

Dissertation

**Analyse der Vitalität und
Differenzierungsfähigkeit humaner primärer
Knochenvorläuferzellen**

eingereicht von

Dr. med. univ. Karin Pekovits

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der medizinischen Wissenschaft

(Dr. scient. med.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt unter der Anleitung von

o. Univ.-Prof. Dr. Gottfried Dohr

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Heinz Hutter

am

Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Danksagungen

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Betreuern Univ.-Prof. Dr. Gottfried Dohr, Univ.-Prof. Mag. Dr. Heinz Hutter und Priv.-Doz. DDr. Michael Payer für ihre fachliche und mentale Unterstützung während des Doktoratsstudiums und der Erstellung dieser Dissertation bedanken. Sie begegneten mir stets mit viel Sympathie, hatten immer ein offenes Ohr für meine Anliegen, ließen mir großen Handlungsfreiraum und halfen mir so meine Fähigkeiten zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten weiterzuentwickeln.

Ich danke aber auch allen Kollegen und Kolleginnen am Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie, insbesondere Nina Flieser, DI Amin El-Heliebi, Dr. Julia König, Elisabeth Bock und Rudolf Schmied für ihre Hilfsbereitschaft und fachkundige Unterstützung in allen Belangen des (Labor)alltags und bei der Fertigstellung meiner Arbeit. Desweiteren möchte ich mich bei Univ.-Ass. Dr. Angelika Wildburger und Univ.-Prof. DDr. Norbert Jakse von der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Abschließend möchte ich an dieser Stelle besonders meinem Freund für sein geduldiges Verständnis, seine liebevolle Unterstützung und Ermutigung während des gesamten Studiums und in der Zeit der Entstehung der Dissertation danken.

Zusammenfassung

Ziel: Autogener Knochen gilt, aufgrund seiner osteokonduktiven, osteoinduktiven und osteostimulativen Eigenschaften, als Goldstandard zur Knochenregeneration in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von 2 verschiedenen Knochenschabern hinsichtlich der Qualität der Knochentransplantate zu vergleichen und die Eignung von Alveolarknochen als Quelle für mesenchymale Stromazellen (MSCs) zu testen.

Material und Methoden: Die Studie wurde als prospektive, kontrollierte experimentelle Studie an ausgewählten ambulanten Krankenhauspatienten der Abteilung für Zahnärztliche Chirurgie und Röntgenologie durchgeführt (Medizinische Universität Graz, Österreich). Knochenproben wurden während einer Routine-Weisheitszahnentfernung aus dem Unterkiefer gewonnen. Sowohl der mechanische (MS) als auch der piezoelektrische (PD) Knochenschaber wurden bei jedem Patienten an direkt angrenzenden Spenderregionen angewandt. Als Variablen wurden die Morphologie der Knochenfragmente, die Zellvitalität, die osteogene Differenzierung und das Differenzierungspotential untersucht. Für statistische Analysen wurden der Student's t-Test und Fischers Exakter Test ($P < 0.05$) verwendet.

Ergebnisse: 20 Patienten (12 Frauen und 8 Männer, durchschnittliches Alter 28.2 ± 5.8 Jahre) wurden in die Studie inkludiert. 40 Knochenproben wurden während Unterkiefer-Weisheitszahnentfernungen entnommen. MS und PD ermöglichten die Gewinnung ähnlicher Mengen an Knochenfragmenten. Nach 7 bis 18 Tagen zeigte sich bei 90% der MS und 80% der PD Proben ohne statistische Signifikanz ($P < 0.67$) ein Auswachsen adhärenter Zellen in vitro. Die Zellvitalität war in beiden Gruppen beinahe gleich ($94.7\% \pm 2.2\%$ in der MS und $94.1\% \pm 1.6\%$ in der PD Gruppe). Die Analyse der PCR-Ergebnisse und das Färbeprofil verifizierten die Zellen beider Gruppen als osteogene Zellen. Die Zellen zeigten, verglichen mit MSCs, ein ähnliches Differenzierungsverhalten.

Konklusion: Sowohl der PD als auch der MS stellen adäquate Technologien zur Gewinnung von Knochenmaterial für intraorale Augmentationsverfahren dar. Die Ergebnisse zeigten keine Vorteile des PD. Alveolarknochen könnte als geeignete Quelle multipotenter Zellen für Geweberegeneration in der Zahnheilkunde dienen.

Abstract

Purpose: Autogenous bone is still considered the gold standard for bone regeneration in oral and maxillofacial surgery due to its osteoconductive, osteoinductive and osteogenetic properties. The aim of the doctoral thesis was to compare the influence of 2 different bone scrapers with respect to graft quality and to investigate the suitability of alveolar bone as an applicable source of human mesenchymal stromal cells.

Materials and Methods: The study was conducted as a prospective, controlled experimental study of patients selected from the outpatient unit of the Department of Oral Surgery and Radiology (Dental Clinic, Medical University, Graz, Austria). Bone samples were obtained during routine lower third molar removal. Both a manual bone scraper (MS) and a piezoelectric device (PD) were used in directly adjacent regions in each case. As variables, the chip morphology, cell viability, osteogenic differentiation and trilineage differentiation potential were investigated. For statistical analysis, the Student t test and Fisher's exact test ($P < 0.05$) were applied.

Results: A total of 20 patients (12 women and 8 men, mean age 28.2 ± 5.8 years) were included in the study. A series of 40 bone samples was obtained during lower third molar removal. MS and PD enabled similar intraoral harvest of bone chips. In vitro outgrowth of adherent cells was found in 90% of the MS and 80% of the PD samples after 7 to 18 days, without statistical significance ($P < 0.67$). Similar cell viability of outgrowing cells in both groups was observed ($94.7\% \pm 2.2\%$ in the MS group and $94.1\% \pm 1.6\%$ in the PD group). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis and the staining pattern verified osteopotent cells in both groups. The cells showed similar trilineage differentiation potential compared to mesenchymal bone marrow stromal cells.

Conclusions: Both manual and piezoelectric techniques are adequate harvesting technologies for limited intraoral augmentations. Our results did not show any advantage for the piezoelectric device. Alveolar bone may be considered as a suitable source of multipotent cells for tissue-engineering therapies in regenerative dentistry.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	3
Zusammenfassung	4
Abstract	5
Inhaltsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1 Knochengewebe	8
1.1.1 Anatomie des Knochens	8
1.1.2 Histologie des Knochengewebes	10
1.1.3 Knochenentwicklung und Wachstum.....	11
1.1.4 Bestandteile der extrazellulären Matrix	13
1.1.5 Zellen des Knochengewebes	14
1.1.6 Phasen der Osteogenese in vitro	21
1.1.7 Knochenheilung	25
1.1.8 Knochenregeneration	27
1.2 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	29
2. Material und Methoden	32
2.1 Zellkulturmethoden	32
2.1.1 Vorbehandlung von Kulturgefäßen.....	32
2.1.2 Mediumwechsel bei Monolayerkulturen	33
2.1.3 Subkultivierung von Monolayerkulturen.....	34
2.1.4 Bestimmung der Zellzahl	36
2.1.5 Kryokonservierung von Zellen	37
2.1.6 Auftauen von Zellen	38
2.2 Gewinnung autologen Knochenmaterials	39
2.2.1 Isolation von Primärzellen	40
2.3 Rasterelektronenmikroskopie	42
2.4 Immunzytochemie.....	45
2.5 Hämatoxylin-Färbung.....	49
2.6 Alkalische Phosphatase Bestimmung.....	51
2.7 Öl-Rot-O Färbung	52
2.8 Alcian-Blau-Färbung	52
2.9 Differenzierungsversuche	53
2.9.1 Osteogene Differenzierung	53
2.9.2 Adipogene Differenzierung	54
2.9.3 Chondrogene Differenzierung	54
2.10 Herstellung von Paraffinschnitten	55
2.11 RNA-Isolierung	58
2.12 Semiquantitative RT-PCR.....	59

2.13 Agarosegel-Elektrophorese	63
2.14 Datenanalyse	65
3. Ergebnisse	66
3.1. Entnahme der autogenen Knochentransplantate	66
3.2 Analyse der Ultrastruktur	68
3.3 Proliferationspotential der Zellen	72
3.4 Bestimmung der Zellvitalität	73
3.5 (Immun)zytochemische Charakterisierung der Zellen	74
3.6 Genexpressionsprofil	76
3.7 Differenzierungspotential der Zellen	77
3.7.1 Immunzytochemische Analyse des Differenzierungsstatus	77
3.7.2 Zytochemischer Nachweis der Multipotenz	80
3.7.3 Molekularbiologische Analyse der Multipotenz	83
4. Diskussion	86
4.1 Evaluierung der klinischen Anwendbarkeit zweier Techniken zur intraoralen Entnahme autologen Knochenmaterials	86
4.2 Differenzierung humaner Knochenvorläuferzellen und ihre potentiellen Anwendungen im Kontext des Tissue-Engineerings	90
5. Referenzen	94
6. Anhang	99

1. Einleitung

1.1 Knochengewebe

Knochengewebe ist eine hochspezialisierte Form des Bindegewebes, das im Körper dort anzutreffen ist, wo beträchtliche Druck- und Zugbelastungen auftreten. Die Hauptaufgaben des Knochengewebes sind die Bildung des passiven Teils des Bewegungsapparates und der Schutz des Zentralnervensystems, der Thorax-, Bauch- und Beckenorgane. Außerdem werden alle inneren Hohlräume der Knochen mit Knochenmark ausgefüllt. Man unterscheidet zwischen rotem hämatopoietisch aktiven Knochenmark und gelbem Fettmark. Beim Neugeborenen und Säugling füllt das rote Mark alle Knochen aus. Im Laufe der Kindheit und Jugend wird das rote Knochenmark im Bereich der Diaphysen der langen Röhrenknochen durch gelbes Fettmark ersetzt und nur die Lücken zwischen der Spongiosa von kurzen und platten Knochen sowie die Epiphysen der Röhrenknochen bleiben zeitlebens von rotem Knochenmark ausgefüllt. Desweiteren dient das Knochengewebe auch als Speicher von Ionen wie Kalzium und Phosphat, deren Konzentrationen im Blut und im Extrazellulärraum streng geregelt werden.

1.1.1 Anatomie des Knochens

Der Form nach, können die Knochen des Menschen in 3 Gruppen eingeteilt werden:

- Kurze Knochen (z.B.: Wirbelkörper, Handwurzelknochen)
- Flache Knochen (z.B.: Schädelknochen, Schulterblatt)
- Röhrenförmige Knochen (z.B.: Femur, Humerus)

An den Röhrenknochen können ein Schaft (Diaphyse) und zwei verdickte Enden (Epiphysen) unterschieden werden. Im wachsenden Knochen sind Dia- und Epiphyse durch eine knorpelige Wachstumsplatte (Wachstumsfuge,

Epiphysenfuge) getrennt. Die Metaphyse ist die trichterförmige Erweiterung der Diaphyse und grenzt an die Wachstumsplatte an.

An einem Knochen kann man makroskopisch zwei Bauformen unterscheiden: Spongiosa (Substantia spongiosa) und Kompakta (Substantia compacta). Die Spongiosa befindet sich im Inneren des Knochens und besteht aus einem schwammartigen Gitterwerk aus Knochenbälkchen (Trabekel). Die Kompakta bildet die homogen erscheinende Rindenschicht (Corticalis), die den Knochen außen umgibt. Der spezielle Bau der Knochen dient unter anderem dazu, das Gewicht des Skeletts (ca. 7kg) zu reduzieren. Die Dicke der Kompakta und die Anordnung der Trabekel in der Spongiosa sind genau der Art und Größe der Belastung, der das Knochengewebe ausgesetzt wird, angepasst. Die Hohlräume zwischen den Knochenbälkchen in der Spongiosa werden durch Knochenmark ausgefüllt. Rotes, blutbildendes Knochenmark findet man in der Spongiosa der kurzen und platten Knochen, sowie in den Epiphysen der Röhrenknochen. Die Diaphysen der Röhrenknochen enthalten nur wenig Spongiosa und sind mit gelbem, fetthaltigem Knochenmark (Fettmark) gefüllt. Im Kindesalter enthalten auch die Diaphysen der Röhrenknochen rotes Knochenmark, das jedoch allmählich in Fettmark umgewandelt wird und nicht mehr an der Blutbildung teilnimmt.

Die inneren Knochenoberflächen (Spongiosa-Trabekel, Wände der Havers- und Volkmann Kanäle) werden vom Endost ausgekleidet. Das Endost besteht aus einer dünnen Schicht aus Kollagenfibrillen und einer kontinuierlichen Lage von unterschiedlichen Zellen wie mesenchymalen Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Bone Lining Cells und Osteoklasten. Bei Bedarf treten diese Zellen in einen aktiven Zustand ein und nehmen ihre Funktionen ein.

Von außen werden die Knochen von Periost umgeben, das aus zwei Schichten besteht: Dem äußeren Stratum fibrosum aus straffem Bindegewebe, dessen Fasern (Sharpey-Fasern) in die Kortikalis einstrahlen und dem inneren Stratum osteogenicum, das dem Knochen direkt anliegt und die gleichen Zellen enthält wie das Endost.

Die Hauptaufgaben von Endost und Periost sind die Versorgung des Knochengewebes mit Nährstoffen und die Sicherstellung eines kontinuierlichen Nachschubs an Vorläuferzellen für Wachstum, Reparatur- und Umbauprozesse.

1.1.2 Histologie des Knochengewebes

Histologisch kann man zwei Arten von Knochen unterscheiden: Geflechtknochen und Lamellenknochen.

Geflechtknochen (Primärknochen) tritt nur bei der Knochenneubildung (Knochenentwicklung, Frakturheilung, Reparaturprozesse) auf. Er wird beim Erwachsenen fast überall durch Lamellenknochen ersetzt, mit Ausnahme der Suturen der platten Schädelknochen, der Alveolen der Zähne und der Ansatzstellen von Sehnen. Der Geflechtknochen unterscheidet sich vom Lamellenknochen durch den geringeren Mineralgehalt und die zufällige Anordnung der Kollagenfibrillen.

Lamellenknochen (Sekundärknochen) ersetzt im Zuge des natürlichen Umbaus allmählich den biomechanisch minderwertigeren Geflechtknochen, was mancherorts auch Jahrzehnte dauern kann (z.B.: Felsenbein). Die extrazelluläre Matrix des ausdifferenzierten Knochens ist sowohl in der Spongiosa als auch in der Kompakta in Lamellen organisiert, daher auch der Name Lamellenknochen. Jede Lamelle ist ca. 3-7 μ m dick und besteht aus in charakteristischer Weise angeordneten, dicht gepackten Kollagen I-Fibrillen.

In der Spongiosa verlaufen die Lamellen parallel zur Trabekeloberfläche und formen keine Osteone mit zentralen Kapillaren. Da die Trabekel (Durchmesser max. 400 μ m) gefäßlos sind, werden die Osteozyten durch Diffusion aus den Gefäßen des Knochenmarks ernährt.

In der Kompakta hingegen, sind 5-20 Knochen- bzw. Speziallamellen konzentrisch um einen Havers-Kanal angeordnet und bilden ein sog. Osteon bzw. Havers-System. Die Havers-Kanäle beinhalten Kapillaren, Venolen, Lymphgefäße, gelegentlich Nervenfasern und sind mit Endost ausgekleidet. Sie verlaufen longitudinal in der Kortikalis und anastomosieren miteinander. Osteone sind miteinander durch quer verlaufende Volkmann-Kanäle, in denen sich die arteriellen Abzweigungen befinden, verbunden. Ein Osteon ist im Querschnitt rund bzw. oval und hat einen Durchmesser von bis zu 400 μ m. Es wird von den Canaliculi, über die alle Osteozyten vom Havers-Kanal aus durch Diffusion erreichbar sind, radiär durchzogen. Von außen ist es durch eine stärker

anfärbbare Zementlinie (Kittlinie mit höherem Proteoglykan- und geringerem Kollagengehalt), die sie mit den angrenzenden Osteonen bzw. Schaltlamellen verbindet und sie zugleich optisch abgegrenzt, umgeben. Schaltlamellen füllen den Raum zwischen den Osteonen und stellen Reste von alten oder im Umbau befindlichen Osteonen dar.

Im äußersten Bereich der Kompakta sind die Lamellen nicht in Osteonen angeordnet, sondern umgeben als äußere Generallamellen kontinuierlich die ganze Zirkumferenz des Knochens. Lamellen, die dem Markraum zugewandt sind und unmittelbar dem Endost anliegen, werden als innere Generallamellen bezeichnet (1).

1.1.3 Knochenentwicklung und Wachstum

Die Entstehung eines Knochens (Osteogenese) ist auf zwei Arten möglich: direkt (desmale Osteogenese) oder indirekt (chondrale Osteogenese).

Im Falle der desmalen Osteogenese wird Geflechtknochen aus embryonalem Bindegewebe gebildet, indem sich mesenchymale Zellen zu Osteoblasten differenzieren. Osteoblasten lagern Osteoid um sich herum ab und werden nach Mineralisation des Osteoids zu Osteozyten. Auf diese Weise werden z.B. die Schädelknochen sowie die Schlüsselbeine gebildet.

Bei der chondralen Osteogenese entsteht Geflechtknochen indirekt über eine knorpelige Vorstufe. Dabei differenzieren sich mesenchymale Zellen zu Chondroblasten, die zunächst ein Modell des zukünftigen Knochens aus hyalinem Knorpel (Primordialskelett) herstellen. Dieses Knorpelmodell ist außen von Perichondrium umgeben und nimmt durch interstitielles Wachstum an Länge bzw. durch appositionelles Wachstum an Dicke zu. Die Bildung von Knochengewebe (Ossifikation) findet an zwei Orten im Knorpelmodell statt: um das Knorpelmodell (perichondral) sowie im Inneren des Knorpelmodells (enchondral).

Im Zuge der perichondralen Ossifikation differenzieren sich mesenchymale Zellen aus dem Perichondrium der Diaphyse zu Osteoblasten und erstellen nach Art der desmalen Osteogenese eine Knochenmanschette um die Diaphyse herum. Diese Manschette wird nach proximal und distal verlängert. Das spätere Dickenwachstum wird dadurch erreicht, dass innenliegendes Knochengewebe

abgebaut und außen neues angelagert wird. Mit Hilfe der Osteoklasten werden Kanälchen in diese Manschette gefressen und so können Blutgefäße aus dem Periost, das sich aus dem Perichondrium entwickelt hat, in den Knorpel gelangen. Unter der Knorpelmanschette differenzieren sich hypertrophe Chondrozyten und veranlassen die Mineralisation der Knorpelmatrix. Somit beginnt der Prozess der enchondralen Ossifikation der Diaphyse. Mit den Blutgefäßen wandern auch mesenchymale Zellen ein, aus denen über Zwischenstufen Osteoblasten hervorgehen. Osteo- und Chondroblasten entstammen monozytären Vorläuferzellen aus den fetalen Blutbildungszentren der Leber bzw. Milz. Chondroblasten bauen das mineralisierte Knorpelgewebe allmählich ab, Osteoblasten bauen neuen Geflechtknochen auf und so schreitet die enchondrale Ossifikation der Diaphyse nach beiden Enden fort (2).

Die Ossifikation der Epiphyse läuft grundsätzlich gleich ab wie in der Diaphyse, nur mit dem Unterschied, dass die Epiphyse schon im knorpeligen Zustand versorgende Gefäße besitzt und der Ossifikationsprozess erst kurz vor oder erst Monate bis Jahre nach der Geburt einsetzt. Die Ossifikation beginnt im Zentrum der Epiphyse und schreitet nach allen Seiten fort bis der gesamte Knorpel durch Knochen ersetzt ist, mit Ausnahme der Gelenkflächen.

An der Grenze zwischen Diaphyse zur Epiphyse bleibt eine knorpelige Wachstumszone (Epiphysenfuge bzw. -platte), in der weiterhin Chondrozyten proliferieren, bis zum Abschluss des Skelettwachstums bestehen und gewährleistet das postnatale Längenwachstum der Knochen. Die Zonen der Wachstumsplatte kann man in folgende Abschnitte teilen (3):

- In der Reservezone liegen undifferenzierten Chondrozytenprogenitorzellen vor. Sie nimmt in frühen Entwicklungsstadien die gesamte Epiphyse ein.
- Die Proliferationszone enthält mitotisch aktive Chondrozyten, die sich säulenartig anordnen. Hier erfolgt das Wachstum.
- In der hypertrophen Zone zeigen die Chondrozyten eine deutliche Größenzunahme (hypertrophe Chondrozyten). In dem distalen Bereich dieser Zone beginnt die Mineralisation der Longitudinalsepten zwischen den einzelnen Chondrozytensäulen.

- In der Eröffnungszone werden Knorpelhöhlen der Chondrozyten eröffnet. Die freigelegten Chondrozyten gehen durch Apoptose zugrunde und werden durch Chondroklasten abgebaut.
- In der Ossifikationszone lagern sich Osteoblasten an die Oberflächen der mineralisierten Longitudinalsepten und beginnen mit der Bildung von Osteoid

Erst wenn die Chondrozyten ihre Proliferation einstellen, erreicht der Ossifikationsprozess in Richtung Epiphyse die Wachstumsplatte und ersetzt diese durch Knochen. Somit schließen sich die Epiphysenfugen und das Wachstum kommt zum Stillstand.

Während des gesamten Lebens unterliegt das Skelettsystem einem ständigen Umbau (remodelling), welcher der Reparatur von Mikroschäden, Anpassung an veränderte mechanische Beanspruchung und der Bereitstellung von anorganischen Mineralien dient. Jährlich werden ca. 10% des Skeletts ab- und wieder aufgebaut (4).

1.1.4 Bestandteile der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) nimmt bis zu 90% des Gesamtvolumens im Knochengewebe ein und besteht (in Gewicht-%) zu 25% aus Wasser, zu 45% aus organischem und zu 45% aus anorganischem Material. Den Hauptanteil der anorganischer Matrix bildet Kalziumphosphat in Form von Hydroxylapatitkristallen ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Außerdem kommen auch kleinere Mengen von Magnesium, Fluorid, Kalium, Natrium, Magnesium, Chlorid, Ferrum, Zink u.a. vor (1). Der organische Anteil der Matrix besteht zu 95% aus Kollagen Typ I (in geringen Mengen auch Kollagen Typ III, V, XII), den Rest machen nichtkollagenöse Proteine wie Proteoglykane und Glykoproteine aus. Die nichtkollagenösen Matrixproteine sind mitunter für die Mineralisierung der Matrix, die Organisation der ECM, der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen verantwortlich (4). Die mikroskopisch kleinen, länglichen, hexagonalen Hydroxylapatitkristalle besitzen eine hohe Affinität zu Kollagenmolekülen und ordnen sich in mineralisierter ECM parallel zu den Kollagenfibrillen an. Durch die Verbindung von druckfesten

Mineralkristallen und zugfesten Kollagenfibrillen erhält der Knochen seine wichtige biomechanische Eigenschaft, die sog. Biegefestigkeit (1).

1.1.5 Zellen des Knochengewebes

Im Knochengewebe sind unterschiedliche Zelltypen anzutreffen: die auf den Oberflächen (im Periost und Endost) lokalisierten Osteoblasten, Osteoklasten und Bone Lining Cells und die in der Knochenmatrix eingemauerten Osteozyten sowie die an der Regeneration des Knochengewebes beteiligten mesenchymalen Stammzellen und Osteoprogenitorzellen.

Osteoblasten

Osteoblasten sind voll ausdifferenzierte knochenbildende Zellen, die sich von mesenchymalen Stammzellen ableiten. Da neue Knochenmatrix stets auf schon vorhandener mineralisierter Matrix abgelagert wird, befinden sich Osteoblasten immer auf einer freien knöchernen Oberfläche, entweder im Inneren des Knochens oder außen unter dem Periost. Sie sind kubisch bis hochprismatisch geformte Zellen, die eine epithelähnliche Schicht bilden und mit ihren Fortsätzen untereinander in Kontakt stehen. Als typische proteinbildende Zellen besitzen sie einen ausgeprägten Golgi-Apparat, viel raues endoplasmatisches Retikulum und sind reich an Mitochondrien. Osteoblasten produzieren Kollagen I und andere Proteine der extrazellulären Matrix und steuern deren Mineralisation (4). Die Osteoblasten sitzen nicht direkt der mineralisierten Matrix auf, sondern sind von dieser durch eine Schicht noch nicht mineralisierter Matrix, dem sog. Osteoid, getrennt, die sie selbst synthetisiert haben. Ein Teil der metabolisch aktiven Osteoblasten werden in die extrazelluläre Matrix eingemauert, entfernen sich so von den benachbarten Osteoblasten und werden nach Mineralisation des Osteoids zu Osteozyten. Andere Osteoblasten verringern ihre synthetische Aktivität, werden zu Bone Lining Cells und reihen sich in das Endost bzw. Periost ein. Etliche sind jedoch nach Abschluss der Knochenbildung überflüssig und gehen durch Apoptose zugrunde (5).

Osteozyten

Osteozyten sind in der mineralisierten Knochenmatrix eingeschlossene Zellen und der im Knochengewebe am häufigsten anzutreffende Zelltyp. Osteozyten liegen zwischen den Knochenlamellen in Höhlen (Lakunen), von denen zahlreiche Knochenkanälchen (Canaliculi) abgehen. In den Lakunen befinden sich die Zelleiber der Osteozyten, in den Canaliculi ihre Ausläufer. Die Canaliculi laufen sowohl senkrecht durch die Lamellen als auch parallel dazu und bilden so ein Labyrinth, das die gesamte mineralisierte Matrix durchzieht. Durch dieses Labyrinth werden alle Osteozyten durch Diffusion mit Nährstoffen versorgt und stehen durch ihre langen zytoplasmatischen Fortsätze und Gap junctions miteinander und mit den umliegenden Osteoblasten, Osteoklasten, wie auch den Bone Lining Cells und gefäßführenden Kanälen in Kontakt (6). Osteozyten sind für das Aufrechterhalten der Knochenmatrix zuständig und lassen sich in zwei Gruppen teilen: Matrixproduzierende Osteozyten, die für die Produktion und Sekretion der Knochenmatrix notwendig sind und osteolytische Osteozyten, die mineralisierte Extrazellulärschubstanz wieder auflösen (7).

Bone Lining Cells

Bone Lining Cells sind metabolisch inaktive Zellen, die nur wenig Zytoplasma und eine geringe Menge an Zellorganellen aufweisen. Sie haften an nicht im Umbau befindlichen Knochenoberflächen und an den Wänden von Volkmann- und Havers-Kanälen. Weiters sind sie durch ihre zytoplasmatischen Fortsätze und Gap junctions untereinander und mit den benachbarten Osteozyten in Verbindung. Ihre Funktion ist bis jetzt nicht im Einzelnen geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass sie ruhende Osteoblasten oder Osteoprogenitorzellen darstellen, die wieder in den aktiven Zustand eintreten können, wenn sie entsprechend angeregt werden (4).

