die jedoch noch nicht sehr dicht ist. Zellwachstum und Mineralisation wurden hier fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Die Mineralisierungen zeigen sich als stark leuchtende, etwa gleichmäßig über die Kultur verstreute Punkte mit Durchmessern, die deutlich geringer als die blau gefärbten Kerne auszumachen sind. In der Analyse der Leuchtkraft, die hier noch proportional zur Mineralisierung gemessen wurde, wurde die Platte im Reader an mehreren Stellen im Well angeregt und gemessen. Die Messfläche erlaubt eine Mittelung der mineralisierten Anteile, da das Leuchten im Reader als homogenes Signal detektiert wird, das wegen der geringen Abstände der leuchtenden Punkte nicht lokal aufgelöst wird.

3.4 Verhältnis von Mineralisation und Proliferation in Phosphat substituierten Kulturen

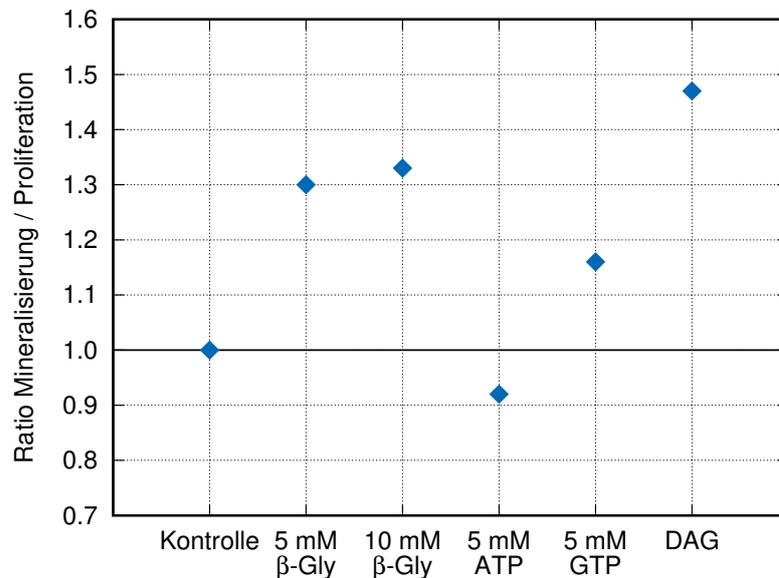


Abb. 9: Verhältnis von Mineralisation und Proliferation in Phosphat substituierten Kulturen. Die Darstellung zeigt den Quotienten zwischen Mineralisation und Proliferation der einzelnen Proben. Das Verhältnis von Mineralisation und Proliferation in Zellen, die mit Normalmedium kultiviert wurden, dient als Referenz und wurde entsprechend auf 1 gesetzt. Abweichungen der *Ratios* nach oben oder unten liegen ober- bzw. unterhalb der x-Achse.

Diese *Ratios* sind in Abbildung 9 graphisch dargestellt. Die Kulturen, die ausschließlich Basismedium erhielten, sind die Referenz. Der Quotient aus Mineralisation und Proliferation beträgt für die Kontrollgruppe 1.0.

Die *Ratio* der Proben, die mit 5 mM β -Glyzerolphosphat supplementiert wurden, beträgt 1.30. Dies bedeutet, dass die Mineralisierung gegenüber der Proliferation überwiegt.

Für die Kulturen, die unter einem eintägigen Stimulus von 10 mM β -Glyzerolphosphat standen,

ergibt sich eine *Ratio* von 1.33. Die Kulturen weisen ebenfalls ein erhöhtes Mineralisierungspotenzial im Vergleich zur Proliferation auf.

Auch bei der Zugabe von **GTP** überwiegt das Mineralisierungspotenzial gegenüber der Proliferation bei einer *Ratio* von 1.16.

Unter **DAG** beträgt der Quotient 1.47 und ist damit im Vergleich zu den anderen Proben am höchsten. Das Verhältnis ist noch stärker zu Gunsten der Mineralisierung ausgeprägt als in den anderen Kulturen.

Unter der Supplementierung mit **ATP** verhält es sich konträr. Der Quotient aus relativer Mineralisierung und Proliferation beträgt 0.92. **ATP** ist somit in dieser Versuchsreihe die einzige Phosphatquelle, die keine spezifische Mineralisierung induziert.

Im Abschnitt 3.3 konnte gezeigt werden, dass es auch in nicht induzierten **USSC**-Kulturen zu spontanen Mineralisationsprozessen kommt. Unter beiden Konzentrationen β -Glyzerolphosphat zeichnete sich im Vergleich zur Kontrolle eine schwächere Proliferationsrate ab, dennoch ist die spezifische Mineralisation deutlich erhöht.

Die Zugabe von **DAG** führte ebenfalls zu einer geringeren Anzahl an Zellen im Vergleich zur nicht induzierten Kontrollgruppe, dennoch ergab sich hier die höchste spezifische Mineralisation.

Unter der einmaligen Zufuhr von **GTP** waren sowohl die Mineralisation als auch die Proliferation verglichen mit der Referenzgruppe abgeschwächt, doch auch hier ist die Mineralisationsrate der Proliferation deutlich übergeordnet.

Die Supplementierung mit **ATP** führte, verglichen mit den Kontrollkulturen, ebenfalls zu verminderten Mineralisierungs- und Proliferationsraten. Verglichen mit **GTP** fällt insbesondere auf, dass **ATP**-Kulturen zwar eine höhere Mineralisation erreichen, die Zellzahlen jedoch deutlich nach unten abweichen.

Es bleibt festzuhalten, dass die Kulturen, die mit β -Glyzerolphosphat, **GTP** und **DAG** substituiert wurden, ein deutlich erhöhtes spezifisches Mineralisationspotenzial im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen. Unter dem Einfluss von **ATP** sind sowohl Mineralisierung als auch Proliferation gegenüber der Referenzkultur unterlegen. Eine spezifische Mineralisierung findet hier nicht statt, da die Zellen in Relation stärker proliferieren als mineralisieren. Damit wird deutlich, dass einzig die Supplementierung mit **ATP** zu keiner spezifischen Mineralisierung führt. In Tabelle 15 sind zur besseren Übersicht nochmals alle Werte aufgelistet. Daraus ist deutlich zu erkennen, dass in den **ATP**- und **GTP**-Kulturen sowohl eine verringerte Mineralisation als auch Proliferation im Vergleich zur Kontrollkultur stattgefunden hat, es unter der Zugabe von **GTP** aber dennoch zu einer spezifischen Induktion der Mineralisation der Kultur kam.

Zusammenfassend lässt sich hier sagen, dass die Kulturen, die unter dem Stimulus von β -Glyzerolphosphat, **GTP** und **DAG** standen, ein deutlich erhöhtes spezifisches Mineralisationspotenzial im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen. In der **ATP**-Kultur verhält es sich umgekehrt. In Tabelle 15 sind zur besseren Übersicht nochmals alle Werte aufgelistet. Daraus

erschließt sich dann auch, dass in den **ATP**- und **GTP**-Kulturen sowohl der Mineralisierungs- als auch der Proliferationsprozess denen der Referenzkultur unterlegen waren.

Tabelle 15: Mediane Mineralisation und Proliferation und Quotientenbildung

	Kontrolle	5 mM β -Gly	10 mM β -Gly	ATP	GTP	DAG
Median Mineralisation [RFU]	32904	37794	40161	26399	25930	41124
%	100,00	114,86	122,06	80,23	78,81	124,98
Median Proliferation [RFU]	18934	16786	17376	16486	12828	16144
%	100,00	88,66	91,77	87,07	67,75	85,26
Änderung des Verhältnisses Mineralisierung / Proliferation	1,00	1,30	1,33	0,92	1,16	1,47

3.5 Einfluss der Phosphatquellen auf Zellzyklus und Zell-Zell-Kontakte

Mittels quantitativer **RT-PCR** wurden die Einflüsse der unterschiedlichen Phosphat-Supplemente auf die Genexpression analysiert.

In Tabelle 16 sind alle Ansätze aufgeführt. Es konnten lediglich für das „Stressprotein“ Hsp60, den Zellzyklusmarker CyclinB, den Stammzellregulator Notch3, das Adhäsionsprotein Vinculin sowie RUNX2b als Marker der osteoblastären Differenzierung Signale ermittelt werden. Die weitere Analyse und Interpretation musste jedoch auf die Ergebnisse von CyclinB, Notch3 und Vinculin beschränkt werden, da die Werte aus den einzelnen Wiederholungen für Hsp60 und RUNX2b zu stark variierten.

In der Gruppe der Marker des Phosphathaushaltes wiesen die Ergebnisse ebenfalls zu starke Varianzen auf und konnten somit nicht in die Analyse miteinbezogen werden.

In Abbildung 10 werden die Transkriptionsergebnisse für die einbezogenen Gene Notch3, CyclinB und Vinculin unter dem Einfluss der verschiedenen Phosphat-Supplemente 5 mM β -Glyzerolphosphat, 10 mM β -Glyzerolphosphat, 5 mM **ATP** und 5 mM **GTP** veranschaulicht. Die Phosphate wurden an Tag 1 der Kultur für 24 Stunden zugesetzt, die Analyse fand nach einer Gesamtkulturzeit von 10 Tagen statt. Die Zugabe von β -Glyzerolphosphat und **ATP** konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine signifikanten Expressionsunterschiede bei Notch3 bewirken. Die Behandlung mit **GTP** führte allerdings zu einer 2.7-fachen Zunahme der Transkriptionsmenge im Vergleich zur Kontrolle.

Für den Zellzyklusmarker CyclinB zeigen sich unter der Zugabe beider Konzentrationen β -

Tabelle 16: Ergebnisse der RT-qPCR. Tabellarische Auflistung aller Gene, auf deren Expression die mRNA des Zellmaterials untersucht wurde.

