

Klinik für Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
Westdeutsche Kieferklinik
im Fachbereich Medizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Untersuchungen zur Eignung embryonaler Stammzellen
für das Tissue Engineering von Knochen**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi
im Fachbereich Medizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

von
Dr. med. Dr. med. dent Jörg Handschel

2007

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

2. Material und Methode

2.1. Material

- 2.1.1. Zellen
- 2.1.2. Biomaterialien
- 2.1.3. Zellkulturmedien und Chemikalien
- 2.1.4. PCR-Primer und Sonden
- 2.1.5. Histologie
- 2.1.6. Enzymassays
- 2.1.7. Geräte

2.2. Methoden

- 2.2.1. Bestimmung eines geeigneten in vitro Differenzierungsmediums
 - 2.2.1.1. Versuchsaufbau
 - 2.2.1.2. Histologische Untersuchung
 - 2.2.1.3. RT-PCR und Real-Time RT-PCR
- 2.2.2. Analyse Expressionsmuster
 - 2.2.2.1. Versuchsaufbau
 - 2.2.2.2. Microarray
- 2.2.3. In vitro Biokompatibilitätsmessung
 - 2.2.3.1. Versuchsaufbau
 - 2.2.3.2. CyQuant®-Assay
 - 2.2.3.3. Rasterelektronenmikroskopie
 - 2.2.3.4. Real-Time RT-PCR
- 2.2.4. Mikromassenkulturen
 - 2.2.4.1. Versuchsaufbau
 - 2.2.4.2. Histologische Untersuchung
 - 2.2.4.3. Transmissionselektronenmikroskopie
 - 2.2.4.4. Elektronenstrahldiffraktionsanalyse
- 2.2.5. Statistische Methode

3. Resultate

- 3.1. Bestimmung eines geeigneten in vitro Differenzierungsmediums
 - 3.1.1. Histologische Ergebnisse
 - 3.1.2. RT-PCR und Real-Time RT-PCR
- 3.2. Analyse Expressionsmuster
 - 3.2.1. Maus Genom Microarray
- 3.3. In vitro Biokompatibilitätsmessung
 - 3.3.1. CyQuant®-Assay
 - 3.3.2. Rasterelektronenmikroskopie
 - 3.3.3. Real-Time RT-PCR
- 3.4. Mikromassenkulturen
 - 3.4.1. Histologische Ergebnisse
 - 3.4.2. Transmissionselektronenmikroskopie
 - 3.4.3. Elektronenstrahldiffraktionsanalyse

4. Diskussion

- 4.1. Induktion der osteoblastären Differenzierung von ESC
- 4.2. Analyse des Genexpressionsmusters während der Differenzierung
- 4.3. Kompatibilität mit Biomaterialien
- 4.4. Mikromassenkulturen mit ESC
- 4.5. Klinische Bedeutung des Tissue Engineering mit ESC

5. Zusammenfassung

6. Literatur

7. Danksagung

Abkürzungen

Aqua dest	destilliertes Wasser
ADPC	Adipose tissue derived progenitor cells
BMDPC	Bone marrow derived progenitor cells
BMP-2	Bone morphogenic protein 2
Cbfa1	Core binding factor alpha 1 (alias Runx2)
DAG	Dexamethason + Ascorbinsäure + β -Glycerophosphat
ESC	Embryonale Stammzellen
FCS	fetales Kälberserum
Fox D3	forkheadbox D3 (Transkriptionsfaktor)
GAPDH	Glyceral-3-phosphat-Dehydrogenase
GvHR	Graft versus host reaction
HvGR	Host versus graft reaction
ICBM	Insoluble collagenous bone matrix
kDa	kilo Dalton
LIF	Leukaemia inhibitory factor
MHC	Major histocompatibility complex
MPC	Multipotente Progenitorzellen
MMP	Matrix Metallopeptidase
Nanog	Nanog homeobox (Transkriptionsfaktor)
NMTS	nuclear matrix targeting signal
OLC	Osteoblastenähnliche Zellen (osteoblast-like cells)
PBS	Phosphate buffered saline
PDPC	Periost derived progenitor cells
PGA	Polyglycolsäure
PLA	Polylactat
Pou5f1	Transkriptionsfaktor (alias Oct4)
REM	Rasterelektronenmikroskop
Smad	Signalproteine (Derynck <i>et al.</i> , 1996)
SMID	Smad interacting domain
Sox-2	SRY-box 2 (Transkriptionsfaktor)

Runx2	Runt-related binding factor 2
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
USSC	Unrestricted somatic stem cell (Nabelschnurblutstammzelle)

1. Einleitung

Die Therapie von Malignomen im Kiefer-Gesichtsbereich aber auch Traumata auf Grund von Unfällen oder Rohheitsdelikten führen häufig zu einer partiellen Zerstörung des Gesichtsschädels. Kieferdefekte von mehreren Zentimetern sind nicht selten und resultieren in signifikanten funktionellen und ästhetischen Beeinträchtigungen der Patienten. Aber auch der Alterungsprozess – insbesondere in zahnlosen Kieferabschnitten – verursacht zum Teil extreme Knochenatrophien. Dieser Knochensubstanzverlust ist bei starker Ausprägung letztlich dafür verantwortlich, dass diese Patienten weder mit schleimhautgetragenen Prothesen noch mit implantatverankertem Zahnersatz versorgt werden können. Allen beschriebenen Krankheitsbildern ist gemein, dass die Wiederherstellung des knöchernen Gesichtsskeletts mit seinen funktionellen und ästhetischen Aspekten für die Lebensqualität der Patienten von großer Bedeutung ist.

In den letzten Jahrzehnten gab es in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie entscheidende Fortschritte bezüglich knochenrekonstruktiver Behandlungsmöglichkeiten. Hatte sich die Chirurgie zuvor auf die Resektion erkrankten Gewebes beschränkt, so wurde nun zunehmend der Fokus auf die Reparation von Defekten gelegt. Für die Überbrückung von Knochendefekten wurden zunächst häufig synthetische Materialien wie z.B. Polymethylmetacrylate (Pochon and Kloti, 1991), Polyurethane (Leake and Habal, 1976) oder Metalloxid-Keramiken (Binderman and Fin, 1990; Frenkel and Niederdellmann, 1975) verwendet. Diese Materialien verbesserten die Möglichkeiten der Chirurgen, die Form des Knochenskeletts und teilweise auch dessen Funktion wieder herzustellen. Obwohl den meisten Knochenersatzmaterialien spezifische Nachteile zuzuschreiben sind, stellt die Implantation dieser Materialien z.T. auch heutzutage noch (z.B. Polymethylmetacrylate (Louis and Cuzalina, 2000)) eine häufige Behandlungsmethode im klinischen Alltag dar. Zur Erreichung langfristiger Behandlungserfolge wird mittlerweile zunehmend berücksichtigt, dass das Knochenskelett einem komplexen und dynamischen Geschehen unterworfen ist, gekennzeichnet durch einen adaptativen Knochenan- und -abbau. Sowohl der Erhalt ortsständigen Knochens und insbesondere die Knochenneubildung basieren auf der

Fähigkeit vieler ossärer Gewebe, dynamische Umbauprozesse in Gang zu setzen, die zu einer Restitutio ad integrum führt. Die Knochenheilung nach Fraktur oder Osteotomie stellt das klassische Beispiel einer solchen Restitutio dar (Rodan, 1992). Diese Erkenntnisse führten zu einer verstärkten Verwendung autologer Transplantate zur Knochenrekonstruktion. Diese Transplantate enthalten im Gegensatz zu reinen Knochenersatzmaterialien lebende, biologisch aktive Zellen, die sowohl an der Einheilung als auch z.B. an der Adaptation an die lokalen mechanischen Anforderungen beteiligt sind. Auf Grund der Vorteile, welche die Transplantation autologen Gewebes bietet, kann hier aktuell von einem „Gold-Standard“ bezüglich der Knochenrekonstruktion gesprochen werden (Pretorius *et al.*, 2005). Neben nicht vaskularisierten freien Knochentransplantaten werden für größere Defekte mikrovaskulär anastomosierte Transplantate verwendet (Mehta and Deschler, 2004; Wolff *et al.*, 1996; Wolff *et al.*, 2003). Letztere bieten gerade bei größeren Defekten oder in vorgeschädigtem Gewebe (z.B. post radiationem) Vorteile (Smolka and Iizuka, 2005). Zwei wesentliche Nachteile der Transplantation von autologem Knochengewebe sind jedoch zum einen die Morbidität auf Grund des Entnahmedefektes (Nkenke *et al.*, 2001; Nkenke *et al.*, 2004; Sasso *et al.*, 2005; Youdas *et al.*, 1988) und zum anderen die quantitative Limitation des zur Verfügung stehenden Knochenreservoirs.

Die aktuelle Forschung konzentriert sich daher zunehmend auf zellbasierte Knochenregenerations- und Rekonstruktionsansätze. Zellen synthetisieren die extrazelluläre Matrix und steuern den Mineralisationsprozess. Sie bilden die Basis einer biologischen Knochenregenerationsstrategie. Vitale Zellen können dabei Gewebefunktionalitäten wiederherstellen, aufrechterhalten oder auch weiter verbessern (Langer and Vacanti, 1993; Lysaght and Reyes, 2001).

Zellbasierte Knochenregenerationsstrategien

Prinzipiell gibt es drei verschiedene Möglichkeiten für zellbasierte Knochenregenerationsstrategien:

- Transplantation von Zellen in einem Gewebeblock
- In situ Aktivierung von Zellen

- Transplantation von isolierten und/oder extrakorporal kultivierten Zellen, ggf. auch als extrakorporal generiertes Gewebekonstrukt

Der Transfer von Zellen in einem Gewebekonstrukt (klassisches Knochentransplantat) stellt, wie bereits erwähnt, eine in der klinischen Praxis häufig durchgeführte Behandlungsoption dar. Vorteilhaft ist hier die hohe mechanische Kompetenz des Transplantates. Zudem werden im Transplantat alle organischen und anorganischen Komponenten zur Verfügung gestellt, die ein schnelles Remodeling ermöglichen. Als Nachteile sind die quantitative Limitation des Spenderareals und die Entnahmemorbidity zu nennen (s.o.).

Die in situ Aktivierung von Zellen benötigt hingegen keinen Spenderknochen. Hier werden ortsständige oder benachbarte körpereigene Zellen durch verschiedene Stimuli zur Knochenbildung angeregt. Mechanische Reize wie etwa Dehnungsreiz bei der Distraktionsosteogenese (Meyer *et al.*, 1999a; Meyer *et al.*, 1999b), elektromechanische Reize (Aaron *et al.*, 2004; Markaki and Clyne, 2004) und die Stimulation durch Zytokine (z.B. BMP-2 (Kubler *et al.*, 1998), BMP-7 (Terheyden *et al.*, 2001) oder BMP-2-Mutanten (Depprich *et al.*, 2005)) sind typische Beispiele für die in situ Aktivierung. Größere Defekte oder vorgeschädigte ortsständige Zellen (z.B. post radiationem) schränken allerdings die Anwendbarkeit ein.

Die Transplantation von extrakorporal generierten Konstrukten repräsentiert das nach europäischer Definition klassische „Tissue Engineering“. Zellen werden in vitro auf bzw. in einer Matrix (Biomaterial) kultiviert und anschließend zusammen mit dem Biomaterial transplantiert. Dieser Ansatz steht zur Zeit noch am Anfang seiner Erprobung. Vor- und Nachteile hängen dabei von den verwendeten Komponenten ab. Insbesondere den Matrixmaterialien (Handschelel *et al.*, 2002; Wiesmann *et al.*, 2004) und den verschiedenen Zellpopulationen (Handschelel *et al.*, 2006b) kommt dabei entscheidende Bedeutung zu.

Einteilung der verschiedenen Zellarten für „Tissue Engineering“ von Knochen

Zellen, die für die extrakorporale Generierung von Knochen eingesetzt werden, können im Wesentlichen autologen, allogenen oder xenogenen Ursprungs sein. Jede Kategorie kann wiederum nach ihrer Differenzierungskapazität unterteilt werden. Sowohl reife, ausdifferenzierte Zelllinien (z.B. Osteoblasten) als auch sogenannte

multipotente mesenchymale Progenitorzellen wurden im „Tissue Engineering“ von Knochen eingesetzt. Aber auch erste Versuche mit pluripotenten Zellen wie etwa embryonalen Stammzellen (ESC) (Heng *et al.*, 2004; zur Nieden *et al.*, 2005) oder pluripotenten Nabelschnurblutstammzellen (USSC) (Kogler *et al.*, 2004) wurden kürzlich beschrieben. Als totipotent werden Zellen bezeichnet, die sich teilen und einen Organismus bilden können. Pluripotente Zellen können letzteres zwar nicht, differenzieren sich aber unter den entsprechenden Bedingungen in alle verschiedenen Gewebe eines Organismus. Multipotente Zellen wiederum sind in der Lage, sich zumindest in einige verschiedenen Zelllinien zu differenzieren. Neben diesen natürlich vorkommenden Zellen wurden zur Erforschung grundlegender Prozesse der Knochenbildung in vitro auch genetisch modifizierte Zelllinien entwickelt. Demnach lassen sich die verschiedenen Zellpopulationen folgendermaßen einteilen (Handschel *et al.*, 2006b) (s. Tabelle 1):

Natürlich vorkommende Zellen	Genetisch modifizierte Zellen
Toti- und Pluripotente Zellen <ul style="list-style-type: none"> • Embryonale Stammzellen (ESC) • Nabelschnurblutstammzellen (USSC) 	<ul style="list-style-type: none"> • Osteosarkom Zelllinien • Immortalisierte Zelllinien <ul style="list-style-type: none"> ○ spontan ○ transformiert • Nicht transformierte clonale Zelllinien
Multipotente Zellen <ul style="list-style-type: none"> • ADPC • BMDPC • PDPC • Progenitorzellen aus Gefäßwänden • Progenitorzellen aus Plazenta 	
Unipotente Zellen <ul style="list-style-type: none"> • Präosteoblasten • “Lining cells” • Osteoblasten • Osteocyten 	

Tab. 1: Einteilung von Zellen für das Tissue Engineering von Knochen. ADPC = Progenitorzellen aus Fettgewebe, BMDPC = Progenitorzellen aus Knochenmark, PDPC = Progenitorzellen aus Periost

Zu den toti- und pluripotenten Zellen, die sich in nahezu jede Zelllinie differenzieren können, gehören ESC und USSC. Sie können sich sowohl in Zelllinien, die bei der Knochenbildung direkt an der Mineralisation beteiligt sind, als auch beispielsweise in Endothelzellen differenzieren, die ebenfalls eine wichtige Funktion bei der Bildung von Knochengewebe übernehmen. Multipotente Progenitorzellen (MPC), die aus

verschiedenen Geweben gewonnen werden können (z.B. Knochenmark, Fett, Periost, etc.), können sich zumindest noch in verschiedene mesenchymale Zelllinien differenzieren. Osteoblasten und Osteozyten gehören in die dritte Kategorie (unipotente Zellen). Sie sind bereits ausdifferenziert und eine Dedifferenzierung konnte bei Säugetierzellen bis heute noch nicht nachgewiesen werden.

Während MPC und die ausdifferenzierten Zelllinien in der Regel autologen Ursprungs sind und daher vom späteren Empfänger zunächst entnommen werden müssen, sind ESC immer allogenen oder xenogenen Ursprungs, so dass keine Entnahmemorbidity für den Empfänger besteht. Hinzu kommt, dass MPC z.B. in Knochenmarkaspiraten eine wenig repräsentierte Subpopulation darstellen. Nur eine von 100.000 Zellen aus dem Knochenmark ist eine MPC (D'Ippolito *et al.*, 1999; Quarto *et al.*, 1995). Das Erneuerungspotenzial dieser Zellen ist im Gegensatz zu ESC nur begrenzt (McCulloch *et al.*, 1991) und mit höherem Lebensalter nehmen das Proliferationspotenzial und die Differenzierungskapazität der entnommenen Zellen ab (D'Ippolito *et al.*, 1999; McCulloch *et al.*, 1991; Quarto *et al.*, 1995).

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich daher auf ESC als Repräsentanten für toti- und pluripotente Stammzellen.

Embryonale Stammzellen (ESC)

ESC stellen die Hauptvertreter der toti- und pluripotenten Stammzellen dar. Vor über 20 Jahren gelang es erstmals ESC aus der Maus zu isolieren und zu kultivieren (Martin, 1981). Ende des letzten Jahrtausends gelang schließlich auch die Etablierung einer stabilen humanen ESC-Zelllinie (Thomson *et al.*, 1998). ESC werden üblicherweise aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen und repräsentieren die Stammzellen, die sich im Laufe der Ontogenese in die verschiedenen Zelllinien des Organismus differenzieren können. Zunächst wurden ESC zusammen mit anderen Zellen kultiviert, die als Feederzellen bezeichnet werden und beispielsweise aus mitotisch inaktivierten Fibroblasten bestehen können (Bielby *et al.*, 2004; Burt *et al.*, 2004; Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Diese Co-Kulturen mit anderen Zellen sind jedoch nicht notwendig, wenn Leukaemia inhibitory factor (LIF) dem Medium hinzugefügt wird (Chambers, 2004; Smith *et al.*, 1988). Ohne diesen Zusatz (LIF) differenzieren sich ESC in morphologisch uneinheitliche

Zellpopulationen, die Genexpressionsmuster sowohl endodermaler als auch mesodermaler Zellen aufweisen (Niwa *et al.*, 2000). Einen beträchtlichen Sprung in der Stammzellforschung stellte die gezielte Differenzierung muriner und humaner ESC zu bestimmten Zelllinien dar. So wurden ESC in Kardiomyozyten (Klug *et al.*, 1996), Neurone (Lee *et al.*, 2000; McDonald *et al.*, 1999) und auch glatte Muskelzellen (Drab *et al.*, 1997) differenziert. Schließlich konnte kürzlich auch gezeigt werden, dass es möglich ist, ESC unter besonderen Kulturbedingungen in osteoblastenähnliche Zellen (OLC) zu differenzieren (Chaudhry *et al.*, 2004; Heng *et al.*, 2004; zur Nieden *et al.*, 2005). Die gebräuchlichste Methode, um ESC gezielt in OLC zu differenzieren, ist der Zusatz von Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat (DAG) zum Nährmedium (Bielby *et al.*, 2004; Chaudhry *et al.*, 2004). Aber auch Zytokine wie BMP-2 oder Vitamin D3 können die osteoblastäre Differenzierung von ESC fördern (zur Nieden *et al.*, 2005). Welches Medium für die Differenzierung von ESC zu Osteoblasten am geeignetsten ist, ist genauso unklar wie die bei der Differenzierung exprimierten Genexpressionsmuster.

Im Gegensatz zu MPC aus adultem Gewebe werden ESC als „immortal“ bezeichnet und haben ein unbegrenztes Erneuerungspotenzial. ESC stellen somit eine ausreichende Resource dar, um Osteoprogenitorzellen oder OLC für Transplantationen zu generieren. Demgegenüber sind das Proliferations- und Erneuerungspotenzial sowie die Differenzierungskapazität von MPC beschränkt und nehmen mit dem Alter des Spenders weiter ab (D'Ippolito *et al.*, 1999; Quarto *et al.*, 1995).

Eine große Herausforderung für die Verwendung von ESC für Knochentransplantate ist die Frage der Immuntoleranz durch einen immunkompetenten Empfänger.

Hoffnungsvoll stimmen diesbezüglich die Ergebnisse von Burt und Mitarbeitern (Burt *et al.*, 2004), die ESC in „MHC-mismatched“ Mäuse transplantierten und weder klinische noch histologische Anzeichen einer Abstoßungsreaktion (Host-versus-Graft-Reaktion (HVGR) oder Graft-versus Host-Reaktion (GVHR)) beobachteten.

Zudem beschrieb Zavazava in seinem Übersichtsartikel, auf Basis verschiedener Studien, das Potenzial von ESC eine Immuntoleranz zu induzieren (Zavazava, 2003). Es gibt Hinweise, dass die Antigenität fremder ESC durch die Suppression der MHC-Genexpression vermindert wird (Heng *et al.*, 2004). Andere Bedenken bezüglich der

Verwendung von ESC für Transplantationen beziehen sich auf eine mögliche maligne Entartung der Zellen. So wurde beschrieben, dass transplantierte undifferenzierte ESC in Tieren das Auftreten von Teratomen und Teratokarzinomen erhöhen können (Trounson, 2002). Andererseits haben viele Autoren in ihren jeweiligen in vivo Untersuchungen mit ESC keinerlei Hinweise auf tumoröse Entartungen finden können (Zhang *et al.*, 2001). Ob schließlich für Zellen, die eingebunden in eine Matrix sind, oder für vordifferenzierte ESC ein relevantes Entartungsrisiko besteht, ist jedoch nicht bekannt.

Schließlich gibt es auch noch ethische und rechtliche Bedenken bzw.

Einschränkungen für die Verwendung von humanen ESC für wissenschaftliche Versuche und klinische Behandlung. Die vorhandenen Bedenken gründen in der Regel darauf, dass die Entnahme von ESC aus der Blastozysten mit der Zerstörung des Embryos verbunden ist. Die aktuelle Debatte über den ethischen Status des Embryos beschäftigt sich mit der Fragilität und Wehrlosigkeit des humanen Embryos und fokussiert sich letztlich auf die Frage, ob der Schutz und die Integrität des humanen Embryos oder aber potenzielle Therapieoptionen für Patienten ein höheres Gut darstellen. Verbunden damit ist die Diskussion, ob der absolute Respekt vor dem individuellen menschlichen Leben bereits mit der Konzeption oder erst später beginnt (Cogle *et al.*, 2003; Gilbert, 2004). Nachdem sich die Bundesrepublik Deutschland mit dem Embryonenschutzgesetz (ESchG, in der Fassung vom 13.12.1990) global betrachtet eine eher restriktive Verwendung der humanen ESC auferlegt hat, ist auf Grund der internationalen Entwicklung eher von einer mittelfristigen Lockerung bezüglich der Gewinnung und Verwendung von ESC auch in Deutschland auszugehen, zumal das Europäische Parlament in seiner Plenarsitzung am 15.6.2006 beschlossen hat, die Forschung mit humanen embryonalen Stammzellen unter bestimmten Kriterien zu fördern.

Knochen und Osteoblasten

Knochen ist ein spezialisiertes Stützgewebe, das durch die Mineralisation von Osteoid, der nicht calcifizierten homogenen Extrazellulärmatrix, entsteht. Als zelluläre Elemente lassen sich neben den für die Gefäßversorgung wichtigen Endothelzellen vor allem Zellen der Osteoblastenreihe und Osteoklasten unterscheiden. Während Praeosteoblasten, Osteoblasten und Osteozyten sich aus

mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren, stammen Osteoklasten aus monocytären Stammzellen des Knochenmarkes und damit von hämatopoetischen Stammzellen ab. Die Extrazellulärmatrix wird von Osteoblasten sezerniert und enthält in ihrem organischen Anteil zu ca. 90% Kollagen Typ I (Löffler, 2000), das als Tropokollagen von den Osteoblasten produziert wird. Kollagen Typ I ist ein Hetero-Trimer, das aus zwei $\alpha 1$ -Ketten und einer $\alpha 2$ -Kette besteht, die getrennt von einander genetisch codiert sind. Die Expression von Kollagen Typ I ist ein typischer Marker für mesenchymale Zellen (Bilezikian *et al.*, 1996). In der Folgezeit werden der Extrazellulärmatrix Calcium- und Phosphationen zugeführt und es entstehen in enger Beziehung zu den Kollagenfibrillen Hydroxylapatitkristalle. Der so entstandene Knochen wird Geflechtknochen genannt und baut sich schließlich unter dem Einfluß verschiedener Faktoren (z.B. mechanische Belastung) und unter Mitwirkung von Osteoblasten und Osteoklasten in Lamellenknochen um.

Im Verlauf der Knochenbildung ändert sich allerdings die Zusammensetzung der Osteoblastensekrete. In der frühen Phase der Knochenentwicklung wird Osteopontin sezerniert. Osteopontin ist ein einkettiges, hoch phosphoryliertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 32 kDa. Osteopontin verbindet organische und anorganische Matrixkomponenten miteinander und ist damit an der Gewebeadhäsion beteiligt (McKee and Nanci, 1996). In vitro Experimente an Ratten weisen auf eine Bindung von Osteopontin an Hydroxylapatit hin, die durch seine hohe Affinität für Calciumionen (Somerman *et al.*, 1987) geschaffen wird. Osteonectin ist ein weitverbreitetes nichtkollagenes Glykoprotein, das auf Grund seiner ebenfalls hohen Affinität zu Calciumionen und Hydroxylapatit als Modulator für Zell-Matrix-Verbindungen agiert (Termine and Robey, 1996). Mit der Expression des membranständigen Glykoproteins Alkalische Phosphatase beginnt schließlich nach derzeitigem Wissensstand die Mineralisation der Matrix (Zernik *et al.*, 1990). Allerdings ist die Alkalische Phosphatase kein knochenspezifisches Enzym. Die Expression wird nämlich auch in undifferenzierten embryonalen Stammzellen beobachtet (Phillips *et al.*, 2001). Als spätes Protein der extrazellulären Matrix wird Osteocalcin sezerniert (Aubin and Liu, 1996). Es stellt ca. 1-2% aller Proteine im Knochen dar. Zu seinen bekannten Funktionen gehört die Rekrutierung (Recruitment) von Osteoklasten (Davies, 1996). Zusammengefasst wird durch die zeitlich

koordinierte Synthese der beschriebenen Proteine bzw. durch die Expression der entsprechenden Gene die Differenzierung in reifen Osteoblasten beschrieben. Allerdings muß auch der Mineralisationsprozess evident sein, um der funktionalen Definition eines Osteoblasten (Zelle, die extrazelluläre Matrix produzieren, welche schließlich mineralisiert) zu genügen. Dementsprechend muss für die Charakterisierung eines Osteoblasten auch der histologische Nachweis von kalzifizierter Extrazellulärmatrix z.B. mit Hilfe der von Kossa-Färbung geführt werden.