Osteoklasten

Osteoklasten sind große (50-100µm), mehrkernige (bis zu 10 Kerne) Riesenzellen, die für den Abbau mineralisierter Matrix verantwortlich sind. Sie entstehen durch Fusion einkerniger hämatopoietischer Vorläuferzellen, aus denen auch Blutmonozyten und Makrophagen hervorgehen. Aktive Osteoklasten sind reich an Mitochondrien, zytoplasmatischen Vakuolen, Endosomen und

Lysosomen. Sie sind stark polarisierte Zellen und befinden sich direkt auf der mineralisierten Knochenmatrix in Resorptionsbuchten (Howship-Lakunen), die sie selbst in die Trabekeloberfläche und die Kompakta „gefressen“ haben. Sie heften sich an die Oberfläche an und bilden einen versiegelten Raum zwischen Zell- und Knochenoberfläche, wo die Knochenresorption stattfinden soll. Die Plasmamembran der Zellen besitzt an dieser Stelle eine Vielzahl an Falten (ruffled border) und Mikrovilli zur Vergrößerung der resorptiven Fläche. Im aktiven Zustand verschmelzen dann Endolysosomen, die Protonenpumpen enthalten, mit der Plasmamembran und Protonen werden in diesen versiegelten Raum gepumpt. Anschließend sinkt der pH-Wert in diesem Bereich auf ca. 4,5 und bewirkt die Auflösung der Calcium-Verbindungen. Der organische Anteil der Knochenmatrix wird durch sezernierte Kollagenasen, Proteasen und Hydrolasen zersetzt, die Fragmente der zerstörten Knochenmatrix werden in Endosomen gepackt und durch Verschmelzung mit Lysosomen abgebaut (8).

Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells, MSCs) sind Abkömmlinge des Knochenmarkstromas. Sie wurden erstmalig von Friedenstein identifiziert, der feststellte, dass im Knochenmark neben den hämatopoietischen Stammzellen auch noch eine andere Gruppe von Stammzellen vorkommt (9). Per definitionem, ist eine Stammzelle eine undifferenzierte Zelle, welche die Fähigkeit zur unlimitierten Selbsterneuerung (self-renewal) besitzt. Sie kann somit durch symmetrische Teilung den eigenen Stammzellpool aufrechterhalten. Andererseits können aus ihr durch geeignete Stimuli andere Zelltypen differenzieren. Dies erfolgt durch asymmetrische Mitose, wobei zwei verschiedene Tochterzellen entstehen: Eine selbsterneuerungsfähige Stammzelle und eine Zelle, die befähigt ist, sich in einen differenzierteren Phenotyp zu verwandeln. Stammzellen kann man bezüglich ihres Entwicklungsstadiums in embryonale, fetale und adulte Stammzellen unterteilen. Weiters lassen sie sich hinsichtlich ihres Entwicklungspotentials in totipotente und pluripotente Stammzellen einteilen. Totipotente Stammzellen findet man bis zum 8-Zellstadium der Embryonalentwicklung. Jede einzelne totipotente Stammzelle besitzt die Fähigkeit einen gesamten Organismus neu zu bilden. Zu den pluripotenten Stammzellen zählen alle embryonalen, fetalen und adulten Stammzellen. Im Kontext mit adulten

Stammzellen wird oft die Bezeichnung Vorläuferzelle bzw. Progenitorzelle verwendet. Eine Progenitorzelle ist jene differenzierte Zelle, die aus einer asymmetrischen Mitose einer Stammzelle hervorgeht. Sie besitzt in vivo nur mehr eine begrenzte Fähigkeit zur Selbsterneuerung (10).

Friedenstein konnte schon in den 70igern nachweisen, dass sich Zellen aus dem Knochenmarkstroma stark vermehren und Kolonien von fibroblastenähnlichen Zellen (colony-forming unit fibroblast, CFU-F) ausbilden, aus denen nachfolgend andere differenzierte Zelltypen wie Fibroblasten, Osteoblasten und Chondroblasten entstehen (11). In der Folgezeit wurde die Multipotenz dieser mesenchymaler Stammzellen mehrfach bestätigt (12). Es konnte auch gezeigt werden, dass diese Zellen die Fähigkeit besitzen sich sogar in Myoblasten, Adipozyten und Endothelzellen zu differenzieren.

Heutzutage ist bekannt, dass nicht nur Knochenmarkstroma eine wichtige Quelle der MSCs darstellt, sondern auch andere Gewebearten mesenchymaler Herkunft, wie beispielsweise Muskel-, Knorpel-, Fett-, Knochen- und Plazentagewebe (13), neben mesenchymalen Vorläuferzellen auch eine geringe Anzahl an MSCs beherbergen. Beide Zellpopulationen sind an den Reparaturprozessen im Gewebe nach Traumata oder Erkrankungen beteiligt. Interessant ist die Erkenntnis, dass mesenchymale Vorläuferzellen, die überwiegend gewebsspezifisch wirken, unter bestimmten Bedingungen in Vorläuferzellen anderer Zelltypen transdifferenzieren können (14). So können beispielsweise Knochenvorläuferzellen nicht nur aus MSCs des Knochenmarks, sondern auch aus Vorläuferzellen des Muskel-, Fett- oder Knorpelgewebes entstehen (15). Welche Signale für die Umprogrammierung der Zellen zur gewünschten differenzierten Zielzelle verantwortlich sind und woher diese Signale stammen ist derzeit noch Gegenstand der Forschung (5).

Osteoprogenitorzellen und osteogene Differenzierung

Die Osteogenese ist ein komplexer Prozess, der sowohl die Rekrutierung von Osteoprogenitorzellen als auch ihre Umwandlung in voll funktionstüchtige reife Osteoblasten unter dem Einfluss von systemischen und lokalen Faktoren beinhaltet. Dieser Prozess findet nicht nur während der embryonalen Entwicklung, sondern auch im adulten Organismus während der natürlichen Umbauprozesse und bei der Frakturheilung statt. Die Differenzierung einer MSC zu einem reifen Osteoblasten kann in mehrere postulierte Schritte unterteilt werden (Abb. 1.1).

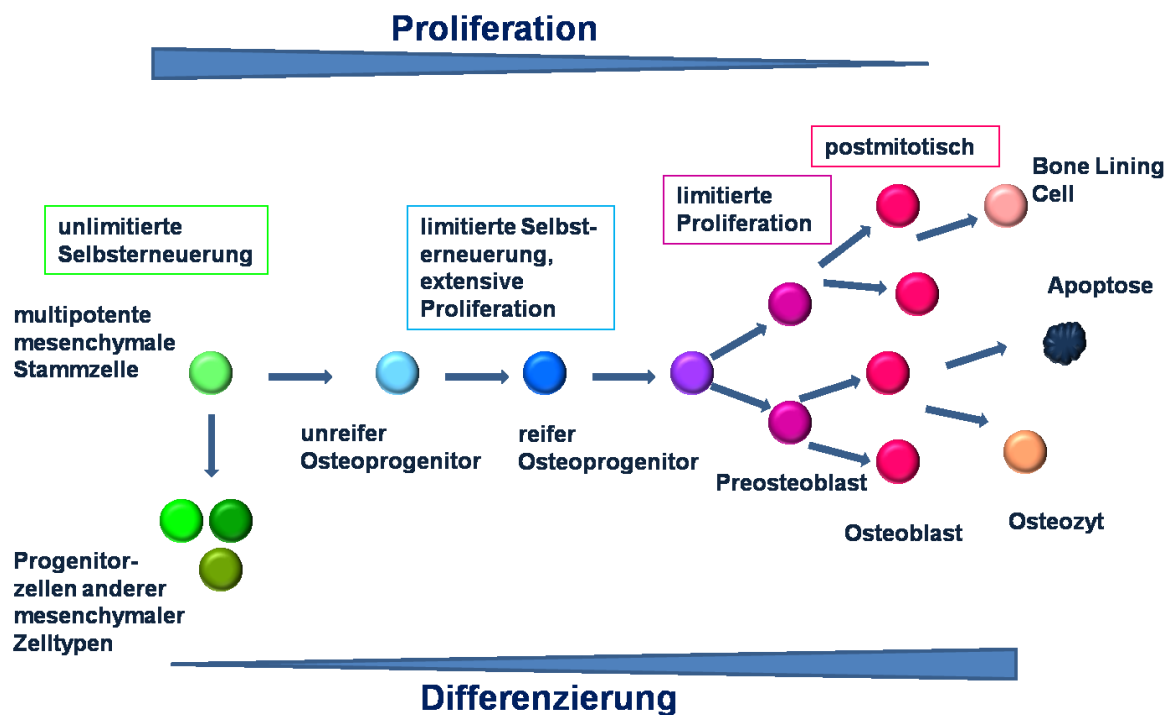


Abb. 1.1.: Postulierte Schritte in der osteogenen Linie in Zusammenhang mit der Proliferationsfähigkeit und dem Differenzierungsstatus. (adaptiert aus Aubin JE, Bone stem cells, 1998) (16)

Anfangs entstehen aus einer multipotenten MSC durch asymmetrische Mitose Progenitorzellen, die in ihrer Potenz eingeschränkter sind als MSCs. Progenitorzellen sind meistens tri- oder bipotent, was bedeutet, dass sie sich zu Vorläuferzellen von zwei oder drei anderen Zelltypen entwickeln können. Aus diesen tri- oder bipotenten Vorläuferzellen entwickeln sich in weiterer Folge Progenitoren, deren weiterer Entwicklungsweg schon festgelegt ist (commitment). Beispielsweise unreife Osteoprogenitoren, die sich anschließend in reife Osteoprogenitoren, danach in Präosteoblasten und schließlich in reife Osteoblasten differenzieren. Von den reifen Osteoblasten entwickeln sich nur 10-20% zu Osteozyten und Bone Lining Cells, der restliche Teil unterliegt offensichtlich der Apoptose.

Die Zellen der einzelnen Entwicklungsstufen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer proliferativen Fähigkeiten, ihrer Morphologie und ihren biochemischen Kapazitäten. Verglichen mit den MSCs, die unlimitierte Selbsterneuerungsfähigkeiten und Proliferationskapazitäten besitzen, sind die

Fähigkeiten der Progenitorzellen zur Selbsterneuerung und Vermehrung eingeschränkt. Die zum nächsten Entwicklungsstadium zählenden Präosteoblasten sind in ihrer Teilungsfähigkeit limitiert und reife Osteoblasten, Bone Lining Cells sowie Osteozyten haben sie gänzlich verloren (17).

Eine genaue Identifikation der biochemischen Marker osteogener Differenzierung erweist sich als sehr schwierig, da einerseits eine in vitro Kultur eine Mischung aus unterschiedlich weit ausdifferenzierten Zellen darstellt und andererseits Zellen unter Kulturbedingungen nicht immer ihre normalen histologischen Eigenschaften zeigen. Trotz der Diskrepanzen der einzelnen experimentellen Ergebnisse verschiedener Studien, konnte eine brauchbare Anzahl an Markern identifiziert werden, die für eine Charakterisierung der osteogenen Zellen in den einzelnen Entwicklungsstadien nötig ist (Tab.1.1.).

Tab. 1.1.: Expression der wichtigsten Marker osteogener Differenzierung

(adaptiert aus Aubin JE, Regulation of osteoblast formation and function, 2001) (18)

Marker	Multipotente Stammzelle	Unreife Knochenvorläuferzelle	Reife Knochenvorläuferzelle	Prä-osteoblast	Osteoblast	Osteozyt
STRO-1	+	+	+/-	-	-	-
Alkalische Phosphatase Aktivität	-	-	+	++	+++	-
Kollagen Typ 1	?	-/+	++	++	++	-
Osteocalcin	-	-	-	-	- → +++	-
Osteopontin	?	-/+	-/+	- → +	- → +++	- → +++
Bone Sialoprotein II	-	-	-	- → +++	- → +++	- → +++
Parathormon Rez.	?	-	-/+	++	+++	++

- → =keine detektierbare Expression

-/+, +, ++, +++ = detektierbare bis sehr starke Expression

- → +++ = heterogene Expression

? = widersprüchliche Angaben

Reife Osteoblasten sind bis dato biochemisch am besten charakterisiert. Sie stellen metabolisch äußerst aktive Zellen dar, die Kollagen Typ I und nicht-gewebespezifische membrangebundene alkalische Phosphatase (ALPL), zwei wichtige Marker fortgeschrittener osteogener Differenzierung, synthetisieren. Weiters produzieren sie viele nichtkollagenöse Matrixproteine wie z. B. Osteopontin (OP), Osteonectin (ON), Osteocalcin (OC), Fibronectin (FN), Biglycan und Bone Sialoprotein (BSP). Weiters besitzen sie zahlreiche Rezeptoren für die Bindung von Hormonen (z.B.: Parathormon, Östrogen) und Wachstumsfaktoren (z.B.: platelet-derived (PDGF), insulin-like (IGF), epidermal (EGF), transforming beta (TGF β), fibroblast-derived (FGF) growth factors). Jedoch sind bei reifen Osteoblasten nur drei der Differenzierungsmarker, nämlich ALP, Kollagen I und der Parathormon-Rezeptor immer in relativ gleicher Menge exprimiert. Der weitaus größere Teil der Marker wird in unterschiedlichem Ausmaß produziert. Osteocalcin, ein wichtiger Marker osteogener Differenzierung, der nur in postmitotischen Entwicklungsstadien zu finden ist, zeigt beispielsweise ein sehr heterogenes Expressionsprofil. Die Produktion wird einerseits durch die Lage des Osteoblasten im Knochengewebe beeinflusst, andererseits ist sie von der Stimulation durch lokale Faktoren wie beispielsweise Zytokine abhängig.

Bei den vergleichsweise metabolisch inaktiveren Osteozyten, sind nur die Expression von BSP und OP sowie das Vorhandensein von Parathormon-Rezeptoren (PTH/PTHrP-R) an der Zelloberfläche nachgewiesen (6).

Reife Osteoprogenitoren und Präosteoblasten synthetisieren neben ALPL und Kollagen I auch geringe Mengen an OP und PTH/PTHrP-R. Osteocalcin, ein wichtiger Marker des osteoblastären bzw. osteozytären Entwicklungsstadiums, ist in Osteoprogenitoren und Präosteoblasten noch nicht detektierbar.

Relativ schwierig erweist sich die biochemische Charakterisierung von unreifen Osteoprogenitorzellen, da unreife Zellen noch wenig spezifische Marker zeigen. Sie zeigen Oberflächenmarker wie beispielsweise STRO-1, SB-10 bzw. ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) und HOP-26, die alle nicht spezifisch für Osteoprogenitorzellen, sondern auch auf MSCs zu finden sind.

Es ist jedoch immer zu bedenken, dass die einzelnen Entwicklungsstadien fließend ineinander übergehen und eigentlich keine klaren Grenzen gesetzt werden können (5).

1.1.6 Phasen der Osteogenese in vitro

Die Entwicklung von Knochenzellen steht in enger Verbindung mit dem Prozess der Osteogenese und lässt sich in drei Phasen unterteilen: 1) Proliferation der osteogenen Zellen, 2) Bildung und Reifung der ECM und 3) Mineralisierung der ECM. Die Proliferationsphase ist durch maximale Kollagen I und Fibronectin Expression und Aktivierung der Proto-Onkogene wie c-fos, c-myc und c-jun gekennzeichnet. Die zunehmende Bildung der Kollagen I-Fibronectin-Matrix führt gleichzeitig zur Suppression der Zellproliferation und aktiviert Gene, die wichtig für die Reifung der ECM sind. In der Phase der Matrix-Reifung erreicht die Aktivität der ALPL ihren Höhepunkt und sinkt mit zunehmender Matrix-Mineralisierung wieder ab. Die nachfolgend eintretende Matrix-Mineralisierung verringert wiederum die Expression der Proteine, die für die Matrix-Reifung zuständig sind und fördert die Bildung von Osteocalcin, das in dieser Phase seine Höchstwerte erreicht. Bei der Bone Sialoprotein und Osteopontin Expression können meistens zwei Maxima detektiert werden, eines in der Proliferationsphase und ein weiteres zu Beginn der Matrix-Mineralisierung. In der mineralisierten Knochenmatrix werden schließlich Apoptose und weitere Knochenumbauprozesse beobachtet (16).

Wichtige Marker der Osteogenese

Osteozyten, Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen exprimieren eine große Anzahl an Matrixproteinen, Zytokinen und Rezeptoren, die zwar nicht alle als knochenspezifisch gelten, jedoch in ihrer Gesamtheit gute Marker osteogener Entwicklung darstellen. Die von den osteogenen Zellen synthetisierten Matrix-Proteine, können in zwei große Gruppen geteilt werden – in Kollagene und nichtkollagenöse Proteine (Glycoproteine, Proteoglycane und Gla-Proteine).

Kollagen Typ I stellt den Hauptbestandteil des organischen Anteils der Knochenmatrix dar und ist neben dem Knochen auch in anderen Geweben wie Sehnen, Bändern und der Haut reichlich zu finden. Kollagen I gehört, wie auch Kollagen II, III, und XI, zu den fibrillären Kollagenen. Jedes Kollagen I Molekül besteht aus zwei $\alpha 1$ und einer $\alpha 2$ Kette (nur eine geringe Menge besteht aus drei $\alpha 1$ Ketten), die miteinander zu einer Triplehelix verwunden sind. Für die

Ausbildung dieser Triplehelix sind die Wiederholungen der Aminosäuresequenz Gly-X-Y der drei Polypeptidketten verantwortlich. In ungefähr einem Drittel der Fälle ist X ein Prolin und Y ein Hydroxyprolin; die Gegenwart des Hydroxyprolins ist essentiell für die Stabilisierung der Triplehelix, stellt ein Charakteristikum der Kollagenmoleküle dar und ermöglicht die Quantifizierung von Kollagen in Geweben. Die Hydroxylierung von Prolin wird durch spezifische Hydroxylasen katalysiert, deren Aktivität im Wesentlichen von dem Vorhandensein von Ascorbinsäure abhängt. Die Triplehelix wird auch Prokollagen genannt und ist ca. 300 nm lang, 1,5 nm dick und trägt endständig Registerpeptide (N- und C-Telo peptide), die eine Polymerisation zu Kollagenfibrillen innerhalb der Zelle verhindern. Der Entstehungsweg eines Prokollagenmoleküls führt vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und von dort verpackt in Transportvesikel an die Zelloberfläche, wo es durch Exocytose aus der Zelle geschleust wird. Extrazellulär erfolgt die sog. Fibrillogenese durch sofortige Abspaltung der Registerpeptide durch spezifische Proteasen (Prokollagen-Aminopeptidasen und -Carboxypeptidasen). Auf diese Weise wird das Prokollagen zum Tropokollagen und auf eine Moleküllänge von ca. 280 nm reduziert. Durch die Abspaltung der Registerpeptide ist es den Tropokollagenmolekülen nun möglich sich parallel zusammen zufügen und zu Primärfilamenten zu aggregieren. In den Spalten zwischen den einzelnen Tropokollagenmolekülen befinden sich Hydroxyapatitkristalle. Ein Primärfilament (Protofibrille) besteht aus 5 Tropokollagenmolekülen, die jeweils um $\frac{1}{4}$ ihrer Länge gegeneinander versetzt zu liegen kommen. Es besitzt einen Durchmesser von 4-5 nm. Wenn sich viele Primärfilamente zusammengefügen und aneinandergereiht haben und bilden sie zusammen eine Mikrofibrille von 20 nm Dicke. Diese kollagenen Mikrofibrillen zeigen eine charakteristische Querstreifung aus hellen und dunklen Banden. Mikrofibrillen lagern sich weiters zu kollagenen Fibrillen zusammen und jene bilden dann kollagene Fasern und Faserbündel.

Die zugfesten Kollagenfibrillen sind zusammen mit den druckfesten Mineralkristallen für die Biegefestigkeit des Knochens verantwortlich. Genetische Mutationen in den pro- α 1 oder pro- α 2 Genen führen zu extremer Fragilität der Knochen mit Biegefrakturen (Osteogenesis imperfecta, Glasknochenkrankheit) oder zu anormalen Überdehnbarkeit der Gelenke (Ehlers-Danlos Syndrom) (19).

Die Kollagen Typ I Synthese wird von verschiedenen Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren beeinflusst. Zu den wichtigsten Molekülen zählen die Transforming Growth Factors Beta (TGF- β s), die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie sind. Drei Isoformen existieren in Säugetierzellen, nämlich TGF- β 1, TGF- β 2, und TGF- β 3. TGF- β s werden von vielen verschiedenen Zelltypen wie Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, Thrombozyten, Fibroblasten, Osteoblasten und Osteoklasten sezerniert, die größten Mengen sind jedoch im Knochengewebe und in Thrombozyten zu finden. Nahezu alle Zellen besitzen auch TGF- β -Rezeptoren – die höchste Dichte findet sich wiederum auf der Zelloberfläche von Osteoblasten. Die Bindung von den TGF- β s an deren Rezeptoren löst eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden aus und beeinflusst auf unterschiedlichste Weise die Prozesse des Knochenabbaus und -aufbaus. In in vitro Experimenten begünstigten sie beispielsweise die Ausbildung der ECM und reduzierten die Aktivität von matrixabbauenden Metalloproteasen (20).

Osteopontin (OP) zählt man zusammen mit Bone Sialoprotein II, Fibronectin und Osteonectin zur Gruppe der Glycoproteine. Glycoproteine werden posttranslational durch das Anhängen von kurzen Oligosaccharidketten modifiziert. Im Gegensatz zu den Proteoglycanen macht bei Glycoproteinen der Saccharidanteil nur 10-25% der gesamten Molekülmasse aus. Osteopontin ist unter einer Reihe von Pseudonymen wie Bone Sialoprotein I (BSP-I), secreted phosphoprotein (SPP) und pp69 bekannt. Osteopontin wird nicht nur von Osteoblasten, hypertrophen Chondrozyten, Odontoblasten und Zementoblasten sondern auch von Thrombozyten, T-Lymphozyten, Neuronen und Zellen der Nierentubuli exprimiert. Obwohl Osteopontin nicht ausschließlich von Osteoblasten synthetisiert wird, gilt es trotzdem als wertvoller osteogener Differenzierungsmarker, vor allem in Verbindung mit anderen Markern (21).

Osteonectin (ON, Secreted Protein Acid Rich in Cystein-SPARC) ist ein 32 kDa großes Glycoprotein, das nicht nur in der Knochenmatrix sondern auch in anderen Geweben wie Lunge, Ovar, Hoden und Bindegewebe vorkommt. Trotz der hohen Konzentrationen im Knochengewebe, ist ON als Osteoblasten-Marker nur in Kombination mit anderen Markern sinnvoll (22).

Decorin, Biglycan und Fibromodulin sind Proteoglycane der Knochenmatrix, deren Kernproteine kovalent mit langen Polysaccharidketten (Glycosaminoglycanen) verknüpft sind. Als Markerproteine spielen sie eher eine untergeordnete Rolle (17).

Osteocalcin (Bone Gla Protein, BGP) gehört zusammen mit dem Matrix-Gla-Protein zur Gruppe der Gla-Proteine. Gla-Proteine enthalten γ -Carboxyglutaminsäure-Gruppen (Gla-Gruppen), die den Proteinen eine sehr hohe Affinität gegenüber Kalzium und Hydroxylapatit verleihen. Osteocalcin gilt als das am meisten knochenspezifische nichtkollagenöse Matrixprotein, da es nur von Zellen der mineralisierten Gewebe wie Osteoblasten, hypertrophen Chondrozyten, Odontoblasten und Zementoblasten synthetisiert wird. Es macht im reifen Knochen bis zu 10% der nichtkollagenösen Proteine aus, im embryonalen Knochen hingegen ist es in viel niedrigeren Konzentrationen zu finden. Aufgrund der spezifischen Expression in Osteoblasten, stellt Osteocalcin einen anerkannten Marker für diese Zellen dar und wird auch im klinischen Alltag als diagnostischer Marker zur Detektion von Knochenumbauprozessen verwendet (23).

Die nicht-gewebespezifische alkalische Phosphatase (ALPL) gilt als einer der wichtigsten Marker der osteogenen Differenzierung. Dieses Ektoenzym ist ein membrangebundenes Glycoprotein, das über einen Phosphatidylinositol(PI)-Phospholipid-Komplex kovalent in der Zellmembran verankert ist und durch eine PI-spezifische Phospholipase C abgespalten und freigesetzt werden kann. An der Zelloberfläche ist die ALPL als Homotetramer gebunden, nimmt aber nach der Abspaltung die Form eines Homodimers an. ALPL wird von verschiedenen Zelltypen exprimiert, weist jedoch besonders hohe Konzentrationen im Knochen, in der Leber und Niere auf, deshalb auch der Name ALPL (alkaline phosphatase, liver/bone/kidney).

Die ALPL ist essentiell für den Prozess der Matrix-Mineralisierung. Mutationen im ALPL Gen führen zur Produktion einer anormalen Version der ALP und somit zum Funktionsverlust dieses Enzyms. Bei Personen mit ALP-Defizit (Hypophosphatasie) kommt es zu schweren Störungen der Skelett- und Zahnentwicklung bei fehlender Mineralisation. Schwere Formen dieser Erkrankung enden schon im Kindesalter letal. Weiters ist bekannt, dass Membranproteine, die

über einen PI-Komplex an der Zellmembran verankert sind, an der transmembranen Signalübertragung teilnehmen und somit die Migration, Proliferation und Differenzierung osteogener Zellen beeinflussen. Generell wird die ALPL am stärksten von Präosteoblasten und Osteoblasten exprimiert und ein Maximum an ALPL-Aktivität kann in der Phase der Matrix-Reifung gemessen werden (24).

1.1.7 Knochenheilung

Wenn das Knochengewebe einer einwirkenden Belastung nicht standhalten kann, führt dies zum Knochenbruch. Dabei wird Knochenmatrix zerstört und Knochenzellen gehen in diesem Bereich zugrunde. Eine nachfolgende Knochenheilung kann je nach Art der Fraktur bzw. der medizinischen Versorgung auf zwei Wegen erfolgen: als primäre oder als sekundäre Frakturheilung.

Die primäre Knochenheilung (Kontaktheilung) erfolgt nur dann, wenn die Frakturrenden frühzeitig eng adaptiert werden und nicht gegeneinander verschieblich sind. Dies tritt in der Regel nur bei einer chirurgischen Versorgung der Fraktur mittels stabiler Osteosynthese auf. Bei der primären Knochenheilung kommt es zu keiner im Röntgen sichtbaren „Kallus“-Bildung (lat. callum = Schwieler).

Die sekundäre Knochenheilung tritt bei bestehendem Bruchspalt und nicht absoluter Ruhigstellung der Frakturrenden sowie nach Trümmerfrakturen auf. Dabei kommt es zur deutlich sichtbaren „Kallus“-Bildung, die über den Umweg einer Narbe aus Binde- und Knorpelgewebe (fibrocartilaginärer Kallus) innerhalb von Wochen zur tragfähigen knöchernen Narbe (knöcherner Kallus) führt (25).

Die erste Phase der Wundheilung ist die exsudative Phase, an der verschiedene Proteine beteiligt sind und noch keine Zellen. Dabei blutet es aus dem Knochenmark und den geschädigten Gefäßen in den Defekt ein, der durch die mechanische Verletzung des Knochengewebes entstanden ist. Nachfolgend entsteht ein Blutkoagulum, das mit den Wundrändern verklebt und bereits in den ersten Stunden die Wunde durch Gerinnungs- und andere Proteine (z.B. Fibronectin) mechanisch stabilisiert. Das Blutkoagulum enthält zusätzlich eine Vielzahl an Antikörpern und humoralen Abwehrstoffen gegen bakterielle Infektionen.

