

Aus der Orthopädischen Universitätsklinik mit Poliklinik Tübingen

"Dynamik der osteogenen Differenzierung von humanen  
mesenchymalen  
Stromazellen unter dem Einfluss von Laminin-5 in vitro"

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Janczyk, Alexandra Martha

2017

Dekan: Prof. Dr. med. Ingo B. **Autenrieth**

1. Berichterstatter: PD Dr. Falk Mittag

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Fabian M. Stuby

Tag der Disputation: 11.09.2017

*Gewidmet meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
2.1	Hüftendoprothesen .....	6
2.2	Endoprothesenlockerung.....	7
2.3	Osseointegration von Prothesen .....	8
2.4	Zusammensetzung von Knochen .....	9
2.5	Humane mesenchymale Stromazellen .....	9
2.5.1	Kriterien zur Identifikation von MSC .....	11
2.5.2	Kultivierung von MSC unter GMP-Bedingungen.....	11
2.6	Die Reifung osteogener Zellen .....	12
2.7	Die extrazelluläre Matrix (EZM) .....	13
2.8	Adhäsion von Zellen an Proteine der EZM über Integrine .....	14
2.9	Laminine.....	14
2.9.1	Laminin 1/ Laminin 111 .....	15
2.9.2	Laminin-5/ Laminin 332 .....	15
2.10	Collagen .....	17
2.11	Collagen I .....	18
2.12	Fragestellung.....	18
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
3.1	Herkunft der MSC.....	21
3.2	Isolation der MSC aus dem Knochenmark .....	21
3.3	Kultivierungsmedium der MSC .....	22
3.4	Passagieren der MSC .....	23
3.5	Nachweis des pluripotenten Potentials der MSC.....	24
3.5.1	Nachweis der adipogenen Differenzierung der MSC durch die Oil-Red-Färbung .....	25
3.5.2	Nachweis der osteogenen Differenzierung der MSC durch die von-Kossa-Färbung.....	26
3.6	FACS-Analyse der MSC.....	27
3.7	Attachment Assay.....	29

3.8	Nachweis der osteogenen Differenzierung von hMSC auf proteinbeschichteten 6-Well-Platten durch die von-Kossa-Färbung	31
3.9	Kultivierung von MSC in proteinbeschichteten Kulturflaschen.....	32
3.10	Analyse der Expression osteogener Markergene .....	33
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
4.1	Zellkultur der MSC.....	34
4.2	FACS-Analyse der MSC.....	36
4.3	Pluripotentes Potential der MSC.....	38
4.4	Haftung der MSC auf Proteinen der extrazellulären Matrix .....	40
4.5	Osteogene Differenzierung der MSC auf Proteinen der zellulären Matrix.....	42
4.6	Analyse der Expression osteogener Markergene .....	49
4.7	Expression von Runx2.....	50
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>51</b>
5.1	Gewinnung und Kultivierung der MSC.....	51
5.2	Überschneidung der Kriterien von MSC und Fibroblasten.....	53
5.3	Einfluss von humanem Thrombozytenlysat auf die Kultivierung von MSC .....	54
5.4	Pluripotentes Differenzierungspotential der MSC.....	55
5.5	Haftung der MSC auf Proteinen der EZM.....	56
5.6	Osteogene Differenzierung der MSC auf Proteinen der extrazellulären Matrix .....	57
5.7	Analyse der Expression osteogener Markergene.....	59
5.8	Unterschiede des Verhaltens von MSC in vitro und in vivo .....	60
5.9	Ausblick .....	61
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
<b>9</b>	<b>Erklärungen zum Eigenanteil der Dissertationsschrift .....</b>	<b>83</b>
<b>10</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>85</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>86</b>
<b>12</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>87</b>

12.1	Laborgerätschaften:.....	87
12.2	Verbrauchsartikel.....	87
12.3	Chemikalien:.....	88
12.4	Computerprogramme: .....	90
12.5	Ausführliche Versuchsanleitung zur Analyse der Expression osteogener Markergene .....	90
12.5.1	Isolation von RNA.....	90
12.5.2	cDNA-Synthese .....	92
12.5.3	Quantitative real time PCR (Light Cycler ®) .....	92

## **1 Abkürzungsverzeichnis**

AD Adipogenes Differenzierungsmedium

BG Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Tübingen

BMSC mesenchymale Stammzellen, die aus Knochenmark isoliert wurden

BSA bovine serum albumin

CD Cluster of Differentiation

Col I Collagen I

DAPI 4, 6-Diamidin-2-phenylindol Fluoreszenzfarbstoff

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

ERK Extracellular-regulated kinase

EZM Extrazelluläre Matrix

FACS Fluorescence activated cell sorting

FCS/ FBS Fetal calf serum, fetales Kälberserum

FKS fetales Kälberserum

FITC (Farbstoff)

FN Fibronectin

g Gravitationskraft

GMP Good Manufacturing Practice

HBSS Hank's Buffered Salt Solution

hMSC humane mesenchymale Stammzelle

L1 – Laminin 1

L5 – Laminin 5

M Männlich

MSC Mesenchymale Stromazellen

OB Osteoblasten

OD Osteogenes Differenzierungsmedium

OR Oil-Red-Färbung

PBS Phosphate Buffered Saline

PCR Polymerase-Ketten-Reaktion

PE (Farbstoff)

Pen/Strep Penicillin/Streptomycin

PFEA PBS - FS - EDTA - Natrium-Azid-Stocklösung

PI Kunststoff, unbeschichtete Fläche

PK Primärkultur

PMMA Polymethylmetacrylat

Rcf relative centrifugal force, relative Zentrifugalbeschleunigung

rpm rounds per minute, Umdrehungen pro Minute

RT Raumtemperatur

TEP Total-Endoprothese, hier Hüft-TEP

UKT Universitätsklinikum Tübingen

VK Von-Kossa-Färbung

W Weiblich



## 2 Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Laminin 5 im Vergleich mit den Proteinen Laminin 1 und Collagen I auf die Dynamik der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen. Der klinische Hintergrund hierbei ist das Ziel, eine bessere Integration von Endoprothesen zu fördern, um das Risiko einer späteren Lockerung zu reduzieren. Durch das Aufbringen von Proteinen der extrazellulären Matrix sollen die Adhäsion und die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen gefördert werden, sodass die Knochenneubildung beziehungsweise die ossäre Integration des Implantates optimiert wird.

### 2.1 Hüftendoprothesen

In Deutschland wurden im Jahr 2011 286 Hüft-Endoprothesen je 100.000 Einwohner operativ eingesetzt. (1) Die häufigste Indikation für diesen Eingriff ist die primäre Coxarthrose. Hüftgelenkendoprothesen existieren bedarfsangepasst in verschiedenen Ausführungen. Sie bestehen grundsätzlich aus einer Pfanne, die im Acetabulum befestigt wird, einem Kopf, der darin rotiert, und einem Hüftstiel, der im Marklager des Femurs befestigt wird. Das bewegliche Gelenk wird von Kopf und Inlay gebildet. Die miteinander kommunizierenden Materialien sind häufig Keramik und Polyethylen. Andere geläufige Gleitpaarungen sind Metall/ Polyethylen, Keramik/ Keramik, Keramik/ Polyethylen oder Metall/ Metall.

Die Verankerung der Prothesen im Femurschaft kann zementiert oder unzementiert erfolgen. Bei der ersten Variante stellt eine dünne Schicht Polymethylmethacrylat den Kontakt zwischen Knochenhöhle und Implantat her. Insbesondere bei älteren Patienten werden zementierte Hüftprothesen gewählt, da die Vollbelastung schnell möglich ist und zementfrei Implantate nicht mehr so gut verankern. Ein Prothesenwechsel ist durch die Zementreste jedoch aufwendig. (2, 3) Bei der zementfreien Operationstechnik wird eine Prothese mit aufgerauter Oberfläche und ggf. spezieller Beschichtungen den Femurschaft eingebracht. Bei der Press-Fit-Technik wird durch mechanischen

Druck die Prothese fest im Femurschaft verankert. Durch Knochenneubildung erfolgt die Integration der Prothese. (4, 5)

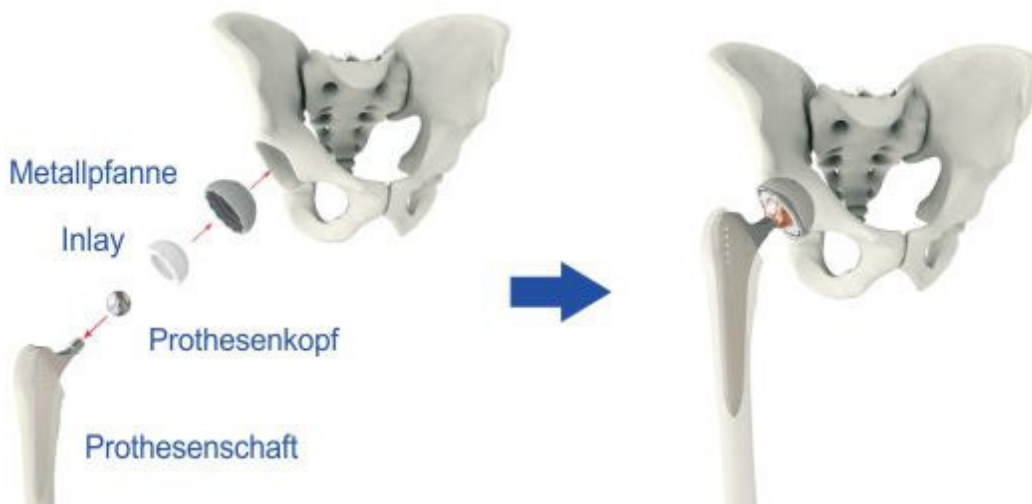


Abbildung 1: Hüftprothesen sind modular aufgebaut. Der Prothesenschaft wird im Knochen des Femurs befestigt die Metallpfanne im Acetabulum. Der Prothesenkopf artikuliert mit dem Inlay, dass in der Metallpfanne verankert ist. Übernommen aus (6)

## 2.2 Endoprothesenlockerung

2010 wurden in Deutschland 25.000 Eingriffe zum Austausch einer Hüftendoprothese durchgeführt. (7) Revisionen sind schwieriger durchzuführen, haben eine höhere Komplikationsrate und kosten mehr als der ursprüngliche Eingriff. (8, 9, 10) Die drei häufigsten Gründe für die Durchführung einer Revision sind aseptische Lockerung, Infektionen und Dislokation der Prothese. (11, 12, 13) Zweitrangig sind rezidivierende Luxationen, Materialverschleiß und andere Ursachen. Histopathologisch unterscheidet man die septische und die aseptische Prothesenlockerung. Der häufigste Grund für eine Revision ist die aseptische Prothesenlockerung, die erst nach einer langen beschwerdefreien Zeit symptomatisch wird. Hierbei kommt es zur Bildung einer Membran zwischen der Prothese und dem Knochengewebe. (14, 15)

Um die Standzeit der Prothesen zu verlängern, können grundsätzlich zwei Strategien verfolgt werden: Zum einen sollen späte Komplikationen wie Materialermüdung und Frakturen durch Osteoporose reduziert werden. Zum

anderen soll von Anfang an sichergestellt werden, dass das Implantat dicht in die Struktur des Knochens eingebettet wird (sogenannte Osseointegration), um das Risiko einer Prothesenlockerung zu minimieren. (16)

### 2.3 Osseointegration von Prothesen

Osseointegration bezeichnet den Vorgang, bei dem ein direkter Kontakt zwischen eingebrachten Biomaterialien (meistens Implantate wie Prothesen) und Knochen aufgebaut wird. Ein Prinzip der erfolgreichen Osseointegration ist die Anhaftung von mesenchymalen Stromazellen (MSC) am Implantat und ihre Proliferation und Reifung zu Osteoblasten. Diese sezernieren eine Matrix auf die Oberfläche des Implantats, sodass es in Knochenmineralien eingebettet wird. (17, 18)

Vereinfacht kann die Osseointegration in drei Phasen eingeteilt werden.

1. Osteoinduktion: Direkt nach Einsetzen des Fremdkörpers kommt es zur Einwanderung von osteogenen Zellen. Nach Differenzierung zu Knochenzellen bewegen die Zellen sich nicht mehr, bilden aber eine osteogene Matrix, die das Implantat immer weiter umschließt. Fibrinfäden verbinden sich mit der Implantatoberfläche und bilden ein Gerüst für die Einwanderung der osteogenen Zellen.
2. Knochenneubildung: Osteogene Zellen differenzieren sich, legen sich direkt auf die Oberfläche des Implantats und sezernieren Knochenmatrix, bis Zement entsteht.
3. Heilungsphase: Langsam organisiert der Knochen sich um das Implantat herum neu, seine Qualität und Standfestigkeit nehmen zu. (19, 20, 21)

Neuere Forschungsansätze haben das Ziel, die Oberflächen der Prothesen zu optimieren und so eine bessere Osseointegration zu gewähren. Zum einen kann dies über die Struktur der Oberflächen geschehen, zum anderen über das gewählte Material und die Beschichtung des Materials. Insbesondere auf dem Gebiet der Orthopädie und der Zahntechnik wurden zahlreiche Studien mit folgenden Ansätzen durchgeführt:

-Beschichtung der Prothesen mit Hydroxylapatit (22, 23) oder Kalziumphosphat (24)

- Aufrauung der Prothesenoberfläche (25): Eine rauere Oberflächenstruktur von Implantaten wirkt sich günstig auf die Osteogenese von MSC aus. (26, 27, 28)
  - Nanotechnologie: Strukturen auf der Implantatoberfläche, z.B. in Form von Halbkugeln oder Eindellungen im Größenbereich von Nanometern sollen direkte Auswirkungen auf die Zellfunktionen nehmen. (29)
  - Entfernung von Substanzen bzw. deren Rückständen, die die Osseointegration behindern. (30, 31)
  - Beschichtung der Implantatoberfläche mit Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) wie Fibronectin (32, 33) und Vitronectin (34).
- Auch in dieser Arbeit wird der Einfluss von den Proteinen der extrazellulären Matrix Laminin 1, Laminin 5 und Collagen I auf die Osteogenese untersucht, mit dem Ziel, in der Zukunft durch eine Beschichtung von zementfreien Implantaten mit diesen Proteinen deren Osseointegration zu verbessern.

## 2.4 Zusammensetzung von Knochen

Die Grundsubstanz des Knochens besteht zu 70-90% aus anorganischen Bestandteilen (hauptsächlich Hydroxylapatit) und zu 10-30% aus organischen Bestandteilen. (35) Collagen I macht 90% des organischen Anteils aus, der Rest wird durch Osteonectin, Osteocalcin, Sialoprotein, Phosphoproteine, Glykoproteine wie Laminine, Proteoglykane, Albumin und weitere Proteine gebildet. (36) Durch die Kombination von kollagenen Fasern und Mineralsubstanzen wird der Knochen druck- und zugfest. Die Zellen des Knochenskeletts bei Erwachsenen bestehen zu >90% aus Osteozyten, zu 4-6% aus Osteoblasten und nur 1-2% Osteoklasten. (37) Osteoklasten entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen und resorbieren Knochengewebe. Osteozyten entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen und bilden Knochengewebe. (38)

## 2.5 Humane mesenchymale Stromazellen

Humane mesenchymale Stromazellen werden auch als humane mesenchymale Stammzellen bezeichnet und mit hMSC abgekürzt. Sie sind adulte Stammzellen, die in verschiedenen Geweben vorkommen. Im Jahr 1966 wurden sie von Friedenstein et. al zum ersten Mal aus menschlichem

Knochenmark isoliert. (39) Bei der Isolation aus Knochengewebe werden sie als BMSC (bone marrow mesenchymale Stromazellen) bezeichnet. Sie existieren dort in eigenständigen Kolonien neben hämatopoetischen Stammzellen und unterstützen deren Funktion. (40) Ihre Aufgabe besteht darin, untergegangene Zellen mit mesodermaler Herkunft zu ersetzen. Sie besitzen die Fähigkeit, sich durch Mitose zu duplizieren. Im Gegensatz zu totipotenten Stammzellen ist ihr Reproduktionspotential jedoch begrenzt.

In späteren Experimenten wurde gezeigt, dass hMSC sich nicht nur zu Chondrozyten, Adipozyten und Osteoblasten differenzieren können, sondern sich unter geeigneten Bedingungen auch zu mehreren anderen Zelltypen wie Fibroblasten, Hepatozyten (41), Cardiomyozyten (42) und Neuronen entwickeln können. (43, 44)

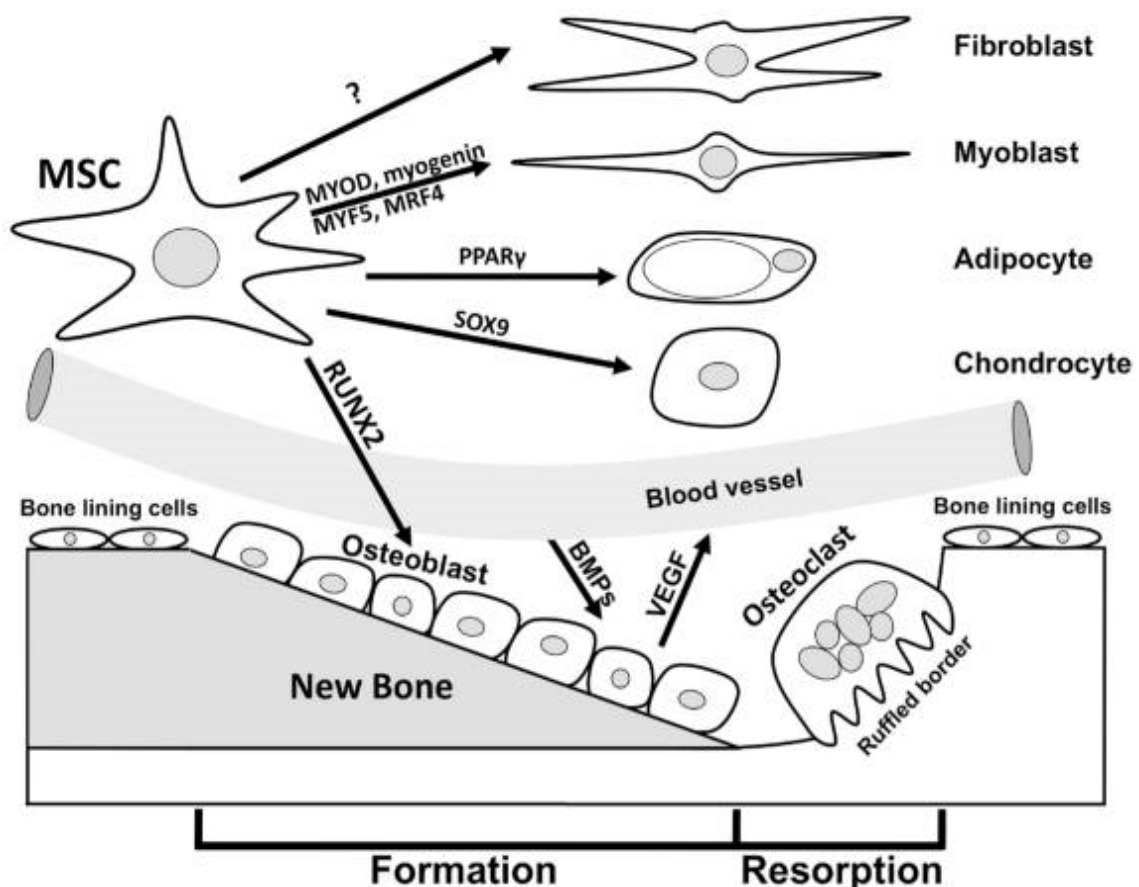


Abbildung 2: MSC sind unter anderem im Periost von Knochen ansässig. Unter dem Einfluss bestimmter Faktoren differenzieren sie sich zu anderen Zelltypen. Übernommen aus (45)

hMSCs sind das beliebte Objekt verschiedener Forschungsthemen, da ihre Isolierung technisch einfach und mit weniger ethischen Bedenken verbunden ist, als die Verwendung von embryonalen Stammzellen. Da sie auch über immunmodulatorisches Potential verfügen, werden sie in klinischen Studien bereits zur Therapie von Multipler Sklerose, Typ 1 Diabetes, „graft versus host disease“ und entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt. (46)

### 2.5.1 Kriterien zur Identifikation von MSC

MSC können aus unterschiedlichen Geweben isoliert werden (Knochenmark, Fettgewebe (47), Nabelschnurblut (48)) und stellen eine heterogene Gruppe dar. Das Stammzellkomitee der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (ISCT) hat 2005 die Minimalkriterien für MSC definiert (49):

- Sie wachsen adhärent an Kunststoffoberflächen.
- Sie besitzen das Potential, sich *in vitro* zu Osteozyten, Chondroblasten und Adipozyten zu differenzieren. (50)
- Sie exprimieren die Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90, nicht aber die hämatopoetischen Marker CD45, CD34 und CD14 oder CD11b, CD79α oder CD19 und sind HLA-DR negativ. (51, 52)

Morphologisch und funktionell besteht eine große Ähnlichkeit zwischen hMSC und Fibroblasten. Per FACS-Analyse lassen die hMSC von hämatopoetischen Stammzellen abgrenzen, nicht aber von Fibroblasten.

### 2.5.2 Kultivierung von MSC unter GMP-Bedingungen

Fetales Kälberserum enthält Wachstumsfaktoren und ist deswegen in der Zellkultur weit verbreitet. Seine Verwendung stimmt jedoch nicht mit den Vorgaben der European good manufacturing practice (GMP) für Medizinprodukte überein. Aufgrund der tierischen Herkunft werden immunologische Reaktionen, die Übertragung von zoonotischen Infektionserregern (insbesondere Prionen (53, 54)) sowie die Veränderung von Stoffwechselprozessen befürchtet. (55, 56, 57, 58) Um eine spätere klinische Anwendung der in diesen Versuchsreihen gewonnenen Erkenntnisse nicht auszuschließen, wurde bei der Kultivierung der hMSC in dieser Arbeit auf die Anwendung von fetalem Kälberserum verzichtet und stattdessen humanes

Serum und humanes Thrombozytenkonzentrat verwendet. (52) Vorhergehende Versuchsreihen hatten bereits gezeigt, dass die korrekte Isolation und erfolgreiche Kultivierung von hMSC ohne die Verwendung von tierischen Produkten durchgeführt werden kann. (59, 60)

## 2.6 Die Reifung osteogener Zellen

Mesenchymale Stammzellen entwickeln sich im Inneren des Knochens zu Osteoblasten. MSC entwickeln sich zunächst zu Osteochondroprogenitorzellen. Über den Runx2-Promotor wird der Transkriptionsfaktor Osterix aktiviert und induziert die Reifung zum Osteoblasten. (61, 62, 63) Osteoblasten produzieren Osteoid, eine mineralfreie Grundsubstanz aus Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Collagenen Fasern (v.a. Collagen Typ I). Die Mineralisierung des Osteoids erfolgt erst nach einem Zeitraum von ca. 2 Wochen durch die Bildung von Hydroxylapatit. Aktive Osteoblasten sezernieren während dem Wachstum von Knochen das Enzym alkalische Phosphatase. (62, 63)

Tabelle 1: Schritte der Reifung von MSC zu Osteoblasten und Osteozyten und die wichtigsten Einflussfaktoren und osteogenen Marker. (64, 65, 66)

Abschnitt der Osteogenese	Osteogene Marker
1. Osteogene Differenzierung der MSC	Runx2, Osterix, Sox9, TGFβ/BMPs, FGFs
2. Proliferation der Osteoprogenitorzellen	Collagen Typ I, Fibronectin, BMP2/TGFβ
3. Synthese der EZM	alkalische Phosphatase (ALP) Osteopontin, Osteonectin, Bone Sialoprotein und Osteocalcin.
4. Mineralisierung	Bone Sialoprotein, Osteocalcin, Osteopontin

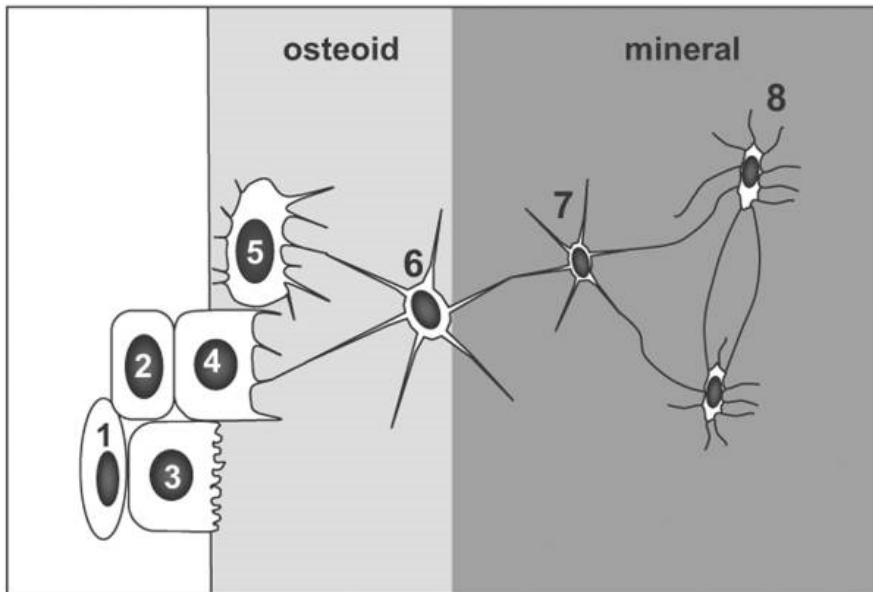


Abbildung 3: Schemazeichnung, die die Übergangsstadien vom Osteoblasten zum reifen Osteozyten darstellt. Während diesem Prozess schrumpfen das Zellvolumen und die Organellen. 1= Proliferierender Präosteoblast, 2= Präosteoblastischer Osteoblast, 3= Osteoblast, 4=Osteoblastischer Osteozyt (Typ I Präosteozyt), 5= Osteoider Osteozyt (Typ II Präosteozyt), 6=Typ III Präosteozyt, 7= Junger Osteozyt, 8= Alter Osteozyt (Übernommen aus (67) (Modifiziert von Franz-Odendaal et. al 68 ))

## 2.7 Die extrazelluläre Matrix (EZM)

Als extrazelluläre Matrix (EZM) wird die Substanz bezeichnet, die die Zellen umgibt. Sie nimmt Einfluss auf die Organisation und Stabilität des Gewebes. Sie enthält komplexe Makromoleküle. Über Integrine steht sie mit den Zellen in Kontakt und beeinflusst deren Funktionen. In Bindegeweben enthält die EZM faserige Bestandteile wie Collagene und nicht-faserige Bestandteile wie Proteoglykane, Glykoproteine und Glykosaminoglykane. (69)

Grundsätzlich werden 2 spezialisierte Formen der EZM unterschieden: Die Basalmembran, die vor allem in epithelialen Geweben zu finden ist, und die interstitielle Matrix, die den Großteil der EZM im Körper ausmacht. Sie besteht aus verschiedenen Collagenen, einschließlich Typ I und III, Lamininen, Fibronectin und Tenascin. Zusätzlich enthält sie Proteoglykane, die Flüssigkeit im Gewebe binden, Verbindungen zu Wachstumsfaktoren und Zytokinen aufbauen und die Matrix vernetzen. (70)



## 2.8 Adhäsion von Zellen an Proteine der EZM über Integrine

Die Anhaftung von Zellen unterliegt komplexen Mechanismen. Die Zellen stellen über verschiedene Integrine eine Verbindung zur EZM her. Zell-Zell-Adhäsionen dagegen werden durch die Familie der Cadherine vermittelt. (71, 72). Integrine sind transmembrane Glykoproteine. Sie sind aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut, die jeweils aus einer hydrophoben transmembranen, einer zytoplasmatischen Domäne und einer glykosylierten extrazellulären Domäne bestehen. (73)

Die Adhäsion von Zellen an Proteinen der EZM über Integrine erfolgt in vier Schritten: Zellanhaftung, Zellspreitung, Organisation des Zytoskeletts und Ausbildung der fokalen Adhäsionskomplexe (focal adhesion complex, FA). (74) In einer Art von Kettenreaktion führt die Bindung an Integrine zur Rekrutierung von umliegenden Adhäsionsproteinen. Die Anhaftung von Zellen wird von biochemischen Signalwegen und von Aktin-Myosin-Kontraktionen reguliert. (75) Die Bindung über Integrine löst im Inneren der Zelle biochemische Signalwege aus. (76) So beeinflusst die Adhäsion die Proliferation, Migration und Differenzierung von MSC und anderen Zellen. (75) Da erwiesen wurde, dass insbesondere Laminine und Collagen I die osteogene Differenzierung von MSC fördern (77), liegt der Gedanke nahe, Implantate mit diesen Proteinen zu beschichten.