Die Differenzierung zu synthetisch aktiven Osteoblasten ist ein komplexer Prozess. An der Differenzierung sind auf der Ebene der Genexpression verschiedene Transkriptionsfaktoren beteiligt, von denen einige bereits in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben wurden. Für die Differenzierung in Präosteoblasten scheint Runx2/Cbfa1 notwendig zu sein. Der durch das Runx2/Cbfa1-Gen codierte Transkriptionsfaktor weist Bindungsstellen für die Promotorsequenzen der o.g. osteoblastentypischen Proteine auf (Kern *et al.*, 2001) und fördert so die Expression dieser Gene. Darüber hinaus scheint Runx2/Cbfa1 auch noch die Mitoserate von Osteoprogenitorzellen zu beeinflussen. Allerdings führt die Expression von Runx2/Cbfa1 nicht zwangsläufig zu reifen Osteoblasten (Pratap *et al.*, 2003). Ein Ausfall von Runx2/Cbfa1 hingegen führt zu schweren cleidocranialen Knochenanomalien (Mundlos *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997). Für die weitere Differenzierung zu reifen Osteoblasten scheint der Faktor Osterix notwendig zu sein (Nakashima *et al.*, 2002). Osterix bindet an spezifische Guanin/Cytosin-reiche DNA-Sequenzen und fördert die Ausbildung des osteoblastären Phänotyps. Neben diesen beiden Transkriptionsfaktoren können auch sogenannte Notch-Transmembranproteine die Differenzierung zu Osteoblasten beeinflussen, indem sie die Ausprägung adipozytentypischer Charakteristika fördern und so die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Osteoblasten verhindern (Sciaudone *et al.*, 2003). Weitere Einflußfaktoren wie BMP-2, zytomechanische Reize oder auch Entzündungsfaktoren können ebenfalls an der osteoblastären Differenzierung beteiligt sein. Auch das aus der Drosophila-Genetik bekannte Wnts/LRP5 beeinflusst die BMP-2-vermittelte Aktivität der alkalischen Phosphatase (Rawadi *et al.*, 2003). Das genaue Zusammenspiel ist jedoch sehr komplex und im Detail noch nicht bekannt

(Jager *et al.*, 2004). Ob und ggf. welche Trägermaterialien für in vitro generierte Knochenkonstrukte die Zelldifferenzierung beeinflussen können, ist noch nicht untersucht. Aktuell diskutierte Trägermaterialien unterscheiden sich dabei nicht nur hinsichtlich der physiko-chemischen Eigenschaften, sondern auch bzgl. der Strukturunterschiede (z.B. Oberflächeneigenschaften, Porosität, etc.) (Wiesmann *et al.*, 2004).

Mikromassenkulturen

In höheren Organismen sind Zellen eingebunden in eine extrazelluläre Matrix und stehen mit anderen Zellen in direktem Kontakt (z.B. via gap junctions). Es ist bekannt, dass die Verbindungen zur extrazellulären Matrix, z.B. über Integrine, viele zelluläre Funktionen wie Proliferation, Zelldifferenzierung, Zellmigration oder Apoptose beeinflussen können (Boudreau and Jones, 1999). In herkömmlichen 2D-Zellkulturen wird diesem Umstand nicht Rechnung getragen, weshalb diese in vitro Kulturen mutmaßlich weit weniger die tatsächlichen Gegebenheiten unter in vivo Bedingungen imitieren als es bei 3D-Kulturen der Fall ist. So konnte beispielsweise die Proliferation von Mammakarzinomzellen durch $\beta 1$ -Integrin-Antikörper sowohl in 3D-Kulturen als auch in vivo blockiert werden, während dies in 2D-Kulturen nicht möglich war (Weaver *et al.*, 1997). Bei 3D-Kulturen ist wiederum zu unterscheiden, ob die Zellen auf eine dreidimensionale Matrix (z.B. Alginatgel (Steinert *et al.*, 2003), Polylactatester (PLA) (Wang *et al.*, 2004) oder Kollagengel (Maeno *et al.*, 2005)) gesetzt werden oder ob die extrazelluläre Matrix von den kultivierten Zellen selbst gebildet wird. Letzteres spiegelt eher die Verhältnisse in vivo wider und wird bei Mikromassenkulturen genutzt (Handschel *et al.*, 2006a). Mikromassenkulturen mit OLC zeigten eine schnellere und ausgeprägtere osteoblastäre Differenzierung als 2D-Kulturen (Gerber and ap Gwynn, 2001; Gerber and ap Gwynn, 2002). Die Zellen in der Mikromassenkultur scheinen dabei den Kondensationsprozess zu imitieren, der in vivo für die skelettale Entwicklung bedeutsam ist (Hall and Miyake, 2000). Kürzlich konnten Tanaka und Mitarbeiter zeigen, dass Mikromassenkulturen auch mit embryonalen Stammzellen möglich sind und sich diese Zellen in knorpelähnliche Zellen differenzieren lassen (Tanaka *et al.*, 2004). Ob dies auch für eine osteogene Differenzierung gilt, ist jedoch noch nicht bekannt.

Eigene Vorarbeiten mit Mikromassenkulturen

Die Mikromassenkulturtechnik wurde bereits mit Chondroblasten etabliert und die derart gewonnenen "Knorpelsphären" in einem Tierversuch anschließend den

Spendertieren wieder reimplantiert (Meyer *et al.*, 2006). Während in diesem ersten Schritt insbesondere die Generierung und der präklinische Einsatz von Chondrosphären untersucht wurden, zeigten erste Versuche der Generierung von Osteoblastensphären prinzipiell ähnliche Ergebnisse in der Mikromassenkultur.

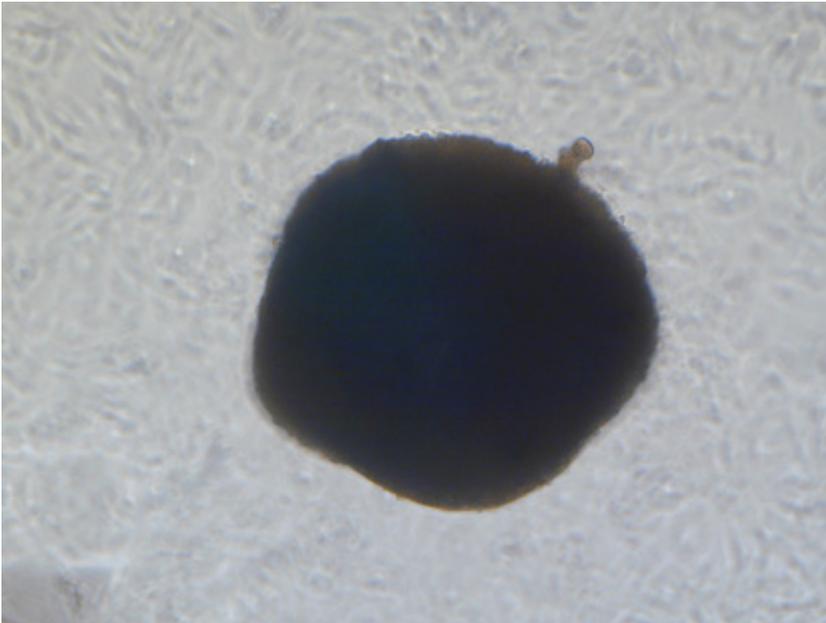


Abb. 1: “Osteoblastensphäre“. Für die lichtmikroskopische Auflichtaufnahme wurde diese vitale Kultur nicht fixiert. Deutlich ist das rundliche Zellaggregat zu erkennen.

Die maturen Osteoblasten wurden zunächst in einem Zellmonolayer kultiviert und stark proliferiert. Die Zellen wurden dann abgelöst und in die eigentlichen Kulturkammern (mit einer nicht adhäsiven Oberfläche) überführt, wo sie sich innerhalb von ein bis drei Tagen zu einer sphärischen Formation zusammenschließen. Je nach Ausgangszellzahl kann diese Sphäre mehr als 0.1mm im Durchmesser groß sein. Die äußere Form der Osteosphären ist kugelig bis sphärisch, wie in der Abbildung 1 erkennbar ist. Zwischen Sphäre und Unterlage gibt es in den ersten beiden Wochen der Kultur keine Verbindung, die Sphären sind nicht an einer Stelle fixiert. Histologisch sind die Osteoblastensphären schon nach einer Woche gekennzeichnet durch eine zellreiche Außenschicht und ein zellärmeres, aber dafür matrixreicheres Zentrum (Abbildung 2). Die Sphären werden an ihrer Oberfläche von einer dünnen “Grenzschicht“, bestehend aus 2 bis 3 Lagen langgestreckter Zellen, abgeschlossen. Diese Grenzschicht ist sehr dünn und nach außen glatt. An einigen

Stellen können bei den bisherigen kurzen Kulturzeiten (als Sphäre) von 2-3 Wochen schon Hinweise auf eine “Osteoidbildung“ gefunden werden, wie Abbildung 2 zeigt.

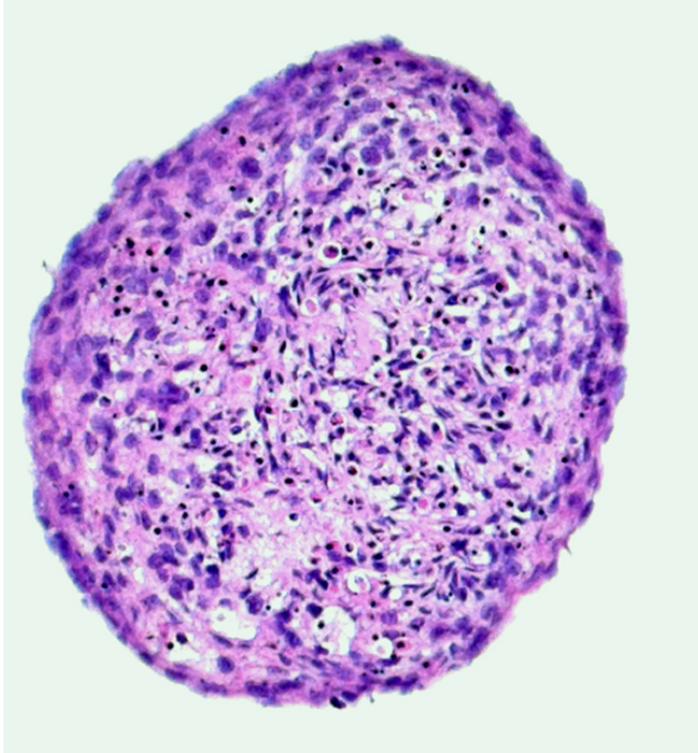


Abb. 2: HE-Färbung einer “Osteoblastensphäre“. Eine zellreichere Außenschicht umgibt die zellärmeren, aber an extrazellulärer Matrix reicheren zentralen Anteile.

Auch in der Fluoreszenzaufnahme sind zentralen Bereiche mit extrazellulärer Matrix deutlich als gelbe „Flecken“ zu erkennen (Abbildung 3).

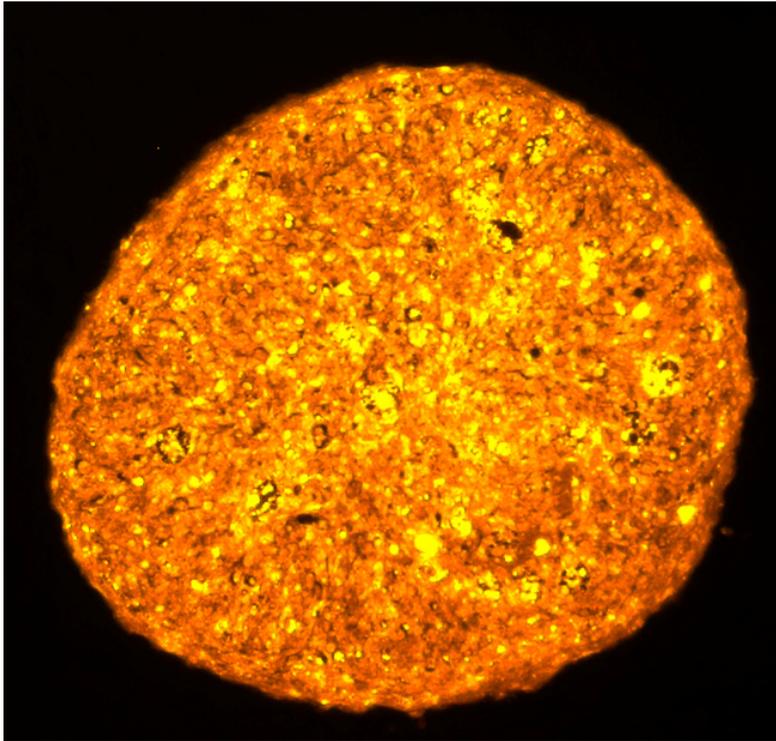


Abb. 3: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer "Osteoblastensphäre".

Ziel der Studie

Embryonale Stammzellen als Vertreter pluripotenter bzw. totipotenter Zellen könnten eine wichtige Resource für das Tissue Engineering von Knochen werden. Ziel dieser Studie ist es daher, die Eignung dieser Zellen für diesen Zweck näher zu analysieren. Im einzelnen sollen dabei folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Welches Medium eignet sich für eine osteoblastäre Differenzierung von ESC und wie lange dauert dieser Prozess?
- Welche Gene sind an dieser Entwicklung beteiligt und zu welchem Zeitpunkt werden diese hoch-/herunterreguliert?
- Welche gängigen Biomaterialien zeigen eine hohe Kompatibilität mit den ESC?
- Ist eine osteogene Differenzierung in Mikromassenkulturen mit ESC möglich?

2. Material und Methode

2.1. Material

2.1.1. Zellen

Für die Durchführung sowohl der in vitro Versuche zur osteoblastären Zelldifferenzierung und zur Kompatibilität von Biomaterialien als auch für die Mikromassenkulturen wurden murine embryonale Stammzellen verwendet. Die Zelllinie stammt aus der inneren Zellmasse der murinen Blastozyste und wurde am Gestationstag 3,5 entnommen und etabliert. Die Zellen wurden vom Institut für Medizinische Mikrobiologie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. K. Pfeffer) zur Verfügung gestellt.

2.1.2. Biomaterialien

Für die Testung geeigneter Matrixmaterialien wurden folgende Präparate gewählt:

- Anorganischer boviner Knochen (Bio Oss ®)
(Fa. Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz)
- β -Tricalciumphosphat kleinporig (Cerasorb ®)
(Fa. Curasan AG, Kleinostheim, Deutschland)
- β -Tricalciumphosphat multiporös (Cerasorb M ®)
(Fa. Curasan AG, Kleinostheim, Deutschland)
- PLA/PGA, Copolymer aus Polylactat (PLA) und Polyglycolsäure (PGA)
(Priv.-Doz. Dr. H.-P. Wiesmann, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universität Münster, Deutschland)
- Boviner ICBM (insoluble collagenous bone matrix)

Die Herstellung erfolgte im eigenen Labor aus Rinder-Femurknochen nach einem bereits etablierten Verfahren (Depprich *et al.*, 2005; Wurzler *et al.*, 2004):

1. Spongiosaaufbereitung für ICBM-Herstellung

Die Femurknochen werden bei -80°C für mindestens 24h eingefroren und anschließend mit der Bandsäge so zugeschnitten, dass nach der Entfernung von Muskelansätzen, Periost und Kompakta nur noch Spongiosaplatten von ca. 1cm

dicke verbleiben. Das Knochenmark wird mit einem Wasserdampfstrahler sowie Druckluft entfernt.

2. Entfettung der Spongiosascheiben

Durch dreimaliges Einlegen in eine Chloroform-Methanol-Lösung (Verhältnis 3:1) für jeweils 24h unter ständigem Rühren werden die Scheiben entfettet und anschließend in 5 l Aqua destillata 30 min gewaschen.

3. Bleichen

Die Spongiosascheiben werden in 3% H₂O₂ für ca. 15 min gebleicht, anschließend in Aqua destillata gewaschen.

4. Demineralisierung

Durch dreimaliges Einlegen in 0,5 M HCl-Lösung für jeweils 90 min unter ständigem Rühren werden die Spongiosascheiben demineralisiert und anschließend in Aqua destillata gewaschen.

5. Zuschnitt der Probenkörper

Mit einem Trepanbohrer (Innendurchmesser 6,0 mm) werden aus den 1cm dicken Spongiosascheiben Zylinder ausgestanzt und anschließend halbiert, so dass die Probenkörper abschließend die folgenden Maße haben:

Durchmesser: 6,0 mm / Länge: 5,0 mm

6. Inaktivierung osteoinduktiver Matrixproteine

Unter ständigem Rühren werden die Probenkörper in 1 l 4M Guanidin-HCl/50mM Tris-HCl mit pH 7,0 für 16h bei 4°C eingelegt.

7. Waschen

Zweimaliges Einlegen der Probenkörper in 1 l 50mM Tris-HCl mit pH 7,0 / 0,15 M NaCl für 4 h bei 4°C und anschließend Waschen in Aqua destillata für 30 min bei Raumtemperatur.

8. Lyophilisieren

Zunächst einfrieren der Probenkörper für mindestens 24 h bei -80°C und anschließend lyophilisieren für 24 h bei -4°C und 0,05mbar.

Die fertigen Probenkörper wurden im Kühlschrank bei -4°C gelagert.

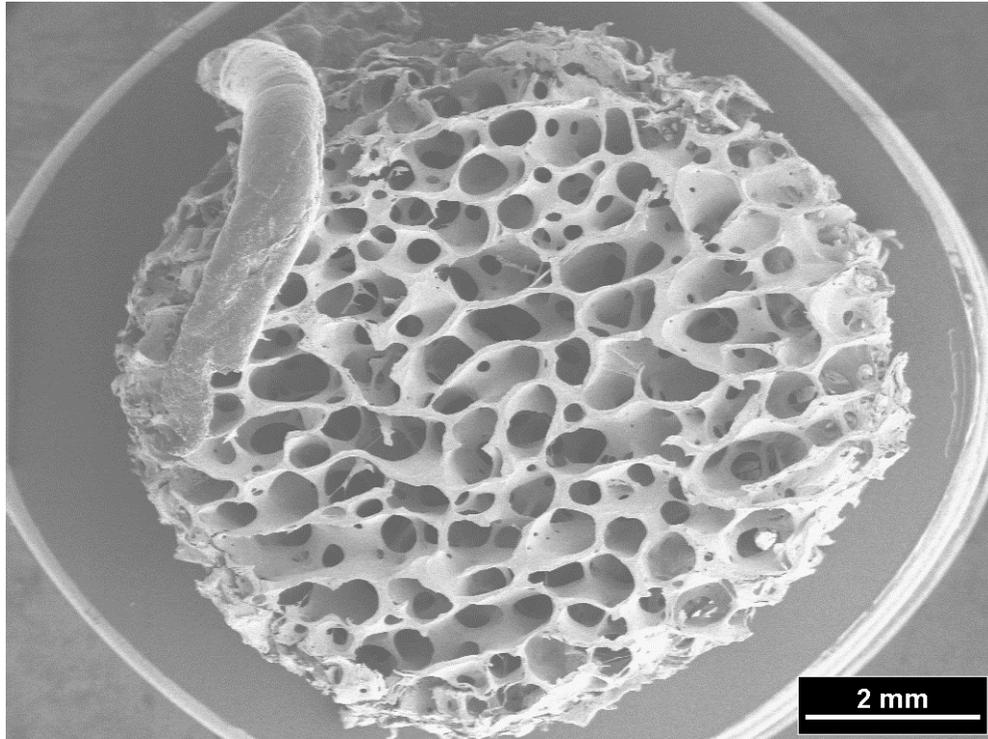


Abb. 4: REM-Aufnahme eines ICBM-Probenkörpers. Links oben ist der für die Mikroskopie technisch notwendige Graphit-Kontakt zu erkennen

2.1.3. Zellkulturmedien und Chemikalien

Bone morphogenic protein 2 (BMP-2)	(Prof. Dr. Sebald, Institut für Physiologische Chemie II, Bayrische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Deutschland)
Leucemia inhibitory factor (LIF)	(Prof. Dr. Pfeffer, Institut für Med. Mikrobiologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Deutschland)
Dulbecco modified eagle medium (DMEM)	(Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
Fetal Bovine Serum (0,2 μm sterile filtered)	(Fa. PAN Biotech GmbH,

	Aidenbach, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (10000U/10000µg/ml)	(Fa. Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
L-Glutamin (200mM)	(Fa. Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
2- Mercaptoethanol (50mM)	(Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
Dexamethason	(Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Ascorbinsäure	(Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
β-Glycerophosphat	(Fa. Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
Dulbecco´s Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (D-PBS) (1x), Flüssig	(Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin-EDTA (0,25%), Flüssig	(Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.4. Material und Chemikalien für real time RT-PCR und qualitativer RT-PCR

2.1.4.1. Primer für real time RT-PCR

Osteonectin

Sequenz:

mostne5 5' –CTT TGG CAT CAA GGA GCA G- 3'

mostne3 5' –TCA GAG GGA GAG AGT TCA GGA- 3'

Fa. MWG- Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

Osteopontin

Sequenz:

mostpo5 5' –CCC GGT GAA AGT GAC TGA TT- 3'

mostpo3 5' –TTC TTC AGA GGA CAC AGC ATT C- 3'

Fa. MWG- Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

Osteocalcin

Sequenz:

mostcal5 5' –GCC CTG AGT CTG ACA AAG GTA- 3'

mostcal3 5' –GGT GAT GGC CAA GAC TAA GG- 3'

Fa. MWG- Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

Kollagen I

Sequenz:

mprocol5 5' –AAG GGG TCT TCC TGG TGA AT- 3'

mprocol3 5' –GGG GTA CCA CGT TCT CCT C- 3'

Fa. MWG- Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

Alkalische Phosphatase

Sequenz:

malp5 5' –AAG GCT TCT TCT TGC TGG TG- 3'

malp3 5' –GCC TTA CCC TCA TGA TGT CC- 3'

Fa. MWG- Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

GAPDH

Sequenz:

mgapd5 5' –CAA TGA ATA CGG CTA CAG CAA C- 3'

mgapd3 5' –AGG GAG ATG CTC AGT GTT GG- 3'

Fa. MWG – Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

2.1.4.2 Material und Chemikalien für real time RT-PCR

Material:

96 Well qPCR, Natural/ Black Plates with Caps, (Eurogentec, Köln, Deutschland),

#RT-PL96-CAP (20 natural strips of caps)

96 Well qPCR, Natural Plates with Caps, (Eurogentec, Köln, Deutschland),

#RT-PL96-01N (4x 5 natural plates)

Chemikalien:

qPCR MasterMix, No Rox, #RT-QP2X-03NR, (Eurogentec, Köln, Deutschland),

2.1.4.3. PCR-Primer für qualitative RT-PCR:

CD 34

Sequenz:

cd34_for 5' –CAC AGA ACT TCC CAG CAA ACT C- 3'

cd34_rev 5' –CAT GTT GTC TTG CTG AAT GGC C- 3'

Fa. MWG- Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

2.1.4.4. Chemikalien für qualitative rt-PCR

Chemikalien:

10x PCR Puffer

10mM dNTP

50mM MgCl₂

Platinum Taq Polymerase (Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.5. Materialien und Chemikalien für Histologie

Färbung nach von Kossa (Silberfärbung)

Prinzip:

Calciumionen in Carbonaten und Phosphate werden gegen Silberionen ausgetauscht.

Die Silberionen werden reduziert von Ag⁺ zu Ag⁰. Mineralisationen stellen sich lichtmikroskopisch schwarz dar.

Chemikalien:

Glutardialdehyd (3%) (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Silbernitratlösung (5%) (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Natriumthiosulfatlösung (1%) (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

Neutralrot (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Glycerolgelatine (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

Natriumcarbonat (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
Formaldehyd (37%) (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.6. Enzymassays

Folgende Enzymassays wurden verwandt:

CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit® (Fa. Invitrogen, Karlsruhe,
Deutschland)

Prinzip des CyQUANT-Assays:

Ein fluoreszierender Farbstoff (CyQUANT GR dye) mit einer starken Affinität zu zellulärer DNA wird mit einem Lysepuffer einer Zellkultur zugegeben. Der entstehende Farbstoff-DNA-Komplex emittiert Licht der Wellenlänge 480nm bis 520nm (Emissionsmaxima). Mit einem Fluorometer kann nun die Lichtemission quantifiziert werden. Dieser Wert wiederum korreliert linear mit der Zellzahl in einem Bereich von 10 Zellen bis ca. 50.000 Zellen (Jones *et al.*, 2001).

2.1.7. Geräte

iCycler Thermal Cycler Base
(Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)

Heracell 240 CO2 Inkubator
(Fa. Fa. Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland)

Elisa-Reader
(Fa. Tecan, Crailsheim, Deutschland)

Multifuge
(Fa. Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland)

2.2. Methoden

2.1.1. Bestimmung eines geeigneten in vitro Differenzierungsmedium

2.2.1.1. Versuchsaufbau

Murine embryonale Stammzellen wurden auf Petrischalen ausgesät und in einem Basismedium aus DMEM + Penicillin/Streptomycin + 2-Mercaptoethanol + FCS) und Zusatz von LIF (5000 U / ml) kultiviert.

Zusammensetzung des Mediums:

500ml DMEM

5ml Glutamin

5ml Penicillin/Streptomycin (entspricht 1:100 Verdünnung)

500µl 2-Mercaptoethanol (1000x)

75ml FCS (15%ig)

5ml Leucemia inhibitory factor (LIF)

Anschließend wurden die Zellen gesplittet und in drei verschiedenen Kulturmedien für 25 Tage weiter kultiviert. Das jeweilige Medium wurde alle zwei Tage vollständig erneuert. Jeden vierten Tag wurden Zellen aus jeder Gruppe geerntet und mittels real time RT-PCR auf ihr Expressionsmuster untersucht. Dieser Versuch wurde insgesamt zweimal durchgeführt.

1. Gruppe: Basismedium + BMP-2 (10ng/ml)
2. Gruppe: Basismedium + Dexamethason (0,1µM) + Ascorbinsäure (50µM) + β-Glycerophosphat (10mM)
3. Gruppe: Basismedium

2.2.1.2. Histologische Untersuchung

Zum Nachweis von Mineralisationen wurde die Färbung nach von Kossa (Silberfärbung) wie folgt durchgeführt:

Die histologischen Färbung der Zellkulturen erfolgte nach Fixierung der Zellen mit Glutardialdehyd.

- Medium absaugen
- Kulturen zweimal mit PBS waschen
- 30 Minuten mit 1 ml 3%igem (w/v) Glutardialdehyd fixieren
- Spülen mit aqua dest 2ml
- Trocknen bei Raumtemperatur
- Mit 1 ml 5%iger Silbernitratlösung überschichten und im Dunkeln für 1h inkubieren
- Spülen mit aqua dest 2 mal
- Reduktion für 2 min mit Lösung aus 5g Natriumcarbonat wasserfrei + 75ml Aqua destillata + 25ml Formaldehyd (37%ige Lösung)
- Spülen mit Aqua destillata
- Fixierung mit 1%iger Natriumthiosulfatlösung
- Spülen mit Aqua destillata

2.2.1.3. Real time RT-PCR und RT-PCR

Die quantitative real time RT-PCR wurde für Osteopontin, Kollagen I, Alkalische Phosphatase, Osteocalcin und CD34 an den Tagen 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 durchgeführt. Die Werte wurden gegen GAPDH normiert und zum Wert der undifferenzierten Ausgangskultur (ESC mit LIF) in Verhältnis gesetzt. Berechnet und dargestellt wurden Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die real time RT-PCR wurde durchgeführt mit folgenden Primern/Sonden (Fa. Roche®):

GAPDH #77, Osteocalcin #4, Alkalische Phosphatase #16, Kollagen I #18, Osteopontin # 82, CD34 #2 (Spezifikation s. 2.1.4.1.)