Die unspezifische zelluläre Phase der Wundheilung ist durch die Degranulation der Thrombozyten des Koagulums gekennzeichnet. Die dabei freigesetzten Signalstoffe, wie Wachstumsfaktoren und Zytokine, wirken auf die Zellen des Gewebes im Wundrand und auf Blutzellen ein. Wachstumsfaktoren wie beispielsweise TGF- β , IGF und PDGF bewirken unter anderem durch Chemotaxis das Einwandern von Entzündungszellen. In der Folge kommt es histopathologisch zur Entzündungsreaktion, wo sich Granulozyten und Makrophagen im Wundgebiet ansammeln und sich mit der Bakterienbekämpfung bzw. dem Abräumen von abgestorbenen Knochenzellen und zerstörter Knochenmatrix befassen. Weiters kommt es zur Einsprossung von Blutkapillaren und es bilden sich neue Gefäße (Angiogenese). Auch Fibroblasten wandern ein, proliferieren, beginnen mit der Produktion von Kollagenfibrillen und dem Aufbau eines Kollagenfasengerüsts. Einige Fibroblasten wandeln sich auch zu Myofibroblasten um, die durch aktive Kontraktion die Wunde weiter verkleinern können (Wundkontraktion). Histologisch wird dieses zellreiche und dicht kapillarisierte Gewebe auch Granulationsgewebe genannt. Bis hierher ist die Wundheilung des Knochens weitgehend unspezifisch und gleicht anderen Wunden.

Die knochenspezifische zelluläre Phase der Wundheilung beginnt mit dem Einwandern von mesenchymalen Stammzellen, die sich zu Osteoprogenitorzellen differenzieren und bei ausreichend hohen Konzentrationen von Bone Morphogenic Protein (BMP) in ihrer Umgebung diese Differenzierung auch beibehalten. BMP wird von den Zellen selbst in das Interstitium sezerniert und fördert die knochenspezifische Differenzierung weiterer mesenchymaler Stammzellen (osteogenes Stroma). Auch das Endost und Periost beginnen mit intensiver Proliferation von Vorläuferzellen. In der Reparaturzone entwickeln sich auch einige Chondroblasten aus Vorläuferzellen, die zusammen mit den Fibroblasten zur Bildung einer Narbe aus straffem Bindegewebe und Knorpelgewebe (fibrocartilaginärer Kallus) beitragen. Somit sind die Frakturrenden vorerst provisorisch verbunden. In weiterer Folge wird das Knorpelgewebe durch Geflechtknochen (enchondrale Ossifikation) ersetzt. Eine Zwischenbildung von Knorpel tritt am Kieferknochen nicht auf, da hier hauptsächlich die desmale Ossifikation stattfindet. Aus den Osteoprogenitorzellen entstehen nach etwa 10 Tagen Osteoblasten, die mit der Bildung von Osteoid beginnen. Die Matrixbildung beginnt nur dort, wo sich Osteoblasten an eine feste Unterlage heften können. Die

Osteoblasten lagern sich, vermittelt durch Integrine, an noch vorhandene Knochenbälkchen und an das Kollagenfasengerüst. Wenn diese Verankerung stabil ist und die Zellen mechanische Ruhe vorfinden, beginnen sie mit der Expression von knochenspezifischen Matrixproteinen. Wird den Zellen eine über ein bestimmtes Maß hinausgehende Unruhe signalisiert, differenzieren die Zellen zu Fibroblasten und nicht zu Osteoblasten. Somit steht die Knochenheilung immer in Konkurrenz zur Weichteilheilung. Wenn die spezifische Phase der Wundheilung ungestört abläuft, mineralisiert die Matrix und es bildet sich Geflechtknochen, der im Zuge des natürlichen Umbaus in weiterer Folge durch Lamellenknochen ersetzt wird (26).

1.1.8 Knochenregeneration

Regeneration bedeutet die Wiederherstellung der normalen Histoarchitektur eines Gewebes nach einem Defekt. Dabei werden nicht nur die zellulären Bestandteile sondern auch die Knochenmatrix vollständig regeneriert. Es ist dem Knochengewebe jedoch nicht möglich, Defekte, die größer als 1 mm sind, auf einmal zu überbrücken (osteogenetische Sprungweite). Die knöcherne Regeneration eines Defekts kann durch das Einbringen eines geeigneten Materials (Defektfüllung) unterstützt werden. Diese Knochenregenerationsmaterialien können für verschiedenste Defekte wie beispielsweise Frakturen, Nekrosen, Zysten und bei reduziertem Knochenangebot mit nachfolgender Implantatinsertion verwendet werden. Sie dürfen die physiologische Knochenheilung nicht behindern und sollten idealerweise sowohl osteokonduktive als auch osteostimulative und osteoinduktive Eigenschaften besitzen. Unter Osteokonduktion versteht man die Fähigkeit eines Materials, aufgrund seiner Struktur das Einwachsen von Knochengewebe zu fördern (Leitschieneeffekt). Osteostimulation bedeutet, dass die Knochenneubildung und die Qualität und Quantität des neugebildeten Knochens nach Einbringen des Knochenregenerationsmaterials verbessert bzw. vergrößert werden. Die osteoinduktiven Fähigkeiten eines Knochenregenerationsmaterials bewirken, die Differenzierung nicht determinierter, pluripotenter Stammzellen zu knochenbildenden Zellen durch verschiedene Wachstumsfaktoren.

Zur Defektfüllung können autogene, allogene oder xenogene Transplantate sowie Ersatzmaterialien aus natürlich vorkommenden Calciumverbindungen und synthetische Calciumphosphatkeramiken verwendet werden.

Unter einem autogenen (autologen) Transplantat versteht man die Verpflanzung von körpereigenem Gewebe an einen anderen Ort in ein- und demselben Individuum. Knochengewebe besitzt ein gutes Heilungspotential, das auch dann noch vorhanden ist, wenn der Knochen von der Blutversorgung für kurze Zeit abgetrennt wird. Aus diesem Grund kann Knochen frei transplantiert werden. Da bei autogenen Knochentransplantaten zur Knochenneubildung befähigte Zellen übertragen werden, besitzen diese Transplantate osteogenetische Eigenschaften und dienen außerdem als Leitstruktur für neuen einwachsenden Knochen. Aufgrund dessen wirken sie osteokonduktiv, osteostimulativ und osteoinduktiv.

Knochengewebe kann sowohl aus dem unmittelbaren Operationsgebiet als auch von weiter entfernten Regionen gewonnen werden – dies ist jedoch mit der Notwendigkeit eines zusätzlichen chirurgischen Eingriffs verbunden. Autologer Knochen bietet gegenüber allogenen oder xenogenen Transplantaten, den Vorteil, dass immunologische Reaktionen ausbleiben. Desweiteren besteht auch keine Gefahr der Übertragung von Infektionskrankheiten. Nachteile der autologen Transplantate sind die zuweilen unkontrollierbare und schwer vorhersagbare Resorption, sowie eine mögliche Erkrankung am Spenderort, wie beispielsweise Wundschmerz, Wundheilungsstörungen, Hämatombildung und Infektionen. Weiter entfernte Entnahmestellen haben außerdem zusätzliche Risiken, die mit einer notwendigen Hospitalisierung und der Narkose verbunden sind (27).

Der Gehalt an vitalen Zellen und bedeutenden Wachstumsfaktoren und seine osteokonduktiven Fähigkeiten machen das autologe Knochentransplantat jedoch zum universellen Knochenaufbaumaterial das zurzeit als therapeutischer Standard und als Referenz für andere Verfahren gilt (28,29).

1.2 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Rekonstruktion von Knochendefekten stellt eine große Herausforderung an verschiedenste Bereiche der regenerativen Medizin dar, wie beispielsweise der Orthopädie, Unfallchirurgie oder Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. In der zahnärztlichen Chirurgie der vergangenen Jahrzehnte wurden viele operative Verfahren zur Knochenregeneration entwickelt, nun ist es ein wichtiges Ziel der aktuellen Forschung, den operativen Aufwand für den Patienten durch neue Methoden zu minimieren. Die operative Medizin in der Zahnheilkunde entwickelte sich von der resektiven Chirurgie in eine reparative und rekonstruktive Chirurgie. Der Entwicklungsschritt zur rekonstruktiven Chirurgie wurde durch die Verwendung von autogenen Gewebetransplantaten ermöglicht (26). Die Hauptindikationen für autogene Knochentransplantate in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie sind vertikale und horizontale Kieferkammaugmentation bei Alveolarkammatrophien (30) und Reparatur von Knochendefekten nach Traumata, Infektionen (31), Entfernung von Zysten oder Tumoren (32-34).

Für die Deckung intraoraler Knochendefekte steht eine Vielzahl unterschiedlicher Spenderorte zur Verfügung. Große Knochendefekte benötigen in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie zur Rekonstruktion Knochentransplantate von extraoralen Spenderorten wie der Calvaria, proximalen Tibia oder dem Beckenkamm (35). Kleinere Defekte können mit Transplantaten aus intraoralen Entnahmestellen gedeckt werden, wie beispielsweise der Protuberantia mentalis, des Tuberculi maxillae, der Linea obliqua oder dem jeweiligen Operationsgebiet selbst (36,37). Die verschiedenen Herkunftsorte unterscheiden sich in ihrer Invasivität und Patientenbelastung und hinsichtlich ihrer biologischen Effektivität. Spongiosatransplantate enthalten viele vitale osteogene Zellen und sind deshalb, wenn sie schonend weiterbehandelt wurden, zur Behandlung von kritischen Defekten geeignet. Kompaktblöcke hingegen besitzen nur einen geringen Gehalt an Zellen und erfordern deswegen ein erstklassiges Transplantatlager mit noch vorhandenen Knochenzellen. Kompaktatransplantate haben jedoch gegenüber Spongiosatransplantaten den Vorteil, dass sie der unkontrollierten Resorption der Einheilphase besser widerstehen (26,38).

Unterschiedliche Techniken zur Knochenentnahme und verschiedenste Instrumente sind in letzter Zeit entwickelt worden und scheinen die Vitalität des transplantierten Knochengewebes signifikant zu beeinflussen. Zur Versorgung kleinster Knochendefekte und als Füllmaterial dienen häufig Frässpäne. Sie können mittels Knochenschabern, beispielsweise bei der operativen Entfernung von retinierten Weisheitszähnen, die bei Implantatpatienten ohnehin häufig angezeigt ist, gewonnen werden.

Die neuesten Errungenschaften in der rekonstruktiven Chirurgie sind jedoch Piezotome. Piezotome können bei zahlreichen Eingriffen eingesetzt werden, wie beispielsweise bei Osteotomien, Sinus-Lift Operationen und Weisheitszahnentfernungen. Ihr Haupteinsatzgebiet ist jedoch die Gewinnung von autologen Knochentransplantaten in der Implantologie (39,40). Die piezochirurgischen Instrumente sollen einen höheren Patientenkomfort während der Knochenentnahme gewährleisten und für eine geringere postoperative Morbidität bzw. Komplikationen an der Entnahmestelle bei gleich hoher Zellvitalität des transplantierten Knochens gegenüber herkömmlichen Entnahmetechniken sorgen. Der große Vorteil dieser Geräte soll auf der Verwendung von niedrigfrequenten Ultraschallintensitäten im Bereich von 25-30 kHz beruhen. Mit diesen Frequenzen könne man nur mineralisiertes Gewebe schneiden, nicht jedoch Weichteilgewebe – für jenes würde man nämlich höhere Frequenzen benötigen (41,42). Deshalb wird berichtet, dass Piezotome schonender zum angrenzenden Gewebe als konventionelle Verfahren sein sollen. Weiters wird gezeigt, dass piezoelektrische Geräte einen geringen Druck für einen hochpräzisen Schnitt benötigen. Bei konventionellen Instrumenten hingegen, müsse der Chirurg viel mehr Druck anwenden und mehr Anstrengung aufwenden um die gleichen Effekt zu erzielen. Zu viel Druck könnte zur Überhitzung des Gewebes und zu Nekrosen und schlechten Heilungsergebnissen führen. Darüber hinaus sollen piezoelektrische Instrumente schonender zum transplantierten Gewebe sein und somit eine bessere Qualität des transplantierten Knochens und eine höhere Zellvitalität im Vergleich zu anderen Verfahren gewährleisten (43-45). Da der Erfolg einer Knochentransplantation, neben anderen Faktoren wie beispielsweise dem Transplantatlager, ganz wesentlich von der Qualität des transplantierten Knochens und der Anzahl an vitalen Zellen im Transplantat mitbestimmt wird, scheint es bedeutsam zu sein, die geeignete Entnahmetechnik

zu kennen (46). Viele Studien zeigen, dass die Entnahmetechnik signifikant sowohl die Qualität des Knochens als auch die Zellvitalität beeinflusst (47,48). Aufgrund dessen, war das Ziel dieser Studie zwei Techniken zur Gewinnung autologen Knochens hinsichtlich ihrer klinischen Anwendbarkeit zu vergleichen. Dabei handelte es sich um den Vergleich zwischen einem konventionellen mechanischen Knochenschaber und einem piezoelektrischen Knochenschaber (Piezotom).

Folgende Fragestellungen standen im Vordergrund:

- Sind beide Methoden gleich effektiv in der Gewinnung von ausreichenden Mengen an Knochenmaterial?
- Unterscheiden sich die Knochentransplantate hinsichtlich ihrer Qualität bzw. der Anzahl an vitalen Zellen?
- Gibt es Unterschiede in der Ultrastruktur der gewonnenen Knochentransplantate bzw. der daraus auswachsenden Zellen?
- Lassen sich die aus den Knochenspänen auswachsenden Zellen weiter kultivieren, passagieren, in Stickstoff einfrieren und wieder auftauen?
- Unterscheiden sich die Zellen in Bezug auf ihr osteogenes Potential bzw. ihre osteogenen Markerproteine?
- In welchem Differenzierungsstadium befinden sich die Zellen?
- Welches Differenzierungspotential besitzen die auswachsenden Zellen bzw. ist es möglich die Zellen in andere Zelllinien zu differenzieren?

2. Material und Methoden

2.1 Zellkulturmethoden

Unter Zellkultur versteht man das Züchten von tierischen oder pflanzlichen Zellen in einem Nährmedium außerhalb des Organismus. Man unterscheidet dabei zwischen einer Primärzelllinie, die eine Kultur passagierter Zellen einer Primärkultur darstellt und einer etablierter (fortlaufender) Zelllinie, die durch Transformation entstanden ist. Primärzelllinien bewahren viele Eigenschaften von den Zellen, von denen sie abstammen und besitzen eine normale Chromosomenzahl. Etablierte Zelllinien hingegen weichen von den Zellen ab, von denen sie abstammen und weisen eine anormale Chromosomenzahl auf, da sie durch Behandlung mit Tumorigenen (Polyoma Virus, Rous Sarcoma Virus) oder kanzerogenen Chemikalien (z.B. 3,4-Benzpyren, N-Nitrosomethylharnstoff) transformiert worden sind. Sie zeigen meist kürzere Verdoppelungszeiten von nur 12-20 h und eine sehr viel größere Dichte als Primärzelllinien. Weiters unterscheidet man zwischen Monolayerkulturen, die aus adhärent wachsenden Zellen bestehen und Suspensionskulturen, in welchen die Zellen frei im Kulturmedium schwimmend wachsen.

Für das Arbeiten mit Zelllinien ist eine absolut sterile Arbeitsweise zum Schutz des Experimentators bzw. seiner Umgebung und zum Schutz der Kulturen angezeigt. Alle Arbeitsschritte werden dabei in einem Zellkulturlabor unter einer sterilen Werkbank (laminar flow) verrichtet. Durch sorgfältiges Reinigen der Arbeitsflächen und aller Gebrauchsgegenstände mit 70% Ethanol wird einer eventuellen mikrobiologischen Kontamination vorgebeugt.

2.1.1 Vorbehandlung von Kulturgefäßen

Zur Verbesserung und zur Veränderung von Oberflächeneigenschaften von Kulturgefäßen aus Glas oder Plastik werden unterschiedlichste Verfahren angewandt. So kann man durch Vorbeschichtung von Kulturgefäßen erreichen,

dass Zellen besser an der Oberfläche haften und das adhärenente Wachstum bzw. Differenzierungsvorgänge fördern. Zur Beschichtung von Kulturgefäßen können sowohl natürlich als auch künstlich hergestellte Substanzen, wie beispielsweise Polylysin, Fibronectin, Kollagen oder Gelatine, verwendet werden. Das Beschichten mit Gelatine stellt eine preiswerte Alternative zur Kollagenbeschichtung dar und wurde auch bei diesen Versuchen verwendet.

Protokoll der Gelatinebeschichtung:

Herstellung einer gebrauchsfertigen Gelatinelösung:

- Erwärmen der 2% Gelatine im Wasserbad bei 37°C bis zur Verflüssigung
- Zusetzen von 1% Penicillin/Streptomycin
- 1:1 Verdünnung mit Hank's buffered salt solution
- Sterilfiltration, Portionierung und Lagerung bei 4°C

Die gebrauchsfertige Lösung kann bei 4°C ca. 3-4 Wochen gelagert werden. Bei längerer Lagerung sollte Penicillin/Streptomycin neu hinzugesetzt werden. Vor Gebrauch muss die Gelatinelösung nicht mehr erwärmt werden.

Beschichtung der Kulturgefäße

- Kulturgefäße mit Gelatinelösung mehr als bodenbedeckt auffüllen
- 1h bei 37°C in den Inkubator stellen
- Überschüssige Gelatinelösung absaugen
- 1h bei 37°C im Inkubator trocknen
- Zellsuspension in die Kulturgefäße einfüllen

2.1.2 Mediumwechsel bei Monolayerkulturen

Monolayerkulturen benötigen zu ihrem Wachstum und zur Vitalitätserhaltung regelmäßigen Mediumwechsel, da die Bestandteile des Mediums entweder von den Zellen metabolisiert werden oder bei 37°C im Laufe der Zeit zerfallen. Die Häufigkeit des Mediumwechsels variiert von Zelllinie zu Zelllinie und ist abhängig von dem Metabolismus und der Wachstumsgeschwindigkeit.

Bei schlecht oder sehr langsam wachsenden Kulturen wird empfohlen nur die Hälfte des Mediums abzuziehen und durch frisches zu ersetzen, da auch langsam wachsende Zellen Nährstoffe verbrauchen und zwar ohne sichtbaren pH-Umschlag. Bei schneller wachsenden Kulturen sollte jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen werden. Weiters empfiehlt es sich vor jedem Mediumwechsel die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop zu beobachten, um einen routinemäßigen Überblick über den jeweiligen Zustand der Vitalität und der Morphologie zu bekommen und so eventuelle Veränderungen sofort bemerken zu können. Der pH-Wert des Mediums kann am Farbumschlag des Phenolrotindikators abgeschätzt werden. Eine Farbveränderung von rot zu gelb resultiert aus der Metabolisierung von Glucose zu Lactat und weist darauf hin dass Nährstoffe bereits verstoffwechselt wurden und ein Mediumwechsel angezeigt wäre.

Protokoll zum Mediumwechsel bei Monolayerkulturen:

- Kulturmedium vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette von einer Ecke des Kulturgefäßes absaugen, ohne den Monolayer durch Berührung zu schädigen
- Zellen mit 3 ml (25 cm² Kulturflasche) oder 10 ml (75 cm² Kulturflasche) mit auf 37°C erwärmten PBS spülen
- Frisches auf 37°C erwärmtes Kulturmedium hinzufügen (5 ml bei 25 cm², 15 ml bei 75 cm²)

2.1.3 Subkultivierung von Monolayerkulturen

Ist die gesamte Oberfläche des Kulturgefäßes mit Zellen bedeckt, bezeichnet man dies als Konfluenz. Da sich die Zellen bei Erreichen der Konfluenz in engem Kontakt befinden und keinerlei freie Oberfläche mehr vorzufinden ist, hören die meisten Primärzellen auf, sich zu vermehren (Kontaktinhibition). Im Regelfall wartet man bei streng adhärennten Zelllinien keine vollständige Konfluenz ab, sondern subkultiviert schon bei 80%-90% Konfluenz, da es bei zu hoher Zelldichte zum Absterben der Kultur kommen kann. Beim Vorgang des Subkultivierens bzw.

Passagierens werden die Zellen unter Verdünnung vom alten Kulturgefäß in ein neues überführt.

Es gibt eine Reihe von Methoden, die geeignet sind, Monolayerkulturen in Suspension zu bringen, unter anderem das „Shake off“-Verfahren, das Passagieren mit proteolytischen Enzymen wie Trypsin, Collagenase oder Dispase oder das Abschaben von Kulturen. Die am weitesten verbreitete Methode, adhärente Zelllinien zu subkultivieren, ist der Gebrauch von Enzympräparaten. Bei dieser Arbeit entschied man sich für Verwendung von Accutase, da dieses Verfahren als besonders schonend gelten soll.

Protokoll zur Subkultivierung von Monolayerkulturen:

- Zellen mit PBS (3 ml bei 25 cm² oder 10 ml bei 75 cm² Kulturflasche) waschen, PBS anschließend absaugen
- Auf 37°C erwärmte Accutase zusetzen (2 ml bei 25 cm² oder 6 ml bei 75 cm² Kulturflasche)
- Kulturflasche für 5 min bei 37°C inkubieren
- Anschließend mit einer sterilen Pasteurpipette die Zellen resuspendieren und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit 10 ml vorgelegten Medium pipettieren
- Zellen 5 min bei 1200rpm (300g) zentrifugieren
- Überstand absaugen und das Zellpellet mit einer sterilen Pasteurpipette in frischem Kulturmedium resuspendieren
- Je nach gewünschter Verdünnung (s. Bestimmung der Zellzahl) Zellsuspension auf neue Kulturflaschen aufteilen und frisches, auf 37°C erwärmtes Kulturmedium zufügen (0,2-0,5 ml pro cm² Wachstumsfläche)

Nach dem Einsäen der Zellen und Auffüllen mit frischem Medium sollen die Zellen sofort zurück in den Brutschrank. Innerhalb der nächsten 24 h sollten sie nicht aus dem Brutschrank herausgenommen werden, um den initialen Anheftungsprozess nicht zu stören. Auch sollte in den darauffolgenden 48 h kein Mediumwechsel erfolgen.

2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Wachstumsgeschwindigkeit der meisten adhären wachsenden Zellen wird von der anfänglich zugesetzten Zellzahl (Inokulum) bestimmt. Zu dünn ausgesäte Zellen wachsen nämlich nur sehr langsam, zu dicht ausgesäte Zellen hingegen müssen zu häufig subkultiviert werden und jede Subkultivierung verkürzt die Gesamtlebensdauer jeder Primärzelllinie. Daher sollte eine Zellzahlbestimmung routinemäßig vor jedem Inokulum vorgenommen werden, beispielsweise mit einem Häemocytometer (Neubauer-Zählkammer) oder mit elektronischen Zählgeräten. Hier wurde ein elektronischer Zellzähler (CASY[®]), der nach dem Widerstandsmessprinzip kombiniert mit einem modernen Verfahren der Signalausarbeitung (Pulsflächenanalyse) arbeitet, eingesetzt. Damit kann man nicht nur die Zellzahl, sondern auch die Größenverteilung der Zellen bestimmt werden. Die für jeden Zelltyp charakteristische Größenverteilung bietet wichtige Zusatzinformationen wie die Quantifizierung von Verunreinigungen, Zelltrümmern, toten Zellen, vitalen Zellen und Zellaggregaten. Die Lebend-Tot-Differenzierung beruht auf der kleineren Darstellung von toten bzw. geschädigten Zellen mit defekter Zellmembran, da diese nur mit der Größe ihres Zellkerns dargestellt werden. Bei der Zellzählung werden die Zellen in isotoner Elektrolytlösung suspendiert und durch eine Messkapillare, an der über zwei Platinelektroden eine elektrische Spannung angelegt ist, gesaugt. Jedes Mal wenn eine Zelle in die Messkapillare gelangt, wird ein elektrischer Puls (Widerstandsänderung) ausgelöst und so entspricht die Anzahl der Pulse der Zellzahl in der Probe (49).

Protokoll zur Zellzahlbestimmung:

- Probenbecher mit 10 ml Casyton füllen, 100 µl Zellsuspension zugeben und geschlossenen Probenbecher 3x schwenken (Vorverdünnung 1:100)
- Probenbecher unter die Messkapillare stellen, über „Start“ die Messung aktivieren
- Auf dem Display wird eine für die jeweilige Zellart typische Größenverteilung angezeigt – für Osteoblasten zeigt sie ganz links Zelldebris, im Bereich von ca. 6-10 µm tote Zellen (Zellkerne) und ab ca. 10 µm vitale Zellen

2.1.5 Kryokonservierung von Zellen

Wenn man eine Zelllinie nicht permanent verwendet, sie aber zu einem späteren Zeitpunkt noch benötigt, kann man Zellen über längere Zeit in flüssigem Stickstoff bei -196°C konservieren und sie so vor Kontamination oder Variabilität durch Subkultivierung zu schützen. Bei Temperaturen unterhalb von -120°C finden nämlich keinerlei biochemische Reaktionen mehr statt. Für kurze Zeit kann man Zellen auch bei -80°C lagern. Zum Einfrieren von Zellen dienen Substanzen wie Glycerin, Serum und Dimethylsulfoxid (DMSO), die die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle und die Dehydratation des Zytoplasmas verhindern, indem sie das Zellwasser ersetzen und binden. Die Kryokonservierung von Zellen in flüssigem Stickstoff kann über Jahre ohne Verlust der Lebensfähigkeit erfolgen. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Zellen in der Flüssigphase (-196°C) oder in der Gasphase über dem flüssigem Stickstoff (-150°C bis -160°C) gelagert werden. Wichtig sind eine kontrollierte und langsame Einfrierrate (-1°C pro Minute) der Zellen, sowie eine richtige Konzentration des Kryoschutzmittels (7-10 Vol.-% DMSO bzw. Glycerin im Medium). Weiters sollte eine Vorinkubationszeit im Kühlschrank von ca. 15 min bei DMSO und 45-60 min bei Glycerin beachtet werden, da in dieser Zeit das Kryoschutzmittel in die Zellen diffundieren und das Zellwasser binden bzw. verdrängen soll. Diese Zeiten sollten aber genau eingehalten und nicht überschritten werden, da Kryoschutzmittel für Zellen hoch toxisch wirken.

Protokoll zur Kryokonservierung von Zellen:

Herstellung eines 10%igen Einfriermediums (20ml):

- 18 ml FCS Gold vorlegen, 2 ml DMSO dazu pipettieren
- jeweils 10 ml steril filtrieren

Einfriervorgang:

- Einfriermedium, Kulturmedium (je nach verwendeter Zelllinie) und Einfriereröhrchen (cryogenic vial) auf Eis stellen

- Gewinnung eines Zellpellets:
 - Kulturmedium mit einer sterilen Pasteurpipette absaugen, Zellen mit PBS spülen, auf 37°C erwärmte Accutase zusetzen und für 5 min inkubieren
 - Anschließend die Zellen mit einer sterilen Pasteurpipette resuspendieren und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit 10 ml vorgelegten Kulturmedium pipettieren.
- Pellet in 1,5 ml Einfriermedium resuspendieren und Zellsuspension in ein Einfrier Röhrchen überführen, dabei auf Eis arbeiten
- Nach Lagerung der Einfrier Röhrchen für 2 Tagen bei -80°C, Überführen der Röhrchen in flüssigen Stickstoff

2.1.6 Auftauen von Zellen

Aufgrund der Toxizität der Kryoschutzmittel, sollten Zellen so rasch wie möglich aufgetaut werden. Bei den meisten Zelllinien ist es durchaus möglich, die aufgetaute Zellsuspension mit dem Einfriermedium direkt in das Kulturmedium zu geben und erst danach die Zellen zu zentrifugieren.

