

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Johannes Kleinheinz -

Immunhistochemische Untersuchung der Bildung und Reifung osteoblastenähnlicher Zellmikromassen

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Maria Gerber

aus Bergisch Gladbach

2017

Gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h. c. mult.

Ulrich K. Joos

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Dirksen

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2017

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-, Gesichtschirurgie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Johannes Kleinheinz -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h. c. mult. Ulrich K. Joos
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Dirksen

ZUSAMMENFASSUNG

Immunhistochemische Untersuchung der Bildung und Reifung osteoblastenähnlicher Zellmikromassen

Gerber, Maria

Für eine schnelle und erfolgreiche Regeneration von ossären Defekten ist ein sensibles Zusammenspiel verschiedener für die Knochenbildung verantwortlicher Faktoren notwendig. In diesen vielstufigen Prozess sind bei der Biomineralisation des Knochens anfangs nicht-kollagene Matrixproteine wie Osteonectin, Osteocalcin und Osteopontin sowie das Matrixprotein Collagen Typ I maßgeblich involviert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bildung und Reifung von Mikromassenkulturen aus Osteoblasten *in vitro*, mit besonderem Augenmerk auf die Matrixproteine Osteonectin, Collagen Typ I, Osteocalcin und Osteopontin immunhistochemisch zu untersuchen.

Zur Herstellung der dreidimensionalen Zellmikromassen wurden primäre Osteoblasten aus dem Periost boviner Metacarpalia gewonnen, als Monolage proliferiert, passagiert und im Anschluss auf einem Gemisch aus Agarose und Leibovitz-Medium kultiviert. Zu definierten Zeitpunkten wurde die Entwicklung der Expression der Matrixproteine untersucht, indem die Zellen/Mikromassen fixiert, voreingebettet, eingebettet, immunhistochemisch markiert und unter dem Lichtmikroskop sowie dem Elektronenmikroskop begutachtet wurden.

Im Versuchszeitraum von 30 Minuten bis zu 14 Tagen strömten die Zellen einem Schwerpunkt entgegen und bildeten bereits nach ca. 1 Tag rundliche Zellmikromassen. Der immunhistochemische Nachweis zeigte, dass schon nach 30 Minuten intrazellulär Matrixproteine wie Osteonectin, Collagen Typ I und Osteopontin synthetisiert wurden. 90 Minuten nach Aussiedelung der Osteoblasten waren erste extrazelluläre Ansammlungen der Proteine zu erkennen, welche nach 4 Stunden die Zellen fast vollständig umschlossen. Die sich bildende extrazelluläre Matrix nahm im Laufe der Kulturzeit deutlich an Masse zu und zeigte erste Anzeichen einer folgenden Mineralisation. Osteocalcin konnte während des gesamten Versuchszeitraumes nicht nachgewiesen werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2017

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Immunhistochemische Untersuchung der Bildung und Reifung osteoblastenähnlicher Zellmikromassen

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Münster

unter der Anleitung von:

Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h.c. mult. Ulrich K. Joos

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

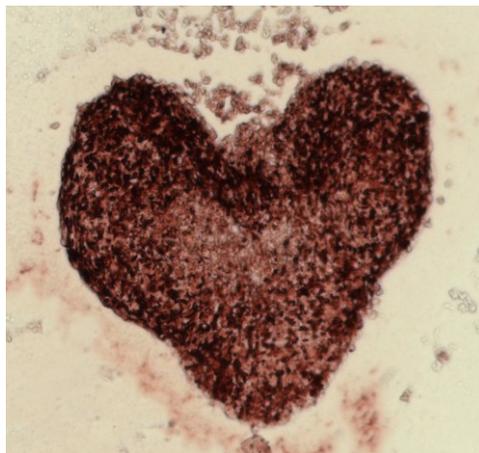
Köln, 14. Februar 2017

Ort, Datum

Maria Gerber

Name/ Unterschrift

In großer Dankbarkeit meinen Eltern und Schwestern gewidmet.



Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>1</i>
I Abbildungsverzeichnis	4
II Tabellenverzeichnis	6
III Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einführung	8
1.1 Knochenersatz	8
1.2 Bone Tissue Engineering	10
1.3 Osteogenese und Osteoblasten	17
1.4 Die organischen Matrixproteine des Knochens	22
1.4.1 Osteonectin	23
1.4.2 Collagen Typ I	24
1.4.3 Osteopontin	26
1.4.4 Osteocalcin	27
1.5 Zielsetzung	28
2 Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.1.1 Zellen	30
2.1.2 Nährmedien	30
2.1.3 Beschichtung der Kulturschale	30
2.1.4 Puffer	31
2.1.5 Lösungen	32
2.1.6 Fixierung	33
2.1.7 Einbettung	33
2.1.8 Färbung	34
2.1.9 Antikörper	34
2.1.10 Reagenzien	35
2.1.11 Geräte	36

2.1.12 Mikroskope und Kameras	37
2.1.13 Laborbedarf	37
2.2 Methoden	40
2.2.1 Gewinnung boviner Osteoblasten	40
2.2.2 Passagieren von Osteoblasten	43
2.2.3 Herstellung der Osteoblasten-Spheres	44
2.2.4 Strukturelle lichtmikroskopische Untersuchungen	45
2.2.4.1 Fixierung	45
2.2.4.2 Einbettung	47
2.2.4.2.1 Voreinbettung	47
2.2.4.2.2 Entwässerung	49
2.2.4.2.3 Einbettung in Paraffin	50
2.2.4.3 Paraffinschnitte für die Lichtmikroskopie	51
2.2.4.4 Färbung der Paraffinschnitte	51
2.2.5 Ultrastrukturelle transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen	55
2.2.5.1 Fixierung	56
2.2.5.2 Einbettung	58
2.2.5.2.1 Voreinbettung	59
2.2.5.2.2 Entwässerung	59
2.2.5.2.3 Einbettung in Lowicryl	60
2.2.5.3 Befilmen der Objektträgernetzchen	62
2.2.5.4 Ultradünnschnitte für die Transmissionselektronenmikroskopie	64
2.2.5.5 Immunogoldmarkierung	67
2.2.5.6 Schnittkontrastierung	69
2.2.6 Ultrastrukturelle rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	70
2.2.7 Statistische Auswertung	70
3 Ergebnisse	72
3.1 Übersicht der Mikromassenkulturen auf Agarose	74
3.2 Übersicht der fixierten Mikromassenkulturen	78
3.2.1 Toluidinblau gefärbte Semidünnschnitte	78
3.2.2 Auswertung der REM-Aufnahmen	80

3.3 Auswertung der lichtmikroskopischen Aufnahmen	82
3.3.1 Osteonectin	83
3.3.2 Collagen Typ I	88
3.3.3 Osteopontin	94
3.3.4 Osteocalcin	99
3.4 Auswertung der TEM-Aufnahmen	101
3.4.1 Osteonectin	101
3.4.2 Collagen Typ I	103
3.4.3 Osteopontin	105
4 Diskussion	108
4.1 Übersicht der Mikromassenkulturen auf Agarose	109
4.2 Übersicht der fixierten Mikromassenkulturen	111
4.3 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen	113
4.3.1 Osteonectin	114
4.3.2 Collagen Typ I	115
4.3.3 Osteopontin	118
4.3.4 Osteocalcin	119
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick	120
5 Zusammenfassung	123
6 Literaturverzeichnis	125
7 Danksagung	142
8 Curriculum vitae	143

I Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Die 3 Säulen des Bone Tissue Engineerings	11
Abb. 2	Geflechtknochen und Lamellenknochen	18
Abb. 3	Collagenfibrillen mit hole zone; Ausbildung apatitischer Biominerale	19
Abb. 4	Knochenumbauzyklus	22
Abb. 5	Fibrilläes Collagen	25
Abb. 6	frisch geschlachtetes Kälberbein	40
Abb. 7	Grobpräparation des Beines; Fell und Huf wurden entfernt	40
Abb. 8	Desinfektion mit 80 % vergälltem Ethanol	41
Abb. 9	Feinpräparation, Entfernen der Sehnen und des Weichgewebes	42
Abb. 10	Feinpräparation, Entfernung der letzten unerwünschten Gewebereste	42
Abb. 11	Ablösen des Periosts vom Knochen	42
Abb. 12	Waschen der Perioststreifen in Earle's Salzen	42
Abb. 13	Zuschneiden der Perioststreifen in $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}$ cm	42
Abb. 14	Perioststücke in Kulturschale	42
Abb. 15	96-Well-Platte	45
Abb. 16	96-Well-Platte mit Agarose-Leibovitz-Gemisch	45
Abb. 17	voreingebettete Proben in einer Gewebereinbettkassette	49
Abb. 18	Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers	52
Abb. 19	Schematische Darstellung der Markierung von Proben mit Antikörpern	53
Abb. 20	Antikörper auf Proben in der Färbebrücke	55
Abb. 21	Wendelförmig gedrehtes Rohr mit Styroporauffangbehälter	58
Abb. 22	Nahaufnahme der Cryo Tubes TM	58
Abb. 23	UV-Polymerisationskammer mit flüssigem Methanol	61
Abb. 24	Auspolymerisierte Probe (Gelkapsel) im Ständer	61
Abb. 25	Schematische Darstellung der Befilmung von Objektträgernetzchen	63
Abb. 26	Mit Grid belegter Parafilm in Petrischale	64
Abb. 27	Leica Ultracut E, Ultramikrotom	64
Abb. 28	Ultracut mit eingespannter Probe und Diamantmesser	66
Abb. 29	Ultradünnschnitte auf der Wasseroberfläche des Messertroges	66
Abb. 30	Ultradünnschnitte auf Grids	66
Abb. 31	Grids in Petrischale als feuchte Kammer	68
Abb. 32	Grids auf Wassertropfen zum Waschen	68
Abb. 33	Schematische Darstellung eines mit Gold gekoppelten sekundären Antikörpers	68
Abb. 34	Petrischale mit einem Tropfen Bleicitrat	69
Abb. 35	Schematische Darstellung der Intervalle der quantitativen Einstufung der Menge der gebildeten Matrixproteine	71

Abb. 36	Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers der Osteoblastensammlungen in Abhängigkeit vom Zeitraum zwischen Aussiedlung und Fixierung. Die Abszisse ist logarithmisch skaliert; die Fehlerbalken zeigen die zweifache Standardabweichung. Die durchgezogene Linie dient lediglich der Augenführung	73
Abb. 37	Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 4facher Vergrößerung von aggregierenden Zellen auf Agarose unmittelbar vor der Fixierung (nicht gefärbt)	74
Abb. 38	Lichtmikroskopische Aufnahme mit 20facher Vergrößerung von, mit Toluidinblau angefärbten, Zellen; Semidünnschnitt	78
Abb. 39	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von mit 2nm Platin besputterten Osteoblasten (mit Dank an Dr. Jörg Neunzehn, TU Dresden)	81
Abb. 40	Lichtmikroskopische Aufnahmen von Mikromassenkulturen, immunhistochemische Färbung für Osteonectin (Monoclonal Antibody to bovine Osteonectin / SPARC, mouse IgG)	83
Abb. 41	Lichtmikroskopische Aufnahmen von Mikromassenkulturen, immunhistochemische Färbung für Collagen Typ I (Rabbit anti bovine Collagen I, Polyclonal IgG)	88
Abb. 42	Lichtmikroskopische Aufnahmen von Mikromassenkulturen, immunhistochemische Färbung für Osteopontin (Rabbit anti human Osteopontin)	94
Abb. 43	Lichtmikroskopische Aufnahmen von Mikromassenkulturen, immunhistochemische Färbung für Osteocalcin (Monoclonal Antibody to bovine Osteocalcin, mouse IgG)	100
Abb. 44	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen einer Mikromassenkultur, Immunogold Labeling für Osteonectin (Monoclonal Antibody to bovine Osteonectin / SPARC, mouse IgG) und Kontrastierung (mit Dank an Dr. Ulrich Plate, UKM)	101
Abb. 45	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen einer Mikromassenkultur, Immunogold-Labeling für Collagen Typ I (Rabbit anti bovine Collagen I, Polyclonal IgG) und Kontrastierung (mit Dank an Dr. Ulrich Plate, UKM)	103
Abb. 46	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen einer Mikromassenkultur, Immunogold-Labeling für Osteopontin (Rabbit anti human Osteopontin, Polyclonal Antibody) und Kontrastierung (mit Dank an Dr. Ulrich Plate, UKM)	105

II Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Mittelwert, Streuung (Standardabweichung) und Bereich (Minimum-Maximum) des Durchmessers der Zellansammlungen in Abhängigkeit vom Fixierzeitpunkt	73
Tab. 2	Quantitative Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen osteoblastärer Zellmikromassen in Übersicht. Ab dem Zeitpunkt 60 Minuten unterscheiden sich die Befunde signifikant vom Ausgangswert ($p < 0,001$)	88
Tab. 3	Quantitative Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen osteoblastärer Zellmikromassen in Übersicht. Ab dem Zeitpunkt 90 Minuten unterscheiden sich die Befunde signifikant vom Ausgangswert ($p < 0,001$; 30 versus 60 Minuten: $p = 0,40$)	93
Tab. 4	Quantitative Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen osteoblastärer Zellmikromassen in Übersicht. Ab dem Zeitpunkt 60 Minuten unterscheiden sich die Befunde signifikant vom Ausgangswert ($p < 0,001$)	99

III Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO	Collagen Typ I
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment constant
FKS	Fetales Kälberserum
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HMDS	Hexamethyldisilazan
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
MM0-f-Medium	Filtriertes Zellkulturmedium für Osteoblasten
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaHCO ₃ x H ₂ O	Natriumhydrogencarbonat
NaN ₃	Natriumazid
OC	Osteocalcin
ON	Osteonectin
OP	Osteopontin
PBS	Phosphat Buffered Saline
REM	Rasterelektronenmikroskop
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TGF-β	Transforming growth factor-β

1 Einführung

1.1 Knochenersatz

Ossäre Defekte mit großem Substanzverlust, bedingt durch Traumata, komplexe Frakturen oder nach Tumorentfernung, stellen die rekonstruktive Chirurgie noch immer vor eine große Herausforderung. Die meist erhebliche ästhetische und auch funktionelle Einschränkung der betroffenen Patienten sollte durch eine schnelle Regeneration der Defekte behoben werden. Gerade bei großen Defekten bietet die Transplantation von Knochengewebe und die Implantation von Knochenersatzmaterial die beste Versorgung. Unter anderem aus diesem Grund ist Knochen, das nach Blut am zweithäufigsten transplantierte Gewebe [Wirth et al., 2004]. Rund 2,2 Millionen Knochentransplantationen werden weltweit auch in der Zahnmedizin zur Rekonstruktion von Knochendefekten durchgeführt [Boyce et al., 1999; Van Heest et al., 1999].