Verdünnung der Proben: 1:10

Volumen/well: 25µl

Programm (iCycler):

Zyklen-Nr.	Anzahl d. Zyklen	Steps innerhalb der Zyklen	Temperatur	Dauer
1	1	Step 1:	50°C	10 min
2	1	Step 1:	95°C	10 min
3	45	Step 1:	95°C	20 s
		Step 2	60°C	45 s
4	1	Step 1:	4°C	HOLD

Für CD34 wurde darüber hinaus am Tag 10 eine qualitative RT-PCR mit den Primern für CD 34 (s. 2.1.4.3.) durchgeführt.

Reaktionsvolumen je well: 50µl

Programm (Thermocycler/ Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland):

Schritte	Temperatur	Dauer	Beschreibung
1	95°C	5 min	Denaturierung
2	95°C	30 s	
3	55°C	1 min 30 s	Annealing der Primer an homologe Bereiche der Template- DANN
4	72°C	1 min 30 s	Primerextension
5	72°C	5 min	Stop aller begonnenen Polymerisationen
6	4°C	~	Dauerkühlung

Wiederholung der Schritte 2-5: 35 (Zyklen)

2.1.2. Analyse des Genexpressionsmusters

2.2.2.1. Versuchsaufbau

Mit dem Medium, das sich am besten geeignet erwiesen hatte (s. Versuch 2.2.1.) wurden ESC drei Wochen lang kultiviert. Am Tag 0, sowie an den Tagen 11 und 21 wurden die Zellen geerntet und das Genexpressionsmuster mittels Microarray analysiert.

2.2.2.2. Microarray

Für die Untersuchungen wurde der Affymetrix mouse genome expression GeneChip® 430 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, USA) gewählt (Abb. 5). Alle Analysen wurden mit jeweils drei verschiedenen Proben durchgeführt.



Abb. 5:
Affymetrix
GeneChip®

Die Präparation der Proben für die Hybridisierung wurde entsprechend den Herstellerangaben (Affymetrix GeneChip® Expression Analysis Technical Manual) durchgeführt. 5µg der RNA, die mit RNeasy® Mini columns (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt waren (entsprechend den Herstellerangaben), wurden für die Generierung einer doppelsträngigen cDNA und zur anschließenden Biotin-Markierung der cRNA (Affymetrix One-Cycle Target Labeling Kit) genutzt. Die Länge der cRNA Produkte und Fragmente wurde mit dem Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Paolo Alto, USA) überprüft. Die fragmentierten cRNA Produkte wurden nun auf den Mouse Genome 430 2.0 GeneChip® Arrays für 16 Stunden bei 45° hybridisiert. Anschließend wurden die Arrays gewaschen und mit Streptavidin Phycoerythrin Konjugaten (Molecular Probes, Eugene, USA) sowie mit Biotin-gekoppelten anti-streptavidin Antikörpern (Vector Laboratories, Burlingame, USA) gefärbt (Abb. 6).

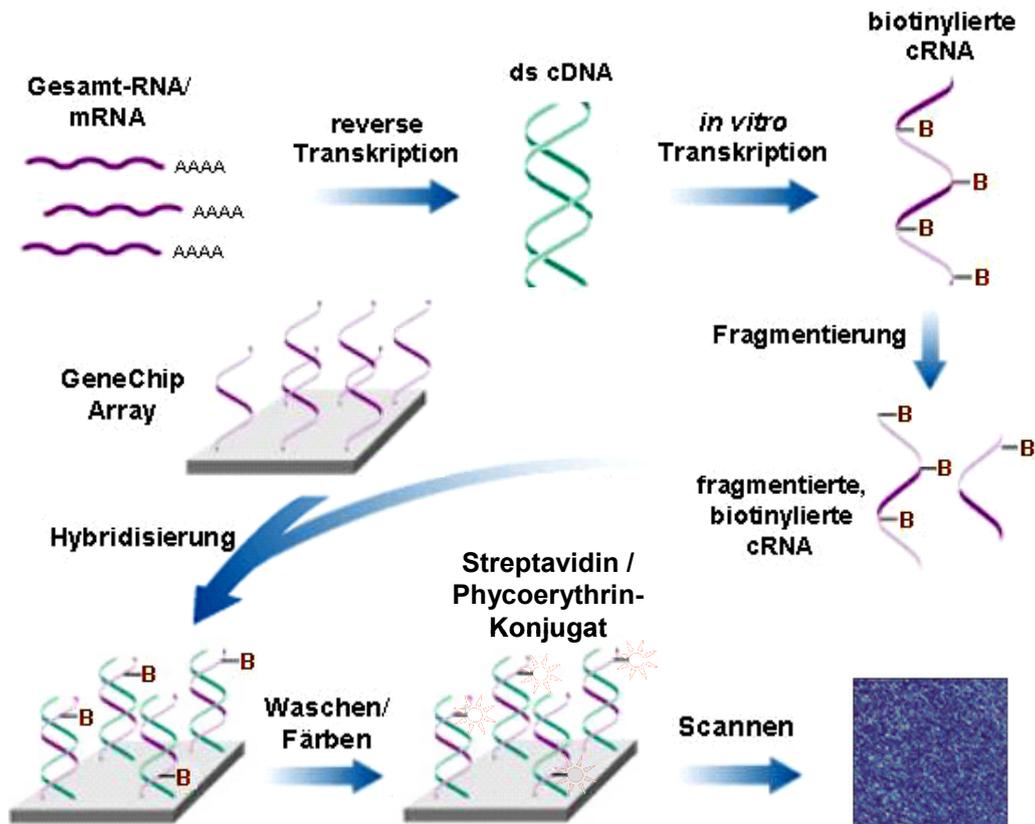


Abb. 6: Schematische Darstellung der Microarray-Analyse

Das Fluoreszenzsignal wurde mit dem Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 gemessen. Die Qualitätskontrolle der Proben sowie des Analyseprozesses wurde durch das Institut „KFB-Center of Excellence for Fluorescent Bioanalysis“ (Regensburg, Deutschland), einem zertifizierten Affymetrix Service Provider (Core Facility der Universität Regensburg), durchgeführt.

Neben einer generellen statistischen Analyse aller Gene wurde die Expression folgender Gene separat überprüft:

- Die osteoblastentypischen Gene Kollagen Typ I, Osteonectin, Osteopontin, Alkalische Phosphatase, Osteocalcin, BMP-2 (s.o.)
- Transkriptionsfaktoren/Regulatorgene, die mit einer osteoblastären Differenzierung assoziiert werden: Runx 2, Osterix (D'Ippolito *et al.*, 2006; Hendy *et al.*, 2005; Naito *et al.*, 2005), Osteoprotegerin (Yamamoto *et al.*, 2006)

- Signalproteine, die mit einer osteoblastären Differenzierung assoziiert werden: Smad 1, Smad 5 (Hendy *et al.*, 2005; Naito *et al.*, 2005), sowie Smad 9 (alias Smad 8) (Binato *et al.*, 2006)
- Gene, die mit der Differenzierung zu Osteoklasten assoziiert werden (Hikita *et al.*, 2005): Matrix Metalloproteinase 14 (MMP14)
- Marker für embryonale Stammzellen: Pouf1 (alias Oct4), Foxd3 (Baharvand *et al.*, 2006)

2.1.3. Versuch zur Kompatibilität von Biomaterialien und ESCs in vitro

2.2.3.1. Versuchsaufbau

Murine embryonale Stammzellen wurden gleichmäßig verteilt in Petrischalen (Durchmesser 10 cm) mit dem Basismedium (DMEM) kultiviert. In jeder Petrischale wurden 4 Probenkörper des gleichen Materials auf den Zellrasen aufgelegt. Am 4. Kulturtag wurden die Probenkörper entnommen und auf zellfreie Petrischalen umgesetzt. Auf diesen wurden die Probenkörper und die daran bzw. darin haftenden Zellen drei weitere Tage mit dem Basismedium kultiviert. Am 7. Tag schließlich wurden die Probenkörper entnommen und durch folgende Verfahren untersucht:

- CyQUANT®-Assay zur Bestimmung der relativen Zellzahl
- Rasterelektronenmikroskopie
- Real time RT-PCR

2.2.3.2. CyQUANT®-Assay

Entsprechend den Herstellerangaben wurden die Proben mit den entsprechenden Reagenzien inkubiert (Jones *et al.*, 2001). Die Werte wurden auf die Probenkörperoberfläche normiert und geben somit einen relativen Wert der Zellzahl je Probenansatz/Biomaterial an.

2.2.3.3. Rasterelektronenmikroskopie

Für rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen wurden die entnommenen Proben in 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M PBS (pH 7,3) für 3 h fixiert. Das dreimalige

Waschen der Proben erfolgte mit 0,1 M PBS-Lösung für 30 min. Die Präparate wurden anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydratisiert. Ein Austausch des Ethanols gegen Amylacetat wurde durch Einlegen der Proben in steigende Konzentrationen eines Amylacetat/Alkohol-Gemisches (10%ig steigende Amylacetat-Konzentration bis zu reinem Amylacetat für 20 min) erreicht. Nach dem Austausch des Amylacetates gegen flüssigen Sauerstoff unter Druck erfolgte die kritische Punkttrocknung der Präparate in einem kritischen Punkttrockner. Eine Plasma-Oberflächenbeschichtung mit Gold wurde unter Zuhilfenahme eines Polaran-Bedampfers erreicht. Die Präparate waren hierfür mit Graphit auf einem Probenhalter fixiert worden und wurden anschließend in einem DSM960 Rasterelektronenmikroskop von Zeiss bei einer angelegten Beschleunigungsspannung von 15 kV untersucht.

2.2.3.4. Real Time RT-PCR

Der Einfluss der Biomaterialien auf das Genexpressionsmuster wurde mittels quantitativer real time RT-PCR analysiert. Die Proben wurden analog 2.2.1.3. verarbeitet. Die jeweiligen Genexpressionswerte am Ende des Kultivierungszeitraumes (Tag 7) wurden mit den Werten der Ausgangskultur (Tag 0, ohne Biomaterialien) verglichen. Die Versuche wurden zweimal wiederholt und die Ergebnisse als Mittelwerte dargestellt.

2.1.4. Mikromassenkulturen mit ESC

2.2.4.1. Versuchsaufbau

Zunächst wurden 96-well-Platten mit einem Gemisch aus Agarose und Basismedium (s. 2.2.1.1.) beschichtet. Die Beschichtung mit Agarose verhindert ein Anhaften der Zellen an der Unterlage und nimmt den Zellen damit die Möglichkeit, einen Monolayer (2D-Kultur) zu bilden. Nach eintägiger Lagerung werden auf den Platten jeweils ca. 200.000 undifferenzierten ESC pro well ausgesiedelt. Eine Hälfte der Platten wird nun mit dem Basismedium, die andere mit dem Basismedium (ohne LIF) und Zusatz von Dexamethason (50 nM) + 100µM L-Ascorbat (50µM) + β-Glycerophosphat (10mM) (s.a. 2.2.1.1.) kultiviert. Die Kultivierung findet in einem

CO₂-Inkubator bei 37°C und 90% Luftfeuchtigkeit und 8% CO₂ statt. Der Wechsel des Mediums erfolgt alle 2 Tage. Nach 3, 7, 10, 21 Tagen wird jeweils ein Viertel der Zellen aus beiden Kulturansätzen geerntet. Folgende Analysen werden an den angegebenen Tagen durchgeführt:

- Histologische Untersuchung
- Transmissionselektronenmikroskopie
- Elektronendiffraktionsanalyse

2.2.4.2. Histologische Untersuchung

Für die histologische Untersuchung werden die Proben in 4% gepuffertem Formaldehyd fixiert und in Paraffin standardmäßig eingebettet. Nach Auswaschen des Fixans unter fließendem Leitungswasser, werden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 75%, 90%, 100% Isopropanol) stufenweise bei Raumtemperatur entwässert. Die Proben werden 1h in Zedernholzöl gelagert, um anschließend jeweils 3 x 60 min mit Paraplast plus® bei 60°C im Wärmeschrank in vorgefertigte Kunststoffkörbchen eingebettet werden zu können. Die 4µm dünnen Schnitte werden mit einem Rotationsmikrotom angefertigt. Zur Beurteilung der Morphologie wird eine konventionelle Alizarinrot S Färbung für den histochemischen Kalziumnachweis durchgeführt. Kalziumsalze werden intensiv rötlich-orange gefärbt. Als Gegenfärbung dient Toluidinblau. Die Auswertung erfolgt deskriptiv.

2.2.4.3. Transmissionselektronenmikroskopie

Die Mikrosphären werden mit einer Pipette entnommen und zur Synchronfixierung mit einer Lösung für 45 min im Eisbad (4°C) fixiert. Diese Lösung besteht aus:

2,0ml	25%iges Glutaraldehyd
1,75ml	10%iges Paraformaldehyd
1,25ml	24%ige Sucrose
10,0ml	0,2 molarer Phosphatpuffer
5,0ml	4%iges Osmiumtetroxid

Anschließend werden die Proben mit 0,1 molarer PBS 2 mal je 10 min gespült. Es folgt die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe:

30% Alkohol	für 30 min
50% Alkohol	für 30 min
70% Alkohol	für 30 min
90% Alkohol	für 45 min
96% Alkohol	für 45 min
100% Alkohol	für 10 min
100% Alkohol	für 45 min
100% Alkohol	für 45 min

Die Proben werden für 60 min in Propylenoxid eingelegt. Schließlich erfolgt die Kunstharzeinbettung durch konsekutives Einlegen in ein Propylenoxid-Araldit-Gemisch für jeweils 60 min im Verhältnis 2:1, 1:1, 1:2 und zuletzt reinem Araldit. Die Polymerisation erfolgt bei 60°C für 3 Tage.

Nach dem Aushärten der Proben erfolgt das Ausschneiden sowie die Anfertigung von Semidünnschnitten zur Orientierung. Die anschließend angefertigten Ultradünnschnitte wurden auf einen Kupferträger aufgebracht und transmissionselektronenmikroskopisch bei verschiedenen Beschleunigungsspannungen untersucht. Zur Kontrastierung wurde Uranylacetat verwendet.

Für die morphologischen Untersuchungen stand ein Philips EM 301 Transmissionselektronenmikroskop (TEM) zur Verfügung. Die gewünschte Spannung wurde zwischen 20 kV und 100 kV in Schritten von 20 kV angelegt. Weitere Untersuchungen wurden mit dem Philips CM10 TEM und Philips CM20 TEM durchgeführt. Das CM10 wurde mit 100 kV betrieben, während das CM20 Untersuchungen bei 200 kV ermöglichte. Beide CM-Mikroskope wurden vor allem für große Vergrößerungen (100.000 fach und größer) bei gleichzeitig gutem Kontrast eingesetzt.

2.2.4.4. Elektronendiffraktionsanalyse

Die Elektronendiffraktionsanalyse erfolgte an den gleichen unkontrastierten Präparaten, die auch für die Transmissionselektronenmikroskopie verwendet wurden. Die Kontaktzeit der Schnitte mit Wasser im Mikrotom wurde auf wenige Sekunden begrenzt, um eine Lösung oder Umverteilung der Kristalle durch Wasser zu verhindern. Die Untersuchung der Proben erfolgte in einem Zeiss EM 902 Elektronenmikroskop mit einer Kameralänge von 650mm bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV. Für den Beugering 002, der für Hydroxylapatit einen charakteristischen Gitterebenenabstand besitzt, wurde der entsprechende d-Wert berechnet (Arnold *et al.*, 1999; Plate *et al.*, 1998).

2.1.5. Statistische Methode

Zur Identifizierung von statistisch signifikanten Unterschieden bei der Genexpressionsanalyse während des Biokompatibilitätsversuches (s. 2.2.3.) wurde der T-Studententest verwendet. Als Software diente SPSS 12.0®.

Zur Analyse der Microarrays wurde die Software Affymetrix GeneChip® Operation Software (GCOS) 1.4 verwendet. Die durchschnittliche Signalintensität wurde gleich 100 gesetzt und den verschiedenen Genen die Kategorien P (present = deutlich detektierbar), M (medium = mäßig detektierbar) und A (absent = nicht detektierbar) zugewiesen (gemäß Affymetrix-Algorithmus). Für die Gesamtheit aller Gene wurde eine multiclass ANOVA-Analyse mit Bonferroni-Korrektur berechnet, wobei der Zeitpunkt 0 als Ausgangspunkt definiert wurde und die signifikanten Expressionsunterschiede an den Tagen 11 und 21 bestimmt wurden (Signifikanzniveau <0,05) (Software: ArrayAssist 3.4). Darüber hinaus wurden die Werte für einige bestimmte Gene, die mit der osteoblastären Differenzierung bzw. Differenzierung von ESC in Verbindung gebracht werden, mittels T-Studententest verglichen.

Schließlich wurden die Gene, die an Tag 11 und 21 signifikante Expressionsunterschiede verglichen zum Ausgangswert aufzeigten, mit Hilfe des Anatomie-Filters der Bibliosphere®-Software (Genomatix Software GmbH, München, Deutschland) hinsichtlich einer Pathwayanalyse analysiert. Dabei wurden alle Gene mit signifikantem Genexpressionsmuster einer Zellart, Zellkompartiment,

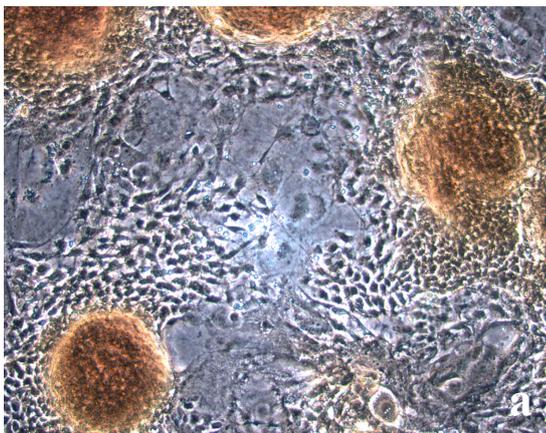
etc. zugeordnet. Die Zuordnung basierte dabei wesentlich auf den Publikationen in den größten internationalen Literaturdatenbanken (z.B. PubMed, Medline, etc.). Das Ranking erfolgte anhand des Z-Score. Der Z-Score errechnet sich aus den tatsächlichen signifikanten Genveränderungen einer Zellart/Zellkompartiment/etc. dividiert durch die erwartete Anzahl hoch- bzw. herunterregulierter Gene derselben Zellart.

3. Ergebnisse

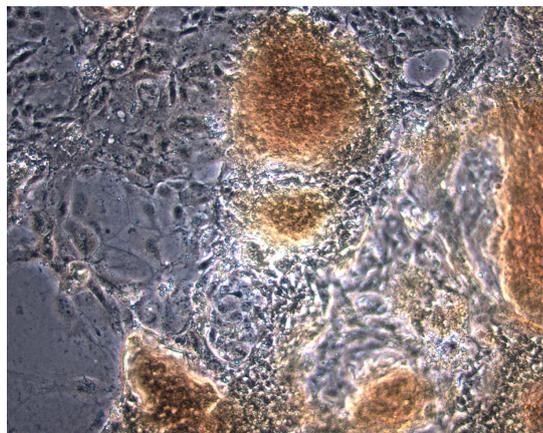
3.1. Bestimmung eines geeigneten in vitro Differenzierungsmediums

3.1.1. Histologische Untersuchungen

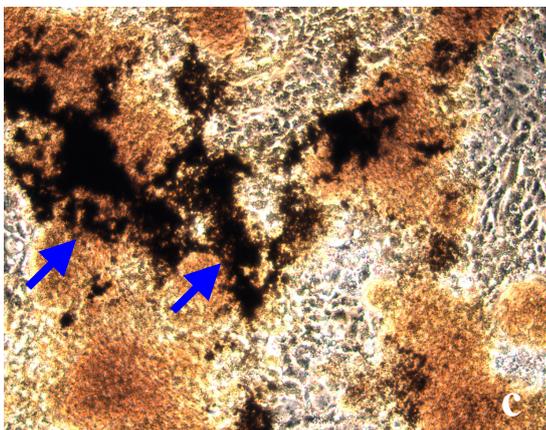
Für die Detektion von Mineralisierungen wurde die Färbung nach von Kossa durchgeführt. Kalziumhaltige Mineralisierungen werden dabei schwarz dargestellt. Während es unter Zusatz von Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat (DAG) zu ausgeprägten Mineralisationen kommt, sind diese in den Kulturen mit alleinigem Zusatz von BMP-2 deutlich geringer ausgeprägt. In den



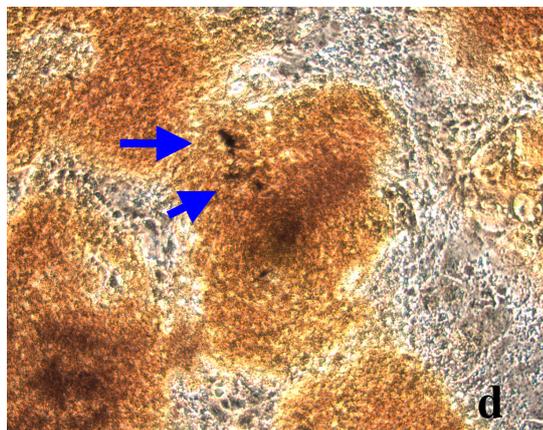
ESC + LIF



ESC ohne LIF



ESC + DAG



ESC + BMP2

Abb. 7: Histologische Darstellung der Mineralisierungen (Tag 14) bei unterschiedlichen Kulturmedien a) ESC mit LIF b) ESC ohne LIF c) ESC mit DAG d) ESC mit BMP-2. Die Pfeile (blau) deuten die Mineralisierungen an, die in der von-Kossa-Färbung schwarz dargestellt werden.

Zellkulturen, die einer „ungerichteten bzw. spontanen“ Differenzierung überlassen wurden, also bei ESC ohne LIF, und auch in den undifferenzierten ESC (ESC mit LIF) sind keine Mineralisationen zu erkennen (Abb. 7).

3.1.2. RT-PCR und Real Time RT-PCR

Zum qualitativen Nachweis des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34 wurde am Tag 10 eine qualitative RT-PCR durchgeführt und das Reaktionsgemisch nach der PCR auf ein Elektrophoresegel aufgetragen. Während in der Kultur ohne osteogenen Zusatz (DAG oder BMP-2) CD34 noch deutlich nachweisbar ist, kann es bei den Zellkulturen mit DAG oder BMP-2 nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 8).

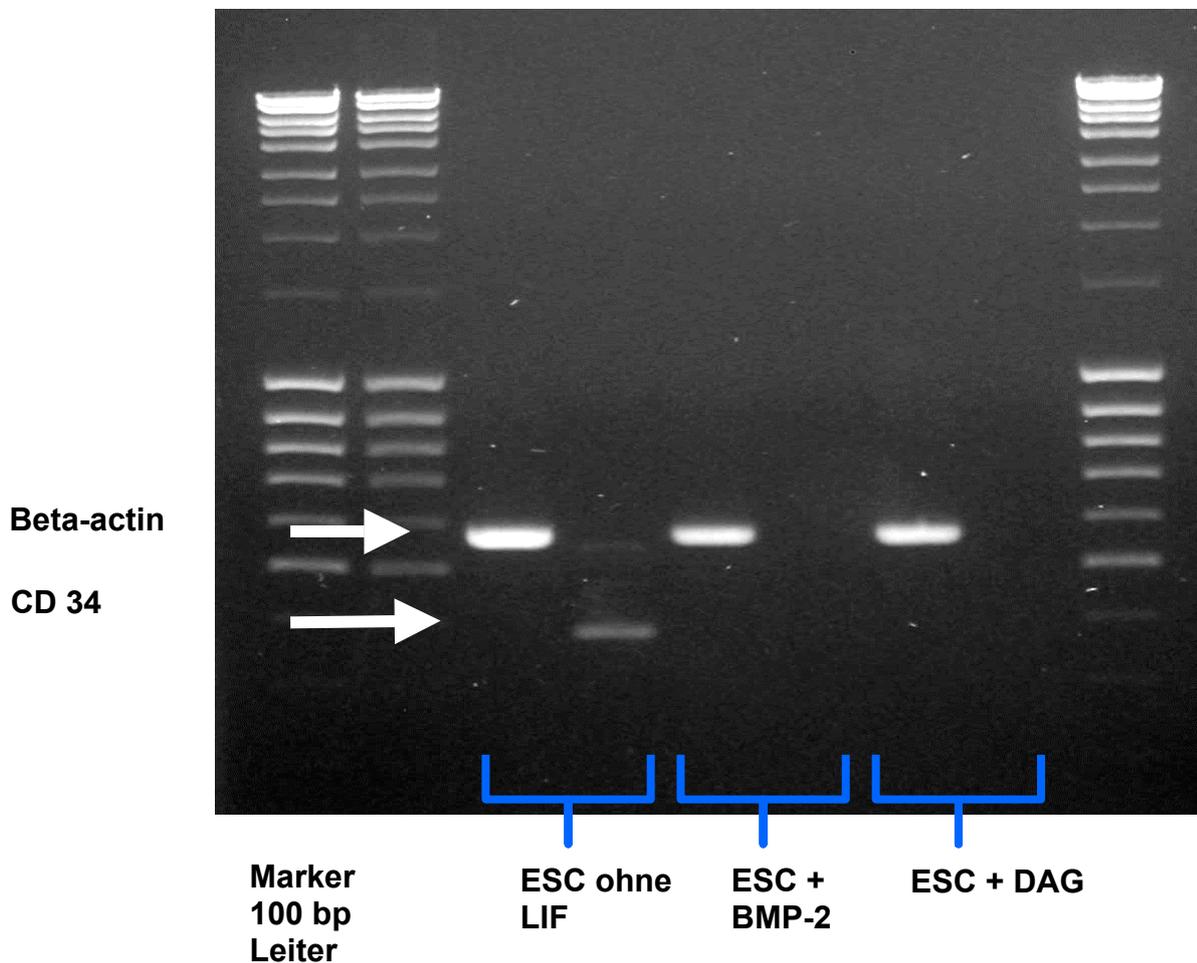
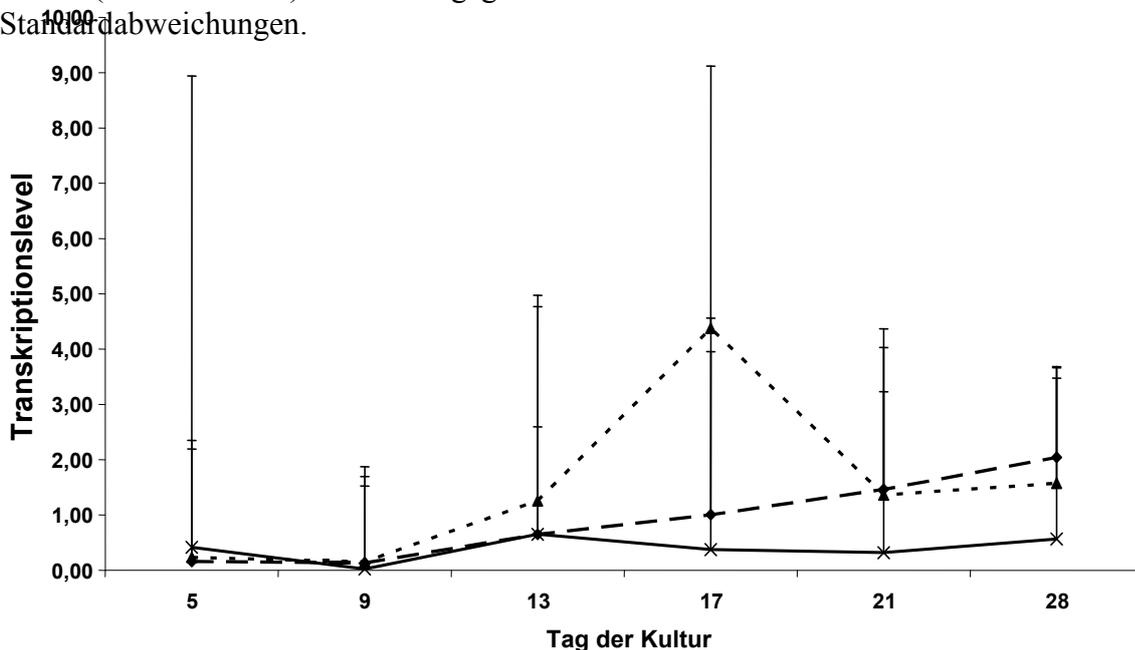


Abb. 8: Ergebnis der qualitativen RT-PCR für CD34. Während die CD34-Bande in der Zellkultur ESC ohne LIF deutlich zu erkennen ist, ist sie bei ESC mit BMP-2 oder ESC mit DAG nicht mehr vorhanden. Als Kontrollbande ist Beta-actin (oberer weißer Pfeil) dargestellt.