Protokoll zum Auftauen von Zellen:

- 1-2 Tage vor dem Auftauen der Zellen das benötigte Kulturmedium herrichten
- Für die Sterilkontrolle 2ml entnehmen und in eine Petrischale pipettieren
- Petrischale über Nacht im Brutschrank inkubieren und am nächsten Tag unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrollieren
- Erst wenn die Sterilkontrolle negativ ist, sollte das Kulturmedium für die Kultur von Zellen verwendet werden
- Schutzhandschuhe anziehen und Schutzbrille bzw. Gesichtsschirm anlegen und den N₂-Behälter vorsichtig öffnen, die Aufbewahrungsbehälter aus dem flüssigen Stickstoff nehmen und mit den Handschuhen die Kryoröhrchen herausnehmen

- Das Kryoröhrchen nur solange ins Wasserbad tauchen, bis gerade das letzte kleine Eisklumpchen verschwunden ist
- Danach sofort unter die Sterilwerkbank gehen, das Kryoröhrchen mit 70%igem Ethanol desinfizieren und die Zellen mit einer Pasteurpipette in ein mit 10 ml erwärmtes Kulturmedium vorbereitetes 50 ml Falconröhrchen überführen
- 5 min bei 1200 rpm (300g) zentrifugieren, Überstand absaugen, das Pellet mit erwärmtem Kulturmedium resuspendieren und in eine Kulturflasche überführen
- Mediumwechsel sollte nach 24 h durchführen werden

2.2. Gewinnung autologen Knochenmaterials

Die Studie wurde als prospektive kontrollierte experimentelle Studie durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität genehmigt (Referenznummer: 20-138 ex 08/09) und entsprach den Richtlinien der Helsinki-Deklaration. Die Eingriffe erfolgten nach Information, ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der PatientInnen. Die Studienpopulation setzte sich aus sowohl männlichen als auch weiblichen PatientInnen zwischen 18 und 65 Jahren zusammen, die eine Unterkiefer-Weisheitszahnentfernung benötigten, einen unauffälligen Gesundheitszustand zeigten und keine systemischen Erkrankungen hatten. PatientInnen, die RaucherInnen oder Patientinnen, die schwanger waren, wurden aus der Studie exkludiert.

Die operativen Eingriffe wurden an der Abteilung für Zahnärztliche Chirurgie und Röntgenologie der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde in lokaler Anästhesie (Ultracain dental forte[®], Sanofi-aventis, Vienna, Austria) durchgeführt. Bei 20 PatientInnen wurden im Zuge der Unterkiefer-Weisheitszahnentfernung sowohl das Piezotom (PD, Satelec Acteon, Bordeaux, France) als auch der manuelle Knochenschaber (MS, HK Instruments, Salzburg, Austria) verwendet. Beim PD wurde ein eigener Aufsatz (BS 6, Satelec Acteon), der speziell für die Gewinnung von autologen Knochen entwickelt wurde, genau nach Vorschrift des Herstellers (Piezotom Modus 1-3, Irrigation 35-40 ml/min)

verwendet. Nach Präparation eines Weichteillappens und noch vor der Weisheitszahnentfernung, wurden die autologen Knochenproben von der Linea obliqua entnommen. Zuerst wurde der PD und danach der MS an einer angrenzenden Stelle in derselben Spenderregion verwendet. Da man für den MS keine Spülung zur Kühlung des Gewebes benötigte, wurden die Knochenstückchen, sofort in ein steriles 10 ml Falcon-Röhrchen mit 4 ml vorgelegtem Medium transferiert. Der PD musste jedoch mit Spülung verwendet werden, um eine Überhitzung des Gewebes zu vermeiden. Aus diesem Grund benötigte man eine Knochenfalle (Quality Aspirators, Duncanville, TX, USA), ein in den Absaugschlauch integriertes Sieb, mit welchem man die Knochenstücke sammelte. Um eine Kontamination mit Speichelbakterien zu vermeiden, wurde dieser zweite Aufsatz auf dem Absaugschlauch nur während der Knochengewinnung eingesetzt. Gleich nach der Gewinnung von ausreichenden Mengen an Knochenmaterial wurden die Knochenstückchen dann von der Knochenfalle ebenfalls in ein steriles Falcon-Tube überführt. Die Knochenproben wurden dann sofort von dem Operationssaal der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde in das Zellkulturlabor an dem Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie gebracht und wie nachfolgend beschrieben unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet. Die Weisheitszahnentfernung wurde dann fortgesetzt und postoperativ zur Schmerzreduktion 400 mg Dexibuprofen (Seractil forte[®], Gebro Pharma, Fieberbrunn, Austria) verabreicht. Bei Kontrolluntersuchung im weiteren Verlauf zeigte sich keine erhöhte Komplikationsrate im Vergleich zu PatientInnen mit alleinigen Routineeingriffen.

2.2.1 Isolation von Primärzellen

Im Zellkulturlabor erfolgten dann alle weiteren Bearbeitungsschritte zur Kultivierung von Primärzellen.

Protokoll zur Isolation von Primärzellen:

- Bestimmung des Gewichtes der jeweiligen Knochenproben mit einer elektronischen Präzisionswaage (Kern 770, Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Germany)
- 3maliges Waschen der Knochenstückchen mit Hanks' balanced salt solution (HBSS, Gibco, Invitrogen Ltd, Paisley, UK), der 300 IU/ml penicillin, 300 µg/ml Streptomycin und 0.75 µg/ml Amphotericin (alle von Gibco), zur Prävention von Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen, zugesetzt wurden
- Überführen und mittiges Platzieren der Knochenstückchen in 25 cm² Zellkulturflaschen (Nunc, Roskilde, Denmark) mit sterilen Einwegpipetten
- Vorsichtiges Zusetzen von 1 ml sterilem, auf 37°C erwärmten Zellkulturmedium: DMEM/F-12 (Gibco) ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum (PAA, Pasching, Austria), 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0.25 µg/ml Amphotericin (alle von Gibco)
- Inkubation der Explant-Kulturen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank

Mediumwechsel erfolgte im Rhythmus Montag-Mittwoch-Freitag-Montag. Explant-Kulturen die kein Auswachsen von Zellen aus den Knochenstückchen nach 4 Wochen zeigten, wurden verworfen. Erreichten die Zellen Konfluenz, wurden sie mit Accutase (PAA) abgelöst und ihre Vitalität mit dem CASY[®] Model TT (Schärfe System, Reutlingen, Germany) bestimmt. Danach wurden die Zellen entweder subkultiviert, auf Lab-Tek 2 oder 4-well Gelatine beschichtete Glas chamberslides (Nunc) für nachfolgende (immun)zytochemische Bestimmungen ausgesät oder im flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Als Positivkontrolle wurden bei allen Experimenten humane fetale Osteoblasten (Human fetal osteoblastic cells 1.19, hFOB 1.19, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) mitgeführt.

2.3 Rasterelektronenmikroskopie

Mit Hilfe von Elektronenmikroskopen können sehr viel kleinere Objekteinheiten von speziell präparierten Objekten abgebildet werden als mit dem Lichtmikroskop. Elektronen besitzen eine viel kleiner Wellenlänge als sichtbares Licht und da das Auflösungsvermögen eines Mikroskops durch die Wellenlänge begrenzt ist, kann mit einem Elektronenmikroskop eine deutliche höhere Auflösung (ca. 0,1nm) erreicht werden als mit dem Lichtmikroskop (ca. 200nm). Bei Lichtmikroskopen wird die optische Auflösung durch die Lichtwellenlänge (400-700 nm) begrenzt, bei Elektronenmikroskopen hingegen verschlechtern die optischen Aberrationen der elektronenoptischen Bauteile die nutzbare Auflösung um etwa zwei Größenordnungen gegenüber der Elektronenwellenlänge, die bei 100 keV ca. 0,0037 nm beträgt.

Bei dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) durchdringen Strahlelektronen das Objekt und werden zur Bildgebung verwendet, beim Rasterelektronenmikroskopen (REM) hingegen tastet eine feingebündelte Elektronensonde punktförmig die Oberflächen von Präparaten ab. Die maximale sinnvolle Vergrößerung beim REM liegt bei etwa 30 000 fach.

Wichtig für die Rasterelektronenmikroskopie ist, dass die Präparate getrocknet und elektrisch leitend sind, damit es nicht zu elektrischen Aufladungserscheinungen kommt und so die Abbildung des Präparates unmöglich wird. Das Vorgehen zur Herstellung von Präparaten für das REM enthält folgende Schritte: Fixierung, Entwässerung und Trocknung, Erzeugung elektrischer Leitfähigkeit.

Zur Fixierung von Präparaten werden üblicherweise Aldehyde (Glutaraldehyd, Formaldehyd) verwendet. Probleme, die aus der geringen Eindringtiefe der Fixiermittel entstehen, sind für REM-Präparaten von untergeordneter Bedeutung, da eine gute Strukturhaltung der äußeren Zone bzw. der Oberfläche als ausreichend angesehen wird.

Die Entwässerung der Proben wird mittels Alkohol oder Aceton durchgeführt. Den nächsten Schritt stellt das Trocknen der Präparate dar. Beim einfachen Verdunsten der Flüssigkeit würde es jedoch, aufgrund der Kräfteeinwirkung von

der Oberflächenspannung, zu ausgeprägten Deformierungen der Präparatoberfläche kommen. Aus diesem Grund ist eine Trocknung vorteilhaft, bei der die Oberflächenspannungen erst gar nicht auftreten. Dies ist der Fall, wenn Flüssigkeit jenseits ihres „kritischen Punktes“ getrocknet wird, wobei dieser in einem geschlossenen Behälter durch eine definierte Temperatur (kritische Temperatur) und einen dazu gehörigen definierten Druck (kritischer Druck) gegeben ist. Am kritischen Punkt einer Flüssigkeit gibt es keinen physikalischen Unterschied zwischen flüssiger und gasförmiger Phase, da die Moleküle der Gasphase maximal komprimiert sind und die Moleküle der Flüssigphase maximal expandiert sind. Somit besteht keine Oberfläche mehr, die den flüssigen vom gasförmigen Aggregationszustand trennt und auch keine Oberflächenspannung mehr. Bei dieser sog. „Kritisch-Punkt-Trocknung“ wird nun langsam beispielsweise das Aceton durch Kohlendioxid ausgetauscht. Kohlendioxid ist bereits bei Zimmertemperatur unter einem Druck von 55 bar flüssig und sobald die Probe vollständig mit Kohlendioxid durchtränkt ist, kann die Temperatur in der Druckkammer erhöht werden. Man verwendet für diesen Prozess flüssiges Kohlendioxid (kritische Temperatur: 31°C, kritischer Druck 73 bar) und nicht Wasser (kritische Temperatur: 374°C, kritischer Druck 228,5 bar), da Kohlendioxid nicht diese hohen gewebezerstörenden Temperaturen und Drucke benötigt. Befinden sich Druck und Temperatur über den kritischen Werten, kommt es zum direkten Übergang vom flüssigen in den gasförmigen Aggregationszustand, ohne Entstehung von Phasengrenzen und somit ohne Auftreten von Oberflächenspannungen. Anschließend kann das gasförmige CO₂ aus der Druckkammer ablassen werden (50).

Um die störenden elektrischen Ladungen abfließen lassen zu können, werden die Präparate auf einen metallischen Probenhalter montiert, der in den geerdeten Präparattisch gesteckt wird. Um das Präparat selbst elektrisch leitfähig zu machen, bringt man eine dünne leitende Schicht auf die Oberfläche auf, die so dünn sein soll, dass die Feinstruktur nicht verdeckt wird. Eine Methode hierfür, ist die Zerstäubung von Metallionen (z.B. Gold) durch eine Gasentladung, die als „Sputtern“ bezeichnet wird.

Das REM liefert außerordentlich plastische Bilder und ermöglicht dadurch eine genaue dreidimensionale Analyse von Oberflächen. In dieser Arbeit wurde das

REM beispielsweise zur Ultrastrukturanalyse von Knochenspänen und der daraus auswachsenden Zellen verwendet.

Protokoll der REM-Probenpräparation:

- Einbringen von Gelatine-beschichtete Deckgläsern in die Kulturflaschen, Aussäen der Zellen und 24-48 h anwachsen lassen
- Waschen der Zellen und Knochenfragmente in PBS
- Fixierung der Proben mit 2% Paraformaldehyd/2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,4 bei 20°C für 15 min
- Auswaschen des Fixans mit Cacodylatpuffer 2x für 5 min
- 2. Fixierung der Proben mit 2% Osmiumtetroxid in 0,1 M Cacodylatpuffer für 10 min
- Auswaschen des Fixans mit Cacodylatpuffer 2x für 5 min
- Präparate rasch in der Probenkorb übertragen um eine Antrocknung der Präparate zu vermeiden
- Entwässerung in 30%, 50%, 70%, 80% 90%, 96%, 2x 100% Ethanol, jeweils 10 min
- Entwässerung für 5 min in 100% Aceton
- Kritisch-Punkt-Trocknung im Critical Point Dryer CPD 030 (Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein)
- Montage der Präparate mit einem Doppelklebeband auf leitende Probeträger (bei der Montage muss berücksichtigt werden, dass die interessierenden Strukturen vom abtastenden Primärstrahl erreicht werden können, d.h. nach oben gekehrt sein sollten)
- Gold-Besputterung im Sputter Coater SCD 500 (Bal-Tec)
- Aufbringen von Leitsilber (Silver Print, Bal-Tec) zwischen Präparatrand und Probeträger
- Analyse der Proben unter dem Digital Scanning Microscope DSM950 (Zeiss, Oberkochen, Germany)

2.4 Immunzytochemie

Als Immunzytochemie (ICC) wird jene Färbemethode bezeichnet, mit der Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Mit dieser Methode kann nicht nur der Nachweis eines Proteins in der Zelle erbracht werden, sondern dieses auch genau lokalisiert werden. Beispielsweise können Transkriptionsfaktoren, die sich nur im Zellkern befinden, detektiert oder auch membranständige Proteine nur in der Zellmembran angefärbt werden. Die Zellen können dafür mittels Zentrifugation auf einen Objektträger aufgebracht werden (Cytospin) oder schon auf Objektträger (Chamberslides) aufgewachsen sein.

Antikörper (Immunglobuline) bestehen aus zwei identisch schweren Ketten, die in 5 Klassen (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) unterteilt sind, und aus zwei identisch leichten Ketten vom Typ κ und λ . Die Ketten sind durch kovalente Disulfidbrücken zu einer Ypsilon-förmigen Struktur miteinander verbunden. Die leichten Ketten besitzen jeweils eine variable und eine konstante Domäne, die schweren Ketten hingegen haben jeweils eine variable und 3 (IgG, IgA) bzw. 4 (IgM, IgE) konstante Domänen. Die beiden Leichtketten bilden zusammen mit dem oberhalb der Gelenkregion (hinge region) liegenden Anteil der schweren Ketten das Antigenbindende Fab-Fragment. Das Fab-Fragment beinhaltet die Antigenbindungsstelle, die aus den variablen Domänen einer leichten und einer schweren Kette gebildet wird. Das kristalline Fc-Fragment wird von den konstanten Domänen der schweren Ketten gebildet und besitzt die Fc-Rezeptor-Bindungsstelle zur Opsonisierung.

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern wird einem Tier (z.B. Kaninchen, Ziege, Schaf) ein hochgereinigtes Antigen (z. B. aus menschlichem Gewebe), das man nachweisen möchte, injiziert. Dieses bildet daraufhin gegen das körperfremde Protein (Antigen) als natürliche Immunreaktion entsprechende Abwehrstoffe (Antikörper). Diese werden dann nach der Blutentnahme aus dem Serum durch aufwendige Techniken aufgereinigt und können in weiterer Folge für immunzytologische bzw. -histologische Untersuchungen verwendet werden.

Um monoklonale Antikörper herzustellen, impft man eine Maus oder Ratte mit dem spezifischen Antigen. Anschließend werden der Milz des Tieres die antikörperproduzierenden Plasmazellen entnommen. Diese werden dann mit

langlebigen Tumorzellen fusioniert, sodass man sog. Hybridoma-Zellen erhält, die die Eigenschaften beider Zellen aufweisen.

Der Nachweis beruht auf der Affinität des Antikörpers zu einem bestimmten Antigen (antibody generator), wobei der Antikörper an ein spezielles Epitop des Antigens bindet (Antigen-Antikörper-Reaktion). Ein Antigen besitzt mehrere solche „Antikörper hervorrufende“ Regionen, auch Epitope bzw. antigene Determinanten genannt. Im Idealfall kommt es zu einer spezifischen und starken Bindung zwischen einem Antikörper und dem entsprechenden Epitop. Der Antikörper, der gegen das zu findende Epitop gerichtet ist, wird als Primärantikörper bezeichnet und sollte eine hohe Spezifität und Affinität zum Epitop zeigen und keine Kreuzreaktionen mit ähnlichen Epitopen aufweisen. Hinderlich können auch allgemeine Hintergrundfärbungen (endogenes Biotin, endogene Peroxidase) sein, die jedoch mit speziellen Blockierlösungen reduziert werden können.

Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex kann auf zwei unterschiedliche Nachweismethoden sichtbar gemacht werden:

Bei der direkten Methode wird ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) verwendet, der direkt mit einem Enzym oder Fluorophor wie Fluoreszein, Rhodamin oder Texas Red gekoppelt (konjugiert) ist. Bei Enzym-konjugierten Antikörpern, wird diesen ein Substrat angeboten, das unter Bildung eines Farbstoffs mit dem Enzym reagiert. Bei fluorochrom-gekoppelten Antikörpern erfolgt die Detektion direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die direkte Immunfluoreszenz eignet sich auch zur Mehrfachdetektion verschiedener Antigene in einem Präparat, dabei werden Antikörper unterschiedlicher Spezifität mit Fluorochromen unterschiedlicher Emissionswellenlänge gekoppelt.

Bei der indirekten Methode wird zuerst ein Primärantikörper verwendet und erst dann ein Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, aufgetragen. Dieser Sekundärantikörper ist mit einem Enzym konjugiert. Ein sichtbarer Farbstoff entsteht dann durch die Enzym-Substrat-Reaktion. Mit der indirekten Methode kann somit ein schwaches primäres Signal verstärkt werden.

Heutzutage ist die Labelled (Strept)avidin-Biotin-Methode die am meisten eingesetzte. Bei dieser indirekte Methode wird zuerst ein unkonjugierter Primärantikörper aufgetragen und dann ein biotinmarkierter (=biotinylierter) Sekundärantikörper mit einem (Strept)avidin-Biotin-Enzymkonjugat. Das Prinzip beruht auf der hohen Affinität von Steptavidin (ein Protein, das von Bakterien der

Spezies *Streptomyces avidinii* produziert wird) und Avidin (ein Glycoprotein aus dem Hühnerei) für Biotin, da Streptavidin und Avidin jeweils vier Bindungsstellen für Biotin aufweisen. Als Enzym wird zumeist die Meerrettichperoxidase (Horse Redish Peroxidase) eingesetzt und ihr Wasserstoffperoxid als Substrat dargeboten. Die freiwerdenden Protonen oxidieren das Chromogen AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) zu seinem farbigen roten Endprodukt unter der Bildung von Wasser.

Um sicherzustellen, dass die verwendeten Antikörper spezifisch binden, sollten immer Isotypkontrollen (negativ Kontrolle) mitgeführt werden. Isotypkontrollen sind Antikörper, die den gleichen Immunglobulintyp aufweisen, wie der eben eingesetzte spezifische Primärantikörper. Auf diese Weise kann eruiert werden, ob der Primärantikörper unspezifisch über seinen Fc-Teil am Gewebe oder an Zellen (z.B. Makrophagen) bindet.

Protokoll der Immunzytochemie:

- Frische auf Chamberslides gezüchtete Zellen:
 - Zuerst Medium absaugen, mit PBS waschen, Kammern demontieren und über Nacht unter der Sterilwerkbank trocknen lassen
- Gefrorene Zellen auf Chamberslides:
 - mindestens 1 h bei Raumtemperatur auftauen und trocknen lassen
- Fixieren der Zellen auf den Chamberslides für 5 min in Aceton
- Kammern mit PAP-Pen (DakoCytomation Pen, Carpinteria, CA, USA) umranden und trocknen lassen
- 5 min in Tris-buffered saline (TBS), dem 0.05% (vol/vol) Tween 20 zur Reduktion der Oberflächenspannung hinzugesetzt wurde, rehydrieren
- Blockieren der endogenen Peroxidase mit Peroxid Blocking Reagent (DakoCytomation) für 10 min, bei Raumtemperatur, lichtgeschützt, in einer feuchten Kammer
- 3x Waschen in TBS/0.05% Tween 20
- Präinkubation für 10 min mit UltraVision Block (inkludiert im UltraVision detection system, Lab Vision, Fremont, CA, USA) ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem humanen AB Serum, um unspezifische Antikörperbindungen und Fc-Rezeptor Bindungen zu verhindern
- Abkippen der UltraVision Blockierlösung
- Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tab. 2.1), verdünnt in Antibody Diluent (DakoCytomation), für 30 min
- 3x Waschen in TBS/0.05% Tween 20
- 20minütige Inkubation mit dem Antibody-Enhancer (UltraVision detection system, Lab Vision)
- Detektion der Antikörperbindung mit dem Horse Radish Peroxidase gekoppelten Biotin-Streptavidin System (UltraVision detection system, Lab Vision)
- Visualisierung der Immunreaktion durch 10minütige Exposition mit 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC Substrate Chromogen, DakoCytomation)
- 3x Waschen in Aqua dest.

Tab. 2.1.: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Isotyp	Firma	Klon	Verdünnung
CD90 (Thy-1)	IgG1	Dianova, Hamburg, Germany	-	1:2000
CD34	IgG1	Dako, Glostrup, Denmark	QBEnd-10	1:100
CD45	-	Millipore, Billerica, MA, USA	OX-1	1:100
CD14	-	Millipore, Billerica, MA, USA	UCHM-1	1:500
HLA-DR	IgG1	Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA	MEM-12	1:1000
CD79 α	-	Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA	SP18	1:100
CD73	IgG1	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	AD2	1:100
CD105	IgG1	AbD Serotec, Kidlington, UK	SN6	1:100
Osteopontin (SPP1)	IgG	LifeSpan Biosciences, Seattle, WA, USA	-	1:100
Osteocalcin (BGLAP)	-	LifeSpan Biosciences, Seattle, WA, USA	-	1:100
Osteonectin (SPARC)	IgG	LifeSpan Biosciences, Seattle, WA, USA	-	1:100
Collagen 1	IgG1	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA	COL-1	1:100

2.5 Hämatoxylin-Färbung

Hämatoxylin ist ein Inhaltsstoff des Blauholzes (*Haematoxylon campechianum*) bzw. verwandter Arten und wird insbesondere in der Histologie als Farbstoff eingesetzt. Hämatoxylin ist in reiner Form farblos bis beige und erst durch Oxidation mittels Luftsauerstoff oder geeigneten Oxidationsmittel (z.B. Natriumiodat, Kaliumpermanganat, Wasserstoffperoxid) entsteht daraus das ockerbraun gefärbte Hämatein. Dieser Prozess wird auch als Reifung bezeichnet. Die färbende Wirkung erhält Hämatein erst durch den Zusatz von Alaunen (Alaune sind Aluminium-Kalium-Doppelsalze, wobei das Aluminium durch Chrom oder Eisen und Kalium durch Natrium oder Ammonium ersetzt werden kann). Dabei kommt es zu Komplexverbindungen durch Chelatbildung zwischen Hämatein und

den jeweiligen Metallionen der Alaune. Die Komplexe aus Hämatein und Alaunen werden als Hämatoxylinlacke (eig. Hämateinlacke) bezeichnet. Hämatoxylinlacke, die mit gewöhnlichem Alaun gebildet sind, werden als Hämalaune bezeichnet; ansonsten werden sie nach den verwendeten Metallionen benannt (z.B. Eisenhämatoxylin bei der Heidenhainfärbung).

Die Farbe der Hämatoxylinlacke ist vom pH-Wert abhängig: Bei niedrigem pH-Wert der Färbelösung (unter pH 3) erscheinen die gefärbten Strukturen rötlich-braun, erst durch Anheben des pH-Wertes durch Spülen in Leitungswasser (pH 6,8-7,0) oder in schwachen Basen entsteht die typische blau-violette Färbung („Bläuen“). Dies führt außerdem zum Fixieren der Färbung, da Hämatoxylinlacke bei höherem pH-Wert schlechter löslich sind.

Hämatoxylinlacke sind bei niedrigem pH-Wert stark positiv geladene Farbstoffe, die daher an negativ geladenen (anionischen), basophilen Strukturen wie der DNA des Kernchromatins, sauren Glykosaminoglykanen des hyalinen Knorpels aber auch Bakterien und Kalk binden. Häufig wird die Hämatoxylin-Färbung (Zellkernfärbung) in Kombination mit einer Eosin-Färbung (Zytoplasmafärbung) eingesetzt (Hämatoxylin-Eosin-Färbung). Eosin färbt dabei kationische (eosinophile) Strukturen wie das Zytoplasma, Kollagenfasern und Proteine, die hellrosa bis pink erscheinen. Bei der Immunzytochemie oder anderen zytochemischen Färbungen wird zumeist eine alleinige Kernfärbung mit Hämalaun als Gegenfärbung angeschlossen.

Protokoll der HE-Färbung:

- Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt, Germany) für 10min
- 3x Waschen in Aqua dest., bis keine Farbwolken mehr zu sehen sind
- „Bläuen“ in Ammoniumwasser
- 3x Waschen in Aqua dest.
- Trockentupfen mit Filterpapierstreifen
- Wässriges Eindeckeln mit Kaisers-Glycerin-Gelatine (Merck)
- Deckglas auf einem Tropfen Eindeckelmedium luftblasenfrei aufsetzen, festdrücken und überschüssige Lösung mit Filterpapierstreifen abtupfen
- Fotodokumentation (Axiophot, AxioVision 3.0.6 SP4, Zeiss, Germany)

2.6 Alkalische Phosphatase Bestimmung

Die Ermittlung der Aktivität der membrangebundenen alkalischen Phosphatase, einem der wichtigsten Marker osteogener Differenzierung, beruht auf einer enzymatischen Reaktion, in der Naphthol AS-MX Phosphat unter ALP-Katalyse in Naphthol AS-MX umgesetzt wird. Dieses bindet sofort an ein Diazoniumsalz, mit dem es an den Stellen mit Phosphatase-Aktivität ein unlösliches, sichtbares Pigment bildet.