Knochenersatz kann in autologes, allogenes, xenogenes und alloplastisches Material unterteilt werden, wobei jede der Gruppen spezifische Eigenschaften, Vor- und auch Nachteile hat. Bei der Wahl eines Knochenersatzmaterials muss deshalb sorgfältig verglichen werden, um das für den Patienten beste Material zu finden.

Autologes Knochenmaterial stellt bislang den ‚Goldstandard der Defektheilkunde‘ dar [vgl. Epple, 2003; Sándor, 2003; Niedhart et al., 1998; Pretorius et al., 2005]. Es handelt sich um Knochen, welcher dem Empfänger selbst entnommen wird. Häufig wird Knochen in der Nähe des Defektes entnommen, um keine weitere Defekt-/Wundstelle zu schaffen. Bei großen Defekten muss jedoch auf die sehr aufwändige Entnahme von Knochentransplantaten aus dem Beckenkamm zurückgegriffen werden. Gerade kleine und mittlere Defekte werden heute mit autologem Knochenmaterial versorgt, welches gegebenenfalls mit Zytokinen wie z.B. VEGF (Vascular endothelial growth factor) [Gerber et al., 1999; Gerber et al., 2000] oder mit in vitro proliferierten Zellen kombiniert wird. Dieses Material ist der ‚Goldstandard‘, da es ein hohes osteogenes (knochenbildendes) Potential hat. Zudem führt es durch Wachstumsfaktoren zur Stimulation von Zellen (osteoinduktiv) und dient als Leitlinie für das Einwachsen von Zellen aus der Umgebung (osteokonduktiv) [Schmidt-Rohlfing et al., 2009]. Die

Tatsache, dass das Ersatzmaterial aus Eigengewebe besteht, führt zu einem entscheidenden Vorteil: Eine Abstoßungsreaktion durch fremde Antigene ist so gut wie ausgeschlossen, ebenso wie eine Infektion des Empfängers durch einen fremden Spender [Rehbein, 2008]. Das Material muss nicht deproteiniert oder vorbehandelt werden, bevor es transplantiert wird. Limitierende Faktoren für das autologe Knochenmaterial sind die schlechte Lagerfähigkeit, weshalb die Transplantation des Gewebes zügig nach der Entnahme erfolgt [Schwenzer et al., 2000]. Nachteile sind außerdem die meist geringe verfügbare Größe, die Form und die Menge an Material. Ein sekundärer Eingriff, chronische Schmerzen an der Entnahmestelle und lokale Infektionen wirken sich zudem negativ auf dieses Transplantationsverfahren aus [Kurz et al., 1989], ebenso wie eine erhöhte Morbidität (Schweregrad von Gesundheitsbeeinträchtigungen) [Sasso et al., 2005] und Funktionseinschränkung an der Entnahmestelle [Raghoobar et al., 2007; Boonj et al., 2005].

Allogene Transplantate bestehen aus fremdem Knochen von humanen Spendern. Sie bergen ein erhöhtes Infektionsrisiko und können eine Immunreaktion bis hin zur Abstoßungsreaktion hervorrufen. Um dem entgegenzuwirken, muss eine gewissenhafte Spenderselektion im Vorfeld stattfinden. Die Transplantate sollten aufgrund der größeren Sensibilität in Bezug auf das Infektionsrisiko (unter anderem mit HIV, HCV und Prionen) und den dadurch höheren Anforderungen an die Sicherheitsmaßnahmen entsprechend aufbereitet, deproteiniert und sterilisiert werden [Epple, 2003; Stancari et al., 2000]. Durch die Aufbereitung entsteht jedoch ein Verlust der biologischen und mechanischen Eigenschaften, und es ist mit hohen Kosten zu kalkulieren [Friedlaender et al., 1999]. Nachteilig wirkt sich auch die deutlich geringere osteoinduktive und osteogene Wirkung als bei den autologen Transplantaten aus [Petite et al., 2000].

Xenogenes Ersatzmaterial stammt von speziell gezüchteten Nutztieren wie Rindern oder Schweinen. Nutztiere werden wirtschaftlich gebraucht, wodurch xenogener Knochenersatz in großen Mengen zur Verfügung steht. Das Infektions- und Abstoßungsrisiko ist jedoch um einiges höher als bei allogenem Material. Auch hier wurden die Sicherheitsvorschriften aufgrund von Prionenerkrankungen deutlich verschärft. Prionen (Proteinaceous infectious particle) sind Proteine, welche bei BSE (bovine spongiose Encephalopathie, Rinderwahn), Scrapie (Traberkrankheit, bei Schafen) und der

Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD, beim Menschen) nachgewiesen werden können [Hildebrandt et al., 1998]. Besonders nach dem Auftreten einer neuen Form der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (vCJD), welche vom Tier auf den Menschen übertragen werden kann [Haller, 2005] und der Verzehr von Rindfleisch als Übertragungsweg angenommen wurde [Petrides et al., 1998], wuchsen die Vorbehalte der Patienten gegenüber xenogenem Ersatzmaterial. Als problematisch gilt auch die Resistenz der Prionen gegenüber Proteasen, Nukleasen, chemischen Substanzen, Strahlung und hohen Temperaturen, welche andere bekannte Pathogene zerstören [Tatalovic, 2010].

Alloplastischer Knochenersatz ist synthetisches Ersatzmaterial, welches einige der vorher genannten Probleme mindern kann. Keramik, Metalle, Polymere und Komposite sind wichtige Vertreter dieser Materialgruppe. Eine gute Verfügbarkeit, geringes Risiko von Abstoßungs- und Infektionsreaktionen, gute Lagerfähigkeit und eine gute Verträglichkeit zeichnen den alloplastischen Knochenersatz aus [Schieker et al., 2008]. Es kann jedoch sowohl zu unvorhersehbaren Implantatresorptionen, als auch zu Infektionen und zu unbefriedigenden ästhetischen Ergebnissen kommen. Auch bestehen gravierende Unterschiede zwischen den Vertretern dieser Materialgruppe bezüglich der mechanischen Stabilität, der Porosität, der Biokompatibilität bei Gewebekontakt, der möglichen Formgebung im Defekt und der Biodegradierbarkeit [Epple, 2003]. Solche Probleme können jedoch häufig durch die Weiterentwicklung des Materials behoben werden.

Aufgrund der beschriebenen Nachteile autologer und allogener Knochenmaterialien und auch des alloplastischen Materials wird intensiv nach einem idealen Knochenersatzmaterial gesucht. Dieses müsste osteogenes Potential haben, osteoinduktiv und osteokonduktiv sein, sowie biokompatibel und degradierbar. Auch sollte es sich dem Remodeling-Prozess, also dem adaptiven Knochenanbau und -abbau unterwerfen und die Bildung neuen Knochens unterstützen, leicht zu handhaben und kostengünstig sein [Giannoudis et al., 2005].

1.2 Bone Tissue Engineering

Das Tissue Engineering (engl. für Gewebezüchtung bzw. –konstruktion) ist ein Ende der achtziger Jahre erstelltes, interdisziplinäres Forschungskonzept, welches die Prinzipien und Methoden sowohl der Ingenieurwissenschaften als auch der Lebenswis-

senschaften dahingehend vereint, Möglichkeiten zu finden, die Funktion unterschiedlicher Gewebe wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern [Langer et al., 1993]. Ziel des Bone Tissue Engineering ist es, natürliches und funktionales Knochengewebe in vitro zu kultivieren, um damit Defekte im Gewebe in vivo zu ersetzen und die Regeneration von funktionstüchtigem Gewebe zu fördern.

Das Konzept des Tissue Engineering setzt sich aus drei biologischen Säulen der Geweberekonstruktion zusammen (Abb. 1):

- 1) der Beteiligung von Zellen, die das zu regenerierende Gewebe ersetzen sollen,
- 2) der Beteiligung von Zell-Trägermaterialien (Scaffolds (engl. für Gerüst), Matrix)
- 3) der Beteiligung von gewebespezifischen Wachstumsfaktoren, Biomolekülen oder z.B. mechanischen Stimuli.

Bei in vitro kultiviertem Ersatzgewebe kann es keine Komplikationen bei der Entnahme eines Transplantates geben. Zudem ist die theoretisch unbegrenzte Verfügbarkeit ein großer Vorteil gegenüber den autologen Transplantaten (Goldstandard) [vgl. Naujoks et al., 2010].

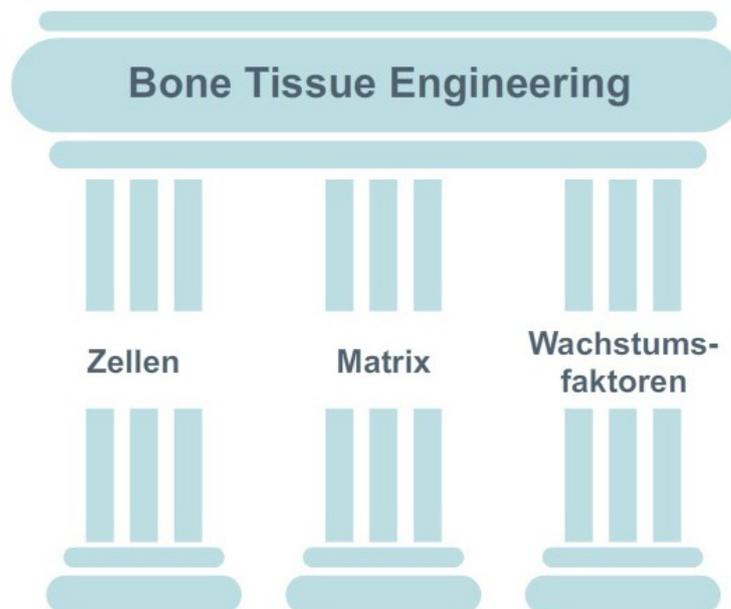


Abb. 1 Die 3 Säulen des Bone Tissue Engineerings

Beim Tissue Engineering können hypothetisch autologe, allogene und xenogene Zellen verwendet werden. Bei autologen Zellen (z.B. Osteoblasten) gibt es weder rechtliche noch ethische Vorbehalte und es kann nicht zu immunologischen Reaktionen kommen (s. Kapitel 1.1). Die Kultivierung von Zellen unterschiedlichsten Ursprungs ist inzwischen ohne Verlust des Differenzierungspotenzials problemlos möglich [Meyer et al., 2005], weshalb eine ausreichende Anzahl an kultivierbaren Zellen zur Geweberegeneration zu Verfügung steht.

Ein großes Problem stellt die Versorgung des benötigten Zellvolumens dar. Für die Bildung von neuem und qualitativ hochwertigem Knochen ist eine ausreichende Vaskularisierung unverzichtbar. Sobald das Gewebe implantiert wurde, ist es auf die Versorgung durch den Organismus angewiesen. Durch Diffusion können Zellen in einer Matrix nur bis zu einem Abstand von 200 μm ausreichend ernährt werden [Goldstein et al., 2001]. Durch diesen Umstand ist die Versorgung mit Nährstoffen in vielen Fällen unzureichend und führt zeitnah zum Absterben der Gewebe [Kneser et al., 1999]. Besonders für die Proliferation und Differenzierung benötigen die Zellen eines Knochenersatzmaterials eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Diese Forderung wird durch die dreidimensionale Form des Materials noch erschwert. Bislang ist die Versorgung der Zellen *in vitro* und die erfolgreiche Implantation *in vivo* ein noch nicht gelöstes Problem.

Jacoby [2009] suchte in ihrer Arbeit nach Möglichkeiten der Kultivierung von Endothelzellen mit osteoblastenähnlichen Zellen in 2- und 3-dimensionalen Kokulturen. Es formierten sich in beiden Kulturen stabile und vitale Zellverbände. Die kugeligen (3-dimensionalen) Kokulturen zeigen durch von Endothelzellen begrenzten Hohlräumen Anzeichen einer beginnender Neovaskularisation.

In der vorliegenden Arbeit werden 3-dimensionale Mikromassenkulturen aus Osteoblasten hergestellt und untersucht. Auf einen Vergleich mit 2-dimensionalen Kulturen wird aufgrund der Ergebnisse verschiedener Studien verzichtet, in welchen dargestellt wird, dass dreidimensionale Zellkulturen eine höhere Proliferationsrate, sowie eine ausgeprägtere zellspezifische Differenzierung haben als zweidimensionale Kulturen [Abbott, 2003; Cukierman et al., 2001; Handschel et al., 2007; Gerber et al., 2001;

Gerber et al., 2002]. Diese Zellproliferation und Differenzierung der in Mikromassen generierten Kulturen zeigen ein gewebeäquivalentes Verhalten zu den Zellen in vivo [Langenbach et al., 2011; Handschel et al., 2007]. Die Zellen der 3D-Kulturen können ihre Form verändern und aufgrund von Zell-Matrix und Zell-Zell-Kontakten, welche die Signalweitergabe und die Auswanderung von Zellen unterstützen, auf eine physiologische Art reagieren [Handschel et al., 2011; Sivaraman et al., 2005; Weaver et al., 1997; Yamada et al., 1997]. Es gilt als bewiesen, dass viele Zellfunktionen auf diesen Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakten beruhen. In dreidimensionalen Kulturen können die Zellen untereinander kommunizieren, frei interagieren und diese entscheidende Wechselbeziehung ‚pflegen‘ [Cukierman et al., 2001; Yamada et al., 1997]. Brickwedde [2007] zeigte Membranverdichtungen benachbarter Osteoblasten in Mikromassenkulturen, welche sie als Kommunikationskontakte zum interzellulären Austausch von Informationen und Stoffen interpretierte, Gap Junction-Funktion [Welsch et al., 1997].