Neben dem rein qualitativen Nachweis von CD34 wurde der zeitliche Verlauf des Expressionsverhaltens einiger osteoblastentypischer Gene mittels real time RT-PCR bestimmt. Die Ergebnisse sind gegen GAPDH normiert und jeweils als Vielfaches der undifferenzierten Ausgangskultur ESC mit LIF dargestellt.

Die **Osteopontin**-Expression ist zunächst in allen drei Kulturmedien (Basismedium ohne LIF, Basismedium mit BMP-2, Basismedium mit DAG) deutlich geringer als in der Ausgangskultur. Während die ESC in der DAG-Kultur dauerhaft niedrigere Expressionslevel zeigen als die Kontrollgruppe (ESC mit LIF), steigt die Expression von Osteopontin in der BMP-2-Gruppe nach zweieinhalb Wochen auf über das 4-fache an, um anschließend auf ein nur leicht erhöhtes Expressionsniveau zurückzukehren. Demgegenüber verläuft die Osteopontinexpression in der ESC ohne LIF-Gruppe nahezu parallel zur DAG-Gruppe, wobei die Werte insgesamt jedoch etwas höher liegen (Abb.9).

Abb. 9: Osteopontinexpression bei Zusatz von DAG (x), mit BMP-2 (▲) und ohne Zusatz (ESC ohne LIF) (◆). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.



Kollagen Typ I, das für Knochengewebe charakteristisch ist, zeigt ein ganz anderes Expressionsmuster. Nach eineinhalb Wochen ist sowohl die Kollagenexpression in der BMP-2-Kultur als auch in der DAG-Kultur deutlich erhöht, wobei die Werte in der DAG-Kultur noch einmal 2/3 über denen in der BMP-2-Kultur liegen. Demgegenüber zeigt die ESC ohne LIF Kultur nur einen weit geringeren und zeitlich nach hinten versetzten Expressionsanstieg. Nach drei Wochen hat die Kollagenexpression in allen Gruppen den Ausgangswert nahezu wieder erreicht und sistsiert auf diesem Niveau. Lediglich in der DAG-Gruppe kommt es noch einmal zu einem Expressionsanstieg (Abb. 10).

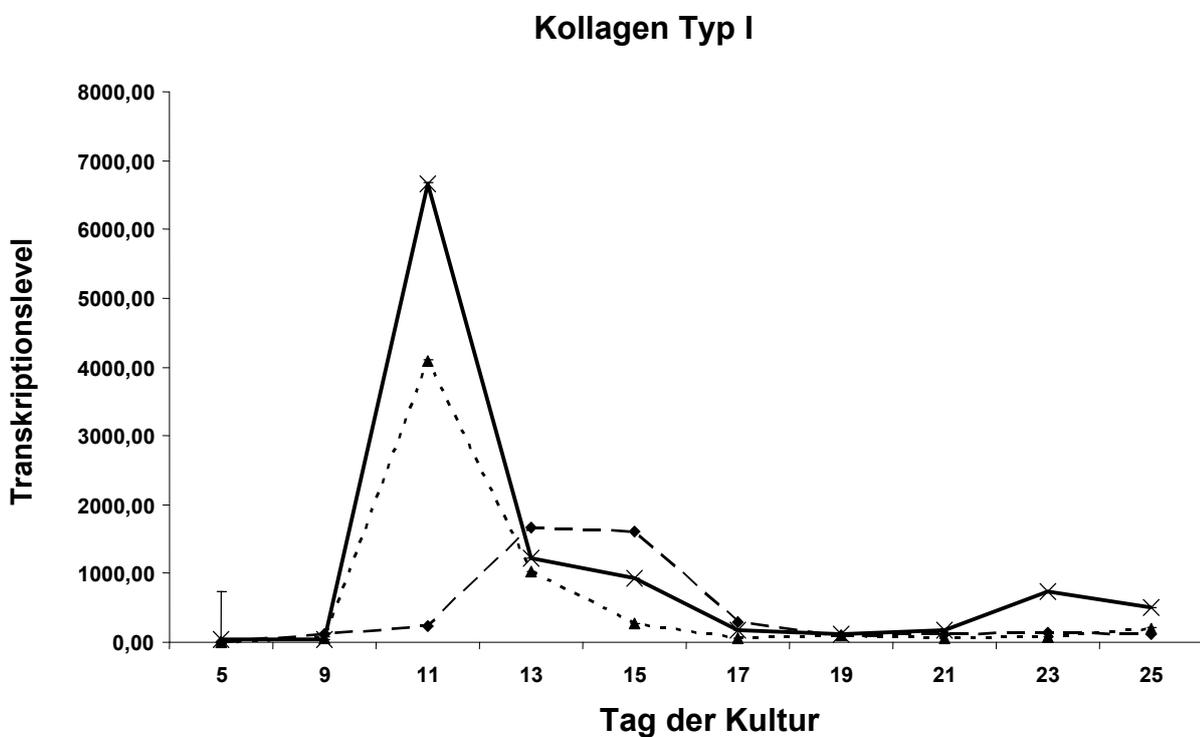


Abb. 10: Kollagen I Expression bei Zusatz von DAG \times , mit BMP-2 \blacktriangle und ohne Zusatz (ESC ohne LIF) \blacklozenge . Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

Die **Alkalische Phosphatase** zeigt für die beiden Kulturen mit DAG und BMP-2 einen ähnlichen Verlauf, der maximal das doppelte Expressionsniveau der Ausgangskultur erreicht. Im Gegensatz dazu kommt es in der ESC ohne LIF Kultur

zu einem deutlichen Anstieg in der dritten Woche. Nach dreieinhalb Wochen jedoch kehrt der Expressionslevel ebenfalls zum Ausgangsniveau zurück (Abb. 11).

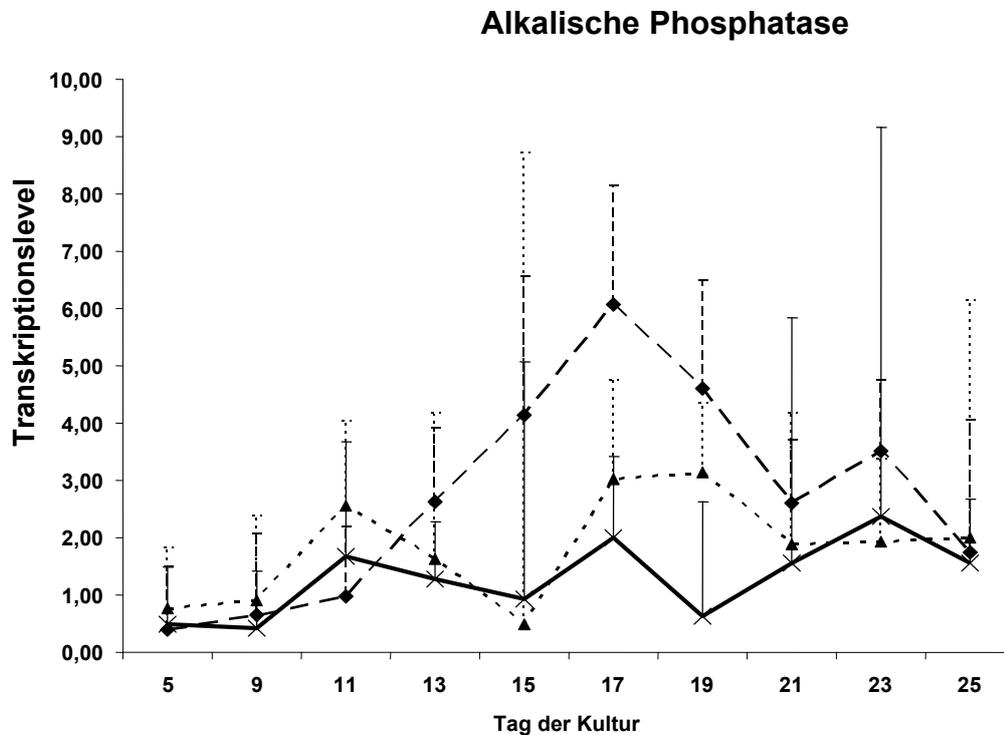


Abb. 11: Alkalische Phosphatase Expression bei Zusatz von DAG $\text{---}\times\text{---}$, mit BMP-2 $\text{····}\blacktriangle\text{····}$ und ohne Zusatz (ESC ohne LIF) $\text{---}\blacklozenge\text{---}$. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

Osteocalcin, ein sehr spezifischer Marker während des osteoblastären Reifungsprozesses, zeigt einen sehr interessanten Expressionsverlauf. In der zweiten Woche erreichen sowohl die BMP-2 Kulturen als auch die DAG-Kulturen das 40 bis 60-fache des Ausgangsniveaus. Während die Kultur ohne LIF ungefähr ab der zweiten Woche bis in die vierte Woche hinein sich bei Werten zwischen 20 und 40 einpendelt, geht die Expression in den beiden anderen Kulturen zunächst auf das Ausgangsniveau zurück, um dann erneut anzusteigen. Dabei geht der Anstieg in der DAG-Kultur dem Anstieg in der BMP-2 Kultur um ca. eine Woche voraus (Abb. 12). Zudem fällt auf, dass die Maximalwerte während des gesamten Beobachtungszeitraumes ausschließlich in der DAG-Gruppe erreicht werden.

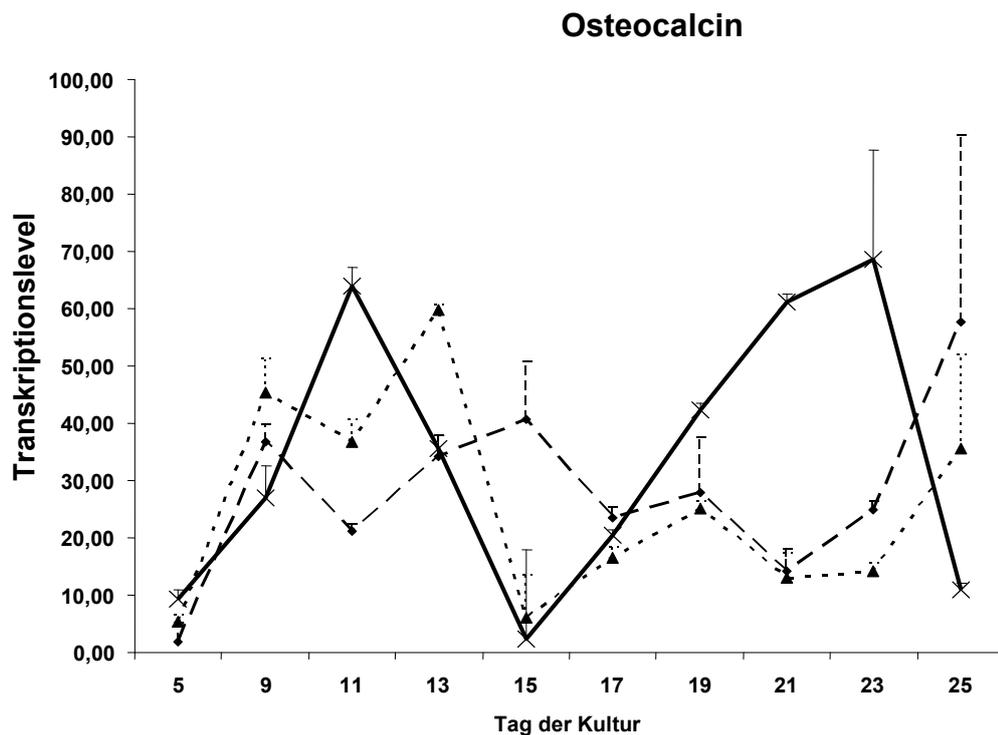


Abb. 12: Osteocalcinexpression bei Zusatz von DAG $\text{---}\times\text{---}$, mit BMP-2 $\text{.....}\blacktriangle\text{.....}$ und ohne Zusatz (ESC ohne LIF) $\text{---}\blacklozenge\text{---}$. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

Nachdem der qualitative Nachweis von **CD34** am Tag 10 geführt worden war, wurde nun auch der quantitative Verlauf über den gesamten Versuchszeitraum analysiert. Dabei zeigten sich weitgehend parallele Expressionsmuster in allen drei Versuchsgruppen, wobei die ESC ohne LIF Gruppe in den ersten eineinhalb Wochen, sowie zum Ende des Versuches, jeweils die höchsten Werte aufweist. Am Tag 9 zeigen die ESC ohne LIF mit 1,0 den höchsten Wert verglichen mit der BMP-2 Gruppe (0,8) und DAG-Gruppe (0,5) (Abb. 13). Dies steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis aus der qualitativen RT-PCR, in der zwar CD34 für ESC ohne LIF nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch in den beiden anderen Gruppen. Interessant ist zudem der temporäre Anstieg in allen Gruppen in der dritten Woche.

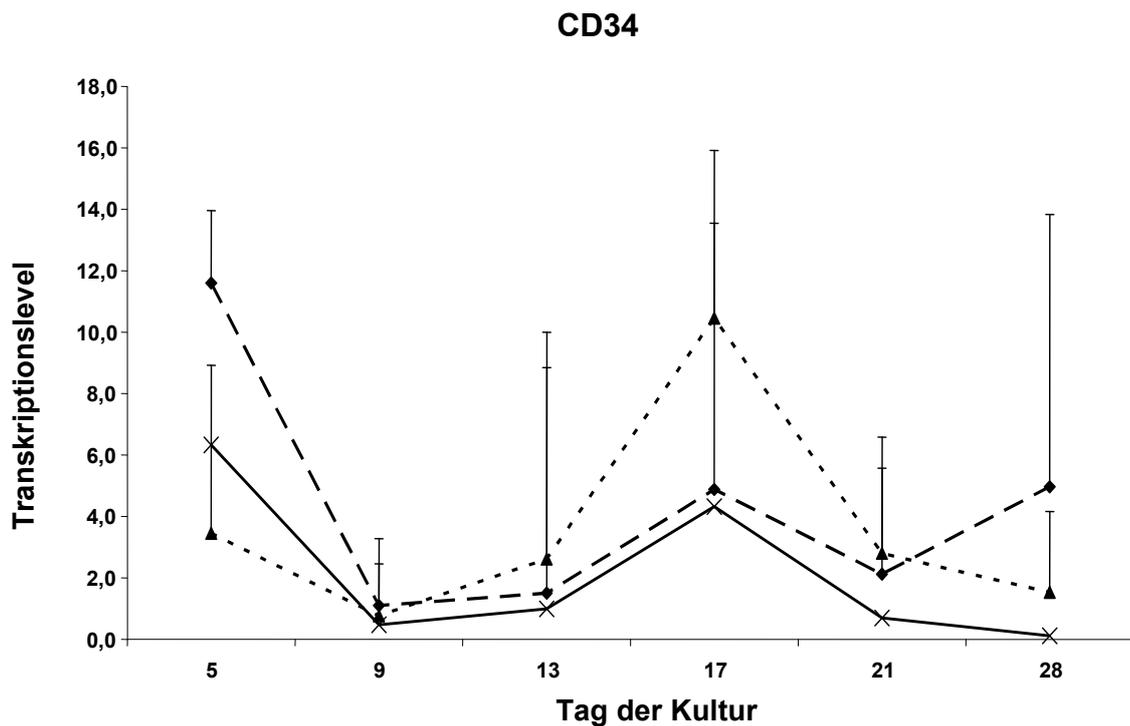


Abb. 13: CD34-Expression bei Zusatz von DAG \times , mit BMP-2 \blacktriangle und ohne Zusatz (ESC ohne LIF) \blacklozenge . Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen.

Zusammenfassend lässt sich Folgendes feststellen: DAG und in weit geringerem Ausmaß auch BMP-2 induzieren Mineralisationen, während diese in den Kontrollgruppen ESC mit LIF und ESC ohne LIF nicht nachzuweisen waren. DAG führt zu einer stärkeren Kollagen I Expression als BMP-2. Dies trifft auch für Osteocalcin zu, wobei der zweite plateauartige Anstieg in der DAG-Kultur auch um ca. eine Woche eher beginnt als in der BMP-2 Gruppe. Sowohl in der DAG- als auch in der BMP-2 Gruppe kommt es passager zu Beginn der zweiten Woche zu einem weitgehenden Verlust des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34, während dieser in der ESC ohne LIF Gruppe noch gerade nachweisbar ist. Dies lässt darauf schließen, dass DAG zu einer schnelleren osteoblastären Differenzierung von ESC führt. Aus diesem Grund werden die nachfolgenden Untersuchungen zur Differenzierung von ESC mit DAG durchgeführt.

3.2. Analyse Expressionsmuster

Nach Kultivierung der ESC mit DAG für drei Wochen wurden an den Tagen 0, 11 und 21 jeweils drei Kulturen geerntet und einer Microarray-Analyse unterzogen. Abbildung 14 zeigt exemplarisch den hybridisierten und gefärbten Genchip einer von drei Proben zum Zeitpunkt Tag 11 (s. Abb. 14).

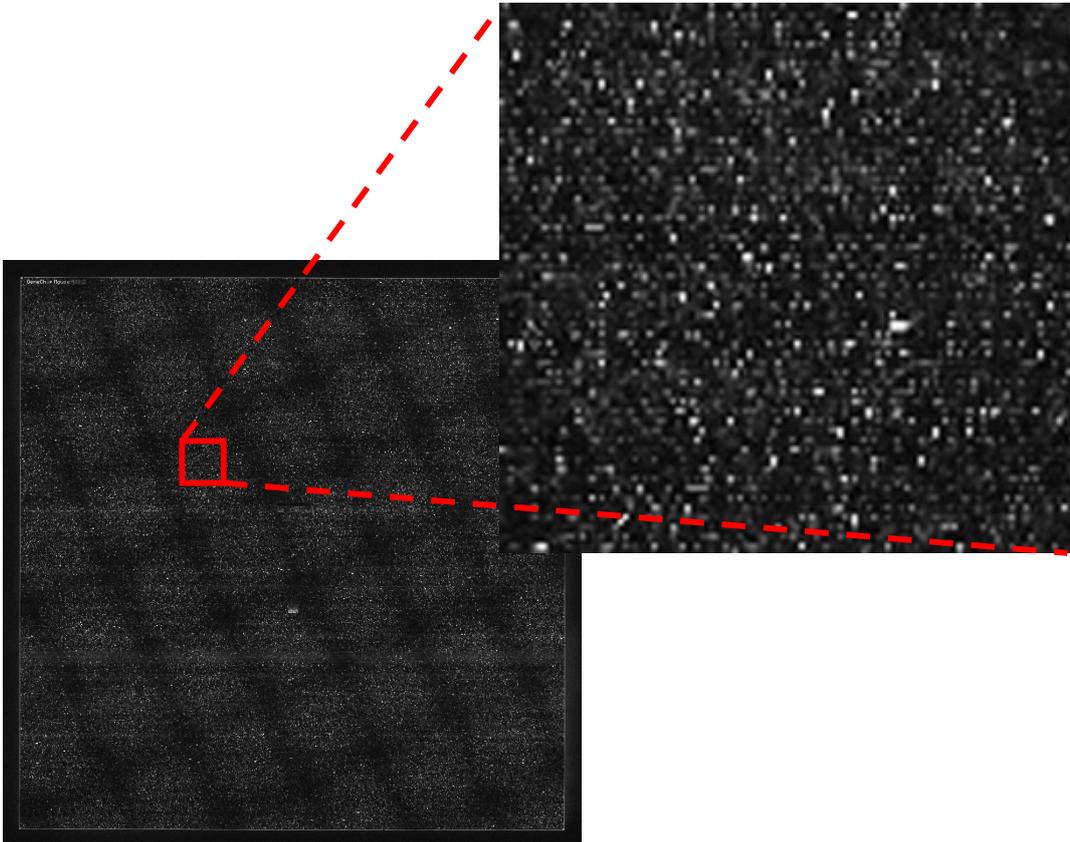


Abb. 14: Hybridisierter GenChip (Affymetrix mouse genome expression GeneChip® 430 2.0) zum Zeitpunkt Tag 11. In der Ausschnittsvergrößerung werden die einzelnen Genfelder mit ihren jeweils unterschiedlichen Graufärbungen sichtbar.

Die signifikant hoch- oder herunterregulierten Gene (Signifikanzniveau $<0,05$) wurden mit Hilfe des Anatomiefilters der Bibliosphere®-Software ausgewertet. Der Z-Wert gibt dabei das Verhältnis zwischen der jeweils tatsächlichen Anzahl signifikant über- oder unterexprimierter Gene zur durchschnittlich erwarteten Anzahl an. Die Auswertung (Abb. 15) zeigt eindrucksvoll, dass bei der Kultivierung der ESC mit DAG osteoblastentypische Gene überproportional beteiligt sind. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die osteoblastäre Differenzierung von ESC durch DAG.

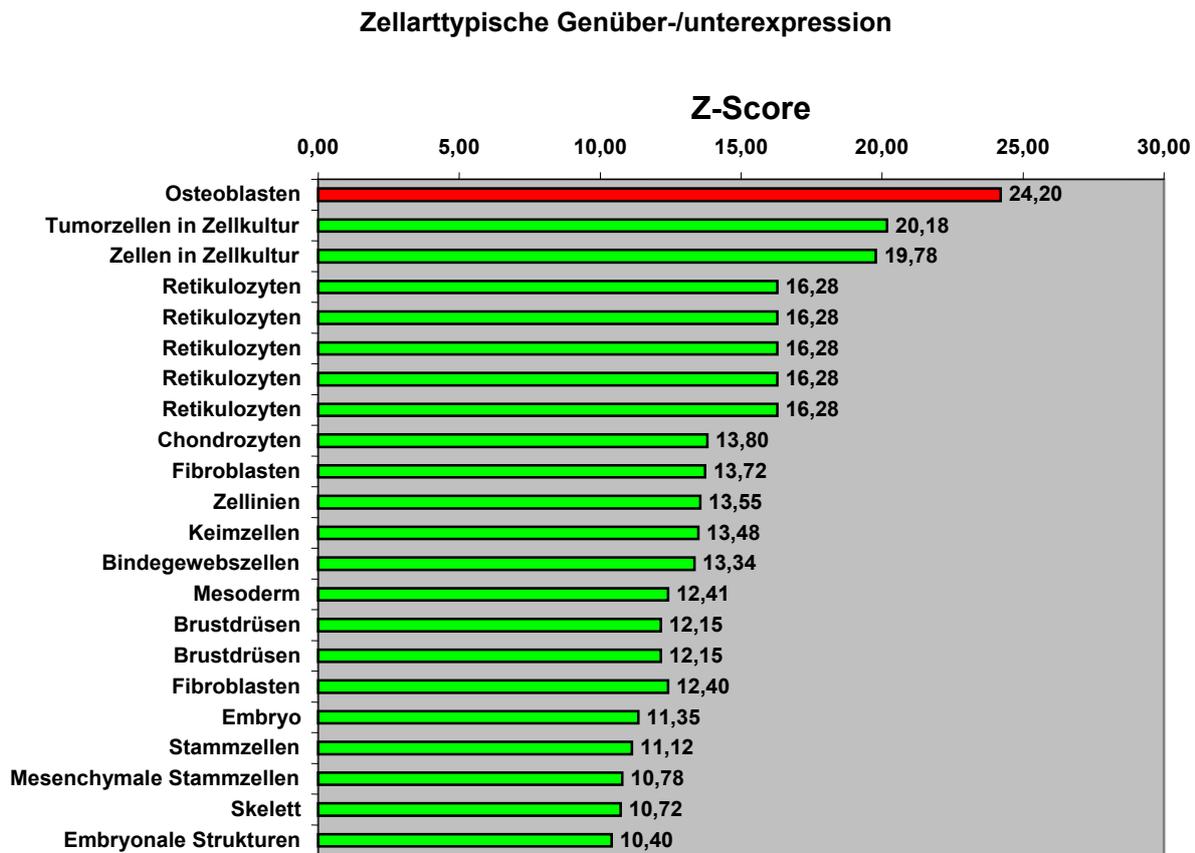


Abb. 15: Darstellung des Z-Score im Anatomiefilter. Dargestellt sind die Kategorien mit den 22 höchsten Werten von insgesamt 1638 Kategorien. Die Expression von osteoblastentypischen Genen wurde weit überproportional beeinflusst.

Auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ konnten im Vergleich zum Ausgangswert (Tag 0) für den Tag 11 insgesamt 1582 Gene mit veränderter Expressionsrate (> 2 -fach) sowie für den Tag 21 insgesamt 1645 Gene identifiziert werden. Für 15 Gene wurde eine separate Auswertung bzgl. ihres Expressionsverhaltens durchgeführt. Erwartungsgemäß kommt es nach drei Wochen zu einem signifikanten Anstieg des osteoblastentypischen Gens Osteocalcin, während Osteonectin, Osteopontin und Osteoprotegerin an beiden Zeitpunkten keine signifikanten Veränderungen zeigten. Lediglich das Expressionsniveau der Alkalischen Phosphatase sank nach drei Wochen signifikant ab. Interessant ist zudem das unterschiedliche Verhalten der beiden Prokollagen I-kodierenden Gene $\alpha 1$ und $\alpha 2$. Während sich die Expression für die $\alpha 2$ -Variante kaum änderte, kam es bei der $\alpha 1$ -Variante zum hochsignifikanten Anstieg. Runx 2 zeigte im Gegensatz zu Osterix einen hochsignifikanten Anstieg.