Protokoll der ALP-Bestimmung:

Vorbereitung:

- Herstellung der Färbelösung (unter Lichtschutz)
 - Den Inhalt einer Fast Blue RR Salz Kapsel in 48 ml Aqua dest. mit einem Magnetrührer auflösen
 - 2 ml Naphthol AS-MX Phosphat Alkalilösung zur verdünnten Diazoniumsalzlösung zugeben und gut mischen (Alkalifarbstoffgemisch)
- Herstellung der Zitrat-Arbeitslösung
 - Verdünnen von 2 ml Zitratkonzentrat-Lösung mit 100 ml Aqua dest.
- Zubereitung der Fixierlösung (60% zitratgepuffertes Aceton)
 - Zitrat-Arbeitslösung auf RT erwärmen und unter ständigem Rühren 2 Volumina Zitrat-Arbeitslösung zu 3 Volumina Azeton geben

Färbe-Verfahren:

- Auf Chamberslides gewachsene Zellen mit PBS waschen
- Fixierung für max. 30 sec. mit zitratgepuffertem Aceton
- Fixierlösung rasch absaugen
- Waschen mit Aqua dest. für 45 sec. (Objektträger dürfen während aller Vorgänge nie austrocknen)
- Zugabe der Färbelösung unter Lichtschutz und Inkubation für 30 min im Brutschrank

- Färbelösung absaugen und gründlich mit Aqua dest. spülen
- Anschließende Hämatoxylin-Kernfärbung und wässriges Eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine

2.7 Öl-Rot-O Färbung

Um die adipogene Differenzierung der Zellen zu überprüfen, wurden sie mit Öl-Rot O gefärbt. Mittels dieser Färbung lassen sich Lipidvesikel in Zellen intensiv orange-rot darstellen.

Protokoll der Öl-Rot-O-Färbung:

- Herstellen der Öl-Rot-O Färbelösung:
 - 0,5% Öl-Rot-O Stammlösung:
 - 0,5 g Öl-Rot-O in 100 ml 98% Isopropanol lösen
 - Öl-Rot-O Gebrauchslösung:
 - 3:2 Verdünnung der Stammlösung mit Aqua dest. (90 ml Stammlösung + 60 ml Aqua dest.)
 - Gebrauchslösung immer frisch herstellen, 15 min stehen lassen und dann mittels Faltenfilter filtrieren
- Fixierung in 60% Isopropanol für 20 sec
- Färbung in Öl-Rot-O Lösung für 10 min
- 2maliges Differenzieren in 60% Isopropanol für je 4 sec
- Spülen mit Leitungswasser
- Anschließende Hämatoxylin-Kernfärbung und wässriges Eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine

2.8 Alcian-Blau-Färbung

Die Alcian-Blau-Färbung dient dem histochemischen Nachweis von Mucopolysacchariden und Glycosaminoglycanen, die sich bei positiver Reaktion blau darstellen lassen.

Protokoll der Alcian-Blau-Färbung:

- Herstellung einer 1% Alcian-Blau-Färbelösung:
 - Lösen von 1 g Alcian-Blau in 100 ml 3% Essigsäurelösung
 - Einstellen der Lösung auf pH 2.5
- Schnitte entparaffinieren und in Aqua dest. rehydrieren
- Färbung mittels Alcian-Blau-Färbelösung für 30 min
- Spülen in Leitungswasser
- Anschließende Hämatoxylin-Kernfärbung und wässriges Eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine

2.9 Differenzierungsversuche

Um das Differenzierungspotential der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in drei verschiedenen mesenchymalen Linien differenziert. Ihre Fähigkeiten, sich osteogen, adipogen und chondrogen differenzieren zu lassen, wurde in weiterer Folge sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene untersucht.

2.9.1 Osteogene Differenzierung

Um das osteogene Differenzierungspotential der Zellen zu testen, wurden die zu 90% konfluenten Zellen für 14 Tage in einem osteogenen Differenzierungsmedium gezüchtet und danach die Alkalische Phosphatase Aktivität zytochemisch bestimmt.

Das Basalmedium (DMEM/F-12, Gibco) enthielt folgende Zusätze:

- 100 IU/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- 0.25 µg/ml Amphotericin (alle von Gibco)
- 1% (v/v) ITS+1 Liquid Media Supplement
- 0.1 µM Dexamethason
- 100 µM L-Ascorbinsäure

- 10mM Glycerol 2-Phosphate Disodium Salt Hydrate (alle von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2.9.2 Adipogene Differenzierung

Zur Bestimmung der adipogenen Differenzierungsfähigkeit wurden die Zellen für 3 Wochen in einem adipogenen Differenzierungsmedium kultiviert und mittels Öl-Rot-O Färbung die Ausbildung von Fetttröpfchen visualisiert.

Dem Basalmedium (DMEM/F12) wurden folgende Zusätze hinzugefügt:

- 10% (v/v) fetales Kälberserum (PAA)
- 100 IU/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- 0.25 µg/ml Amphotericin (alle von Gibco)
- 1 µM Dexamethason
- 0.2 mM Indomethacin
- 0.5 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin
- 10µg/ml Insulin (alle von Sigma-Aldrich)

2.9.3 Chondrogene Differenzierung

Zur Induktion der chondrogenen Differenzierung wurden die Zellen für 28 Tage in chondrogenem Differenzierungsmedium auf Transwells gezüchtet. Danach wurden sie in Paraffin einbettet, Paraffin-Schnitte hergestellt und diese mit Alcian-Blau gefärbt.

Das Basalmedium (DMEM/F12) wurde mit folgenden Zusätzen versehen:

- 100 IU/ml Penicillin,
- 100 µg/ml Streptomycin,
- 0.25 µg/ml Amphotericin (alle von Gibco)
- 1% (v/v) ITS+1 Liquid Media Supplement
- 100 nM Dexamethason

- 40 µg/ml Prolin
- 25 µg/ml L-Ascorbinsäure (alle von Sigma-Aldrich)
- 100 µg/ml Natrium Pyruvat (PAA)
- 10 ng/ml TGF-β3 (Reliatech, Wolfenbüttel, Germany)

2.10 Herstellung von Paraffinschnitten

Der Präparationsvorgang für die Paraffineinbettung von Zellen kann in folgende Schritte unterteilt werden: Fixierung, Entwässerung und Einbettung.

Das Ziel der Fixierung ist es, im Idealfall die Struktur und teilweise auch den Funktionszustand der Zellen zu erhalten und postmortale Erscheinungen, wie Autolyse, Verwesung und Fäulnis zu verhindern. Ein in der Laborroutine häufig verwendetes Fixiermittel ist Formaldehyd. Formaldehyd ist ein stechend riechendes Gas, das sich gut in Wasser löst und in wässriger Lösung als Formalin bezeichnet wird. Formaldehyd wird in 4-10%iger Lösung als Fixiermittel verwendet und trägt den Handelsnamen Formol. Die Gewebefixierung beruht dabei auf einer Vernetzung von Proteinen. Die Fixierung mittels Formaldehyd zeichnet sich durch gutes Eindringungsvermögen aus und dient gleichzeitig der Konservierung von Zellen bzw. Geweben.

Nach dem Fixieren muss das Fixiermittel ausgewaschen werden. Im Falle der Fixierung mittels Formaldehyd, erfolgt dies mit der entsprechenden Pufferlösung in der das Fixans gelöst ist.

Da viele Einbettmedien (z.B.: Paraffin) aus Substanzen bestehen, die sich nicht mit Wasser vermischen lassen, muss das verbliebene Wasser in den Zellen bzw. im Gewebe entfernt werden. Diese Entwässerung erfolgt stufenweise über eine aufsteigende Alkoholreihe. Die Entwässerung wird schrittweise durchgeführt um eine Zerreiβung bzw. Schrumpfung zu verhindern. Nach dem Entwässern werden die Präparate in ein Intermedium überführt, da das Paraffin nicht in ein vollständig mit Alkohol getränktes Präparat eindringen kann. Als Intermedium werden Substanzen, wie Xylol bzw. Xylolersatz verwendet, die sowohl mit Alkohol als auch mit Paraffin mischbar sind. Erst danach erfolgt die Einbettung des Präparates in Paraffin. In vielen Labors werden heutzutage diese einzelnen Schritte in Einbettautomaten durchgeführt.

Protokoll zur Herstellung von Paraffinschnitten:

Fixierung von Zellen/Geweben:

- Fixierung in 4%iger gepufferter Formollösung für 24h bei RT
- Auswaschen des Fixiermittels mit PBS und Lagerung in PBS bis zur Einbettung

Einbettung in Paraffin:

- Probe aus der Pufferlösung nehmen und in eine geeignete Gewebekassette geben und diese mit Bleistift beschriften
- Gewebekassette in den Kassettenkorb legen und den Korb in die Retorte des Gewebeeinbettautomaten stellen
- Retorte schließen, entsprechende Eingaben vornehmen (Programm wählen etc.) und Bearbeitung starten
- Das Standardprogramm (Programm-Nr. 6) lautet:
 - Formol 0 min
 - 60% Ethanol 60 min
 - 80% Ethanol 60 min
 - 96% Ethanol 60 min
 - 100% Ethanol 3x 60 min
 - Tissue Clear (Xylolersatz) 3x 60 min
 - Paraffin 3x 60 min
- Nach Programmende die Retorte öffnen, Stahlkorb herausnehmen, Gewebekassetten zur Ausgießstation bringen und warmstellen
- Vorgewärmte Ausgießform mit passender Ausnehmung bodenbedeckt mit Paraffin füllen, auf 4°C gekühlte Platte stellen und das Paraffin kurz stocken lassen
- Gewebe aus der Gewebekassette nehmen und in richtiger Orientierung in die Ausgießform mit Paraffin geben
- Ausgießform nochmals auf die 4°C gekühlte Platte stellen und das Paraffin stocken lassen bis das Gewebe in seiner passenden Orientierung fixiert ist
- Ausgießform mit Paraffin auffüllen

- Deckel der Gewebekassette abnehmen, die Gewebekassette mit dem beschrifteten Teil in das Paraffin drücken, mit Paraffin anfüllen und auf die 4°C Kühlplatte stellen
- Mindestens eine Stunde kalt stellen bis man den Paraffinblock aus der Form brechen kann
- Paraffinblöcke weiterverarbeiten oder bei RT lagern

Schneiden von Paraffinblöcken:

- Paraffinblöcke auf der Kühlplatte kühlen, Schlittenmikrotom für Gebrauch vorbereiten, Wasserbad auffüllen, Heizplatte auf 52°C vorheizen
- Paraffinblock zuerst manuell mit 10 µm Schnitten trimmen
- Dann auf Automatik umstellen und feine 5 µm Schnitte herstellen
- Schnitte mit einem Pinsel vom Messer abnehmen und vorsichtig mit der glänzenden Seite nach unten ins Wasserbad zum Strecken übertragen
- 1-2 Schnitte auf einen Superfrost Plus-Glasobjektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) aufziehen und auf die Heizplatte legen
- Überschüssiges Wasser unter dem Schnitt mit Filterpapierstreifen abtupfen
- Objektträger mit den Schnitten auf der Heizplatte über Nacht trocken lassen
- Aufbewahrung in Objektkästen bei RT

Entparaffinieren:

Vor dem Färben muss noch das Paraffin aus den Schnitten mit Xylol herausgelöst werden. Da die meisten Farbstoffe in Wasser gelöst sind, müssen sie außerdem noch von absolutem Alkohol über die absteigende Alkoholreihe in Wasser überführt werden.

- 2x 10 min Xylol
- 3 min Xylol/100% Ethanol
- 3 min 100% Ethanol
- 3 min 96% Ethanol
- 3 min 70% Etanol
- 5 min rehydrieren in Aqua dest.

2.11 RNA-Isolierung

Um eine RT-PCR zur Analyse der Genexpression durchführen zu können, muss zuvor die RNA aus den Zellen bzw. dem Gewebe isoliert werden. Dies erfolgte nach den anschließend aufgelisteten Schritten.

Protokoll der RNA-Isolierung:

- Zellen mit PBS (3 ml bei 25 cm² Kulturflasche) waschen, PBS anschließend absaugen
- Homogenisierung mit 1 ml Tri Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)
- Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min
- Zellen von der Unterlage mit einem Zellschaber abschaben, Zellsuspension mit einer Pasteurpipette resuspendieren und in ein 1 ml Eppendorfgefäß überführen
- 100 µl BCP (1-bromo-3-chloropropane, MRC, Cincinnati, USA) dazupipettieren, 22x kippen und bei Raumtemperatur 10 min inkubieren
- Zentrifugation bei 12000 x g, 4°C für 10 min
- Abheben der oberen wässrigen Phase, welche die RNA enthält, mit einer Mikropipette und vorsichtiges Überführen in ein neues 1ml Eppendorfgefäß (die untere rosarote Phase, welche die DNA und Proteine enthält, sollte dabei nicht berührt werden)
- Zugabe von 500 µl Isopropanol (2-Propanol, Merck, Germany) zur RNA-Präzipitation
- 22maliges Kippen und Inkubation bei RT für 7 min
- Zentrifugation bei 12000 x g, 4°C für 10 min
- Überstand verwerfen und Waschen der RNA mit 1 ml 70% Ethanol
- Zentrifugation bei 12000 x g, 4°C für 10 min
- Überstand vorsichtig abheben und das Pellet für 1 h lufttrocknen
- Lösen des Pellets in 100 µl RNase-freiem H₂O
- Bei 55-60°C für 15 min auf dem Thermomixer inkubieren

- Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit (OD260/OD280) mit dem Spektrophotometer (NanoDrop® ND-1000, Peqlab, Germany)
- Aliquotieren und Lagerung der Proben bei -80°C

2.12 Semiquantitative RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Chain-Reaktion (RT-PCR) stellt eine Kombination zweier molekularbiologischer Methoden dar und zwar die Nutzung der Reversen Transkriptase und der Polymerase-Kettenreaktion, um die Expression von spezifischen Genen in Zellen, Geweben oder im Serum nachzuweisen. Zum Nachweis der Genexpression, muss die mRNA untersucht werden. Da die Amplifikation der DNA bei der PCR durch spezifische DNA-Polymerasen erfolgt, die DNA abhängig sind und nicht in der Lage sind RNA zu amplifizieren, muss zuvor eine Reverse-Transkriptase eingesetzt werden. Diese Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit deren Hilfe RNA in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben werden kann. Die cDNA dient dann in weiterer Folge als Ausgangsmaterial für eine PCR, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren.

Die heutzutage verwendeten Reversen Transkriptasen stellen veränderte Enzymvarianten aus unterschiedlichen Retroviren dar, wie dem Murine Leukemia Virus (MLV) oder dem Avian Myeloblastosis Virus (AMV). Diese Enzymvarianten sind von den Herstellern so modifiziert worden, dass sie eine höhere Spezifität aufweisen oder höhere Erträge erzielen.

Zur Initiation der DNA-Synthese benötigen die Reversen Transkriptasen, wie auch andere DNA-Polymerasen, ein kurzes DNA-Stück auch Primer genannt. Hierfür wird häufig ein Oligo-d(T)-Primer eingesetzt, der aus mehreren Thymin-Basen besteht und komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA ist. Bei der One-Step RT-PCR werden jedoch, anstatt der Oligo-d(T)-Primer, Gen-spezifische Primer verwendet und beide Reaktionen laufen hintereinander im selben Reagenzgefäß ab.

Die PCR dient zur Vervielfältigung der DNA und findet heutzutage in der Medizin oder Forschung zahlreiche Anwendungen beispielsweise in der Detektion von Virusinfektionen oder Erbkrankheiten, bei der Erstellung genetischer

Fingerabdrücke, Vaterschaftsbestimmungen und beim Klonieren von Genen. Bei der zu amplifizierenden Sequenz kann es sich um ein gesamtes Gen, um einen Teil eines Gens oder um eine nicht-kodierende Sequenz handeln.

Die für eine PCR benötigten Komponenten sind:

- DNA, die die zu amplifizierende Sequenz enthält (Template)
- Forward und Reverse Primer, die an die DNA-Einzelstränge binden, somit den Startpunkt der DNA-Synthese festlegen und den zu vervielfältigenden Bereich von beiden Seiten begrenzen
- DNA-Polymerase, um den Abschnitt zu replizieren; wobei heutzutage fast ausschließlich eine hitzeresistente Taq-Polymerase verwendet wird
- Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs), die der DNA-Polymerase als Bausteine für den neu synthetisierten DNA-Strang dienen
- Magnesium-Ionen, die für die Funktion der Polymerase wichtig sind
- Pufferlösungen, die der DNA-Polymerase als geeignete chemische Umgebung dienen

Die PCR besteht aus ca. 12-50 Zyklen, die in einem Thermocycler stattfinden, der die in sich befindenden Reaktionsgefäße genau auf die Temperatur erhitzt oder kühlt, die für den jeweiligen Reaktionsschritt benötigt wird. Jeder Zyklus besteht aus folgenden 3 Schritten, wobei bei jeder Reaktion Temperatur und Dauer speziell optimiert werden müssen:

1. Denaturierung (Melting, Schmelzen): Dabei wird die doppelsträngige DNA auf 94-96°C erhitzt um die Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen und zwei Einzelstränge zu erzeugen. Im ersten Zyklus, der sog. Initialisierung, wird die DNA häufig für längere Zeit erhitzt, um sicherzugehen, dass sich sowohl die DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und in Einzelsträngen vorliegen. Nach dieser anfänglichen Erhitzungsphase wird schnell auf 65°C abgekühlt, um die Rückbildung in Doppelhelices zu verhindern.

2. Primerhybridisierung (primer annealing): Hierbei wird die Temperatur ca. 30 Sekunden lang auf einen bestimmten Wert gehalten, damit sich die Primer spezifisch an die DNA anlagern können. Die Temperatur ist dabei von der Länge und der Sequenz der Primer abhängig. Sie liegt normalerweise 5-10°C unter dem Schmelzpunkt der Primer, was meist einer Temperatur von 55-66°C entspricht. Wird die Temperatur zu hoch gewählt, können sich die Primer aufgrund der vermehrten thermischen Bewegung nicht richtig anlagern und es findet keine oder nur eine ineffiziente Produktbildung statt. Verwendet man eine zu geringe Temperatur, binden die Primer möglicherweise auch an nicht-100%-komplementäre Sequenzen und es kommt zur Bildung von unspezifischen Produkten.
3. Elongation (Extension, Polymerisation, Amplifikation): Die DNA-Polymerase beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers mit der Bildung eines neuen komplementären DNA-Stranges. Nach Fertigstellung des neuen Stranges, wird der Primer nicht wieder abgelöst, sondern bildet den Anfang des neuen Einzelstranges. Pro 500 Basenpaaren benötigt die DNA-Polymerase ca. 30 Sekunden, dies variiert jedoch in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase. Ebenso hängt die dafür eingesetzte Temperatur vom Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase ab und liegt zwischen 68-72°C.

In den folgenden Zyklen vermehren sich die PCR-Produkte exponentiell und nach Beendigung aller Zyklen, werden die Reaktionsgefäße im Thermocycler auf 4-8°C gekühlt.

Protokoll der One-Step RT-PCR:

(One-Step RT-PCR kit, Qiagen, Hilden, Germany)

- Auftauen der RNA-Proben, Primer, dNTPs, 5x RT-PCR Puffer auf Eis
- Verdünnen der RNA-Proben und Primer
- Vorbereiten des Master Mix auf Eis, pro Reaktion wurden folgende Mengen an Reagenzien benötigt:
 - 10 µl RNase freies H₂O
 - 1,2 µl Forward Primer
 - 1,2 µl Reverse Primer

- 0,8 µl dNTP-Mix
- 4 µl 5x RT-PCR Puffer
- 0,8 µl RT-PCR Enzym-Mix
- 2 µl (80ng) RNA-Probe
- Folgende Thermocycler-Einstellungen wurden verwendet:
 - 30 min Reverse Transkription bei 50°C
 - 15 min Initialisierung bei 95°C
 - 30 sec Denaturierung bei 94°C
 - 30 sec Primer Annealing bei 60°C
 - 1 min Extension bei 72°C
 - 10 min finale Extension bei 72°C
 - Abkühlen auf 4°C
- Lagerung der Proben für längere Zeit bei -20°C

} Zyklus

Als Positiv-Kontrolle für die Expression osteogener Markergene dienten humane fetale Osteoblasten (hFOB 1.19). Als Negativ-Kontrolle wurde RNase freies H₂O verwendet. Ribosomales Protein L30 (RPL30) wurde als interne Kontrolle mitgeführt. Die Anzahl der Zyklen betrug 32 für SPP1 und 28 für alle anderen Gene. Die Primer wurden auf der frei zugänglichen Website Primer3 konstruiert und bei Invitrogen (Paisley, UK) bestellt (siehe Tab. 2.2).

Tab. 2.2.: Auflistung der verwendeten Primer, PCR-Produkt-Größen und Zyklusanzahl

Gene	RefSeq	Primer	PCR product size	Cycle No
RPL30	NM_000989	for: GAA AGT ACT TGC TGC GGT ACA AAC AGA CTC rev: ATC GGA ATC ACC TGG GTC AAT GAT AGC CAG	236 bp	hFOB 1.19: 28 PC: 28
ALPL	NM_000478	for: CCA CGT CTT CAC ATT TGG TG rev: AGA CTG CGC CTG GTA GTT GT	196 bp	hFOB 1.19: 28 PC: 28
COL1A1	NM_000088	for: AGC CAG CAG ATC GAG AAC AT rev: TCT TGT CCT TGG GGT TCT TG	250 bp	hFOB 1.19: 28 PC: 28
BGLAP	NM_199173	for: GTG CAG AGT CCA GCA AAG GT rev: TCA GCC AAC TCG TCA CAG TC	175 bp	hFOB 1.19: 28 PC: 28
SPP1	NM_001040058.1	for: ACT GAT TTT CCC ACG GAC CT rev: CAT TCA ACT CCT CGC TTT CC	199 bp	hFOB 1.19: 32 PC: 32
SPARC	NM_003118	for: GTG CAG AGG AAA CCG AAG AG rev: AAG TGG CAG GAA GAG TCG AA	202 bp	hFOB 1.19: 28 PC: 28
FABP4	NM_001442	for: GCT TTG CCA CCA GGA AAG TG rev: ATG ACG CAT TCC ACC ACC AG	280 bp	All: 28
LPL	NM_000237	for: GGG CAT GTT GAC ATT TAC CC rev: AGC CCT TTC TCA AAG GCT TC	221 bp	All: 28
ACAN	NM_001135.3	for: AGG GCA CAG CCA CCA CCT ACA A rev: TGC TTT GGC ATT CGG CGG ACA A	300 bp	All: 32

2.13 Agarosegel-Elektrophorese

Die PCR-Produkte können dann in weiterer Folge durch Agarosegelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Dabei werden die PCR-Produkte auf ein Agarose-Gel aufgebracht und anschließend eine Spannung angelegt. Die negativ geladenen DNA-Stränge bewegen sich auf den Pluspol. Folglich wandern die kürzeren Fragmente schneller als die längeren. Die Länge der PCR-Produkte kann mittels Vergleich mit einer DNA-Leiter, die DNA-Fragmente bekannter Größe enthält und parallel zur Probe im Gel mitläuft, bestimmt werden.

Protokoll der Agarosegel-Elektrophorese:

- Herstellung eines 1,5% Agarosegels:
 - Einwiegen von 0,75 g Agarose (Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hess, Germany) in einem Maßkolben
 - 250 ml 1x TAE-Puffer hinzufügen
 - 3maliges Aufkochen in der Mikrowelle und mehrmaliges Schwenken bis die Lösung klar ist
 - Abkühlen der Lösung auf 50-60°C
 - Zugabe von 10 µl Gel Red und Verteilung in der Lösung durch mehrmaliges Schwenken
 - Gellösung in eine Gelkammer mit Kämmen für die Probenslots gießen
 - Gel für 45 min aushärten lassen und Kämmen vorsichtig entfernen
- Auftauen der RT-PCR Proben und der 100bp DNA-Leiter auf Eis
- Proben mit 4µl Loadingdye versetzen, gut vermischen und 5 sec bei 2000 x g zentrifugieren
- Gelkammer mit dem Agarosegel in die Elektrophoresekammer, die 1x TAE-Laufpuffer beinhaltet, legen
- Auftragen von 5µl DNA-Leiter und 8µl der jeweiligen Probe in die Probenslots des Agarosegels
- Auftrennung der RNA für 45 min bei 90V mittels Elektrophoresegerät
- Dokumentation mittels Eagle-Eye Geldokumentationssystem (Stratagene, La Jolla, CA, USA) und Quantifizierung mit Hilfe der AlphaDigiDoc 1000 Software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)

2.14 Datenanalyse

Für die statistischen Analysen wurde das Softwarepaket SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) verwendet. Sowohl Mittelwerte als auch Standardabweichungen wurden für beide Gruppen (konventioneller mechanischer Knochenschaber versus piezoelektrischer Knochenschaber) berechnet. Da die Daten eine Normalverteilung zeigten (Kolmogorow-Smirnow Test), wurden der Student's t-Test für gepaarte Stichproben und Fischers Exakter Test angewandt, um beide Gruppen miteinander zu vergleichen. Die Ergebnisse wurden bei einem p-Wert < 0.05 als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. *Entnahme der autogenen Knochentransplantate*

In die Studie wurden 20 PatientInnen (12 Frauen und 8 Männer), die zwischen 19 und 42 Jahre (28.15 ± 5.8) alt waren, eingeschlossen. Für die Teilnahme an der Studie gaben alle PatientInnen nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis. Bei allen PatientInnen wurde vor der chirurgischen Entfernung der unteren Weisheitszähne, autogenes Knochenmaterial aus dem Operationsgebiet sowohl mit dem Piezotom (Abb. 3.1, 3.3A) als auch mit dem mechanischen Knochenschaber (Abb.3.2, 3.3B) entnommen. Jede Knochenprobe hatte ungefähr ein Gewicht von 0.1 ± 0.05 g (Abb. 3.4).



Abb. 3.1: BS 6 Aufsatz des piezoelektrischen Knochenschabers (Piezotom) der Firma Satelec Acteon (Bordeaux, France).



Abb. 3.2: Mechanischer Knochenschaber (HK Instruments, Salzburg, Austria).

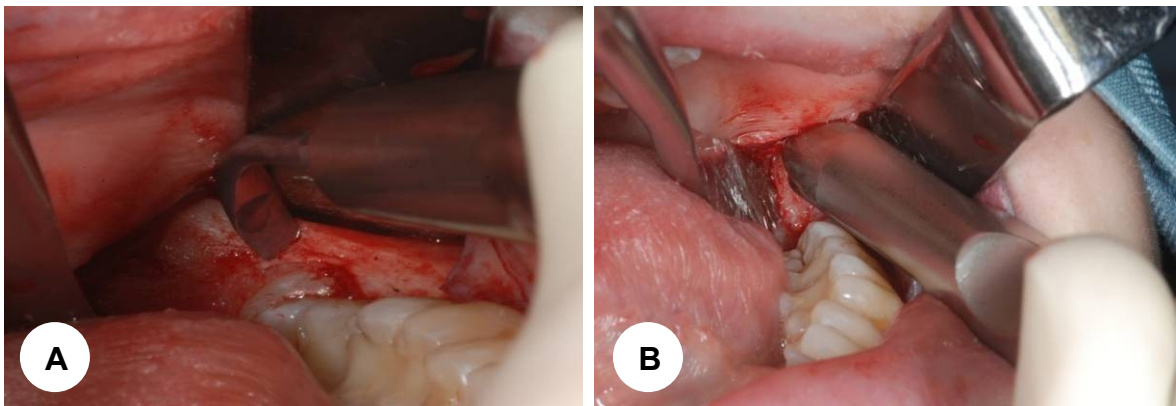


Abb. 3.3: Knochenentnahme an der Linea obliqua mit dem Piezotom (A) und dem mechanischen Knochenschaber (B) während einer Unterkiefer-Weisheitszahn-Extraktion.