+: RNA transkribiert +/-: RNA schwach transkribiert -: RNA nicht transkribiert

Gen	5mM β -Gly	10mM β -Gly	ATP	GTP	KO	GAPDH
NELL1	-	-	-	-	-	-
PIT1	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
PIT2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Hsp60	+	+	+	+	+	+
Cyclin B	+	+	+	+	+	+
Cyclin E	-	-	-	-	+	+
Killin	-	-	-	-	-	+
Notch3	+	+	+	+	+	+
N-Cadherin	-	-	-	-	-	+
Vinculin	+	+	+	+	+	+
RUNX2b	+	+	+	+	+	+

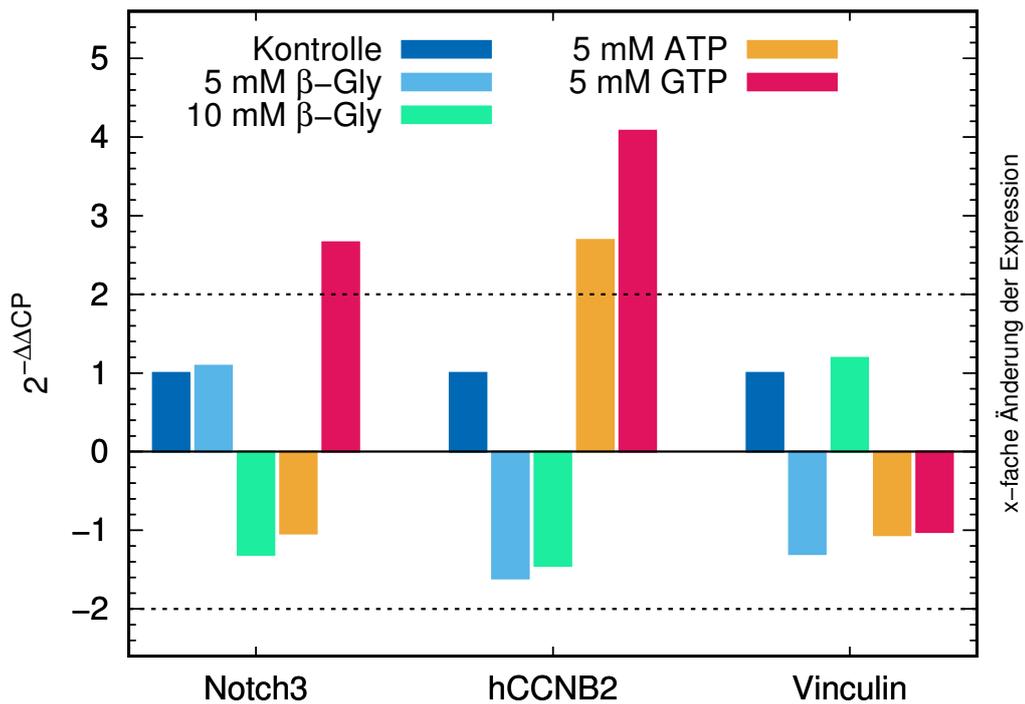


Abb. 10: Differentielle Genexpression in Phosphat substituierten Zellkulturen. Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR: Nachweis der mRNA von Notch- 3, CyclinB (hCCNB2) und Vinculin. Expressionsunterschiede sind ab Werten von ≤ -2 und $\geq +2$ anzunehmen. Auf der x-Achse sind die untersuchten Gene aufgetragen, auf der y-Achse die x-fache Änderung der Expression ($2^{-\Delta\Delta CP}$). Alle Proben sind auf das Referenzgen GAPDH normiert.

Glyzerolphosphat keine signifikanten Abweichungen. Ein Trend in Richtung Reduktion der Expressionsmenge ist zu erkennen. Die Supplementierung mit **ATP** führt hingegen zu einer 2.7-fachen Zunahme der Transkription. Der Effekt unter **GTP** ist nochmals stärker, mit einer 4.1-fachen Zunahme der Expression ist hier die stärkste Veränderung auszumachen.

Die Expression des Adhäsionsproteins Vinculin wird durch die Zugabe der Supplemente nicht signifikant beeinflusst. Während ein Trend dahingehend abzulesen ist, dass 5 mM β - Glyzerolphosphat, **ATP** und **GTP** die Expression hemmen und 10 mM β - Glyzerolphosphat zu einer Zunahme der Transkriptionsmenge führt, sind die Unterschiede nicht deutlich genug, um direkte Rückschlüsse auf die Behandlung zu erlauben.

Es fällt auf, dass die Supplementierung mit den energiereichen Phosphatverbindungen **ATP** und **GTP** die stärksten Effekte zufolge hat.

ATP verstärkt die Transkription des Zellzyklusmarkers CyclinB, hat jedoch keinen Einfluss auf die Expression von Notch3 und Vinculin. **GTP** hat den stärksten Einfluss auf CyclinB und führt darüber hinaus als einziges Supplement zu einer verstärkten Expression von Notch3. Die Expression von Vinculin konnte durch **GTP** nicht beeinflusst werden.

ATP und **GTP** können die Genexpression von CyclinB anregen, **GTP** führt zudem zur Erhöhung der Transkriptionsmenge von Notch3.

Diskussion

Unter dem Aspekt, dass mithilfe des *Tissue Engineerings* zukünftig viele Probleme in der Therapie von Knochendefekten im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich gelöst werden könnten, wurden mit den **USSCs** Zellen ausgewählt, die sich zunächst vor allem durch ihre nahezu uneingeschränkte Verfügbarkeit, ihr geringes immunogenes Potenzial und ihr pluripotentes Differenzierungspotenzial auszeichnen. Im Zellkulturverbund sind sie in der Lage, in mehreren Schichten zu wachsen, was einen großen Vorteil für zukünftige *in vivo*-Versuche darstellt. Im Gegensatz zu humanen **ESCs** sind die **USSCs** ethisch weniger umstritten, ihre Verwendung unterliegt dem Embryonenschutzgesetz (ESchG vom 13.12.1990). Die **ESCs** stehen in Deutschland unter striktem Schutz und das Forschen und Arbeiten mit ihnen ist im Gegensatz zu den **USSCs** verboten. **USSCs** sind aufgrund ihrer vielversprechenden Eigenschaften, der guten Verfügbarkeit und ethischen Unbedenklichkeit in den letzten Jahren immer mehr ins Blickfeld der Forschung gelangt (Kogler et al. 2004; Degistirici et al. 2008; Markov et al. 2007). **USSCs** sind wie Teile des Mittelgesichtes HOX-negativ (Kuratani 2004; Leucht et al. 2008). HOX-Gene geben in der Organentwicklung bestimmte Abläufe vor. HOX-negative Zellen sind somit universeller einsetzbar. Darüber hinaus lösen **USSCs** nur selten Immunreaktionen aus (Kogler et al. 2004).

Kogler et al. beschrieben 2004 erstmalig die Isolation der **USSCs** aus dem Nabelschnurblut und ihre Fähigkeiten, *in vitro* adhärent zu wachsen ohne ihr Differenzierungspotenzial einzubüßen. Sie konnten darüber hinaus *ex vivo* ihre pluripotenten Eigenschaften nachweisen, indem es ihnen gelang, die **USSCs** in Knochenzellen, Knorpelzellen, hämatopoetische Zellen und Nervenzellen zu differenzieren. Auch konnte eine Differenzierung in Leber- und Herzmuskelzellen nachgewiesen werden. Die osteogenen Differenzierungsmöglichkeiten der **USSCs** wurden schließlich in zahlreichen weiteren *in vitro*-Studien bestätigt. Degistirici et al. (2008) zeigten morphologische, biochemische und molekularbiologische Aspekte der osteogenen Differenzierung auf. Shafiee et al. (2011) vergleichen die **USSCs** mit Mesenchymalen Stammzellen (**MSCs**) aus dem Knochenmark (**BM-MSC**) und aus Fettgewebe (**AT-MSC**). Sie sprachen den **BM-MSCs** das größte

osteogene Differenzierungspotenzial zu, gefolgt von den USSCs. Die AT-MSCs wiesen in diesem Versuch das geringste osteogene Potenzial auf. [Lammers et al. \(2012\)](#) fokussierten sich in ihrem Ansatz insbesondere auf die Mineralisationsprozesse bei der osteogenen Differenzierung und kultivierten die Zellen dabei nicht in 2D-Modellen, sondern als Mikrogewebe in 3D-Kulturen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Wahl der Zelllinie auf Basis der Proliferationsanalyse von vier verschiedenen Zelllinien hinsichtlich ihrer Verdopplungszeit über drei Passagen hinweg (s. Kapitel 3.1). Da sich die Zelllinie USSC 18 durch relativ gleichmäßige Zellzahlentwicklungen bei stabiler Verdopplungszeit auszeichnet, wurde sie für die Untersuchungen dieser Arbeit ausgewählt. Auch die Zelllinien USSC 8/77 sowie USSC 5/73 wiesen ähnliche Eigenschaften aus, lediglich die betrachtete Zelllinie USSC 8 zeigte eine deutlich verlängerte Verdopplungszeit. Die vier verschiedenen Zelllinien der USSCs (USSC 18, 8/77, 5/73 und 18) wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und mit Normalmedium über 5 Tage kultiviert, um zunächst ihre Proliferation zu untersuchen. Ausgehend von verschiedenen Passagen wurden die charakteristischen Verdopplungszeiten bestimmt. Die zuvor expandierten Zellen wurden als Startpassage 8, 9 oder 10 angelegt. Dafür wurde ausschließlich Medium ohne osteogene Stimulanzien verwendet, das aus vorangegangenen Studien als geeignet identifiziert worden war ([Langenbach et al. 2010](#); [Naujoks et al. 2011, 2013](#)). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bis zur Passage 8 vorkultiviert. Schließlich wurden sie an Tag 0 in gleichen Mengen auf 24 Well-Platten aufgeteilt und simultan in den Flaschen in die nächste Passage weiter kultiviert. An den Tagen 1, 2, 3, 4 und 5 wurden die Zellen auf den Multiwellplatten gestoppt und eingefroren, um sie zu einem späteren Zeitpunkt mithilfe des CyQuant[®]-Kits zu analysieren (s. Kapitel 2.3.8). Diese Methode basiert auf dem Prinzip, dass der mitgelieferte Farbstoff unspezifisch an Nukleinsäuren bindet und mit einem Fluorometer nach Lyse ein Rückschluss auf die Zellzahl möglich ist. Möglich wird dies durch einen zuvor angelegten Zellstandard, über die Kalibrierfunktion können die Emissionswerte dann in Zellzahlen umgerechnet werden. Vor- und Nachteile dieser Methode im Vergleich zu anderen wurden von [Jones et al. \(2001\)](#) und [Lu et al. \(2009\)](#) erörtert. [Lu et al. \(2009\)](#) nennen beispielsweise Vorteile gegenüber Reagenzien, die spezifisch auf einen bestimmten Stoffwechselvorgang reagieren. Die Analyse der zellulären Esterase-Aktivität oder die Aktivitätsmessung mitochondrialer Enzyme sind dabei nur zwei Optionen. Bei allen gilt es jedoch zu beachten, dass nicht immer bekannt ist, in welchem Stoffwechselzustand die Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt verweilen oder aber auch die Möglichkeit besteht, dass sich nicht alle Zellen einer Kultur im gleichen Entwicklungszustand befinden. So können bei diesen Untersuchungen unter Umständen nicht alle Zellen detektiert werden. Daher sind mehrere Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten unerlässlich. Eine weitere, weit verbreitete Methode zur indirekten Bestimmung der Zellzahl, liefert der [³H]-Thymidin-Assay. Hier kommt es zu einer Bindung des Reagenzes in der S-Phase des Zellzyklus. Nachteilig an dieser Methode ist, dass die Anwendung der radioaktiven Substanz im Labor mit großem Aufwand verbunden ist, auch sind die speziellen Lagerungs- und Entsorgungsvorschriften zu berücksichtigen. [Jones](#)