Auch Gerber et al. [2002] untersuchten diese Zusammenhänge. Sie verglichen Mikromassenkulturen und Monolagenkulturen aus osteoblasten-ähnlichen Zellen, welche aus Kalotten von Ratten stammten. Bereits nach einer Woche konnten sie bei den Mikromassenkulturen längliche Zellen erkennen, in deren Cytoplasma raues Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, ummantelte Vesikel und Ribosomen nachzuweisen waren. Zudem lagen zahlreiche Collagenfibrillen in Membranfalten und in der extrazellulären Matrix vor.

Im Gegensatz dazu standen die im Monolayer kultivierten Zellen, bei welchen sich kaum Collagen Typ I nachweisen ließ. Das Cytoplasma der Zellen ähnelte dem der Mikromassenkulturen. Nach 2 sowie 3 Wochen waren die Zellen im Inneren der Mikromassenkultur umgeben von mineralisierender Matrix. Die Zellen wiesen viele Zell-Zell-Kontakte auf, entweder als Schwerpunkte oder als lange Zellmembranbereiche mit sehr enger Anlagerung. Es waren verschiedenartige Gap Junctions zu beobachten. Gerber und ap Gwynn [2002] kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass Mikromassenkulturen, im Vergleich zu Monolagenkulturen, die Differenzierung der osteoblasten-ähnlichen Zellen durch die frühe Förderung der Zell-Zell-Kontakte, die vermehrte Bildung von Collagen und die Verringerung der Proliferation unterstützen. In einer späteren Studie betonen Gerber et al. [2005] wiederholt die schnellere Differenzierung

und Mineralisation von Mikromassenkulturen im Vergleich zu Monolagenkulturen. Die sphärischen Mikromassenkulturen sollen das Zielgewebe imitieren, eine ähnliche Organisation aufweisen, die mechanischen Eigenschaften und physiologischen Rückmeldungen auf Reize geben [Tortelli et al., 2009]. Neunzehn et al. [2013] können diese Differenzierung der Mikromassenkulturen, welche dem Knochengewebe ähnlich ist, ebenfalls nachweisen. Das System der Mikromassenkulturen stellt somit ein geeignetes Kulturmodell dar, um in vivo Prozesse zu imitieren.

Physiologische Mineralablagerungen, z.B. in den Zähnen und im Knochen, finden ohne eine geeignete Matrix nicht statt [Boskey, 1996]. Häufig bietet die Matrix eine Orientierungshilfe für Mineralablagerungen. Sie kann während des Mineralisationsprozesses die Keimbildung und das Wachstum von Apatitkristallen steuern [Daculsi et al., 1999].

In der Literatur beschriebene Methoden zur Herstellung einer Mikromassenkultur werden aus oben genannten Gründen mit einem Trägermaterial/ Trägergerüst ("Scaffold") durchgeführt. Dieses soll den Anforderungen des Tissue Engineering genügen und nicht giftig, nicht immunogen, biokompatibel sowie natürlich abbaubar sein. Gleichzeitig muss das Trägermaterial die charakteristische Form des Knochens imitieren, die Generierung des Knochens und das Zellattachement unterstützen wie auch durch örtliche Zellen abgeändert werden können (remodelling) [Naujoks et al., 2010; Wiesmann et al., 2004] (vgl. Knochenumbauzyklus Abb. 4, S.18).

So wird bei Zhang et al. [2003] eine durch Aufschäumung entstehende schwammartige Matrix verwendet, welche beim Kontakt mit Wasser CO₂ freisetzt. Es bilden sich dadurch Poren in der Matrix, welche die Ernährung der Zellen gewährleisten sollen. Die Poren sind jedoch nicht gleichmäßig verteilt, sodass die Zellen im Inneren der dreidimensionalen Mikromassenkultur nicht ausreichend versorgt werden. Yan et al. [2005] arbeiten mit in einer computergesteuerten, druckkontrollierten Spritze hergestelltem Gelatinezellaggregat. Nach ca. 2 Wochen gibt das Trägermaterial jedoch seine Form auf und bricht in sich zusammen, wodurch die Grundlage einer langfristigen und funktionellen Knochen-Regeneration fehlt. Ein Polysulfonschlauch, wie ihn Tischer et al. [2004] verwendet haben, um eine dreidimensionale Osteoblastenkultur mit

Nährstoffen zu versorgen, führt zu einer Anheftung der Zellen auf der Oberfläche des Polysulfonschlauches. Dieser Aufbau ist abhängig von einem ständigen Durchfluss des Nährmediums, wodurch eine Anwendung in vivo als Transplantat erschwert wird. Cuhlmann [2009] entwickelte eine neue Methode, um ein resorbierbares Copolymer aus Polylactid und Polyglycolid durch thermische Vorbehandlung und anschließende Sinterung als dreidimensional angepasstes Knochenersatzmaterial nach radiologischer Defektanalyse herzustellen. Während der Zellversuche zeigte sich allerdings eine schlechte mechanische Belastbarkeit der Proben nach UV-Bestrahlung und Wasserkontakt.

Die Matrix kann jedoch auch als Inhibitor fungieren, wenn es darum geht, Kalziumphosphat im Körper am falschen Ort abzuscheiden, was zur Entstehung schwerer Erkrankungen führen könnte [Epple et al., 2002]. Mögliche pathologische Kalziumphosphatablagerungen sind unter anderem verantwortlich für Arteriosklerose [Epple, 2001; Sary, 2000], Zahnstein [LeGeros, 1974; Schroeder, 1969], Blasensteine [Achilles, 1995; LeGeros, 1991] oder die Verkalkung künstlicher Herzklappen [Wintermantel et al., 2002].

Mitunter wurden aus diesen Gründen Gewebe ex vivo auf Trägermaterialien wie Collagen oder Fibrinmembranen gezüchtet [Stahl et al., 2005; Fuchs et al., 2006; Sieminski et al., 2005]. Um einer zusätzlichen Infektion und Fremdkörperreaktion durch Trägermaterialien vorzubeugen und eine gewisse Langzeitstabilität zu erreichen, haben Brickwedde [2007] und Jacoby [2009] 3D Kulturen ohne Trägermaterial ex vivo kultiviert und eine deutlich bessere Zelldifferenzierung nachgewiesen.

Brickwedde [2007] gelang es, Osteoblasten erst als Monolayer zu kultivieren, welche sich anschließend ohne Trägermaterial zu dreidimensionalen, reproduzierbaren Mikromassenkulturen zusammenschließen. Dies geschah auf mit Agarose beschichteten Zellkulturschalen, in denen die Osteoblasten bereits nach einer Stunde zu rundlich-ovalen Mikromassenkulturen aggregierten [vgl. Schäfer et al., 2012]. Die Osteoblasten hafteten nicht auf der Agarose und konnten so die dreidimensionalen Zellmikromassen ("Spheres") bilden. Da ebenfalls keine Adhärenz mit den Zellkulturschalen besteht, können häufig beschriebene Veränderungen der Zellmorphologie und des Zellverhaltens

bei Oberflächenkontakt [Rossi et al., 2005] verhindert werden. Es zeigte sich, dass Agarose ein geeignetes Material zur Herstellung von Mikromassenkulturen ohne Trägermaterial darstellt. Die Zellen weisen Charakteristika einer Differenzierung mit hohem Reifegrad auf und synthetisieren eine knochenähnliche, extrazelluläre Matrix, welche Osteocalcin, Osteonectin und neu synthetisiertes Collagen Typ I enthält. Es ist eine klare Collagenstruktur zu erkennen, welche auf ein Potential der Biomineralisation hindeutet.

Wachstumsfaktoren wirken sich ebenfalls auf die Bildung von Knochen aus. Die biophysikalische und biochemische Stimulationen sind bei den Wachstumsfaktoren zu unterscheiden. Dabei können bekannte Tatsachen, z.B. die Atrophie von Knochen bei verminderter Belastung, beim Bone Tissue Engineering eingesetzt werden [Wiesmann et al., 2004]. Studien belegen, dass externe mechanische Belastungen, z.B. zyklische Zugbeanspruchung, eine Modifikation der Zellorientierung und der Genaktivität bewirken [Brown et al., 1998]. Zudem führt eine Kraftübertragung vom Scaffold auf die Osteoblasten zu einer erhöhten Proliferationsrate [Meyer et al., 1999; Neidlinger-Wilke et al., 1994] und zu einer veränderten Expression der Matrixproteine, u.a. Osteocalcin und Osteopontin [Meyer et al., 1999; Hillsley et al., 1994]. Wiesmann et al. [2001] konnten nachweisen, dass eine Langzeitstimulation von Osteoblasten mit piezoelektrischen Potentialen [vgl. Hartig et al., 2000] die Synthese der extrazellulären Matrix erhöht.

Biochemische Stimulationen der osteogenen Differenzierung können durch Zytokine und bioaktive Proteine erreicht werden. Einige der von Osteoblasten selbst exprimierten biologisch aktiven Moleküle haben bereits das Potential, die Knochenregeneration zu fördern [Schliephake, 2002]. Zu diesen gehören u.a. TGF- β (Transformierender Wachstumsfaktor), FGF (Fibroblasten-Wachstumsfaktoren), PDGF (platelet-derived Wachstumsfaktoren), IGF (Insulinähnliche Wachstumsfaktoren) und BMP (Knochenmorphogenetische Proteine). Letztere lassen sich angesichts grundsätzlicher Übereinstimmungen der TGF- β Familie zuordnen. Die Unterformen BMP-2, -4 und -7 zeichnen sich dabei durch eine positive Beeinflussung der Knochenheilung und -bildung aus [Lieberman et al., 1998; Schmitt et al., 1999]. Eine optimale Förderung der Knochenbildung kann somit durch eine Veränderung dieser Wachstumsfaktoren beeinflusst

werden, z.B. durch eine Verbesserung des Bindungsverhaltens der BMP zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix [Kübler et al., 2000].

1.3 Osteogenese und Osteoblasten

Als Knochen wird ein skelettbildendes Stützgewebe beschrieben, welches den Hauptbestandteil des Hartgewebes im menschlichen Körper darstellt. Als sehr differenziertes Gewebe hat Knochen primär folgende Funktionen innerhalb des Körpers [Liebich, 1993; Amling, 2003]:

- Die Knochen bilden das Skelett, wodurch sie für die mechanische Belastbarkeit, die Formgebung und die Mobilität des Körpers verantwortlich sind.
- Sie übernehmen eine bedeutende Schutzfunktion lebenswichtiger Organe und enthalten das Knochenmark als Stätte der Blutbildung.
- Knochen dient dem Körper als Mineraldepot, insbesondere für Kalzium und Phosphat.

Die Knochenbildung kann als mehrstufiger Prozess angesehen werden, in dem zuerst ein Collagen-Template wächst, anschließend kommen nicht-kollagene Proteine hinzu, welche schließlich die Mineralisierung des Kalziumphosphates kontrollieren [Gerstenfeld et al., 1989]. Diesen Prozess bestätigt auch Owen et al. [1990], die ihn in drei Perioden einteilen: die Proliferation der Zellen, die Reifung der extrazellulären Matrix und die Mineralisation. Der Ablauf der Knochenbildung beschreibt einen mehrstufigen Prozess, wobei die Ausbildung apatitischer Keime als Vorstufe der Knochenmineralisierung einen abschließenden Prozess darstellt [Plate et al., 1998].

Histologisch, nach der Art der Anordnung der Collagenfibrillen, unterscheidet man Geflechtknochen und Lamellenknochen [Marcove et al., 1992; Nickel et al., 1992].

Das Stadium des (unreifen) Geflechtknochens wird vor allem bei der anfänglichen Knochenneubildung durchlaufen. Der zellreiche, auch Faserknochen genannte Knochen, besteht aus lose gepackten, unregelmäßig angeordneten Collagenfibrillen ohne besondere Orientierung zu den ernährenden Gefäßen (Abb. 2). Er wird zunehmend durch lamellären Knochen ersetzt und kommt im gesunden, adulten Skelett fast nicht

mehr vor. Im Rahmen der Frakturheilung wird jedoch auch im adulten Skelett der nicht sehr belastungsfähige Geflechtknochen gebildet.

Geflechtknochen

Lamellenknochen

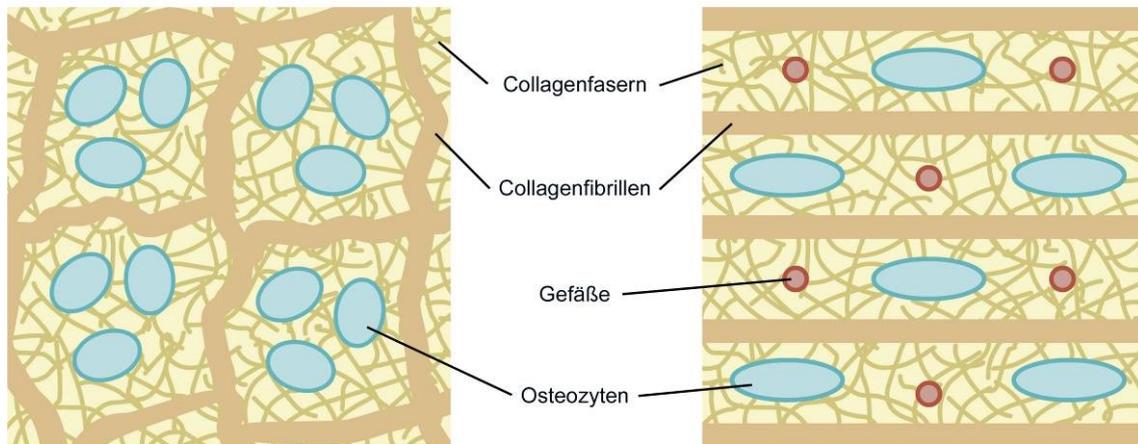


Abb. 2 Geflechtknochen und Lamellenknochen

Lamellenknochen besteht aus helikal verlaufenden, parallel angeordneten Kollagenlamellen und Knochenkanälchen (Abb. 2). Durch eine sekundäre schrittweise Strukturierung formt er sich aus Geflechtknochen. Dieser Parallelisierungsprozess wird durch die biologisch-mechanische Belastung des Knochens initiiert. Aufgrund der Ausrichtung seiner Fasern ist Lamellenknochen deutlich robuster als Geflechtknochen. In der Peripherie ist der Knochen von einer Knochenhaut (Periost) umgeben, an welche sich die Kompakta anschließt. Sie besteht aus spindelförmigen Einheiten und enthält verzweigte Kanälchen (Haversche Kanäle), in denen Blutgefäße, Nerven und lockeres Bindegewebe verlaufen. Versorgt und miteinander verbunden werden die Haversschen Kanäle durch kleine Versorgungskanäle (Volkmann-Kanäle). Die Kortikalis geht in die Spongiosa über, die aus einem Netzwerk feiner Knochenbälkchen besteht, in dessen Maschen sich Knochenmark befindet.