Integrine verbinden Laminine und andere Proteine der EZM mit Zellen. Bis jetzt sind 11 Integrine als Verbindungselemente für Laminine bekannt. (78)

## 2.9 Laminine

Laminine sind heterotrimere Glycoproteine. Sie sind ubiquitär, kommen aber v.a. in der Basalmembran vor. Dort vermitteln sie zusammen mit anderen Proteinen der EZM Zellverbindungen, Zellmigration und Architektur der Gewebe. (79) Über Integrine sind sie mit Zellen verbunden. Sie sind aus einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit aufgebaut. Die Untereinheiten formen ein kreuzförmiges Gebilde mit drei kurzen und einem langen Arm, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. (80) Der lange Arm ist ca. 80nm lang und besteht aus einer  $\alpha$ -helikalen Superhelix aus allen 3 Ketten. Die 3 kurzen Armen

Arme sind 35-50nm lang und bestehen aus je einer Kette. (81) Sie besitzen globuläre Domänen an den N-terminalen Abschnitten ihrer drei Ketten und an der C-terminalen Region der  $\alpha$ -Kette. Diese dienen als Verbindungselemente. Sie sind wichtig für die Anordnung der Laminine und die Bildung von Polymeren in der EZM. (81) In der Basalmembran kommt es über Nidogen zur Wechselwirkung mit Collagen IV. (82)

Die Gruppe der Laminine wächst seit der Entdeckung des ersten Laminins im Jahre 1979 ständig. Im Moment sind 12 Peptidketten (fünf  $\alpha$ -Ketten, vier  $\beta$ -Ketten und drei  $\gamma$ -Ketten) bekannt, die sich als Heterotrimere zu 16 verschiedenen Lamininen zusammenfügen. (78)

### 2.9.1 Laminin 1/ Laminin 111

Das erste Laminin, das entdeckt wurde, das Laminin 1, wurde 1979 aus dem Engelbrecht-Holm-Swarm-Tumor isoliert. Es setzt sich aus den 3 Ketten  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  und  $\gamma_1$  zusammen und wird deswegen auch als Laminin 111 bezeichnet. (83). Es wurde gezeigt, dass Laminin 1 essentiell für die Bildung der Extrazellulären Matrix ist (84). Laminin 1 ist v.a. für seinen fördernden Einfluss auf die Hämatopoese bekannt.

### 2.9.2 Laminin-5/ Laminin 332

Laminin-5 wird auch als Kalinin, Nicein oder Epiligrin bezeichnet. Laminin 5 ist aus den Untereinheiten  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ , und  $\gamma_2$  aufgebaut und trägt deshalb unter anderem auch den Namen Laminin-332. (85)

Laminin 5 hat eine einzigartige Struktur unter den Lamininen: Durch Splicing existieren 2 Isoformen von Laminin 5: Laminin 3A32 ist eine gekürzte Form, bei der das N-terminale Ende am kurzen Arm der  $\alpha_3$ -Untereinheit fehlt. Laminin-3B32 besitzt die volle Länge. Laminin-3A32 gehört zu den Lamininen, die keine Polymere bilden können. Bisher ist das Vorkommen der  $\gamma_2$ -Untereinheit nur bei Laminin 5 bekannt. Nach der Sekretion wird Laminin 5 in der EZM prozessiert. Durch proteolytische Spaltung der  $\alpha_3$ - und  $\beta_2$ - Untereinheit verändert Laminin-5 seine biologische Aktivität. (86, 87)

Laminin 5 hat zahlreiche Funktionen. Es bindet über seine LG-Domänen an unterschiedliche Integrine, v.a.  $\alpha_6\beta_4$  und  $\alpha_3\beta_1$ , und an Collagen Typ VII. Es

dient als Verbindung zwischen den Hemidesmosomen der Epithelzellen und Fasern in der Matrix. (88) Es ist ein wichtiger Bestandteil der epithelialen Basalmembran. Mutationen in den kodierenden Genen für Laminin 5 führen zu Epidermiolysis bullosa. (89)

Laminin-5 und insbesondere seine die  $\alpha 3$ -Untereinheit wurden als wichtiger Einflussfaktor auf die Adhäsion und osteogene Differenzierung von hMSC beschrieben (52). MSC haften über das  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin an Laminin 5. (90)

Laminin 5 verfügt über eine einzigartige Struktur und biologische Aktivität in der Gruppe der Laminine. (86, 91) Die Interaktion von Laminin-5 mit dem Integrin  $\alpha 3\beta 1$  oder  $\alpha 6\beta 4$  begünstigt durch intrazelluläre Signalübertragung das Überleben, die Vermehrung und die Migration von Zellen. Dies geschieht über die Aktivierung verschiedener Signalwege. (92, 93, 94) Lösliches Laminin 5 induziert im Gegensatz zu anderen Laminin die Migration von Zellen. (95)

Klees et. al wiesen 2005 eine Beschleunigung der osteogenen Differenzierung durch Laminin-5 über eine erhöhte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors RUNX2 nach. (96) Hashimoto et al. zeigten 2006, dass Laminin 5 die Proliferationsrate von MSC in nicht-osteogenem Kultivierungsmedium anregt. Dies galt nicht nur für die Kultivierung von MSC auf mit Laminin 5 beschichteten Oberflächen, sondern auch für die Zugabe von Laminin 5 zum Kulturmedium. Laminin 5 regt die Proliferation von MSC über die beiden Integrine  $\alpha 3\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 1$  an. (91)

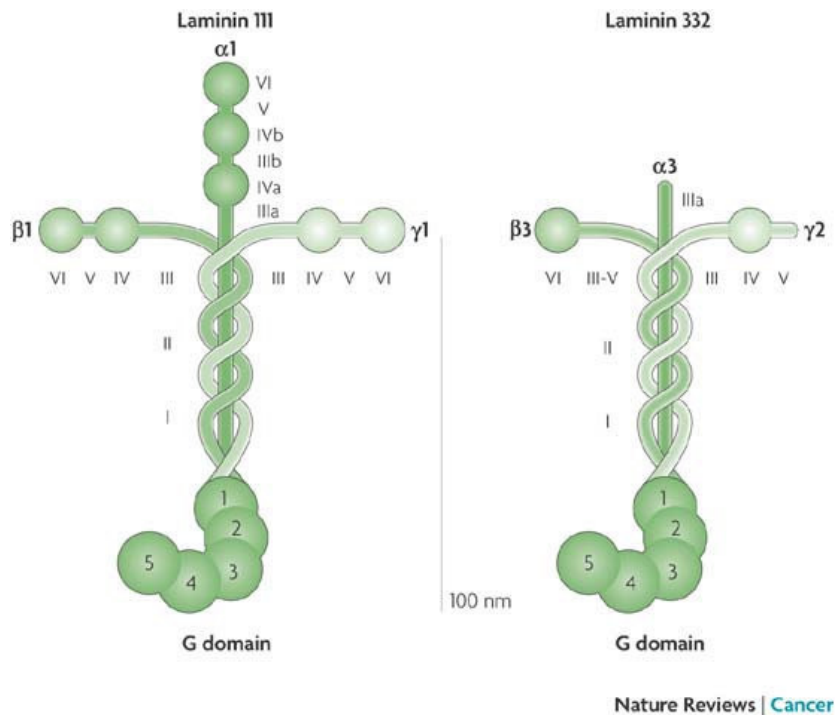


Abbildung 4: Die Struktur von Laminin 1/111 und Laminin 5/332 im Vergleich. Laminine bestehen aus 3 Einheiten und sind unter dem Elektronenmikroskop als kreuzförmige Makromoleküle sichtbar. Die große G-Domäne am unteren Ende des langen Arms enthält 5 repetitive Sequenzen mit epidermal growth factor (EGF)-ähnlichen Sequenzen. Die ersten 3 dieser Sequenzen, die Domänen G1-3 enthalten Bindungsstellen für Integrine. G4 und G5 sind Bindungsstellen für Proteoglykane. Im Gegensatz zu Laminin 1 hat Laminin 5 gekürzte globuläre Domänen an den kurzen Enden der  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  und  $\gamma 2$ -Kette und verändert so dessen biologischen Eigenschaften. Übernommen aus (97)

## 2.10 Collagen

Collagen ist das Hauptprotein der extrazellulären Matrix. Aus Peptidketten ( $\alpha$ -Ketten) aus jeweils ca. 1000 Aminosäuren bilden sich linksgängige Helices. Jeweils drei davon bilden eine rechtsgängige Helix, die ca. 200nm lang ist. Heute kennt man 20 unterschiedliche Collagene, die sich aus unterschiedlichen, durchnummerierten  $\alpha$ -Ketten zusammensetzen. Ihr gemeinsames Merkmal ist, dass jede 3. Aminosäure Glycin ist. Ebenfalls häufig kommen die Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin vor, deren Reste maßgeblich die Bildung der linksgängigen, gestreckten Helix beeinflussen. Im Inneren der Helix liegt die kleinste bekannte Aminosäure Glycin. Das Resultat ist eine dichte, geschraubte Struktur. Collagenfasern lagern sich oft zu dicken Bündeln zusammen, welche unter dem Lichtmikroskop sichtbar sind. (98)

## 2.11 Collagen I

Die Tripelhelix von Collagen I wird von zwei  $\alpha 1$  (I)-Ketten und einer  $\alpha 2$ (I)-Kette gebildet. Es ist, genau wie Collagen II, III und V, ein fibrilläres Collagen. Es kommt vor allem in Haut, Sehnen, Knochen und Dentin vor. (99) Im Knochengewebe macht Collagen I den größten Anteil der nicht mineralisierten Matrix aus. Es wird von Osteoblasten unter dem Einfluss von Collagen VI sezerniert. (100)

Vor einigen Jahren wurde entdeckt, dass im Knochen vorkommendes Collagen I ebenso wie Vitronektin die osteogene Differenzierung von hMSC in ähnlichem Umfang anregt wie lösliche Nährmedien zur osteogenen Differenzierung. (90)

In vorhergehenden Studien wurden bereits Vorzüge der Beschichtung von Implantaten mit Collagenen entdeckt. Da Collagen I an der Zelloberfläche von MSC über andere Integrinrezeptoren gebunden wird als Fibronektin und Vitronektin, wird weniger Konkurrenz um die Bindungsstellen mit absorbiertem Fibronektin und Vitronektin erwartet. Die Aktivierung des Collagen-selektiven Integrins  $\alpha 2\beta 1$  induziert neben der Zelladhäsion auch die osteogene Differenzierung von MSC (90, 101, 102, 103) Die Anhaftung von Osteoblasten an Collagen I kommt über das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin zustande. (104)

## 2.12 Fragestellung

Die Zielsetzung dieser Dissertation besteht darin, den Einfluss unterschiedlicher Proteine der EZM (Laminin 1, Laminin 5 und Collagen 1) auf die Dynamik der osteogenen Differenzierung von hMSC zu untersuchen.

Der klinische Hintergrund dieser Fragestellung besteht im Ansinnen, die Einheilung von neu implantierten unzementierten Prothesen zu beschleunigen sowie die Prothesenlockerung als Folge der Bildung periprothetischer Membranen zu verhindern oder zumindest zu verzögern. In den letzten Jahren gab es mehr Bestrebungen, die Bioaktivität der Materialien von Implantaten zu erhöhen. Die hierbei verwendeten Materialien führen durch Wechselwirkungen mit Proteinen zu einer Gewebsreaktion. Die anschließende Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Proteinen beeinflusst den Heilungsprozess des Gewebes und soll eine bessere Integration des Fremdkörpers in das Gewebe

gewährleisten. (105) Dies geschieht durch die Ausbildung von Fibrinnetzwerken, die Einwanderung von Osteoprogenitorzellen und die spezifische Zelldifferenzierung. (90, 106, 107)

Experimentell wurde nachgewiesen, dass Fibronectin-beschichtete Implantatoberflächen zu einer raschen Einwanderung osteogener Zellen führten. (106) Zusätzlich wiesen die osteogenen Zellen eine raschere Proliferation auf. Somit erscheint es sinnvoll, Implantate mit Proteinen der EZM zu beschichten. (108) Bei in-vitro-Versuchen, bei denen hMSC unter dem Einfluss von FCS kultiviert wurden, wurde der fördernde Einfluss von verschiedenen EZM-Proteinen wie Collagen I, Laminin-5 und Vitronectin auf die Anhaftung von hMSC und die osteogene Differenzierung nachgewiesen. (90, 96, 109, 110, 111)

Eine Forschergruppe um Klees hat den Einfluss von Laminin 5 auf die osteogene Differenzierung von MSC untersucht. Es wurde postuliert, dass die alleinige Anwesenheit von Laminin 5 über die ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase) die osteogene Differenzierung von hMSC induziert. (96) Diese Versuche fanden jedoch unter Bedingungen statt, bei denen die MSC unter dem Einfluss von fetalem Kälberserum kultiviert wurden. Nun soll untersucht werden, welchen Einfluss auf die osteogene Differenzierung Laminin 5 bei Kultivierung von MSC unter GMP+-Bedingungen, um hMSC gegebenenfalls zu einem späteren Zeitpunkt zur klinischen Nutzung zugänglich zu machen.

In früheren Versuchsreihen, in denen die Versuche der Forschergruppe unter Klees unter GMP+-Bedingungen nachgestellt wurden, wurde mittels Attachment Assays nachgewiesen, dass die initiale Haftung von MSC und Osteoblasten auf Laminin 1 und Laminin 5 sowie Collagen 1 bei einer Stoffmenge von 5fmol erreicht werden konnte. In diesen Versuchen hatten hMSC in Haftungsversuchen eine stärkere Affinität zu Collagen 1 als zu Laminin 5 und Laminin 1. (112) Daraus ergibt sich die Fragestellung, was die minimale Stoffmenge ist, die zum Erreichen der Adhäsion der MSC notwendig ist. Außerdem wurde der Einfluss von Laminin 1,5 und Collagen I auf die Expression der osteogenen Marker nach 14-tägiger osteogener Induktion

untersucht. Die Experimente dieser Dissertation dienten folgenden Fragestellungen:

- 1) Zeigt sich bei der Kultivierung von MSC auf mit Laminin 5 beschichteten Oberflächen im Gegensatz zu Beschichtungen mit Laminin 1 oder Collagen 1 ein Einfluss auf die frühe osteogene Differenzierung? Diese Fragestellung soll mit zwei unterschiedlichen Versuchen beantwortet werden.
  - a) Fördert die Beschichtung mit diesen Proteinen die Mineralisierung nach 3, 7 und 28 Tagen?
  - b) Verändert sich die Expression von osteogenen Markern (Runx2, Alkalische Phosphatase, Osteocalcin und Osteopontin) nach 3 bzw. 7 Tagen unter dem Einfluss von Laminin 5, Laminin 1 und Collagen I?
- 2) Wird auch bei geringeren Stoffmengen als 5 fmol eine verstärkte initiale Haftung von MSC und Osteoblasten auf Laminin 5 im Gegensatz zu Laminin 1 und Collagen 1 erreicht?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Herkunft der MSC**

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden MSC verwendet, die Patienten beim operativen Einsetzen einer Hüft-TEP (Totalendoprothese) unter sterilen Bedingungen entnommen wurden. Vorausgegangen war dem sowohl das positive Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen (Votumnr. 263/2007 B02), als auch die Einholung der schriftlichen Zustimmung der jeweiligen Patienten. Nach Entnahme der MSC aus dem Knochenmark des Femurs wurden sie in einem 50ml-Falcon mit Heparin in das Zelllabor transportiert und dort aufgearbeitet. Die verwendeten MSC wurden aus dem Knochenmark von 14 Patienten der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen und der BG-Unfallklinik Tübingen isoliert. Die Spender befanden sich zum Operationszeitpunkt im Alter zwischen 26 und 85 Jahren.

#### **3.2 Isolation der MSC aus dem Knochenmark**

Das 50ml-Falcon mit Heparin, in dem das Knochenmark transportiert wurde, wurde mit PBS aufgefüllt. Durch Ansaugen mit der Pipette und der Zuhilfenahme einer Pinzette wurden Knochenstücke aussortiert. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei Raumtemperatur, bei 150g, sammelte sich eine Fettschicht über dem Knochenmark an [1], die ebenfalls mit der Pipette entfernt wurde. Je nach Fettgehalt und Kontamination des Knochenmarks wurde dieser Vorgang bis zu dreimal wiederholt.

Die Knochenmarkszellen, die nun im unteren Bereich des Falcons ein Pellet bildeten, wurden mit PBS vermischt [2] und auf 10 ml Ficoll aufgeschichtet [3]. Beim anschließenden Zentrifugieren bei Raumtemperatur für 30 Minuten, 400g ohne Bremse bildete sich eine Interphase, welche die MCS beinhaltete [4]. Diese Interphase wurde isoliert und einem neuen Zentrifugationsvorgang zugeführt (RT, 150 g, 10min) [5].



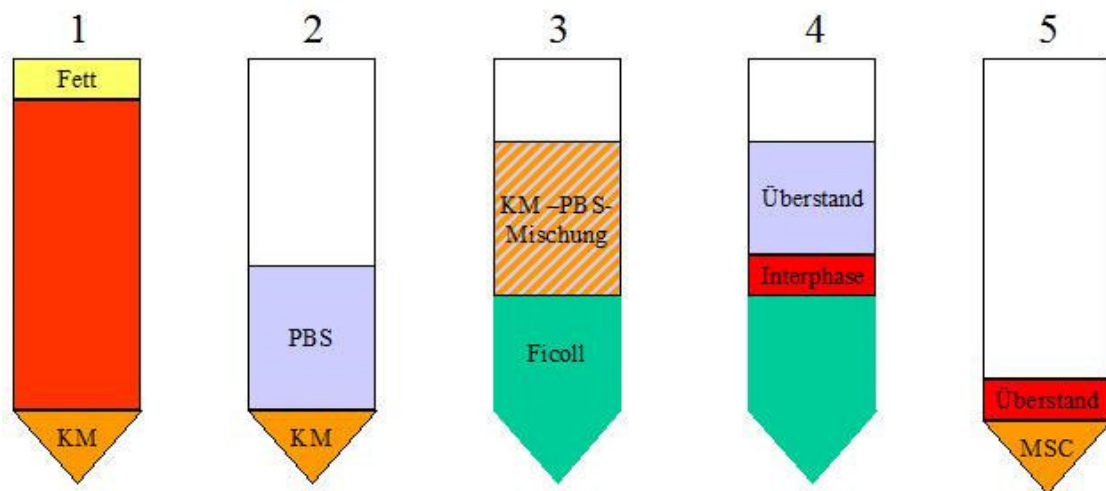


Abbildung 5: Skizze zur Darstellung der Isolation der hMSC aus dem Knochenmark durch Dichtezentrifugation.

Das entstandene Pellet wurde nach Absaugen des Überstands in 10 ml MSC-Kultivierungsmedium (siehe Tabelle 2) resuspendiert. Je  $3,5 \cdot 10^5$  Zellen wurden auf die Zellkulturflaschen verteilt und anschließend mit 8 ml MSC-Kulturmedium bedeckt. Der erste Mediumwechsel fand nach 24 Stunden statt. Danach wurden die Plastik-adhärenenten MSC, die bei diesem Schritt nicht weggeschwemmt wurden, bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C im CO<sub>2</sub> - Inkubator aufbewahrt. (52)

### 3.3 Kultivierungsmedium der MSC

Das Kultivierungsmedium stellt Nährstoffe für die wachsenden Zellen bereit und bietet ein stabiles Milieu, z.B. in Bezug auf den pH-Wert. Durch den Zusatz von Antibiotika bietet das Kulturmedium einen Schutz vor Mikroorganismen. Jedes 75-ccm Falcon wurde mit 8ml Kultivierungsmedium ausgestattet, das im Rhythmus von 3 oder 4 Tagen vollständig ausgetauscht wurde. Die Komponenten des Kulturmediums sind in Tabelle 2 aufgeführt. (52)

Das MSC-Kultivierungsmedium wurde für alle Experimente, die mit den MSC durchgeführt wurden, verwendet, ausgenommen die osteogene und adipogene Differenzierung.

Tabelle 2: MSC-Kultivierungsmedium

Material	Menge	Hersteller
DMEM low Glucose (1g/l)	450 ml	Gibco
Fresh Frozen Plasma	25 ml	Blutbank Tübingen
Thrombozytenlysat	25 ml	Blutbank Tübingen
Penicillin/ Streptomycin	5 ml	Gibco
L-Glutamin	5 ml	Lonza
Heparin Natriumsalz 1g	1 ml	Carl Roth GmbH & Co Kg

### 3.4 Passagieren der MSC

Die Versuche mit den MSC erfolgten in der 3. Passage, darum wurden sie insgesamt drei Mal umgesetzt. Erreichten die Zellen in den Kulturflaschen eine Konfluenz von 80%, erfolgte das Passagieren, um Nährstoffmangel oder vorzeitige osteogene Differenzierung zu verhindern. Nach Absaugen des Medium wurden die Flaschen mit 5ml PBS gewaschen. Anschließend wurde 4ml einer Enzymlösung aufgetragen, um die Zellen vom Plastik zu lösen. Beim Umsetzen von der Primärkultur in die erste Passage wurde dazu Trypsin verwendet, in den darauffolgenden Passagen Accutase, welche weniger aggressiv ist. Die Enzymlösungen wirkten 6 Minuten bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator auf die MSC ein. Durch Beklopfen der Kulturflaschen sollten die Zellen vollständig gelöst werden. Mithilfe des Mikroskops wurde kontrolliert, ob die MSC nun frei in der Flüssigkeit flottierten, andernfalls wurden die Flaschen erneut für zwei Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde nun durch Zugabe von 4ml Kultur-Medium abgestoppt. Die Zellen wurden in 50ml-Falcons überführt und 7min bei 7°C, 1500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 10ml MSC-Kultivierungsmedium resuspendiert. Nun wurde die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt. Hierzu wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Die Neubauer Zählkammer wurde mit dieser Lösung befüllt. Die Anzahl der vitalen

Zellen in den 4 Großquadranten der Neubauer-Zählkammer wurde ermittelt. Mit Hilfe folgender Formel wurde die Zellzahl/ml ermittelt:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Zellzahl / 4 Großquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor } 0,5 \times 10^4$$

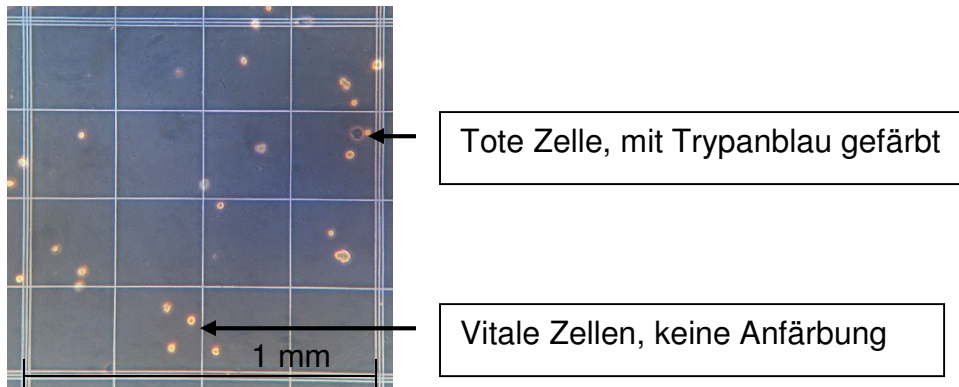


Abbildung 6: Ausschnitt aus einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Jede Neubauer-Zählkammer enthält 4 dieser Felder. Hell erscheinende Zellen sind vital, ihre Membran lässt kein Durchdringen des Farbstoffs Trypanblau zu. (113) In 4 dieser Quadrate werden die vitalen, nicht angefärbten Zellen gezählt, um die Anzahl an Zellen pro Milliliter zu ermitteln.

Anschließend wurden die MSC mit einer Zellzahl von  $3,5 \cdot 10^5$  in der ersten Passage, in den darauffolgenden Passagen mit einer Zellzahl von  $1,5 \cdot 10^5$  je Kulturflasche ausgesät und mit 8ml Kulturmedium bedeckt. (52)

### 3.5 Nachweis des pluripotenten Potentials der MSC

Den Kriterien der Arbeitsgruppe um Friedenstein zufolge haben MCS das Potential, sich zu Osteoblasten, Adipozyten oder Chondrozyten zu differenzieren. (114) Um dieses pluripotente Potential nachzuweisen, wurde bei 7 Patientenkulturen folgender Versuch durchgeführt:

In der 2. oder 3. Passage wurden auf einer 6-Well-Platte  $5 \cdot 10^4$  Zellen je Well ausgesät. Diese wurden mit GMP+-Medium kultiviert, bis die MSC eine Konfluenz von 80% aufwiesen. Von diesem Punkt an wurden für die Dauer von 28 Tagen je 2 Wells mit Kontrollmedium, OD-Medium und AD-Medium gefüttert, wobei der Mediumwechsel auch hier alle 3 oder 4 Tage stattfand. Die Induktionsmedien enthielten im Gegensatz zum Kultivierungsmedium und zum Kontrollmedium 10% fetales Kälberserum (FKS). Das AD-Medium induzierte die Entstehung von Adipozyten mit Fett-Vakuolen, die mit der Oil-Red-Färbung sichtbar gemacht wurden. Unter dem Einfluss des OD-Medium wurde die

Osteogenese induziert, die nach Ablauf von 28 Tagen mittels der Von-Kossa-Färbung nachgewiesen wurde. Die mit Kontrollmedium kultivierten MSC sollten weder durch die von-Kossa-, noch durch die Oil-Red-Färbung eine deutliche Farbanreicherung zeigen und so als Negativ-Kontrolle dienen.

Tabelle 3: Kontrollmedium: Es enthält keine Stoffe, welche die Osteogenese oder Adipogenese der MSC induziert. (KO) Im Unterschied zu dem MSC-Kulturmedium enthält es nur wenig FFP und Thrombozytenlysate.