et al. (2001) beschrieben weitere Fluoreszenzsignal-orientierte Methoden, die allerdings nicht selten erfordern, dass die Zellen bereits vor der Kultur mit dem Fluoreszenz-Farbstoff markiert werden müssen. Darüber hinaus sind in aller Regel deutlich mehr Zellen zur Erstellung einer Standard-Kurve erforderlich als beim CyQuant[®]-Assay. Als nachteilig sehen Jones et al. (2001), dass es beim CyQuant[®]-Assay mitunter Störsignale durch Farbstoffe, wie z.B. Alizarin-Rot im Zellkulturmedium, geben kann. Es wird deshalb empfohlen, vor der Messung einen Spülvorgang mit PBS durchzuführen. Dieser zusätzliche Spülvorgang birgt jedoch die Gefahr, dass sich Zellen vom Untergrund ablösen und folglich nicht in die Messung einbezogen werden können. Allerdings kommen die zuvor genannten Methoden auch nicht ohne Spülvorgänge zwischen einzelnen Arbeitsschritten aus. Mit dem CyQuant[®] können laut Hersteller Zellzahlen zwischen 50 und 250.000 zuverlässig detektiert werden, die Methodik ist gut anwendbar und individuelle Fehler beim Zählen können vermieden werden. Auch der zeitliche Aufwand ist überschaubar, da durch das Pipettieren auf großen Platten viele Ergebnisse simultan erzielt werden können. In anderen Studien hat sich der Einsatz des CyQuant[®]-Assays ebenfalls bewährt. Naujoks et al. (2011) haben die Methode auch auf USSCs angewendet, diese wurden jedoch nicht in Zellkulturflaschen oder Multiwellplatten, sondern auf verschiedenen Biomaterialien kultiviert. Handschel et al. (2009) untersuchten murine embryonale Stammzellen, die in Petrischalen kultiviert wurden. Jones et al. (2001) wendeten das CyQuant[®]-Kit sowohl auf humane als auch auf Mäuse- und Rattenzelllinien an. Das Proliferations-Assay scheint also für eine große Anzahl unterschiedlicher Zellen, selbst auf verschiedenen Nährböden, geeignet zu sein. Somit stellt die Anwendung und Auswertung des CyQuant[®]-Assays eine etablierte und adäquate Methode dar, um die Zellzahlentwicklung in der vorliegenden Untersuchung zu analysieren.

Es sollten nicht nur verschiedenen Zelllinien, welche ja die Eigenschaften unterschiedlicher Spender aufweisen, verglichen werden, sondern es sollte auch untersucht werden, ob sich die Zellteilungsrate mit aufsteigender Passage verändert. Ein Passagieren von Zellen ist notwendig, da eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen nicht mehr gewährleistet ist, sobald die Wachstumsfläche vollständig bedeckt ist (Gstraunthaler and Lindl 2013). In der Literatur wird beschrieben, dass die Teilungsbereitschaft der USSCs mit aufsteigender Passage abnimmt (Degistirici et al. 2008). Dieses Phänomen konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die USSC 18 und USSC 5/73 wiesen in Passage 10 erhöhte Verdopplungszeiten auf, bei den USSC 8/77 und USSC 8 waren hingegen verkürzte Verdopplungszeiten zu beobachten. Hier teilten sich die Zellen in Passage 10 deutlich schneller als im Vergleich zu Passage 8 und 9. Allerdings zeigten Suchanek et al. (2007) am Beispiel von multipotenten Vorläuferzellen aus dem Pulpagewebe, dass die Teilungsbereitschaft der Zellen erst ab Passage 50 signifikant abnahm. Während der ersten 40 Passagiervorgänge konnte dort keine Verlängerung der Verdopplungszeit beobachtet werden. Salhi (2010) hat die Entwicklung von Zellzahlen in aufsteigenden Passagen für Vorläuferzellen aus dem Knochenmark betrachtet. Seine Untersuchungen zeigten eine absteigende Teilungsbereitschaft ab Passage 5, wobei jedoch auch die Abhängigkeit von der Aussattdichte

zu berücksichtigen war. Weniger dicht ausgesäte Zellen zeigten nach Passage 5 einen höheren Abfall der Proliferationsrate als dichter ausgesäte Zellen. Begründet wurde dies durch morphologische Veränderungen der Zellen, sie verloren zum Teil ihre Spindelform. Die heterogenen Zellen sezernieren wiederum parakrin wirkende Stoffe, die sich nachteilig auf die benachbarten Zellen auswirken können. In anderen Versuchen mit USSCs nahm die Verdopplungszeit erst ab Passage 23 merklich ab (Degistirici et al. 2008).

Bei der Auswertung der Ergebnisse fiel außerdem auf, dass die Anzahl der ausgesäten Zellen an Tag 0 in teils mehreren Passagen einer Zelllinie höher lag als die an Tag 1 gemessenen Zellzahlen. Verschiedene Ursachen können hierfür verantwortlich sein. Pipettierfehler sind aufgrund der nur geringen Standardabweichung auszuschließen. Vorstellbar ist, dass die Zellen den Splitprozess nicht überstanden haben und sich dies bei einer relativ geringen Ausgangssaat von 19.000 Zellen pro Well deutlich niederschlägt. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Zellen 24 Stunden nach der Aussaat noch nicht adhärent genug am Boden der Multiwellplatten anhafteten und somit durch das Absaugen des Zellkulturmediums und dem Spülvorgang vor dem Einfrieren der Platten verloren gegangen sind. Diese Annahme wird durch die an Tag 2 ermittelten Zellzahlen weiter unterstützt, da diese wiederum im Rahmen der anzunehmenden Werte lagen. Eine bessere Annäherung an die tatsächliche Verdopplungszeit der einzelnen Zelllinien wäre möglicherweise erreichbar, sofern die ersten Zellen erst 48 Stunden nach der Aussaat geerntet würden. Eine weitere Möglichkeit wäre, die erste Messung nach 36 Stunden durchzuführen, da in einigen Passagen Verdopplungszeiten von weniger als 48 Stunden errechnet wurden.

Die Analyse der Verdopplungszeiten sollte zusätzlich dabei helfen, eine Zelllinie zu identifizieren, die so langsam proliferiert, dass der Beobachtungszeitraum nicht zu kurz ausfällt. Es ist beschrieben, dass zu stark konfluierende USSCs ihr pluripotentes Potenzial einbüßen und dann spontan in unterschiedliche Richtungen differenzieren können (Degistirici et al. 2008). Zellen, die sich langsamer teilen, erreichen diese Konfluenz erst deutlich später und erlauben somit einen längeren Untersuchungszeitraum. Für den Versuchsaufbau war es wichtig, eine Zelllinie zu verwenden, die sich innerhalb des 10-tägigen Untersuchungszeitraums nicht zu stark vermehrt. Die Kultur sollte nicht zu konfluent sein, um den Einfluss der Phosphatzusätze bewerten zu können ohne eine spontane Differenzierung zu provozieren.

Es gibt also verschiedene Kriterien, die die Wahl der Zelllinie beeinflussen. Betrachtet man in diesem Ansatz ausschließlich die Entwicklung der Verdopplungszeiten, so müsste die Wahl auf die USSC 8/77 fallen, da ihre Teilungsraten über die drei betrachteten Passagen hinweg am ähnlichsten waren. Die Linien USSC 18 und USSC 5/73 zeigen Irregularitäten der Teilung in Passage 9, bei den USSC 8 gibt es eine signifikante Abweichung in Passage 10. Nicht zu vernachlässigen ist jedoch der Aspekt, dass die Zelllinie USSC 8/77 in allen drei Passagen an Tag 1 deutlich niedrigere Zellzahlen aufwies als am Tag der Aussaat. Dieses Phänomen zeigt sich bei den USSC 18 und USSC 5/73 nur in der Passage 9 und bei den USSC 8 in Passage 10. Ausschlusskriterium für die Linie 8/77 war dieser Verlust von Zellen von Tag 0 zu Tag 1.

Einen ausreichend langen Beobachtungszeitraum lieferten alle vier betrachteten Linien. Insgesamt zeigten die USSC 18 die gleichmäßigsten Wachstumseigenschaften und wurden aus diesem Grund für alle weiteren Versuche verwendet.

Zur Induktion der osteogenen Differenzierung von Stammzellen wird in der Literatur die Zugabe von Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat (DAG) beschrieben (z.B. Robey (2011); Kogler et al. (2004); Handschel et al. (2010)). Dabei soll Dexamethason einerseits eine Steigerung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) bewirken, wobei die ALP wiederum im Zusammenspiel mit organischen Phosphatquellen die Bildung von Hydroxylapatit in der extrazellulären Matrix zu fördern scheint (Bellows et al. 1986; Bhargava et al. 1988). Andererseits zeigte sich, dass DAG über verschiedene intra- und interzelluläre Mechanismen die Expression und Aktivität vom *Runt-related Transcription Factor 2* (Runx2) induzieren kann (Gaur et al. 2005; Hong et al. 2009; Mikami et al. 2007). Runx2 gilt auf molekularbiologischer Ebene als einer der essentiellen Transkriptionsfaktoren zur Induktion der osteoblastären Differenzierung (Komori 2010, 2017). Ascorbinsäure (Asc) ihrerseits wird vor allem für die Selenierung von Kollagen Typ 1 in die extrazelluläre Matrix benötigt. Sie dient als Cofaktor bei der Hydroxylierung der Aminosäuren Prolin und Lysin. Erst durch diese Reaktion kann es zur Ausbildung der typischen helikalen Strukturen kommen. Insofern kann es in Abwesenheit von Ascorbinsäure zur fehlerhaften Ausbildung des Strukturproteins Kollagen kommen (Vater et al. 2011; Franceschi and Iyer 1992). β -Glycerolphosphat gilt als zuverlässige Phosphatquelle bei der Ausbildung von Hydroxylapatit (Foster et al. 2006) und soll ebenfalls Einfluss auf die Expression osteogener Gene wie Bone Morphogenic Protein (BMP) und Osteopontin (OP) haben (Fatherazi et al. 2009). Es wird berichtet, dass β -Glycerolphosphat in Konzentration von mehr als 1 mM seine Wirkung entfalten kann, wobei insbesondere die Ausbildung von Hydroxylapatit zu nennen ist (Foster et al. 2006). Zu hohe Konzentrationen scheinen sich jedoch nachteilig auf die Proliferation der Zellen auszuwirken (Ariffin et al. 2017; Langenbach and Handschel 2013). Neben dem Nachweis von spezifischen Enzymen und Proteinen gilt vor allem das Vorhandensein von Hydroxylapatit als Charakteristikum für Osteoblasten bzw. terminal differenzierte Osteozyten (Beresford et al. 1994; Cheng et al. 1994; Jaiswal et al. 1997). Der Nachweis des Vorhandenseins von Hydroxylapatit wurde wegen einer hohen Spezifität zur Identifizierung von osteogenen Prozessen ausgewählt.