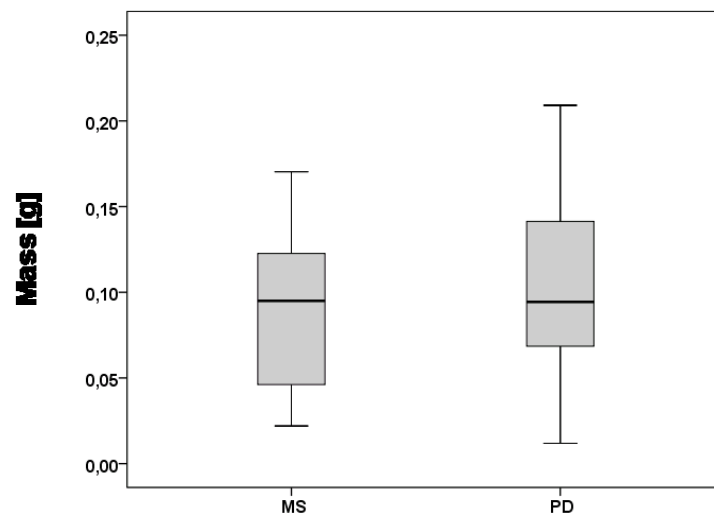


Abb. 3.4: Darstellung des Gewichts der autologen Knochenfragmente mittels Boxplots. MS (mechanical scraper): Proben, die mit dem mechanischen Knochenschaber gewonnen wurden. PD (piezoelectric device): Proben, die mit dem Piezotom entnommen wurden.

3.2 Analyse der Ultrastruktur

Die mittels beider Operationstechniken entnommenen Knochenfragmente wurden zur genauen Analyse ihrer Ultrastruktur unter dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Untersuchung zeigte, dass Knochenstückchen, die mit dem Piezotom entnommen worden sind, ein gestrecktes, viereckiges oder bogenförmig gekrümmtes Aussehen besaßen mit einer relativ glatten Oberfläche. Jene Knochenfragmente hingegen, die mit dem mechanischen Knochenschaber gewonnen worden sind, wiesen eine unregelmäßige Gestalt und eine raue Oberfläche auf. Nach Anwendung des Piezotoms zeigten sich, bei höherer Vergrößerung, an der Oberfläche der Knochenfragmente lauter feine Risse. Diese konnte man, nach Verwendung des mechanischen Knochenschabers, an der Oberfläche der Knochenpartikel nicht erkennen, es zeigte sich jedoch eine Vielzahl an oberflächlich haftenden Blutzellen (Abb. 3.5, 3.6).

Die Analyse der Ultrastruktur der aus den Knochenstückchen auswachsenden Zellen zeigte, dass sich die Zellen beider Gruppen nicht wesentlich voneinander unterschieden. Sie wiesen ein spindelförmiges Aussehen auf und Zell-Zell-Kontakte durch zahlreiche feine Zellfortsätze bzw. pseudopodienähnliche Ausläufer waren gut zu erkennen (Abb. 3.7).

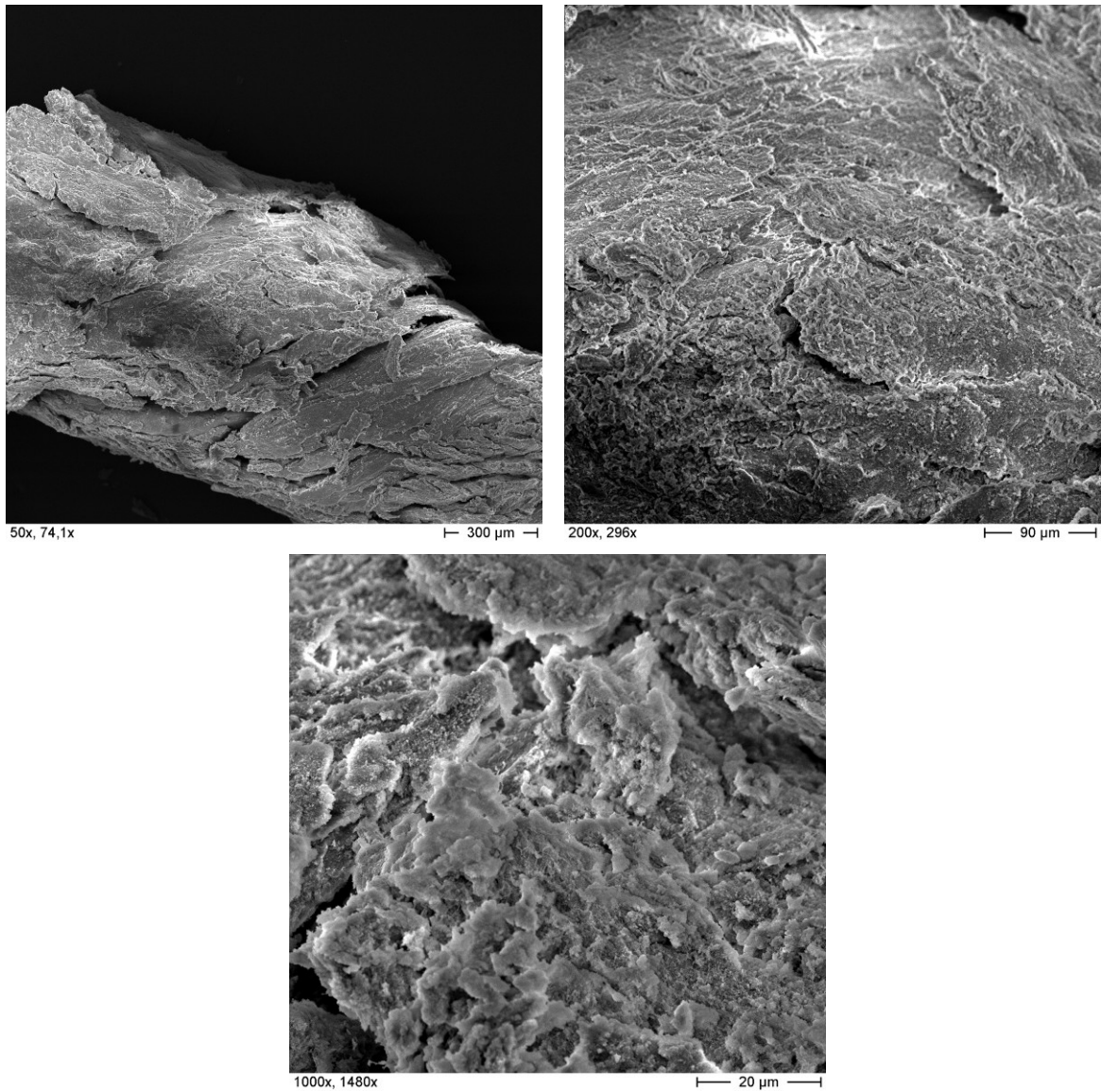


Abb. 3.5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines mit dem Piezotom entnommenen Knochenfragments in unterschiedlicher Vergrößerung. Die Knochenpartikel weisen eine zylindrische Gestalt auf und eine vergleichsweise glatte Oberfläche mit feinen Rissen.

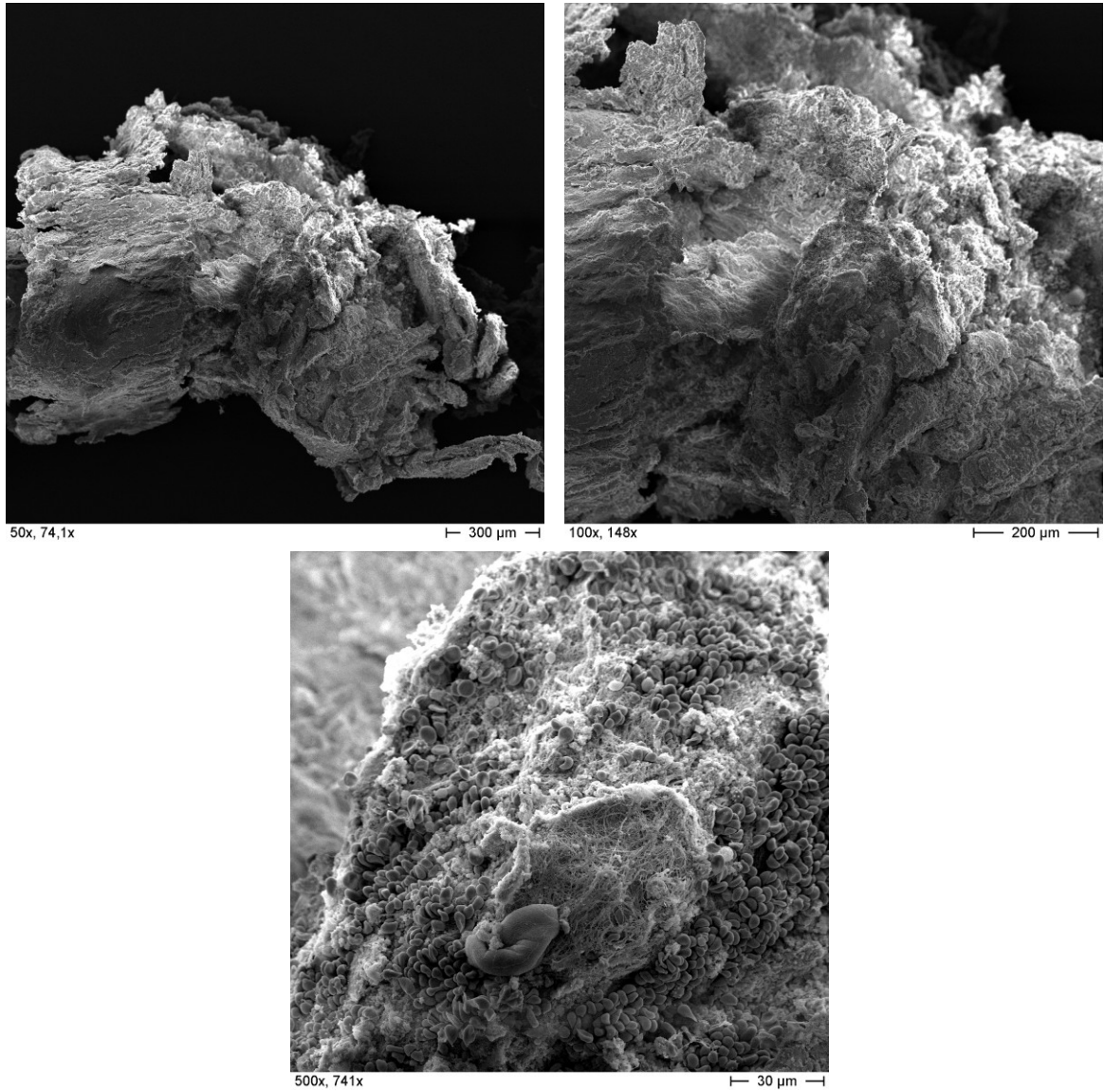


Abb. 3.6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines mit dem mechanischen Knochenschaber entnommenen Knochenfragments in unterschiedlicher Vergrößerung. Deutlich zu erkennen sind die raue Oberfläche und die zahlreich anhaftenden Blutzellen.

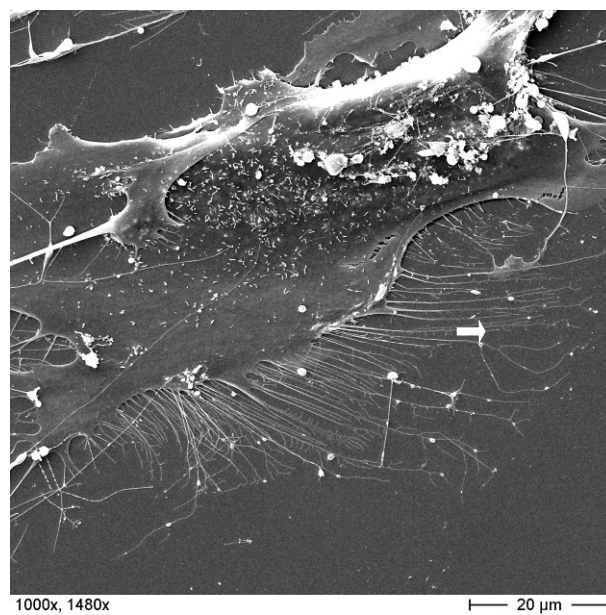
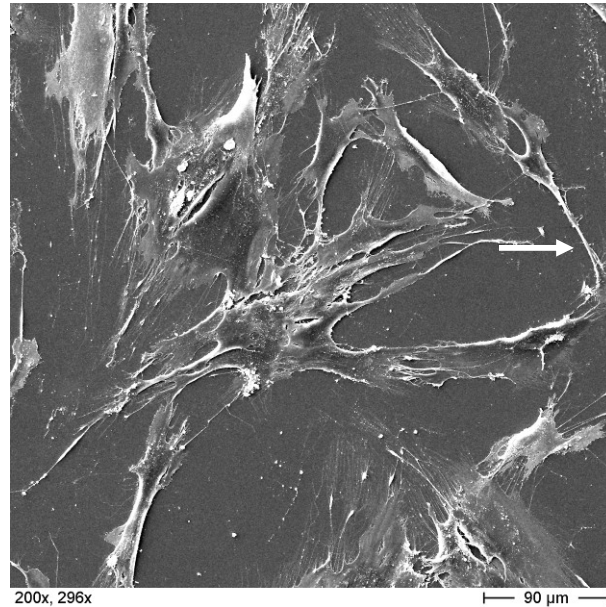


Abb. 3.7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der aus den Knochenfragmenten auswachsenden Zellen in 296facher und 1480facher Vergrößerung. Die Zellen zeigen eine spindelförmige Gestalt und sind mit Zytoplasmafortsätzen miteinander in Verbindung (Pfeile). Bei höherer Vergrößerung werden die feinen pseudopodienähnlichen Ausläufer (Pfeilspitzen) und die zentrale Zone mit Nukleus (n) und zahlreichen Zellorganellen sichtbar.

3.3 Proliferationspotential der Zellen

Ein Auswachsen von Zellen konnte in 34 von 40 Proben beobachtet werden – dies entspricht einer Erfolgsrate von 85%. Aus den Knochentransplantaten, die mit dem mechanischen Knochenschaber entnommen wurden, wuchsen bei zwei Proben keine Zellen aus. In der anderen Gruppe, in der das Piezotom verwendet wurde, konnte bei vier Proben kein Auswachsen von Zellen festgestellt werden. Es ergab sich somit kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der Auswuchsrate von Zellen ($p = 0.67$, Fischers Exakter Test). Während der gesamten Kulturperiode zeigte sich in keiner der beiden Gruppen eine mikrobielle Kontamination mit Bakterien oder Pilzen.

Die Proben wurden alle zwei Tage hinsichtlich bakterieller bzw. fungaler Kontamination und dem Auswachsen von Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop überprüft. Das Auswachsen erster adhärenter Zellen aus den Knochenstücken zeigte sich nach 7-18 Tagen. In beiden Gruppen erreichten die Zellen nach weiteren 7-21 Tagen in Kultur Konfluenz (Abb. 3.8).

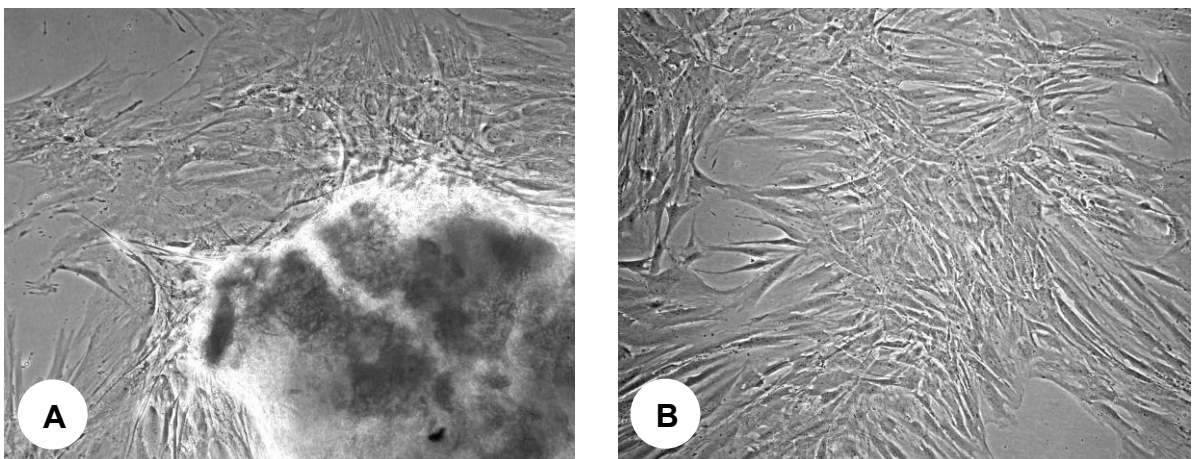


Abb. 3.8: Auswachsen der Zellen aus einem Knochentransplantat nach 7-18 Tagen (**A**). Nach einer Kulturperiode von weiteren 7-21 Tagen erreichten die Zellen Konfluenz (**B**).

3.4 Bestimmung der Zellvitalität

Nach Erreichen von Zellkonfluenz wurden die Zellen einer Vitalitätsbestimmung unterzogen. Die Zellen zeigten eine Vitalität von $94.7 \pm 2.2\%$ bei Verwendung des mechanischen Knochenschabers und eine Vitalität von $94.1 \pm 1.6\%$ bei Anwendung des Piezotoms (Abb. 3.9). Beim Vergleich beider Entnahmetechniken konnte hinsichtlich der Vitalität der auswachsenden Zellen kein Unterschied festgestellt werden ($p = 0.43$, Student's t-Test für gepaarte Proben).

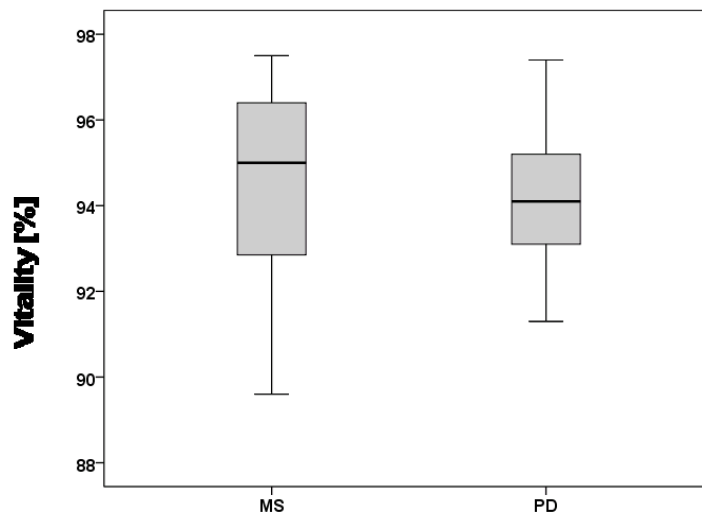


Abb.3.9: Darstellung der Zellvitalität mittels Boxplots. MS (mechanical scraper): Proben, die mit dem mechanischen Knochenschaber gewonnen wurden. PD (piezoelectric device): Proben, die mit dem Piezotom entnommen wurden.

3.5 (Immun)zytochemische Charakterisierung der Zellen

Die aus den Knochentransplantaten auswachsenden Zellen wurden bis zur Konfluenz in Kulturflaschen gezüchtet und nachfolgend auf Chamberslides weiterkultiviert, um sowohl zytochemische als auch immunzytochemische Bestimmungen zur Charakterisierung der Zellen durchführen zu können. Die alkalische Phosphatase Bestimmung musste an noch lebenden Zellen durchgeführt werden, da es sich hierbei um eine Aktivitätsbestimmung handelte. Sie zeigten sowohl in der PD- als auch in der MS-Gruppe positive alkalische Phosphatase Aktivität. Das Testen auf das Vorhandensein hoher alkalischer Phosphatase Aktivität stellt einen wichtigen Schritt zur Bestimmung der osteogenen Differenzierung dar.

Für weitere immunzytochemische Analysen konnten auch auf Chamberslides tiefgefrorene Zellen verwendet werden. Sie wurden auf das Vorhandensein von typischen Osteoblasten-Markern untersucht. Dazu gehörten unter anderem Kollagen Typ 1, Osteocalcin, Osteopontin und Osteonectin. Die Zellen beider Gruppen zeigten positive immunzytochemische Färbereaktionen auf alle vier Marker. Das Färbeergebnis visualisierte somit eine Differenzierung der Zellen in Osteoblasten, ohne Zugabe von osteogenen Differenzierungsfaktoren zum Kulturmedium.

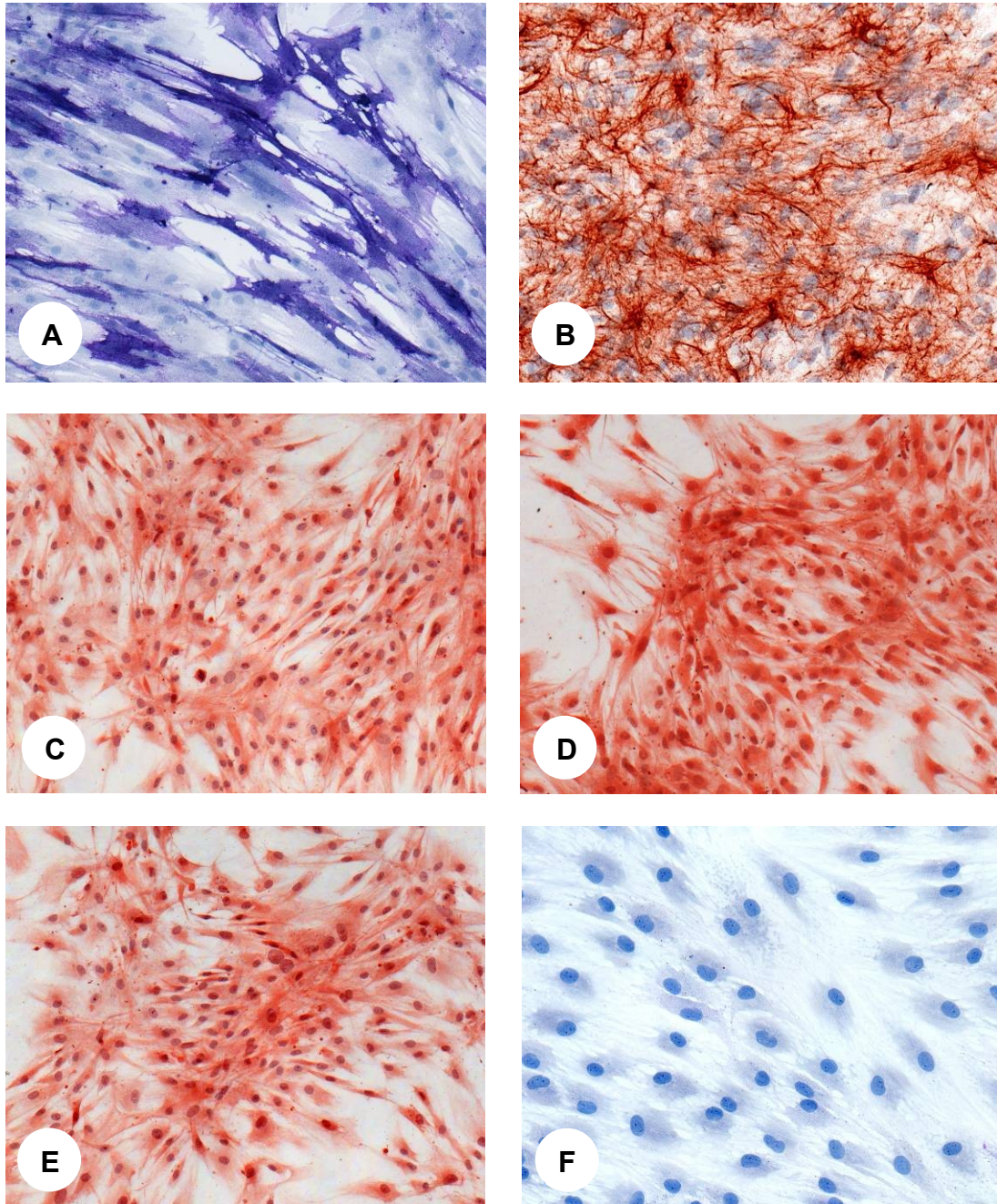


Abb. 3.10: Positives Färbeverhalten der auswachsenden Zellen für Osteoblasten-Marker. Zytochemische Detektion von alkalischer Phosphatase (A) and immuzytochemischer Nachweis von Kollagen Typ 1 (B), Osteocalcin (C), Osteonectin (D) und Osteopontin (E). Isotyp-Kontrolle (F).

3.6 Genexpressionsprofil

Die Zellen wurden nicht nur auf Proteinebene sondern auch auf RNA-Ebene phenotypisch charakterisiert. Es zeigte sich sowohl in den MS- als auch in den PD-Proben eine Expression von Alkalischer Phosphatase (ALPL), Kollagen Typ 1 (COL1), Osteonectin (SPARC, Secreted protein acidic cysteine-rich) und Osteocalcin (BGLAP, bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein), die alle samt typische Marker osteoblastärer Differenzierung darstellen (Abb.3.11).

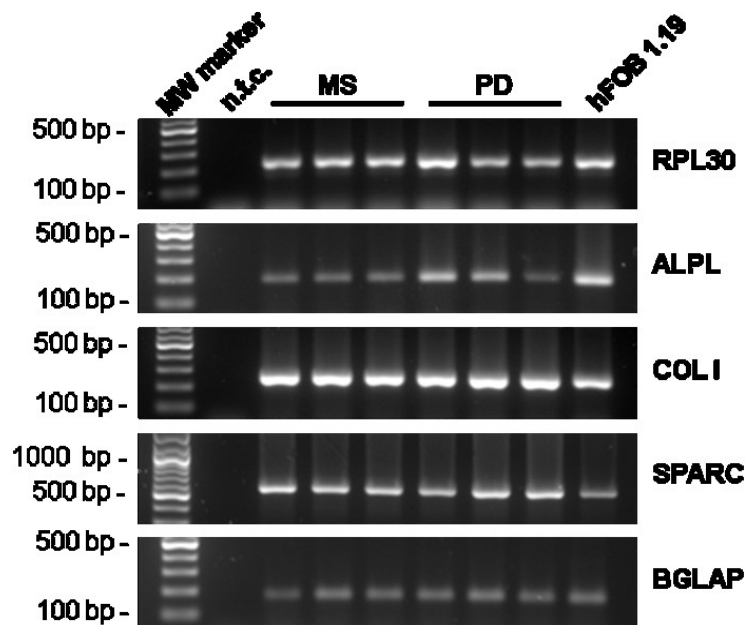


Abb. 3.11: Agarosegel-Elektrophorese der RT-PCR Produkte. Positive Expression von Alkalischer Phosphatase (ALPL), Kollagen Typ 1 (COL1), Osteonectin (SPARC), Osteocalcin (BGLAP) und dem house keeping gene ribosomales Protein L30 (RPL30) in MS- und PD-Proben. Negativ Kontrolle: PCR-Mix ohne Probe (n.t.c., no template control). Positiv Kontrolle: Humane fetale Osteoblasten 1.19 (hFOB 1.19).

3.7 Differenzierungspotential der Zellen

Um das Differenzierungspotential der auswachsenden Zellen zu testen, wurde zuerst ihr Differenzierungsstatus immunzytochemisch bestimmt und in weiterer Folge ihre Multipotenz sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene überprüft.