Inhaltsstoff	Menge	Hersteller
DMEM low Glucose	450ml	Gibco
L-Glutamin	5ml	Lonza
Penicillin/Streptomycin	5ml	Gibco
Heparin Natriumsalz	1ml	Carl Roth GmbH & Co Kg
Fresh Frozen Plasma	500µl	Blutbank Tübingen
Thrombozytenlysate	500µl	Blutbank Tübingen

### 3.5.1 Nachweis der adipogenen Differenzierung der MSC durch die Oil-Red-Färbung

Die MSC in den 6-Well-Platten wurden mit GMP+-Medium ernährt, bis sie eine Konfluenz von 80% erreichten. Anschließend wurden MSC in 2 Feldern einer 6-Well-Platte 28 Tage lang mit Spezialmedium ernährt, welches die Adipogenese induziert (AD-Medium). Die Inhaltsstoffe sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Medium, das die adipogene Differenzierung der MSC induziert (AD-Medium)

Inhaltsstoff	Menge	Hersteller
DMEM high glucose	426ml	PAA
FCS 10%	50ml	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	10ml	Gibco
Fungicide	6ml	Biochrom AG
3-Isobutylxanthin	5ml	Sigma
Indomethacin	2ml	Calbiochem
Dexamethason (0,1µM)	500µl	Sigma
Insulin (human)	500µl	Sigma

Die Oil-Red-Färbung erfolgte für jede untersuchte Patientenkultur bei jeweils 2 6-Well-Platten, in denen MSC mit AD-Medium kultiviert wurden, sowie einer 6-Well-Platte, in der MSC mit Kontrollmedium kultiviert wurden.

Die Oil-Red-Stammlösung besteht aus 0,5g Oil-Red, welches mit 100ml Isopropanol verdünnt wurde. Anschließend wird mit aqua dest. eine Mischung im Verhältnis 3:2 hergestellt, die 24 Stunden später filtriert wird.

Um die Fettvakuolen mit Oil-Red anzufärben, wurde zunächst das Medium aus den Wells abgesaugt. Anschließend wurden die Wells mit 2ml der Oil-Red-Färbelösung bedeckt. Nach 30 Minuten wurde die Färbelösung entfernt und die Platten drei Mal mit PBS gespült. Die rot angefärbten Fettvakuolen waren unter dem Mikroskop sichtbar und wurden fotografisch festgehalten. Auch makroskopisch ließ sich eine rote Anfärbung der ganzen 6-Well-Platten feststellen.

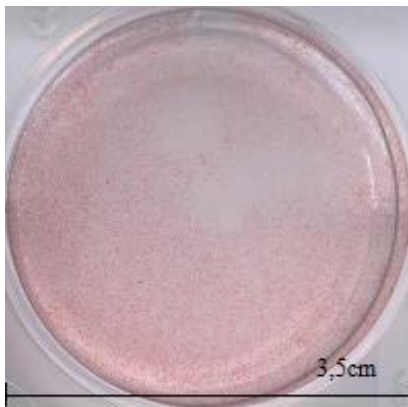


Abbildung 7: 6-Well-Platte, die nach Kultivierung der MSC mit AD-Medium mit Oil-Red angefärbt wurde

### 3.5.2 Nachweis der osteogenen Differenzierung der MSC durch die von-Kossa-Färbung

Nach Erreichen einer Konfluenz von 80% wurden MSC in 2 Feldern einer 6-Well-Platte 28 Tage lang mit OD-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die von-Kossa-Färbung. Auch eine 6-Well-Platte der gleichen Patientenkultur, die 28 Tage lang mit Kontrollmedium kultiviert wurde, wurde mit der von-Kossa-Technik angefärbt.

Tabelle 5: Inhaltsstoffe des osteogenen Induktionsmediums (OD)

Inhaltsstoff	Menge	Hersteller
DMEM high Glucose	427ml	Gibco
10% FCS	50ml	Biochrom AG
$\beta$ -Glycerolphosphat 10mM	5ml	Sigma
Penicillin/Streptomycin	5ml	Gibco
Fungizone/ Fungicid	6ml	Biochrom AG
L-Ascorbinsäure 0,17mM	1,75ml	Sigma
Dexamethason 0,1 $\mu$ M	500 $\mu$ l	Sigma

Die von-Kossa-Färbung dient als Standardmethode zum Nachweis von Mineralisierung von osteogenen Zellkulturen. Silberionen binden an die Anionen von Calciumsalzen. Die anschließende Reduktion der Silbersalze führt zu einer dunkelbraunen oder schwarzen, metallisch glänzenden Anfärbung.

Nach Absaugen des Mediums aus den 6-Well-Platten erfolgte die Fixierung mit auf  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgekühltem, 100-prozentigem Methanol für 5 Minuten. Anschließend wurden die Platten zweimal mit Aqua dest. gewaschen. Nun wurde die Silbernitrat-Färbelösung aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von 60 Minuten im Dunkeln wurden die Platten erneut zweimal mit Aqua dest. gewaschen. Im nächsten Schritt wurde eine Natriumcarbonatlösung aufgetragen. Diese wurde nach zweiminütiger Einwirkzeit entfernt und die Platten zweimal mit Aqua dest. gespült. Im letzten Schritt wurde eine Natrium-Thiosulfatlösung für zwei Minuten aufgetragen und die Platten anschließend wieder zweimal mit Aqua dest. gewaschen. Auch die Ergebnisse dieser Färbung wurden photographisch festgehalten.

### 3.6 FACS-Analyse der MSC

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung lässt anhand unterschiedlicher Ausprägung von Oberflächenmarkern eine Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Zelltypen zu. Ein Kriterium zur Einordnung von MSC ist die Exprimierung von CD73, CD90 und CD 105, und das Fehlen von CD14, CD 34 und CD45.

Die FACS-Analyse wurde bei allen verwendeten MSC-Kulturen in der 2. oder 4. Passage durchgeführt. Dazu wurden je 3 Zellkulturflaschen einer Zelllinie verwendet. Waren die MSC zu 80% konfluent, wurde das Kultivierungsmedium durch Kontrollmedium ersetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Accutase vom Flaschenboden gelöst und bei 7°C, 1500rpm, 7 Minuten lang zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 10,5ml PFEA-Puffer (Tabelle 6) gelöst.

Die Zellsuspension wurde auf 7 nummerierte 2,0 ml-Safe-Lock Tubes verteilt. Die Röhrchen wurden 4 Minuten lang bei 300g/0,3 rcf zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nun wurde 50µl Gammunex in jedes Cup pipettiert. Nach gründlichem Mischen durch den Vortexer wurden die Cups 20 Minuten lang bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde 1ml PFEA-Puffer in jedes Eppendorf-Cup gegeben und die Cups nach erneutem Zentrifugieren (4 Minuten, 300g) dekantiert. Nun wurden je 50µl der unten aufgeführten Antikörperlösungen auf die Proben verteilt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Antikörperlösungen, die bei der FACS-Analyse verwendet wurden

Probe	Funktion	Anti-körper	Farbstoff	Hersteller	Verdünnungsschema
1	Kontrolle				50µl PFEA
2	Positiv-Marker	CD73	PE	BD Pharmingen	20µl CD73+35µl PFEA
3		CD90	PE	R+D Systems	10µl CD90+45 µl PFEA
4		CD105	FITC	AbD serotec	10µl CD105+45 µl PFEA
5	Negativ-Marker	CD14	PE	BD Pharmingen	10µl CD14+45 µl PFEA
6		CD34	PE	Biologend	5µl CD34+50 µl PFEA
7		CD45	PE	Biologend	10µl CD45+45 µl PFEA

Die Proben wurden erneut 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde 1ml PFEA-Puffer in jedes Cup pipettiert, die Cups 4min bei 300g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das verbleibende Pellet wurde in 300µl PFEA-Puffer resuspendiert und in die FACS-Röhrchen überführt. Diese wurden bis zur Messung im FACS-Gerät kühl und dunkel gelagert.

Die FACS-Analyse wurde an dem Modell BD LSR II mithilfe der BD FACSDiva™ Software durchgeführt. Für die Farbstoffe PE und FITC wurde als Voreinstellung eine Wellenlänge von 370nm gewählt. Mit Hilfe des Programms FlowJo wurden die Ergebnisse ausgewertet und in Form eines Kurvendiagramms dargestellt. (52)

### 3.7 Attachment Assay

Bei diesem Versuch sollte geprüft werden, wie gut MSC an verschiedenen Proteinen, insbesondere Laminin 5 haften, und wie viel von diesen Proteinen dazu mindestens nötig ist.

Dieser Versuch wurde auf 35mm-Petrischalen durchgeführt. Auf der Rückseite wurde ein Kreis mit 4 Quadranten gezeichnet, wovon ein Quadrant nochmals halbiert wurde. Diese Kreisanteile wurden mit Laminin 5 Laminin 1, Collagen I, BSA (als Negativprobe) und Fibronectin beschriftet.

Fibronectine sind große Glykoproteine (500 kDa). Sie präsentieren sich in der Form von Dimeren aus zwei großen Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Durch Splicing entstehen viele verschiedene Isoformen von Fibronectin. (115) Im Körper existiert Fibronectin sowohl in flüssiger Form als auch als unlösliche Fasern auf der Zelloberfläche. MSC bilden Integrine aus, die eine Verbindung vom Cytoskelett der Zelle zum Fibronectin formen. Durch mechanischen Zug werden weitere Fibronectine zur Verfügung gestellt. (116, 117) Es kommt zu einer hohen Initialhaftung der MSC. (118) Aus diesem Grund eignet sich Fibronectin gut als Positivprobe bei Zellhaftungsversuchen.

Am Rand der Innenseite der Petrischalen wurde mit einem Fettstift ein Kreis aufgezeichnet, um die Fläche, auf der die Flüssigkeit sich später verteilen sollte, einzugrenzen.

Zuvor waren Laminin 1, Laminin 5 und Collagen I mit PBS auf eine Konzentration von 1fmol/µl verdünnt worden. In die Mitte der Kreisabschnitte wurde mit einer Pipette 1µl dieser Proteinlösungen als Tropfen aufgetragen. Mit dem Ziel, eine Proteinmenge von 2 oder 3 fmol zu erreichen, wurden gegebenenfalls 1µl-Tropfen übereinander aufgetragen. Ebenso wurden auf die Felder für Positiv- und Negativ-Probe 1 µl Fibronectin und BSA aufgetragen.



Die Protein-Tropfen auf den Petrischalen trockneten für 15 Minuten an der Luft. Danach wurde auf jede Petrischale 200µl einer 1% BSA-Lösung in PBS pipettiert. Die Flüssigkeit wurde gleichmäßig verteilt und die Petrischalen wurden 1 Stunde lang im Brutschrank inkubiert.

Für die Haftungsexperimente wurden MSC aus der 3. Passage benutzt. Erreichten sie eine Konfluenz von 80%, wurde am Vortag des Attachment Assay das Kulturmedium durch Kontrollmedium ausgetauscht. Jede Kulturflasche enthielt genug Zellen für je eine 35mm-Petrischale. Die Zellen wurden mit Accutase abgelöst. Das nach dem Zentrifugieren entstandene Pellet wurde in 10ml DMEM ohne Zusatzstoffe gelöst und 40 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension nochmal zentrifugiert und die Zellen wurden in 200µl Spezial-DMEM pro Petrischale aufgenommen.

Spezial-DMEM wurde aus den Bestandteilen 2ml DMEM, 200µl 1% BSA und 20µl Ionenmix gemischt.

Nach der Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit aus den Petrischalen entfernt und die Platten wurden mithilfe einer Pipette zweimal mit 500µl PBS gewaschen. 200µl der Zellsuspension wurden auf jede Petrischale pipettiert und gleichmäßig verteilt. Die Petrischalen wurden, je nach Versuchsaufbau, nochmals für 15 Minuten oder 30 Minuten bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension aus den Petrischalen entfernt und die Schalen gründlich mit PBS gewaschen. 400µl PBS wurden in die Petrischale pipettiert. Mit einer 200µl-Pipette wurden die angezeichneten Linien auf dem Boden der Petrischale unter Einsaugen und Ausstoßen der Flüssigkeit knapp über dem Schalenboden abgefahren. Jede Linie wurde 5 Mal auf diese Weise mit der Pipette abgefahren. Schließlich wurde das PBS bis auf einen kleinen Rest entfernt, um das vorzeitige Austrocknen der MSC zu verhindern. Die eingeteilten Felder der Petrischalen wurden nun dem unter dem Anxiovert 200M Mikroskop (Zeiss) fotografiert. (52, 119)

### 3.8 Nachweis der osteogenen Differenzierung von hMSC auf proteinbeschichteten 6-Well-Platten durch die von-Kossa-Färbung

Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung wurden MSC in der 3. Passage auf mit Proteinlösungen beschichtete 6-Well-Platten kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80% wurden sie für einen definierten Zeitraum von 3, 7 und 28 Tagen mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Parallel dazu wurde eine 6-Well-Platte mit MSC der gleichen Patientenkultur mitgeführt, die mit Kontrollmedium kultiviert wurde. Nach Ablauf des jeweiligen zu untersuchenden Zeitraums wurden die MSC entfernt. Die 6-Well-Platten wurden der von-Kossa-Färbung unterzogen. Anschließend wurden Detailausschnitte der Platten unter dem Mikroskop fotografiert. Außerdem wurden die ganzen 6-Well-Platten eingescannt und die Graustufen mithilfe des Programms ImageJ analysiert.

Zunächst wurden die 6-Well-Platten mit Proteinlösungen beschichtet. Diese bestanden aus den Proteinen Laminin 1, Laminin 5 und Collagen 1, welche mit der Konzentration von 1µg/ml in PBS gelöst wurden. Auf je ein 35mm-Well wurde 1,5ml der Proteinlösung aufgetragen und die Lösung durch Schwenken der Platten verteilt. Die Platten wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Proteinlösung entfernt, die Platten mit PBS gewaschen und an der Luft getrocknet.

Die Zellen wurden in der 3. Passage mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen pro Well ausgesät, wobei jeweils 2 Platten mit der gleichen Proteinlösung beschichtet wurden, um einen Vergleich zwischen der Kultivierung mit Differenzierungsmedium und Kontrollmedium ziehen zu können. Zudem wurden auch zwei unbeschichtete Platten mit Zellen bestückt, um zu erkennen, wie die MSC sich auf Plastik ohne Proteinbeschichtung entwickeln.

Die Zellen in den 6-Well-Platten wurden mit je 2ml GMP+-Medium kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 80% erreichten. Von diesem Zeitpunkt an wurde ein Teil der MSC mit osteogenem Differenzierungsmedium, der andere mit Kontrollmedium ernährt. Diese Phase dauerte bei einem Teil der Kulturen 28

Tage, bei einem anderen Teil wurde der Versuch für den Zeitraum von 3 und 7 Tagen durchgeführt.

Am Ende der Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium bzw. Kontrollmedium wurde die Einlagerung von Calciumapatit in die extrazelluläre Matrix als Zeichen der osteogenen Differenzierung mithilfe der Von-Kossa-Färbung nachgewiesen.

Nach der Färbung wurden charakteristische Detailausschnitte der gefärbten Platten fotografiert. Zusätzlich wurden die 6-Well-Platten eingescannt, um einen Vergleich der Intensität der Färbung zu erstellen. Anschließend wurde mithilfe des Grafik-Programms ImageJ der Grauwert der einzelnen Platten analysiert. Die Graustufe der Platten wurde als Zahl angegeben, die sich zwischen 0 und 200 befindet. Hierbei gilt, dass größere Zahlen einen helleren Ton widerspiegeln. Zur logischeren Darstellung wurde der Kehrwert dieser Zahlen gebildet. (52)

### 3.9 Kultivierung von MSC in proteinbeschichteten Kulturflaschen

Der Flaschenboden der 75ccm-Falcons wurde mit Proteinlösungen beschichtet, um das osteogene Differenzierungsverhalten der MSC auf beschichtetem Plastik zu beobachten. Mittels RT-PCR wurde die Expression von vier ausgewählten osteogenen Markergenen - Osteopontin, Osteocalcin, Alkalische Phosphatase und Runx-2 – untersucht. Folgende Proteine wurden zur Beschichtung verwendet:

Tabelle 7: Proteinlösungen zur Beschichtung der Kulturflaschen

Protein	Hersteller	Ausgangskonzentration
Laminin 1	Sigma	1mg/ml
Laminin 5	Abcam	0,65mg/ml
Collagen 1	BD Biosciences	200µg/ml

Durch Verdünnung mit PBS wurden Proteinlösungen mit einer Konzentration von 1µg/ml hergestellt. Die Zellkulturflaschen wurden mit jeweils 5ml dieser Lösungen befüllt und über Nacht im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt. Die

überschüssige Proteinlösung wurde abgenommen und die Flaschen mit PBS gespült. Nach dem die Flaschen an der Luft getrocknet waren, wurden sie mit  $1,5 \cdot 10^5$  MSC in der 3. Passage und 10ml GMP+-Medium befüllt.

Die MSC wurden zunächst mit MSC-Medium kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 80% erreichten. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen für 3 bzw. 7 Tage mit OD-Medium bzw. Kontrollmedium (welches weder die Adipogenese noch Osteogenese der MSC induziert) kultiviert. Insgesamt wurden je Patientenprobe 16 Flaschen zur Überprüfung der osteogenen Differenzierung mitgeführt, da zwei Zeitpunkte (3 und 7 Tage) überprüft wurden und zusätzlich zu den beschichteten Flaschen die Kultivierung auch auf unbeschichtetem Plastik erfolgte. (52)

Tabelle 8: Schema zur Beschichtung, der Kulturdauer und den verwendeten Differenzierungsmedien der vorbereiteten Kulturflaschen. OD = osteogenes Differenzierungsmedium, KO= Kontrollmedium.

Kultur-Dauer	3 Tage		7 Tage	
Beschichtung:	Differenzierungsmedium:		Differenzierungsmedium:	
Laminin 1	OD	KO	OD	KO
Laminin 5	OD	KO	OD	KO
Collagen I	OD	KO	OD	KO
unbeschichtet	OD	KO	OD	KO

### 3.10 Analyse der Expression osteogener Markergene

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die Expression der osteogenen Markergene Osteopontin, Osteocalcin, Alkalische Phosphatase und Runx-2 nach Kultivierung auf den proteinbeschichteten Kulturflaschen zu untersuchen.

Dies erfolgte in 3 Schritten:

1. Isolation der RNA der MSC
2. Umschreiben der RNA in cDNA
3. Quantitative Real Time PCR (RT-PCR)

Die ausführliche Versuchsanleitung findet sich im Anhang dieser Arbeit. (52)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellkultur der MSC

Nach Isolation aus dem Knochenmark wurden die MSC auf 2 bis 3 Kulturflaschen verteilt. Durch einen Mediumwechsel nach 24 Stunden wurde sichergestellt, dass nur diejenigen Zellen proliferieren konnten, die am Flaschenboden adhärent waren. Zunächst bildeten die einzelnen Zellen spindelförmige Fortsätze und formten sich später zu Kolonien. Nach dem Erreichen einer Konfluenz von 80% konnten sie in die erste Passage umgesetzt werden.

Bis zum Zeitpunkt der Versuche wurden die Zellkulturen drei Mal passagiert. Bei jedem Passagieren wurde die Anzahl der lebenden Zellen nach Ablösen vom Flaschenboden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. So wurde das Aussäen einer definierten Zahl von MSC in die Kulturflaschen ermöglicht.

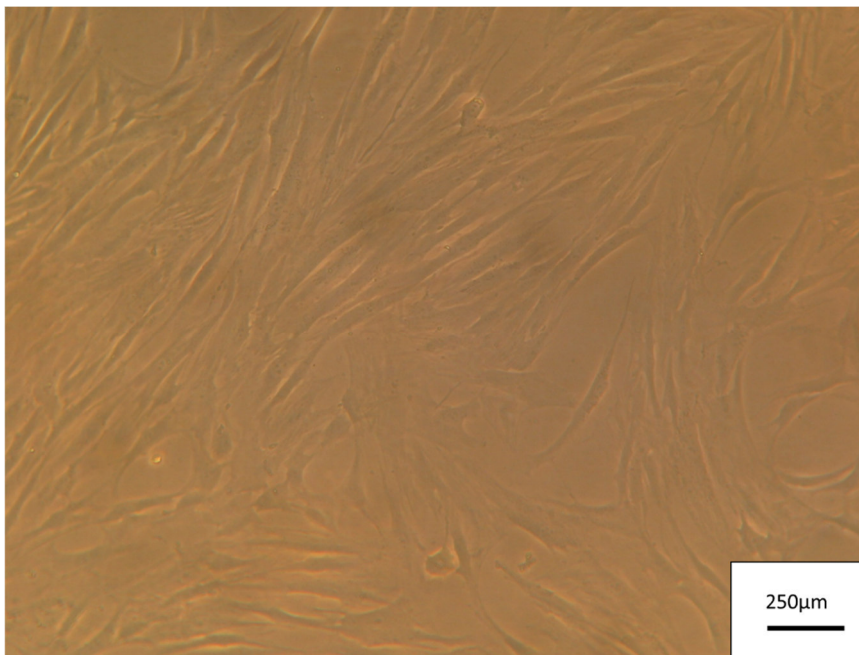


Abbildung 8: Zellen der MSC-Kultur ABC am 4. Tag der 2. Passage. Die Zellen hatten stellenweise eine Konfluenz von 80% erreicht, sodass sie zu diesem Zeitpunkt in die nächste Passage umgesetzt wurden.

In der ersten Passage wurden die Zellen mit einer Zellzahl von  $3,5 \cdot 10^5$ , in den darauffolgenden Passagen mit einer Zellzahl von  $1,5 \cdot 10^5$  je Kulturflasche

ausgesät. Sie wurden mit MSC-Kultivierungsmedium unter GMP-konformen Bedingungen gezüchtet, bis sie in der 3. Passage verschiedenen Versuchen unterzogen wurden. Unter dem Einfluss dieses Mediums erreichten die Zellen in der Primärkultur nach durchschnittlich 10,5 Tagen eine Konfluenz von 80% und konnten umgesetzt werden. Die MSC erreichten in der 1. Passage nach 5,4 Tagen eine Konfluenz von 80%, in der 2. Passage nach 6,5 Tagen und in der 3. Passage nach 5,6 Tagen. Die MSC, die für die Versuche verwendet werden wurden, erreichten nach insgesamt 26,4 Tagen eine Konfluenz von 80% in der 3. Passage. (52)

Einige Kulturen erreichten die 3. Passage nicht, weil sie schon in der Primärkultur nicht plastik-adhärenz waren. Dies war bei zwei der isolierten Zellkulturen der Fall. Jene Zellkulturen wurden bei der Interpretation der Versuchsergebnisse und des Wachstums der MSC nicht berücksichtigt. Drei der isolierten und angezüchteten Zellkulturen proliferierten nach dem Umsetzen in darauffolgende Passagen nicht mehr und wurden ebenfalls verworfen, konnten bis zu diesem Zeitpunkt teilweise aber noch für Versuche verwendet werden.

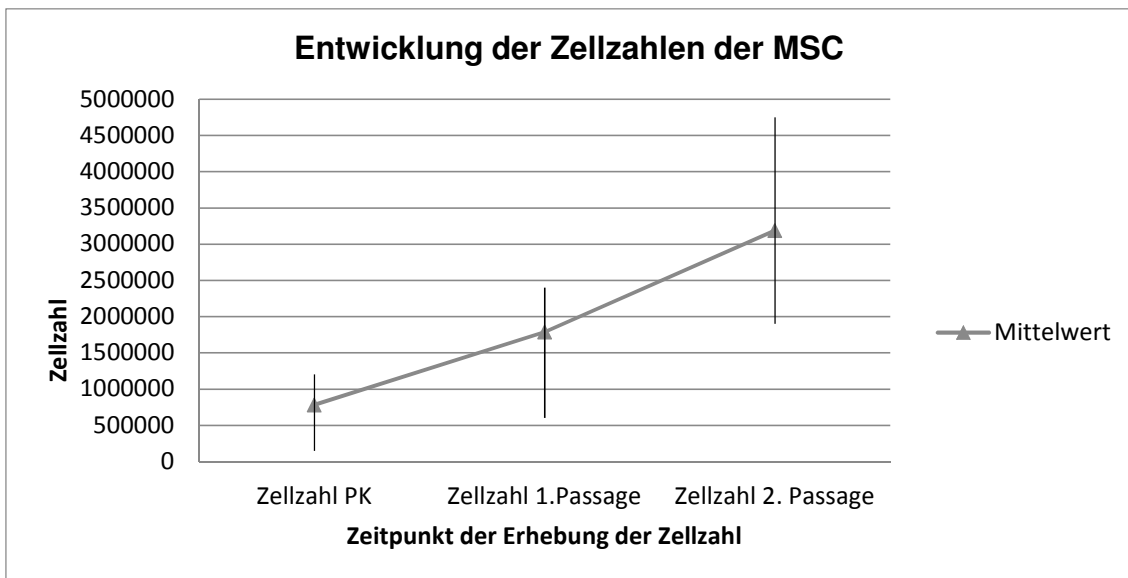


Abbildung 9: Entwicklung der Zellzahlen der MSC von der Primärkultur bis zur 2. Passage. Die Zellzahlen wurden mithilfe der Neubauer-Zählkammer beim Umsetzen der Zellen ermittelt. In diesem Diagramm sind die Mittelwerte sowie die Spannbreiten der Zellzahlen angegeben.

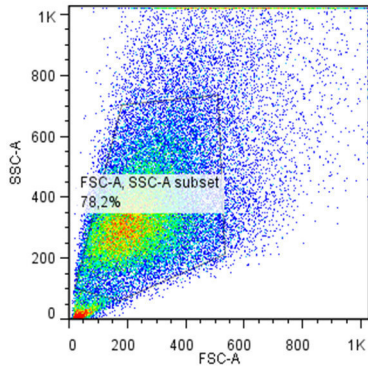
In Abbildung 9 ist das Expansionsverhalten der verschiedenen Patientenkulturen im Vergleich dargestellt. Hier sind die Mittelwerte der Zellzahl zu verschiedenen Zeitpunkten sowie die Spannbreite der individuellen Zellzahlen ersichtlich. Die erste Ermittlung der Zellzahlen fand am Ende der Primärkultur vor dem Umsetzen in die erste Passage statt. Die Zellzahl nach der 3. Passage wurde nicht ermittelt, sondern die Zellen direkt für Versuche verwendet. Es zeigten sich deutliche Unterschiede im Expansionsverhalten. Beispielsweise wiesen die Kulturen PPH und HFR bei der Zählung der Zellen beim Umsetzen von der 2. in die 3. Passage die höchste Zellzahl auf, während die Kulturen FSW und JPK sich nur wenig vermehrten.

Zu beachten ist dabei jedoch auch die unterschiedliche Zellzahl zu Beginn der Kultivierung, abhängig davon, wie viele Zellen aus dem Knochenmark isoliert werden konnten.

## 4.2 FACS-Analyse der MSC

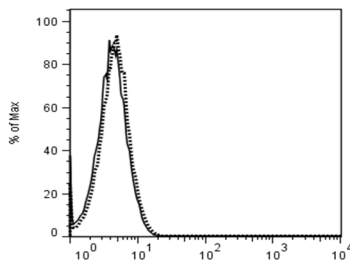
Bei allen verwendeten MSC-Kulturen wurde die FACS-Analyse durchgeführt, um sicherzustellen, dass die MSC erfolgreich von den hämatopoetischen Zellen separiert wurden. Zur FACS-Analyse wurden jeweils 3 Zellkulturflaschen mit einer Zelldichte von 80% in der 2. Passage verwendet. War die FACS-Analyse aufgrund mangelnder Zellzahl nicht möglich, so wurde sie in der 3. oder 4. Passage wiederholt. Mit Hilfe des Programms FlowJo erfolgte die Auswertung der FACS-Analyse in Form von Histogrammen.

MSC exprimieren die Oberflächenmarker CD 73, CD 90 und CD 105, nicht jedoch die Oberflächenmarker CD 14, CD 34 und CD 45 (siehe Kapitel 2.5.1). Alle mittels FACS-Analyse untersuchten MSC entsprachen diesen Kriterien. Beispielhaft sind in Abbildung 10 die Ergebnisse der FACS-Analyse der Patientenkultur BSR dargestellt. (52)

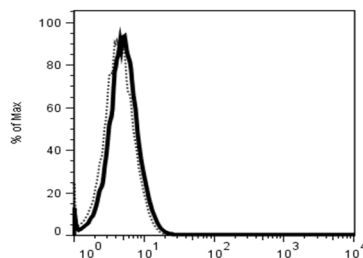


Das ausgewählte Fenster zeigt die MSC an, die in die FACS-Analyse eingingen (SSC-A subset). Das gewählte Raster wird eingesetzt, um tote Zellen oder Zelltrümmer von der Untersuchung auszuschließen.