Gen / Analysezeitpunkt	Tag 11	Tag 21
 Alkalische Phosphatase	≈	0,05
 BMP-2	0,01	0,001
 Fox D3	0,05	0,05
 Kollagen Typ I α1	0,001	0,001
Kollagen Typ I α2	≈	≈
 MMP 14	0,001	0,001
 Osteocalcin	≈	0,05
Osteonectin	≈	≈
Osteopontin	≈	≈
Osteoprotegerin	≈	≈
Osterix	≈	≈
 Pou 5f1	0,001	0,001
 Runx 2	0,001	0,001
 Smad 1	0,001	0,001
Smad 5	≈	≈
 Smad 9	≈	0,05

Tab. 2: Darstellung von Expressionsveränderungen ausgewählter Gene im Vergleich zum Ausgangswert (Tag 0). Die ESC wurden 11 bzw. 21 Tage mit DAG kultiviert. Angegeben ist das jeweilige Signifikanzniveau und die Richtung der Veränderung.  = signifikante Erhöhung,  = signifikante Verminderung; ≈ = keine signifikante Veränderung der Expression

Von den drei Signalproteinen Smad 1, Smad 5, Smad 9 (alias Smad 8) zeigte nur ersteres einen signifikanten Anstieg. Beide Stammzellmarker Pou 5f1 und Fox D3 zeigten eine signifikant reduzierte Expression nach 11 bzw. 21 Tagen (Abb. 16).

3.3. In vitro Biokompatibilitätsmessung

3.3.1. Relative Proliferationsrate der Zellen

Um die Kompatibilität von ESC mit verschiedenen Biomaterialien zu testen, wurde für alle Materialien ein CyQUANT®-Assay durchgeführt. Mit weitem Abstand zeigt ICBM die höchsten Werte gefolgt von den beiden Trikalziumphosphaten Cerasorb® und Cerasorb M®, die beide in etwa gleiche Werte erzielen. Deutlich geringere Werte und damit auch Zellen weisen die PLA/PGA-Konstrukte sowie der bovine deproteinierte Knochen (Bio Oss®) auf (Abb. 16). Der Einfluß des Biomaterials auf die Extinktionswerte, respektive Proliferationswerte, ist in der ANOVA-Analyse hochsignifikant ($p < 0,001$).

Zellproliferation auf Biomaterialien

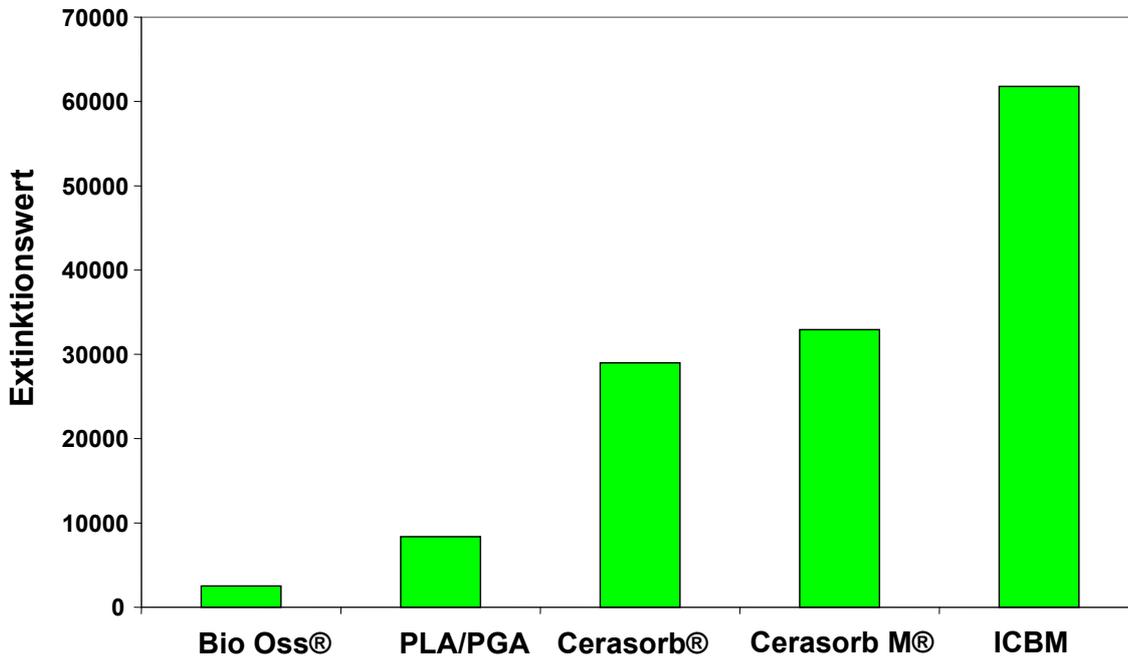


Abb. 16: Relative Zellzahlbestimmung mittels CyQUANT®-Assay. Angegeben sind die auf 1mm^2 normierten Extinktionsmittelwerte als Maß für die relative Anzahl vitaler Zellen auf den jeweiligen Biomaterialien. Die materialspezifischen Unterschiede sind in der ANOVA-Analyse hochsignifikant ($p < 0,001$).

3.3.2. Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungsergebnisse bestätigen die Ergebnisse des CyQuant®-Assays. Während Zellen auf dem anorganischen bovinen Knochen (Bio Oss®) kaum zu erkennen waren, zeigten sich deutliche Zellansammlungen auf den Trikalziumphosphat-Körpern (Cerasorb® und Cerasorb M®). Die Zellen liegen dem Trikalziumphosphat direkt auf und beginnen sogar, in das Material bzw. die Poren der Probenkörper einzuwachsen. Insbesondere bei dem – im Vergleich zu Cerasorb® - multiporöseren und grobporigeren Cerasorb M® konnten in den halbierten Probenkörpern auch Zellen identifiziert werden, die in das Material eingewachsen waren.

Die Zellen zeigten nicht mehr die morphologischen Charakteristika von undifferenzierten ESC (undifferenzierte ESC haben eine rundliche Form ohne Zellfortsätze) sondern präsentierten sich als längliche Zellen mit reichlich Zellfortsätzen, die am Biomaterial anheften. Morphologisch ist dies durchaus mit osteoblastären Zellen vereinbar. Ein besonders dichter „Zellrasen“ stellte sich auf den ICBM-Körpern dar. Die Zellen scheinen durch viele Zell-Zell-Kontakte miteinander in Verbindung zu stehen. Darüber hinaus gewährleisteten offensichtlich Zell-Biomaterial-Kontakte die Fixierung der Zellen in diesem recht porösen Material. Auch hier weisen die Zellen morphologisch eher Charakteristika von osteoblasten-ähnlichen Zellen als von undifferenzierten kugelförmigen ESC auf.

In den nachfolgenden Abbildungen sind ausgewählte Biomaterialien in jeweils zwei unterschiedlichen elektronenoptischen Vergrößerungen dargestellt, die das jeweilige Material vor und nach der Zellbesiedelung zeigen (Abb. 17 – 31).

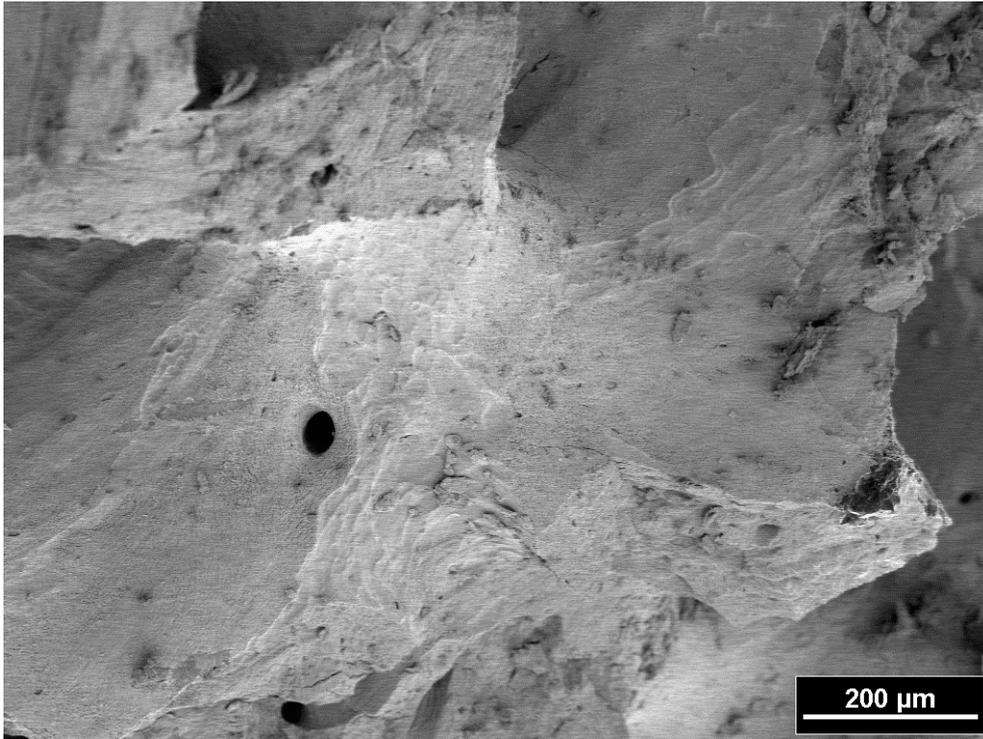


Abb. 17: Bio Oss® vor der Zellbesiedelung.

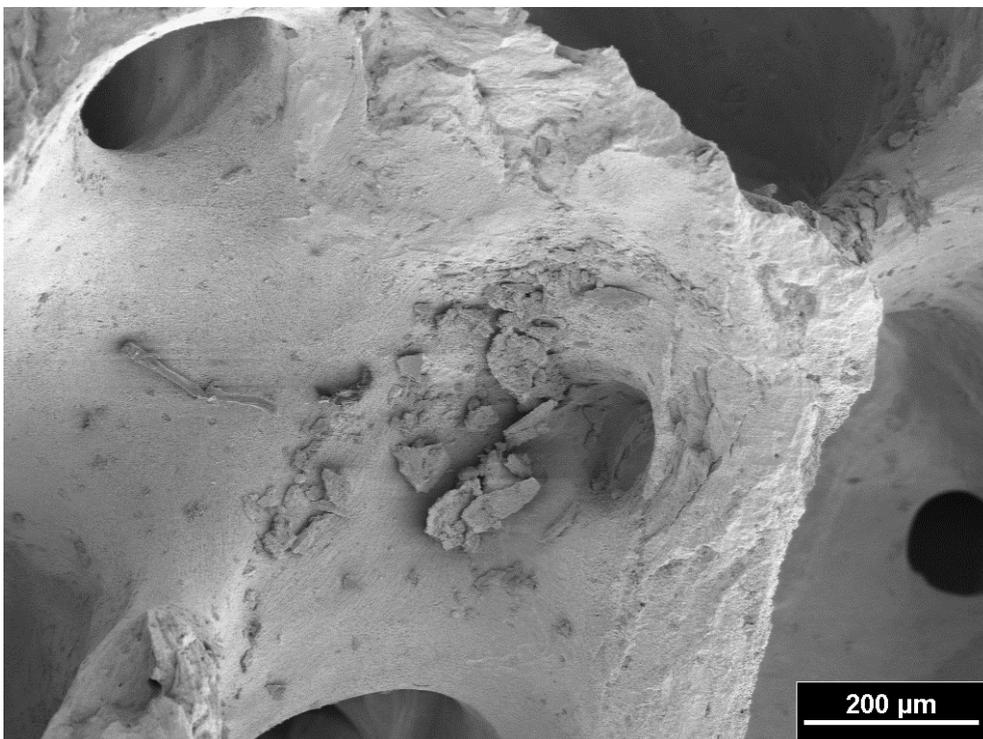


Abb. 18: Bio Oss® nach der Zellbesiedelung. Es sind keine Zellen zu erkennen. Möglicherweise handelt es sich in der Mitte des Bildes um Zelldetritus

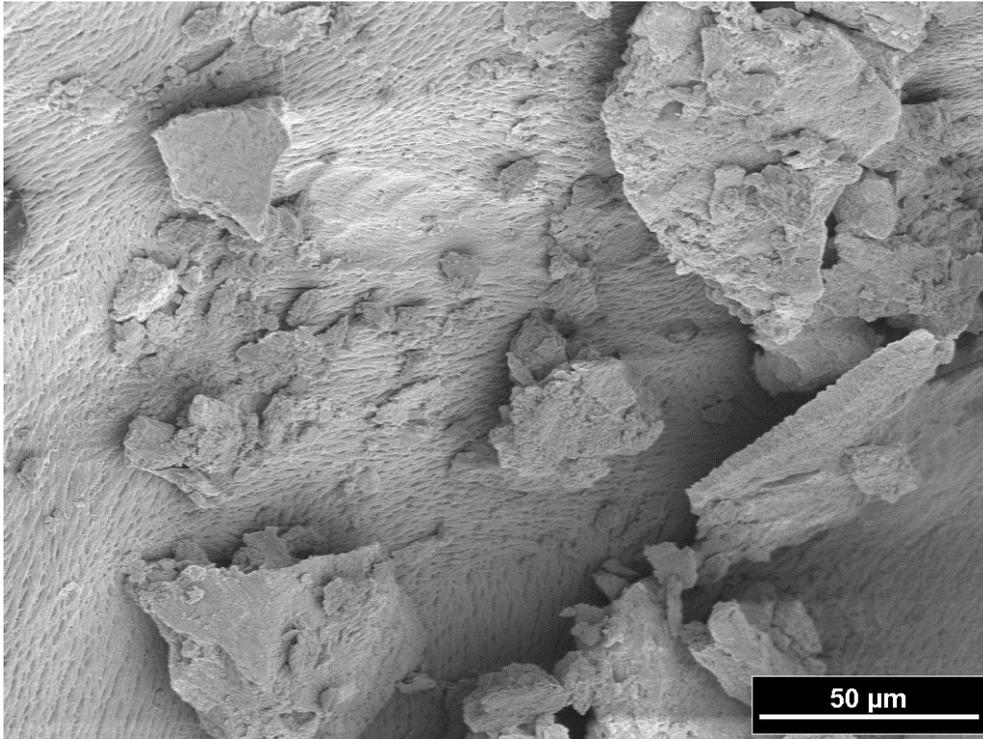


Abb. 19: Bio Oss® nach der Zellbesiedelung. Auch bei höherer Vergrößerung lassen sich keine Zellen erkennen.

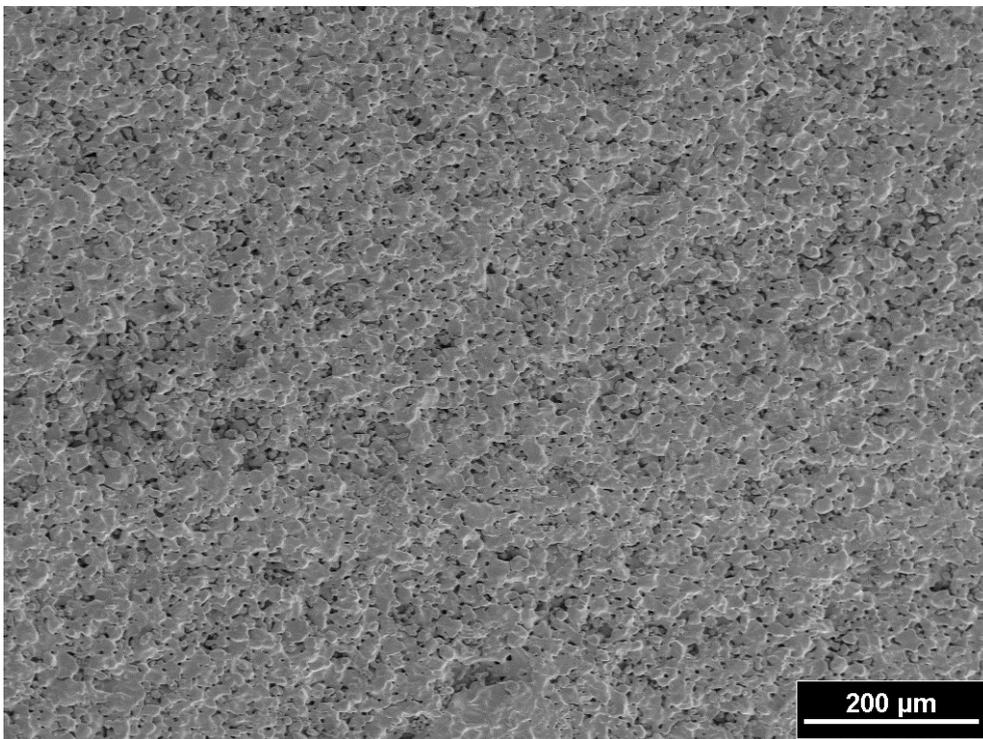


Abb. 20: Cerasorb® vor der Zellbesiedelung.

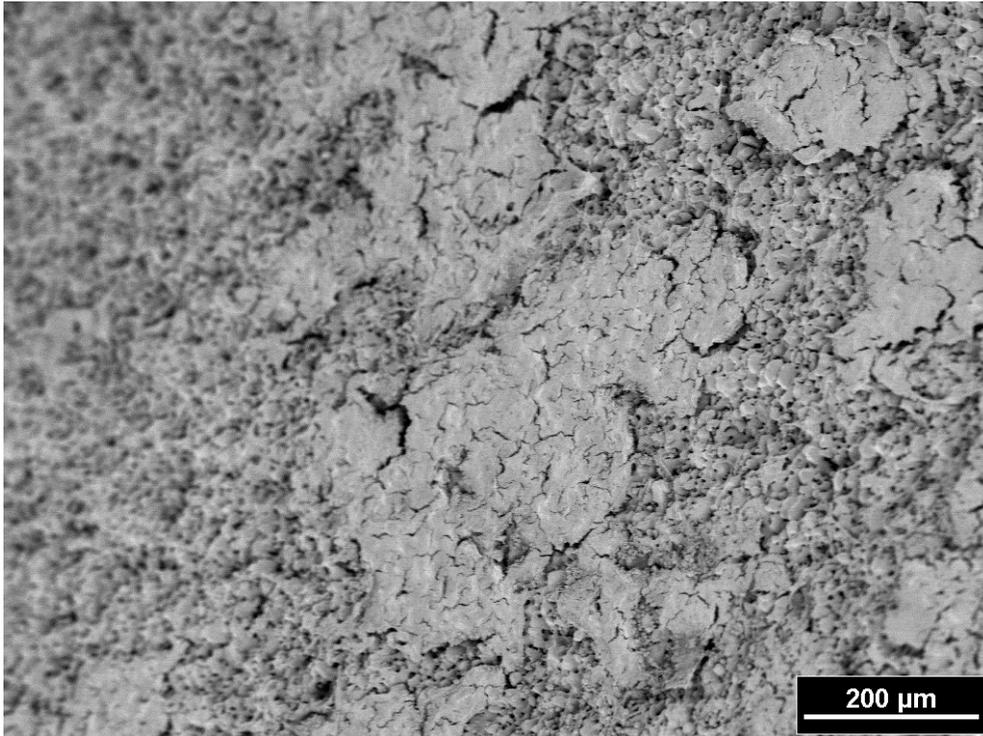


Abb. 21: Cerasorb® nach der Zellbesiedelung. Einige Bereiche der Oberfläche sind durch Zellen bedeckt.

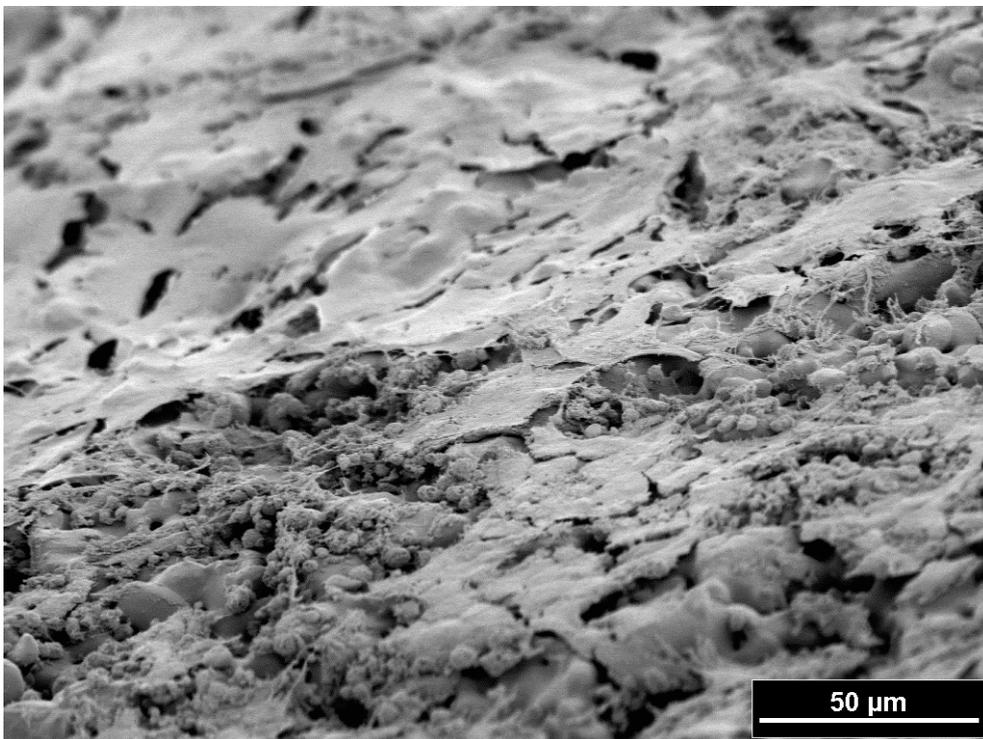


Abb. 22: Cerasorb® nach der Zellbesiedelung. In der höheren Vergrößerung sind viele Zellen erkennbar, die dem Material direkt aufliegen aber nicht in dieses hineinwachsen.

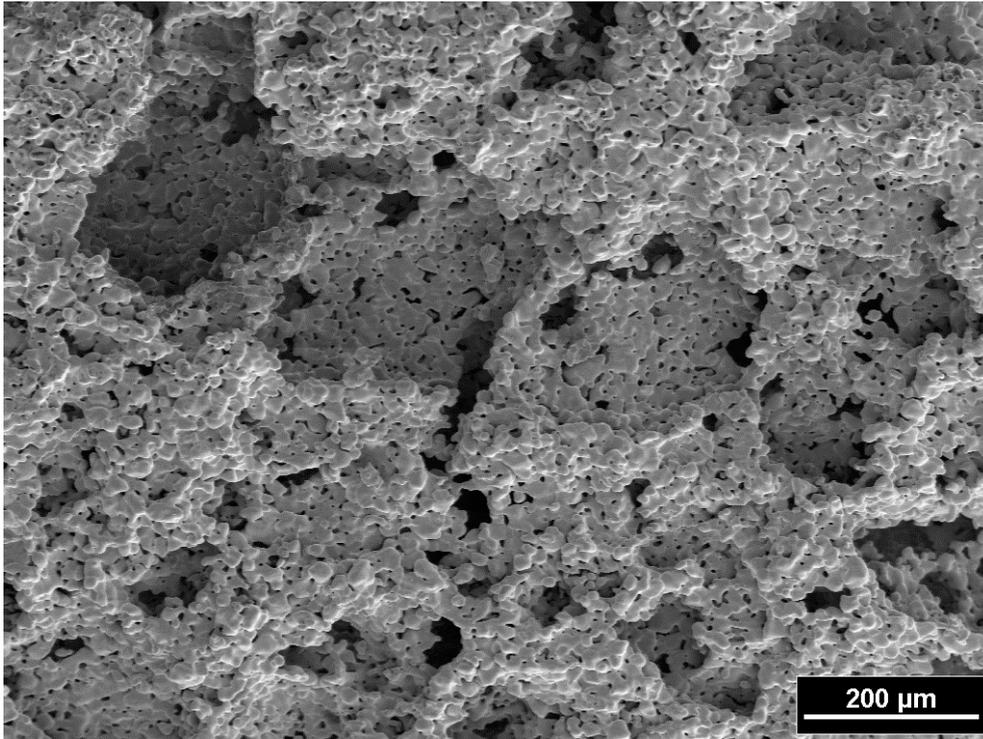


Abb. 23: Cerasorb M® vor der Zellbesiedelung. Deutlich sind die größeren Poren im Vergleich zu Cerasorb® zu erkennen

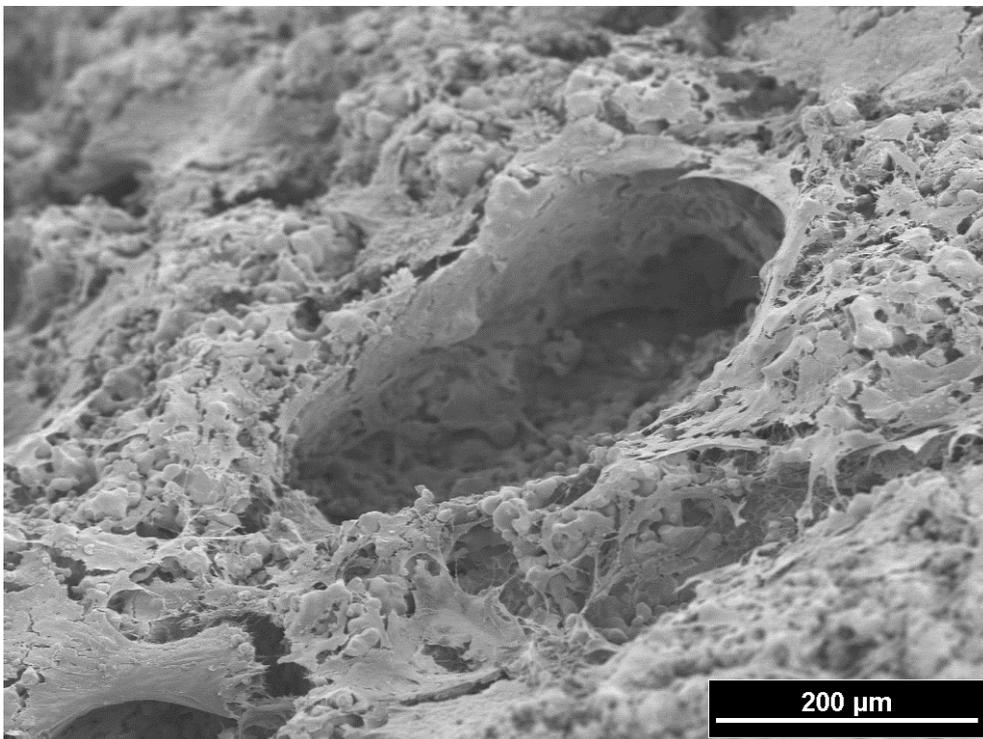


Abb. 24: Cerasorb M® nach der Zellbesiedelung. Lockere Zellverbände ziehen sich über das Material und ragen teilweise in die Poren hinein.