Knochengewebe besteht aus Zellen und Interzellulärsubstanz. Zu den zellulären Elementen des Knochens gehören die Vorläuferzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Die Knochenvorläuferzellen findet man an beiden Knochenoberflächen (innen sowie außen). Sie sind relativ undifferenziert und entwickeln sich zu Osteoblasten. Die Hauptaufgabe der Osteoblasten ist der Knochenaufbau (s. Abb. 4 a/g). Sie

besitzen die Fähigkeit, eine extrazelluläre, mineralisierte Matrix über eine Vorstufe, dem Osteoid (Knochengrundsubstanz aus Collagen, Proteoglykanen und Glykoproteinen), zu bilden. Im Verlauf der Knochenneubildung ändern sich die von den Osteoblasten sezernierten Proteine. Anfangs wird hauptsächlich Osteonectin gebildet, da es eine sehr hohe Affinität zu Calcium und Hydroxylapatit aufweist. Osteocalcin ist ein später Marker, weil es in einer späten Phase der Differenzierung von Osteoblasten sezerniert wird, bei bzw. nach Beginn der Mineralausbildung [Perets et al., 2003; Nor et al., 2001].

Bei der Bildung der extrazellulären Matrix werden intrazellulär Procollagen I Moleküle gebildet und diese durch Exozytose freigesetzt. Nach dieser Ausschleusung erfolgt die Fibrillenbildung unter Eingliederung von elektronenoptisch nachweisbaren ‚hole zones‘ (Lochzonen) [Glimcher, 1968], welche als Mineralisationskeimzonen dienen können (Abb. 3). Unter Einfluss der alkalischen Phosphatase entstehen dann in einer breiteren Mineralisationsfront aus den anorganischen Komponenten Calcium und Phosphat primär punktkettenförmige und sekundär nadelförmige Minerale aus Hydroxylapatit (Abb. 3) [Adler et al., 1992].

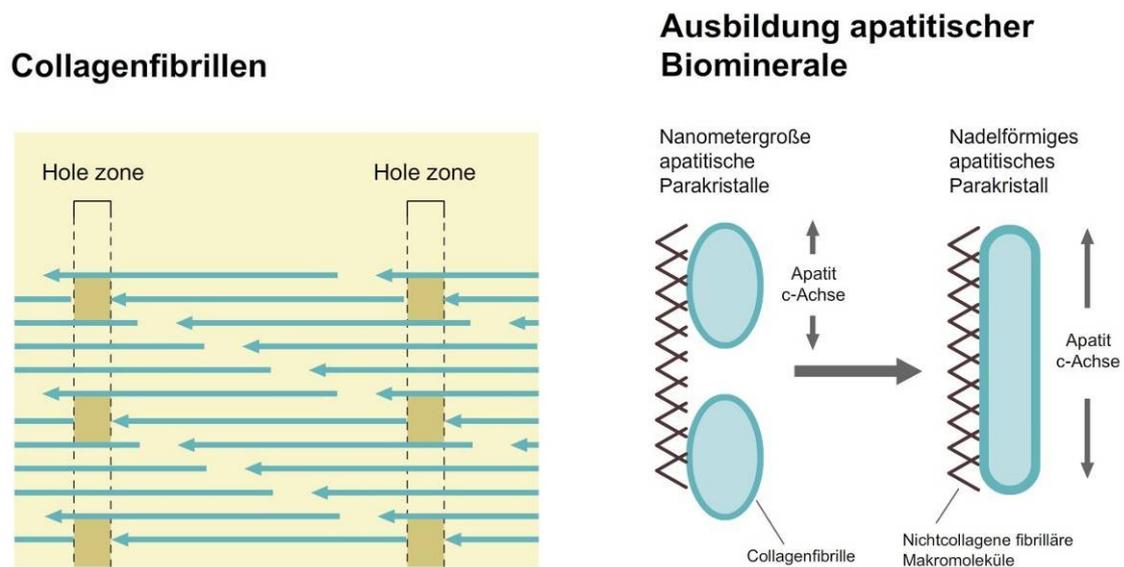


Abb. 3 Collagenfibrillen mit hole zone; Ausbildung apatitischer Biomaterialien

In den letzten Jahrzehnten war der Grundgedanke aufgekommen, dass die primären Kristall-Formationen Plättchen mit einer Dicke im Nanometerbereich sind, welche jedoch eine Breite und Länge von mehreren Nanometern aufweisen [Glimcher, 1992;

Arena et al., 1992]. Eine andere Vermutung beschrieb, dass die primären Kristall-Formationen Nadeln mit einem Durchmesser im Bereich von 2 bis 3nm und einer Länge von mehreren Nanometern sind [Cuisinier et al., 1993; Höhling, 1989]. Für die Kristallbildung in Collagen reichem Hartgewebe und auch im Zahnschmelz wurden hauptsächlich Ketten von nanometergroßen Teilchen gefunden [Plate et al., 1992; Plate et al., 1994; Plate et al., 1996; Arnold et al., 1997], die sich im weiteren Verlauf der Biomineralausbildung zu nadel- und dann gitterartigen Strukturen ausbilden.

Primäre Calcium- und Phosphationen sammeln sich an sich wiederholenden, geladenen funktionellen Stellen entlang der länglichen, wahrscheinlich faserigen Matrixmoleküle. Nach Überschreiten des kritischen Radius für die Keimbildung entwickeln sich Calcium-Phosphat-Keime, welche sich zu Aggregaten und anschließend zu stabilen, nanometergroßen Inseln verbinden. Diese Partikel bilden eine kettenartige Struktur in Längsrichtung (Apatit c-Achse) entlang der Fasermoleküle und bilden nach bevorzugter Mineralisation entlang dieser Längsrichtung nadelförmige, apatitische Minerale aus, in denen die einzelnen Inseln nicht mehr sichtbar sind (Abb. 3). Das Dickenwachstum schreitet fort und sie verschmelzen mit den Nachbarn zu apatitischen gitter-, später band- oder plattenähnlichen Kristallen. Auch für die Mineralisierung in und um die Matrixvesikel wurden diese frühen mineralischen Stränge von nanometergroßen Partikeln beobachtet [Plate et al., 1998].

Die Zusammenstellung der Interzellulärsubstanz des Knochens hängt vom Alter ab und kann durchschnittlich in 20% organische und 70% anorganische Bestandteile unterteilt werden. Die restlichen 10% sind Wasser. Der anorganische Teil des Knochens besteht zum Großteil aus Phosphor und Calcium. Sie kommen hauptsächlich als unlösliche Calciumphosphate u.a. Calciumhydroxylapatit oder Karbonapatit vor [Koolman et al., 2009]. 1-1,5 kg des Körpergewichtes bestehen insgesamt aus Calcium, wovon ca. 99% im Knochen gespeichert werden. In geringen Mengen sind jedoch auch Natrium, Magnesium, Kalium, Carbonat, Fluorid, Chlorid und Pyrophosphat enthalten. 90% der organischen Matrix ist Collagen Typ I [Pollard et al., 2002; Löffler, 2008]. In nicht mineralisierter Knochenmatrix (Osteoid) sind die Collagenfibrillen erst einmal ungeordnet [Liebich, 1993], und verbünden sich im Verlauf der Knochenreifung zu Lamellen. Die verbleibenden 10% der organischen Matrix sind ca. 200 nicht-kollagene

Proteine [Epple, 2003] unter anderem Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin, Bone Sialoprotein, Fibronectin und andere Proteoglykane und Glykosaminglykane.

Das Zusammenspiel von organischer Matrix und anorganischen Mineralien verleiht den Knochen ihre besonderen mechanischen Eigenschaften: Das Collagen ist für die Biege- und Zugbelastung (Elastizität) mitverantwortlich, während das Calciumphosphat die Härte beeinflusst.

Zusammenfassend sezernieren die Osteoblasten nicht mineralisiertes Osteoid und sind an der Knochenreifung beteiligt [Amling, 2003]. Im weiteren Verlauf der Osteogenese werden die Osteoblasten von mineralisierter Knochenmatrix eingeschlossen, es gehen Osteozyten aus ihnen hervor. Diese in den Höhlen (Lakunen) liegenden Zellen stehen über dendritische Fortsätze miteinander in Verbindung und können dadurch auch mit den endostalen Knochenbelegzellen (lining cells), den mesenchymalen Stammzellen und den Endothelzellen kommunizieren. Durch diese Verbindung können die lokalen Anpassungsvorgänge (Knochenwachstum, Knochenaufbau ("Modeling"), Knochenumbau ("Remodeling")) innerhalb des Knochens (s. Abb. 4) mit den externen Signalen abgestimmt werden [Burr et al., 2002].

Für die Knochenresorption sind mehrkernige, bewegliche Riesenzellen (Osteoklasten) zuständig, welche aus dem Zusammenschluss mononukleärer Vorläuferzellen des Knochenmarks hervorgehen (s. Abb. 4d). Sie resorbieren sowohl die mineralischen als auch die organischen Anteile der Knochenmatrix [Nöbel, 2007; Amling et al., 1998].

Knochenumbauzyklus

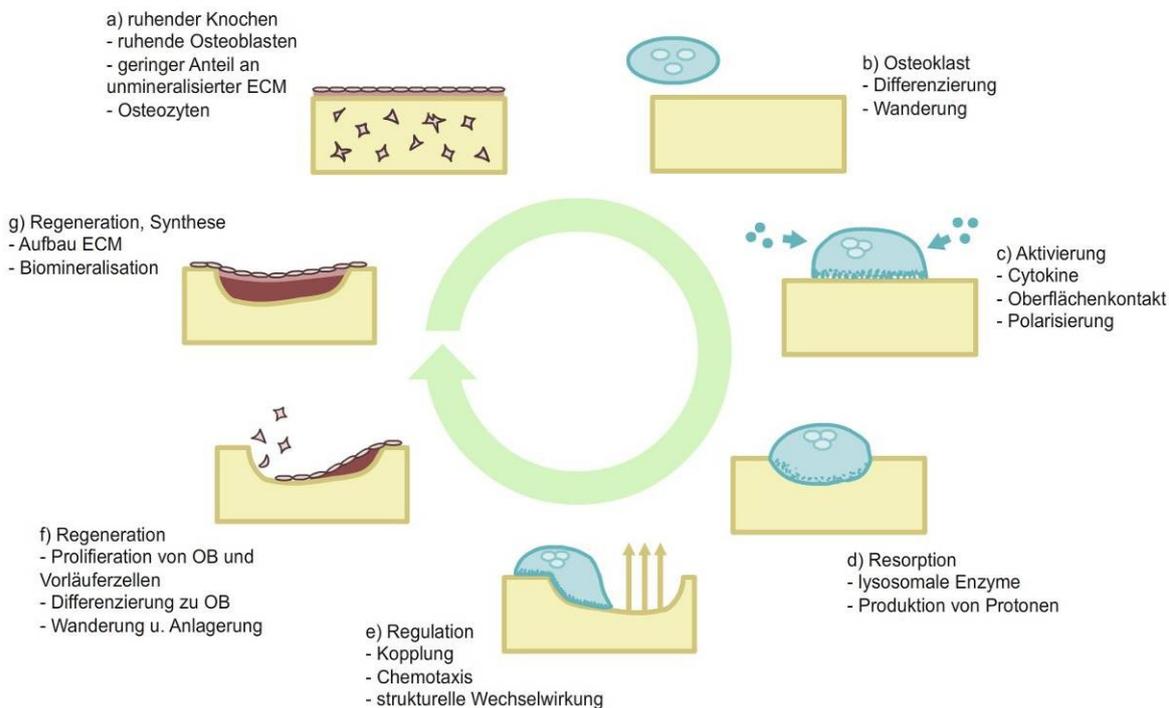


Abb. 4 Knochenumbauzyklus

1.4 Die organischen Matrixproteine des Knochens

Wie bereits erwähnt, besteht die organische Matrix des Knochens zu 90% aus Collagen Typ I. Weitere Matrixproteine sind u.a. Collagen Typ V, welches der Regulation der Collagen Typ I Fibrillenbildung dient, ebenso wie die Proteoglykane (u.a. Decorin, Osteoadherin und Biglycan). Letztere inhibieren die Mineralisation und sind für die Matrixhaftung wichtig. Für die Zelladhäsion verantwortlich ist vermutlich Fibronectin. Metalloproteinasen sind für den allgemeinen Matrixabbau zuständig. Das Bone Sialoprotein ist ein eher später Marker [Gehorn et al., 1992]. Durch die Vermittlung der Zellhaftung an Hydroxylapatit und dessen Kristallbildung ist es ein wichtiger Bestandteil der Matrix. Spezifische Knochenmarker und ebenfalls Matrixproteine sind Osteocalcin, welches die Mineralisation regelt, Osteonectin, welches die Zellmigration fördert und Osteopontin, welches die Zelladhäsion erleichtert [Benninghoff et al., 2003].

In der vorliegenden Arbeit wird genauer auf die Matrixproteine Osteonectin, Collagen Typ I, Osteopontin und Osteocalcin eingegangen.

1.4.1 Osteonectin

Osteonectin (ON), auch bekannt als secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), macht 2% der organischen Knochenmatrix aus [Pollard et al., 2002]. Es wurde vor über 25 Jahren als eines der ersten nicht-kollagenen Matrixproteine entdeckt [Termine et al., 1981]. Man nahm an, dass ON knochenspezifische Funktionen aufweist [Young, 2003] sowie ein knochenspezifischer Nukleator für die Mineralisation zu sein scheint [Termine et al., 1981]. Das Glykoprotein kann sowohl an Hydroxylapatit als auch an Collagene vom Typ I [Termine et al., 1981], Typ II und III [Sage et al., 1989], Typ IV [Mayer et al., 1991] sowie Typ V [Sage et al., 1989] binden, weshalb es auch als ‚bone connector‘ bezeichnet wird. Durch diese Eigenschaft trägt das Protein zur Verknüpfung von organischen und anorganischen Bestandteilen der Knochenmatrix bei [Helmberg, 2009]. Bei in vitro Studien über die Produktion der extrazellulären Matrix kann Osteonectin sowohl intra- als auch extrazellulär nachgewiesen werden [El-Amin et al., 2002].