In den Versuchen dieser Arbeit zum Aufdecken von Mineralisationsprozessen wurde das Zellkulturmedium mit β -Glycerolphosphat in Konzentrationen von 5 mM oder 10 mM versetzt. Weitere Ansätze von Supplementen bestanden aus 5 mM ATP oder 5 mM GTP im Nährmedium. Es fand zudem ein Vergleich mit den Prozessen unter dem Einfluss von Zellkulturmedium ohne weitere Phosphatzusätze (s. Kapitel 2.3.1) und auch DAG-supplementiertem Medium statt. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine Aussage darüber, ob unter der Zugabe alternativer Phosphate eine veränderte Mineralisierung in der Kultur nachgewiesen werden kann und darüber hinaus auch, ob es ohne Zugabe von Phosphaten zu einer spontanen Mineralisierung kommt. In einer frühe-

ren Studie von Handschel et al. (2006) wurden murine Embryonale Stammzellen (ESC) unter anderem mit und ohne Zusatz von DAG kultiviert und ihr Mineralisationsverhalten überprüft. Handschel et al. (2008) konnten in Kulturen ohne DAG-Zusatz an Tag 14 mithilfe einer von-Kossa-Färbung keine Mineralisierung nachweisen. Beim Vergleich mit anderen Studien muss kritisch betrachtet werden, dass die Zellen in unseren Versuchen jeweils nur für 24 Stunden mit den Phosphatsupplementen behandelt wurden und im Anschluss wieder Standardzellkulturmedium zugesetzt bekamen. Zellen, die nach dem Standardprotokoll unter DAG in Kultur gehen, stehen zumeist für 14 bis 21 Tage unter dem Einfluss von β -Glyzerolphosphat (Jaiswal et al. 1997; Lammers et al. 2012). Jedoch wurde bereits in anderen Studien eine Kurzzeit-Supplementierung mit Phosphaten beschrieben. Rendenbach et al. (2014) verwendeten in ihren Versuchen murine Osteoblasten. Sie wurden zunächst mit Ascorbinsäure und β -Glyzerolphosphat vorkultiviert. Es folgte eine 18-stündige Inkubation ohne Phosphate. Abschließend wurden ihnen für 2 bzw. 6 Stunden 2 bzw. 4 mM-Phosphat zugesetzt, wodurch teils Änderungen der Expression knochen-spezifischer Marker nachgewiesen werden konnten. Bereits 1992 untersuchten Tenenbaum et al. (1992) den Einfluss von anorganischem Phosphat und Bisphosphonaten auf das Mineralisationsverhalten von Hühnerperiost-Kulturen (*chick periosteal cultures*). In den ersten 10 Tagen der Kultur konnte keine Mineralisation nachgewiesen werden, erst ab Tag 11. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass anorganisches Phosphat die Mineralisierung hemmt. Unter dem Einfluss von organischem Phosphat konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch nach 10 Tagen und einer Phosphatgabe von 24 Stunden bei Kulturbeginn schließlich Hydroxylapatit in USSC-Kulturen nachgewiesen werden konnte. Es ist somit davon auszugehen, dass die Gabe von organischen Phosphaten im Gegensatz zu anorganischen Phosphaten die Mineralisierung der USSCs fördert.

Da die osteoblastären Leitmarker auf molekularbiologischer Ebene in verschiedenen Phasen der Reifungskaskade exprimiert werden, bedarf der ausführliche molekularbiologische Nachweis einer osteogenen Differenzierung von Zellen in einem Zellverbund sicherlich einer längeren Zellkulturdauer sowie damit einhergehend einer ausgedehnten Kontaktzeit mit Phosphat-supplementiertem Medium. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Zellen in einem zweidimensionalen Modell wie in dieser Arbeit kultiviert werden oder aber in einem dreidimensionalen Modell. Dreidimensionale Modelle entstehen beispielsweise unter Zuhilfenahme von Trägermaterialien. Die osteoblastäre Entwicklung wird in vier Stadien unterteilt: 1. Differenzierung von einer Stammzelle in eine osteoblastäre Vorläuferzelle, 2. Proliferationsphase, 3. Phase der Matrixentwicklung und Matrixreifung sowie 4. Mineralisationsphase. In der Proliferationsphase dominiert die Expression von Kollagen Typ 1 (Koll 1). Gegen Ende dieser Phase und im Übergang zur Reifungsphase erreicht die Expression der Alkalischen Phosphatase (ALP) ihr Maximum. Osteopontin (OP) spielt am Ende der Reifungsphase sowie in der frühen Mineralisierungsphase eine Rolle, allerdings wird dieser letzte Abschnitt der Entwicklungskaskade von der Expression von Osteokalzin (OC) geprägt. Der Leitmarker der osteoblastären Entwicklung *Runx2* kann

in nahezu allen Entwicklungsstufen nachgewiesen werden. Er hat sowohl induzierende als auch inhibierende Effekte auf diverse Teilabschnitte der komplexen Vernetzung aus Osteoblasten-Entwicklung und Osteoblasten-Reifung im Bezug auf Auf- und Umbauprozessen von Knochen (Beck 2003; Vimalraj et al. 2015; Komori 2017). Die Bestimmung der osteoblastären Differenzierungsmarker könnte zukünftig auch in dem vorliegenden Versuchsansatz durchgeführt werden, um detaillierte Informationen der Zellentwicklung zu erhalten. Dabei könnten die Zellen entweder über die gesamte Kulturdauer mit alternativen Phosphaten versorgt werden oder aber wiederholt Kurzzeitsupplementierungen vorgenommen werden. Ein Vergleich mit DAG sollte dann für Kulturen erfolgen, die ebenfalls 14 bis 21 Tage inkubiert werden.

Aufgrund der relativ kurzen Kulturdauer lag das Augenmerk dieser Arbeit auf Mineralisierungsprozessen. Zum Nachweis von Hydroxylapatit werden in der Literatur am häufigste die Alizarinrot S-Färbung (Wang et al. 2006) oder auch die Von Kossa-Färbung (Bonewald et al. 2003) verwendet. Die Alizarinrot S-Färbung basiert auf einer Chelatbildung zwischen Alizarin und vorhandenem löslichem Kalzium, das sich rötlich färbt. Bei der Von Kossa-Färbung werden anorganische Bestandteile von Kalziumverbindungen durch Silberionen ausgetauscht und zu metallischem Silber reduziert, das sich im Mikroskop schwarz darstellt. Beide Verfahren haben den Nachteil, dass sie nur einen Nachweis für Kalzium liefern, das aber lediglich ein Bestandteil von Hydroxylapatit ist. In einer jüngeren Studie entwickelten Davari et al. (2017) eine *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy* (LIBS) Methode, um pathologische Mineralisationen in Herzklappen aufzuspüren. Sie konnten mit dieser Technik bereits nach 2 Tagen Kalziumansammlungen aufzeigen, die mit der Von Kossa-Färbung erst nach 4 bis 7 Tagen sichtbar wurden. Es sollte also bedacht werden, dass die Mineralisation in kurzzeitig supplementierten USSC-Kulturen mit Von Kossa-Färbungen unter Umständen nicht zuverlässig nachgewiesen werden. Für die vorliegende Arbeit wurde eine alternative Methode für den Hydroxylapatitnachweis verwendet. Das OsteoImage™ Mineralization Assay der Firma Lonza basiert auf der spezifischen Bindung eines fluoreszierenden Reagenz an das Hydroxylapatit. Die genaue Entstehungsweise der Bindung ist bisher noch nicht bekannt, jedoch sind in der Literatur Methoden einer spezifischen Bindung an das Hydroxylapatit beschrieben (Kasugai et al. 2000). Auch Mueller et al. (2014) nutzen zum Nachweis von Hydroxylapatit das OsteoImage™-Assay. Für ihre Versuche verwendeten sie multipotente Vorläuferzellen aus der Nabelschnur, in diesem Fall aus dem so genannten *Wharton Jelly*. Es handelt sich dabei um ein zellreiches, gallertartiges Bindegewebe in der Nabelschnur, in dem die Gefäße der Nabelschnur eingebettet sind. Die Zellen werden über 30 Tage mit einem osteogenen Medium versorgt, die Kontrollgruppe ohne Zusatz von DAG zeigte keine Mineralisation. In der vorliegenden Arbeit konnte in der Kontrollgruppe ebenfalls ein Fluoreszenzsignal unter Verwendung des OsteoImage™ detektiert werden, was ein Hinweis dafür ist, dass bei den USSCs spontane Mineralisierung auftritt. Dieses Phänomen konnte bereits in einer früheren Studie beobachtet werden. Dort konnte bei USSC-Kulturen auch ohne Zugabe von osteoinduktiven Zusätzen Hydroxylapatit nach 14 Tagen in Kultur nachgewiesen werden (Kersten-Thiele