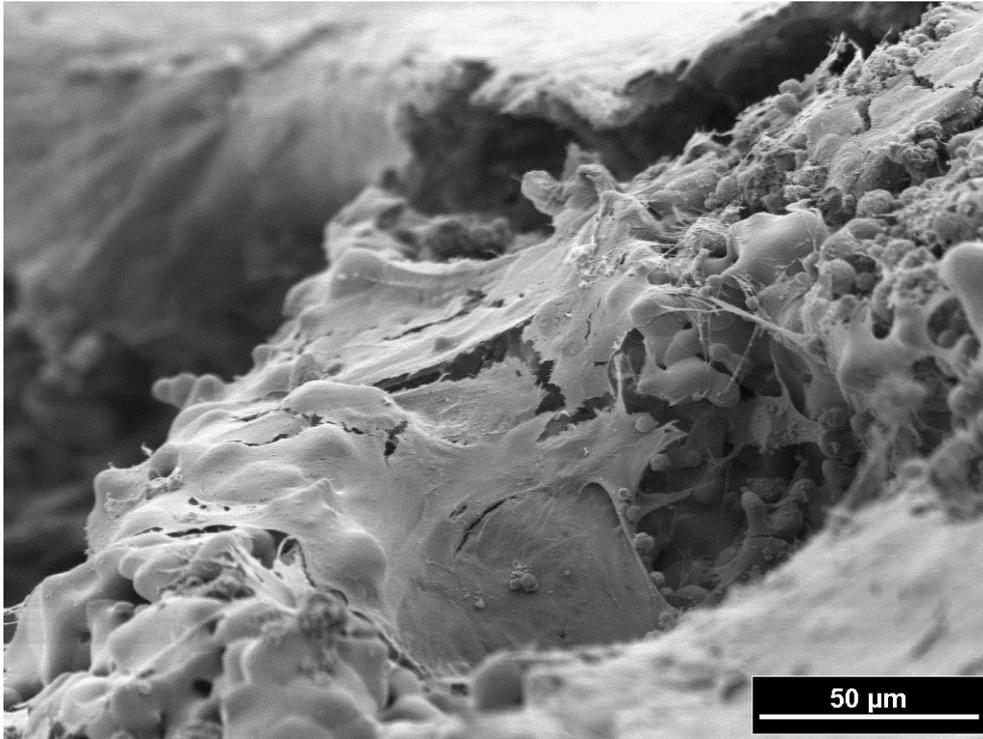


Abb. 25: Cerasorb M® nach der Zellbesiedelung. In der höheren Vergrößerung ist das Hineinwachsen der Zellen in das Material deutlich zu erkennen

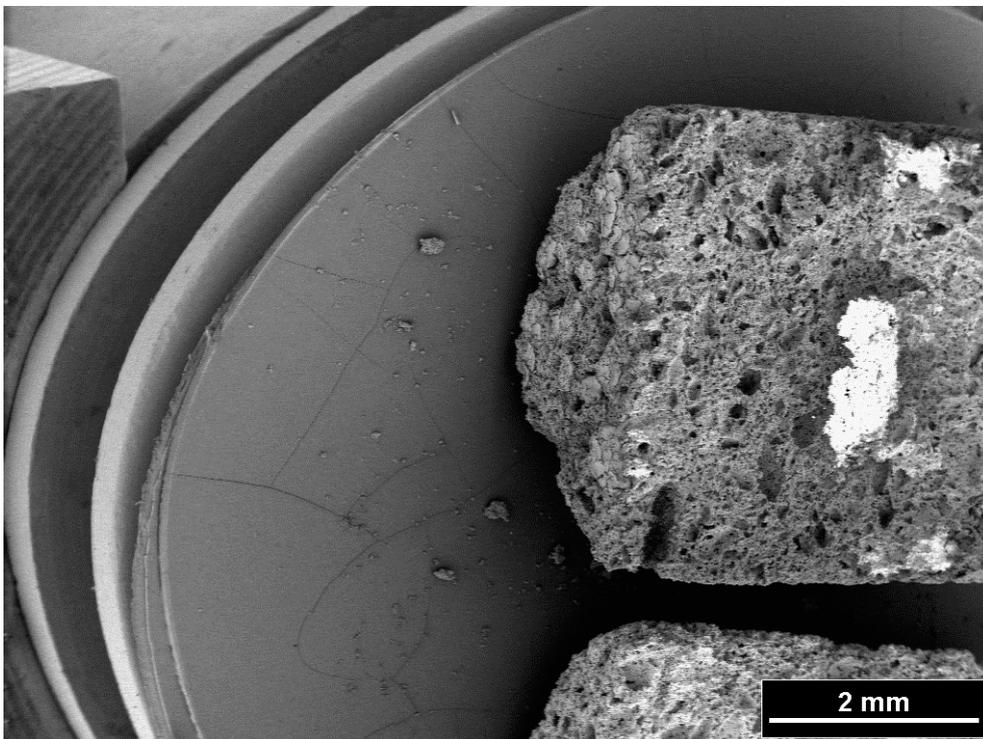


Abb. 26: Cerasorb M® nach der Zellbesiedelung. Der Probenkörper wurde längsseitig halbiert. Die linke Seite stellt die initial zellbesiedelte Oberfläche dar

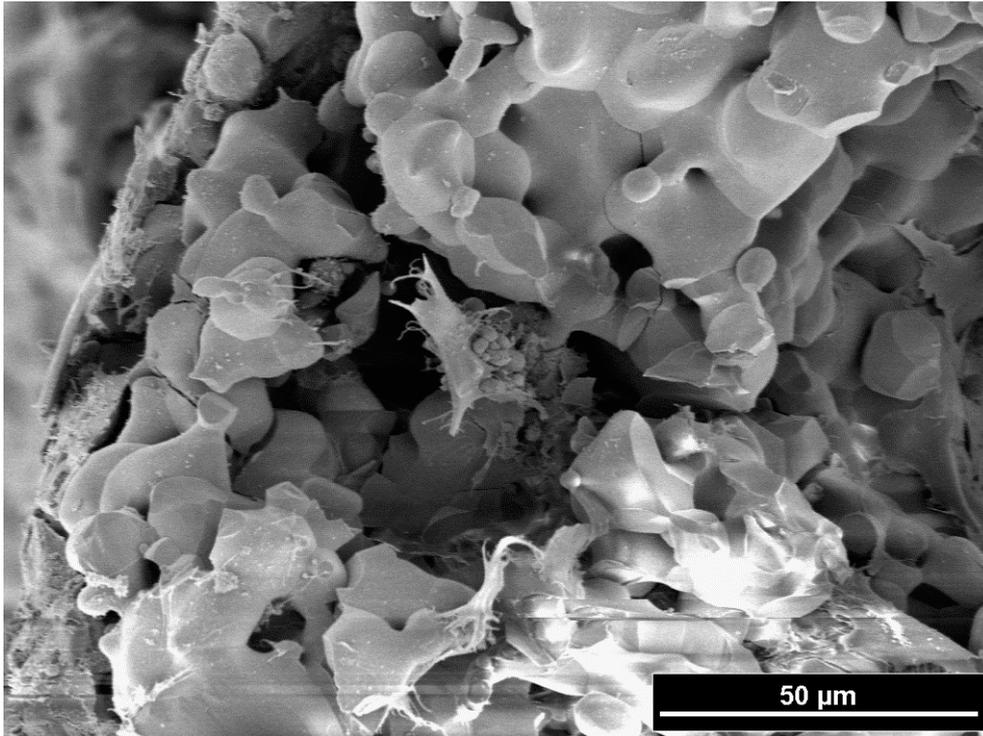


Abb. 27: Cerasorb M mit Zellen (halbiert): einige Zellen sind bereits in das Biomaterial eingewachsen. Am linken Bildrand ist die Oberfläche des Probenkörpers zu erkennen

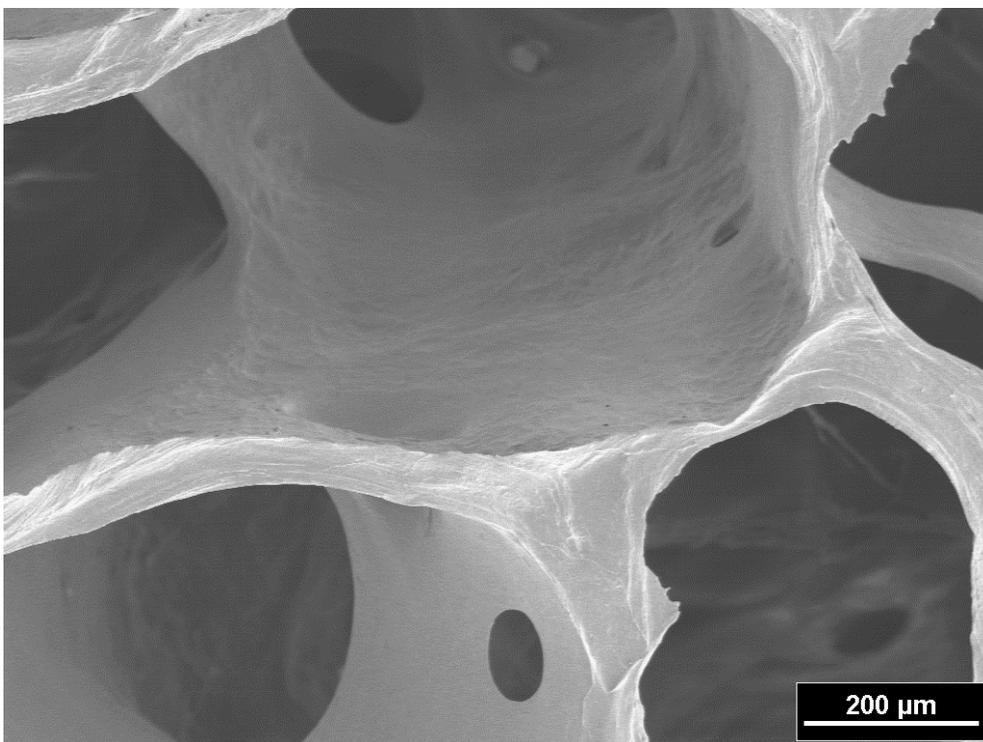


Abb. 29: ICBM vor Zellbesiedelung. Gut zu erkennen ist die grobporige Struktur des Materials.

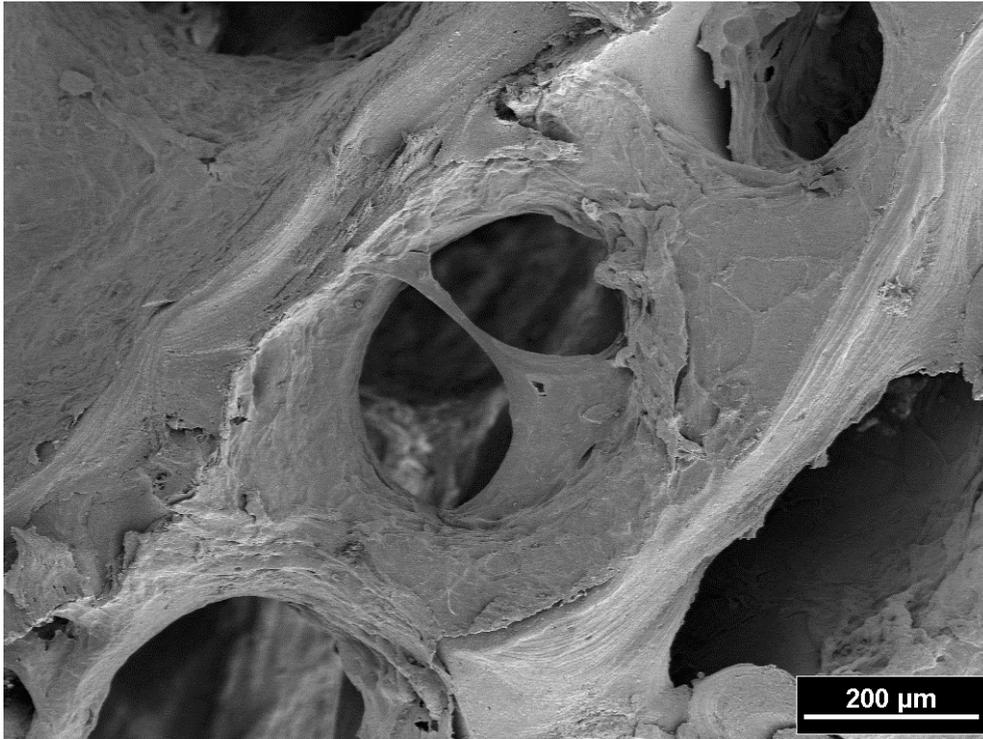


Abb. 30: ICBM nach Zellbesiedelung: Das Material ist von Zellen bedeckt. Zellen wachsen in die porösen Strukturen hinein und sind mit ihren Zellausläufern am Material angeheftet (s. Bildmitte).

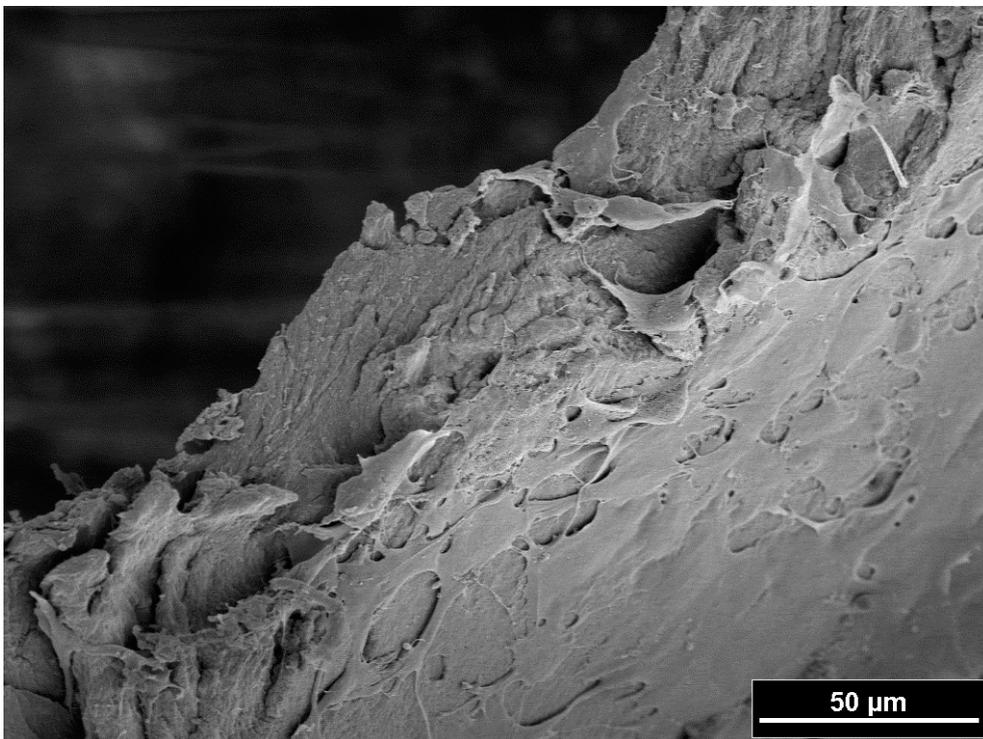


Abb. 31: ICBM nach Zellbesiedelung: Auf dem Material ist ein dichter Zellrasen erkennbar, dessen Zellen über Zellausläufer miteinander verbunden sind.

3.3.3. Ergebnisse der real time RT-PCR

Die Untersuchungen zur Genexpression zeigen ein uneinheitliches Bild für die Biomaterialien β -Trikalziumphosphat (Cerasorb®), anorganischer boviner Knochen (Bio Oss®), PLA/PGA und ICBM. In Übereinstimmung mit den beiden vorherigen Untersuchungsergebnissen für den Biokompatibilitätsversuch konnten bei den Kulturen mit dem anorganischen bovinen Knochen keine ausreichenden Mengen an RNA detektiert werden. In der PLA/PGA-Kultur kam es zu einem statistisch signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) von CD34 im Vergleich zur Kontrollkultur (ESC mit LIF ohne Biomaterial). In der β -Trikalziumphosphat-Kultur (Cerasorb®) hingegen kam es zu einem signifikanten ($p < 0,05$) Abfall der Osteopontinexpression sowie von CD34 ($p < 0,05$). Letzteres zeigte auch in der ICBM-Kultur einen signifikanten ($p < 0,05$) Abfall. Desweiteren induzierte ICBM aber auch noch eine niedrigere Expression der Alkalischen Phosphatase ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollkultur.

Material/ Gen	Osteo- pontin	Kollagen Typ I	Alkalische Phosphatase	Osteo- calcin	CD 34
ICBM	≈	≈		≈	
Bio Oss®	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
Cerasorb®		≈	≈	n. n.	
PLA/PGA	≈	≈	≈	≈	

Tab. 3: Veränderungen der Genexpression durch Biomaterialien. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 10 Tagen Kultur mit Probenkörpern:

n. n. = nicht nachweisbar; ≈ = kein signifikanter Unterschied

 signifikant niedriger als Leerprobe (ES+LIF ohne Biomaterial)

 signifikant höher als Leerprobe (ES+LIF ohne Biomaterial)

3.4. Ergebnisse der Mikromassenkulturen

3.4.1. Histologische Ergebnisse

Die histologischen Präparate wurden mit Toluidin blau gefärbt sowie mit Alizarin rot gegengefärbt. Kalziumhaltige Mineralisationen werden rot gefärbt und sind deutlich

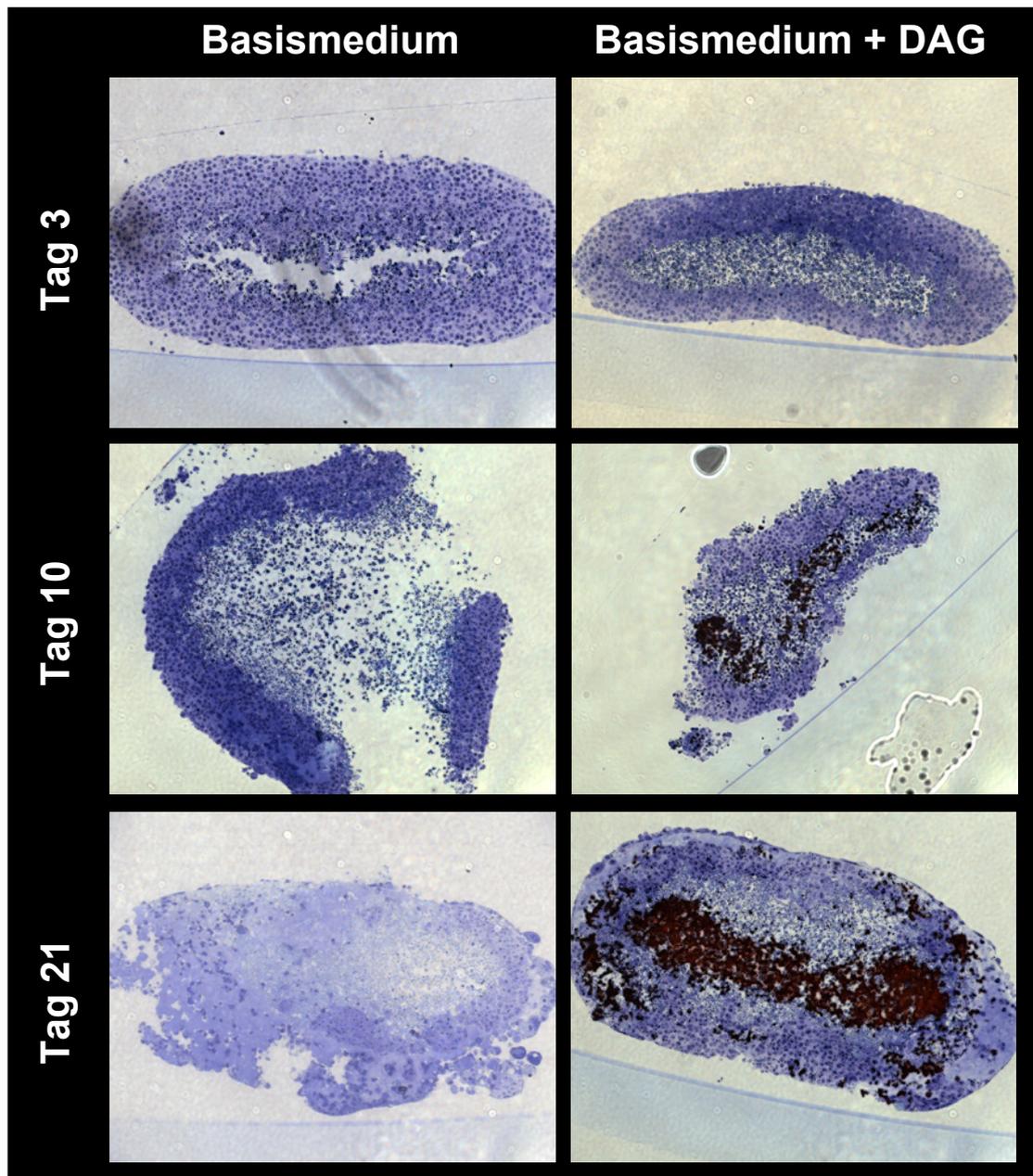


Abb. 32: Mikromassenkulturen mit ESC. Darstellung der ESC-Microspheres getrennt nach Kulturmedien und Dauer der Kultur. Deutlich zu erkennen ist die zentrale Mineralisierung in der Kultur mit dem osteogenen Zusatz DAG (rechte Bildspalte). Vergrößerung 10-fach.

zu erkennen. Die Microspheres aus ESC haben eine ovale Form. Lichtmikroskopisch ist ein zellreicher Randbereich mit einer diffusen extrazellulären Matrix zu erkennen. Davon hebt sich ein zellärmeres Zentrum ab. Am 3. Tag der Kultur sind weder in der ESC-Kultur mit unserem Basismedium noch in der ESC-Kultur mit unserem osteogenen Zusatz DAG Mineralisationen zu erkennen. Nach 10 Tagen sind bereits die ersten Mineralisationen in der DAG-Kultur zu erkennen und nach drei Wochen ist das Zentrum dieser ESC-Microspheres nahezu vollständig von Mineralisationen durchdrungen (Abb. 32). In diese zentralen Mineralisationen sind zahlreiche Zellen eingebettet, deren blaue Zellkerne in Abbildung 33 sehr gut zu erkennen sind (Abb. 33).

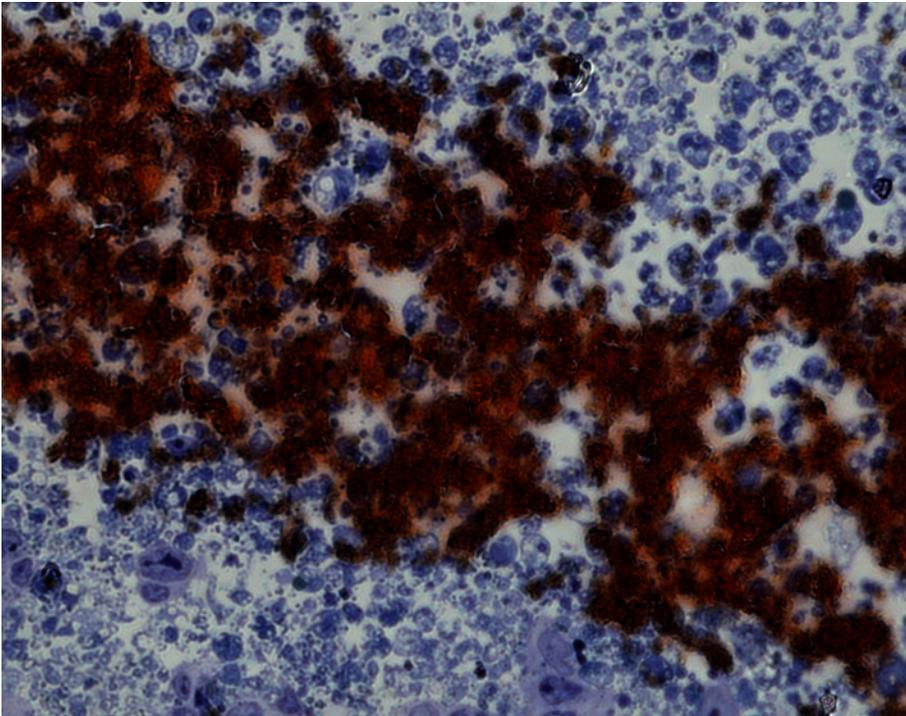


Abb. 33: Mikromassenkulturen mit ESC nach 21 Tagen im Kulturmedium mit DAG. Die perizellulären Mineralisationen (rot) sind deutlich zu erkennen. Vergrößerung 40-fach.

3.4.2. Transmissionselektronenmikroskopie

Um die Ultrastruktur der mineralisierten Bezirke besser bewerten zu können, wurden transmissionselektronische Aufnahmen gemacht. Auf den Aufnahmen mit 3000-facher Vergrößerung sind die nadelförmigen Kristallite gut zu erkennen (Abb. 34). In

der kontrastierten Aufnahme sind kollagenartige Fibrillen im mineralisierten Bereich zu erkennen (Abb. 35).

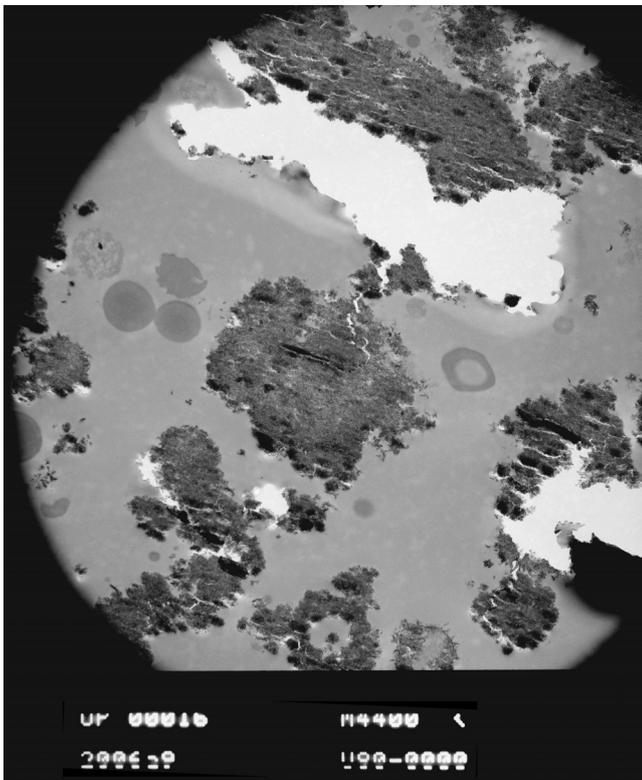


Abb. 34: Mikromassenkulturen mit ESC nach 21 Tagen im Kulturmedium mit DAG. TEM-Aufnahme. Deutlich sind die nadelförmigen Kristallite zu erkennen.