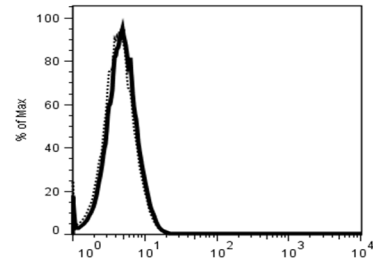
CD 14 negativ



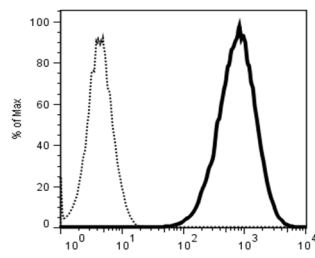
CD 34 negativ



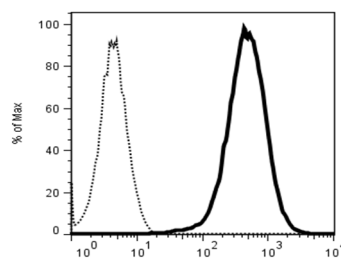
CD 45 negativ



CD 73 positiv



CD 90 positiv



CD 105 positiv

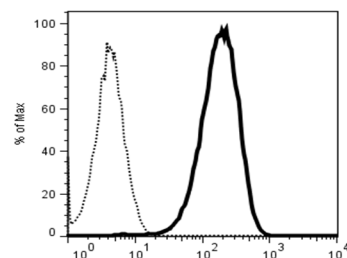


Abbildung 10: Histogramme der FACS-Analyse für die MSC-Kultur BSR. Die Zellen wiesen nicht die Oberflächenmarker CD 14, CD 34 und CD 45 auf. Sie besaßen die Oberflächenmarker CD 73, CD 90 oder CD 105. (schwarze Linie = Antikörperfluoreszenz, graue Linie = Eigenfluoreszenz)



### 4.3 Pluripotentes Potential der MSC

Laut den Kriterien von Friedenstein et al. besitzen MSC das Potential, sich unter geeigneten Bedingungen zu Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten zu entwickeln. Um dieses pluripotente Potential nachzuweisen, wurden die von Kossa-Färbung zum Nachweis osteogener Differenzierung und die Oil-Red-Färbung zum Nachweis adipogener Differenzierung durchgeführt.

Die MSC wurden in der 3. Passage in 6-Well-Platten mit einer Anzahl von  $5 \cdot 10^4$  Zellen pro Well ausgesät. Sie wurden durchschnittlich 6,2 Tage mit GMP+-Medium ernährt, bis sie eine Konfluenz von 80% erreichten. Je zwei Platten einer 6-Well-Platte wurden 28 Tage lang mit Kontrollmedium, osteogenem Differenzierungsmedium und Adipozyten-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Platten mit der von-Kossa-Färbung zum Nachweis der Bildung von Calciumkristallen und mit der Oil-Red-Färbung zum Nachweis von Fettvakuolen angefärbt. Zum Vergleich wurden die von-Kossa-Färbung und die Oil-Red-Färbung auch bei je einer Platte mit MSC, die mit Kontrollmedium kultiviert worden waren, durchgeführt.



Abbildung 11: 6-Wellplatte, auf der MSC der Kultur WSL zum Nachweis ihres pluripotenten Potentials 28 Tage lang mit Differenzierungsmedien angezüchtet und anschließend mit Oil-Red- und der von-Kossa-Färbung angefärbt werden. Die Platte wurde anschließend eingescannt. Die MSC, die mit AD-Medium kultiviert wurden, ließen sich durch die Oil Red-Färbung rot anfärben. Die MSC, die mit OD-Medium kultiviert wurden, produzierten eine Matrix, die mit der Von-Kossa-Färbung dunkel angefärbt wurde. Unter dem Einfluss von Kontrollmedium kam es zu keiner adipogenen und osteogenen Differenzierung.

Die Oil-Red- und von-Kossa-Färbung wurde bei 7 verschiedenen Kulturen durchgeführt. Beispielhaft sind hier Detailaufnahmen mit einer 150-fachen Vergrößerung dargestellt.

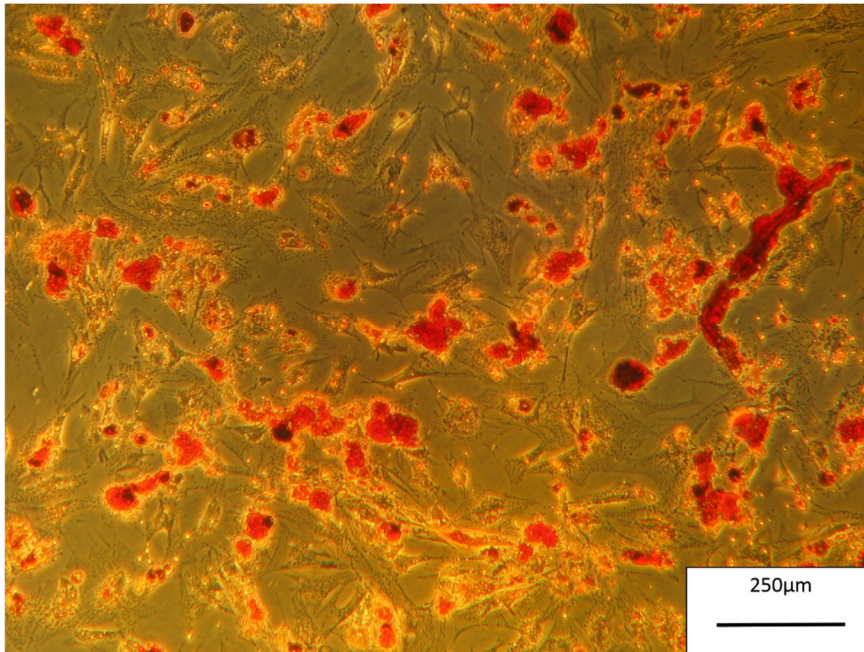


Abbildung 12: Zellen der MSC-Kultur WSL, die 28 Tage lang mit adipogenem Induktionsmedium kultiviert wurden. Mit Hilfe der Oil-Red-Färbung wurden die Fettvakuolen der Zellen leuchtend rot angefärbt.

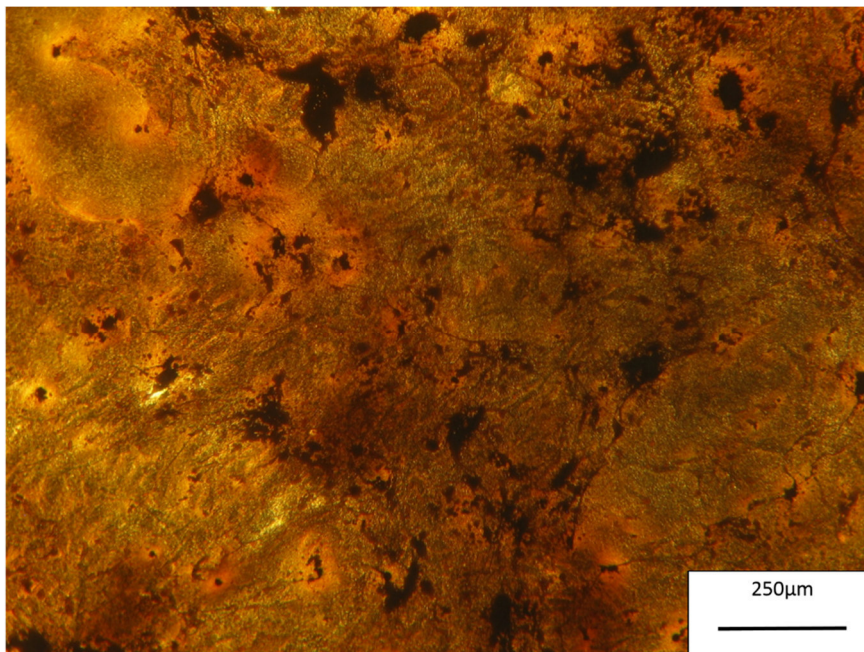


Abbildung 13: Zellen der MSC-Kultur GIR, die 28 Tage lang mit osteogenem Induktionsmedium kultiviert wurden. Mit Hilfe der Von-Kossa-Färbung wurden Calciumphosphateinlagerungen dunkel angefärbt.

MSC, die unter OD-Bedingungen kultiviert wurden, nahmen eine kuboide Zellform an. Es ist erkennbar, dass MSC, die 28 Tage lang mit Osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert wurden, sich mit der Von-Kossa-Färbung dunkel anfärben lassen. MSC, die mit adipogenem Differenzierungsmedium gezüchtet wurden, bildeten Fettvakuolen aus, welche mit der Oil-Red-Färbung rot angefärbt wurden. Diese Anfärbbarkeit ließ sich bei allen untersuchten MSC-Kulturen nach mehrtägigem Kontakt mit dem entsprechenden Induktionsmedium reproduzieren. Jedoch ist auch zu beobachten, dass teilweise erhebliche Unterschiede in der Intensität der Färbung bestanden. Bei der von-Kossa-Färbung kam dies teilweise durch eine Ablösung der gefärbten Matrix vom Boden der Kulturplatte während des Färbeprozesses zustande. Mikroskopisch ließ sich erkennen, dass nicht alle Zellen rot angefärbte Fettvakuolen ausbilden. Die Zahl und Größe der Fettvakuolen wies eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen Stellen einer Kulturplatte und zwischen unterschiedlichen Kulturplatten auf. MSC, die mit Kontrollmedium kultiviert wurden, zeigten keine Anfärbbarkeit mit der von-Kossa-Färbung und der Oil-Red-Färbung.

Aufgrund der hier nachgewiesenen eindeutigen Färbereigenschaften der MSC ist davon auszugehen, dass sie osteogenes und adipogenes Differenzierungspotential haben. (52)

#### 4.4 Haftung der MSC auf Proteinen der extrazellulären Matrix

Mittels Attachment Assays wurde die initiale Haftung von MSC auf Laminin 1, Laminin 5 und Collagen 1 untersucht. Dazu wurden die Proteine aufgelöst und auf die Petrischalen gespottet.

Jeweils 1, 2 und 3 fmol der verschiedenen Proteine wurde auf die Petrischalen aufgetragen. Die MSC wurden für 15 und 30 Minuten auf die Petrischalen aufgebracht. Danach wurden die nicht adhärenen Zellen durch Spülen entfernt. Die adhärenen Zellen stellten sich als heller kreisförmiger Fleck dar. Sie wurden fotografisch dokumentiert. Als Positivkontrolle diente Fibronectin, als Negativkontrolle diente BSA.

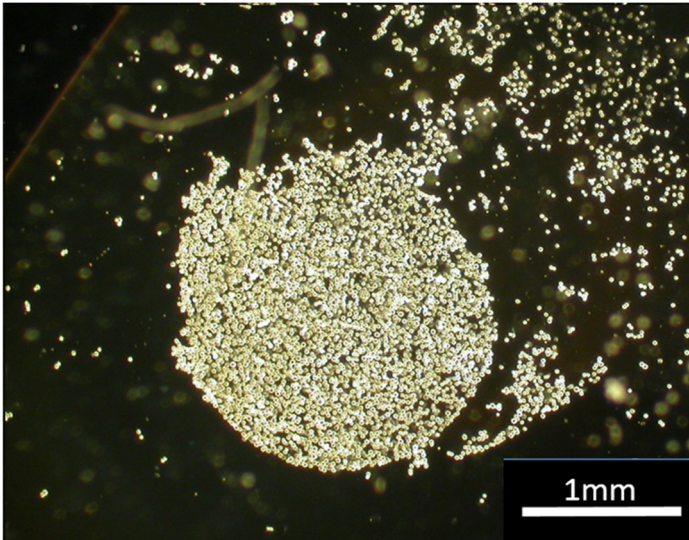


Abbildung 14: Positivprobe der Attachment Assays: Fibronectin-Spot mit darauf haftenden MSC. Bei ausreichender Initialhaftung der MSC auf Laminin 1, Laminin 5 oder Collagen I wird ein ähnliches Ergebnis erwartet

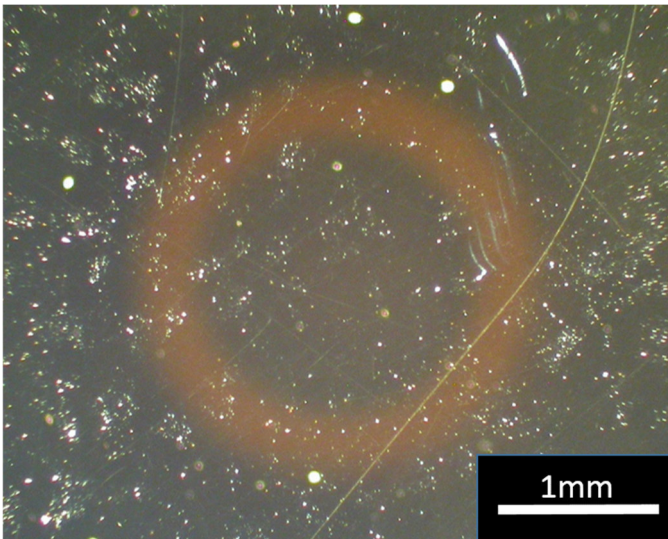


Abbildung 15: Negativ-Probe der Attachment Assays. BSA-Spot ohne erkennbare Grenzen, die Zellen sind gleichmäßig und ungeordnet verteilt. Der helle Lichtkreis ist als Artefakt bei der Photographie entstanden.

Dieser Versuch wurde bei 7 MSC-Proben durchgeführt. Bei allen Versuchen dieser Art zeigte sich keine Haftung bei dieser Stoffmenge. Lediglich bei 2fmol Collagen I zeigte sich bei 2 Proben eine leichte Haftung. Bei einem Teil dieser Versuche konnte auch auf Fibronectin keine ausreichende Initialhaftung der MSC beobachtet werden können. (52)

## 4.5 Osteogene Differenzierung der MSC auf Proteinen der zellulären Matrix

Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung diente die von-Kossa-Färbung auf beschichteten 6-Well-Platten, auf denen MSC kultiviert worden waren. 75ccm-Falcons wurden mit Laminin 1, Laminin 5 und Collagen I in Konzentrationen von 1 µg/ml beschichtet. In jedem Falcon wurden  $5 \cdot 10^4$  MSC einer Kultur in der 3. Passage ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80% mit Kultivierungs-Medium ernährt. Dies nahm durchschnittlich 4,5 Tage in Anspruch. (Siehe Kapitel 3.8). Anschließend wurde je eine Probe der MSC in den beschichteten Wells mit osteogenem Differenzierungsmedium und im Vergleich dazu eine Probe mit der gleichen Beschichtung mit Kontrollmedium gezüchtet. Zweimal wöchentlich wurde ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt.

Die von-Kossa-Färbung fand bei einer Gruppe von 5 MSC-Kulturen nach 3 und 7 Tagen statt, wobei hier die 6-Wells doppelt angelegt und gefärbt wurden, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Bei einer anderen Gruppe von 8 MSC-Kulturen wurde die Von-Kossa-Färbung nach 28 Tagen durchgeführt. Diese Färbetechnik basiert darauf, dass Silberionen sich an Calciumsalzen anlagern. Durch Reduktion im Tageslicht werden die braunschwarz gefärbten Calciumstrukturen sichtbar.

Unter dem Einfluss von osteogenem Induktionsmedium zeigte sich bei allen Kulturen nach 3 Tagen nur eine geringe Anfärbbarkeit der Platten. Nach 7 Tagen zeigten sich nach der von-Kossa-Färbung teilweise schon intensiv dunkle Platten. Nach 28 Tagen wurden alle Platten komplett angefärbt oder wiesen zumindest dunkle Einschlüsse auf. Unter dem Einfluss von Kontrollmedium kam es nicht zur Mineralisierung der Matrix und die Platten wurden nicht dunkel angefärbt.

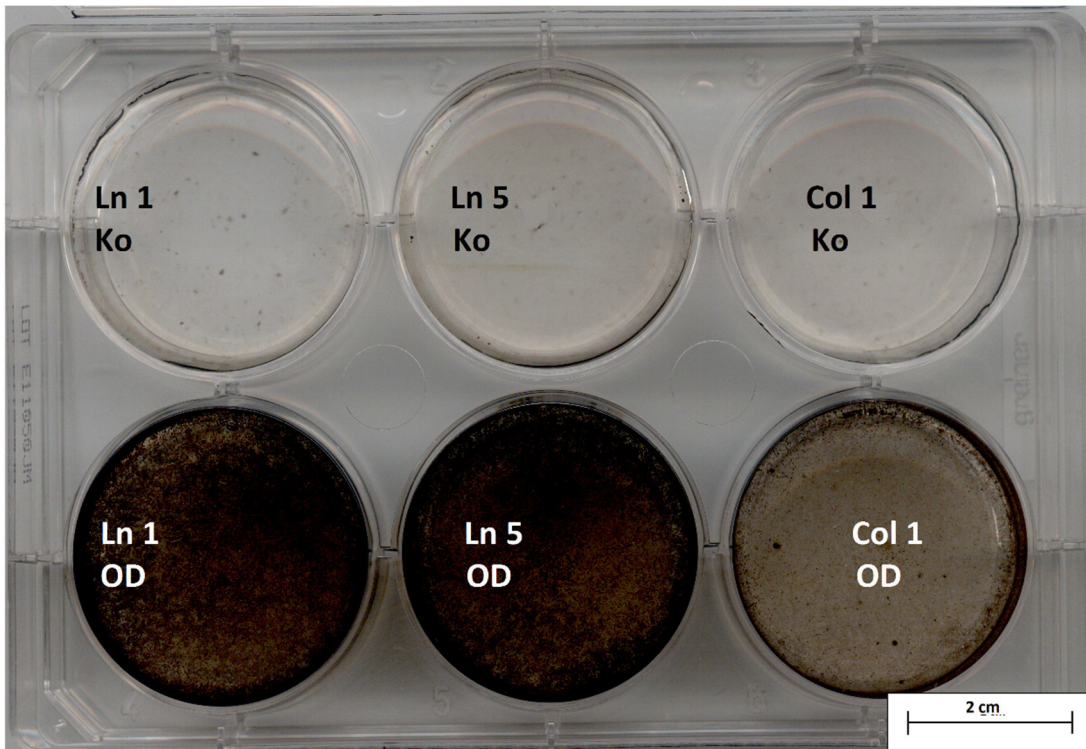


Abbildung 16: Eingescannte 6-Well-Platte der MSC-Kultur ATS. Nach Erreichen einer 80%-igen Konfluenz der MSC wurden die Zellen nun mit GMP+-Medium zur Kontrolle (Ko) und OD-Medium kultiviert (OD). Nach 7 Tagen wurde die von-Kossa-Färbung durchgeführt.

Charakteristische Ausschnitte der Platten wurden fotografiert. Zusätzlich wurden die 6-Well-Platten eingescannt. Mit dem Grafik-Programm ImageJ wurde die Graustufe der einzelnen Platten ermittelt, welche als Zahl zwischen 0 und 200 dargestellt wurde, wobei große Zahlen einen helleren Ton widerspiegeln. Im Folgenden wurden die Kehrwerte dieser Zahlen verwendet, um die Darstellung in Diagrammform für den Betrachter sinnvoll zu gestalten. Zunächst wurden die Mittelwerte der Zahlenwerte für je eine Beschichtung zu einem Zeitpunkt mit dem gleichen Kulturmedium, für die verschiedenen Zellkulturen ermittelt. Anschließend wurde errechnet, um welchen Faktor die Zahlenwerte für MSC, die mit OD-Medium gefüttert wurden im Gegensatz zu den Zahlenwerten für MSC, die mit Kontrollmedium gefüttert wurden, erhöht waren. Diese Werte wurden gegen 1 als Kontrolle gewichtet und in Diagrammform aufgetragen. Zum Nachweis der statistischen Signifikanz wurde der t-Test durchgeführt.

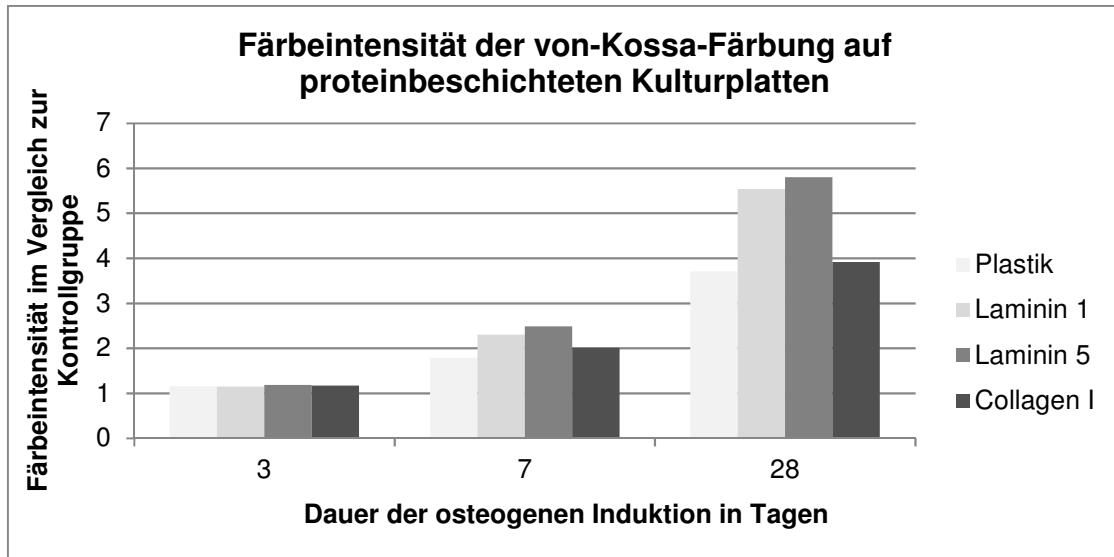


Abbildung 17: Vergleich der Färbeintensität bei der Von-Kossa-Färbung von 6-Well-Platten, die vorher mit Laminin 1, Laminin 5, Collagen 1 beschichtet wurden, nach 3-tägiger, 7-tägiger und 28-tägiger Induktion, normiert auf die Kultivierung mit Kontrollmedium. Diese Abbildung wurde auch im Artikel „Laminin-5 and type I collagen promote adhesion and osteogenic differentiation of animal serum-free expanded human mesenchymal stromal cells.“ veröffentlicht. (52)

Nach 3-tägiger osteogener Induktion zeigten sich keine relevanten Unterschiede der Färbeintensität. Nach 7 Tagen war jedoch schon der begünstigende Einfluss von Laminin 5, gefolgt von Laminin 1, auf die Mineralisierung der Matrix erkennbar. Nach 28-tägiger osteogener Induktion war ersichtlich, dass die Beschichtung mit Laminin 5 im Vergleich zu Plastik und Collagen I zu der intensivsten Anfärbung bei der von-Kossa-Färbung führte. ( $p < 0.04$ ) Die MSC, die auf mit Laminin 1 beschichteten Platten kultiviert worden waren, zeigten ebenfalls intensive Grauwerte, allerdings mit keiner Signifikanz ( $p < 0,09$ ). Eine vergleichsweise deutlich reduzierte Färbeintensität zeigten MSC, die auf Platten, die mit Collagen 1 und auf unbeschichteten Platten kultiviert wurden. (52)

Auf einzelnen 6-Well-Platten war dieses Färbeverhalten, bei dem Laminin 5 und Laminin 1 zu einer dunkleren Färbung der Substanz auf den Platten geführt hatte, auch ohne Analyse mit technischen Hilfsmitteln deutlich erkennbar. Dies ist zum Beispiel an der Patientenkultur ATS A gut erkennbar. Die 6-Well-Platten, die mit Laminin 1 und Laminin 5 beschichtet worden waren, sind nach der von-Kossa-Färbung deutlich dunkler als jene, die mit Collagen I oder gar nicht angefärbt wurden. MSCs vom gleichen Patienten zeigten bei den Von-Kossa-

Färbungen nach 3 und 7 Tagen oft unterschiedliche Ergebnisse. So zeigte sich auch bei der parallel mitgeführten Patientenkultur ATS B bei allen Beschichtungen nur eine schwache Einlagerung von Silbernitrat.