2011). Dennoch scheint die Mineralisierung durch die Zugabe von Phosphaten beeinflussbar zu sein. Die energiereiche Verbindung **GTP** konnte in der vorliegenden Arbeit die Bildung von Hydroxylapatit deutlich verstärken. Die Gabe von **ATP** ging hingegen mit einer verminderten Proliferations- und Mineralisationsrate einher. In einer Studie mit Ratten-Osteoblasten wurde spezifisch die extrazelluläre **ATP**-Konzentration enzymatisch gesenkt, was im Vergleich mit der Kontrollgruppe zu einer erhöhten Mineralisation führte (Orriss et al. 2013). Auch der Einfluss von **GTP** auf die Mineralisation von Ratten-Osteoblasten wurde dort untersucht. **GTP** wurde in dieser Studie von Orriss et al. (2007) in Konzentrationen von $10\mu\text{M}$ und $100\mu\text{M}$ zugefügt. Die Osteoblasten wurden für 14 Tage mit den Nukleotidagonisten substituiert. Es zeigte sich, dass es in Anwesenheit von $10\mu\text{M}$ **GTP** zu einer 98-prozentigen Blockade der Mineralisation im Vergleich zur **DAG**-substituierten Kultur kam. Bei Zugabe von $100\mu\text{M}$ zur Kultur konnte dort gar keine Mineralisation nachgewiesen werden. Brandao-Burch et al. (2005) beschreiben in ihrer Arbeit, dass ein saurer pH-Wert die Mineralisation von Ratten-Osteoblasten hemmt. Die Anwesenheit von **GTP** im Zellkulturmedium führt zu einem Absinken des pH-Wertes. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kurzzeit-Supplementierung gewählt, um ein Übersäuern der Kultur zu vermeiden. Mit einer Konzentration von 5mM liegen die Werte hier deutlich über denen dieser Studie. Traut (1994) gibt als durchschnittliche physiologische Konzentrationen für **ATP** $2,1\mu\text{M}$ an, für **GTP** $305\mu\text{M}$. Für Gewebe werden höhere Konzentrationen beschrieben als für einzelne Zellen. Es könnte somit sinnvoll sein, zukünftig Versuche mit verschiedenen Konzentrationen zu wiederholen. Insbesondere die Variation der Konzentration von **GTP** als Zugabe zum Zellkulturmedium sowie die Dauer der Supplementierung könnten hier vielversprechende Ansätze sein, um Proliferation und Mineralisierung vorhersagbar zu beeinflussen.

Zur Analyse verschiedener Aspekte auf Transkriptionsebene wurde in der vorliegenden Untersuchung eine quantitative **RT-PCR** durchgeführt. Die Primersequenzen für die Amplifikation wurden aus den humanspezifischen Sequenzen der Gendatenbank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) abgeleitet (s. Tabelle 8). Alle verwendeten Primer stammen aus einer einzigen Primersynthese und wurden zur Vergleichbarkeit für alle Versuche verwendet. Dies diente somit der Minimierung systematischer Fehler. Die genspezifischen Sonden stammten aus der Universal Probe Library der Firma Roche (s. Tabelle 9).

Die untersuchten Gene ließen sich verschiedenen Gruppierungen zuordnen. So wurden mit **NELL1**, **PIT1** und **PIT2** Expressionsänderungen bestimmt, die Rückschlüsse auf den Phosphathaushalt zulassen. Die Variationen in der Expression des Hitzeschockproteins **Hsp60** sollte Informationen darüber liefern, ob die Kulturen unter der Zugabe der Supplemente einen erhöhten Stresslevel erreichen.

Änderungen der Genexpression werden in der Literatur bei Werten ± 2 als signifikant angenommen. Alle Ergebnisse sind auf das Referenzgen **GAPDH** normiert (s. Kapitel 2.4.5). Der konstante Wert 1 für die Kontrollgruppen (Abb. 10) ist Folge der gängigen Darstellung und ist nicht als Zyklusänderung anzusehen (Liedtke et al. 2017).

Änderungen der Expression von CyclinB und CyclinE als Zellzyklusmarker sollten Hinweise darauf liefern, ob die Phosphate die Zellteilung beeinflussen können. Killin gilt als Tumorsuppressor, Expressionsänderungen ermöglichen ebenfalls Rückschlüsse auf die Zellteilung.

Der Nachweis von Expressionsänderungen für Notch3 als Stammzellregulator sollte helfen herauszufinden, ob die USSC-Kulturen durch die Zugabe von alternativen Phosphatquellen in ihrem Stammzellpotenzial beeinflusst werden.

N-Cadherin und Vinculin sind Marker für Zell-Zell-Kontakte. Änderungen ihrer Expression können zeigen, ob die Zellen in ihrer direkten Kommunikation beeinflusst werden. RUNX2b gilt als einer der Schlüsselmarker für die osteoblastäre Differenzierung, es wird auch als „Master Gen“ bezeichnet.

Die RNA-Isolierung erfolgte jeweils aus dem gesamten Zellrasen einer Kultur. Die Ergebnisse beziehen sich somit auf die mittlere Transkription der RNA aller Zellen einer Kultur und nicht in einer einzelnen Zelle. Zellen einer Flasche weisen nämlich nicht alle den gleichen Differenzierungsstatus auf. Insbesondere die Zelldichte und die damit verbundene Nährstoffsättigung spielen dabei eine wichtige Rolle.

Für die Analyse wurde das Referenzgen GAPDH für jede Platte separat gemessen. Auch der Mastermix wurde für jede Platte separat angesetzt.

Da die isolierte RNA ausschließlich aus zweidimensionalen Zellkulturen hervorging und die beteiligten Zellen mit 24-stündigem initialen Phosphatstimulus jeweils nur für 10 Tage kultiviert wurden, waren die Marker verschiedener Nischen von besonderem Interesse. Der Vergleich mit dem etablierten osteogenen Supplement DAG wurde im Hinblick auf die Proliferation und die Mineralisation durchgeführt. In zukünftigen Versuchen könnte der Aspekt der Genexpression hier ebenfalls untersucht werden, um beurteilen zu können, wie Phosphatquellen sich im Gegensatz zu DAG-Einfluss auswirken.

Mit Vinculin wurde ein Protein untersucht, das Bestandteil von Zell-Zell-Kontakten ist und an Aktin bindet (Xu et al. 1998; Bays and DeMali 2017). Es ist anzunehmen, dass Zellen mit erhöhter Teilungsbereitschaft auch vermehrt Zell-Zell-Kontakte ausbilden. Anselme (2000) beleuchtet in ihrem Review-Artikel die Funktionen von Vinculin. Sie beschreibt, dass eine hohe Expression von Vinculin mit einer verminderten Zellwanderung und umgekehrt eine verminderte Expression erhöhte Zellbewegungen bedeuten. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnten weder unter dem Einfluss der verschiedenen Phosphatsupplemente noch in der Kontrollgruppe Expressionsunterschiede für Vinculin nachgewiesen werden. Es ist denkbar, dass dies einerseits auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass die Zellen in Zellkulturflaschen nicht so adhärent wachsen wie auf Biomaterialien, andererseits könnte es auch sein, dass die Zellen im Untersuchungszeitraum nicht konfluent genug wachsen, um einen Effekt bei der Expression von Vinculin messen zu können. Es könnte interessant sein, die Versuche zukünftig unter abgewandelten Rahmenbedingungen zu wiederholen. Ein Vergleich zwischen Kulturen, die in Zellkulturflaschen und auf Biomaterialien wachsen, wäre hier genauso denkbar wie ein Vergleich

mit Kulturen, die über einen längeren Zeitraum in Zellkulturflaschen oder auf Multiwellplatten gewachsen sind.

Der Nachweis von Cyclin B2, einem Zellzyklusmarker, sollte Aufschluss über das Proliferationsverhalten der Zellen geben. Cyclin B2 wird vor allem am Übergang von der G₂-Phase in die M-Phase der Mitose exprimiert. Die G₂-Phase ist die Phase, in der die Zelle wächst, die Proteinbiosynthese und RNA-Synthese stattfinden und die Replikation auf Fehler hin untersucht wird, ehe die Zelle in der M-Phase eine erneute Teilung durchläuft. Im Anschluss an die M-Phase kann die Zelle entweder in die G₀-Phase übergehen oder aber in die Synthesephase zur Vorbereitung einer abermaligen Zellteilung übergehen. Die G₀-Phase ist eine Ruhephase, die insbesondere von Stammzellen häufig eingenommen wird, oft sogar für viele Jahre. [Smith et al. \(1995\)](#) konnten in ihren Versuchen darlegen, dass die Expression von Cyclin B2 in Ratten-Osteoblasten an das Differenzierungsstadium der Zellen gekoppelt ist. Zellkulturen, in denen die Proliferation überwog, zeigten dort noch keinen Anstieg von Cyclin B2. [ATP](#)- und [GTP](#)-Supplementierung führte in der vorliegenden Arbeit zu einer erhöhten Expression von Cyclin B2. Dahingegen ließen sich in den Kulturen, denen β -Glyzerolphosphat zugefügt wurden, keine Expressionsunterschiede nachweisen. Beim Proliferations-Assay (CyQuant[®]) konnte in den Gruppen, die [ATP](#) und [GTP](#) erhielten, kein Anstieg der Zellzahlen gemessen werden. In Anlehnung an die Beobachtungen von [Smith et al. \(1995\)](#) könnte die Ursache dafür sein, dass die [USSCs](#) vor allem differenzieren. Im Vergleich mit β -Glyzerolphosphat, das allgemein bekannt die osteogene Differenzierung fördert, hier aber keinen Effekt auf die Expression von CyclinB2 hat, könnte zudem geschlossen werden, dass die Zellen unter [ATP](#) und [GTP](#) verstärkt proliferieren, allerdings im sauren Milieu nicht überleben, was mit den Ergebnissen aus dem Proliferations-Assay in Einklang gebracht werden könnte. [Rajgopal et al. \(2007\)](#) konnten einen Zusammenhang zwischen dem Schlüsselmarker der osteogenen Differenzierung [Runx2](#) und einem Komplex aus der Kinase CDK1 und Cyclin B2 herleiten, wobei humane Osteosarkoma-Zellen untersucht wurden. Es konnte nachweisen werden, dass [Runx2](#) während der Mitose von dem CDK1/Cyclin B2 Komplex phosphoryliert wird und diese Form schlussendlich chromosomengebunden ist. Dies ist insofern interessant, als [ATP](#) und insbesondere [GTP](#) in den Versuchen dieser Arbeit Cyclin B2 hochregulieren konnten. Es könnte als aussichtsreiches Indiz dafür angesehen werden, dass die alternative Zugabe dieser Phosphatquellen die osteogene Differenzierung fördert.