Strukturell ist Osteonectin ein saures, cysteinreiches Glykoprotein, welches aus einer einzelnen Polypeptidkette besteht. Diese lässt sich in 4 Domänen unterteilen: eine Ca^{2+} bindende Domäne nahe der sauren Regionen, eine cysteinreiche Domäne, eine hydrophile Domäne und eine Domäne mit EF-Hand Motiv (spezifisches Aminosäuremotiv in Proteinen, welches Ca^{2+} bindet) [Villarreal et al., 1989; Ayad et al., 1998]. Zu dem kommen zwei Kalziumbindungsstellen.

Wie bereits erwähnt, wird ON die Eigenschaft der Förderung der Knochenmineralisation zugesprochen [Pollard et al., 2002]. In anderen Studien wird jedoch festgestellt, dass es auch als effektiver Inhibitor von Mineralablagerungen wirken kann [Romberg et al., 1986]. Diese doppelte Rolle zeichnet ON als bedeutenden Teil der Knochenmatrix aus. In Bereichen der initialen Kristallformation kann das Protein nicht nachgewiesen werden, wohl aber in der vollständig mineralisierten Knochenmatrix [Roach, 1994], was die beeinflussende Funktion von Größe und Geschwindigkeit der Mineralformation unterstützt [Sodek et al., 2002]. ON wurde unter anderem in Osteoblasten gefunden,

allerdings nur in Phasen von schnellem Wachstum und Proliferation. Dies zeigt eine Relation zwischen dem Vorhandensein von ON in Osteoblasten und deren Proliferationspotential [Termine, 1990]. Die für Osteoblasten charakteristischen nicht-kollagenen Matrixproteine, zu denen neben Osteonectin auch Osteocalcin und Osteopontin zählen, werden zudem in 3-dimensionalen Multilayersystemen auf einem höheren Level exprimiert als in Monolayer-Kulturen [Lynch et al., 1995].

1.4.2 Collagen Typ I

Collagen Typ I (CO) macht den Großteil der Strukturproteine der organischen Knochenmatrix mit 90% aus [Ayad et al., 1998; Cowles et al., 1998]. Durch diesen großen Anteil der organischen Komponente hat CO eine entscheidende Rolle in der Struktur und Funktion des Knochengewebes [Young, 2003].

Collagen Typ I zählt zu den fibrillären Collagenen [Pihlajaniemi et al., 1995; van der Rest et al., 1991]. Es besteht aus ca. 1000 Aminosäuren, wobei an jeder dritten Position ein Glycinrest vorliegt. Ins Innere der Tripelhelix weist die Seitenkette der kleinsten Aminosäure (Glycin), wodurch die engen helikalen Windungen der Moleküle möglich werden. Diese Struktur ist entscheidend für die enorme Zugfestigkeit des Collagens. Neben Glycin kommen Hydroxyprolin und Prolin am häufigsten vor (Abb. 5, Primärstruktur). Die Seitenketten dieser Aminosäuren zeigen nach außen, wodurch sie seitliche Interaktionen ermöglichen und zur Stabilisierung der Tripelhelix beitragen. CO setzt sich aus 3 Polypeptidketten (Protocollagen) zusammen (Abb. 5, Sekundärstruktur). Zwei dieser Untereinheiten sind identisch, die dritte Kette unterscheidet sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung spezifisch von den anderen [Kivirikko, 1993]. Nach der Translation folgen Modifikationsschritte an der Polypeptidkette, welche nur vor Bildung der Tripelhelix ablaufen können. Zum einen erfolgt die Hydroxylierung bestimmter Prolinreste, welche wichtig für die Bildung einer stabilen Tripelhelix ist [Kielty et al., 1993]. Zum anderen werden Lysinreste ebenfalls hydroxyliert. Die entstehenden Hydroxylysinreste werden wiederum glykosyliert oder es erfolgt die enzymatische Anheftung von Galaktosylresten, wodurch die extrazelluläre Entstehung von intra- und intermolekularen Quervernetzungen ermöglicht wird. Im Anschluss bilden sich Schwefelbrücken (Disulfidbrücken) zwischen den Propeptiden

aus, es kommt zur Ausbildung der Tripelhelix und zur Exozytose in den extrazellulären Raum. Dort erfolgt die Abspaltung der N- und C-Propeptide, wodurch das fertige Collagenmolekül entsteht (Abb. 5, Tertiärstruktur). Durch einen entropiegetriebenen, nicht enzymatischen Prozess folgt die spontane Aggregation zu Collagenfibrillen (self-assemble-system) (Abb. 5, Quartärstruktur). Mithilfe katalytischer Wirkung bilden sich Quervernetzungen aus, welche die Fibrillen intra- und intermolekular stabilisieren [Ayad et al., 1998].

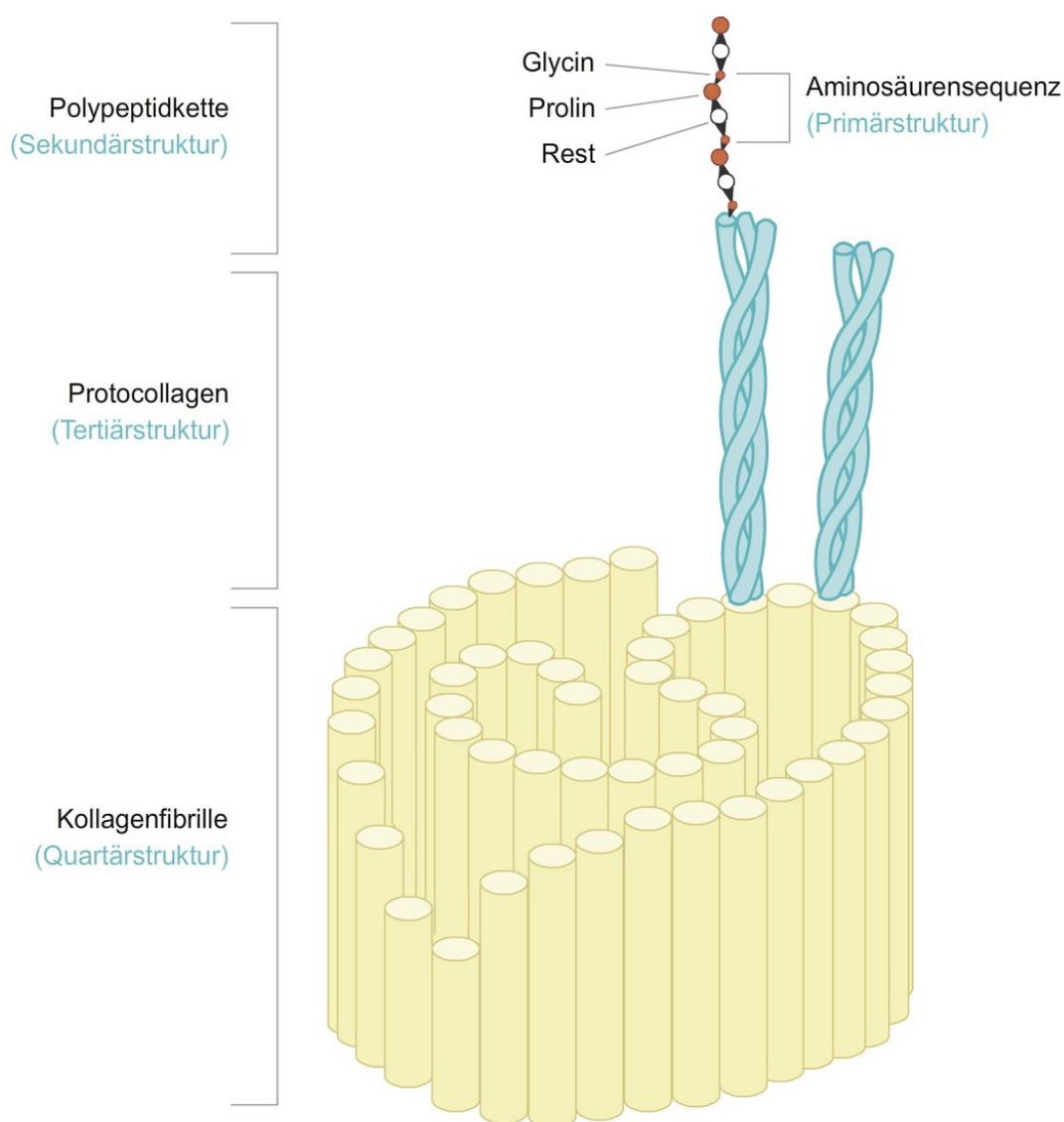


Abb. 5 Fibrilläres Collagen

Gewöhnlich kann eine typische Abfolge der Knochenbildung dargestellt werden. Primär erfolgt die Biosynthese und die extrazelluläre Anordnung des Netzwerkes aus faserarti-

gem Collagen Typ I, woran sich sekundär die Mineralisation anschließt [Owen et al., 1990]. Dabei wachsen die biologischen Apatitkristalle parallel entlang der Längsachse der Collagenfasern [Epple et al., 2002; Wiesmann et al., 2003]. CO war das erste Matrixprotein, welchem man die Fähigkeit zusprach, Mineralablagerungen zu unterstützen [Mergenhausen et al., 1960]. Diese Annahme wurde jedoch durch spätere Studien eingeschränkt, da sich herausstellte, dass Collagen ohne das Vorhandensein anderer assoziierter Matrixmoleküle seine Fähigkeit, Apatitablagerungen zu initiieren, verliert [Termine et al., 1981]. Es agiert demzufolge als orientierende Matrix für Mineralablagerungen, an der andere Nukleatoren binden können [Gehron et al., 1992], während die nicht-kollagenen Matrixproteine die Mineralisation initiieren. Aufgrund der heutigen Annahme, dass Collagenfibrillen als strukturelles Template der Mineralisation dienen [Boskey AL, 1996; Landis et al., 1996], ist es wichtig, dass die Genese der Fibrillen vor der Präzipitation des Kalziumphosphates (Mineralablagerung) zum Großteil abgeschlossen ist. Das Produkt dieses Mineralisationsprozesses ist ein Netzwerk aus Collagenfibrillen, auf welchen sich parallel biologische Kalziumphosphatkristalle mit einer Größe von ca. 100nm ablagern [Bradt, 1998; Epple et al., 2002].

1.4.3 Osteopontin

Osteopontin (OP), auch bekannt als bone sialoprotein I (BSP-1 oder BNSP), macht nur einen geringen Anteil (<1%) der extrazellulären, organischen, nicht-kollagenen Knochenmatrix aus [Pollard et al., 2002]. Das kleine, saure SIBLING Protein (small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein) wurde 1986 zuerst in Osteoblasten entdeckt und kommt sowohl im Knochen (von Osteoblasten sezerniert) als auch in den Zähnen (von Odontoblasten sezerniert) vor. Schon der Name dieses Proteins beschreibt den Entstehungsort sowie seine Funktion (Osteo – Knochen, pontin – pons – Brücke). Das Strukturprotein bindet an Hydroxylapatit. Studien zeigen, dass diese Proteine eine Schlüsselrolle in der Mineralisation dieser Gewebe spielen [Qin et al., 2004].

Das humane OP setzt sich aus ca. 300 Aminosäuren zusammen, an welche ca. 30 Kohlenhydratreste gebunden sind. Während der posttranslationalen Modifikation im Golgi-Apparat werden zudem 10 Sialinsäurereste gebunden. Das Protein ist reich an sauren Resten mit ca. 35% Asparagin- oder Glutaminsäure [Mazzali et al., 2002].

Osteopontin ist ein wichtiger Faktor bei der Knochengeweberemodellierung (bone remodeling) [Choi et al., 2008]. Es wird angenommen, dass das Protein eine wichtige Rolle bei der Verankerung der Osteoklasten an der mineralischen Matrix von Knochen spielt bzw. diese vermittelt [Reinholt et al., 1990]. OP scheint den Prozess zu initiieren, bei welchem am zentralen Bereich der Osteoklasten (mit Bürstensaum deshalb auch ruffled borders genannt) die Knochenresorption beginnt.

1.4.4 Osteocalcin

Osteocalcin (OC), auch bekannt als BGP (bone β -carboxylglutamic acid-containing protein), macht 2% der extrazellulären, organischen, nicht-kollagenen Knochenmatrix aus [Pollard et al., 2002]. Das kleine, negativ geladene Protein wurde 1975 entdeckt und kommt sowohl im Knochen (von Osteoblasten sezerniert) als auch in den Zähnen (von Odontoblasten sezerniert) vor. Es bindet Hydroxylapatit und Ca^{2+} , ist ein Marker für den Knochenaufbau und fördert die Mineralisation des Knochens.

Das humane Osteocalcin setzt sich aus 49 Aminosäuren zusammen. Es enthält Glutaminsäurereste, welche mithilfe von Vitamin K und Glutamylcarboxylase carboxyliert werden [Hauschka et al., 1982; Hauschka et al., 1989]. Ohne die Carboxylierung kann Osteocalcin im Knochen nicht aktiv Kalzium binden. Nach dieser katalytischen Reaktion sind nun zwei COO^- -Gruppen im Molekül enthalten, welche durch ihre benachbarte negative Ladung einen idealen Anlagerungsplatz für das Ca^{2+} bieten. Dieses wird so lokal im Knochen konzentriert und bildet in Form von biologischem Apatit weitere Kristallisationskeime für Kalzium- und Phosphatmoleküle [Helmberg, 2009, Hoang et al., 2003; Hauschka et al., 1982a]. Mit dieser Eigenschaft verhindert OC die Präzipitation des schwer löslichen Kalziumphosphats an unerwünschten Stellen im Körper.