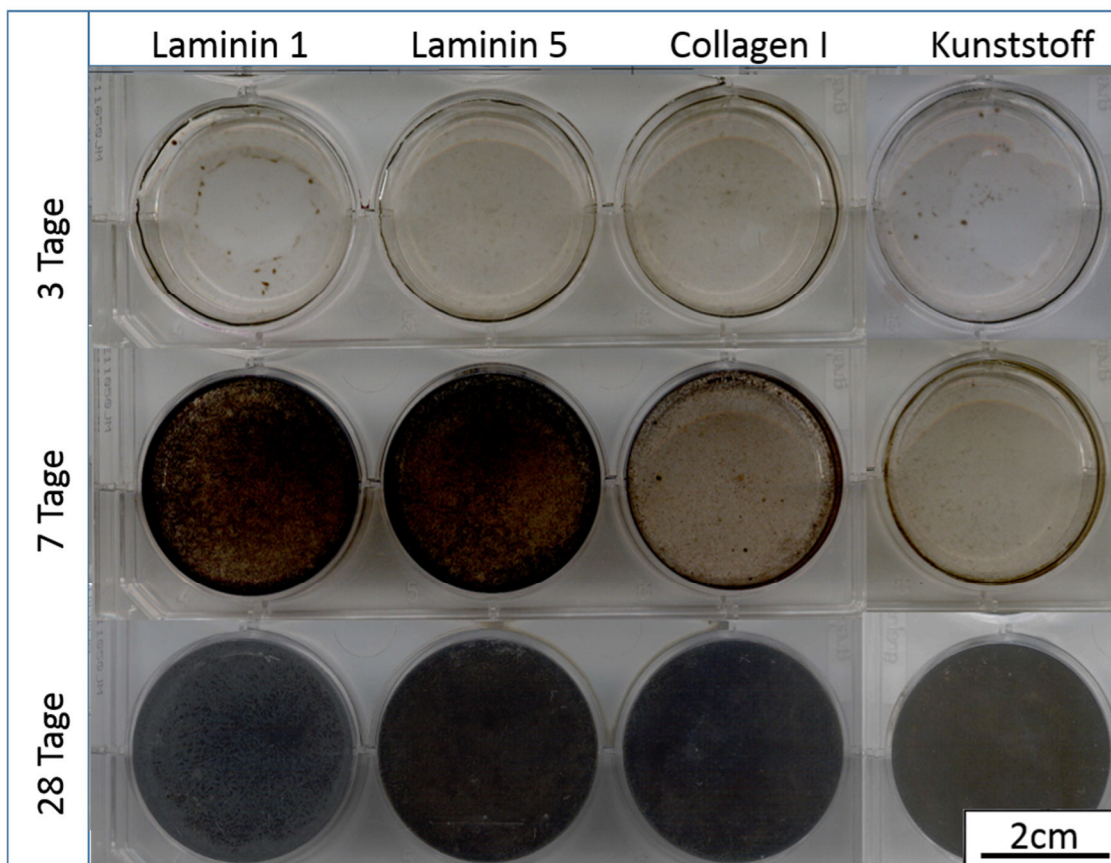
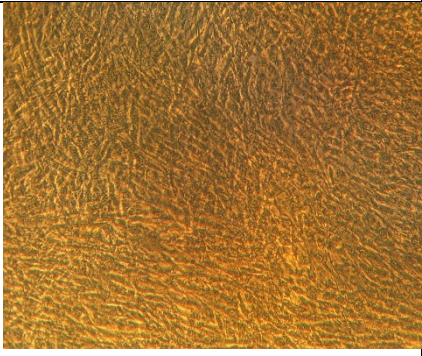
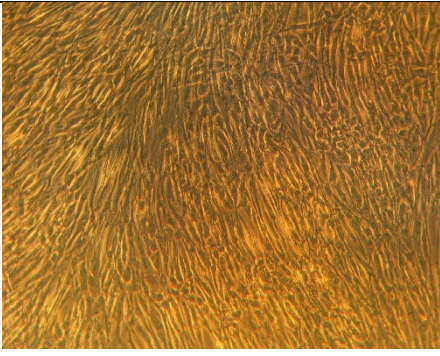
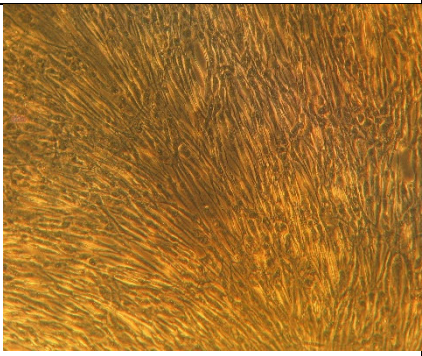
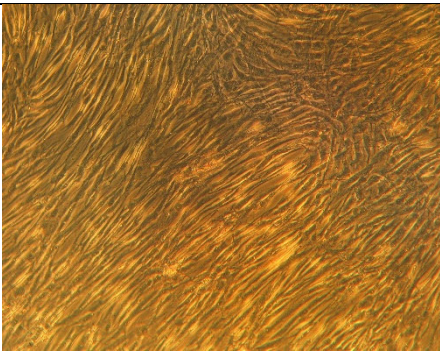
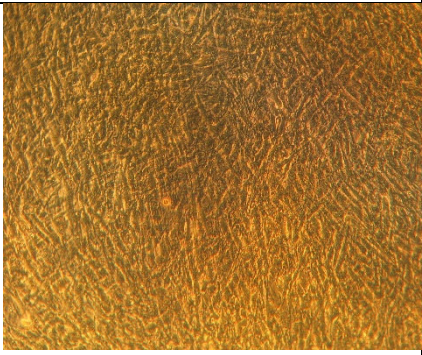
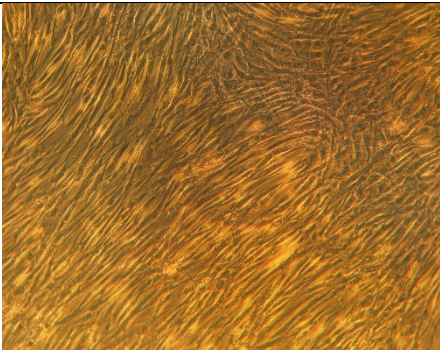
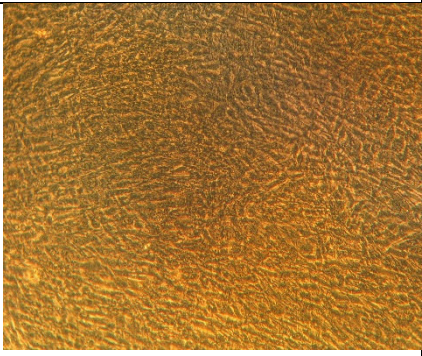
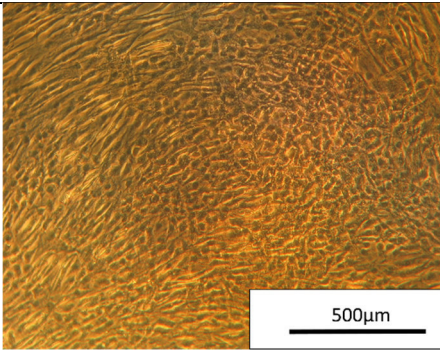
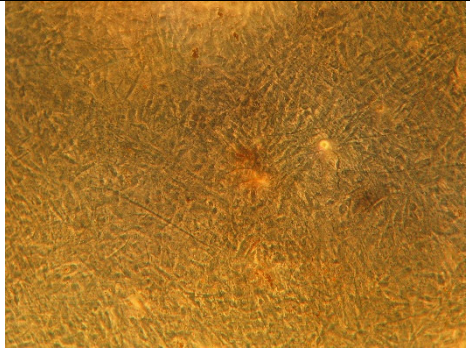
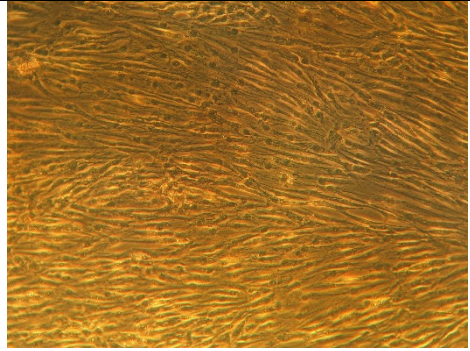
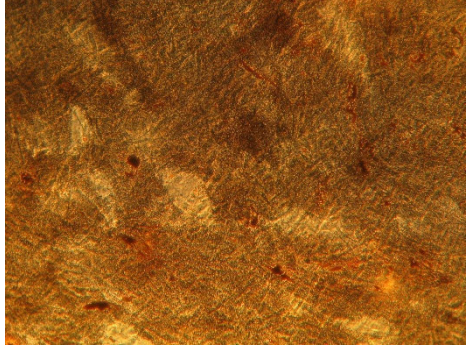
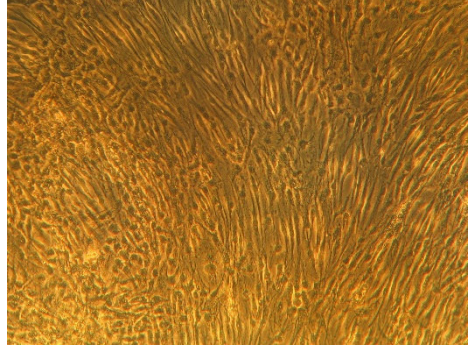
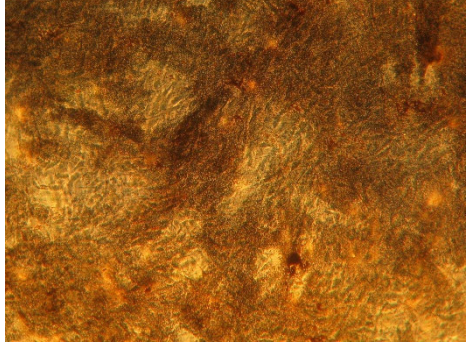
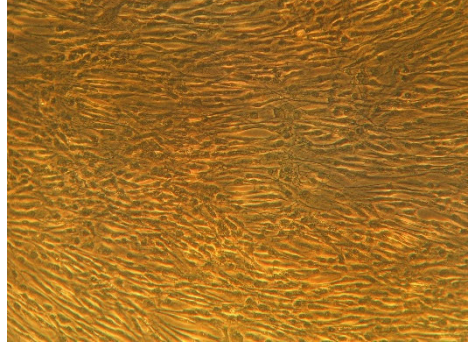
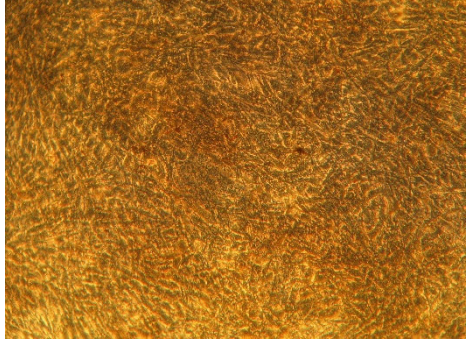
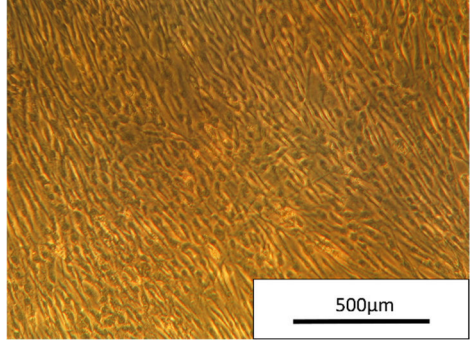


Abbildung 18: Ausschnitte aus eingescannten 6-Well-Platten nach der Von-Kossa-Färbung. Beispielhaft sind hier die MSC der Kultur ATS nach 3-tägiger und 7-tägiger osteogener Induktion und MSC der Kultur GIR nach 28-tägiger osteogener Induktion auf beschichteten 6-Well-Platten dargestellt. Diese Abbildung wurde auch im Artikel „Laminin-5 and type I collagen promote adhesion and osteogenic differentiation of animal serum-free expanded human mesenchymal stromal cells.“ veröffentlicht. (52)

Auch bei mikroskopischer Betrachtung ließ sich eine unterschiedliche Mineralisierung der Matrix feststellen. Beispielhaft ist dies an Detailaufnahmen der eingefärbten Kulturplatten von 2 MSC-Kulturen sichtbar (Abbildung 19). Nach 7 Tagen sind auf Laminin 1 und Laminin 5 mehr Silbereinschlüsse sichtbar als bei osteogener Induktion der MSC auf Collagen 1 und unbeschichteten Platten. (52)



Beschichtung	3-tägige Induktion (MSC ATS)	osteogene 3-tägige Kultivierung mit Kontrollmedium
Plastik		
Laminin 1		
Laminin 5		
Collagen I		

Beschichtung	7-tägige osteogene Induktion (MSC ATS)	7-tägige Kultivierung mit Kontrollmedium
Plastik		
Laminin 1		
Laminin 5		
Collagen I		

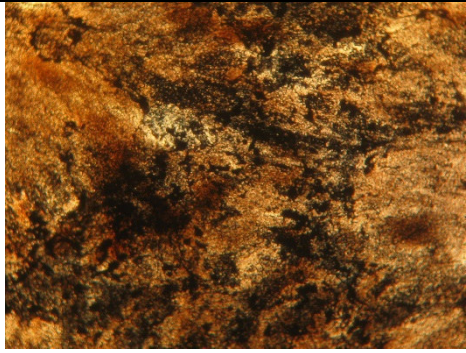
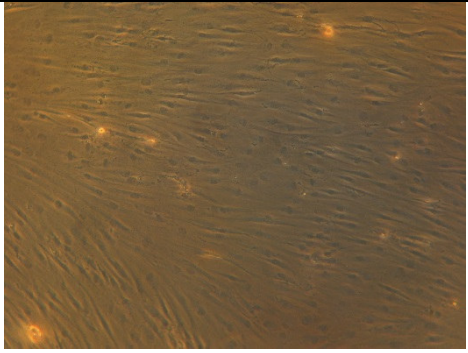
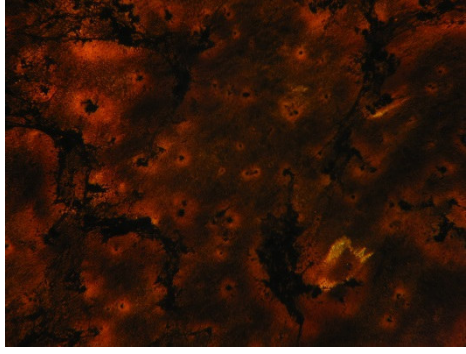
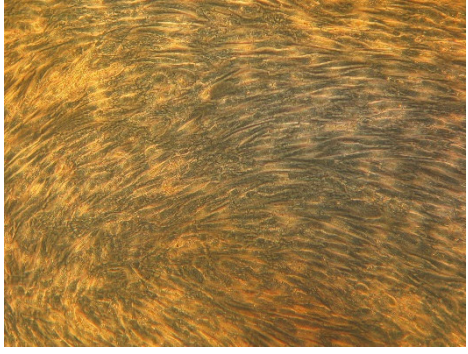

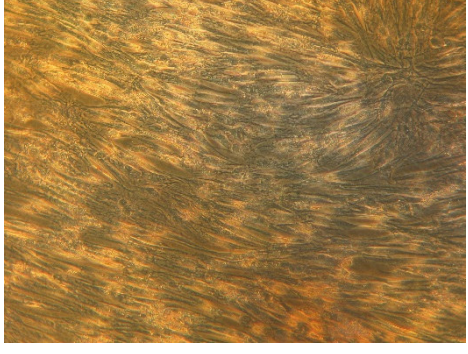
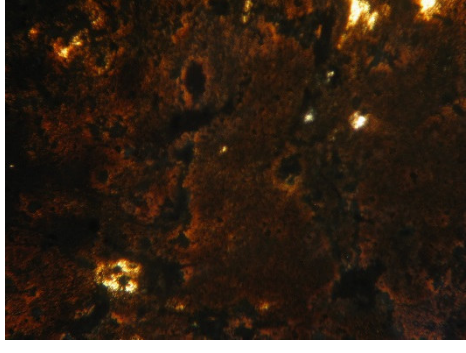
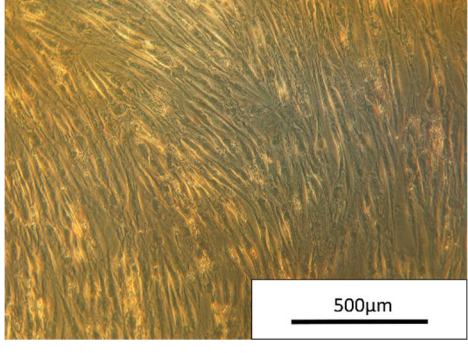
Beschichtung	28-tägige osteogene Induktion (MSC JPK)	28-tägige Kultivierung mit Kontrollmedium
Plastik		
Laminin 1		
Laminin 5		
Collagen I		

Abbildung 19: Dargestellt sind Detailaufnahmen der von-Kossa-Färbung von MSC auf unterschiedlichen Beschichtungen. MSC der Kulturen ATS und JPK wurden 3 und 7 Tage bzw. 28 Tage lang mit Osteogenem Induktionsmedium bzw. Kontrollmedium kultiviert. Bei der von-Kossa-Färbung sieht man teils bereits nach 7 Tagen eine stärkere Anfärbung bei den mit Laminin 1 und Laminin 5 beschichteten Platten.

## 4.6 Analyse der Expression osteogener Markergene

Ein Versuchsteil dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Expression osteogener Markergene unter dem Einfluss von Proteinen der extrazellulären Matrix mittels real-time PCR.

MSC nach der 3. Passage wurden in Zellkulturflaschen kultiviert, die zuvor mit Laminin 1, Laminin 5 und Collagen beschichtet worden waren. Nach Erreichen einer 80%igen Konfluenz der Zellen wurde die osteogene Differenzierung mit Spezialmedien induziert. Nach 3 und 7 Tagen wurden die MSC isoliert und mittels real-time PCR die Expression osteogener Markergene quantifiziert. (Siehe Kapitel 5.9., 5.10.)

Die 4 Markergene Alkalische Phosphatase, Runx-2, Osteocalcin und Osteopontin wurden untersucht. Bei 4 der Patientenkulturen wurden diese Schritte durchgeführt. Bei den Patientenkulturen CRA und GIR konnte die Expression aller 4 Markergene bei allen Beschichtungen und zu den beiden gewünschten Untersuchungszeitpunkten analysiert werden. Bei den beiden Patientenkulturen ABC und IRR wurden nur die Proben auf Genexpression hin untersucht, bei denen es technisch möglich war und bei denen das Ergebnis zielführend war. Bei einigen Patientenkulturen konnten die Ergebnisse nicht verwertet werden, weil das Untersuchungsmaterial schon in einem der vorherigen Schritte beschädigt wurde oder die Untersuchung mit dem Light Cycler keine Daten erbrachte.

Die mit Hilfe des Programms Molecular Biochemical Light Cycler Software erbrachten Ergebnisse wurden mit dem Programm Excel ausgewertet und in Diagrammform dargestellt. (Abbildung 20) Zu beachten ist hierbei, dass aufgrund der niedrigen Probenzahl keine Ergebnisse mit statistischer Signifikanz erreicht werden konnten. (52)

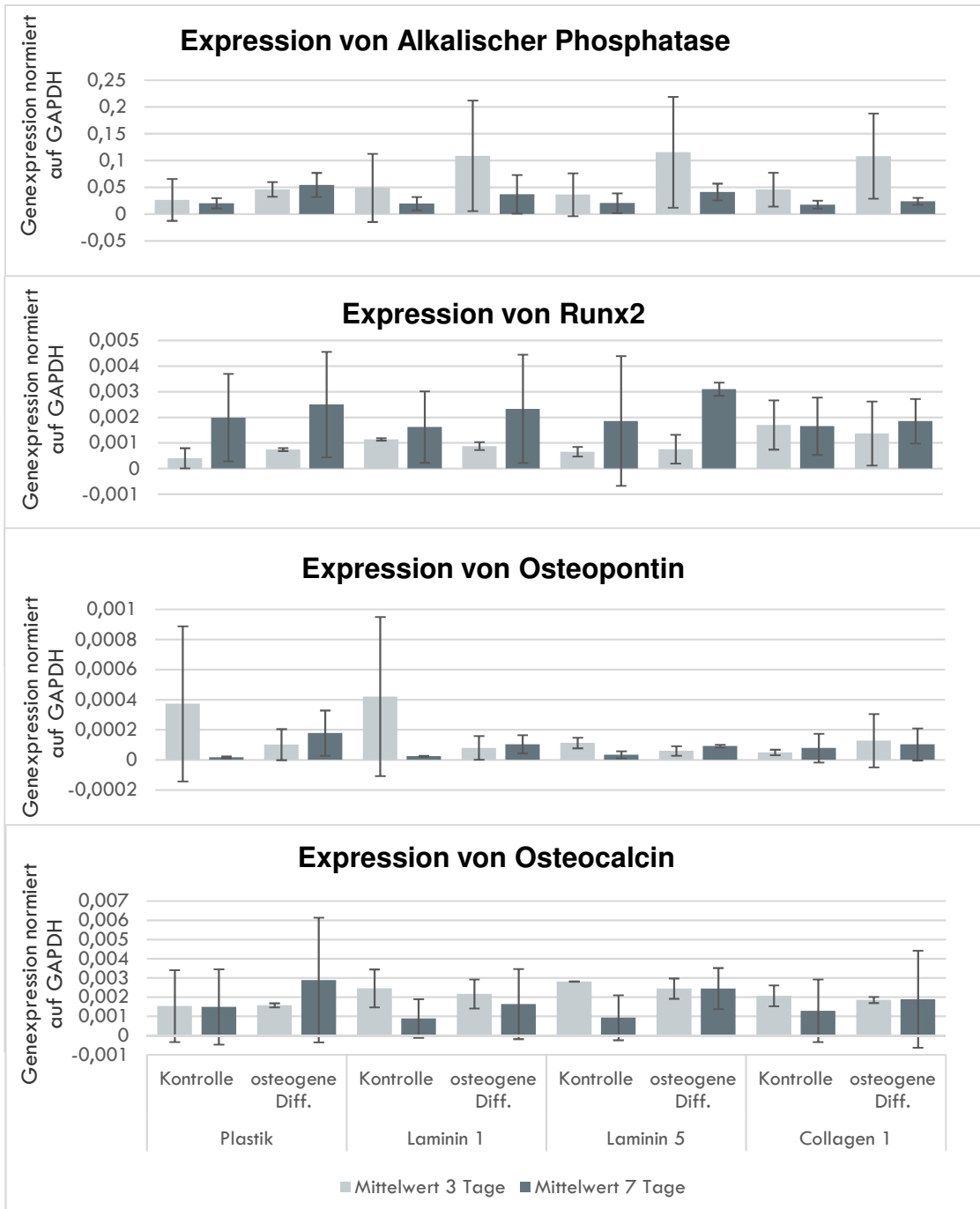


Abbildung 20: Die Genexpression von Alkalischer Phosphatase, Runx-2, Osteopontin und Osteocalcin normiert auf GAP-DH. Die MSC wurden davor 3 und 7 Tage lang mit osteogenem Induktionsmedium auf mit Laminin 1, Laminin 5 und Collagen I beschichteten Kunststoffoberflächen gezüchtet.

## 5 Diskussion

Die Prothesenlockerung ist ein Faktor mit hoher volkswirtschaftlicher und gesundheitlicher Relevanz. Es gibt verschiedene Ansätze, sie zu reduzieren oder zumindest zu verzögern. Sie betreffen sowohl die Operationstechniken als auch die Materialbeschaffenheit der Prothesen. Ein weiterer Ansatz ist die Beschichtung der Prothesen mit Proteinen der EZM, um eine besseres initiales Einwachsen in den Knochen zu gewährleisten. Dies soll zum einen über eine erhöhte Initialhaftung der BMSC geschehen, zum anderen wurde die Hypothese erarbeitet, dass insbesondere Laminin 5 die osteogene Differenzierung der im Knochenmark ansässigen MSC induziert. (96)

Seit ihrer Entdeckung sind hMSC ein beliebtes Forschungsobjekt. Die Isolation und Kultivierung von hMSC ist mit weniger technischen Schwierigkeiten und ethischen Bedenken verbunden als die Verwendung embryonaler Stammzellen. Aufgrund ihrer Plastizität und ihres schnellen Wachstums gibt es Ansätze in vielen klinischen Gebieten, hMSC therapeutisch einzusetzen. Um hMSC der klinischen Verwendung zuführen zu können, ist die Kultivierung unter GMP-konformen Bedingungen notwendig. Hierbei wird auf den Zusatz tierischer Produkte zu den Nährmedien verzichtet. (120)

In dieser Versuchsreihe sollte insbesondere die Dynamik der osteogenen Differenzierung von MSC unter dem Einfluss von Laminin 5 im Vergleich mit Laminin 1 und Collagen 1 untersucht werden.

### 5.1 Gewinnung und Kultivierung der MSC

Im Rahmen vom Hüftprothesenimplantationen wurden aus dem Knochenmark der Femurköpfe von 14 freiwilligen Spendern hMSC gewonnen. Die Isolation erfolgte mittels Reinigungsvorgängen und Dichtezentrifugation nach einem etablierten Verfahren. (121) Durch einen ersten Mediumwechsel nach 24 Stunden wurde sichergestellt, dass nur Plastik-adhärenzte Zellen kultiviert wurden. Die MSC wurden erfolgreich von den ebenfalls im Knochenmark ansässigen hämatopoetischen Zellen getrennt. Dies wurde mit Hilfe der FACS-Analyse bewiesen. Die Zellen aller kultivierten MSC-Populationen wiesen keine für hämatopoetische Zellen typischen Oberflächenmarker CD14, CD34 und

CD45 auf. Sie exprimierten die für MSC typischen Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD 105. Lichtmikroskopisch zeigte sich eine homogene Zellpopulation, die in weiteren Versuchen unter entsprechenden Bedingungen zur adipogenen und osteogenen Differenzierung fähig war. Somit wurden die Bedingungen für Einordnung als mesenchymale Stammzellen (ISCT) erfüllt. (51, 52)

Die Isolation der MSC aus dem Knochenmark zu Forschungszwecken ist sinnvoll. Erstens ist dieses Verfahren etabliert und technisch einfach umzusetzen. Die Zellen sind in diesem Gewebe zahlreicher vorhanden als z.B. in peripherem Blut.

Zweitens haben BMSC im Gegensatz zu MSC, die aus anderen Geweben isoliert wurden, tatsächlich das größte Potential zur Bildung von funktionsfähigem Knochen in Kooperation mit Osteoblasten und Osteozyten. Andere MSC, die z.B. aus Zähnen isoliert wurden, können zwar eine mineralisierte Matrix herstellen, deren Qualität reicht jedoch nicht an die von BMSC produzierten Knochen heran. (122)

Bis auf wenige Ausnahmen proliferierten die MSC erfolgreich und rasch. Sie wurden mit GMP-Medium kultiviert, das humanes Plasma und Thrombozytenlysat enthielt. Es zeigten sich Unterschiede im Proliferationsverhalten der MSC, sowohl in der Geschwindigkeit als auch in der zahlenmäßigen Entwicklung der Zellzahlen. Dies wurde auch bei anderen Studien mit MSC beobachtet. Verschiedene Faktoren können für das unterschiedliche Expansionsverhalten von MSC verantwortlich sein:

1. Alter der Spender: Einige Studien wiesen eine niedrigere Proliferationsrate von MSC nach, die von älteren Spendern stammten. (123, 124, 125) Jedoch gibt es auch Studien, die keine Auswirkung des Spenderalters auf die Proliferationsrate von MSC nachwiesen. (126, 127) Auch in dieser Studie gab es keine starken Hinweise darauf, dass die MSC von jüngeren Spendern deutlich schneller proliferierten. Beispielhaft ist zu nennen, dass die MSC der mit 26 Jahren mit Abstand jüngsten Spenderin JPK langsamer und schwächer proliferierten, als die MSC der mit 82 bzw. 85 Jahren ältesten Spender CRA und IRR.

2. Geschlecht des Spenders: Auch in dieser Studie das Geschlecht des Spenders der MSC keinen Einfluss auf die zahlenmäßige Entwicklung der MSC zu haben. Diese Ergebnisse decken sich mit vorhergehenden Studien, dass das Geschlecht des Spenders keine Auswirkung auf die Proliferationsraten von MSC hat. (126, 128, 129)

3. Medikamentöse Behandlung der Spender vor der Operation: In verschiedenen Studien wurde der Erweis erbracht, dass eine Steroidtherapie zu einer erhöhten Zellteilungsrate einzelner MSC-Kulturen führen kann. (130, 131, 132) Nähere Informationen zu Vorerkrankungen und Medikamenteneinnahme der Spender der MSC in dieser Versuchsreihe lagen nicht vor.

4. Alter der Spender des Thrombozytenlysats: Zur Kultivierung der MSC unter GMP-Bedingungen wurden Thrombozytenlysate und humanes Plasma verwendet. Lohmann et. al fanden 2012 heraus, dass ein erhöhtes Alter der Spender des Thrombozytenlysats sowohl die Proliferation der MSC als auch ihr Potential zur osteogenen Differenzierung negativ beeinflusst. (133)

5. Umweltbedingungen der Zellkultur: Die Zahl der Zellteilungen ist durch das als Hayflick-Phänomen bekannte Abnehmen der Telomeraseaktivität begrenzt. (134) Die Bedingungen der Kultivierung beeinflussen die Replikationsrate über die Aktivität der Telomerase. Dazu zählen die Dichte der Zellaussaat (129-135) sowie die Sauerstoffkonzentration. (136, 137)

6. Unterschiedliche relative Reduktion der Zellzahl im Rahmen der Versuche: Zu bedenken ist auch, dass es bei einer kleinen Startmenge an hMSC in der Primärkultur zu einem größeren relativen Verlust durch die Entnahme festgelegter Zellmengen zu Versuchszwecken kommt.