Der Zusammenhang zwischen Notch-Signalwegen und der osteogenen Differenzierung wird in der Literatur kontrovers beschrieben. Einigkeit besteht darin, dass die Wirkungsweise von Notch auf die Zellen vom betrachteten Zellverbund abhängt. In den meisten Fällen führt die Aktivierung von Notch jedoch zu einer Hemmung der Knochenbildung ([Zanotti and Canalis 2012](#); [Penton et al. 2012](#)). Im Kontext mit den Schlussfolgerungen, die [Dou et al. \(2017\)](#) aus ihrer Studie ziehen, erlangt die in der vorliegenden Untersuchung gemachte Beobachtung, dass nämlich die Expression von Notch3 unter dem Einfluss von [GTP](#) steigt, besondere Bedeutung. [Dou et al. \(2017\)](#) beschrieben, dass das gezielte Abschalten von Notch3 in Zellkulturen aus

dem *Torus mandibulae*, einer gutartigen Hyperossifikation des Unterkiefers, zu einer verstärkten Mineralisierung führte. [Canalis et al. \(2013\)](#) konnten zudem nachweisen, dass Notch3 auf Osteoblasten und ihre Vorläuferzellen negative Auswirkungen im Sinne von Knochenfehlbildungen und anderen Erkrankungen hatte, bei reifen Osteozyten hingegen zu einer erhöhten Knochenmasse führte. Die Beobachtungen in dieser Arbeit, dass **GTP** sowohl die Expression von Cyclin B2 als auch die von Notch3 begünstigt, ist entsprechend besonders interessant. Sie könnten darauf hinweisen, dass die **USSCs** unter dem Stimulus von **GTP** einerseits den Weg der osteogenen Differenzierung einschlagen, andererseits aber auch nicht zu stark proliferieren. Untermuert wird diese These durch das Verhältnis von Mineralisation und Proliferation aus dieser Studie: unter **GTP**-Einfluss kommt es zu spezifischer Mineralisierung bei verminderter Proliferation.

Schlussfolgerungen

Mit der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Phosphate auf die Proliferation, Mineralisierung und den Zellzyklus sowie auf Zell-Zell-Kontakte humaner Nabelschnurblutstammzellen (USSC) untersucht. Es wurde überprüft, ob die USSCs ihr Proliferations-, Mineralisations- und Differenzierungsverhalten verändern, wenn ihnen anstelle der etablierten Phosphatzusätze wie β -Gly Phosphat in Form von ATP und GTP zugeführt wird.

Das Proliferationsverhalten wurde mittels eines *cell proliferation assays* (CyQUANT®), das unspezifisch an Nukleinsäuren bindet, analysiert. Dabei wurden vier verschiedene Zelllinien miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass durch die Wahl der Phosphatquelle das Proliferationsverhalten der Zellen beeinflusst werden konnte.

In einem weiteren Versuch wurden die USSCs einem eintägigen Phosphatstimulus ausgesetzt und anschließend für weitere 9 Tage kultiviert. Bei gleichem Versuchsaufbau wurde außerdem mithilfe eines fluoreszenzmarkierten, spezifisch an Hydroxylapatit bindenden Agens (OsteoImage™), das Mineralisationsverhalten der Zellen quantifiziert. Die Wahl des Phosphat-supplements führte zu einer messbaren Beeinflussung des Mineralisationsmusters der USSCs. Der Einfluss der unterschiedlichen Phosphatquellen auf den Zellzyklus und Zell-Zell-Kontakte wurde über verschiedene Transkriptionsprofile in einer RT-qPCR betrachtet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Phosphatquellen zu Variationen, insbesondere der Expression von Zellzyklusmarkern, führten.

Die Ergebnisse dieser Studie liefern Hinweise, dass alternative Phosphatquellen wie die körpereigenen Energielieferanten ATP und GTP zur Regulierung von Proliferations- und Mineralisierungsprozessen in USSC-Kulturen heran gezogen werden können. Im Einklang mit den positiven Eigenschaften der USSCs zeigen sich hier neue Ansätze im modernen *Tissue Engineering*, dessen Ziel letztendlich die Regeneration von Knochengewebe ist. Weitere Untersuchungen und eine Übertragbarkeit der *in vitro*-Ergebnisse auf *in vivo*-Studien sind weiterhin erforderlich, um zukünftig eine klinische Anwendung des *Tissue Engineering* am Patienten zu ermöglichen.

Literaturverzeichnis

- Aaron, R. K., Boyan, B. D., Ciombor, D. M., Schwartz, Z., Simon, B. J. Feb 2004. Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res* (419), 30–37.
- Allgrove, J., Adami, S., Manning, R. M., O’Riordan, J. L. Feb 1985. Cytochemical bioassay of parathyroid hormone in maternal and cord blood. *Arch Dis Child* 60 (2), 110–115.
- Allgrove, J., Shaw, N., Karger, S. 2009. Calcium and bone disorders in children and adolescents. Vol. 16. Karger, Basel.
- Anselme, K. 2000. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21 (7), 667 – 681.
- Ariffin, S. H., Manogaran, T., Abidin, I. Z., Wahab, R. M., Senafi, S. 2017. A Perspective on Stem Cells as Biological Systems that Produce Differentiated Osteoblasts and Odontoblasts. *Curr Stem Cell Res Ther* 12 (3), 247–259.
- Bays, J. L., DeMali, K. A. Aug 2017. Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions. *Cell Mol Life Sci* 74 (16), 2999–3009.
- Beck, G. R. Oct 2003. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 90 (2), 234–243.
- Bellows, C. G., Aubin, J. E., Heersche, J. N., Antosz, M. E. Mar 1986. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 38 (3), 143–154.
- Benito, A. I., Diaz, M. A., Gonzalez-Vicent, M., Sevilla, J., Madero, L. Apr 2004. Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical results. *Bone Marrow Transplant* 33 (7), 675–690.
- Beresford, J. N., Joyner, C. J., Devlin, C., Triffitt, J. T. Nov 1994. The effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells in vitro. *Arch Oral Biol* 39 (11), 941–947.
- Bhargava, U., Bar-Lev, M., Bellows, C. G., Aubin, J. E. 1988. Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvaria cells. *Bone* 9 (3), 155–163.
- Bonewald, L. F., Harris, S. E., Rosser, J., Dallas, M. R., Dallas, S. L., Camacho, N. P., Boyan, B., Boskey, A. May 2003. von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcif Tissue Int* 72 (5), 537–547.

- Bradstock, K. F., Hertzberg, M. S., Kerridge, I. H., Svennilson, J., McGurgan, M., Huang, G., Antonenas, V., Gottlieb, D. J. Jun 2006. Unrelated umbilical cord blood transplantation for adults with haematological malignancies: results from a single Australian centre. *Intern Med J* 36 (6), 355–361.
- Brandao-Burch, A., Utting, J. C., Orriss, I. R., Arnett, T. R. Sep 2005. Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. *Calcif Tissue Int* 77 (3), 167–174.
- Buck, D. W., Dumanian, G. A. Jun 2012. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg* 129 (6), 1314–1320.
- Buckwalter, J., Glimcher, M., Cooper, R., Recker, R. 1996. Bone biology. i: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional course lectures* 45, 371.
- Burt, R. K., Verda, L., Kim, D. A., Oyama, Y., Luo, K., Link, C. Apr 2004. Embryonic stem cells as an alternate marrow donor source: engraftment without graft-versus-host disease. *J Exp Med* 199 (7), 895–904.
- Canalis, E., Adams, D. J., Boskey, A., Parker, K., Kranz, L., Zanotti, S. Aug 2013. Notch signaling in osteocytes differentially regulates cancellous and cortical bone remodeling. *J Biol Chem* 288 (35), 25614–25625.
- Cheng, S. L., Yang, J. W., Rifas, L., Zhang, S. F., Avioli, L. V. Jan 1994. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134 (1), 277–286.
- Cogle, C. R., Guthrie, S. M., Sanders, R. C., Allen, W. L., Scott, E. W., Petersen, B. E. Aug 2003. An overview of stem cell research and regulatory issues. *Mayo Clin Proc* 78 (8), 993–1003.
- Covas, D. T., Piccinato, C. E., Orellana, M. D., Siufi, J. L., Silva, W. A., Proto-Siqueira, R., Rizzatti, E. G., Neder, L., Silva, A. R., Rocha, V., Zago, M. A. Oct 2005. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. *Exp Cell Res* 309 (2), 340–344.
- Davari, S. A., Masjedi, S., Ferdous, Z., Mukherjee, D. May 2017. In-vitro analysis of early calcification in aortic valvular interstitial cells using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). *J Biophotonics* 10, 735.
- Degistirici, O., Jager, M., Knipper, A. Jun 2008. Applicability of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells in tissue engineering concepts. *Cell Prolif* 41 (3), 421–440.
- Deprich, R., Handschel, J., Sebald, W., Kubler, N. R., Wurzler, K. K. Nov 2005. Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein (BMP) mutants. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9 (6), 363–368.
- D’Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A., Howard, G. A. Jul 1999. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 14 (7), 1115–1122.

- Dou, X. W., Park, W., Lee, S., Zhang, Q. Z., Carrasco, L. R., Le, A. D. Mar 2017. Loss of Notch3 Signaling Enhances Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells from Mandibular Torus. *J Dent Res* 96 (3), 347–354.
- Downey, P. A., Siegel, M. I. Jan 2006. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther* 86 (1), 77–91.
- Ducy, P., Schinke, T., Karsenty, G. Sep 2000. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289 (5484), 1501–1504.
- Fatherazi, S., Matsa-Dunn, D., Foster, B. L., Rutherford, R. B., Somerman, M. J., Presland, R. B. Jan 2009. Phosphate regulates osteopontin gene transcription. *J Dent Res* 88 (1), 39–44.
- Foster, B. L., Nociti, F. H., Swanson, E. C., Matsa-Dunn, D., Berry, J. E., Cupp, C. J., Zhang, P., Somerman, M. J. Feb 2006. Regulation of cementoblast gene expression by inorganic phosphate in vitro. *Calcif Tissue Int* 78 (2), 103–112.
- Franceschi, R. T., Iyer, B. S. Feb 1992. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 7 (2), 235–246.
- Frenkel, G., Niederdellmann, H. Nov 1975. Use of compact aluminum oxide ceramics for reconstruction of the temporomandibular joint. *Quintessenz* 26 (11), 37–44.
- Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyanyan, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V., Komm, B. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S., Lian, J. B. Sep 2005. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 280 (39), 33132–33140.
- Ghosh, A. K., Joshi, S. R. Aug 2008. Disorders of calcium, phosphorus and magnesium metabolism. *J Assoc Physicians India* 56, 613–621.
- Greene, J., Rao, V. 1998. Recombinant DNA principles and methodologies. Vol. 1. New York: Marcel Dekker.
- Gstraunthaler, G., Lindl, T. 2013. Zell-und Gewebekultur: allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. Vol. 7. Springer, Heidelberg.
- Habener, J. F., Amherdt, M., Ravazzola, M., Orci, L. Mar 1979. Parathyroid hormone biosynthesis. Correlation of conversion of biosynthetic precursors with intracellular protein migration as determined by electron microscope autoradiography. *J Cell Biol* 80 (3), 715–731.
- Habener, J. F., Kronenberg, H. M. Oct 1978. Parathyroid hormone biosynthesis: structure and function of biosynthetic precursors. *Fed Proc* 37 (12), 2561–2566.
- Handschel, J., Berr, K., Depprich, R., Naujoks, C., Kubler, N. R., Meyer, U., Ommerborn, M., Lammers, L. May 2009. Compatibility of embryonic stem cells with biomaterials. *J Biomater Appl* 23 (6), 549–560.
- Handschel, J., Berr, K., Depprich, R. A., Kubler, N. R., Naujoks, C., Wiesmann, H. P., Ommerborn, M. A., Meyer, U. Jun 2008. Induction of osteogenic markers in differentially treated cultures of embryonic stem cells. *Head Face Med* 4, 10.