Experimente an Mäusen zeigen, dass es bei Mangel an Osteocalcin, zu einer abnorm erhöhten Knochenmineralisation und Zunahme der Knochensubstanz kommt, wobei die Bruchfestigkeit stark vermindert ist. Dies sind alle Merkmale der Osteoporose. Die Studie zeigt die beeinflussende Funktion von Osteocalcin bezüglich der Geschwindigkeit der Mineralisation und der späteren Funktionalität des Knochens.

1.5 Zielsetzung

In unserer Arbeitsgruppe ‚Tissue Engineering und Biomineralisation des Universitätsklinikum Münster‘ wurde in den letzten Jahren viel mit Mikromassenkulturen, unter anderem auch aus Osteoblasten, experimentiert. Grundsätzlich geht es um die Entwicklung von autologem Knochenersatzmaterial sowie die Entstehung einer knochenähnlichen definierten Matrix, durch welche apatitische Biominerale erzeugt werden können. Diese sollen als Implantatbeschichtung ("Implantat-Coating") eingesetzt werden. Das Ersatzmaterial sollte ein hohes osteogenes, induktives und konduktives Potential haben. Versucht wird, die negativen Eigenschaften des herkömmlichen Materials unter anderem die schlechte Lagerfähigkeit, die geringe verfügbare Größe, die Form und die Menge an Material zu minimieren, um ein praktikables Ersatzmaterial für Knochendefekte zu erhalten. Für eine mögliche klinische Implantation der Mikromassenkulturen wäre es wünschenswert, vitale Konstrukte als Gewebeersatz mit knochenspezifischen Markern und einer mineralisationsfähigen Matrix zur Knochenregeneration ausbilden zu können.

Bei jedem größeren Ziel, besonders wenn es wie in diesem Fall langfristig in den klinischen Alltag integriert werden soll, ist es unvermeidlich, sich der Grundlagenforschung zu widmen. Die zugrundeliegenden Mechanismen müssen bekannt sein. Denn ohne ein grundlegendes Verständnis auch des biochemischen Prozesses innerhalb der Mikromassenkultur ist es nicht möglich, ein therapeutisch wirksames Knochenersatzmaterial zu entwickeln.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die immunhistochemische Untersuchung der Bildung und Reifung osteoblastärer Mikromassenkulturen ("Spheres"). Durch die Erkenntnisse aus dieser Arbeit sollen die weiterführenden Forschungen hin zu einem Knochenersatzmaterial unterstützt und gefördert werden. Denn nur wenn man weiß, wie sich die Zellen einer Mikromassenkultur biochemisch verhalten und zu welchem Zeitpunkt sie anfangen, Matrixproteine evtl. definiert gesteuert zu exprimieren, kann die Bildung der Spheres positiv beeinflusst werden. Besonders die Matrixproteine Osteonectin, Collagen Typ I, Osteocalcin und Osteopontin sollen untersucht werden, da sie in ausgeprägter Weise wichtig für die Mineralisation von Knochengewebe sind.

Die Beobachtung des Zellverhaltens wird während der gesamten Kulturdauer mit Hilfe von strukturellen, lichtmikroskopischen und in außerordentlichen Fällen ultrastrukturellen, elektronenmikroskopischen Untersuchungen (TEM, REM) durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Materialien verwendet:

2.1.1 Zellen

primäre Osteoblasten aus dem Periostgewebe vom Metacarpus frisch geschlachteter Kälber (12 Metacarpi, 12 Kälber) (Westfleisch-Vieh- und Fleischzentrale Hamm, DE)

2.1.2 Nährmedien

- MM0-f-Medium
 - 500 ml High Growth Enhancement Medium (High GEM) (Molecular Probes, Leiden, NL)
 - 60 ml Fetales Kälberserum 690 (FKS) (Biochrom AG seromed[®], Berlin, DE)
 - 5 ml Glutamin (Biochrom AG seromed[®], Berlin, DE)
 - 5 ml Amphotericin B (Biochrom AG seromed[®], Berlin, DE)
 - 5 ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG seromed[®], Berlin, DE)

- Leibovitz-Medium
 - 50 ml Leibovitz (BRL Life Technologies, Karlsruhe, DE)
 - 5 ml FKS 690 (Biochrom AG seromed[®], Berlin, DE)
 - 500 µl Amphotericin (Biochrom AG seromed[®], Berlin, DE)
 - 500 µl Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG seromed[®], Berlin, DE)
 - 560 µl Hapes (Gibco, BRL Life Technologies, Karlsruhe, DE)

2.1.3 Beschichtung der Kulturschale

- Agarose mit Leibovitz
 - 1 g Agarosepulver (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE)
 - 50 ml Leibovitz (Gibco, BRL Life Technologies, Karlsruhe, DE)

2.1.4 Puffer

- PBS steril, pH 7,4, ohne Ca^{2+} u. Mg^{2+}
 - 4 g Natriumchlorid (NaCl) (Merck, Darmstadt, DE)
 - 0,1 g Kaliumchlorid (KCl) (Merck, Darmstadt, DE)
 - 0,72 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, DE)
 - 0,1 g KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, DE)
 - ad 500 ml Aqua bidestillata (Aqua bidest.)

- PBS-BSA Puffer
 - 1,48 g Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, DE)
 - 0,43 g KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, DE)
 - 7,20 g NaCl [ad 1000 ml Aqua bidest., pH 7,4] (Merck, Darmstadt, DE)
 - 1,30 g NaN_3 (Merck, Darmstadt, DE)
 - 1,00 g BSA (Sigma Aldrich, Steinheim, DE)

- Tris-BSA Puffer
 - 20 M Trisaminomethan (Merck, Darmstadt, DE)
 - 0,9% NaCl (Braun Melsungen AG, Melsungen, DE)
 - auf ca. 30-50 ml eine Spatelspitze BSA frisch dazugeben

- PBS-Puffer mit 0,02 % Tween 20
 - 100 ml PBS – Stammlösung 10x (Hausapotheke UKM, DE)
 - 900 ml Aqua bidest. (Hausapotheke UKM, DE)
 - 200 μl Tween 20 (Promega Corporation, Matison, US)

- PBS-Stammlösung 10x
 - 80 g NaCl (Merck, Darmstadt, DE)
 - 14,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, DE)
 - 2,0 g KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, DE)
 - 2,0 g KCL (Merck, Darmstadt, DE)
 - ad 1000 ml Aqua bidest.

- Stammlösung I
 - 27,58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, DE)
 - ad 1000 ml Aqua bidest.

- Stammlösung II
 - 28,38 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, DE)
 - ad 1000 ml Aqua bidest.

- 0,2 M PBS
 - 19 ml Stammlösung I
 - 81 ml Stammlösung II

- 0,1 M PBS
 - 0,2 M PBS
 - Aqua bidest. 1:1

- 5% BSA in PBS-BSA-Puffer
 - 1,25 g BSA (Sigma Aldrich, Steinheim, DE)
 - 25 ml PBS-BSA-Puffer

2.1.5 Lösungen

- Earle's Salzkonzentrat
 - 6,80 g NaCl (Merck, Darmstadt, DE)
 - 0,14 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, DE)
 - 0,20 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, DE)
 - 0,20 g CaCl_2 (Merck, Darmstadt, DE) (mit H_2O 0,26 g)
 - 1 g Glucose (Merck, Darmstadt, DE)
 - 2,20 g $\text{NaHCO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, DE)
 - 10,00 mg Phenolrot (Riedel de Haen, Darmstadt, DE)

- Earle's Salzlösung I
 - 450 ml Aqua dest. autoklaviert (Hausapotheke UKM, DE)
 - 50 ml Earle's Salzkonzentrat (Merck, Darmstadt, DE)
 - 3 ml 7,5%iges NaHCO_3 (Merck, Darmstadt, DE)

- Earle's Salzlösung II
 - 200 ml Earle's Salzkonzentrat (Merck, Darmstadt, DE)
 - 2 ml Amphotericin (Biochrom AG seromed[®], Berlin, DE)
 - 2 ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG seromed[®], Berlin, DE)

- Lowicryl K4M-Harz
 - 2,70 g Crosslinker A (Polysciences Inc., Warrington, US)
 - 17,30 g Monomer B (Polysciences Inc., Warrington, US)
 - 0,10 g Initiator (Polysciences Inc., Warrington, US)
- Casy Zählgerät
 - Casyton (Schärfe System GmbH, Reutlingen, DE)
 - Casyclean (Schärfe System GmbH, Reutlingen, DE)
- Desinfektionsmittel
 - Antifect[®] N liquid (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, DE)
 - Cutasept G, Ethanol, 80%ig, vergällt, gefärbt, filtriert (Bode Chemie, Hamburg, DE)

2.1.6 Fixierung

- 4% Formalin
 - 75 ml 37% Formaldehyd (Fisher Chemicals, Loughborough, GB)
 - 75 ml PBS 0,2 M (Hausapotheke UKM, DE)
 - 75 ml PBS 0,1 M (Hausapotheke UKM, DE)
- chemische Fixierung
 - 25% Glutaraldehyd (Sigma Aldrich, Steinheim, DE)
 - 37% Formaldehyd (Fisher Chemicals, Loughborough GB)
- Kryofixierung
 - Flüssigstickstoff (Westfalen AG, Münster, DE)
 - Propangas (Westfalen AG, Münster, DE)
 - Methanol (Merck, Darmstadt, DE)

2.1.7 Einbettung

- Agar
 - 1 g Agar granulated (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, US)
 - 25 ml Aqua destillata (Aqua dest.) (Apotheke, UKM, DE)
- Alkohol 30%:
 - → 660 ml Aqua bidest. + 300 ml 96% Ethanol
- Alkohol 50%:
 - → 460 ml Aqua bidest. + 500 ml 96% Ethanol
- Alkohol 70%:
 - → 260 ml Aqua bidest. + 700 ml 96% Ethanol

- Alkohol 90%: • → 60 ml Aqua bidest.+ 900 ml 96% Ethanol
- Ethanol 96% (AppliChem GmbH, Darmstadt, DE)
- Isopropanol 100% (AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, DE)
- Isopropylalkohol (Hedinger, Stuttgart, DE)
- Hexamethyldisilazan (HMDS) (Merck, Darmstadt, DE)
- Aceton (Burdick&Jackson Honeywell Chemicals Seelze GmbH, Seelze, DE)
- HistoGel™ 10 ml (Microm International GmbH, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE)
- Zedernholzöl (Merck, Darmstadt, DE)
- Paraplast Plus, Tissue Embedding Medium (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE)

2.1.8 Färbung

- 2% Uranylacetat • 0,2 g Uranylacetat (Agar scientific, Stansted, GB)
- 10 ml Aqua bidest. (Hausapotheke UKM, DE)
- Bleicitrat nach Reynolds • 1,33 g Bleinitrat ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) (Merck, Darmstadt, DE)
- 1,76 g Natriumcitrat ($\text{Na}_3[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7] \times 2 \text{H}_2\text{O}$) (Merck, Darmstadt, DE)
- 30 ml Aqua bidest. (für 30 Minuten schütteln)
- 8 ml Zugabe von 1 M NaOH, Lösung mischen
- ad 50 ml Aqua bidest.
- Toluidinblau • 1 g Toluidinblaupulver (Chroma Gesellschaft, Münster, DE) in 100 ml Aqua bidest.
- 1 g Boraxpulver in 1%ige Boraxlösung

2.1.9 Antikörper

- 1. Antikörper • Monoclonal Antibody to bovine Osteocalcin, mouse IgG (TaKaRa BIO Inc., Otsu, JP)

- Monoclonal Antibody to bovine Osteonectin / SPARC, mouse IgG (TaKaRa BIO Inc., Otsu, JP)
 - Rabbit anti bovine Collagen I, Polyclonal IgG (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, DE)
 - Rabbit anti human Osteopontin, Polyclonal Antibody (Chemicon international, Billerica, US)
- 2. Antikörper
 - Goat anti Rabbit 20 nm IgG (Plano GmbH, Wetzlar, DE)
 - Goat anti Mouse 20 nm IgG + IgM (Plano GmbH, Wetzlar, DE)
- 2. Antikörper
 - Envision + System – HRP, Labelled Polymer, Anti-mouse (Dako Denmark A/S, Glostrup, DK)
 - Envision + System – HRP, Labelled Polymer, Anti-rabbit (Dako Denmark A/S, Glostrup, DK)

2.1.10 Reagenzien

- Argon 4.9 (Westfalen AG, Münster, DE)
- Accutase (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, DE)
- 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) + High Sensitivity Substrat Chromogen (Dako Denmark A/S, Glostrup, DK)
- Aqua bidest. (Hausapotheke UKM, DE)
- Chloroform (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, DE)
- Formvar (Plano GmbH, Wetzlar, DE)
- Glycergel Mounting Medium (Dako, Denmark A/S, Glostrup, Denmark)
- NaCl, steril, 0,9%ig (Braun Melsungen AG, Melsungen, DE)
- Natriumhydroxid-Plättchen (Merck, Darmstadt, DE)
- The Blocking Solution (Candor Bioscience GmbH, Wangen, DE)
- Xylol (Isomere) (Rotipuran® ≥ 99,8%, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, DE)
- 3% H₂O₂
 - 1 ml Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30% (Merck, Darmstadt, DE)
 - 9 ml Methanol (Merck, Darmstadt, DE)

2.1.11 Geräte

- Balzers Sputtering-Device-Anlage Typ 07 120B – Standard (OC Oerlikon Balzers AG, Balzers, LI)
- Computer-Counter-System Casy[®]1 Modell TT (Schärfe System GmbH, Reutlingen, DE)
- Ultraschallbad Sonorex RK102H (Bandelin Electronic GmbH & Co.KG, Berlin, DE)
- Dampfdruckautoklav, SanoClav (Hermann Wolf GmbH&Co.KG, Wuppertal, DE)
- Edwards E 306 Vakuumanlage mit Kühltisch und Peltierelemente (Hind High Vacuum Private Limited (HHV), Crawley, GB)
- Färbebrücke (Eigenbau MKG-Labor des UKM, DE)
- Färbekasten mit Falzdeckel (ASSISTENT[®], Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, DE)
- Gefrierschrank (Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach a. d. Riss, DE)
- Haake - Kryostat P2-CT-80L (PSL Systemtechnik GmbH, Clausthal-Zellerfeld, DE)
- Heizplatte Omnilab OT900 (Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co.KG, Bremen DE)
- Inkubator mit Kohlenstoffdioxid (Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf, DE)
- Inkubator ohne CO₂ (Cellstar Nunc, Wiesbaden, DE)
- Kühlschrank (Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss, DE)
- LKB BROMMA 7800 KnifeMaker (LKB, Bromma, SE)
- Magnetrührer Temperaturmessfühler (IKA[®]Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE)
- Objektträgerkästen nach Hellendahl (ASSISTENT[®], Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, DE)
- Paraffin – Ausgießstation AP280 (Microm International GmbH, Walldorf, DE)
- Präparatmappen ohne Deckel für 20 Objektträger (ASSISTENT[®], Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, DE)
- Rotationsmikrotom (Leica RM 2155, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE)
- Rüttelplatte KS 125 basic (IKA Labortechnik, Staufen, DE)
- Sterilbank mit üblichem Zubehör wie Pipettus, Einmalpipetten 20 µl, 200 µl und 1000 µl, sterilisierte Pasteurpipetten, Absaugvorrichtung (Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf, DE)