## 5.2 Überschneidung der Kriterien von MSC und Fibroblasten

MSC stellen eine heterogene Gruppe dar. Ihre Einordnung als MSC erfolgt durch Minimalkriterien: Plastik-Adhärenz, die Abwesenheit bzw. das Vorhandensein bestimmter Oberflächenmarker, ihre Fibroblasten-ähnliche Morphologie und ihr Potential zur adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierung. (siehe Kapitel 2.5.1)



Obwohl MSC seit ca. 40 Jahren der Gegenstand vieler Studien sind, existieren kaum Möglichkeiten, um sie eindeutig von Fibroblasten abzugrenzen. (138, 139) Fibroblasten adhären an Plastik und exprimieren die gleichen Oberflächenmarker wie MSC. Sie haben ebenfalls das Potential zur Differenzierung zu anderen Zelltypen. (140) Besonders in den ersten Passagen enthalten MSC-Kulturen auch Fibroblasten (ca. 5% der Zellen), die erst nach längerer Kultivierung verdrängt werden. Es wurde jedoch auch nachgewiesen, dass dies die Plastizität der MSC nicht beeinträchtigt. (141) Haniffa et al. postulierten 2007, dass Fibroblasten MSC funktionell ebenbürtig sein können. (142)

In den letzten Jahren haben sich mehrere Studien mit dem Thema beschäftigt, zuverlässige Merkmale zur Unterscheidung von MSC und Fibroblasten zu finden. Die Ergebnisse sind bis nicht einheitlich. „Aktuell scheint es in der Praxis am sinnvollsten, eine Zelllinie als MSC zu bezeichnen, die formal die Minimalkriterien des ISCT erfüllt (siehe Kapitel 3.4.1) und auch nach mehreren Zellteilungen in vitro Plastizität besitzt.“ (143)

### 5.3 Einfluss von humanem Thrombozytenlysat auf die Kultivierung von MSC

Fetales Kälberserum und andere tierische Produkte sollen bei der Kultivierung von MSC mit dem Ziel der Nutzung zu klinischen Zwecken nicht verwendet werden, um das Risiko von Infektionen und immunologischen Reaktionen zu verringern. Stattdessen wird humanes Thrombozytenlysat verwendet, da es ebenfalls verschiedene Wachstumsfaktoren enthält. (59)

Experimentell wurde gezeigt, dass unter dem Einfluss von Humanem Thrombozytenlysat die schnelle und effektive Kultivierung von hMSC möglich ist. (144) Humanes Thrombozytenlysat enthält unter anderem die Wachstumsfaktoren PDGF und TGF- $\beta$ 1 in größeren Mengen, wobei die Konzentrationen stark variieren können. (145, 146) Zusammen mit bFGF stellen sie essentielle Bedingungen für die Proliferation von MSC dar. Diese Substanzen allein können jedoch nicht den gleichen Effekt wie Produkte auf der Basis von Blutserum erzielen. (147)

Ein Nachteil der Verwendung von humanem Thrombozytenlysat besteht in der Variabilität der Chargen (52) und demzufolge der unterschiedlichen Konzentration an Wachstumsfaktoren. (147) Stammt das Thrombozytenlysat von älteren Spendern, kann dies zu einer verlangsamten Proliferation der MSC führen.(133) Studien zeigten, dass unter dem Einfluss von humanem Thrombozytenlysat das Potential der adipogenen und osteogenen Differenzierung von MSC eingeschränkt ist.(148, 149) Ein weiterer Nachteil besteht in der geringen Möglichkeit der Übertragung von humanpathogenen nicht detektierten Infektionen.(150)

#### 5.4 Pluripotentes Differenzierungspotential der MSC

Die Gewebematrix, die sich nach 28-tägiger Induktion am Boden der Platten bildete, wurde mit der Oil-Red-Färbung zum Nachweis von Fettvakuolen bei der Adipogenese und mit der von-Kossa-Färbung zum Nachweis von Calciumkristallen bei der Osteogenese angefärbt. Alle MSC-Kulturen zeigten positive Färbeergebnisse nach der Kultivierung mit AD-Medium und OD-Medium. Dies dient als Beweis für das pluripotente Potential der isolierten MSC. Vorhergegangene Studien zeigten, dass bei gleicher Isolation und Kultivierung der MSC auch von einem chondrogenen Potential der MSC auszugehen ist. (151, 152) Die Differenzierungsmöglichkeiten von MSC nehmen hierarchisch in der Reihenfolge Adipogenese – Chondrogenese und zuletzt Osteogenese ab. (152) Nicht alle Zellen einer Linie von MSC sind pluripotent. Dies konnte auch in dieser Versuchsreihe beobachtet werden. Bei der Oil-Red-Färbung von MSC nach der adipogenen Induktion zeigte sich, dass nur ein Teil von ihnen Fettvakuolen ausbildete, die sich rot anfärbten. Auch mit der von-Kossa-Färbung wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Die Pluripotenz von MSC wird von intrazellulären Vorgängen wie Genexpressionsmustern, und extrazellulären Bedingungen wie epigenetischen Faktoren und Proteinkonzentrationen beeinflusst.(153) Zusätzlich nehmen Umweltfaktoren der Zellkultur Einfluss auf die Differenzierung, z.B. scheint ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck die Zeitspanne zu verkürzen, in der MSC sich differenzieren.(154) In vorhergehenden Studien wurde die Abnahme des Potentials zur adipogenen Differenzierung mit zunehmender Zellkulturdauer

beschrieben, bedingt durch eine reduzierte Telomeraseexpression. (155) Dieses Phänomen wurde in dieser Studie nicht beobachtet, da der Nachweis der adipogenen Differenzierung bereits in der 3. Passage erbracht wurde.

## 5.5 Haftung der MSC auf Proteinen der EZM

In Vorversuchen wurde mittels Attachment Assays demonstriert, dass zur Erzeugung einer starken initialen Haftung von MSC eine Stoffmenge von 5 fmol Laminin 5 sowie 1 fmol Collagen I ausreichend zu sein scheint. (52, 112) In dieser Arbeit sollte die untere Haftungsgrenze der MSC auf Laminin 1, Laminin 5 und Collagen 1 ermittelt werden. Alle Attachment Assays wurden nach einem standardisierten Protokoll mit einem festen Schema zur Spülung der Objektplatten durchgeführt. Bei diesen Versuchen konnte jedoch keine ausreichende initiale Haftung von MSC auf Proteinen der EZM auf Stoffmengen von 1, 2 und 3 fmol erzeugt werden. (52)

Teilweise ließ sich auch auf Fibronectin keine ausreichende Initialhaftung erzeugen. Integrine stellen Verbindungen zwischen Zellen und Proteinen der EZM her. (156, 157) Es bestehen große interindividuelle Unterschiede im Expressionsmuster der Integrine zwischen den Spendern der MSC. (158) Die Integrinexpression verändert sich im Verlauf der Differenzierung der MSC. (156) Auch Hashimoto et al. konnten 2006 keine zufriedenstellende Anhaftung von MSC an 96-Well nachweisen, die mit Laminin 1, sowie Laminin 2/4 mit einer Konzentration von 2µg/ml beschichtet worden waren. Jedoch konnte auf einer Beschichtung mit 1µg/ml Laminin 5 eine starke initiale Anhaftung nach 5 und 10 Minuten erreicht werden. (91) Aufgrund des unterschiedlichen Versuchsaufbaus gestaltet sich der Vergleich schwierig, gibt aber Hinweise darauf, dass zumindest Laminin 1 auch in höherer Konzentration als 5fmol nicht geeignet zur Erzeugung einer starken initialen Haftung ist.

Schlussfolgernd lässt sich nach diesen Attachment Assays die Aussage treffen, dass die minimale Stoffmenge von Laminin 1, Laminin 5 und Collagen I zur Erzeugung einer ausreichenden Initialhaftung der MSC bei mindestens 5 fmol liegt. Für die klinische Anwendung von Laminin 5 und Collagen I zur Beschichtung von Implantaten ist zu bedenken, dass neben dem verwendeten

Material zur Beschichtung auch die Oberflächenstruktur entscheidend für die Anhaftung ist. (159, 160)

## 5.6 Osteogene Differenzierung der MSC auf Proteinen der extrazellulären Matrix

MSC wurden auf Gewebepplatten kultiviert, die mit Laminin 1, Laminin 5 und Collagen 1 beschichtet wurden. Nach 3-, 7- und 28-tägiger osteogener Induktion wurde die von-Kossa-Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung durchgeführt.

Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch zeigten sich deutliche Unterschiede der Intensität der Anfärbung. Besonders auf Laminin 1 und Laminin 5 bildeten sich nach 28-tägiger osteogener Induktion deutlich mehr Calciumverbindungen, was sich in der verstärkten Aufnahme von Silberionen niederschlug. Die Anfärbung von Calciumapatit der extrazellulären Matrix wird als Beweis für die osteogene Differenzierung von MSC angesehen werden. (161) Die verstärkte osteogene Differenzierung von MSC auf Laminin 5 im Gegensatz zu Collagen I und unbeschichteten Oberflächen überlappen sich mit Ergebnissen der Forschergruppe um Klees et. al. (52, 162)

Auch Laminin 1 scheint sich vorteilhaft auf die osteogene Differenzierung von MSC auszuwirken, allerdings bestand hier keine statistische Signifikanz ( $p < 0,09$ ). (52) 2012 wies eine Forschergruppe unter Becerra-Bayona et. al nach, dass Laminin 1 nach 7-tägiger osteogener Induktion eine erhöhte Expression des osteogenen Markers Osterix und eine vermehrte Einlagerung des Proteins Osteocalcin in die extrazelluläre Matrix induzierte. (163) In Tierversuchen zeigte sich, dass mit Laminin-1 beschichtete Implantate nach 2 Wochen ein vermehrtes Knochenwachstum in dem umgebenden Gewebe nach sich zogen als unbeschichtete. (109)

Die Beschichtung mit Collagen I hatte einen schwächeren Effekt auf die Anfärbbarkeit mit der von-Kossa-Färbung. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe decken sich mit vorangegangenen Ergebnissen anderer Forschergruppen. Collagen I ist nicht allein in der Lage, die geordnete Einlagerung von Calciumphosphaten auszulösen. (164, 165) Die Anlagerung

von Mineralen an Collagen-I erfordert den Einfluss von nicht-kollagenen, sauren Proteinen. (166, 167)

Die MSC-Kulturen aus der gleichen Zelllinie, deren Färbeergebnisse nach einer Induktion der Osteogenese für 3 bzw. 7 Tage paarweise verglichen wurden, zeigten teilweise unterschiedliche Intensitäten der Anfärbung. Schon vorher wurde bewiesen, dass MSC, die aus demselben Isolat stammen, unterschiedliches Potential zur Differenzierung aufweisen und dass nur ein Teil der Zellen einer Kolonie pluripotent ist. (168, 169) Verschiedene Faktoren können Einfluss auf die Unterschiede im Differenzierungspotential von MSC derselben Kultur nehmen: In einer Studie wurde gezeigt, dass bereits die Lage der betreffenden Zellen im Inneren oder den Randbezirken der Zellkolonie dazu zählt. (170, 171) Die Kultivierung in vitro bietet keinen vollständigen Schutz vor äußeren Einflüssen wie Stress in Form von erhöhter Sauerstoffkonzentration, die zur Heterogenität von Zellpopulationen führen kann. (172) Die Dichte der Zellaussaat beeinflusst ebenfalls die Calciumeinlagerung. Eine optimale Ausgangsposition für die nachfolgende osteogene Differenzierung ist eine Zelldichte von 80%. (173) Auch in dieser Studie wurde die osteogene Differenzierung bei einer Zellkonfluenz von 80% induziert. Eine höhere Zelldichte führt zur Apoptose und verhindert die Differenzierung. (174)

Das Alter der Spender der MSC wurde in verschiedenen Studien als negativer Faktor auf die osteogene Differenzierung von MSC diskutiert. Manche Autoren berichten von einer Reduktion des Potentials zur osteogenen Differenzierung, (125, 175) während in anderen Studien keine Korrelation zu einem erhöhten Alter der Spender der MSC nachgewiesen wurde. (176,177, 178) Eine neuere Studie zeigte, dass die Dynamik der Mineralisierung der Matrix unabhängig vom Alter der Spender der MSC ist. (173)

Verschiedene andere Faktoren können die osteogene Differenzierung von BMSC hemmen. Dazu gehört beispielsweise der Einfluss von TNF bei chronischen Entzündungszuständen. (179)

Neben der Silbernitrat-Färbung nach von Kossa existieren noch andere Methoden zur Beurteilung der Mineralisierung von Geweben: Röntgen, Elektronenmikroskopie und Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). In

der Versuchsreihe von Klees et al. wurde alternativ die Calcium-Menge quantifiziert (111), sodass ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

## 5.7 Analyse der Expression osteogener Markergene

In dieser Studie sollte untersucht werden, wie die Beschichtung mit Laminin 1, Laminin 5 und Collagen I sich auf die Expression osteogener Marker auswirkt. In vorherigen Studien wurde vor allem die Genexpression nach einem längeren Zeitraum von 14 Tagen untersucht wurde. (112) In dieser Versuchsreihe wurde ein kürzerer Zeitraum untersucht, um mehr Einblick in die Dynamik der osteogenen Differenzierung zu gewinnen, nämlich die Genexpression nach 3 und 7 Tagen osteogener Differenzierung.

Mittels real time-PCR wurde die Expression der osteogenen Markergene Osteopontin, Osteocalcin, Runx2 und AP untersucht. Nach einigen Tagen der osteogenen Induktion zeigten sich nur kleine Unterschiede im Genexpressionsmuster. Dies deckt sich mit einer vorhergehenden Studie. (110) Ein Erklärungsansatz hierfür ist die kleine untersuchte Anzahl der Proben. Größtenteils waren die Ergebnisse durch zu hohe Standardabweichungen nicht verwertbar. Ein weiterer Erklärungsansatz ist die Beschädigung von Zellen im Rahmen der Versuche, sodass nicht ausreichend DNA extrahiert werden konnte. Teilweise hafteten die Zellen so stark am Flaschenboden an, dass sie mit einem Spatel abgelöst werden mussten. Dies könnte zur Beschädigung der Zellen geführt haben, sodass die PCR bei 2 Zellkulturen keine vollständigen Ergebnisse brachte.

Auch in vorhergehenden Untersuchungen mit ähnlichem Versuchsaufbau, in denen die Expression von AP, Runx2, Osteopontin und Osteocalcin unter dem Einfluss von Laminin 1, Laminin 5 und Collagen 1 nach einer osteogenen Differenzierung für 14 Tage untersucht wurde, zeigten sich keine großen Unterschiede im Genexpressionsmuster. Auch E. Falkenberg beschreibt in ihrer Dissertation, dass nur bei einem Teil der Reihen, bei denen die rt-PCR durchgeführt wurde, die Ergebnisse verwertbar waren. Sie diskutierte neben der mechanischen Beschädigung der Zellen die mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch die Verwendung von humanem Plasma zur Expansion der

hMSC und die anschließende osteogene Differenzierung, die unter dem Einfluss von fetalem Kälberserum stattfand. (112)

Teils zeigten auch Untersuchungen mit größeren Fallzahlen ebenfalls keine Unterschiede im Genexpressionsmuster. Beispielsweise zeigten die Untersuchungen von Hashimoto et. al keine Unterschiede bei der Kultivierung von MSC auf Laminin 5 in Bezug auf die Expression von Osteopontin und Osteocalcin. (91)

Osteocalcin ist als später Marker der Osteogenese beschrieben worden, der erst mit der Mineralisierung in Erscheinung tritt und erst nach 10-20 Tagen einen Anstieg verzeichnet. (180, 181) Es ist nicht überraschend, dass sich keine deutliche Dynamik im Verlauf der Genexpression in den ersten 7 Tagen beobachten ließ.

Klees et. al wiesen 2005 eine Beschleunigung der osteogenen Differenzierung durch Laminin-5 über eine erhöhte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors RUNX2 nach. (96) In dieser Versuchsreihe zeigte sich eine Erhöhung des Mittelwerts für die Expression von Runx2 auf Laminin 5 nach 7-tägiger osteogener Induktion. Aufgrund der hohen Standardabweichung ist dieser Wert jedoch nicht signifikant. Grundsätzlich ist bei der Betrachtung dieser Ergebnisse auch zu bedenken, dass die Genexpressionsmuster von osteogenen Zellen durch eine starke Heterogenität gekennzeichnet sind. (182)

## 5.8 Unterschiede des Verhaltens von MSC in vitro und in vivo

Nur geringe Mengen an MSC können aus dem Knochenmark und anderen Geweben isoliert werden. (183) Deshalb setzt die klinische Verwendung von MSC ihre Kultivierung in vitro voraus, um die hohen geforderten Zellzahlen zu erreichen. Die Kultivierung von MSC in vitro geht jedoch mit negativen Auswirkungen auf die therapeutische Verwendbarkeit einher. Es kommt zu einer Verminderung der Teilungsrate sowie Veränderungen der Zellmorphologie und -funktion. (184, 185) Die Fähigkeit zur heterotopen Knochenbildung in-vivo wiederum scheint mit der Teilungsrate von BMSC zu korrelieren. (186)

Die osteogene Differenzierung der MSC wird in vivo von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Dazu zählen auch mechanische Reize wie Zug oder Druck. Im Knochenmark kooperieren MSC mit anderen Zelltypen, wie

hämatopoetischen Stammzellen, Chondrozyten und Osteoblasten. Hormone wie Vitamin D und Parathormon steuern den Knochenstoffwechsel und nehmen Einfluss auf die Differenzierung von MSC.

Viele Einflüsse auf die Funktionen der MSC wurden noch nicht vollständig erfasst. Die Ergebnisse von Versuchen in vitro können darum nicht direkt auf die Vorgänge im lebendigen Organismus übertragen werden.

## 5.9 Ausblick

In dieser Versuchsreihe wurde nachgewiesen, dass Laminin 5 die Bildung von Calciumphosphatverbindungen durch MSC nach 7 und 28 Tagen der osteogenen Induktion fördert. In geringerem Ausmaß gilt dies auch für Laminin 1. Zudem wiesen wir nach, dass eine Stoffmenge von mehr als 3fmol dieser Proteine für eine ausreichende initiale Adhäsion der Zellen vorhanden sein muss.

Wir verwendeten flache Plastikoberflächen zur Testung in vitro, sodass die Ergebnisse aktuell nicht auf die Endoprothetik übertragen werden können. Um die klinische Anwendbarkeit zu erproben, müssen noch mehrere Schritte erfolgen. Zunächst sollten Prüfkörper mit den o.g. Proteinen beschichtet werden und die Initialhaftung und die osteogene Differenzierung von MSC hierauf in vitro untersucht werden. Im nächsten Schritt werden beschichtete Prüfkörper am Tiermodell getestet. Durch Ausreißversuche kann die erzielte Osseointegration quantifiziert und verglichen werden. Schließlich würde die Implantation beschichteter Prothesen beim Menschen erfolgen, wobei hier gesetzliche Reglementierungen (Gewebe-gesetz, Arzneimittel- und Medizinprodukte-gesetz) Beachtung finden müssen.



## 6 Zusammenfassung

Die aseptische Lockerung von Prothesen ist ein entscheidender Grund für die verkürzte Standzeit und Revisionsoperationen bei orthopädischen Implantaten. Durch die Optimierung der Integration des Implantats in den Knochen sollen diese Komplikationen verringert werden. Ein Ansatz hierzu ist die Beschichtung der Implantate mit Proteinen, die in der extrazellulären Matrix von Knochengewebe vorkommen und die ossäre Integration fördern. In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss von den Proteinen Laminin 5 und Laminin 1 im Vergleich zu Collagen I auf die osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSC) nach osteogener Induktion für 3, 7 und 28 Tage untersucht. Zudem sollte in dieser Versuchsreihe die erforderliche Stoffmenge dieser Proteine als untere Haftungsgrenze im Rahmen von Adhäsionsversuchen bestimmt werden.

Humane mesenchymale Stromazellen wurden aus Knochenmark isoliert und unter GMP-konformen Bedingungen kultiviert. In der FACS-Analyse wurde das für hMSC typische Muster der Oberflächenantigene nachgewiesen. Der Nachweis ihres pluripotenten Potentials erfolgte mit Hilfe der von-Kossa-Färbung und Oil-Red-Färbung.

Die hMSC wurden auf 6-Well-Platten gezüchtet, die mit Laminin 1, Laminin 5 und Collagen I beschichtet wurden oder keine Beschichtung hatten. Sie wurden 3, 7 und 28 Tage lang mit osteogenem Differenzierungsmedium im Vergleich zu Kontrollmedium kultiviert. Anschließend wurden die Platten mittels der von-Kossa-Technik gefärbt und die Platten eingescannt. Hier zeigte sich, dass Laminin 5 zu einer dunkleren Färbung durch die verstärkte Einlagerung von Calciumphosphat in die extrazelluläre Matrix nach 7- und 28-tägiger osteogener Induktion führte. Laminin 1 hatte ebenfalls einen nachweisbaren, aber schwächeren positiven Effekt auf die Bildung einer osteogenen Matrix.

Die hMSC wurden 3 und 7 Tage lang mit osteogenem Differenzierungs- und Kontrollmedium in Kulturflaschen gezüchtet, die mit Laminin 1, Laminin 5 und Collagen I beschichtet wurden oder keine Beschichtung hatten. Ihre DNA wurde isoliert und mittels RT-PCR wurde die Expression von 4 Markergenen der osteogenen Differenzierung (Osteopontin, Osteocalcin, Alkalische

Phosphatase und Runx-2) gemessen. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen von jeweils 2-4 MSC-Kulturen wurden keine Ergebnisse mit statistischer Signifikanz erbracht.

Die initiale Haftung der MSC auf Laminin 1, Laminin 5 und Collagen I im niedrigen Stoffmengenbereich wurde mit Attachment Assays untersucht. MSC-Proben wurden 15 und 30 Minuten lang auf Stoffmengen von 1, 2 und 3 fmol der Proteine inkubiert und die initiale Haftung photographisch festgehalten. Es zeigte sich, dass Stoffmengen bis 3fmol nicht zur initialen Haftung der MSC ausreichen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Laminin 5 und in geringerem Ausmaß auch Laminin 1 einen positiven Einfluss auf die Bildung von Calciumphosphatverbindungen durch hMSC bzw. Osteoblasten nach 7 und 28 Tagen der osteogenen Induktion haben. Zur Erreichen einer ausreichenden initialen Adhäsion der Zellen an beschichteten Materialien ist eine Stoffmenge von mehr als 3 fmol nötig.

Als nächster experimenteller Schritt würde die Beschichtung von originalen Implantatoberflächen mit Laminin 5 erfolgen. Sollten sich bei diesen Experimenten in vitro ein positiver Effekt auf die Osteogenese wie in dieser Arbeit zeigen, würde ein Tierversuch folgen, bei dem Ausreißversuche mit Laminin 5 beschichteten Implantaten durchgeführt werden. Der letzte Schritt wäre die Implantation von entsprechend beschichteten Prothesen beim Menschen.

## 7 Abbildungen und Tabellen

- Abbildung 1: Hüftprothesen sind modular aufgebaut. Der Prothesenschaft wird im Knochenmark des Femurs befestigt die Metallpfanne im Acetabulum. Der Prothesenkopf mit dem Inlay artikuliert mit dem Inlay, dass in der Metallpfanne verankert ist. Übernommen aus (6) ..... 7
- Abbildung 2: MSC sind unter anderem im Periost von Knochen ansässig. Unter dem Einfluss bestimmter Faktoren differenzieren sie sich zu anderen Zelltypen. Übernommen aus (45)..... 10
- Abbildung 3: Schemazeichnung, die die Übergangsstadien vom Osteoblasten zum reifen Osteozyten darstellt. Während diesem Prozess schrumpfen das Zellvolumen und die Organellen. 1= Proliferierender Präosteoblast, 2= Präosteoblastischer Osteoblast, 3= Osteoblast, 4=Osteoblastischer Osteozyt (Typ I Präosteozyt), 5= Osteoider Osteozyt (Typ II Präosteozyt), 6=Typ III Präosteozyt, 7= Junger Osteozyt, 8= Alter Osteozyt (Übernommen aus() (Modifiziert von Franz-Odendaal et. al))..... 13
- Abbildung 4: Die Struktur von Laminin 1/111 und Laminin 5/332 im Vergleich. Laminine bestehen aus 3 Einheiten und sind unter dem Elektronenmikroskop als kreuzförmige Makromoleküle sichtbar. Die große G-Domäne am unteren Ende des langen Arms enthält 5 repetitive Sequenzen mit epidermal growth factor (EGF)-ähnlichen Sequenzen. Die ersten 3 dieser Sequenzen, die Domänen G1-3 enthalten Bindungsstellen für Integrine. G4 und G5 sind Bindungsstellen für Proteoglykane. Im Gegensatz zu Laminin 1 hat Laminin 5 gekürzte globuläre Domänen an den kurzen Enden der  $\alpha$ 3,  $\beta$ 3 und  $\gamma$ 2-Kette und verändert so dessen biologischen Eigenschaften. Übernommen aus (97)..... 17
- Abbildung 5: Skizze zur Darstellung der Isolation der hMSC aus dem Knochenmark durch Dichtezentrifugation..... 22
- Abbildung 6: Ausschnitt aus einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Jede Neubauer-Zählkammer enthält 4 dieser Felder. Hell erscheinende Zellen sind vital, ihre Membran lässt kein Durchdringen des Farbstoffs Trypanblau zu. (113) In 4 dieser Quadrate werden die vitalen, nicht

angefärbten Zellen gezählt, um die Anzahl an Zellen pro Milliliter zu ermitteln. ....	24
Abbildung 7: 6-Well-Platte, die nach Kultivierung der MSC mit AD-Medium mit Oil-Red angefärbt wurde .....	26
Abbildung 8: Zellen der MSC-Kultur ABC am 4. Tag der 2. Passage. Die Zellen hatten stellenweise eine Konfluenz von 80% erreicht, sodass sie zu diesem Zeitpunkt in die nächste Passage umgesetzt wurden. ....	34
Abbildung 9: Entwicklung der Zellzahlen der MSC von der Primärkultur bis zur 2. Passage. Die Zellzahlen wurden mithilfe der Neubauer-Zählkammer beim Umsetzen der Zellen ermittelt. In diesem Diagramm sind die Mittelwerte sowie die Spannbreiten der Zellzahlen angegeben. ....	35
Abbildung 10: Histogramme der FACS-Analyse für die MSC-Kultur BSR. Die Zellen wiesen nicht die Oberflächenmarker CD 14, CD 34 und CD 45 auf. Sie besaßen die Oberflächenmarker CD 73, CD 90 oder CD 105. (schwarze Linie = Antikörperfluoreszenz, graue Linie = Eigenfluoreszenz) .....	37
Abbildung 11: 6-Wellplatte, auf der MSC der Kultur WSL zum Nachweis ihres pluripotenten Potentials 28 Tage lang mit Differenzierungsmedien angezüchtet und anschließend mit Oil-Red- und der von-Kossa-Färbung angefärbt werden. Die Platte wurde anschließend eingescannt. Die MSC, die mit AD-Medium kultiviert wurden, ließen sich durch die Oil Red-Färbung rot anfärben. Die MSC, die mit OD-Medium kultiviert wurden, produzierten eine Matrix, die mit der von-Kossa-Färbung dunkel angefärbt wurde. Unter dem Einfluss von Kontrollmedium kam es zu keiner adipogenen und osteogenen Differenzierung. ....	38
Abbildung 12: Zellen der MSC-Kultur WSL, die 28 Tage lang mit adipogenem Induktionsmedium kultiviert wurden. Mit Hilfe der Oil-Red-Färbung wurden die Fettvakuolen der Zellen leuchtend rot angefärbt. ....	39
Abbildung 13: Zellen der MSC-Kultur GIR, die 28 Tage lang mit osteogenem Induktionsmedium kultiviert wurden. Mit Hilfe der von-Kossa-Färbung wurden Calciumphosphateinlagerungen dunkel angefärbt. ....	39