- Handschel, J., Naujoks, C., Langenbach, F., Berr, K., Depprich, R. A., Ommerborn, M. A., Kubler, N. R., Brinkmann, M., Kogler, G., Meyer, U. Aug 2010. Comparison of ectopic bone formation of embryonic stem cells and cord blood stem cells in vivo. *Tissue Eng Part A* 16 (8), 2475–2483.
- Handschel, J., Wiesmann, H. P., Depprich, R., Kubler, N. R., Meyer, U. 2006. Cell-based bone reconstruction therapies—cell sources. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21 (6), 890–898.
- Handschel, J., Wiesmann, H. P., Stratmann, U., Kleinheinz, J., Meyer, U., Joos, U. Apr 2002. TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials* 23 (7), 1689–1695.
- Heng, B. C., Cao, T., Stanton, L. W., Robson, P., Olsen, B. Sep 2004. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner Res* 19 (9), 1379–1394.
- Holmes, S. B., Lloyd, T., Coghlan, K. M., Newman, L. Mar 2002. Distraction osteogenesis of the mandible in the previously irradiated patient. *J Oral Maxillofac Surg* 60 (3), 305–309.
- Hong, D., Chen, H. X., Xue, Y., Li, D. M., Wan, X. C., Ge, R., Li, J. C. Aug 2009. Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 116 (1-2), 86–92.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. Jun 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6 (4), 279–284.
- In 't Anker, P. S., Scherjon, S. A., Kleijburg-van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M., Claas, F. H., Fibbe, W. E., Kanhai, H. H. 2004. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 22 (7), 1338–1345.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., Bruder, S. P. Feb 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64 (2), 295–312.
- Jepsen, K. J. 2009. Systems analysis of bone. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1 (1), 73–88.
- Jerosch, J., Bader, A., Uhr, G. 2002. Knochen: Curasan-Taschenatlas spezial. Vol. 1. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Jones, L. J., Gray, M., Yue, S. T., Haugland, R. P., Singer, V. L. Aug 2001. Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay. *J Immunol Methods* 254 (1-2), 85–98.
- Juppner, H. Oct 2007. Novel regulators of phosphate homeostasis and bone metabolism. *Ther Apher Dial* 11 Suppl 1, 3–22.
- Kasugai, S., Fujisawa, R., Waki, Y., Miyamoto, K., Ohya, K. May 2000. Selective drug delivery system to bone: small peptide (Asp)₆ conjugation. *J Bone Miner Res* 15 (5), 936–943.
- Kaufman, M. H., Robertson, E. J., Handyside, A. H., Evans, M. J. Feb 1983. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 73, 249–261.

- Kersten-Thiele, P. V. 2011. Osteogene Differenzierung von humanen Nabelschnurblutstammzellen (USSC) in der adhärennten Zellkultur sowie auf boviner, kollagener Knochenmatrix. Hochschulschrift [Dissertation], Gießen: Justus-Liebig-Universität, urn:nbn:de:hebis:26-opus-81932.
- Kim, D. H., Rhim, R., Li, L., Martha, J., Swaim, B. H., Banco, R. J., Jenis, L. G., Tromanhauser, S. G. Nov 2009. Prospective study of iliac crest bone graft harvest site pain and morbidity. *Spine J* 9 (11), 886–892.
- Kleen, T. O., Kadereit, S., Fanning, L. R., Jaroscak, J., Fu, P., Meyerson, H. J., Kulchycki, L., Slivka, L. F., Kozik, M., Tary-Lehmann, M., Laughlin, M. J. Nov 2005. Recipient-specific tolerance after HLA-mismatched umbilical cord blood stem cell transplantation. *Transplantation* 80 (9), 1316–1322.
- Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A. 2009. Physiologie. Vol. 6. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kogler, 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. Jul 2004. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200 (2), 123–135.
- Komori, T. 2010. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol* 658, 43–49.
- Komori, T. 2017. Roles of Runx2 in Skeletal Development. *Adv Exp Med Biol* 962, 83–93.
- Krishnan, L., Willett, N. J., Guldberg, R. E. Feb 2014. Vascularization strategies for bone regeneration. *Ann Biomed Eng* 42 (2), 432–444.
- Kubler, N. R., Reuther, J. F., Faller, G., Kirchner, T., Ruppert, R., Sebald, W. Aug 1998. Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27 (4), 305–309.
- Kuratani, S. Nov 2004. Evolution of the vertebrate jaw: comparative embryology and molecular developmental biology reveal the factors behind evolutionary novelty. *J Anat* 205 (5), 335–347.
- Lammers, L., Naujoks, C., Berr, K., Depprich, R., Kubler, N., Meyer, U., Langenbach, F., Luttenberg, B., Kogler, G., Wiesmann, H. P., Handschel, J. Mar 2012. Impact of DAG stimulation on mineral synthesis, mineral structure and osteogenic differentiation of human cord blood stem cells. *Stem Cell Res* 8 (2), 193–205.
- Langenbach, F., Handschel, J. 2013. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther* 4 (5), 117.
- Langenbach, F., Naujoks, C., Kersten-Thiele, P. V., Berr, K., Depprich, R. A., Kubler, N. R., Kogler, G., Handschel, J. Feb 2010. Osteogenic differentiation influences stem cell migration out of scaffold-free microspheres. *Tissue Eng Part A* 16 (2), 759–766.

- Leake, D. L., Habal, M. B. Jul 1976. Craniofacial contour defect reconstruction with a dacron/urethane composite: an alloplastic tray for bone induction fabrication and application. *J Biomed Mater Res* 10 (4), 555–560.
- Leucht, P., Kim, J. B., Amasha, R., James, A. W., Girod, S., Helms, J. A. Sep 2008. Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development* 135 (17), 2845–2854.
- Liedtke, S., Sacchetti, B., Laitinen, A., Donsante, S., Klockers, R., Laitinen, S., Riminucci, M., Kogler, G. Oct 2017. Low oxygen tension reveals distinct HOX codes in human cord blood-derived stromal cells associated with specific endochondral ossification capacities in vitro and in vivo. *J Tissue Eng Regen Med* 11 (10), 2725–2736.
- Lu, W., McCallum, L., Irvine, A. E. Jun 2009. A rapid and sensitive method for measuring cell adhesion. *J Cell Commun Signal* 3 (2), 147–149.
- Mann, J. 2007. Untersuchung des Differenzierungspotenzials von USSC in vitro und in vivo im Hühnerembryomodell. *Hochschulschrift [Dissertation]*, Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität, urn:nbn:de:hbz:061-20070705-141544-3.
- Markov, V., Kusumi, K., Tadesse, M. G., William, D. A., Hall, D. M., Louney, V., Carlton, A., Leonard, J., Cohen, R. I., Rappaport, E. F., Saitta, B. Feb 2007. Identification of cord blood-derived mesenchymal stem/stromal cell populations with distinct growth kinetics, differentiation potentials, and gene expression profiles. *Stem Cells Dev* 16 (1), 53–73.
- Marks, S., Hermey, D. 1996. The structure and development of bone. *Principles of bone biology* 1, 3–14.
- Marks, S. C., Popoff, S. N. Sep 1988. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 183 (1), 1–44.
- Martin, G. R. Dec 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 (12), 7634–7638.
- Mayer, G. 2007. Phosphathaushalt bei chronischer niereninsuffizienz. *Der Nephrologe* 2 (4), 287–294.
- McCulloch, C. A., Strugurescu, M., Hughes, F., Melcher, A. H., Aubin, J. E. May 1991. Osteogenic progenitor cells in rat bone marrow stromal populations exhibit self-renewal in culture. *Blood* 77 (9), 1906–1911.
- Meyer, U., Meyer, T., Wiesmann, H. P. 2006. *Bone and cartilage engineering*. Vol. 1. Springer, Heidelberg.
- Mikami, Y., Omoteyama, K., Kato, S., Takagi, M. Oct 2007. Inductive effects of dexamethasone on the mineralization and the osteoblastic gene expressions in mature osteoblast-like ROS17/2.8 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 362 (2), 368–373.
- Moosmann, S., Hutter, J., Moser, C., Krombach, F., Huss, R. 2005. Milieu-adopted in vitro and in vivo differentiation of mesenchymal tissues derived from different adult human CD34-negative progenitor cell clones. *Cells Tissues Organs (Print)* 179 (3), 91–101.