- Leica UltraCut E Microtome (Reichert-Jung, Wien, AT)
- UV Polymerisationskammer (Herolab GmbH Laborgeraete, Wiesloch, DE)
- Vakuumpumpe (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, DE)
- Waage Sartorius (Kern & Sohn GmbH, DE)
- Wärmeschrank (Mettler GmbH + Co.KG, Schwabach, DE)
- Wasserbad (GFL[®] Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, DE)
- Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R (Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf, DE)

2.1.12 Mikroskope und Kameras

- Umkehrmikroskop Diaphot-TMD (Nikon, Tokyo, JP)
- Umkehrmikroskop Kamera DS-Fi1 (Nikon, Tokyo, JP)
- Auflichtmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, DE)
- Lichtmikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, DE)
- Lichtmikroskop Kamera AxioCam MRC (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, DE)
- Transmissionselektronenmikroskop TM902, 80 kV Beschleunigungsspannung, elektrostatischer Energiefilter (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, DE)
- Slow-Scan-CCD-Kamera
- Rasterelektronenmikroskop (REM) Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) XL 30, 0,5 kV Beschleunigungsspannung, 7,5mm Arbeitsabstand, Everhart-Thornley-Detektor (Philips GmbH, Hamburg, DE)

2.1.13 Laborbedarf

- PELCO[®] Center-Marked Grids, 100 Mesh, Copper (Ted Pella, Inc., Redding, US)
- 595 Rundfilter (Schleicher & Schuell Micro Science GmbH, Dassel DE)
- Alufolie (Bunzl GmbH, Gelsenkirchen, DE)
- Ausgießformen Tissue-Tek[®] (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, DE)
- Ceran-Labor-Schutzplatte (SCHOTT AG, Mainz, DE)
- Coulter-Gefäße (Engelbrecht GmbH, Edermünde, DE)
- Cryo Tube[™] Vials, 1,8 ml (NUNC[™], Roskilde, DK)

- Dalmatinerhaarpinsel (Eigenbau)
- Deckgläschen 24x46 mm (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, DE)
- Dewargefäß für flüssigen Stickstoff (Kundert Vario AG, Wolfhausen, CH)
- DiATOME Diamantmesser histo (DiATOME AG, Biel, CH)
- DiATOME Diamantmesser ultra (DiATOME AG, Biel, CH)
- Einbettkassetten Tissue-Loc Histo Screen (Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE)
- Einmalklingen Nr. 21 für Mehrwegskalpelle Griff 4 (Bayha, Tuttlingen, DE)
- Einmalpipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg, DE)
- Einmalskalpelle Nr. 21 (Bayha, Tuttlingen, DE)
- Einmalskalpelle steril (pfm medical AG, Köln, DE)
- Erlenmeyerkolben 100 ml, 250 ml, 2000 ml (VWR, Darmstadt, DE)
- Färbeeinsatz aus Stahl (ASSISTENT[®], Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, DE)
- Feine Pinzette mit Hacken (Braun/ Aesculap, Tuttlingen, DE)
- Filtrationssysteme (Biochrom AG seromed[®], Berlin, DE)
- Fotokleber (Henzo International B.V., Roermond, NL)
- Gelatine Kapseln Größe 0 (Plano GmbH, Wetzlar, DE)
- Gipsmesser (Henry Schein Dental Depot GmbH, Langen, DE)
- Glasflaschen 100 ml, 250 ml (VWR, Darmstadt, DE)
- Glasstreifen zu Messerherstellung (Plano GmbH, Wetzlar, DE)
- Goldkathode (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE)
- Goldobjektträger (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE)
- Grobe Pinzette mit Hacken (Braun/ Aesculap, Tuttlingen, DE)
- Handschuhe steril (Paul Hartmann, Heidenheim, DE)
- Handschuhe unsteril (Paul Hartmann, Heidenheim, DE)
- Heidemannspatel (VWR, Darmstadt, DE)
- ImmEdge Pen (Vector Laboratories Inc., Burlingame, US)
- Kleine Pinzette (Plano GmbH, Wetzlar, DE)
- Kleine Schere (Braun/ Aesculap, Tuttlingen, DE)
- Kleine, mit Wachs ausgegossene Petrischalen als ‚feuchte Kammer‘ (Eigenbau)

- Kühlakku (Baumarkt Praktiker Online GmbH, Hamburg, DE)
- Küvetten (VWR, Darmstadt, DE)
- Magnetstäbchen IKAFLON® (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE)
- Mikrotomklingen R35 (medite Medizintechnik, Nunningen, CH)
- Mundschutz (3M Deutschland GmbH, Neuss, DE)
- Objektträger (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, DE)
- Parafilm M Laboratory Film (American National Can™, Greenwich, GB)
- Platinkathode (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE)
- Platten, 48-Well (Nunclon™ δ Surface, Nunc™, DK)
- Platten, 96-Well (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, DE)
- Prep Blades (Pilling Weck, Inc., Horsham, US)
- Probenrevolver (Hind High Vacuum Private Limited (HHV), Crawley, GB)
- Rollrandgläser mit Schnappdeckel (ASSISTENT®, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, DE)
- Rothaarmarderpinsel (Eigenbau)
- Safe –Lock Tubes 2 ml unsteril (Eppendorf, Hamburg, DE)
- Spatellöffel klein (VWR, Darmstadt, DE)
- Spritzflasche (VITALAB GmbH, Grossostheim, DE)
- Ständer für Gelkapseln (Eigenbau)
- Sterile Tücher, grüne OP-Tücher (Wäscherei UKM, Münster, DE)
- Styroporgitterbox (Verpackungsmaterial)
- SuperFrost® Plus Objektträger (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, DE)
- Tablett (VWR, Darmstadt, DE)
- Tüpfelplatte (Plano GmbH, Wetzlar, DE)
- wendelförmig gedrehtes Rohr aus Kupfer (Eigenbau)
- Zellkulturschalen 150 x 20 mm (Biochrom AG seromed®, Berlin, DE)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml (Biochrom AG seromed®, Berlin, DE)

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung boviner Osteoblasten

Zur Herstellung der Zellkultur primärer Osteoblasten wurde das Periost von 12 bovinen Metacarpi verwendet. Diese wurden von der Westfleisch Vieh- und Fleischzentrale Hamm von 12 Kälbern angeliefert. Zur Zellgewinnung wurde ein spezielles Verfahren verwendet, welches auf der Fähigkeit der Osteoblasten beruht, bei geeigneten Kulturbedingungen aus dem Periostgewebe auszuwandern [Jones/Boyde, 1977; weiterentwickelt von Hartig, 2000].

Um das Periost entnehmen zu können, wurde die Präparation in zwei Teilschritte untergliedert: Grob- und Feinpräparation.

Grobpräparation

Zuerst erfolgte die Grobpräparation der von frisch geschlachteten Kälbern entnommenen Schienbeine unter normalen Laborbedingungen (Abb. 6). Dabei wurden die Kälberschienbeine unter fließendem Wasser von Kot und Dreck befreit und mit Antifect[®] N Liquid desinfiziert. Anschließend mussten die Haut- und Fettschichten mit dem Skalpell behutsam entfernt werden (Abb. 7). Am Gelenkspalt wurde der Huf vom benötigten Metacarpus getrennt. Letzteren spülte man unter dest. Wasser ab und desinfizierte ihn mit 80%igem vergälltem, gefärbtem und filtriertem Ethanol (Abb. 8).



Abb. 6 frisch geschlachtetes Kälberbein



Abb. 7 Grobpräparation des Beines; Fell und Huf wurden entfernt



Abb. 8 Desinfektion mit 80 % vergälltem Ethanol

Feinpräparation

Die Feinpräparation spielte sich unter sterilen Bedingungen ab. Es wurde als Erstes das vom Alkohol gefärbte Weichgewebe und die Sehnen vorsichtig mit Skalpell und Pinzette abpräpariert (Abb. 9, Abb. 10). Der Kälberknochen wurde mit 0.9% NaCl gründlich abgewaschen und es wurde je ein Schnitt zirkulär an den beiden äußeren Enden des freiliegenden Periosts gesetzt. Im Abstand von 5 mm erfolgten Längsschnitte. Die entstandenen Perioststreifen wurden vom Knochen abgezogen (Abb. 11), in einen Glaskolben überführt und zweimal 10 Minuten in 37 °C warmer Earle's-1-Salzlösung (Earle's balanced salt solution (EBSS)) gewaschen. Es folgte eine zehnmünütige Spülung in einer Earle's-2-Salzlösung (s. Material 2.1.5). Alle Spülungen wurden mit einem Magnetrührer durchgeführt (Abb. 12). Die gewaschenen Perioststreifen konnten nun in 5 x 5 mm breite Rechtecke geschnitten (Abb. 13) und ca. 15-20 Stück mit der haftenden, osteogenen Unterseite in eine sterile Zellkulturschale (Ø 13,5 cm) gelegt werden. Hierbei wurde auf einen ausreichenden Abstand zwischen den einzelnen Perioststücken geachtet, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten (Abb. 14). Nach 20 minütiger Anheftungsphase an den Polystyrolboden der Zellkulturschale und Zugabe von je 20 ml MM0-f-Nährmedium pro Kulturschale kamen die Perioststücke in den CO₂-Inkubator. Dort wurden sie bei einer Temperatur von 37 °C, 100% relative Luftfeuchtigkeit und einem 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Wöchentlich wurde das MM0-f-Nährmedium mithilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und durch 20 ml frisches Medium ersetzt.



Abb. 9 Feinpräparation, Entfernen der Sehnen und des Weichgewebes



Abb. 10 Feinpräparation, Entfernung der letzten unerwünschten Gewebereste



Abb. 11 Ablösen des Periosts vom Knochen



Abb. 12 Waschen der Perioststreifen in Earle's Salzen

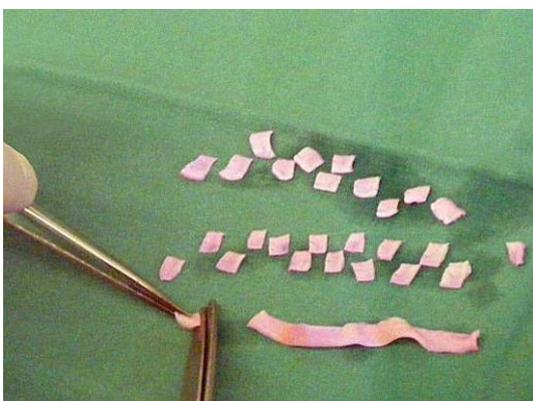


Abb. 13 Zuschneiden der Perioststreifen in $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}$ cm



Abb. 14 Perioststücke in Kulturschale

Die Perioststücke wurden nach 7 Tagen aus den Schalen entfernt und bereits nach weiteren 2 Wochen kam es zum Auswachsen eines konfluenten, aus Osteoblasten bestehenden Monolayers.

2.2.2 Passagieren von Osteoblasten

Waren die Zellen nach ca. 21 Tagen zu einem konfluenten Monolayer herangewachsen, konnten sie abgelöst und passagiert werden.

Unter sterilen Bedingungen wurden die auf dem Boden der Kulturschale haftenden Zellen vorsichtig abgelöst. Dazu wurde zuerst sorgsam das MM0-f-Nährmedium aus der Schale mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend wurden die Zellkulturschalen zweimal mit je 10 ml PBS gespült und mit je 10 ml Accutase™ bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator für 20 Minuten inkubiert. Durch die Accutase™ wurden die Zellen schonend vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Accutase™ zeigt proteolytische und kollagenolytische Aktivität, sie baut die Proteine ab, welche den Zellverband aufrecht erhalten. Die Zellmatrixproteine blieben bei dem Ablösen mit Accutase™ jedoch intakt. Die Suspension wurde mit der Pipette sorgfältig aufgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Bevor das Röhrchen bei 20 °C und 600 U/min 10 Minuten zentrifugiert wurde, gingen 100 µl der Suspension und 10 ml CasyTon-Lösung in ein Coulter-Gefäß, um mit Hilfe eines Zellsystems [Computer-Counter-System Casy® 1 Modell TT] die Zellgrößenverteilung und die Zellzahl pro ml Accutase-Lösung bestimmen zu können.

Aus dem Zentrifugenröhrchen wurde mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe der Accutase-Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet mit dem Leibovitz-Medium resuspendiert (pro 1 Millionen Zellen 1 ml Medium).

Im Gegensatz zu MM0 hat das Leibovitz-Medium den CO₂-Gehalt gespeichert. Aufgrund dieser Tatsache wurde kein CO₂-Inkubator benötigt. Im Leibowitz-Medium stellten Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) und die basischen Aminosäuren L-Arginin, L-Cystein und L-Histidin den Puffer dar. Zudem wurde durch den Austausch von D(+)-Glucose (in CO₂-abhängigen Medien) zu D(+)-Galactose, L-Alanin und Natriumpyruvat weniger Milchsäure freigesetzt. Die CO₂-Versorgung der Zellen war

jedoch durch den erhöhten Natriumpyruvatanteil und die zelleigene Umsetzung gewährleistet [Lindl, 2002].

2.2.3 Herstellung der Osteoblasten-Spheres

Nachdem die Osteoblasten nun vom Schalenboden gelöst und mit Leibovitz-Medium in Suspension gebracht worden waren, wurden sie zu jeweils 200.000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte überführt.