3.7.1 Immunzytochemische Analyse des Differenzierungsstatus

Zur Bestimmung des Differenzierungsstatus wurden zahlreiche immunzytochemische Färbungen der auswachsenden Zellen durchgeführt. Die immunzytochemischen Analysen mit kommerziell erhältlichen Primärantikörpern zeigten ein für mesenchymale Stromazellen typisches Expressionsprofil. Es konnte eine hohe Expression von CD73 (Ecto-5'-Nucleotidase), CD90 (Thy-1) und CD105 (Endoglin) festgestellt werden. Keine Expression konnte, wie erwartet, bei folgenden Markern detektiert werden: CD14 (Monozyten/Makrophagen-Marker), CD34 (Marker für hämatopoietischen Stammzellen und Endothelzellen), CD45 (Panleukozytenmarker), CD79 α (B-Lymphozyten-Marker), HLA-DR (exprimiert auf MHC-II und antigenpräsentierenden Zellen).

Die Zellen zeigten ebenfalls die für mesenchymale Stromazellen typischen morphologischen Charakteristiken, wie Mononuklearität, spindelförmige, fibroblasten-ähnliche Gestalt und Plastikadhärenz bei Kultivierung unter Standardkulturbedingungen.

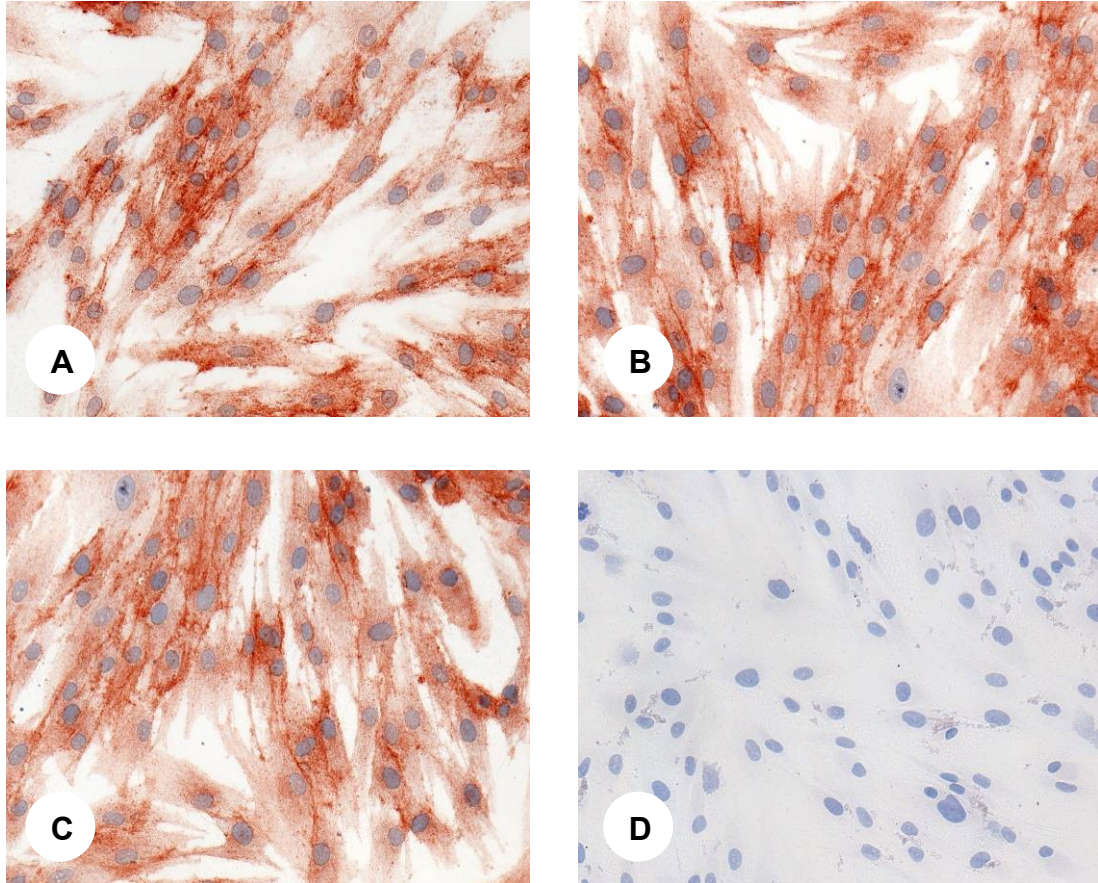


Abb. 3.12: Darstellung des Expressionsprofils der Oberflächenantigene. Die Zellen zeigen hohe Expression von CD73 (A), CD90 (B) und CD105 (C) und keine Expression von CD14 (D)

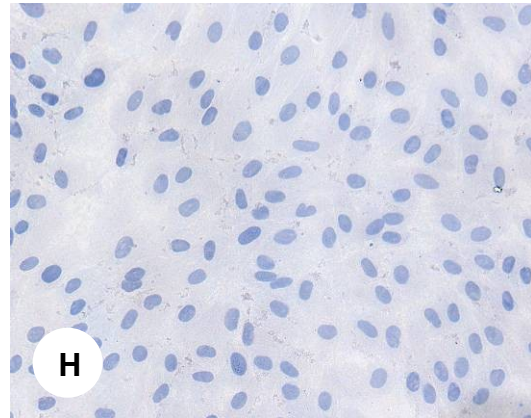
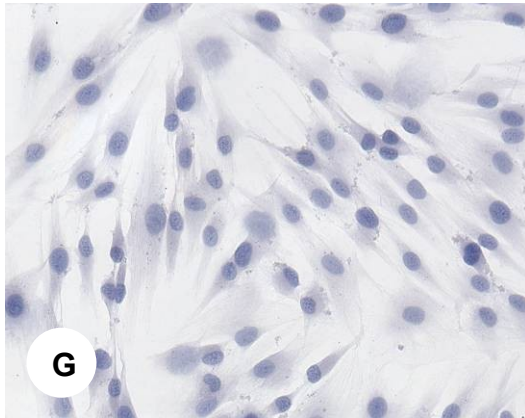
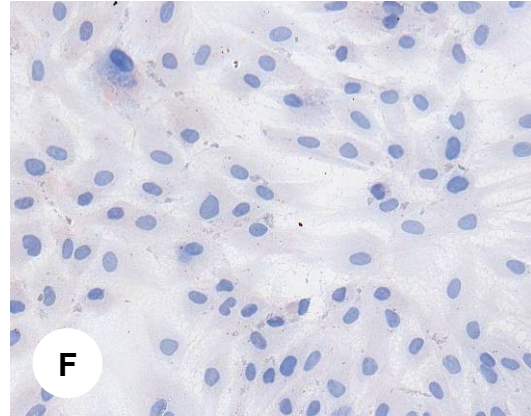
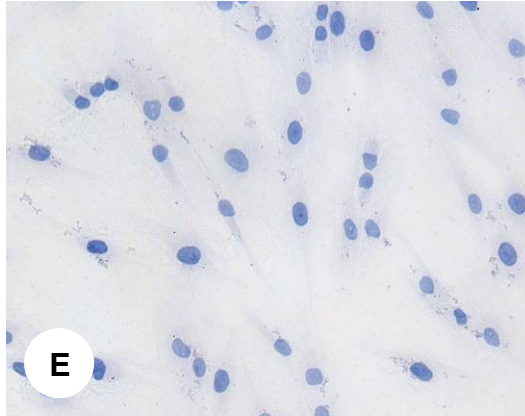


Abb. 3.13: Expressionsprofil der Oberflächenantigene. Es zeigt sich keine Expression von CD34 (**E**), CD45 (**F**), CD79 α (**G**) und HLA-DR (**H**).

3.7.2 Zytochemischer Nachweis der Multipotenz

Zu den biologischen Eigenschaften, die eine mesenchymale Stammzelle charakterisieren, zählen nicht nur die Fähigkeit zur unlimitierten Selbsterneuerung sondern auch das Potential sich in andere differenzierte Zellen mesenchymaler Abstammung, wie Osteoblasten, Chondroblasten oder Adipozyten zu verwandeln. Dieses Stammzellpotential bzw. die Multipotenz wurde auch bei den aus den Knochen auswachsenden Zellen überprüft. Sie wurden bei den nachfolgenden Experimenten als hABDCs (human alveolar bone derived cells) bezeichnet und mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (hBMSCs, human bone marrow mesenchymal stem cells) als Positivkontrolle verglichen. Für die Versuche wurden die hABDCs und hBMSCs sowohl in adipogenem, osteogenem und chondrogenem Differenzierungsmedium als auch zur Kontrolle in Standardmedium kultiviert.

Adipogenes Differenzierungspotential

Nach 21tägiger Kulturzeit in adipogenem Differenzierungsmedium zeigten sich unter dem Phasenkontrastmikroskop große, runde Zellen in deren Zytoplasma Vesikel gefüllt mit Neutralfetten zu finden waren. Die Zellen wurden mit Öl-Rot-O gefärbt, um die Lipide auch histochemisch nachzuweisen (Abb. 3.14 A, B). Verglichen mit den hBMSCs, produzierten nur eine geringe Anzahl der hABDCs Lipide. Sowohl hABDCs als auch hBMSCs, die in Standardmedium kultiviert wurden, zeigten keine Veränderungen und bildeten keine lipidhaltigen Vesikel aus.

Osteogenes Differenzierungspotential

Die Zellen wurden für 14 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert und danach einer alkalischen Phosphatase Bestimmung unterzogen. Es zeigte sich sowohl bei den hBMSCs als auch bei den hABDCs sehr hohe alkalische Phosphatase Aktivität (Abb. 3.14 C, D). In den Kontrollgruppen konnte keine alkalische Phosphatase Aktivität und somit keine osteogene Differenzierung festgestellt werden.

Chondrogenes Differenzierungspotential

Um das chondrogene Differenzierungspotential zu testen, wurden die Zellen auf Transwells zentrifugiert und 28 Tage in chondrogenem Medium kultiviert. Während dieser Kulturperiode bildeten beide Zellarten knorpelähnliche Matrix aus. Diese Knorpelmatrix wurde mit Alcian-Blau gefärbt, um selektiv Glykosaminoglycane und Mucopolysaccharide darstellen zu können. Im Vergleich mit den hBMSCs zeigte sich, dass die hABDCs eine fast annähernd gleiche Menge an knorpelähnlicher Matrix produzierten (Abb. 3.14 E, F). Die in Standardmedium kultivierten Kontrollgruppen blieben unverändert und bildeten keine knorpelähnliche Matrix aus.

hBMSCs

hABDCs

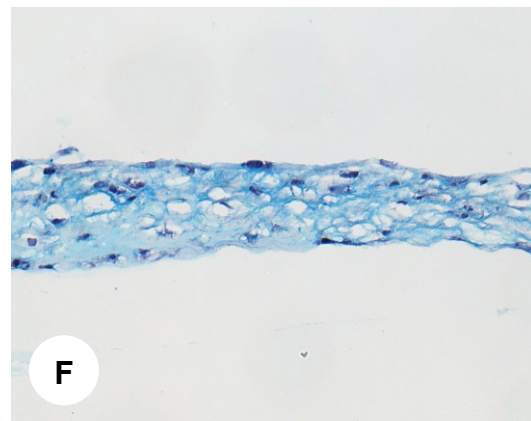
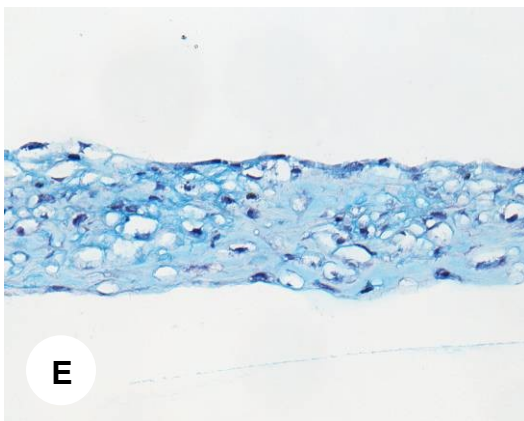
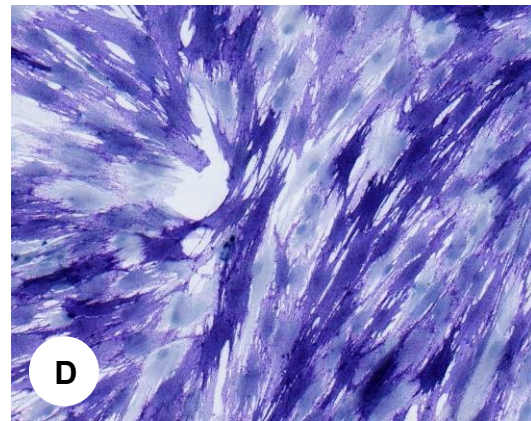
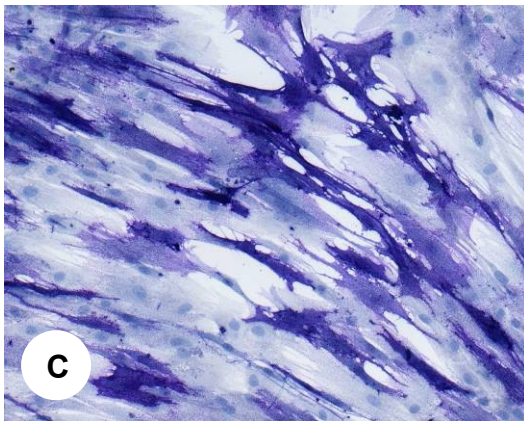
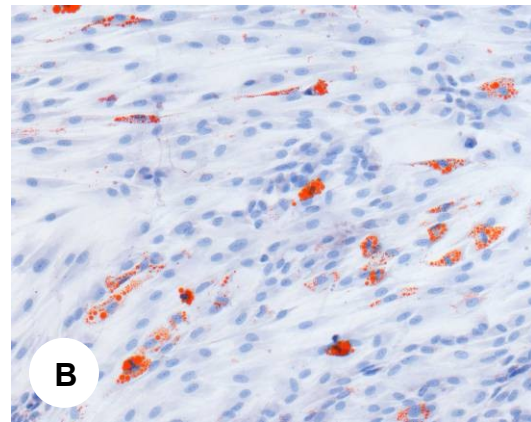
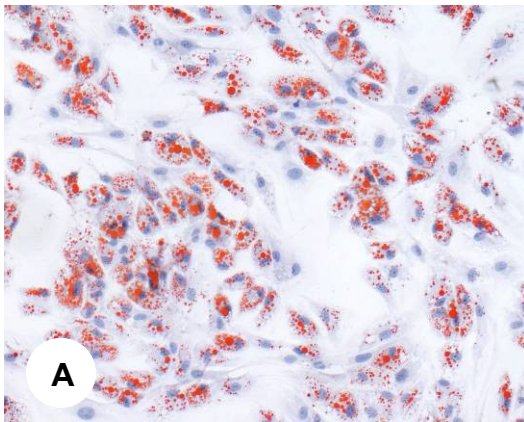


Abb. 3.14: Zytochemische Analyse des Differenzierungspotentials. Öl-Rot-O-Färbung der hBMSCs (A) und hABDCs (B). Alkalischer Phosphatase Nachweis in den hBMSCs (C) und hABDCs (D). Alcian-Blau-Färbung der Kollagenmatrix gebildet von den hBMSCs (E) und hABDCs (F)

3.7.3 Molekularbiologische Analyse der Multipotenz

Eine semiquantitative RT-PCR Analyse wurde durchgeführt, um die Level der RNA-Expression der verschiedenen Markergene für die osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierung zu vergleichen. Hierfür wurde, nach Kultivierung in den jeweiligen Differenzierungsmedien, die RNA-Expression folgender Gene der induzierten als auch der nichtinduzierten hABDCs und hBMSCs untersucht (Abb.3.15):

- Gene, die für extrazelluläre Matrixproteine kodieren und das Ausmaß der osteogenen Differenzierung wiedergeben sollen, wie BGLAP (bone gamma-carboxyglutamate gla protein, osteocalcin) und SPARC (secreted protein acidic cysteine-rich, osteonectin)
- Gene, die für Proteine (FABP4, fatty acid binding protein 4) und Enzyme (LPL, lipoprotein lipase) kodieren, die Adipozyten charakterisieren
- Gene, die für Proteine kodieren, die einen wesentlichen Bestandteil der extrazellulären Matrix des Knorpelgewebes darstellen (ACAN, Aggrecan)

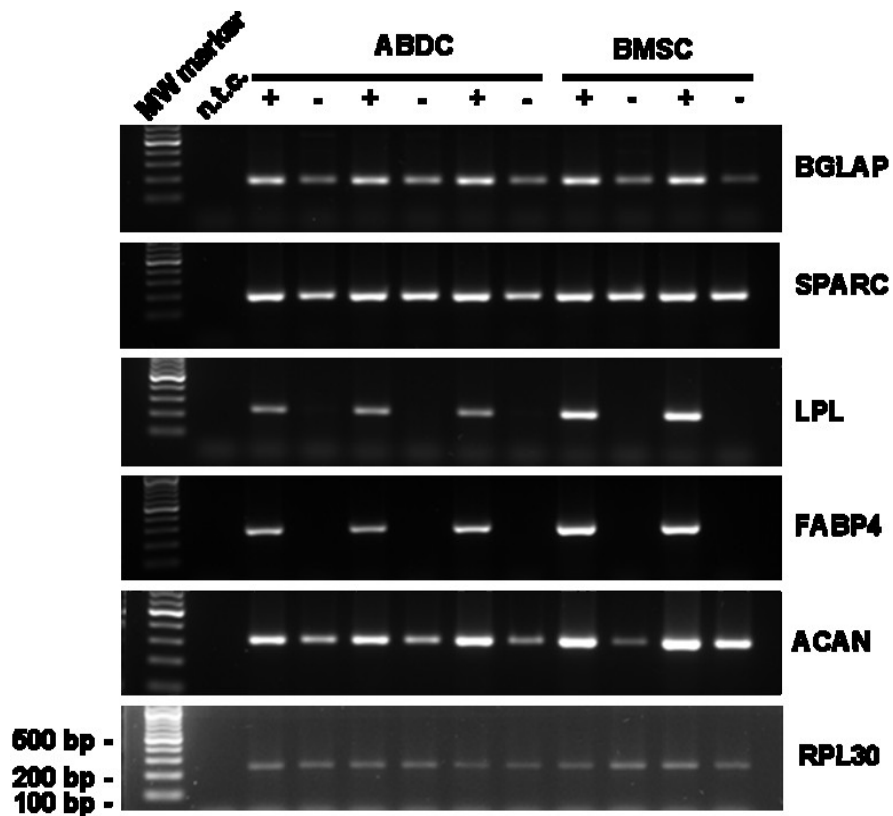


Abb. 3.15: Agarosegel-Elektrophorese der RT-PCR Produkte. Expressionsprofil von BGLAP, SPARC, LPL, FABP4 und ACAN in induzierten (+) und nichtinduzierten (-) ABDC- und BMSC-Proben. Interne Kontrolle: „house keeping gene“ ribosomales Protein L30 (RPL30). Negativ Kontrolle: PCR-Mix ohne Probe (n.t.c., no template control).

Die RNA-Expression des osteogenen Differenzierungsmarkers BGLAP steigerte sich um das Doppelte bei den induzierten hABDCs und um das Dreifache bei den hBMSCs verglichen mit den nichtinduzierten Zellen. Die SPARC-RNA-Expression nahm in beiden Gruppen nur geringfügig zu. Die RNA Expression des FABP4 Gens, das in hohen Konzentrationen in Adipozyten exprimiert wird, zeigte eine deutliche Zunahme (3-fach bei den hABDCs und 7-fach bei hBMSCs) im Vergleich mit den Kontrollzellen. Eine ebenso deutliche Zunahme konnte bei der Expression der LPL verzeichnet werden, die 8- bis 15-fach höhere Level erreichte als in der Kontrollgruppe. Die Zunahme des chondrogenen Differenzierungsmarkers ACAN war in beiden Gruppen annähernd gleich und zeigte 2-fach höhere Level verglichen mit den Kontrollen (Abb. 3.16).

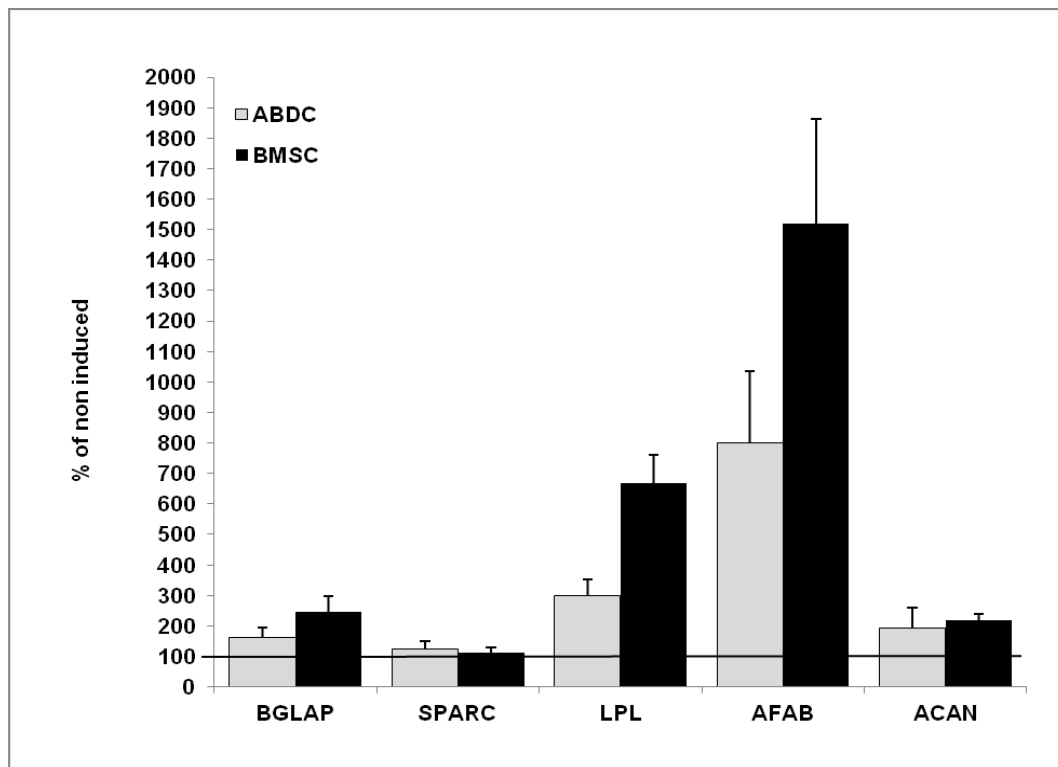


Abb. 3.16: Semiquantitative Analyse der mRNA-Expression in induzierten und nichtinduzierten hABDCs und hBMSCs. Die Expressionsraten von BGLAP, SPARC, LPL, AFAB und ACAN wurden nach Densitometrie der Banden berechnet. Nichtinduzierte hABDCs und hBMSCs dienten als Kontrollen und wurden als 100%-Marke dargestellt. Die Daten (+/- SD) wurden als Prozentwerte von den nichtinduzierten Kontrollen angeben.

4. Diskussion

4.1 Evaluierung der klinischen Anwendbarkeit zweier Techniken zur intraoralen Entnahme autologen Knochenmaterials

Ziel dieser Arbeit war es, zwei Techniken zur intraoralen Entnahme autologen Knochenmaterials hinsichtlich ihrer klinischen Anwendbarkeit zu prüfen. Dabei wurde ein konventioneller mechanischer Knochenschaber mit einem piezoelektrischen Knochenschaber (Piezotom) verglichen. Um die verschiedenen Fragestellungen beantworten und die unterschiedlichen Zwischenziele der Studie erreichen zu können, wurden die Knochentransplantate und die daraus auswachsenden Zellen elektronenmikroskopisch untersucht, die Zellen auf Protein- und RNA-Ebene phenotypisch charakterisiert und ihr Differenzierungspotential getestet. Die Analyse der Ergebnisse zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Techniken zur autologen Knochenentnahme. Aus klinischer Sicht scheinen beide Methoden gleich effektiv zu sein, da es mit beiden Instrumenten möglich ist, ähnliche Mengen autologen Knochenmaterials minimal invasiv zu gewinnen.

Die elektronenmikroskopischen Analysen zeigten deutliche Unterschiede in der Ultrastruktur der untersuchten Knochenfragmente. Jene Knochenstückchen, die mit dem mechanischen Knochenschaber (MS, mechanical bone scraper) entnommen wurden, zeigten eine Vielzahl an Blutzellen an ihrer Oberfläche. Für die Entnahme von Knochenmaterial mit dem MS benötigte man keine Spülung um das angrenzende Gewebe vor Überhitzung zu schützen – im Gegensatz zur Anwendung des piezoelektrischen Knochenschabers (PD, piezoelectric device, Piezotom). Da somit die Vitalität des Knochengewebes besser erhalten blieb und die im Blut und im Gewebe vorhandenen Wachstumsfaktoren und Signalstoffe nicht ausgeschwemmt wurden, könnte dies ein Grund für die geringfügig bessere Auswuchsrate von Zellen in der MS-Gruppe sein, die sich aber statistisch als nicht signifikant erwies. Ein Auswachsen von Zellen aus den Knochentransplantaten

wurde in 90% (18 Proben) der MS-Gruppe und in 80% (16 Proben) der PD-Gruppe beobachtet.

Die geringere Auswuchsrate in der PD-Gruppe könnte auch durch eine mögliche Überhitzung des Knochengewebes bedingt sein, die trotz Spülung manchmal nicht zu vermeiden ist. Die thermale Schädigung des Gewebes stellt gerade in der Piezochirurgie einen großen Nachteil dar (51). Intraossäre Hyperämie beginnt bereits bei 40 °C und Resorptionsprozesse treten bei ca. 47°C auf (52). Harder et al beschreibt, dass es zu einer Temperaturzunahme im Gewebe von durchschnittlich 3°C bei korrekter Anwendung des Piezotoms kommt (51).

Eine weitere Ursache, die in diesem Fall zu tragen kommt, könnte der vermehrte Anpressdruck sein, der bei Anwendung des Piezotoms nötig ist. Dabei wird nicht nur das Gewebe mechanisch geschädigt sondern auch die Wärmeentwicklung steigert sich. Ebenso beeinflussen sowohl die verwendeten Geräteeinstellungen wie die Schnittfrequenz und Vibrationsgeschwindigkeit als auch die Designs der verschiedenen Aufsätze und die Schärfe der Schneide die Höhe der Gewebeerwärmung (53).

Weiters zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Zellvitalität bei den kultivierten Zellen, die $94.7 \pm 2.2\%$ in der MS-Gruppe und $94.1 \pm 1.6\%$ in der PD-Gruppe betrug. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Chiriac et al. Dieser beschrieb eine Vitalität von 87.9% in Proben, die mit einem piezoelektrischen Instrument gewonnen wurden (54).

Die Zellvitalität wird unter anderem durch die Größe der gewonnen Knochenfragmente bestimmt. Eine experimentelle Studie bei Affen zeigte beispielsweise, dass Partikel mit einer Größe von 125-1000 μm ein höheres osteogenes Potential besitzen als Partikel, die kleiner als 125 μm sind und leichter resorbiert werden (55). Chiriac et al. jedoch beschrieb, dass die Größe der Knochenstückchen, die bei dieser Studie $486 \pm 355 \mu\text{m}$ betrug, keinen Einfluss auf das Auswachsen von Zellen, die Proliferation, Vitalität und Differenzierung hat (54). Essentiell für die Zellvitalität scheint aber, bei der Anwendung von piezoelektrischen Geräten, eine suffiziente Kühlung des Gewebes durch Spülung mit Wasser zu sein. Man sollte jedoch bedenken, dass bei der Spülung auch Blut, Nährstoffe und andere notwendige Wachstums- und Differenzierungsfaktoren herausgewaschen werden und sich dies wieder negativ auf die Vitalität der Zellen auswirken kann.