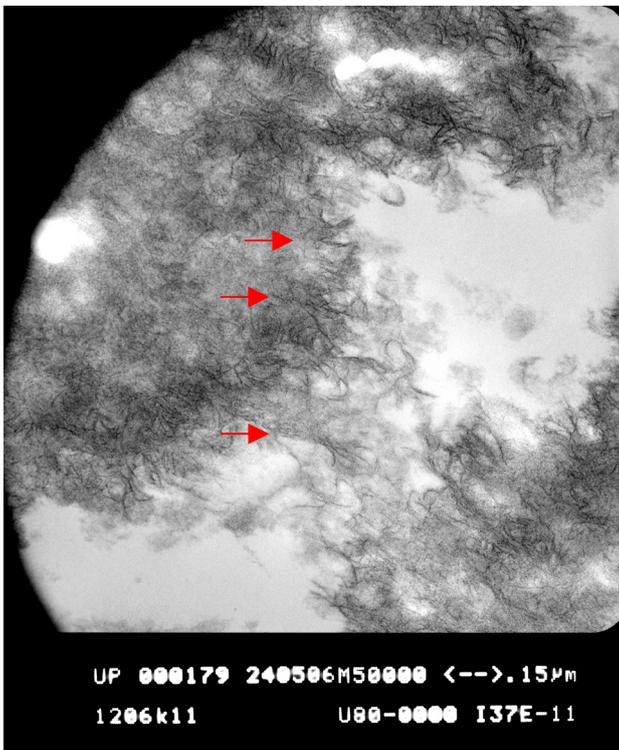


Abb. 35: Mikromassenkulturen mit ESC nach 21 Tagen im Kulturmedium mit DAG. Kontrastierte TEM-Aufnahme. Kollagenartige Fibrillen schlängeln sich im mineralisierten Bereich.

3.4.3. Elektronendiffraktionsanalyse

Um zu überprüfen, ob es sich bei den histologisch nachgewiesenen Mineralisationen um Kalziumablagerungen oder Hydroxylapatitkristalle handelt, wurde eine Elektronendiffraktionsanalyse durchgeführt. Das Beugungsmuster zeigt homogene konzentrische Ringe. Der D-Wert (Gitterebenenabstand) für den Diffraktionsring 002 wurde mit 0,344nm berechnet (Arnold *et al.*, 1999; Plate *et al.*, 1998) und entspricht damit dem typischen Muster von Hydroxylapatit (Abb. 36). Daher handelt es sich bei den zentralen Mineralisationen in der Mikromassenkultur mit osteogenem Zusatz (DAG) um Hydroxylapatit und nicht nur um Kalziumablagerungen.

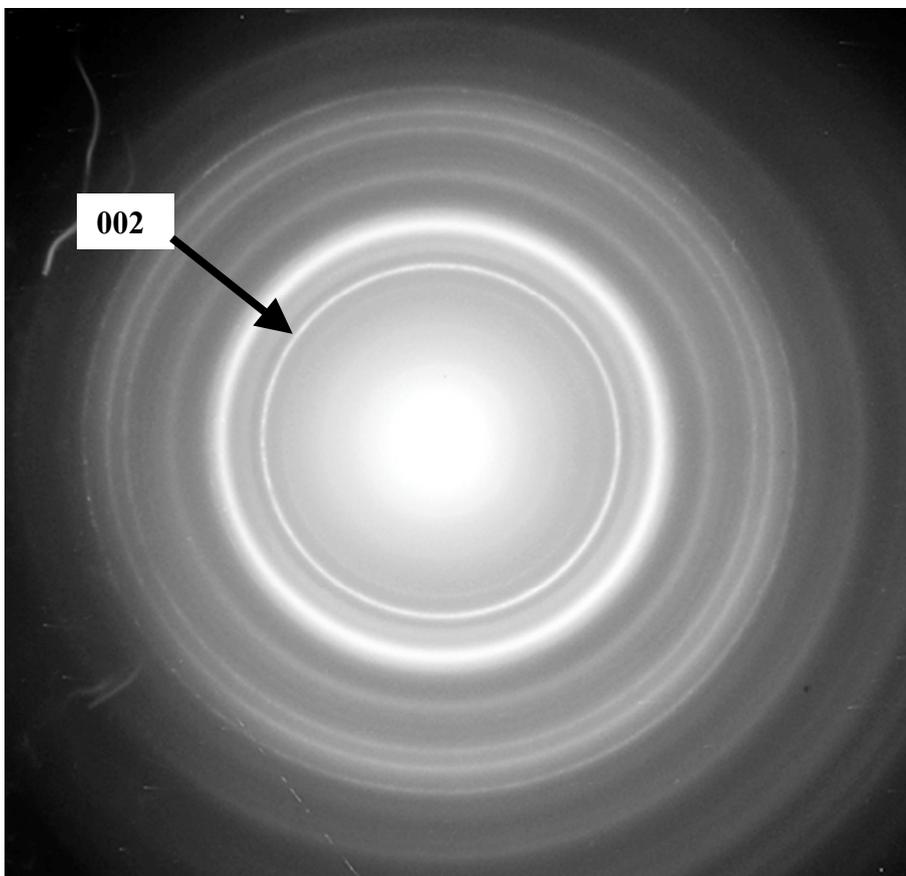


Abb. 36: Diffractionsmuster der Mineralisierungen in der Mikromassenkultur (Tag 21). Das Muster stimmt mit dem Muster von Hydroxylapatit überein.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchungen waren die Klärung verschiedener Aspekte der Eignung embryonaler Stammzellen für das Tissue Engineering von Knochen. ESC sind die klassischen Vertreter der pluripotenten Stammzellen, die sich in alle Zelllinien differenzieren können. Für das Tissue Engineering von Knochen ist nun v.a. die Differenzierung in OLC von Bedeutung. Welches Medium für die osteoblastäre Differenzierung geeignet ist, ob der Zusatz von BMP-2 notwendig/sinnvoll ist und wie lange die Differenzierung in etwa dauert, waren die Fragestellungen im ersten Versuchsansatz. Die Differenzierung von Zellen ist ein komplexer Prozess, bei dem viele verschiedene Gene hoch- bzw. runterreguliert werden. Transkriptionsfaktoren und Signalproteine können eine Rolle spielen und diese Entwicklung maßgeblich beeinflussen. Im zweiten Versuchsansatz wurde eine Vielzahl von Genen mittels Microarray-Analyse auf ihre Beteiligung an diesem Differenzierungsprozess von ESC zu OLC hin analysiert.

Für die Generierung größerer Gewebstrukture ist eine Matrix notwendig, die aus verschiedenen Materialien bestehen kann (Wiesmann *et al.*, 2004). Aktuell werden viele unterschiedliche Knochenersatzmaterialien in Forschung und Klinik eingesetzt. Es ist anzunehmen, dass nicht alle Biomaterialien mit ESC gleich kompatibel sind. Vielmehr ist wahrscheinlich, dass es bei der Besiedelung der Biomaterialien mit ESC deutliche Unterschiede gibt. Im dritten Versuchsansatz wurde daher die Biokompatibilität ausgewählter Biomaterialien mit ESC überprüft.

Einige *in vivo* Studien weisen aber daraufhin, dass Trägermaterialien die klinische Einsetzbarkeit von *ex vivo* generierten Knochenkonstrukten negativ beeinflussen. Immunogenität des Materials oder Abbauprodukte desselben können die *in vivo* Regeneration von Knochen beeinträchtigen (Meyer and Wiesmann, 2005; van der Kraan *et al.*, 2002). Deshalb halten einige Forscher Matrixmaterialien, die der natürlichen extrazellulären Matrix sehr nahe kommen am geeignetsten. In Mikromassenkulturen wird die gesamte extrazelluläre Matrix von den Zellen selbst synthetisiert. Dies kommt den Verhältnissen *in vivo* am nächsten. Im vierten Versuchsansatz wurde überprüft, ob solche Mikromassenkulturen mit ESC überhaupt möglich sind und ob eine osteoblastäre Differenzierung induziert werden kann.

4.1. **Induktion der osteoblastären Differenzierung von ESC**

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung zeigen bereits nach 2 Wochen deutliche Mineralisationen in der ESC-Zellkultur, der DAG zugesetzt wurde. Demgegenüber ist das Ausmaß der Mineralisationen in der BMP-2 Kultur weitaus geringer und schließlich in der Kontrollgruppe (ESC ohne und mit LIF) gar nicht mehr nachweisbar. Mit diesem histologischen Ergebnis einher geht dramatischer Anstieg der Kollagen I Expression Mitte der zweiten Kulturwoche, der in der DAG-Kultur deutlich höher ausfällt als in der BMP-2 Kultur. Ein weiteres markantes Expressionsmuster konnte für Osteocalcin detektiert werden. Osteocalcin zeigt einen zweigipfligen Verlauf in den osteogenen Medien DAG und BMP-2 mit einem ersten kurzzeitigen Maximum im Verlauf der 2. Woche und einem länger währenden plateauartigen zweiten Maximum nach drei Wochen Kultur. Dabei sind die Maxima der BMP-2 Kultur im Vergleich zur DAG-Kultur niedriger und treten später auf. Zusammengenommen spricht dies für eine schnellere und eindeutiger Differenzierung von ESC im Medium mit DAG-Zusatz als in den Zellkulturen mit BMP-2. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den wenigen, in der internationalen Literatur bereits veröffentlichten Versuchen zur osteoblastären Differenzierung von ESC (Buttery *et al.*, 2001; Chaudhry *et al.*, 2004; zur Nieden *et al.*, 2003; zur Nieden *et al.*, 2005), so ist festzustellen, dass die frühesten Mineralisationen in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen nach ca. 2 Wochen zu erwarten sind. Als osteogene Adjuvantien verwendet die Arbeitsgruppe um Buttery ebenfalls DAG, weist in ihrer Arbeit aber daraufhin, dass die Mineralisationen am intensivsten sind, wenn Dexamethason erst ab dem 14. Tag hinzu gegeben wird (Buttery *et al.*, 2001). Dies führt – im Vergleich zu den hier beschriebenen Ergebnissen – dann allerdings zu einer verzögerten, langsameren Differenzierung. Beschränkt sich Buttery bei der Auswertung seiner Versuche noch allein auf histologische Methoden, so analysieren zur Nieden und Mitarbeiter die Differenzierung auch mittels molekulargenetischer Verfahren, indem sie analog zu dem hier verwendeten Versuchsaufbau den Expressionsverlauf einiger osteoblastentypischer Gene evaluieren (zur Nieden *et al.*, 2003). Das von ihnen gefundene Expressionsmuster weicht allerdings in einigen Bereichen von dem oben beschriebenen ab. Übereinstimmungen ergeben sich beim relativ frühen Anstieg von

Kollagen I, dem plateauartigen späten Anstieg von Osteocalcin und dem niedrigen Expressionsniveau der Alkalischen Phosphatase in den ersten vier Wochen. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass die Alkalische Phosphatase in Relation zu den undifferenzierten ESC aufgetragen wird und diese undifferenzierten ESC dieses Gen bereits hoch exprimieren (Phillips *et al.*, 2001), so dass absolut gesehen, die Expression auf hohem Niveau relativ konstant bleibt. Anders als bei zur Nieden zeigten die ESC in den vorliegenden Untersuchungen bereits einen frühen Osteocalcin-Peak nach 11 Tagen. Ein deutlicher Anstieg der Osteopontinexpression in der ersten Woche konnte allerdings nicht beobachtet werden. Diese Unterschiede könnten auf die verschiedenen verwendeten osteogenen Adjuvantien zurückzuführen sein. Zur Nieden und Mitarbeiter verwendeten nämlich 1,25-OH Vitamin D3 anstelle von Dexamethason bei sonst gleichen Zusätzen (Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat). Über Vitamin D3 wurde u.a. berichtet, dass es die Osteopontinexpression in Osteoblasten hochreguliert und zum anderen die Expression von Osteocalcin inhibiert (Zhang *et al.*, 1997). Dies würde die o.g. Unterschiede erklären. Chaudhry und Mitarbeiter schließlich tauschten Dexamethason gegen Retinolsäure aus und konnten ebenfalls Mineralisationen in den ESC-Kulturen nachweisen, allerdings erst nach drei bis vier Wochen (Chaudhry *et al.*, 2004). Demzufolge scheinen Dexamethason und Vitamin D3 der Retinolsäure bzgl. der Induktion einer frühen osteoblastären Differenzierung von ESC überlegen zu sein.

Der alleinige Zusatz von BMP-2 scheint nach den vorliegenden Ergebnissen der DAG-Kultur bzgl. Geschwindigkeit und Intensität der Differenzierung unterlegen zu sein. Auch die bis heute publizierten beiden anderen Studien zur osteoblastären Differenzierung von ESC mit BMP-2 verwenden dieses Zytokin ausschließlich als zusätzliches Adjuvans zu einem schon ohnehin osteogenen Medium (Ascorbinsäure + β -Glycerophosphat + Vitamin D3 (zur Nieden *et al.*, 2005) oder Ascorbinsäure + β -Glycerophosphat + Retinolsäure (Yamashita *et al.*, 2005)).

Der kritische Vergleich der hier beschriebenen Ergebnisse mit den bisher publizierten Versuchen zeigt also, dass DAG in der von hier verwendeten Konzentration ein sehr potentes Medium ist, das bereits nach 2 Wochen zu deutlichen Mineralisationen führt und Zellen hervorbringt, die spätestens nach knapp drei Wochen, mit der plateauartigen erhöhten Osteocalcinexpression, einen recht spezifischen Marker von

Osteoblasten präsentieren.

4.2. **Analyse des Genexpressionsmusters während der Differenzierung**

Unter Verwendung des o.g. osteogenen Mediums mit DAG-Zusatz wurden ESC drei Wochen lang kultiviert. Um einen Überblick über die Expressionsveränderungen im gesamten Genom während der osteogenen Differenzierung zu erhalten, wurden an den Tagen 0 (Start-Tag), 11 und 21 jeweils drei Kulturen mittels Microarrays analysiert. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass es sich bei dem Versuch um eine osteoblastäre Differenzierung gehandelt hat. Die signifikant veränderten Gene werden insbesondere mit Osteoblasten in Verbindung gebracht. Insofern wird das Ergebnis des ersten Versuches noch einmal bestätigt. Betrachtet man die osteoblastentypischen Gene in dieser Analyse, so werden wiederum die Ergebnisse des ersten Versuches bestätigt. Dies gilt insbesondere für die Kollagen I α 1-Expression am 11. Tag sowie den Anstieg der Osteocalcinexpression zu Beginn der dritten Woche. Die übrigen osteoblastentypischen Gene zeigen kaum eine Veränderung. Lediglich die Alkalische Phosphatase sinkt nach drei Wochen ab. Auch dies ist mit dem ersten Versuch kompatibel. Hier lag das Expressionsniveau in der DAG-Kultur am 19. Tag unter dem Ausgangsniveau. Eine bedeutende Rolle im Differenzierungsprozess scheint der Transkriptionsfaktor Runx2 zu spielen. Runx2, auch bekannt unter Cbfa1 (core binding factor alpha 1), ist in den Reifungsprozess und die Proliferation von Osteoblasten involviert (Pratap *et al.*, 2003). In der vorliegenden Untersuchung zeigt Runx2 sowohl nach 11 als auch nach 21 Tagen eine hochsignifikante Überexpression. Runx2 bewirkt vermutlich mit BMP-2 zusammen eine osteogene Differenzierung, wobei Runx2 vermutlich „downstream“ von BMP-2 liegt (Young *et al.*, 2005). Für die Interaktion von BMP-2 und Runx2 scheint eine Sequenz aus der SMID/NMTS Domäne (391-432) von Runx2 verantwortlich zu sein (Afzal *et al.*, 2005). Auch wenn sowohl BMP-2 als auch Runx2 wesentlich zur osteoblastären Differenzierung beitragen, so induzieren ihre Expressionen doch verschiedene komplementäre Effekte. Yang und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die vector-vermittelte Überexpression von Runx2 zwar zu deutlich höheren Expressionsleveln der osteoblastentypischen Marker Alkalische Phosphatase und Osteocalcin führt, aber die Mineralisierungen sehr schwach ausfallen. Demgegenüber induzierte die BMP-2

Überexpression eine starke Mineralisation, aber nur eine geringfügig erhöhte Osteocalcinexpression (Yang *et al.*, 2003). In Übereinstimmung mit diesen Publikationen waren auch in dem vorliegenden Versuch sowohl BMP-2 als auch Runx2 signifikant erhöht, was zu einer deutlichen Mineralisation in der Zellkultur, aber auch Überexpression von Osteocalcin führte. Die Wirkung von BMP-2 wiederum wird über eine Phosphorylierung der Signalproteine Smad1, Smad5 und Smad8 vermittelt (Binato *et al.*, 2006; Deregowski *et al.*, 2006; Hendy *et al.*, 2005; Naito *et al.*, 2005). Auch in der vorliegenden Untersuchung konnte eine Hochregulation von Smad1 und – nach drei Wochen – auch von Smad9 (alias Smad8) beobachtet werden. Lediglich bei Smad5 konnten an den beiden Analysetagen (Tag 11 und 21) keine Veränderung zur Ausgangskultur gemessen werden. Osterix, alias Sp7 oder trans-acting transcription factor 7, kann ebenfalls an der osteoblastären Differenzierung beteiligt sein. Versuche mit mesenchymalen Zellen weisen darauf hin, dass Runx2 den „downstream“ liegenden Osterix-Promotor aktivieren kann und dadurch die osteoblastäre Differenzierung dieser Zellen forciert (Nishio *et al.*, 2006). Anscheinend gilt dies aber nicht für alle Zellen. Weder die ESC in unserem Versuch noch Follikelzellen der Zahnanlage zeigen während der osteogenen Differenzierung signifikante Veränderungen in der Osterixexpression (Morsceck, 2006). Pou5f1, alias Oct4, kann in ESC ab dem 8-16-Zell Morula-Stadium nachgewiesen werden, während es in totipotenten Zygoten und im 2-4-Zell-Stadium nicht detektiert werden kann (Liu *et al.*, 2004). Pou5f1 spielt zusammen mit den beiden Transkriptionsfaktoren Sox-2 und Nanog eine zentrale Rolle beim Erhalt der Pluripotenz und des Selbsterneuerungspotenzials von ESC (Boyer *et al.*, 2005). Dementsprechend sinkt die Expression von Pou5f1 bei fortschreitender Differenzierung (Carlin *et al.*, 2006). Diese Theorie wird durch die deutliche Herunterregulation von Pou5f1 in dem vorliegenden Versuch nochmals bestätigt. Auch FoxD3 wurde in ESC nachgewiesen und ist für den Erhalt des Differenzierungspotenzials notwendig (Tompers *et al.*, 2005). Damit lässt sich der hier beobachtete Abfall der FoxD3-Expression ebenfalls erklären. MMP14 ist durch Spaltung des NF-kappaB-Rezeptors an der Differenzierung zu Osteoklasten beteiligt (Hikita *et al.*, 2005). Aber auch an der Neubildung von Gefäßen durch Endothelzellen soll MMP14 beteiligt sein (Chun *et al.*, 2004). Kübler

und Mitarbeiter beschrieben in der Initialphase der Knochenbildung eine Ossikelbildung, die mit der Bildung von zentralen, blutbildenden Knochenmarkstrukturen einhergeht (Kubler *et al.*, 1999). Ob dies auch der Grund dafür ist, warum MMP14 in dem hier beschriebenen Versuch deutlich hochreguliert wurde, lässt sich derzeit noch nicht beantworten.

Insgesamt sprechen die vorliegenden Ergebnisse für eine osteoblastäre Differenzierung der ESC, die vermutlich über die Aktivierung von Runx2 und BMP-2 abläuft. Die Signaltransduktion scheint hauptsächlich über Smad1 und Smad9 zu erfolgen, während Osterix und Smad5 kaum eine Rolle spielen. Hinzuweisen ist ferner auf die signifikant erniedrigten Expressionswerte der ESC-Stammzellmarker Pou5f1 und FoxD3, die ebenfalls ein Indiz für die erfolgreiche Differenzierung darstellen.

4.3. Kompatibilität mit Biomaterialien

Die Kompatibilität von verschiedenen Biomaterialien und ESC wurde anhand der relativen Anzahl vitaler Zellen mittels CyQUANT®-Assay, sowie deskriptiv rasterelektronenmikroskopisch analysiert. Ein Vorteil des CyQUANT®-Assays gegenüber Assays, die ATP detektieren ist die geringere Anfälligkeit der intrazellulären Nukleinsäuremenge im Vergleich zur ATP-Konzentration. Dies führt zu einer hohen Korrelation zwischen gemessener Konzentration und Zellzahl im CyQuant®-Assay (Jones *et al.*, 2001). Zudem wurde der Einfluss der Biomaterialien auf die Expression typischer Osteoblastenmarker mittels real-time RT-PCR analysiert.

Die Ergebnisse aus CyQUANT®-Assay und Rasterelektronenmikroskopie zeigen eindeutig, dass die Zahl vitaler Zellen auf ICBM am größten ist. Die Zellen haben auf den Biomaterialien ihre kugelige Stammzellform verloren und ähneln mit ihren ausgezogenen Zellfortsätzen, mit denen sie z.T. am Biomaterial angeheftet sind, Osteoblasten. Zu den materialspezifischen Faktoren, die die Biokompatibilität beeinflussen, gehören die dreidimensionale Topographie und die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Materials (Meyer *et al.*, 2004). Viele Studien zeigen, dass Knochenzellen sehr sensibel auf die Oberflächenstruktur des angrenzenden Biomaterials reagieren (Dalby *et al.*, 2000; Dennis *et al.*, 1992; Goshima *et al.*, 1991).

Zellen reagieren auf die Oberflächentopographie mit einer Adaptation von Zellorientierung, Zellmigration und Attachment-Kinetik (Chehroudi *et al.*, 1997; den Braber *et al.*, 1995; Wojciak-Stothard *et al.*, 1995). Zu den Eigenschaften, die die Oberflächentopographie beeinflussen, gehört insbesondere die Porosität des Materials. Eine geeignete Porengröße soll bei ca. 100µm Durchmesser liegen (O'Brien *et al.*, 2005). Von allen hier untersuchten Materialien besitzt ICBM die höchste Porosität, wenn man vornehmlich die Makroporen berücksichtigt. Zudem handelt es sich um interkonnektierende Poren, die miteinander in Verbindung stehen und auf Grund dieser geometrischen Eigenschaften einen positiven Einfluss auf die Knochenbildung haben können (Mahmood *et al.*, 2001) Dass aber die Porengröße nicht allein ausschlaggebend ist, zeigen die Ergebnisse der beiden β -Trikalziumkeramiken Cerasorb® und Cerasorb M®, die sich im wesentlichen nur durch ihre Porosität unterscheiden aber beim Proliferationstest (CyQuant®-Assay) vergleichbare Werte zeigen. Ein weiterer Gesichtspunkt, der eine Rolle spielen könnte, ist die physikalisch-chemische Eigenschaft der Materialien. Es fällt auf, dass das am wenigsten mineralisierte Material (ICBM), das fast ausschließlich aus Kollagen Typ I besteht, vermutlich den Zellen die günstigsten Eigenschaften für eine Adhäsion bietet. In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass das Attachment von Osteoblasten in den ersten Stunden signifikant davon abhängt, ob die Materialien eine proteinartige Oberfläche besitzen (Dennis *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1998). So wurde kürzlich beschrieben, dass Bio OSS® gegenüber Hydroxylapatit, das mit dem Peptid P15 bedeckt wurde, hinsichtlich Zelladhärenz deutlich unterlegen ist (Turhani *et al.*, 2005). Die hier vorgestellten Ergebnisse stehen zudem im Einklang mit der Studie von Petrovic und Mitarbeitern, die signifikant höhere Proliferations- und Zellzahlen auf Biomaterialien mit hohem Kollagenanteil beobachteten als auf Materialien, die kein oder nur wenig Kollagen beinhalten (Petrovic *et al.*, 2006). ICBM wies bei den hier untersuchten Biomaterialien den höchsten Kollagenanteil auf. Ein weiterer Grund für die Überlegenheit von ICBM könnte schließlich sein, dass im ICBM noch einige Wachstumsfaktoren enthalten sind (Kubler *et al.*, 2000).

Die Ergebnisse der materialabhängigen Genexpressionsanalyse zeigen für ICBM ein Expressionsmuster der osteoblastentypischen Marker, das dem Expressionsmuster der

Monolayer-Kultur ESC ohne LIF am 10. Tag weitgehend entspricht. Auch das β -Trikalziumphosphat verändert die Genexpression in einer ähnlichen Weise. Auffällig aber konsistent mit den übrigen Ergebnissen ist, dass ESC auf bovinem lyophilisierten Knochen (Bio Oss®) so wenig DNA-Gehalt aufweisen, dass keine sinnvollen Werte detektiert werden konnten. Auch Masaki und Mitarbeiter wiesen in einer kürzlich veröffentlichten Studie nach, dass verschiedene Materialoberflächen das Genexpressionsmuster von mesenchymalen Stammzellen beeinflussen. Wie dies geschieht, ist aber noch unklar (Masaki *et al.*, 2005).

4.4. Mikromassenkulturen mit ESC

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, wie sich mittels Mikromassenkultur aus ESC ein Konstrukt herstellen lässt, dessen extrazelluläre Matrix ausschließlich von den Zellen selbst gebildet wird. Diese Matrix besteht aus Hydroxylapatit, wie der Vergleich mit Ergebnissen anderer Wissenschaftler nahe legt (Arnold *et al.*, 1999; Plate *et al.*, 1998). Auf den transmissionselektronischen Aufnahmen sind kristalline Strukturen des Minerals sowie kollagenähnliche Fibrillen zu erkennen. Darüber hinaus konnte mit Hilfe der Diffraktionsanalyse die kristalline Struktur dahingehend analysiert werden, dass es sich bei den Mineralisierungen tatsächlich um Hydroxylapatit handelt. Plate und Mitarbeiter beschreiben die Apatitkristallbildung in Knochen und Dentin als einen mehrstufigen Prozess, der mit der Akkumulation von Kalzium und Phosphat- Ionen beginnt. Nach Bildung erster Kalzium-Phosphat-Kristalle lagern sich diese Partikel longitudinal aneinander und formen nadelförmige Kristalle, die in den ESC-Spheres ebenfalls nachgewiesen werden konnten. Diese „Nadeln“ wachsen weiter und konfluieren schließlich (Plate *et al.*, 1998). Desweiteren haben die ESC-Spheres durchaus Ähnlichkeiten mit den Mikromassenkulturen aus Präosteoblasten, die von anderen Autoren beschrieben wurden. Im Unterschied zu Monolayer-Kulturen fanden diese Autoren viele Kollagenfibrillen in der neu gebildeten extrazellulären Matrix (Gerber and ap Gwynn, 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der vorliegenden Mineralisation um einen biologischen Prozess handelt, der starke Ähnlichkeiten mit der Dentin- und Knochenbildung aufweist. Die osteogene Differenzierung einer

Mikromassenkultur mit ESC ist also möglich. Wurde bisher versucht, mit Matrixmaterialien die von den Zellen selbst synthetisierte Matrix nachzuahmen (Ripamonti, 2004), so bilden die ESC-Spheres – zumindest in einem kleinen Bereich – jeweils ihre eigene knochenähnlich Matrix. Dies könnte für das Tissue Engineering von Knochen einen enormen Fortschritt bedeuten, wenn nun z.B.