- Abbildung 14: Positivprobe der Attachment Assays: Fibronectin-Spot mit darauf haftenden MSC. Bei ausreichender Initialhaftung der MSC auf Laminin 1, Laminin 5 oder Collagen I wird ein ähnliches Ergebnis erwartet..... 41
- Abbildung 15: Negativ-Probe der Attachment Assays. BSA-Spot ohne erkennbare Grenzen, die Zellen sind gleichmäßig und ungeordnet verteilt. Der helle Lichtkreis ist als Artefakt bei der Photographie entstanden. .... 41
- Abbildung 16: Eingescannte 6-Well-Platte der MSC-Kultur ATS. Nach Erreichen einer 80%-igen Konfluenz der MSC wurden die Zellen nun mit GMP+-Medium zur Kontrolle (Ko) und OD-Medium kultiviert (OD). Nach 7 Tagen wurde die von-Kossa-Färbung durchgeführt. .... 43
- Abbildung 17: Vergleich der Färbeintensität bei der Von-Kossa-Färbung von 6-Well-Platten, die vorher mit Laminin 1, Laminin 5, Collagen 1 beschichtet wurden, nach 3-tägiger, 7-tägiger und 28-tägiger Induktion, normiert auf die Kultivierung mit Kontrollmedium. Diese Abbildung wurde auch im Artikel „Laminin-5 and type I collagen promote adhesion and osteogenic differentiation of animal serum-free expanded human mesenchymal stromal cells.“ veröffentlicht. (52) ..... 44
- Abbildung 18: Ausschnitte aus eingescannten 6-Well-Platten nach der Von-Kossa-Färbung. Beispielhaft sind hier die MSC der Kultur ATS nach 3-tägiger und 7-tägiger osteogener Induktion und MSC der Kultur GIR nach 28-tägiger osteogener Induktion auf beschichteten 6-Well-Platten dargestellt. Diese Abbildung wurde auch im Artikel „Laminin-5 and type I collagen promote adhesion and osteogenic differentiation of animal serum-free expanded human mesenchymal stromal cells.“ veröffentlicht. (52).. 45
- Abbildung 19: Dargestellt sind Detailaufnahmen der von-Kossa-Färbung von MSC auf unterschiedlichen Beschichtungen. MSC der Kulturen ATS und JPK wurden 3 und 7 Tage bzw. 28 Tage lang mit Osteogenem Induktionsmedium bzw. Kontrollmedium kultiviert. Bei der von-Kossa-Färbung sieht man teils bereits nach 7 Tagen eine stärkere Anfärbung bei den mit Laminin 1 und Laminin 5 beschichteten Platten. .... 48
- Abbildung 20: Die Genexpression von Alkalischer Phosphatase, Runx-2, Osteopontin und Osteocalcin normiert auf GAP-DH. Die MSC wurden

davor 3 und 7 Tage lang mit osteogenem Induktionsmedium auf mit Laminin 1, Laminin 5 und Collagen I beschichteten Kunststoffoberflächen gezüchtet.....	50
Tabelle 1: Schritte der Reifung von MSC zu Osteoblasten und Osteozyten und die wichtigsten Einflussfaktoren und osteogenen Marker. ....	12
Tabelle 2: MSC-Kultivierungsmedium .....	23
Tabelle 3: Kontrollmedium: Es enthält keine Stoffe, welche die Osteogenese oder Adipogenese der MSC induziert. (KO) Im Unterschied zu dem MSC-Kulturmedium enthält es nur wenig FFP und Thrombozytenlysat. ....	25
Tabelle 4: Medium, das die adipogene Differenzierung der MCS induziert (AD-Medium) .....	25
Tabelle 5: Inhaltsstoffe des osteogenen Induktionsmediums (OD) .....	27
Tabelle 6: Antikörperlösungen, die bei der FACS-Analyse verwendet wurden .....	28
Tabelle 7: Proteinlösungen zur Beschichtung der Kulturflaschen.....	32
Tabelle 8: Schema zur Beschichtung, der Kulturdauer und den verwendeten Differenzierungsmedien der vorbereiteten Kulturflaschen. OD = osteogenes Differenzierungsmedium, KO= Kontrollmedium.....	33
Tabelle 9: Färbelösungen für die Von-Kossa-Färbung.....	88
Tabelle 10: Inhaltsstoffe von PFEA (FACS-Analyse) .....	89
Tabelle 11: Primersequenzen für die Gene AP und Runx-2 der Firma LWG .	93

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 [http://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-2011\\_health\\_glance-2011-en](http://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-2011_health_glance-2011-en) (Zugriff am 11.11.2016 11:04)
- 2 Gorab RS, C.B., Borden LS, The Rational For Cementless Revision; Total Hip Replacement With Contemporary Technology. *Orthop. Clin. North. Am.*, 1993.24: p. 627- 633.
- 3 Jacobs JJ, S.D., Galante JO, Mechanisms Of Bone Loss Associated With Total Hip Replacement. *Orthop. Clin. North. Am.*, 1993. 24: p. 583 - 590.
- 4 Morscher EW: Die zementfreie Fixation der Hüftgelenkpfanne bei der primären Hüfttotalprothesenarthroplastik. Springer-Verlag, Berlin, 1995
- 5 Hozack WJ, R.R., Eng K, Mesa J, Primary cementless hip arthroplasty with a titanium plasma sprayed prosthesis. *Clin. Orthop*, 1996. 333(217-225).
- 6 [www.huftprothesenoperation.de/%2F%3Fid%3Dhuefte\\_4%26lan%3Dde&h=265&w=560&tbnid=tNBZhklirOMJ1M%3A&zoom=1&docid=DG2kkfK2sNvrkM&ei=rmLuU4WQCtKh7AbnYGgCg&tbm=isch&client=firefox-a&iact=rc&uact=3&dur=1300&page=2&start=21&ndsp=26&ved=0CH0QrQMwGg](http://www.huftprothesenoperation.de/%2F%3Fid%3Dhuefte_4%26lan%3Dde&h=265&w=560&tbnid=tNBZhklirOMJ1M%3A&zoom=1&docid=DG2kkfK2sNvrkM&ei=rmLuU4WQCtKh7AbnYGgCg&tbm=isch&client=firefox-a&iact=rc&uact=3&dur=1300&page=2&start=21&ndsp=26&ved=0CH0QrQMwGg) (Zugriff am 15.08.2014, 21:48)
- 7 Hüftendoprothesenversorgung, Vorbericht, AQUA — Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen GmbH, 7. September 2011, S. 29
- 8 Holt G, Murnaghan C, Reilly J, Meek RM. (2007) The biology of aseptic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res*: 460: 240–252.
- 9 Garcia-Cimbrelo E, Garcia-Rey E, Cruz-Pardos A. (2011) The extent of the bone defect affects the outcome of femoral reconstruction in revision surgery with impacted bone grafting: a five-to 17-year follow-up study. *J Bone Joint Surg Br.*: 93: 1457–1464.
- 10 Gallo J, Goodman SB, Konttinen YT, Raska M. (2013) Particle disease: biologic mechanisms of periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty. *Innate Immun*: 19, 213–224
- 11 Hailer NP, Garellick G, Karrholm J (2010) Uncemented and cemented primary total hip arthroplasty in the Swedish Hip Arthroplasty Register. *Acta Orthop*: 81(1): 34–41.
- 12 Bozic KJ, Kurtz SM, Lau E, Ong K, Vail TP, Berry DJ. (2009) The epidemiology of revision total hip arthroplasty in the United States. *J Bone Joint Surg Am.*; 91(1): 128–133.
- 13 Arthursson AJ, Furnes O, Espehaug B, Havelin LI, Soreide JA. (2007) Prosthesis survival after total hip arthroplasty—does surgical approach matter? Analysis of 19,304 Charnley and 6,002 Exeter primary total hip arthroplasties reported to the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop.*; 78(6): 719–729.

- 14 Springer BD, Fehring TK, Griffin WL, Odum SM, Masonis JL. (2009) why revision total hip arthroplasty fails. *Clin Orthop Relat Res*; 467: 166–173.
- 15 Krenn, V., L. Morawietz, and M. Jacobs, (2011) Joint endoprosthesis pathology: histopathological diagnostics and classification. *Pathologe*, 23(3): p. 2010-2019
- 16 Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P. & Amouriq, Y. (2007) Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials* 23: 844–854.
- 17 Zarb CA, Albrektsson T. Nature of implant attachments. In: Branemark P-I, Zarb C, Albrektsson T, editors. *Tissue-integrated prostheses osseointegration in clinical dentistry*. Chicago: Quintessence Publishing Co.; 1985. pp. 88–98.
- 18 Zarb GA, Albrektsson T. Osseointegration: a requiem for periodontal ligament? *Int J Periodontal Restor Dent*. 1991;11:88–91.
- 19 Lemons, J.E. (2004) Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. *The Journal of Oral Implantology* 30: 318–324.
- 20 Puleo DA, Nanci A. (1999) Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*. 20: 2311–2321.
- 21 Junker, R., Dimakis, A., Thoneick, M. and Jansen, J. A. (2009), Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research*, 20: 185–206.
- 22 Yamada M, Ueno T, Tsukimura N, Ikeda T, Nakagawa K, Hori N, Suzuki T, Ogawa T. (2012) Bone integration capability of nanopolymorphic crystalline hydroxyapatite coated on titanium implants. *Int J Nanomedicine*. 8: 859–873.
- 23 Dean JC, Tisdell CL, Goldberg VM, Parr J, Davy D, Stevenson S. (1995) Effects of hydroxyapatite tricalcium phosphate coating and intracancellous placement on bone ingrowth in titanium fibermetal implants. *J Arthroplasty*: 10: 830–838.
- 24 Schwarz ML, Kowarsch M, Rose S, Becker K, Lenz T, Jani L. (2009) Effect of surface roughness, porosity, and a resorbable calcium phosphate coating on osseointegration of titanium in a minipig model. *J Biomed Mater Res A*. Jun;89(3):667-78
- 25 Giavaresi G, Fini M, Chiesa R, Rimondini L, Rondelli G, Borsari V, Martini L, Nicolaldini N, Guzzardella GA, Giardino R. (2002) Osseointegration of sandblasted or anodised hydrothermally-treated titanium implants: mechanical, histomorphometric and bone hardness measurements. *Int J Artif Organs*.25: 806–813.
- 26 Takeuchi K, Saruwatari L, Nakamura HK, Yang JM, Ogawa T. (2005) Enhanced intrinsic biomechanical properties of osteoblastic mineralized tissue on roughened titanium surface. *J Biomed Mater Res A*; 72(3): 296–305.



- 27 Ogawa T, Ozawa S, Shih JH, et al. Biomechanical evaluation of osseous implants having different surface topographies in rats. (2000) *J Dent Res.* 79(11): 1857–1863.
- 28 Ogawa T, Nishimura I. Different bone integration profiles of turned and acid-etched implants associated with modulated expression of extracellular matrix genes. (2003) *Int J Oral Maxillofac Implants.* 18(2): 200–210.
- 29 De Peppo, G. M., Agheli, H., Karlsson, C., Ekström, K., Brisby, H., Lennerås, M., & Petronis, S. (2014). Osteogenic response of human mesenchymal stem cells to well-defined nanoscale topography in vitro. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 2499.
- 30 Bonsignore L, Colbrunn R, Tatro J, Messerschmitt P, Hernandez C, Goldberg V, Stewart M, Greenfield E. (2011) Surface contaminants inhibit osseointegration in a novel murine model. *Bone.* 49: 923–930.
- 31 Lindsay A. Bonsignore, J. Robert Anderson, Zhenghong Lee, Victor M. Goldberg, Edward M. Greenfield, (2013) Adherent lipopolysaccharide inhibits the osseointegration of orthopedic implants by impairing osteoblast differentiation, *Bone*, Volume 52, Issue 1, 93-101
- 32 Jimbo R, Sawase T, Shibata Y, Hirata K, Hishikawa Y, Tanaka Y, Bessho K, Ikeda T, Atsuta M. (2007) Enhanced osseointegration by the chemotactic activity of plasma fibronectin for cellular fibronectin positive cells. *Biomaterials*; 28: 3469–3477.
- 33 Sousa SR, Lamghari M, Sampaio P, Moradas-Ferreira P, Barbosa MA. (2008) Osteoblast adhesion and morphology on TiO<sub>2</sub> depends on the competitive preadsorption of albumin and fibronectin. *J Biomed Mater Res A.*; 84: 281–290.
- 34 Degasne I, Basle MF, Demais V, Hure G, Lesourd M, Grolleau B, Mercier L, Chappard D. (1999) Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. *Calcif Tissue Int.* 64: 499–507.
- 35 Gokhale JA, Boskey AL, Robey PG. (2001) The Biochemistry of Bone. In: Marcus R, F D, Kelsey J, editors. *Osteoporosis. Second.* San Diego: Academic Press; . pp. 107–188.
- 36 Gorski J.P. (1998). "Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of noncollagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms". *Crit. Rev. Oral Med.* 9: 201-23
- 37 Javed A, Chen H, Ghori FY. (2010) Genetic and transcriptional control of bone formation. *Oral Maxillofac Surg Clin N.Am.*; 22: 283–93.
- 38 Katagiri, T. and Takahashi, N. (2002), Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases*, 8: 147–159.

- 39 Friedenstein AJ, Piatetzky S II, Petrakova KV. (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*; 16:381-90.
- 40 Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. (2006) The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev*; 20: 161–171.
- 41 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. (2000) Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*; 32: 11–6.
- 42 Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. (2000) Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*; 105: 71–7.
- 43 Pittenger, M. F., and Martin, B. J. (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.* 95, 9–20
- 44 Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164: 247-56
- 45 Clines GA. Prospects for osteoprogenitor stem cells in fracture repair and osteoporosis. (2010) *Curr Opin Organ Transplant.*; 15(1): 73–78.
- 46 Wang, L.-T., Ting, C.-H., Yen, M.-L., Liu, K.-J., Sytwu, H.-K., Wu, K. K., & Yen, B. L. (2016). Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *Journal of Biomedical Science*, 23, 76.
- 47 Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell.*; 13: 4279–4295
- 48 Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. (2003) The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcified Tissue International.*; 72: 135–142
- 49 Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8: 393–395. Doi: 10.1080/14653240500319234.
- 50 Phinney DG. (2002) Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*; 38: 7–12.
- 51 Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315–317.
- 52 Mittag, F., Falkenberg, E.-M., Janczyk, A., Götze, M., Felka, T., Aicher, W. K., & Kluba, T. (2012). Laminin-5 and type I collagen promote adhesion and

osteogenic differentiation of animal serum-free expanded human mesenchymal stromal cells. *Orthopedic Reviews*, 4(4), e36. 160-164

53 Asher DM. (1999) Bovine sera used in the manufacture of biologicals: current concerns and policies of the US Food and Drug Administration regarding the transmissible spongiform encephalopathies. *Dev Biol Stand.*; 99: 41–4.

54 Brown P, Will RG, Bradley R, Asher DM, Detwiler L. (2001) Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background evolution, and current concerns. *Emerg Infect Dis.*; 7: 6–16.

55 Mannello F, Tonti GA. (2007) Concise review. No breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serumfree, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells.*;25: 1603–9.

56 Sundin M, Ringdén O, Sundberg B, Nava S, Götherström C, Le Blanc K. (2007) No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica.*; 92(9): 1208–1215.

57 Mackensen A, Dräger R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. (2000) Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunology Immunotherapy.* 49(3): 152–156.

58 EMA. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Note for Guidance on the Use of Bovine Serum in the Manufacture of Human Biological Medicinal Products (Draft). 2002b; CPMP/BWP/1793/02.

59 Felka T, Schäfer R, De Zwart P, Aicher WK. (2010) Animal serum-free expansion and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* Apr; 12(2): 143-53.

60 Kocaoemer A, Kern S, Kluter H, Bieback K. (2007) Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells.*; 25: 1270–8.

61 Karsenty G. (2003) „The complexities of skeletal biology. “ *Nature* 423: 316-318.

62 Bussard KM, Gay CV, Mastro AM. (2008) The bone microenvironment in metastasis; what is special about bone? *Cancer Metastasis Rev.*; 27: 41–55.

63 Palumbo C. (1986) A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell Tissue Res.*; 246: 125–131.

64 Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JH. (1986) Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol Rev.*; 66(4): 855–886.

- 65 Kato S, Suzawa M, Takada I, et al. (2003) The function of nuclear receptors in bone tissues. *Bone Miner Metab.*; 21(6): 323–336.
- 66 Javed A, Chen H, Ghori FY. (2010) Genetic and transcriptional control of bone formation. *Oral Maxillofac Surg Clin N.Am.*; 22: 283–93.
- 67 Dallas SL, Bonewald LF (2010) Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192: 437–443
- 68 Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. (2006) Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.*; 235: 176–90.
- 69 Karsdal MA, Nielsen MJ, Sand JM, Henriksen K, Genovese F, et al. (2013) Extracellular matrix remodeling: the common denominator in connective tissue diseases. Possibilities for evaluation and current understanding of the matrix as more than a passive architecture, but a key player in tissue failure. *Assay and drug development technologies* 11: 70–92
- 70 Bosman FT, Stamenkovic I. (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.*; 200: 423–428.
- 71 Oda H, Takeichi M (2011) Evolution: structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *J Cell Biol* 193: 1137–1146
- 72 Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673–687
- 73 Arnaout, M. A. (2002). Coming to Grips with Integrin Binding to Ligands. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 641-651
- 74 LeBaron, R. G. & Athanasiou, K. A. (2000). Extracellular Matrix Cell Adhesion Peptides: Functional Applications in Orthopedic Materials. *Tissue Engineering*: 6, 85-103
- 75 Wang YK, Chen CS. (2013) Cell adhesion and mechanical stimulation in the regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J Cell Mol.*; 17: 823–832.
- 76 Hanada K, Dennis JE, Caplan AI. (1997) Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res.*; 12: 1606–14.
- 77 Dennis, J.E., et al., (1992) Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell.Transplant.*, 1(1): p. 23-32.
- 78 Golbert DC1, Santana-van-Vliet E, Mundstein AS, Calfo V, Savino W, de Vasconcelos AT. (2014) Laminin-database v.2.0: an update on laminins in health and neuromuscular disorders. *Nucleic Acids Res. Jan*; 42(Database issue): D426-9. Doi: 10.1093/nar/gkt901. Epub 2013 Oct 7.

- 79 Malinda, K.M.,and Kleinman,H.K.(1996).The laminins. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 28, 957–959
- 80 Colognato, H., and Yurchenco, P. D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* 218, 213–234
- 81 Hohenester E, Yurchenco PD. Laminins in basement membrane assembly. *Cell ADH Migr.* 2013; 14: 56–63.
- 82 P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman, G. Fuchs, W. Gerok Karlsons *Biochemie und Pathobiochemie*, 15. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 2005, Seite 708, Abb. 23.49
- 83 Timpl, R., Rohde, H., Gehron Robey, P., Rennard, S. I., Foidart, J.M. and Martin, G. R.(1979) : Laminin - a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254: 9933-9937
- 84 McKee KK, Harrison D, Capizzi S, Yurchenco PD. (2007) Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly. *J Biol Chem.*; 282: 21437–47
- 85 Decline, F., and Rousselle, P. (2001). Keratinocyte migration requires alpha2beta1 integrin-mediated interaction with the laminin 5 gamma2 chain. *J. Cell Sci.* 114, 811–823.
- 86 Ogawa T, Tsubota Y, Maeda M et al. (2004) Regulation of biological activity of laminin-5 by proteolytic processing of gamma2 chain. *J Cell Biochem.*; 92: 701–714.
- 87 Hiroaki T, Mizushima H, Tsubota Y et al. (2000) Structural requirement of carboxyl-terminal globular domains of laminin alpha3 chain for promotion of rapid cell adhesion and migration by laminin-5. *J Biol Chem.*; 75: 22495–22502.
- 88 Sugawara K, Tsuruta D, Ishii M, Jones JC, Kobayashi H. (2008) Laminin-332 and -511 in skin. *Exp Dermatol.*; 17: 473–80.
- 89 Kiritsi D, Has C, Bruckner-Tuderman L. (2012) Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa. *Cell Adhes Migr.* 7: 135–41. Doi: 10.4161/cam.22418.
- 90 Salasznyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE. (2004) Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J.Biomed.Biotechnol.*; 200424: 34.
- 91 Hashimoto J, Kariya Y, Miyazaki K. (2006) Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5. *Stem Cells*; 24:2346–54.
- 92 M.B. Visser, C.C. Pollitt, (2011) Immunohistochemical Distribution of Laminin-332 and Collagen Type IV in the Basement Membrane of Normal Horses and Horses with Induced Laminitis, *Journal of Comparative Pathology*, 145, 1, 80

- 93 Sita Subbaram, C Michael DiPersio, (2011) Integrin  $\alpha 3\beta 1$  as a breast cancer target, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15, 10, 1197
- 94 Baek Gil Kim, Hee Jung An, Suki Kang, Yoon Pyo Choi, Ming-Qing Gao, Haengran Park, Nam Hoon Cho, (2011) Laminin-332-Rich Tumor Microenvironment for Tumor Invasion in the Interface Zone of Breast Cancer, *The American Journal of Pathology*, 178, 1, 373
- 95 Kariya Y, Miyazaki K. (2004) The basement membrane protein laminin-5 acts as a soluble cell motility factor. *Exp Cell Res* 297: 508–520.
- 96 Klees RF, Salaszyk RM, Kingsley K, Williams WA, Boskey A, Plopper GE. (2005) Laminin-5 induces Osteogenic Gene Expression in Human Mesenchymal Stem Cells through an ERK-dependent Pathway. *Molecular Biology of the Cell*. 16(2): p. 881-890
- 97 Marinkovich M. (2007) Laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nature Reviews Cancer* 7, 370-380
- 98 Alberts B, *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science, New York), 5. Auflage 2008, Seite 1185
- 99 P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman, G. Fuchs, W. Gerok *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, 15. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 2005, Seite 703 f.
- 100 Harumiya S, Gibson MA, Koshihara Y. (2002) Antisense suppression of collagen VI synthesis results in reduced expression of collagen I in normal human osteoblast-like cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem*; 66: 2743–2747
- 101 Carvalho RS, Kostenuik PJ, Salih E, Bumann A, Gerstenfeld LC. (2003) Selective adhesion of osteoblastic cells to different integrin ligands induces osteopontin gene expression. *Matrix Biol.*; 22(3): 241–9.
- 102 Hennessy KM, Pollot BE, Clem WC, Phipps MC, Sawyer AA, et al. (2009) The effect of collagen I mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation, and on bone formation at hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials* 30: 1898–1909
- 103 Kundu AK, Putnam AJ. (2006) Vitronectin and collagen I differentially regulate osteogenesis in mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*; 347: 347–357
- 104 Taubenberger, A.V. and M.A. Woodruff, (2010) The effect of unlocking RGD motifs in collagen 1 on pre-osteoblast adhesion and differentiation *Biomaterials.*, 31(10): p. 2827-2835.
- 105 V. Frojd, A. Wennerberg, V. Franke Stenport (2012) Importance of Ca (2+) modifications for osseointegration of smooth and moderately rough anodized titanium implants – a removal torque and histological evaluation in rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res*, 14: pp. 737–745

- 106 R. Jimbo, T. Sawase, Y. Shibata, K. Hirata, Y. Hishikawa, Y. Tanaka et al. (2007) Enhanced osseointegration by the chemotactic activity of plasma fibronectin for cellular fibronectin positive cells *Biomaterials*, 28: pp. 3469–3477
- 107 R. Jimbo, M. Ivarsson, A. Koskela, Y.T. Sul, C.B. Johansson (2010) Protein adsorption to surface chemistry and crystal structure modification of titanium surfaces, *J Oral Maxillofac Res*, 1: p. e3
- 108 G. Avila, K. Misch, P. Galindo-Moreno, H.L. Wang (2009) Implant surface treatment using biomimetic agents, *Implant Dent*, 18, pp. 17–26
- 109 Bougas K, Jimbo R, Vandeweghe S, et al. 2012) Bone apposition to laminin-1 coated implants: histologic and 3D evaluation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 5. P. 677-682
- 110 Cool SM, Nurcombe V. Substrate Induction of Osteogenesis from Marrow-Derived Mesenchymal Precursors. *Stem Cells and Development*. 14: 632–642 (2005)
- 111 Klees RF, Salaszyk RM, Ward DF, Crone DE, Williams WA, Harris MP, Boskey A, Quaranta V, Plopper GE. (2008) Dissection of the osteogenic effects of laminin-332 utilizing specific LG domains: LG3 induces osteogenic differentiation, but not mineralization. *Exp Cell Res*. Feb 15; 314(4): 763-73.
- 112 Falkenberg E (2011), Medizinische Dissertationsschrift: Haftung und Differenzierung von osteogenen Zellen und Laminin-5 in vitro, Universität Tübingen
- 113 Schmitz, S. (2011) *Der Experimentator Zellkultur*, 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, S.206.
- 114 Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 3: 393–403.
- 115 Alberts B, *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science, New York), 5. Auflage 2008, Seite 1191
- 116 Alberts B, *Molecular Biology of the Cell* (Garland Science, New York), 5. Auflage 2008, Seite 1191 f.
- 117 P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman, G. Fuchs, W. Gerok *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, 15. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 2005, Seite 704, Abb. 23.48
- 118 Schonmeyr BH, Wong AK, Li S, Gewalli F, Cordiero PG, Mehrara BJ. (2008) Treatment of hydroxyapatite scaffolds with fibronectin and fetal calf serum increases osteoblast adhesion and proliferation in vitro. *Plast Reconstr Surg*.; 121(3): 751–62.
- 119 Warstat, K., *Mesenchymale Stammzellen in Kontakt mit der Extrazellulären Matrix: Expression von Integrin und Matrix-Metalloproteasen unter Einfluss von TGF  $\beta$* , in *Biologie 2009*, Eberhard- Karls Universität: Tübingen.p. 1-97.

- 120 Tekkatte C, Gunasingh GP, Cherian KM, Sankaranarayanan K (2011) "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int* 2011: 504723.
- 121 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.*; 284(5411): 143–147.
- 122 Robey PG. (2011) Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but promising) *Tissue Engineering B.*; 17(6): 423–430.
- 123 Stenderup, K. and J. Justesen, (2003) Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* 33(6): p. 919-926.
- 124 Baxter MA, Wynn RF, Wraith JE, Jowitt SN, Fairbairn LJ, Bellantuono I. (2004) Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells.*; 22(5): 675–682
- 125 Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, et al. (2008) Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell.*; 7(3): 335–343
- 126 Phinney, D.G., et al., (1999) Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J cell Biochem.* 1999. 75: p. 424-438.
- 127 Khan WS, Adesida AB, Tew SR, Andrew JG, Hardingham TE. (2009) the epitope characterisation and the osteogenic differentiation potential of human fat pad-derived stem cells is maintained with ageing in later life. *Injury.*40(2): 150–157
- 128 Dexheimer V, Mueller S, Braatz F, Richter W. (2011) Reduced reactivation from dormancy but maintained lineage choice of human mesenchymal stem cells with donor age. *PLoS ONE.*; 6(8) Article ID e22980
- 129 Fossett E, Khan WS. (2012) Optimising human mesenchymal stem cell numbers for clinical application: a literature review. *Stem Cells Int.*; 2012: 465259.
- 130 Chen, T.L., C.M. Cone, and D. Feldmann, (1983) Glucokorticoïd modulation of cell proliferation in cultured osteoblast like bone cells: differences between rat and mouse. *Endocrinology*,112(5): p. 1739-1745.
- 131 Kream, B.E., D.N. Petersen, and L.G. Raisz, (1990) Cortisol enhances the anabolic effects of insulin-like growth factor 1 on collagen synthesis and procollagen messenger ribonucleic acid levels in cultured 21- day fetal rat calvariae. *Endocrinology*, 1990. 126(3): p. 1576-1583.
- 132 Canalis, E., (1983) Effekt of glucokorticoïds on type 1 collagen synthesis, alkaline phosphatase activity and deoxyribonucleic acid content in cultured rat calvariae. *Endocrinology.* 112(3): p. 931-939.