Die Zellvitalität kann auch durch Kontamination mit Pilzen oder Bakterien beeinträchtigt werden. Bei der Verwendung des Piezotoms müssen die Knochenstückchen in einer Knochenfalle, die in den Absaugschlauch integriert ist, gesammelt werden. Dies birgt das Risiko einer bakteriellen oder fungalen Kontamination durch die mikrobielle Keimflora der Mundhöhle, die in hohen Konzentrationen im Speichel, auf der Schleimhaut und den Zahnoberflächen präsent ist (56). Eine Möglichkeit diese Verunreinigung in der Piezochirurgie zu umgehen, besteht in der Verwendung zweier getrennter Absaugsysteme. Das Risiko einer Kontamination kann auch durch die präoperative Desinfektion der Mundhöhle mit Chlorhexidin reduziert werden (57). Effektiver ist jedoch die Behandlung der gewonnenen Knochenproben mit Rifamycin (56). In dieser Studie wurde die Spülung der Knochenproben mit einer Pufferlösung, die mit Antibiotika und Antimykotika ergänzt wurde, einer präoperativen Desinfektion vorgezogen. Es zeigte sich bei keiner Probe eine mikrobiologische Kontamination.

Bei Benützung des mechanischen Knochenschabers ist keine Knochenfalle nötig, um Knochenfragmente zu sammeln. Deshalb ist auch das Risiko einer Kontamination geringer als bei Verwendung piezoelektrischer Geräte. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass zur Kühlung des Gewebes nicht gespült werden muss und auf diese Weise die Knochenfragmente mit Blut benetzt bleiben. Dies wirkt sich positiv auf die Zellvitalität und das regenerative Potential aus (53,58). Diese Beobachtung wird in dieser Studie auch von den elektronenmikroskopischen Untersuchungen gestützt.

Bei der Interpretation der Daten bezüglich der Zellvitalität, sollte aber berücksichtigt werden, dass beide Instrumente bei ein und derselben Operation angewandt wurden. Dies könnte negative Auswirkungen auf die an zweiter Stelle gewonnenen Knochentransplantate haben. Um diese Effekte zu vermeiden, wurden beide Geräte nicht hintereinander an derselben Spenderregion verwendet, sondern das zuletzt verwendete Gerät an einer der ersten Entnahmeregion angrenzenden Stelle.

Bei dieser Studie wurden bewusst beide Knochenschaber an demselben Patienten bzw. an derselben Patientin angewandt, um interindividuelle Unterschiede bezüglich des Regenerationspotentials des Transplantatgewebes ausschließen zu können. Die Qualität des Knochengewebes wird nämlich nicht nur vom Alter des Patienten/der Patientin bestimmt sondern auch von anderen

Faktoren wie Lebensstil- (z.B. Raucher versus Nichtraucher) oder genetischen Faktoren.

Zusammenfassend kann aber festgehalten werden, dass der mechanische Knochenschaber eine einfache und sichere Methode darstellt, vitale Zellen zur Knochenregeneration zu gewinnen. Die Knochenentnahme mit piezoelektrischen Instrumenten, die in Studien als weniger traumatischere Methode zur Knochengewinnung angepriesen wird, zeigt keine Vorteile gegenüber den herkömmlichen mechanischen Methoden. Im klinischen Kontext stellen beide Instrumente adäquate Methoden zur Entnahme autologen Knochenmaterials dar, mit gutem Regenerationspotential und ohne erhöhter postoperativer Morbidität.

4.2 Differenzierung humaner Knochenvorläuferzellen und ihre potentiellen Anwendungen im Kontext des Tissue-Engineerings

In dieser Arbeit war nicht nur die Vitalität der auswachsenden Zellen von besonderer klinischer Relevanz, sondern auch deren Differenzierung. Es war wichtig festzustellen, dass die Zellen osteogenes Potential besaßen, da nur Osteoblasten Knochenmatrix produzieren und so ein erfolgreiches Einwachsen des Transplantats in die Empfängerregion ermöglichen können. Die osteogene Differenzierung der Zellen wurde sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene bestätigt. Dabei muss beachtet werden, dass zur Bestimmung der osteogenen Differenzierung ein einziger Marker oft nicht ausreicht, sondern es notwendig ist mehrere Marker in Kombination zu testen.

Die alkalische Phosphatase ist einer der wichtigsten Marker osteogener Differenzierung und ist am stärksten in der Phase der Matrixreifung exprimiert. Eine stark positive alkalische Phosphatase Reaktion konnte sowohl in der MS- als auch in der PD-Gruppe nachgewiesen werden und indizierte, dass es sich hierbei um Präosteoblasten oder Osteoblasten handelte. Ein positiver Nachweis von alkalischer Phosphatase zeigte ebenso, dass viele Präosteoblasten und Osteoblasten die Prozedur überlebten und nach der Gewinnung der Knochenfragmente noch vital sind. Hoegel et al. beispielsweise untersuchte Knochenfragmente hinsichtlich der Vitalität der noch enthaltenen Zellen indem er die alkalische Phosphatase Aktivität bestimmte (59). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass nicht nur das Auswachsen von Zellen aus einem Transplantat sondern auch die Enzymaktivität wichtige Informationen bezüglich der Vitalität der Zellen im Transplantat liefert.

Osteocalcin gilt zurzeit als das am meisten knochenspezifische nichtkollagenöse Matrixprotein. Ein positiver Nachweis in beiden Gruppen zeigte an, dass sich in der Kultur hauptsächlich reifere Osteoblasten befanden (60).

Osteopontin und Osteonectin sind weniger spezifische Markerproteine, da sie nicht ausschließlich von Osteoblasten synthetisiert werden. Sie stellen aber in Kombination mit anderen Markern eine durchaus sinnvolle Ergänzung zur Bestimmung der Differenzierung dar. Das Vorhandensein weist auf ein eher

fortgeschrittenes Entwicklungsstadium hin (22). In allen Kulturen konnte auch ein positiver Nachweis von Kollagen Typ 1, das den Hauptbestandteil des organischen Anteils der Knochenmatrix bildet, erbracht werden.

Die osteogene Potenz der Zellen konnte in beiden Gruppen somit eindeutig festgestellt werden, nicht jedoch ihr Differenzierungsstadium. Dabei ist nämlich zu bedenken, dass eine Zellkultur immer eine Mischung aus unterschiedlich weit differenzierten Zellen darstellt und sich die Zellen somit in verschiedenen Differenzierungsstadien befinden.

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, das Differenzierungspotential der auswachsenden Zellen, die in weiterer Folge als hABDCs (human alveolar bone derived cells) bezeichnet werden, mit hBMSCs (human bone marrow stromal cells) zu vergleichen. Wir konnten zeigen, dass hABDCs, die aus Knochenproben der Linea obliqua gewonnen wurden, ein zu den hBMSCs, die aus Knochenmarksaspiraten des Beckenkamms isoliert wurden, vergleichbares Differenzierungspotential aufwiesen.

In der gegenwärtigen Literatur werden verschiedenen Methoden zur Etablierung von humanen Knochenzell-Kulturen beschrieben, entweder mit oder ohne vorheriger Behandlung der Knochenfragmente mit Kollagenase (47,61,62). In dieser Studie verwendete man keine Vorbehandlung mit Kollagenase zur Isolation der Knochenzellen, um eine mögliche Beeinträchtigung der Zellvitalität durch die enzymatische Verdauung zu vermeiden. Man bediente sich der Methode der Explantkultur, um Zellen zu selektionieren, die selbst die Fähigkeit besitzen sich aus der Knochenmatrix los zu lösen und aus den Knochentransplantaten auszuwachsen. Auf diese Weise kann man am besten die Situation in vivo nachahmen, wo Zellen im Zuge eines Reparaturprozesses bei Knochendefekten ebenso aus der angrenzenden Region immigrieren und die ursprüngliche Struktur wiederherstellen.

Die morphologischen Analysen der hABDCs mit dem Phasenkontrastmikroskop zeigten, dass diese in Kultur expandierten Zellen eine fibroblastenähnliche, spindelförmige Gestalt hatten. Viele Autoren postulieren dies als ein morphologisches Hauptmerkmal von mesenchymalen Stromazellen (MSCs) (12,63). Außerdem präsentierten sie sich auf Plastik adhärent wachsend, eine ebenfalls gutbeschriebene Eigenschaft der MSCs (63,64). Im Vergleich mit den hBMSCs ergaben sich somit keine Unterschiede bezüglich der Morphologie.

Um das Differenzierungspotential der hABDCs zu evaluieren, wurden sie zusammen mit den hBMSCs in Richtung der adipogenen, chondrogenen und osteogenen Linien differenziert und die Ergebnisse der Experimente sowohl zytochemisch als auch molekularbiologisch analysiert. Obwohl die hABDCs ein geringeres Differenzierungspotential aufwiesen als die hBMSCs, konnte doch deutlich gezeigt werden, dass sie die Fähigkeit besitzen, sich in drei unterschiedliche mesenchymale Zelllinien zu entwickeln. Es kann angenommen werden, dass die hABDCs eine heterogene Zellpopulation darstellen, die noch nicht ausdifferenzierte Vorläuferzellen enthält. Diese Vorläuferzellen sind in ihrer Potenz eingeschränkter als MSCs. Sie sind nicht multipotent wie MSCs, sondern nur mehr bi- oder tripotent, was bedeutet, dass sie sich noch in zwei oder drei andere Zelltypen entwickeln können. Aus diesen tri- oder bipotenten Vorläuferzellen entwickeln sich in weiterer Folge Progenitoren, deren Entwicklungsweg schon festgelegt ist. In dieser Studie entwickelten sich durch Induktion in unterschiedlichen Differenzierungsmedien osteogene, chondrogene und adipogene Progenitorzellen.

Somit konnte gezeigt werden, dass nicht nur Knochenmarksstroma, sondern auch andere Gewebearten mesenchymaler Herkunft, wie der Alveolarknochen, mesenchymale Vorläuferzellen enthält. Die durch Explantkulturen gewonnenen hABDCs stellen eine leicht zu isolierende und in vitro expandierende Zellpopulation dar. Sie können minimal invasiv unmittelbar aus dem Operationsgebiet, beispielsweise bei der operativen Entfernung retinierter Weisheitszähne, gewonnen werden, sodass kein zusätzlicher Eingriff damit verbunden ist. Dies stellt im Gegensatz zur Gewinnung von MSCs aus Knochenmarksaspiraten des Beckenkamms einen bedeutenden Vorteil dar. In der Praxis bedeutet dies, einen höheren Patientenkomfort, geringere postoperative Morbidität, sowie Kostenreduktion, da die Risiken und der Mehraufwand, die mit einer Knochenentnahme an einer weiter entfernten Region verbunden sind, nicht zu tragen kommen. Außerdem können die hABDCs, aufgrund ihrer Fähigkeit sich in unterschiedliche mesenchymale Zelltypen zu differenzieren, für die regenerative Medizin von großem Interesse sein. So könnten sie beispielsweise in zellbasierten Behandlungsmethoden von Hart- und Weichteildefekten in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie Anwendung finden.

Es sollte jedoch bedacht werden, dass das Verhalten der Zellen in vitro ein experimentelles Modell darstellt, das nicht alle komplexen Interaktionen der Zellen und ihrer Umgebung, wie beispielsweise die Beeinflussung durch Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine, nachbilden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen lediglich die Basis für zukünftige Forschung auf diesem Gebiet dar. Nachfolgende Studien sind nötig um die Erkenntnisse über das tripotente Differenzierungspotential der hABDCs in in vivo Transplantationsversuch zu verifizieren, da nur in vivo Experimente die komplexe Situation in einem lebenden Organismus nachahmen können.

5. Referenzen

- (1) Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. Germany: Georg Thieme Verlag; 2006. p. 142-162.
- (2) Bucher O, Wartenberg H. Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Germany: Verlag Hans Huber; 1997. p. 129-140.
- (3) Junqueira LC, Carneiro J, Kelly OR. Histologie. In: Gratzl M, editor. Germany: Springer Verlag; 2002. p. 91-106.
- (4) Marks SC, Odgren PR. Structure and Development of the Skeleton. In: Bilezikian,J.P.; Raisz,L.G.; Rodan,G.A. "Principles of Bone Biology" USA: Academic Press; 2002. p. 3-15.
- (5) Aubin JE. Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. In: Bilezikian,J.P.; Raisz,L.G.; Martin,T.J. "Principles of Bone Biology". United States: Academic Press; 2008. p. 85-108.
- (6) Aubin JE, Turksen K, Heersche JNM. Osteoblastic Cell Lineage. In: Noda,M."Cellular and Molecular Biology of Bone". United States: Academic Press; 1993. p. 1-47.
- (7) Klein-Nulend J, Bonewald LF. The Osteocyte. In: Bilezikian,J.P.; Raisz,L.G.; Martin,T.J. "Principles of Bone Biology". USA: Academic Press; 2008. p. 153-174.
- (8) Väänänen HK, Zhao H. Osteoclast Function: Biology and Mechanisms. In: Bilezikian,J.P.; Raisz,L.G.; Martin,T.J. "Principles of Bone Biology". United States: Academic Press; 2008. p. 193-210.
- (9) Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet 1970 Oct;3(4):393-403.
- (10) Sell S. Stem Cells: What are they? Where do they come from? Why are they here? When do they go wrong? Where are they going? In: Sell,S. "Stem Cells Handbook". United States: Humana Press; 2004. p. 1-18.
- (11) Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp Hematol 1974;2(2):83-92.
- (12) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999 Apr 2;284(5411):143-147.

- (13) König J, Huppertz B, Desoye G, Parolini O, Fröhlich JD, Weiss G, et al. Amnion-Derived Mesenchymal Stromal Cells Show Angiogenic Properties but Resist Differentiation into Mature Endothelial Cells. *Stem Cells Dev* 2011 Sep 6. [Epub ahead of print]
- (14) Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells. In: Lanza,R.; Blau,H.; Melton,D.; et al."Handbook of Stem Cells". United States: Elsevier Academic Press; 2004. p. 299-308.
- (15) Dennis ED, Caplan AI. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. In: Sell,S. "Stem Cells Handbook". United States: Humana Press; 2004. p. 107-118.
- (16) Aubin JE. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30-31:73-82.
- (17) Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* 1998;76(6):899-910.
- (18) Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2001 Jan;2(1):81-94.
- (19) Bou-Gharios G, de Crombrughe B. Type I Collagen Structure, Synthesis, and Regulation. In: Bilezikian,J.P.; Raisz,L.G.; Martin,T.J. "Principles of Bone Biology". United States: Academic Press; 2008. p. 285-318.
- (20) Dallas SL, Alliston T, Bonewald LF. Transforming Growth Factor-beta. In: Bilezikian,J.P.; Raisz,L.G.; Martin,T.J. "Principles of Bone Biology". United States: Academic Press; 2008. p. 1145-1166.
- (21) Noda M, Denhardt DT. Osteopontin. In: Bilezikian,J.P.; Raisz,L.G.; Martin,T.J. "Principles of Bone Biology". United States: Academic Press; 2008. p. 351-366.
- (22) Hughes JF, Aubin JE. Culture of cells of the osteoblast lineage. In: Arnett,T.R.; Henderson,B. "Methods in Bone Biology" UK: Chapman & Hall Ltd; 1998. p. 1-49.
- (23) Gehron-Robey P. Noncollagenous Bone Matrix Proteins. In: Bilezikian,J.P.; Raisz,L.G.; Martin,T.J. "Principles of Bone Biology". USA: Academic Press; 2008. p. 335-350.
- (24) Whyte MP. Hypophosphatasia: Nature's Window on Alkaline Phosphatase Funktion in Humans. In: Bilezikian,J.P.; Raisz,L.G.; Martin,T.J. "Principles of Bone Biology". United States: Academic Press; 2008. p. 1573-1598.
- (25) Tscheliessnigg KH, Uranüs S, Pierer G. Lehrbuch der Allgemeinen und Speziellen Chirurgie. Austria: Wilhelm Maudrich; 2003. p. 345-353.
- (26) Terheyden H. Aktuelle Knochenaufbaumethoden. In: Horch,H.H. "Zahnärztliche Chirurgie" Germany: Urban & Fischer; 2003. p. 346-383.

- (27) Bernhart T, Koffler G. Knochenregenerationsmaterialien. In: Schroll,K.; Watzek,G. "Zahnärztliche Chirurgie" AUSTRIA: Wilhelm Maudrich; 1997. p. 281-292.
- (28) Acil Y, Terheyden H, Dunsche A, Fleiner B, Jepsen S. Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. J Biomed Mater Res 2000 Sep 15;51(4):703-710.
- (29) Jakse N, Seibert FJ, Lorenzoni M, Eskici A, Pertl C. A modified technique of harvesting tibial cancellous bone and its use for sinus grafting. Clin Oral Implants Res 2001 Oct;12(5):488-494.
- (30) Block MS, Kent JN. Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. J Oral Maxillofac Surg 1997 Nov;55(11):1281-1286.
- (31) Behneke A, Behneke N, d'Hoedt B. Treatment of peri-implantitis defects with autogenous bone grafts: six-month to 3-year results of a prospective study in 17 patients. Int J Oral Maxillofac Implants 2000 Jan-Feb;15(1):125-138.
- (32) Esposito M, Grusovin MG, Felice P, Karatzopoulos G, Worthington HV, Coulthard P. The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants - a Cochrane systematic review. Eur J Oral Implantol 2009 Autumn;2(3):167-184.
- (33) Malo P, de Araujo Nobre M. A new approach for maxilla reconstruction. Eur J Oral Implantol 2009 Summer;2(2):101-114.
- (34) Sbordone L, Toti P, Menchini-Fabris GB, Sbordone C, Piombino P, Guidetti F. Volume changes of autogenous bone grafts after alveolar ridge augmentation of atrophic maxillae and mandibles. Int J Oral Maxillofac Surg 2009 Oct;38(10):1059-1065.
- (35) Lezcano FJ, Cagigal BP, Cantera JM, de la Pena Varela G, Blanco RF, Hernandez AV. Technical note: medial approach for proximal tibia bone graft using a manual trephine. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007 Jul;104(1):e11-7.
- (36) Kainulainen VT, Kainulainen TJ, Oikarinen KS, Carmichael RP, Sandor GK. Performance of six bone collectors designed for dental implant surgery. Clin Oral Implants Res 2006 Jun;17(3):282-287.
- (37) Johansson LA, Isaksson S, Lindh C, Becktor JP, Sennerby L. Maxillary sinus floor augmentation and simultaneous implant placement using locally harvested autogenous bone chips and bone debris: a prospective clinical study. J Oral Maxillofac Surg 2010 Apr;68(4):837-844.
- (38) Chiapasco M, Gatti C, Gatti F. Immediate loading of dental implants placed in severely resorbed edentulous mandibles reconstructed with autogenous calvarial grafts. Clin Oral Implants Res 2007 Feb;18(1):13-20.

- (39) Labanca M, Azzola F, Vinci R, Rodella LF. Piezoelectric surgery: twenty years of use. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008 Jun;46(4):265-269.
- (40) Vercellotti T. Technological characteristics and clinical indications of piezoelectric bone surgery. *Minerva Stomatol* 2004 May;53(5):207-214.
- (41) Vercellotti T, De Paoli S, Nevins M. The piezoelectric bony window osteotomy and sinus membrane elevation: introduction of a new technique for simplification of the sinus augmentation procedure. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001 Dec;21(6):561-567.
- (42) Vercellotti T, Pollack AS. A new bone surgery device: sinus grafting and periodontal surgery. *Compend Contin Educ Dent* 2006 May;27(5):319-325.
- (43) Tete S, Vinci R, Zizzari V, Cingano L, Bollero R, D'Apolito G, et al. Evaluation of effects on bone tissue of different osteotomy techniques. *J Craniofac Surg* 2009 Sep;20(5):1424-1429.
- (44) Schlee M, Steigmann M, Bratu E, Garg AK. Piezosurgery: basics and possibilities. *Implant Dent* 2006 Dec;15(4):334-340.
- (45) Eggers G, Klein J, Blank J, Hassfeld S. Piezosurgery: an ultrasound device for cutting bone and its use and limitations in maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2004 Oct;42(5):451-453.
- (46) von See C, Rucker M, Kampmann A, Kokemuller H, Bormann KH, Gellrich NC. Comparison of different harvesting methods from the flat and long bones of rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2010 Dec;48(8):607-612.
- (47) Springer IN, Terheyden H, Geiss S, Harle F, Hedderich J, Acil Y. Particulated bone grafts--effectiveness of bone cell supply. *Clin Oral Implants Res* 2004 Apr;15(2):205-212.
- (48) Pradel W, Tenbrieg P, Lauer G. Influence of harvesting technique and donor site location on in vitro growth of osteoblastlike cells from facial bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005 Nov-Dec;20(6):860-866.
- (49) Lindl T. Zell- und Gewebekultur. Germany: Spektrum Akademischer Verlag; 2002. p. 85-102.
- (50) Colliex C. Elektronenmikroskopie: Eine anwendungsbezogene Einführung. Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2008. p. 12-67.
- (51) Harder S, Wolfart S, Mehl C, Kern M. Performance of ultrasonic devices for bone surgery and associated intraosseous temperature development. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009 May-Jun;24(3):484-490.
- (52) Grundner U, Strub JR. Die Problematik der Temperaturerhöhung beim Bearbeiten des Knochens mit rotierenden Instrumenten. Eine Literaturübersicht. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 1986;96:956-959.

- (53) Cardoni A, MacBeath A, Lucas M. Methods for reducing cutting temperature in ultrasonic cutting of bone. *Ultrasonics* 2006 Dec 22;44 Suppl 1:e37-42.
- (54) Chiriac G, Herten M, Schwarz F, Rothamel D, Becker J. Autogenous bone chips: influence of a new piezoelectric device (Piezosurgery) on chip morphology, cell viability and differentiation. *J Clin Periodontol* 2005 Sep;32(9):994-999.
- (55) Shapoff CA, Bowers GM, Levy B, Mellonig JT, Yukna RA. The effect of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogeneic freeze-dried bone and autogenous marrow. *J Periodontol* 1980 Nov;51(11):625-630.
- (56) Sivoilella S, Berengo M, Scarin M, Mella F, Martinelli F. Autogenous particulate bone collected with a piezo-electric surgical device and bone trap: a microbiological and histomorphometric study. *Arch Oral Biol* 2006 Oct;51(10):883-891.
- (57) Young MP, Carter DH, Worthington H, Korachi M, Drucker DB. Microbial analysis of bone collected during implant surgery: a clinical and laboratory study. *Clin Oral Implants Res* 2001 Apr;12(2):95-103.
- (58) Zaffe D, D'Avenia F. A novel bone scraper for intraoral harvesting: a device for filling small bone defects. *Clin Oral Implants Res* 2007 Aug;18(4):525-533.
- (59) Hoegel F, Mueller CA, Peter R, Pfister U, Suedkamp NP. Bone debris: dead matter or vital osteoblasts. *J Trauma* 2004 Feb;56(2):363-367.
- (60) Aubin JE, Turksen K. Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblast lineage. *Microsc Res Tech* 1996 Feb 1;33(2):128-140.
- (61) de Assis AF, Beloti MM, Crippa GE, de Oliveira PT, Morra M, Rosa AL. Development of the osteoblastic phenotype in human alveolar bone-derived cells grown on a collagen type I-coated titanium surface. *Clin Oral Implants Res* 2009 Mar;20(3):240-246.
- (62) Rosa AL, Crippa GE, de Oliveira PT, Taba M, Jr, Lefebvre LP, Beloti MM. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. *Clin Oral Implants Res* 2009 May;20(5):472-481.
- (63) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-317.
- (64) Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7(5):393-395.

6. Anhang

Originalarbeiten, publizierte Abstracts und Präsentationen bei wissenschaftlichen Veranstaltungen, die im Rahmen dieser Dissertation entstanden sind:

2012

Originalarbeiten (Zeitschrift)

Pekovits, K; Wildburger, A; Payer, M; Hutter, H; Jakse, N; Dohr, G

Evaluation of graft cell viability-efficacy of piezoelectric versus manual bone scraper technique.

J Oral Maxillofac Surg. 2012; 70(1):154-162

2011

Abstracts (Zeitschrift) / Präsentationen

Pekovits, K; Wildburger, A; Payer, M; Jakse, N; Dohr, G; Hutter, H

Differentiation Analysis of Alveolar Bone derived Mesenchymal Stromal Cells (Al-MSCs) and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSc): A comparison. Proceedings of the 51. Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. 2011; -51th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (ASCB); DEC 3-7, 2011; Denver, USA. [Poster]

Pekovits, K; Dohr, G; Hutter, H

Are alveolar bone derived cells an ideal source for tissue engineering?

Proceedings of the 1st Doctoral Day. 2011; -1st Doctoral Day 2011; NOV 4, 2011; Graz, AUSTRIA. [Poster]

Pekovits, K; Wildburger, A; Payer, M; Jakse, N; Dohr, G; Hutter, H

Different autogenous bone harvesting techniques: Influence on chip morphology, cell viability and differentiation status. TISSUE ENG PART A. Tissue Engineering Part A-February 2011; 17(3-4):552-552.-BioStar 4th Congress on Regenerative Biology and Medicine; OCT 13-15, 2010; Stuttgart, GERMANY. [Poster]

Pekovits, K; Dohr, G; Hutter, H

Oral skeletal tissue as an applicable source of progenitor cells for regenerative medicine

Int J Artif Organs. 2011; 34(8):690-691.-4th ESAO-IFAO Joint Congress; OCT 9-12, 2011; Porto, PORTUGAL. [Poster]

Pekovits, K; Hutter, H; Dohr, G

Comparative multilineage differentiation analysis of osteoprogenitor cells and bone marrow mesenchymal stem cells. Histology and Histopathology. 2011; 26(1):348-

349.-Termis EU 2011 Annual Meeting, Tissue Engineering & Regenerative Medicine; JUN 7-10, 2011; Granada, SPAIN. [Poster]

2010

Abstracts (Zeitschrift) / Präsentationen

Pekovits, K; Wildburger, A; Payer, M; Jakse, N; Dohr, G; Hutter, H

Are cell viability and differentiation status influenced by different autogenous bone harvesting methods? Proceedings of the ISCT-Europe 2nd Regional Meeting 2010; -ISCT-Europe 2nd Regional Meeting; SEP 11-14, 2010; Belgirate, ITALY. [Poster]

Pekovits, K; Wildburger, A; Payer, M; Jakse, N; Hutter, H; Dohr, G

Influence of bone collectors on the quality of autogenous bone grafts: a clinical and histological study.
9. Österreichischer Histologentag; DEZ 10-11, 2010; Vienna, AUSTRIA. 2010. [Oral Communication]

Pekovits, K; Wildburger, A; Payer, M; Jakse, N; Dohr, G; Hutter, H

Comparison of two different autogenous bone harvesting methods: Piezoelectric Device versus Manual Bone Scraper. ISS 2010 Advanced Methods in Cell Biology; AUG 20-28, 2010; Piran, SLOVENIA. 2010. [Poster]

Pekovits, K; Wildburger, A; Payer, M; Jakse, N; Dohr, G; Hutter, H

Is the quality of autogenous bone chips influenced by the harvesting technique? Proceedings of the 2nd Joint ZMF & Doctoral Days 2010; -2nd Joint ZMF & Doctoral Days; NOV 5-6, 2010; Graz, AUSTRIA. [Oral Communication]