- Mueller, A. A., Forraz, N., Gueven, S., Atzeni, G., Degoul, O., Pagnon-Minot, A., Hartmann, D., Martin, I., Scherberich, A., McGuckin, C. Jul 2014. Osteoblastic differentiation of Wharton jelly biopsy specimens and their mesenchymal stromal cells after serum-free culture. *Plast Reconstr Surg* 134 (1), 59e–69e.
- Naujoks, C., Langenbach, F., Berr, K., Depprich, R., Kubler, N., Meyer, U., Handschel, J., Kogler, G. Jan 2011. Biocompatibility of osteogenic predifferentiated human cord blood stem cells with biomaterials and the influence of the biomaterial on the process of differentiation. *J Biomater Appl* 25 (5), 497–512.
- Naujoks, C., Von Beck, F. P., Langenbach, F., Hentschel, M., Berr, K., Hofer, M., Depprich, R., Kubler, N., Handschel, J. 2013. Biocompatibility of membranes with unrestricted somatic stem cells. *In Vivo* 27 (1), 41–47.
- Nkenke, E., Radespiel-Troger, M., Wiltfang, J., Schultze-Mosgau, S., Winkler, G., Neukam, F. W. Oct 2002. Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 13 (5), 514–521.
- Nkenke, E., Schultze-Mosgau, S., Radespiel-Troger, M., Kloss, F., Neukam, F. W. Oct 2001. Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res* 12 (5), 495–502.
- Nkenke, E., Weisbach, V., Winckler, E., Kessler, P., Schultze-Mosgau, S., Wiltfang, J., Neukam, F. W. Mar 2004. Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33 (2), 157–163.
- Nolan, T., Hands, R. E., Bustin, S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1 (3), 1559–1582.
- Orriss, I. R., Key, M. L., Hajjawi, M. O., Arnett, T. R. 2013. Extracellular ATP released by osteoblasts is a key local inhibitor of bone mineralisation. *PLoS ONE* 8 (7), e69057.
- Orriss, I. R., Utting, J. C., Brandao-Burch, A., Colston, K., Grubb, B. R., Burnstock, G., Arnett, T. R. Sep 2007. Extracellular nucleotides block bone mineralization in vitro: evidence for dual inhibitory mechanisms involving both P2Y2 receptors and pyrophosphate. *Endocrinology* 148 (9), 4208–4216.
- Penton, A. L., Leonard, L. D., Spinner, N. B. Jun 2012. Notch signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol* 23 (4), 450–457.
- Pfaffl, M. W. May 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29 (9), e45.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., Marshak, D. R. Apr 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 (5411), 143–147.
- Pochon, J. P., Kloti, J. Aug 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), 387–398.
- Quarto, R., Thomas, D., Liang, C. T. Feb 1995. Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif Tissue Int* 56 (2), 123–129.
- Rajgopal, A., Young, D. W., Mujeeb, K. A., Stein, J. L., Lian, J. B., van Wijnen, A. J., Stein, G. S. Apr 2007. Mitotic control of RUNX2 phosphorylation by both CDK1/cyclin B kinase and PP1/PP2A phosphatase in osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 100 (6), 1509–1517.
- Rassow, J., Hauser, K., Deutzmann, R., Netzker, R. 2012. *Duale Reihe Biochemie. Vol. 3.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Rendenbach, C., Yorgan, T. A., Heckt, T., Otto, B., Baldauf, C., Jeschke, A., Streichert, T., David, J. P., Amling, M., Schinke, T. May 2014. Effects of extracellular phosphate on gene expression in murine osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 94 (5), 474–483.
- Robey, P. G. Dec 2011. Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but promising). *Tissue Eng Part B Rev* 17 (6), 423–430.
- Rodan, G. A. 1992. Introduction to bone biology. *Bone* 13 Suppl 1, 3–6.
- Rohen, J. W. 2001. *Funktionelle Neuroanatomie: Lehrbuch und Atlas. Vol. 6.* Schattauer Verlag, Stuttgart.
- Rouwkema, J., Rivron, N. C., van Blitterswijk, C. A. Aug 2008. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 26 (8), 434–441.
- Salhi, Y. 2010. Optimierung der Proliferationsrate humaner mesenchymaler Stammzellen zum Zwecke des Tissue Engineering. *Hochschulschrift [Dissertation]*, Hamburg: Universität Hamburg, urn:nbn:de:gbv:18-51139.
- Sasso, R. C., LeHuec, J. C., Shaffrey, C. Feb 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, 77–81.
- Sbordone, C., Toti, P., Guidetti, F., Califano, L., Santoro, A., Sbordone, L. Nov 2012. Volume changes of iliac crest autogenous bone grafts after vertical and horizontal alveolar ridge augmentation of atrophic maxillas and mandibles: a 6-year computerized tomographic follow-up. *J Oral Maxillofac Surg* 70 (11), 2559–2565.
- Scheerlinck, L. M., Muradin, M. S., van der Bilt, A., Meijer, G. J., Koole, R., Van Cann, E. M. 2013. Donor site complications in bone grafting: comparison of iliac crest, calvarial, and mandibular ramus bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 28 (1), 222–227.
- Schmidt, R. F., Lang, F., Heckmann, M. 2010. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie. Vol. 31.* Springer, Heidelberg.
- Schrödel, A. 2009. Kryokonservierung von eukaryotischen zellkulturzellen. *Biologie in unserer Zeit* 39 (5), 308–308.

- Sen, M. K., Miclau, T. Mar 2007. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury* 38 Suppl 1, 75–80.
- Shafiee, A., Seyedjafari, E., Soleimani, M., Ahmadbeigi, N., Dinarvand, P., Ghaemi, N. Jun 2011. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnol Lett* 33 (6), 1257–1264.
- Smith, E., Frenkel, B., Schlegel, R., Giordano, A., Lian, J. B., Stein, J. L., Stein, G. S. Nov 1995. Expression of cell cycle regulatory factors in differentiating osteoblasts: postproliferative up-regulation of cyclins B and E. *Cancer Res* 55 (21), 5019–5024.
- Smolka, W., Eggenesperger, N., Carollo, V., Ozdoba, C., Iizuka, T. Apr 2006. Changes in the volume and density of calvarial split bone grafts after alveolar ridge augmentation. *Clin Oral Implants Res* 17 (2), 149–155.
- Sommer, S., Berndt, T., Craig, T., Kumar, R. Mar 2007. The phosphatonins and the regulation of phosphate transport and vitamin D metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103 (3-5), 497–503.
- Sommerfeldt, D. W., Rubin, C. T., Rubin, C. T. Oct 2001. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 10 Suppl 2, 86–95.
- Springfield, D. Jul 1996. Autograft reconstructions. *Orthop Clin North Am* 27 (3), 483–492.
- Suchanek, J., Soukup, T., Ivancakova, R., Karbanova, J., Hubkova, V., Pytlik, R., Kucerova, L. 2007. Human dental pulp stem cells— isolation and long term cultivation. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 50 (3), 195–201.
- Suda, T., Takahashi, N., Martin, T. J. Feb 1992. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 13 (1), 66–80.
- Tenenbaum, H. C., Torontali, M., Sukhu, B. 1992. Effects of bisphosphonates and inorganic pyrophosphate on osteogenesis in vitro. *Bone* 13 (3), 249–255.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. Oct 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75 (2-3), 291–295.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. Nov 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 (5391), 1145–1147.
- Traut, T. W. Nov 1994. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry* 140 (1), 1–22.
- Trounson, A. 2002. Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types. *Reprod Biomed Online* 4 Suppl 1, 58–63.
- Vater, C., Kasten, P., Stiehler, M. Feb 2011. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 7 (2), 463–477.

- Vimalraj, S., Arumugam, B., Miranda, P. J., Selvamurugan, N. 2015. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol* 78, 202–208.
- Wang, Y. H., Liu, Y., Maye, P., Rowe, D. W. 2006. Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes. *Biotechnol Prog* 22 (6), 1697–1701.
- Wiesmann, H. P., Joos, U., Meyer, U. Sep 2004. Biological and biophysical principles in extra-corporal bone tissue engineering. Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33 (6), 523–530.
- Wilz, D. R., Gray, R. W., Dominguez, J. H., Lemann, J. Oct 1979. Plasma 1,25-(OH)₂-vitamin D concentrations and net intestinal calcium, phosphate, and magnesium absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 32 (10), 2052–2060.
- Wobus, A. M., Boheler, K. R. 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiological reviews* 85 (2), 635–678.
- Xu, W., Baribault, H., Adamson, E. D. Jan 1998. Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development* 125 (2), 327–337.
- Yamamuro, T., Hench, L., Wilson, J. 1990. *CRC Handbook of Bioactive Ceramics: Calcium Phosphate and Hydroxylapatite Ceramics*. C R C Press LLC, Boca Raton Florida.
- Yamashita, T., Yoshioka, M., Itoh, N. Oct 2000. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 277 (2), 494–498.
- Zanotti, S., Canalis, E. Feb 2012. Notch regulation of bone development and remodeling and related skeletal disorders. *Calcif Tissue Int* 90 (2), 69–75.
- Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O., Thomson, J. A. Dec 2001. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19 (12), 1129–1133.
- zur Nieden, N. I., Kempka, G., Rancourt, D. E., Ahr, H. J. 2005. Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages. *BMC Dev. Biol.* 5, 1–12.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. R. Depprich (Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf) für die Überlassung des Themas sowie die umfangreiche wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. K. Berr (Leiterin des Forschungslabors der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf) für die unerschöpfliche Geduld bei der Einarbeitung in die allgemeinen Laborabläufe und die molekularbiologischen Arbeitsmethoden sowie für die wertvolle wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft bei Fragen und Problemen. Sie war stets ansprechbar und hat überaus motivierend auf mich eingewirkt. Bei Rückschlägen in der experimentellen Phase der Arbeit stand sie stets mit guten Ratschlägen zur Seite, hat mich bei der Posterpräsentation im Rahmen der Jahrestagung der MKG 2017 in Bonn wissenschaftlich und emotional unterstützt. Ein herzliches Dankeschön auch für die Korrektur dieser Arbeit. Wenn alles aussichtslos schien, war sie mit Kaffee, Schokolade oder Eis zur Stelle und hat schlussendlich den Satz „Alles wird gut“ um diese Arbeit herum geprägt.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. N. Kübler für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten, Geräte und Materialien. Frau Prof. Dr. G. Kögler (Leiterin der José Carreras Stammzellbank, Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Universitätsklinik Düsseldorf) gilt mein Dank für die Bereitstellung der Nabelschnurstammzellen ([USSC](#)).

Frau M. Hölbling sowie Frau A. Hollinger danke ich für die Einarbeitung in die Zellkultur und ihre Hilfe bei Fragen rund um alle Laborabläufe.

Meinem Mann Fabian danke ich für seine unermüdliche Geduld und Motivation. Mit seiner Beharrlichkeit hat er die Entstehung dieser Arbeit voran getrieben und mir trotz Fernbeziehung und voller Berufstätigkeit alle Freiräume für diese Arbeit gelassen. Er stand stets als Ansprechpartner bei Problemen mit \LaTeX oder allgemeinen Fragen zum wissenschaftlichen Arbeiten zur Verfügung. Ohne seine Unterstützung hätte ich diese Arbeit vermutlich nicht zu Ende gebracht.

Meinen Eltern und meiner Schwester Julia gilt ebenfalls ein besonders herzlicher Dank. Sie haben immer an mich geglaubt, haben mich in schwierigen Phasen zum Weitermachen ermuntert und hatten stets ein offenes Ohr für mich.

Danke auch meinen lieben Freundinnen Pamela, Lydia und Sabine, die mich nicht nur im Studium begleitet haben, sondern auch bei der Korrektur dieser Arbeit geholfen haben.