„Miniknochenkonstrukte“ (osteogen differenzierte ESC-Spheres) auf ein immer noch erforderliches artifizielles Matrixmaterial aufgebracht werden und implantiert werden können.

Die Mikromassenkultur mit ESC könnte darüber hinaus aber auch ein Modell für die embryonale bzw. fetale Organogenese insbesondere die Skelettbildung sein. Die Aggregation von Zellen bis zu einer kritischen Größe ist ein fundamentaler Schritt bei der Initiierung der Organogenese bei Wirbeltieren (Atchley and Hall, 1991). Hall und Miyake vermuten, dass die Kondensation von Zellen eine initiale Voraussetzung für die Skelettbildung ist, die die Differenzierung der beteiligten Zellen in Osteoblasten oder Chondroblasten induziert (Hall and Miyake, 1992; Hall and Miyake, 2000). In den bisherigen 2D-Kulturen können diese Wechselwirkungen experimentell nicht nachvollzogen werden.

4.5. **Klinische Bedeutung von Tissue Engineering mit ESC**

Das Tissue Engineering wird zukünftig vermutlich eine immer größere Rolle in der rekonstruktiven und regenerativen Medizin einnehmen. Embryonale Stammzellen werden dabei eine zunehmende Bedeutung erlangen. In diesem Zusammenhang hat beispielsweise das Europäische Parlament in seiner Sitzung anlässlich des 7. Forschungsrahmenprogramms am 15.6.2006 beschlossen, Projekte mit embryonalen Stammzellen zu fördern. Neben dem großen Potenzial embryonaler Stammzellen hinsichtlich Differenzierungskapazität und Selbsterneuerungspotenzial gibt es aber auch noch große Herausforderungen für die Verwendung von ESC bei der Herstellung von knöchernen Hybridorganen bzw. ex-vivo gezüchteten Knochenkonstrukten. So ist beispielsweise die Frage der Immuntoleranz durch einen immunkompetenten Empfänger noch nicht geklärt. Hoffnungsvoll stimmen diesbezüglich die Ergebnisse von Burt und Mitarbeitern (Burt *et al.*, 2004), die ESC in „MHC-mismatched“ Mäuse transplantierten und weder klinische noch

histologische Anzeichen einer Abstoßungsreaktion (HvGR oder GvHR) beobachtet. Zavazava weist in seinem Übersichtsartikel basierend auf verschiedenen Studien darauf hin, dass ESC das Potenzial haben, eine Immuntoleranz zu induzieren (Zavazava, 2003). Zudem gibt es Hinweise, dass die Antigenität fremder ESC durch die Suppression der MHC-Genexpression vermindert wird (Heng *et al.*, 2004). Andere Bedenken beziehen sich auf eine mögliche maligne Entartung der Zellen. So wurde beschrieben, dass transplantierte undifferenzierte ESC in Tieren das Auftreten von Teratomen und Teratokarzinomen erhöhen können (Trounson, 2002). Andererseits haben viele Autoren in ihren *in vivo* Untersuchungen mit ESC keinerlei Hinweise auf tumoröse Entartungen finden können (Zhang *et al.*, 2001). Schließlich gibt es zur Zeit auch noch ethische und rechtliche Bedenken bzw. Einschränkungen für die Verwendung von humanen ESC für wissenschaftliche Versuche und klinische Anwendungen.

Trotz der hier genannten Fragen (Immunogenität, maligne Entartung, ethische Bedenken) eröffnet sich mit den embryonalen Stammzellen ein weites Feld sowohl für zukünftige therapeutische Strategien als auch für grundlagenwissenschaftliche Forschungen z.B. hinsichtlich der embryonalen Organogenese. Zudem weisen u.a. die Ergebnisse dieser Arbeit das Potenzial der osteogenen Differenzierung und des Tissue Engineerings von Knochen mit pluripotenten Stammzellen nach, die möglicherweise auf andere pluripotente Stammzellen – wie z.B. USSC (Nabelschnurstammzellen) – übertragen werden können. Bei diesen Zellen, wenn sie für den ursprünglichen Spender benutzt werden, sind zumindest immunologische Probleme und ethische Bedenken nicht zu befürchten.

5. Zusammenfassung

Embryonale Stammzellen (ESC) haben als pluripotente Stammzellen viele Vorteile gegenüber multipotenten adulten Stammzellen oder maturen unipotenten Zellen. Ziel dieser Studie war es, die Eignung dieser Zellen für das Tissue Engineering von Knochen näher zu analysieren. Neben der Frage nach dem geeigneten Differenzierungsmedium wurde der Differenzierungsprozess hinsichtlich seines zeitlichen Verlaufs und des Expressionsmusters wichtiger osteoblastentypischer Gene analysiert. Zudem wurden erste Erkenntnisse über die Beteiligung verschiedener Transkriptionsfaktoren gewonnen. Verschiedene Biomaterialien wurden auf ihre Kompatibilität mit ESC überprüft. Schließlich wurden erstmalig ESC in Mikromassenkulturen osteogen kultiviert und differenziert.

Methodisch kamen neben den konventionellen 2D-Kulturtechniken auch die Mikromassenkulturmethode zu Anwendung. Die Analysen wurden mittels qualitativer und quantitativer real time RT-PCR, Enzymassay und Histologie durchgeführt. Zudem wurde die Microarray-Technik angewendet. Schließlich erfolgte eine morphologische und physikalische Analyse einiger Versuche mittels Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie sowie Elektronenstrahldiffraktionsanalyse. Die Ergebnisse zeigen, dass Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat (DAG) ein geeigneter Zusatz sind um ESC osteogen zu differenzieren. Während des ca. dreiwöchigen Differenzierungsprozesses zeigen v.a Kollagen I und Osteocalcin ein charakteristisches Expressionsmuster. Mit zunehmender Differenzierung verlieren sie die Pluripotenzmarker Oct4 und FoxD3. Bei der Differenzierung scheinen der Transkriptionsfaktor Runx2 (Cbfa1) sowie BMP-2 eine Rolle zu spielen, während der Transkriptionsfaktor Osterix, der von anderen Autoren beschrieben wurde, keine signifikanten Veränderungen zeigte. Die Signalproteine Smad1, Smad5 und Smad8 werden in der Literatur mit der BMP-2-Wirkung in Verbindung gebracht. Interessant ist, dass in ESC während der osteogenen Differenzierung nur Smad1 und Smad8 signifikante Änderungen des Expressionslevels zu den betrachteten Messzeitpunkten zeigten.

ESC wachsen nicht auf allen Biomaterialien gleich gut. Vielmehr ist die Biokompatibilität von ICBM (insoluble collagenous bone matrix) gefolgt von β -Trikalziumphosphat (β -TCP), gemessen anhand des Proliferationsverhaltens und der

rasterelektronenmikroskopischen Morphologie, am höchsten. Die Zellen zeigen bereits nach einer Woche morphologische Ähnlichkeiten mit Osteoblasten.

Erstmals wurden ESC in Mikromassenkulturen osteogen differenziert. Die Zellen bildeten ohne artifiziell hinzugegebene Matrixmaterialien ein dreidimensionales sphärisches Konstrukt, in dessen Zentrum Hydroxylapatit sowie kollagenartige Fibrillen zu erkennen waren. Dies spricht für eine knochenähnliche Mineralisation innerhalb der ESC-Spheres.

Obgleich einige Fragen beispielsweise bzgl. der Immunogenität und eines möglichen malignen Entartungspotenzials von ESC noch ungeklärt sind, zeigen diese Ergebnisse das enorme Potenzial von ESC für das Tissue Engineering von Knochen. Darüber hinaus könnten ESC-Mikromassenkulturen ein Modell für die embryonale Organogenese oder zumindest der Skelettentwicklung sein und so zum besseren Verständnis dieser komplexen Prozesse beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- Aaron RK, Boyan BD, Ciombor DM, Schwartz Z, Simon BJ (2004). Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res* 419):30-7.
- Afzal F, Pratap J, Ito K, Ito Y, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS, Lian JB, Javed A (2005). Smad function and intranuclear targeting share a Runx2 motif required for osteogenic lineage induction and BMP2 responsive transcription. *J Cell Physiol* 204(1):63-72.
- Arnold S, Plate U, Wiesmann HP, Stratmann U, Kohl H, Hohling HJ (1999). Quantitative electron spectroscopic diffraction analyses of the crystal formation in dentine. *J Microsc* 195 (Pt 1)(58-63.
- Atchley WR, Hall BK (1991). A model for development and evolution of complex morphological structures. *Biol Rev Camb Philos Soc* 66(2):101-57.
- Aubin JE, Liu F (1996). The osteoblast lineage. In: Principles of Bone Biology. J Bilezikian, L Raisz and G Rodan editors. San Diego: Academic Press, pp. 51-67.
- Baharvand H, Ashtiani SK, Tae A, Massumi M, Valojerdi MR, Yazdi PE, Moradi SZ, Farrokhi A (2006). Generation of new human embryonic stem cell lines with diploid and triploid karyotypes. *Dev Growth Differ* 48(2):117-28.
- Bielby RC, Boccaccini AR, Polak JM, Buttery LD (2004). In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng* 10(9-10):1518-25.

Bilezikian J, Raisz L, Rodan GA (1996). Principles of Bone Biology San Diego: Academic Press, Inc.

Binato R, Alvarez Martinez CE, Pizzatti L, Robert B, Abdelhay E (2006). SMAD 8 binding to mice Msx1 basal promoter is required for transcriptional activation. *Biochem J* 393(Pt 1):141-50.

Binderman I, Fin N (1990). Bone substitutesorganic, inorganic, and polymeric: Cell material interactions. In: CRC Handbook of Bioactive Ceramics. T Yamamuro, L Hench and J Wilson editors. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 45-51.

Boudreau NJ, Jones PL (1999). Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* 339 (Pt 3)(481-8.

Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122(6):947-56.

Burt RK, Verda L, Kim DA, Oyama Y, Luo K, Link C (2004). Embryonic stem cells as an alternate marrow donor source: engraftment without graft-versus-host disease. *J Exp Med* 199(7):895-904.

Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, Episkopou V, Polak JM (2001). Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* 7(1):89-99.

Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D (2006). Expression of early transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol* 4(1):8.

Chambers I (2004). The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 6(4):386-91.

Chaudhry GR, Yao D, Smith A, Hussain A (2004). Osteogenic Cells Derived From Embryonic Stem Cells Produced Bone Nodules in Three-Dimensional Scaffolds. *J Biomed Biotechnol* 2004(4):203-210.

Chehroudi B, McDonnell D, Brunette DM (1997). The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. *J Biomed Mater Res* 34(3):279-90.

Chun TH, Sabeh F, Ota I, Murphy H, McDonagh KT, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Allen ED, Weiss SJ (2004). MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. *J Cell Biol* 167(4):757-67.

Cogle CR, Guthrie SM, Sanders RC, Allen WL, Scott EW, Petersen BE (2003). An overview of stem cell research and regulatory issues. *Mayo Clin Proc* 78(8):993-1003.

D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 14(7):1115-22.

D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC (2006). Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone*.

Dalby MJ, Di Silvio L, Davies GW, Bonfield W (2000). Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts in vitro. *J Mater Sci Mater Med* 11(12):805-10.

Davies JE (1996). In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec* 245(2):426-45.

den Braber ET, de Ruijter JE, Smits HT, Ginsel LA, von Recum AF, Jansen JA (1995). Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth. *J Biomed Mater Res* 29(4):511-8.

Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI (1992). Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant* 1(1):23-32.

Depprich R, Handschel J, Sebald W, Kubler NR, Wurzler KK (2005). [Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein (BMP) mutants.]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9(363-8).

Deregowski V, Gazzo E, Priest L, Rydzial S, Canalis E (2006). Notch 1 overexpression inhibits osteoblastogenesis by suppressing Wnt/beta-catenin but not bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 281(10):6203-10.

Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin CH, Kern SE, Massague J, Melton DA, Mlodzik M, Padgett RW, Roberts AB, Smith J, Thomsen GH, Vogelstein B, Wang XF (1996). Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell* 87(2):173.

Drab M, Haller H, Bychkov R, Erdmann B, Lindschau C, Haase H, Morano I, Luft FC, Wobus AM (1997). From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *Faseb J* 11(11):905-15.

Evans MJ, Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154-6.

Frenkel G, Niederdellmann H (1975). [Use of compact aluminum oxide ceramics for reconstruction of the temporomandibular joint]. *Quintessenz* 26(11):37-44.

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

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

Gilbert DM (2004). The future of human embryonic stem cell research: addressing ethical conflict with responsible scientific research. *Med Sci Monit* 10(5):RA99-103.

Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1991). The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Relat Res* 262):298-311.

Hall BK, Miyake T (1992). The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 186(2):107-24.

Hall BK, Miyake T (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 22(2):138-47.

Handschel J, Wiesmann HP, Stratmann U, Kleinheinz J, Meyer U, Joos U (2002). TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials* 23(7):1689-95.

Handschel J, Depprich R, Kübler NR, Wiesmann HP, Ommerborn M, Meyer U (2006a). Prospects of micromass culture technology in tissue engineering. *Head Face Med* accepted

Handschel J, Depprich R, Wiesmann HP, Kübler NR, Meyer U (2006b). Cell based bone reconstruction therapies - cell sources. *Int J Oral Maxillofac Implants* accepted

Hendy GN, Kaji H, Sowa H, Lebrun JJ, Canaff L (2005). Menin and TGF-beta superfamily member signaling via the Smad pathway in pituitary, parathyroid and osteoblast. *Horm Metab Res* 37(6):375-9.

Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B (2004). Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner Res* 19(9):1379-94.

Hikita A, Kadono Y, Chikuda H, Fukuda A, Wakeyama H, Yasuda H, Nakamura K, Oda H, Miyazaki T, Tanaka S (2005). Identification of an alternatively spliced variant of Ca²⁺-promoted Ras inactivator as a possible regulator of RANKL shedding. *J Biol Chem* 280(50):41700-6.

Jager M, Sager M, Knipper A, Degistirici O, Fischer J, Kogler G, Wernet P, Krauspe R (2004). [In vivo and in vitro bone regeneration from cord blood derived mesenchymal stem cells]. *Orthopade* 33(12):1361-72.

Jones LJ, Gray M, Yue ST, Haugland RP, Singer VL (2001). Sensitive determination of cell number using the CyQUANT cell proliferation assay. *J Immunol Methods* 254(1-2):85-98.

Kern B, Shen J, Starbuck M, Karsenty G (2001). Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem* 276(10):7101-7.

Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ (1996). Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98(1):216-24.

Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200(2):123-35.

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

Kubler NR, Wurzler K, Reuther JF, Faller G, Sieber E, Kirchner T, Sebald W (1999). [EHBMP-2. Initial BMP analog with osteoinductive properties]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 3 Suppl 1(S134-9.

Kubler NR, Wurzler KK, Reuther JF, Sieber E, Kirchner T, Sebald W (2000). [Effect of different factors on the bone forming properties of recombinant BMPs]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 Suppl 2(S465-9.

Langer R, Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science* 260(5110):920-6.

Leake DL, Habal MB (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):555-60.

Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18(6):675-9.

Liu L, Czerwiec E, Keefe DL (2004). Effect of ploidy and parental genome composition on expression of Oct-4 protein in mouse embryos. *Gene Expr Patterns* 4(4):433-41.

Löffler G (2000). *Basiswissen Biochemie*. 4. Auflage ed. Berlin Heidelberg
New York: Springer Verlag.

Louis PJ, Cuzalina LA (2000). Alloplastic augmentation of the face. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 8(2):127-91.

Lysaght MJ, Reyes J (2001). The growth of tissue engineering. *Tissue Eng* 7(5):485-93.

Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, Toyama Y, Taguchi T, Tanaka J (2005). The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* 26(23):4847-55.

Mahmood J, Takita H, Ojima Y, Kobayashi M, Kohgo T, Kuboki Y (2001). Geometric effect of matrix upon cell differentiation: BMP-induced osteogenesis using a new bioglass with a feasible structure. *J Biochem (Tokyo)* 129(1):163-71.

Markaki AE, Clyne W (2004). Magneto-mechanical stimulation of bone growth in a bonded array of ferromagnetic fibres. *Biomaterials* 25(19):4805-15.

Martin GR (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12):7634-8.

Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C (2005). Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Implants Res* 16(6):650-6.

McCulloch CA, Strugurescu M, Hughes F, Melcher AH, Aubin JE (1991). Osteogenic progenitor cells in rat bone marrow stromal populations exhibit self-renewal in culture. *Blood* 77(9):1906-11.

McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW (1999). Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5(12):1410-2.

McKee MD, Nanci A (1996). Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. *Connect Tissue Res* 35(1-4):197-205.

Mehta RP, Deschler DG (2004). Mandibular reconstruction in 2004: an analysis of different techniques. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 12(4):288-93.

Meyer U, Meyer T, Jones DB (1998). Attachment kinetics, proliferation rates and vinculin assembly of bovine osteoblasts cultured on different pre-coated artificial substrates. *J Mater Sci Mater Med* 9(6):301-7.

Meyer U, Meyer T, Wiesmann HP, Stratmann U, Kruse-Losler B, Maas H, Joos U (1999a). The effect of magnitude and frequency of interfragmentary strain on the tissue response to distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 57(11):1331-9; discussion 1340-1.

Meyer U, Wiesmann HP, Kruse-Losler B, Handschel J, Stratmann U, Joos U (1999b). Strain-related bone remodeling in distraction osteogenesis of the mandible. *Plast Reconstr Surg* 103(3):800-7.

Meyer U, Joos U, Wiesmann HP (2004). Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part I. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(4):325-32.

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

Meyer U, Wiesmann H, Büchter A, Libera J (2006). Cartilage regeneration by ex vivo engineered autologous microtissue - a pilot study. *Osteoarthr. Cartil.* submitted(

Morszeck C (2006). Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int* 78(2):98-102.

Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89(5):773-9.

Naito J, Kaji H, Sowa H, Hendy GN, Sugimoto T, Chihara K (2005). Menin suppresses osteoblast differentiation by antagonizing the AP-1 factor, JunD. *J Biol Chem* 280(6):4785-91.

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108(1):17-29.

Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe R J, Schwarz EM, Drissi H (2006). Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene* 372(62-70).

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24(4):372-6.

Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Radespiel-Troger M, Kloss F, Neukam FW (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 FW (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):157-63.

O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ (2005). The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 26(4):433-41.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ (1997). Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89(5):765-71.

Petrovic L, Schlegel AK, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J (2006). Different substitute biomaterials as potential scaffolds in tissue engineering. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21(2):225-31.

Phillips BW, Belmonte N, Vernochet C, Ailhaud G, Dani C (2001). Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284(2):478-84.

Plate U, Arnold S, Stratmann U, Wiesmann HP, Hohling HJ (1998). General principle of ordered apatitic crystal formation in enamel and collagen rich hard tissues. *Connect Tissue Res* 38(1-4):149-57; discussion 201-5.

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

Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Vradii D, Bhat BM, Robinson JA, Choi JY, Komori T, Stein JL, Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ (2003). Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts. *Cancer Res* 63(17):5357-62.

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

Quarto R, Thomas D, Liang CT (1995). Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif Tissue Int* 56(2):123-9.

Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S (2003). BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 18(10):1842-53.

Ripamonti U (2004). Soluble, insoluble and geometric signals sculpt the architecture of mineralized tissues. *J Cell Mol Med* 8(2):169-80.

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

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

Sciaudone M, Gazzero E, Priest L, Delany AM, Canalis E (2003). Notch 1 impairs osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology* 144(12):5631-9.

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336(6200):688-90.

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

Somerman MJ, Prince CW, Sauk JJ, Foster RA, Butler WT (1987). Mechanism of fibroblast attachment to bone extracellular matrix: role of a 44 kilodalton bone phosphoprotein. *J Bone Miner Res* 2(3):259-65.

Steinert A, Weber M, Dimmler A, Julius C, Schutze N, Noth U, Cramer H, Eulert J, Zimmermann U, Hendrich C (2003). Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res* 21(6):1090-7.

Tanaka H, Murphy CL, Murphy C, Kimura M, Kawai S, Polak JM (2004). Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells: effects of culture conditions and dexamethasone. *J Cell Biochem* 93(3):454-62.

Terheyden H, Knak C, Jepsen S, Palmie S, Rueger DR (2001). Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an

experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30(5):373-9.

Termine J, Robey P (1996). Bone matrix proteins and the mineralization process. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. M Favus editor. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 24-28.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145-7.

Tompers DM, Foreman RK, Wang Q, Kumanova M, Labosky PA (2005). Foxd3 is required in the trophoblast progenitor cell lineage of the mouse embryo. *Dev Biol* 285(1):126-37.

Trounson A (2002). Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types. *Reprod Biomed Online* 4 Suppl 1(58-63).

Turhani D, Weissenbock M, Watzinger E, Yerit K, Cvikl B, Ewers R, Thurnher D (2005). In vitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *Int J Oral Maxillofac Surg* 34(5):543-50.

van der Kraan PM, Buma P, van Kuppevelt T, van den Berg WB (2002). Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage* 10(8):631-7.

Wang YW, Wu Q, Chen GQ (2004). Attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts on random biopolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds. *Biomaterials* 25(4):669-75.

Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C, Bissell MJ (1997). Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* 137(1):231-45.

Wiesmann HP, Joos U, Meyer U (2004). Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(6):523-30.

Wojciak-Stothard B, Curtis AS, Monaghan W, McGrath M, Sommer I, Wilkinson CD (1995). Role of the cytoskeleton in the reaction of fibroblasts to multiple grooved substrata. *Cell Motil Cytoskeleton* 31(2):147-58.

Wolff KD, Ervens J, Herzog K, Hoffmeister B (1996). Experience with the osteocutaneous fibula flap: an analysis of 24 consecutive reconstructions of composite mandibular defects. *J Craniomaxillofac Surg* 24(6):330-8.

Wolff KD, Holzle F, Eufinger H (2003). The radial forearm flap as a carrier for the osteocutaneous fibula graft in mandibular reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32(6):614-8.

Wurzler KK, Emmert J, Eichelsbacher F, Kubler NR, Sebald W, Reuther JF (2004). [Evaluation of the osteoinductive potential of genetically modified BMP-2 variants]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8(2):83-92.

Yamamoto Y, Udagawa N, Matsuura S, Nakamichi Y, Horiuchi H, Hosoya A, Nakamura M, Ozawa H, Takaoka K, Penninger JM, Noguchi T, Takahashi N (2006). Osteoblasts provide a suitable microenvironment for the action of receptor activator of NF- κ B ligand. *Endocrinology*.

Yamashita A, Takada T, Narita J, Yamamoto G, Torii R (2005). Osteoblastic differentiation of monkey embryonic stem cells in vitro. *Cloning Stem Cells* 7(4):232-7.

Yang S, Wei D, Wang D, Phimphilai M, Krebsbach PH, Franceschi RT (2003). In vitro and in vivo synergistic interactions between the Runx2/Cbfa1 transcription factor and bone morphogenetic protein-2 in stimulating osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 18(4):705-15.

Youdas JW, Wood MB, Cahalan TD, Chao EY (1988). A quantitative analysis of donor site morbidity after vascularized fibula transfer. *J Orthop Res* 6(5):621-9.

Young DW, Pratap J, Javed A, Weiner B, Ohkawa Y, van Wijnen A, Montecino M, Stein GS, Stein JL, Imbalzano AN, Lian JB (2005). SWI/SNF chromatin remodeling complex is obligatory for BMP2-induced, Runx2-dependent skeletal gene expression that controls osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 94(4):720-30.

Zavazava N (2003). Embryonic stem cells and potency to induce transplantation tolerance. *Expert Opin Biol Ther* 3(1):5-13.

Zernik J, Twarog K, Upholt WB (1990). Regulation of alkaline phosphatase and alpha 2(I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. *Differentiation* 44(3):207-15.

Zhang R, Ducy P, Karsenty G (1997). 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits Osteocalcin expression in mouse through an indirect mechanism. *J Biol Chem* 272(1):110-6.

Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19(12):1129-33.

zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ (2003). In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 71(1):18-27.

zur Nieden NI, Kempka G, Rancourt DE, Ahr HJ (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):1.

7. Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt zunächst Herrn Universitätsprofessor Dr. Dr. N. R. Kübler für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, seine Anleitung zu chirurgischer Arbeit und die bereitwillige Vermittlung klinischer Fähigkeiten, für die hervorragende Unterstützung bei den verschiedensten Fragestellungen sowie seine Bereitschaft zu ständigen Diskussionen.

Den Referenten dieser Arbeit danke ich recht herzlich für ihre Gutachtertätigkeit.

Frau Dipl. Biol. Karin Berr und Frau Julia Hartmann sei ganz besonders für Ihre Unterstützung bei den labortechnischen Arbeiten gedankt. Ohne ihre Hilfsbereitschaft und ihren Einsatz hätten große Teile der Studie nicht durchgeführt werden können. Frau Karin Berr danke ich zudem für Ihre Bereitschaft zur kritischen wissenschaftlichen Diskussion.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Dr. U. Meyer sowie meiner Kollegin Frau Dr. Dr. R. Depprich danke ich für die Bereitschaft zur kritischen wissenschaftlichen Diskussion.

Herrn Universitätsprofessor Dr. K. Pfeffer und seinen Mitarbeitern aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf danke ich für die Überlassung von murinen embryonalen Stammzellen sowie die großzügige Bereitstellung eines großen Teils, des von uns benötigten Equipments. Ohne diese freundliche Unterstützung wären diese Forschungsarbeiten in den vergangenen Jahren nicht möglich gewesen.

Herrn Universitätsprofessor Dr. W. Sebald, Institut für Physiologische Chemie II der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, danke ich für die großzügige Bereitstellung von BMP-2.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors von Herrn Priv. Doz. Dr. H.P. Wiesmann, Arbeitsgruppe Biomineralisation Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Frau Cebulla, Frau Struck, Frau Schütte, Frau Dehmer-Möller und Frau

Grabiniok danke ich für viele anregende Diskussionen und ihre Unterstützung in vielen technischen Angelegenheiten.

Schließlich möchte ich ganz herzlich meiner Familie danken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit vorbehaltlos und uneingeschränkt unterstützt hat.