- 133 Lohmann M, Walenda G, Hemeda H, Jousen S, Drescher W, Jockenhoevel S, Hutschenreuter G, Zenke M, Wagner W. (2012) Donor age of human platelet lysate affects proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells.
- 134 Bernardo, M. E., Zaffaroni, N., Novara, F., et al. (2007). Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Research*, 67, 9142–9149.
- 135 Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M., & Prockop, D. J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 3213 –3218.
- 136 Fehrer, C., Brunauer, R., Laschober, G., et al. (2007). Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*, 6, 745 – 757.
- 137 Pevsner-Fischer, M., & Zipori, D. (2009). Environmental signals regulating mesenchymal progenitor cell growth and differentiation. In VKV Rajasekhar & C. Mohan (Eds.), *Regulatory networks in stem cells*. 1st Ed (p. 175 – 184) Humana.
- 138 Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, et al. (2009) Mesenchymal stem cells: The fibroblasts' new clothes? *Haematologica*; 94: 258–263.
- 139 Cappelleso-Fleury S, Puissant-Lubrano B, Apoil PA, Titeux M, and Winterton P et al. (2010) Human fibroblasts share immunosuppressive properties with bone marrow mesenchymal stem cells. *J Clin Immunol* 30: 607-619
- 140 Chen FG, Zhang WJ, Bi D, Liu W, Wei X, Chen FF, Zhu L, Cui L, Cao Y. (2007) Clonal analysis of nestin(-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *J Cell Sci.*; 120: 2875–2883
- 141 Ha JW, Kim JA, Ha CW. (2012) Do the Fibroblasts Contained in Early Passage MSC Population Adversely Affect the Characteristics of Stem Cell Population Obtained from Human Placenta? *Int J Stem Cells*. Nov 2012; 5(2): 89–95.
- 142 M. A. Haniffa, X.-N. Wang, U. Holtick et al., (2007) Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells, *The Journal of Immunology*, vol. 179, no. 3, pp. 1595–1604,
- 143 Ulrich C, Hart ML, Rolaufts B, Abele H, Götze M, et al. (2012) Mesenchymal Stromal Cells and Fibroblasts. *J Tissue Sci Eng* 3:e109.
- 144 Bernardo ME, Avanzini MA, and Perotti C, et al. (2007) Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-

therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *Journal of Cellular Physiology.*; 211(1): 121–130.

145 Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. (2007) Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*; 47: 1436–46.

146 Ploederl K, Strasser C, Hennerbichler S, Peterbauer-Scherb A, Gabriel C. (2010) Development and validation of a production process of platelet lysate for autologous use. *Platelets.*;22: 204–9.

147 Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, et al. (2012) Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy*; 14(5): 540–554.

148 Lange C, Cakiroglu F, Spiess A-N, Cappallo-Obermann H, Dierlamm J, Zander AR. (2007) Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology.* 213(1): 18–26.

149 Gruber R, Karreth F, Kandler B, et al. (2004) Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets.* 15(1): 29–35.

150 Ikebe C, Suzuki K. (2014) Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols. *Biomed Res Int.*; 15: 951512.

151 Muraglia, A., Cancedda, R., & Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 7), 1161 –1166.

152 Banfi, A., Muraglia, A., Dozin, B., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., & Quarto, R. (2000). Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Experimental Hematology*, 28, 707–715

153 Furusawa, C., & Kaneko, K. (2009). Chaotic expression dynamics implies pluripotency: when theory and experiment meet. *Biology Direct*, 4, 17.

154 Krinner, A., Hoffmann, M., Loeffler, M., Drasdo, D., & Galle, J. (2010). Individual fates of mesenchymal stem cells in vitro. *BMC Systems Biology*, 4, 73.

155 Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, et al. (2004) Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells.*; 22: 675-82

- 156 Frith JE, Mills RJ, Hudson JE, Cooper-White JJ. (2012) Tailored integrin-extracellular matrix interactions to direct human mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells Dev* ; 21: 2442–2456.
- 157 Roca-Cusachs P, Gauthier NC, Del Rio A, Sheetz MP. (2009) Clustering of alpha (5) beta (1) integrins determines adhesion strength whereas alpha (v) beta (3) and talin enable mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 106: 16245–16250.
- 158 Semon JA, Nagy LH, Llamas CB, Tucker HA, Lee RH, Prockop DJ. (2010) Integrin expression and integrin-mediated adhesion in vitro of human multipotent stromal cells (MSCs) to endothelial cells from various blood vessels. *Cell Tissue Res.*; 341: 147–158.
- 159 Martínez E, Engel E, Planell JA, Samitier J. (2009) Effects of artificial micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Ann Anat.*; 191(1): 126–135
- 160 Ni, S., et al. (2014). Understanding improved osteoblast behavior on select nanoporous anodic alumina. *Int J Nanomedicine* 9: 3325-3334.
- 161 Bills CE, Eisenberg H, Pallante SL. (1971) Complexes of organic acids with calcium phosphate: the von Kossa stain as a clue to the composition of bone mineral. *Johns Hopkins Med J.*; 128: 194–207.
- 162 Klees RF, Salaszyk RM, Vandenberg S, et al. (2007) Laminin-5 activates extracellular matrix production and osteogenic gene focusing in human mesenchymal stem cells. *Matrix Biol.*; 262: 106–14.
- 163 Becerra-Bayona S, Guiza-Arguello V, Qu X, Munoz-Pinto DJ, Hahn MS. (2012) Influence of select extracellular matrix proteins on mesenchymal stem cell osteogenic commitment in three-dimensional contexts. *Acta Biomaterialia.*; 8(12): 4397–4404.
- 164 Hunter, G. K., Poitras, M. S., Underhill, T. M., Grynpas, M. D. and Goldberg, H. A. (2001), Induction of collagen mineralization by a bone sialoprotein–decorin chimeric protein. *J. Biomed. Mater. Res.*, 55: 496–502.
- 165 Deshpande AS, Beniash E (2008) Bio-inspired Synthesis of Mineralized Collagen Fibrils. *Cryst Growth Des* 8: 3084–3090
- 166 Beniash E. (2011) Biominerals – Hierarchical nanocomposites: The example of bone. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.*; 3: 47–69.
- 167 Qin C., Baba O., Butler W.T. (2004) Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2004; 15: 126–136.
- 168 Russell, K. C., Phinney, D. G., Lacey, M. R., Barrilleaux, B. L., Meyertholen, K. E., & O' Connor, K. C. (2010). In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells*, 28, 788 –798.

- 169 Okamoto, T., Aoyama, T., Nakayama, T., et al. (2002). Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295, 354–361.
- 170 Ylostalo, J., Bazhanov, N., & Prockop, D. J. (2008). Reversible commitment to differentiation by human multipotent stromal cells in single-cell-derived colonies. *Experimental Hematology*, 36, 1390–1402.
- 171 Sengers, B. G., Dawson, J. I., & Oreffo, R. O. (2010). Characterisation of human bone marrow stromal cell heterogeneity for skeletal regeneration strategies using a two-stage colony assay and computational modelling. *Bone*, 46, 496–503.
- 172 Wagner, W., Ho, A. D., & Zenke, M. (2010). Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering. Part B: Reviews*, 16, 445–453.
- 173 Heggebö J, Haasters F, Polzer H, Schwarz C, Saller MM, Mutschler W, Schieker M, Prall WC. (2014) Aged human mesenchymal stem cells: the duration of bone morphogenetic protein-2 stimulation determines induction or inhibition of osteogenic differentiation. *Orthop Rev (Pavia)*. Jun 3; 6(2): 5242. Doi: 10.4081/or.2014.5242. eCollection 2014.
- 174 Song IH, Caplan AI, Dennis JE. Dexamethasone inhibition of confluence-induced apoptosis in human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 2009; 27: 216-21
- 175 Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. (2008) Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev*; 129: 163–173.
- 176 Siddappa R, Licht R, van Blitterswijk C, de Boer J.(2007) Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *J Orthop Res*; 25: 1029–1041.
- 177 Fickert S, Schroter-Bobsin U, Gross AF, Hempel U, Wojciechowski C, et al. (2010) Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation during long-term ex vivo cultivation is not age dependent. *J Bone Miner Metab* 2011 Mar;29(2):224-35
- 178 Stenderup K, Justesen J, Eriksen EF, Rattan SI, Kassem M. (2001) Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *J Bone Miner Res.*; 16: 1120–1129.
- 179 Zhao L, et al. (2011) Tumor necrosis factor inhibits mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts via the ubiquitin E3 ligase Wwp1. *Stem Cells.*; 29(10): 1601–1610. doi: 10.1002/stem.703.
- 180 Lee KY, Alsberg E, Hsiung S, Comisar W, Linderman J, Ziff R, Mooney D. (2004) Nanoscale Adhesion Ligand Organization Regulates Osteoblast Proliferation and Differentiation. *Nano Lett*. 2004 Jul 13; 4(8): 1501-1506.

- 181 Aubin JE. (1998) Bone stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1998: 73–82.
- 182 Dallas SL, Bonewald LF (2010) Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1192: 437–443
- 183 Mageed AS, Pietryga DW, DeHeer DH, West RA. (2007) Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells. *Transplantation*; 83: 1019–1026.
- 184 Whitfield MJ, Lee WCJ, Van Vliet KJ. (2013) Onset of heterogeneity in culture expanded bone marrow stromal cells. *Stem Cell Research.*: 11(3): 1365–1377.
- 185 Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, Horwitz E, Le Blanc K, Phinney DG, et al. (2010) defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy.*; 12: 576–8
- 186 Janicki P, Boeuf S, Steck E, Egermann M, Kasten P, Richter W. (2011) Prediction of in vivo bone forming potency of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *European Cells & Materials*; 21: 488–507

## 9 Erklärungen zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel "Dynamik der osteogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stromazellen unter dem Einfluss von Laminin-5 in vitro" selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Bei der Durchführung der Versuchsreihe, Interpretation der Ergebnisse und Formulierung dieses Manuskripts wurde ich von unten genannten Personen in aufgeführter Weise unterstützt:

Die Arbeit wurde in der orthopädischen Klinik Tübingen unter der Betreuung von PD Dr. Falk Mittag ausgeführt. Die Fragestellung dieser Studie und die Versuchsreihe wurden von meinem Betreuer, PD Dr. Falk Mittag, konzipiert. Er stellte mir die Studien von Klees et al. vor, die als Anstoß für diese Versuchsreihe dienten. Er unterstützte mich bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse und Interpretation der Ergebnisse und beriet mich bei der Erstellung dieses Manuskripts.

Ich führte nach Anleitung die Versuche im orthopädischen Forschungslabor des Universitätsklinikum Tübingen mit unten genannten Ausnahmen selbstständig durch. Die Durchführung der Versuche wurde mir von folgenden Mitarbeitern des orthopädischen Forschungslabor Tübingen gezeigt:

Tanja Abbruzzese, Angestellte MTA von Prof. W. Aicher, zeigte mir die Isolation und Kultivierung von MSC, Durchführung von FACS-Analyse, rt-PCR sowie Durchführung der Oil-Red- und von-Kossa-Färbungen und der Attachment-Versuche. Die rt-PCR von zwei Zelllinien wurden zu Demonstrationszwecken alleine von ihr durchgeführt. Elisabeth Kienzle, angestellte MTA von Prof. W. Aicher, unterstützte mich bei der Zellkultur, indem sie die Femurköpfe aus dem UKT in das Forschungslabor transportierte und mir die Isolation der MSC zeigte. Christine Ulrich, Doktorandin bei Prof. W. Aicher, demonstrierte mir die FACS-Analyse. Lorenzo Roncoroni, Doktorand bei Prof. W. Aicher, zeigte mir die Attachment-Versuche und deren fotografische Dokumentation. Der Leiter des

orthopädischen Forschungslabors, Prof. Wilhelm Aicher, beriet mich bei der Interpretation der Ergebnisse der Studie. Unter Berücksichtigung statistischer Ergebnisse beriet er mich zum Umfang der Experimente, insbesondere in Bezug auf die rt-PCR und Attachment Assays.

Die statistische Auswertung erfolgte selbstständig durch mich mit Hilfe von PD Dr. Falk Mittag und Prof. Dr. Wilhelm Aicher.

Ich versichere, dieses Manuskript selbstständig nach Anleitung durch PD Dr. Falk Mittag verfasst zu haben.

**Erklärung zum Eigenteil der Veröffentlichung, die Teile dieser Versuchsreihe enthält:**

Teile der Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind auch in dem Artikel „Laminin-5 and type I collagen promote adhesion and osteogenic differentiation of animal serum-free expanded human mesenchymal stromal cells.“ veröffentlicht worden, der 2012 in der Zeitschrift Orthopedic Reviews erschien. (52) Die Abbildungen, die ebenfalls dort veröffentlicht sind, wurden in der Abbildungsbeschriftung entsprechend gekennzeichnet. Ergebnisse und Schlussfolgerungen dieser Arbeit, die zuvor in der Publikation veröffentlicht wurden, habe ich ebenfalls gekennzeichnet. Für die Publikation wurden Ergebnisse aus dieser Arbeit und aus der medizinischen Dissertation von Eva-Maria Falkenberg zum Thema „Haftung und Differenzierung von osteogenen Zellen und Laminin-5 in vitro“, 2011, Tübingen (112), verwendet. Die Versuche fanden nach Konzeption und unter Betreuung von PD Dr. Falk Mittag statt. Dr. Eva-Maria Falkenberg und ich führten unabhängig voneinander verschiedene Versuchsreihen im orthopädischen Zelllabor der Universität Tübingen durch. Die Auswertung der Ergebnisse, statistische Auswertung der Versuche und Erstellung der Grafiken, die sich auf die von mir durchgeführten Versuchsteile beziehen, wurden von mir unter Anleitung von PD Dr. Falk Mittag und Beratung durch Prof. W. Aicher durchgeführt.

## **10 Veröffentlichungen**

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Mittag Falk, Falkenberg Eva-Maria, Janczyk Alexandra, Götze Marco, Felka Tino, Aicher Wilhelm K., Kluba Torsten. Laminin-5 and type I collagen promote adhesion and osteogenic differentiation of animal serum-free expanded human mesenchymal stromal cells - Orthopedic Reviews – 2012 - Band 4(4) - S. 160-164



## **11 Danksagung**

Zunächst gilt mein Dank Herrn PD Dr. F. Mittag, der mir als Doktorvater und Betreuer in die Thematik dieses Manuskripts einführte und mich bei der Versuchsdurchführung und Fertigstellung der Dissertation betreute. Herrn Prof. Dr. W. Aicher danke ich ebenfalls herzlich. Als Leiter des orthopädischen Forschungslabors der Universität Tübingen unterstützte er mich mit fachlicher Betreuung und informierte mich über den aktuellen Stand der Forschung auf dem Gebiet der Stammzellen. Allen Mitarbeitern des orthopädischen Forschungslabors der Universitätsklinik Tübingen danke ich sehr für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft. Besondere Unterstützung habe ich von den Technischen Assistentinnen T. Abruzzese und E. Kienzle erfahren, die mich stets geduldig bei den Versuchen anleiteten und unterstützten. Auch bei den Doktoranden C. Ulrich und L. Roncoroni möchte ich mich für die ausführliche Erklärung von Laborversuchen bedanken. Meinen Eltern danke ich schließlich dafür, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mich während der Fertigstellung dieser Dissertation stets unterstützen.

Zuletzt möchte ich noch meinen Dank an die freiwilligen Spender des Knochenmaterials aussprechen, ohne die die Versuche nicht möglich gewesen wären.

## 12 Anhang

### 12.1 Laborgerätschaften:

- FACS-Gerät: BD LSR II
- Fotoapparat (Leica, Nikon)
- Inkubator (Binder CB 210, 5%, CO<sub>2</sub>, 37°)
- Kühlschrank 4°C, Liebherr, Biberach/D
- LightCycler 1.5 (Roche)
- Mikroskop (Anxiovert 13 S, Zeiss)
- Mikroskop Leica DMIL
- Pipettierhilfen, Pipetus (Hirschmann)
- Pipetten: Eppendorf research, 10, 100, 200, 1000 µl
- Sterilbank (BDK)
- Tiefkühltruhe -20°C, Tiefkühltruhe -70°C
- Vakuumsaugpumpe (Neuberger Laborport)
- Warmwasserbad: w12 STÖRK tronic
- Zentrifugen: Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf Centrifuge 5424, Eppendorf Centrifuge 5415D

### 12.2 Verbrauchsartikel

- Gewebekulturplatte 6-Well (Cellstar®, Greiner)
- Gewebekulturplatte 96-Well (Cellstar®, Greiner)
- Cryo tubes vials nunc
- Deckgläser, 24x32mm, Langenbrick, Emmendingen/D
- Einmalpipetten (25 ml, 10ml, 5ml, 2ml BD Falcon)
- Filtertips (100,200,1000 µl Biozym, 10 µl, Preqlab)
- Kanüle (BD Microlance)
- Light Cycler Glaskapillaren, LC Capillaries 2 µl, Roche, Mannheim/D
- Neubauer Zählkammer (Neubauer)
- Petrischalen: 35mm (Cellstar Greiner bio-one, 145/20mm)
- Reaktionsrörchen (2,0; 1,5,; 0,5ml Eppendorf)

- Rneasy Mini Kit (Qiagen)
- Rundbodenröhrchen 5ml (BD Flacon)
- Spritze (BD Plastipac)
- Zellkulturflaschen : 75cm<sup>2</sup> Falcon (BD Biosciences)
- Zellschaber (Costar)
- Zentrifugationsröhrchen: 15ml (Sarstedt), 50 ml (Cellstar tubes, Greiner bio-one)

### 12.3 Chemikalien:

- 3-Isobuthylxanthin (Sigma)
- 70% Ethanol (Lonza)
- Accutase (PAA)
- Ascorbinsäure (Sigma)
- BSA
- Collagen I (BD)
- Collagenase XI (Sigma)
- cDNA-Synthese-Kit, Advantage RT-for-PCR Kit, Clontech, Palo Alto/USA
- Descosept AF (Dr. Schuhmacher GmbH)
- Dexamethason (Sigma)
- Dimetyl Sulphoxide (Sigma)
- Dispase II Roche Diagnostics GmbH
- DMEM HG (PAA)
- DMEM-F12 Gibco (Invitrogen)
- Tabelle 9: Färbelösungen für die Von-Kossa-Färbung

Silbernitratlösung	2,5 g Silbernitrat in 50 ml Aqua dest.
Natriumcarbonatlösung	2,5g Na-Carbonat in 12,5 ml Formaldehydlösung 35% und 35ml Aqua dest.
Natriumthiosulfatlösung	2, 5 g Na-Thiosulfat in 50 ml Aqua dest.

- FBS Superior Biochrom AG
- Ficoll-Paque Premium (GE-Healthcare)

- Fungizide Patricin Biochrom
- Heparin Natriumsalz Carl Roth GmbH & Co Kg
- Human plasma recovered (PAA)
- Indomethacin (Calbiochem)
- Insulin solution: human (Sigma)

Tabelle 10: Inhaltsstoffe von PFEA (FACS-Analyse)

Inhaltsstoff	Menge	Hersteller
DPBS	500ml	Gibco
FCS	10ml	Biochrom AG
Natrium-Azid-Stocklösung	1ml	Merck KGaA
EDTA-Natrium	372mg	Triplex III (Merck)

- Proteine der extrazellulären Matrix
  - Laminin 1, 1mg/ml, Sigma
  - Laminin 5, 0,65mg/ml, Abcam
  - Collagen 1, 200 µg/ml, BD Biosciences
- L-Glutamine (Lonza)
- Oil red O (Sigma)
- PBS-Puffer, Dulbecco's PBS, PAA
- PCR-Kit, Taq DNA-Polymerase, Boehringer Mannheim/D
- RNA-Extraktionskit, RNeasy minikit (250), Qiagen, Maryland/USA
- Penicillin/ Streptomycin Gibco Pen/Strep
- Silbernitrat Roth
- β-Glycerolphosphat Sigma
- β-Mercaptoethanol Sigma
- Thrombozytenlysat (Blutbank Tübingen)
- Trypan Blue solution (Sigma)
- Trypsin PAA

- Antikörper für die FACS-Analyse:

CD73	PE	BD Pharmingen	Cat.nr. 550257
CD90	PE	R+D Systems	FAB 2067P
CD105	FITC	AbD serotec	MCA 1557F
CD14	PE	BD Pharmingen	555397
CD34	PE	Biologend	316407
CD45	PE	Biologend	304007

## 12.4 Computerprogramme:

- Excel (Office 2000, Microsoft Cooperation, USA)
- Image J, NIH, USA
- Image Manager 1000, Leica
- Programm für PCR-Auswertung: Molecular Biochemical Light Cycler Software, Roche, Mannheim/D
- BD FACSDiva™ Software (BectonDickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
- FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA)
- Remote Capture

## 12.5 Ausführliche Versuchsanleitung zur Analyse der Expression osteogener Markergene

### 12.5.1 Isolation von RNA

Zur Isolation der RNA der MSC wurde der RNeasy-Mini Kit von Qiagen benutzt. Die MSC, die davor 3 bzw. 7 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium bzw. Kontrollmedium in proteinbeschichteten 75ccm-Falcons kultiviert wurden, wurden mit Trypsin vom Flaschenboden abgelöst. Nach Abstoppen mit GMP+-Medium wurden die MSC bei 1500 rpm, 7 Minuten bei 7°C zentrifugiert. Nach

Absaugen des Überstands wurden die Zellen in 350 µl RLT-Puffer (+ 1% β Mercaptoethanol) resuspendiert und anschließend bei –70°C für einige Tage aufbewahrt.

Nach dem Auftauen der Suspension erfolgten folgende Schritte:

- Zugabe von 350µl 70%iges Ethanol
- Aufziehen mit einer Spritze (5 Mal wiederholen)
- Aufschichten des Gemischs auf die Silicagel-Säule (Rneasy-Kit)
- 15 Sekunden bei 1000rpm zentrifugieren und Verwerfen des Durchflusses
- Zugabe von 350µl RW1-Puffer auf die Säule
- 15 Sekunden bei 1000rpm zentrifugieren und Verwerfen des Durchflusses
- Zugabe von 10 µl DNase und 70 µl RDD Puffer in die Mitte der Säule
- 15 Minuten bei 20°C inkubieren
- Erneutes Waschen mit 350µl RW1-Puffer
- 15 Sekunden bei 1000rpm zentrifugieren und Verwerfen des Durchflusses
- Umsetzen der Säule in ein neues Tube
- Zugabe von 500 µl RPE-Puffer
- 15 Sekunden bei 1000rpm zentrifugieren und Verwerfen des Durchflusses
- Zugabe von 500 µl RPE-Puffer
- 2 Minuten bei 10000 rpm zentrifugieren
- Zugabe von 40µl Rnase-freiem Wasser
- 1 Minute bei 20°C inkubieren
- 2 Minuten bei 10000rpm zentrifugieren

Vor dem Umschreiben der RNA in cDNA wurde die Konzentration der RNA bei 260nm und 280 nm mit dem Photometer gemessen. Gegebenenfalls wurde Rnase-freies Wasser hinzugegeben, um eine einheitliche Konzentration zu erreichen.

## 12.5.2 cDNA-Synthese

Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgte mithilfe des cDNA-Synthese-Kits (Clontech). Der Ansatz für die Synthese der cDNA enthielt 1 µg RNA, die in 12,5 µl RNase-freiem Wasser gelöst war, und 2 µl Oligo-dT-Primer. Diese Primer lagern sich an die Poly-A-Schwänze der mRNA an. Im Thermoblock wurde der Ansatz für 2 Minuten auf 70°C erhitzt und danach 2 Minuten lang auf Eis abgekühlt.

Danach wurde der „Mastermix“ hinzugefügt, der aus folgenden Stoffen bestand:

- 5x Reaktionspuffer (4 µl)
- Rekombinanter RNase-Inhibitor (0,5 µl)
- dNTP-Mix (1 µl)
- Reverse Transkriptase (1 µl)

Im Thermoblock wurde das Gemisch zunächst eine Stunde lang auf 42°C aufgeheizt. In dieser Zeit synthetisierte die Reverse Transkriptase den komplementären DNA-Strang. Danach wurden die Proben fünf Minuten lang auf 95°C erhitzt. Schließlich wurde die entstandene cDNA bei 4°C gelagert, bis die Proben dem Thermoblock entnommen wurden. Die entstandene cDNA wurde mit 80 µl RNase-freiem Wasser versehen und bei -20°C gelagert.

## 12.5.3 Quantitative real time PCR (Light Cycler ®)

Die quantitative Real-time PCR beruht darauf, dass während der Polymerase-Ketten-Reaktion bereits die Anzahl der PCR-Produkte mittels Fluoreszenzmessung ermittelt wird.

Die PCR erfolgt grundsätzlich in folgenden Schritten:

- Hitzedenaturierung: Zunächst wird durch Schmelzen bei 95°C der DNA-Doppelstrang getrennt.
- Annealing: Über Basenpaarung lagern sich die Primer an den DNA-Einzelstrang (Template-DNA) an und begrenzen den DNA-Abschnitt, der vervielfältigt werden soll.
- Extension: Die Amplifikation wird bei 72°C durch das hitzestabile Enzym Taq-Polymerase durchgeführt. Durch Wiederholung der Reaktionszyklen

wird die DNA exponentiell vervielfältigt. Die PCR wurde mit dem Light Cycler® von Roche und dem Light Cycler Fast Start Master Mix von Roche durchgeführt. Der Mix enthielt Taq-DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> und den Farbstoff SYBRGreen. Zusätzlich wurden Primer benötigt, die spezifisch für die jeweiligen Gene sind. Für GAPDH, Osteopontin und Osteocalcin wurden intronüberspannende Primer der Firma Search LC gewählt.

Jede untersuchte Probe enthielt:

- 12,6 µl H<sub>2</sub>O
- 2 µl cDNA der jeweiligen MSC-Probe
- 2 µl SYBR-Green Master Mix
- 2,4 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 1 µl Primer Mix in einer Konzentration von 10 µM pro Primer

Für Alkalische Phosphatase und Runx-2 wurden Primer der Firma MWG gewählt. Diese Proben enthielten folgende Primer-Sequenzen:

Tabelle 11: Primersequenzen für die Gene AP und Runx-2 der Firma LWG

AP	up	5'- ATT ACC TGG ACA TCG GCA AC -3'
	down	5'- TTG GGC ACC ACA TCA TAG AA -3'
Runx-2	up	5'- TCT GGC CTT CCA CTC TCA GT -3'
	down	5'- GAC TGG CGG GGT GTA AGT AA -3'

Die Primer-Sequenzen für die Gene Osteopontin und Osteocalcin werden nicht von dem Hersteller LCSearch veröffentlicht.

Der Fluoreszenz-Farbstoff SYBRGreen lagert sich zwischen Template- und neuem DNA-Strang an und wird dadurch aktiviert. In jedem Reaktionszyklus gibt die Fluoreszenzintensität Rückschluss auf die Menge der neu gebildeten PCR-Produkte.

Bei der hier angewandten relativen Quantifizierung wird die ermittelte Kopienanzahl im Verhältnis zur Kopienanzahl eines House-keeping-Gens gesetzt. Hierzu wird ein Gen gewählt, welches zuverlässig und in hohem Maß von jeder Zelle exprimiert wird, in diesem Fall wurde GAPDH gewählt.



Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurden die DNA-Proben erneut auf 95°C erhitzt, sodass die Doppelstränge wieder getrennt wurden und das Fluoreszenzsignal des SYBR-Green-Farbstoffes abnimmt. Damit die Reaktion als spezifisch gelten kann, darf diese Schmelzkurve nur einen Peak beinhalten. Zusätzlich wurde eine vierstufige Standard-Verdünnungsreihe mitgeführt, deren Abweichung sich unter 0,05 befinden sollte.