Um zu verhindern, dass sich die Zellen an der Unterlage anhefteten und als Monolage ("Monolayer") proliferierten, wurden vor Aussiedlung der Osteoblastenzellen die 96-Well-Platten mit einem Gemisch aus Agarose und Leibovitz-Medium beschichtet (Abb. 15, Abb. 16). Die Agarose bewirkte, dass die angesiedelten Zellen nicht an der Plattenwand adhärten. Es bildete sich eine schwach konkave Oberfläche, in welcher sich die Zellen zu Zell-Mikromassen, sogenannten Zellspheres, nach einer definierten Zeit zusammen lagerten [s. Schäfer, unveröffentlicht].

Für das Gemisch aus Agarose und Leibovitz-Medium wurden 50 ml Leibovitz-Medium steril in eine 100 ml Glasflasche pipettiert, 1 g Agarosepulver hinzugegeben und durch leichtes Schwenken untergemischt. Nach 20 minütigem Autoklavieren im Dampfdruckkessel bei 110 °C und 1 bar wurden 50 µl der noch warmen Agarose-Medium-Mischung pro Well steril pipettiert. Die leicht geöffnete 96-Well-Platte blieb zum Abkühlen unter der Sterilbank.

Die gezählten Zellen wurden auf die so vorbereiteten Platten gegeben und bei 37 °C in einem Wärmeschrank ohne CO₂ für den Versuchszeitraum inkubiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Mikromassenkulturen gearbeitet, welche sich in Form und Anzahl mit einer definierten Qualität reproduzieren ließen. Sie bestanden aus 200.000 Osteoblasten und entstanden ohne Trägermaterial. Für jede der 3 Untersuchungsmethoden (licht-, transmissionselektronen- und rasterelektronenmikroskopisch) wurden bei jedem Versuchsdurchgang 8 Mikromassenkulturen pro Zeitpunkt verwendet. Die lichtmikroskopische Untersuchung wurde 4-mal wiederholt. Die transmissions- und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden je 2-mal wiederholt.

Unmittelbar vor den Fixierzeitpunkten wurden lichtmikroskopische Bilder der Mikromassenkulturen unter dem Umkehrmikroskop Diaphot-TMD der Firma Nikon mit der Kamera DS-Fi1 von Nikon mit 4facher Vergrößerung angefertigt.

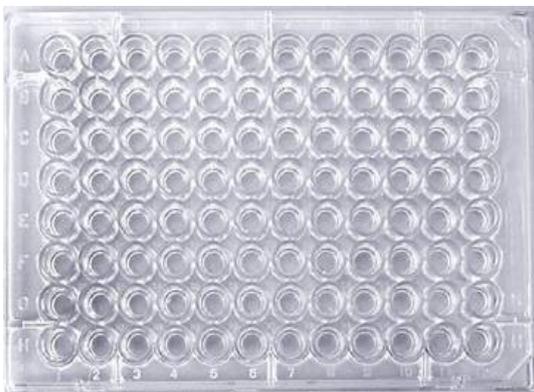


Abb. 15 96-Well-Platte

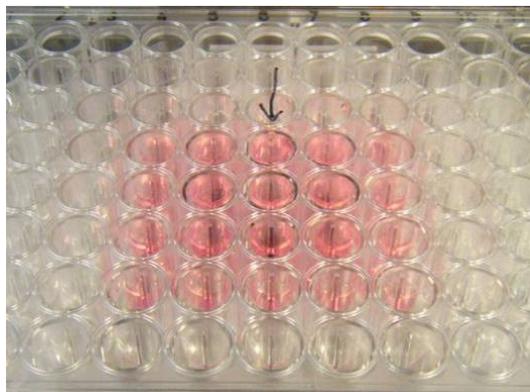


Abb. 16 96-Well-Platte mit Agarose-Leibovitz-Gemisch

2.2.4 Strukturelle lichtmikroskopische Untersuchungen

Die nach der im Folgenden beschriebenen Methode fixierten, eingebetteten und immunhistochemisch behandelten Zellen/Spheres wurden zur Auswertung unter dem Lichtmikroskop (Axioplan 2 der Firma Carl Zeiss MicroImaging GmbH) bei 10- und 40facher Vergrößerung betrachtet. Alle lichtmikroskopischen Abbildungen in dieser Arbeit wurden mit der Kamera (AxioCam MRC der Firma Carl Zeiss MicroImaging GmbH) aufgenommen.

2.2.4.1 Fixierung

In den Vertiefungen der 96-Well-Platten bildeten sich nach einiger Zeit dreidimensionale Zell-Spheres, welche in ihrer Entstehung zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert wurden.

Durch die Fixierung der Zellen wurde der jeweilige aktuelle, natürliche Zustand erhalten. Die Größe, Form und Färbbarkeit der Zellen sollten möglichst unverändert bleiben. Durch diese Anforderungen und Aufgaben wurde die Fixierung zu einem sehr entscheidenden Teilschritt der Präparation.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen war es wichtig, dass die Zugänglichkeit der das Antigen präsentierenden Bereiche der Zellen erhalten blieben. Das Antigen sollte dabei an seiner Position verbleiben und anschließend im Licht-, bzw. Elektronenmikroskop erkannt und zugeordnet werden können [Mulisch et al., 2010].

Formalin ist eines der am häufigsten verwendeten Fixiermittel und erhält sowohl die Struktur und die Form, als auch die Farbe der Spheres [Mulisch et al., 2010]. Formalin ist eine 37% Lösung des Formaldehyds.

Aldehyde gehören zu den vernetzenden Fixanzien. Sie bilden Brücken zwischen den Molekülen, indem sie sich mit Proteinen oder Lipiden verbinden. Je mehr Bindungen sich ausbilden, desto besser bleibt die Struktur erhalten. Aldehydhaltige Fixierlösungen sollten immer im Überschuss vorhanden sein, da sie bei der Fixierreaktion verbraucht werden.

Formaldehydmoleküle (Methanalmoleküle) sind sehr klein und dringen schnell in Gewebe ein, bilden jedoch nur langsam relativ lockere und reversible Quervernetzungen der zellulären Proteine aus. Die Ultrastruktur der Zelle wird bei reiner Formaldehydfixierung nicht gut erhalten [Mulisch et al., 2010], jedoch wirkt es wenig denaturierend, wodurch die Sekundärstruktur der Proteine zum größten Teil aufrechterhalten bleibt [Lang, 2006].

Um die Entwicklung der Expression der Matrixproteine Osteonectin, Collagen Typ I, Osteopontin und Osteocalcin zu untersuchen, wurden die Zellen nach 30, 60, 90, 120, 240 und 420 Minuten sowie nach 1, 7 und 14 Tagen fixiert.

Für die spätere Einbettung in Paraffin wurden die Spheres (Proben nach 1, 7 und 14 Tagen) mit 200 µl Arbeitsvolumen in ein Rollrandglas pipettiert. In jedes wurde 1 ml Formalin 4% gegeben, einmal geschwenkt und für eine Stunde stehen gelassen.

Die Proben, welche zwischen 30 und 420 Minuten fixiert werden sollten, konnten in der Praxis nicht auf diese Weise der Fixierlösung zugeführt werden, da sie sich nicht pipettieren ließen.

Aus diesem Grund wurde bei diesen Proben die Fixierlösung bei der Fixierung vorsichtig in die einzelnen Wells pipettiert. Nachdem 150 µl Nährlösung mit größter Sorgfalt abgesaugt waren, wurden 200 µl Formalin nach 30, 60, 90, 120, 240 und 420 Minuten auf die Proben gegeben. Es war darauf zu achten, dass die Zellen in den Wells sich so wenig wie möglich bewegten und Zellverbände nicht aufgelöst wurden. Zudem sollte nur die nötigste Menge Fixierlösung genutzt werden, um die Voreinbettung nicht zu erschweren.

Die fixierten Proben wurden anschließend in Paraffin eingebettet, geschnitten und immunhistochemisch untersucht.

2.2.4.2 Einbettung

Die fixierten Proben sollten in einen Zustand gebracht werden, welcher es erlaubt, mikrometerdünne Schnitte dieser Proben herzustellen, um sie anschließend unter dem Lichtmikroskop zu untersuchen. Dafür musste man sie dem Einbettungsprozess unterziehen, einer Substitution.

Die Flüssigkeit, welche die Vakuole ausfüllt, wurde zunächst durch Fixierlösung ersetzt. Danach wurde diese wiederum (teilweise über Zwischenschritte) durch ein Einbettmedium ausgetauscht.

Das Einbettmedium lag bei Raumtemperatur in festem Zustand vor und musste zum Verflüssigen erwärmt werden (z.B. Paraffin). In flüssigem Zustand drang es in die Proben ein. Nach Abkühlung des Mediums verfestigte sich dieses wieder. Um zu gewährleisten, dass das Gewebelöckchen später in ein Mikrotom eingespannt und geschnitten werden konnte, musste es in einer formgebenden Aluminiumschale mit dem Einbettmedium aushärten.

2.2.4.2.1 Voreinbettung

Hatten sich die Spheres nach einem Tag gebildet, so konnte man sie problemlos fixieren und mit etwas Vorsicht der aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung zuführen. Es erforderte Geschick und Feingefühl, die Spheres während der Entwässerung nicht zu

‚verlieren‘, da sie sehr klein und manchmal mit bloßem Auge auf den ersten Blick nicht zu erkennen waren [Literatur Paraffineinbettung (Mulisch et al., 2010)].

Unmöglich wurde dies allerdings bei der Handhabung der Zellen, welche sich noch nicht zu einer Kugel zusammengeschlossen hatten. Die Fixierlösung konnte noch vorsichtig auf die Zellen in den Well aufgebracht werden, doch die Alkoholreihe mit einzelnen, losen Zellen durchzuführen war nicht möglich. Die Zellen wären durcheinandergewirbelt und auf die Proben verteilt worden, ohne sie in irgendeiner Weise ihrem Ursprungsort zuordnen zu können. Wurden die Zellen vor der aufsteigenden Alkoholreihe von einer Substanz umschlossen, welche sie auf ihrem Platz fixiert, aber noch durchlässig für Flüssigkeiten ist, konnten die Alkoholreihe und alle weiteren Prozesse ohne Problem durchgeführt werden.

Die Voreinbettung war in dieser Arbeit deshalb von entscheidender Bedeutung. Für die Lichtmikroskopie sowie die Transmissionselektronenmikroskopie konnten die Proben nur dank der Voreinbettung so aufbereitet und soweit präpariert werden, dass sie mikroskopisch ausgewertet werden konnten.

Aus oben genannten Gründen, zur besseren Übersicht sowie zur besseren Handhabung und auch um die fertigen Kugeln im Paraffin nicht zu verlieren, wurden die Proben in HistoGelTM eingebettet. Dazu wurde das Gel auf 58 °C im Wasserbad erwärmt und auf eine Tüpfelplatte gegeben. Mithilfe einer Pipette wurden die Kugeln dort hineingesetzt und die Tüpfelplatte wurde auf eine Kühlplatte gestellt. Nach ca. 10-20 Minuten war das Gel erstarrt.

Bei den Proben, welche zwischen 30 und 420 Minuten im Well fixiert worden waren, wurde vorsichtig der größte Teil der Fixierlösung abgesaugt. Anschließend wurde das warme HistoGelTM auf die Zellen in den Wells gegeben. Wiederum war es sehr wichtig, dass die Zellen sich so wenig wie möglich bewegten und Zellverbände erhalten blieben. Es dauerte ca. 30 Minuten, bis das Gel erstarrt war.

Die erstarrten Gelstücke schnitt man zu und gab sie in eine Gewebeeinbettkassette (Abb. 17), um sie für eine Stunde unter fließendem Leitungswasser zu wässern, was nach der Liegezeit in Formalin nötig war. Da Reste der Fixierlösung die Qualität der

Einbettung und die anschließende Färbung negativ beeinflussen könnten und außerdem zu Artefakten in den Präparaten führen könnten, mussten sie gründlich mit Leitungswasser und Alkohol ausgewaschen werden. Zudem diente das Auswaschen dazu, die sich anschließende, aufsteigende Alkoholreihe nicht mit Fixierlösung zu verunreinigen [Lang, 2006].

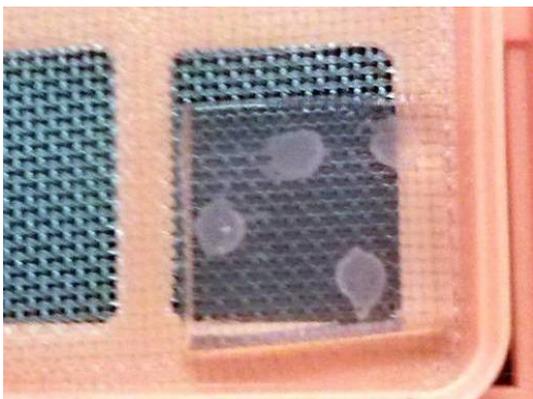


Abb. 17 voreingebettete Proben in einer Geweeinbettkassette

2.2.4.2.2 Entwässerung

Formalin ist mit Wasser mischbar, das Einbettmedium Paraffin hat jedoch hydrophobe Eigenschaften. Um die Proben von der hydrophilen in die hydrophobe Phase zu überführen, mussten im Verlauf Flüssigkeiten zwischengeschaltet werden, welche sich sowohl mit Wasser als auch mit organischen Lösungsmitteln vermischen lassen. Das Wasser sollte möglichst vollständig aus den Proben entfernt bzw. verdrängt werden [Lang, 2006].

Dies erreichte man durch Alkohole, welche in aufsteigender Konzentration (auch 'aufsteigende Alkoholreihe') die Proben penetrieren. Die aufsteigende Alkoholreihe stellte eine möglichst schonende Art der Entwässerung, ohne Zerreißen oder Schrumpfen der Proben dar. Hochprozentiger Alkohol wirkt in der Regel schrumpfend auf Gewebe. Diese Eigenschaft konnte jedoch minimiert werden, indem die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Alkoholen der Reihe gering gehalten wurden [vgl. Lang, 2006].

Da die Spheres sehr klein waren, durften die Zeiten in den Alkoholstufen nicht zu lang gewählt werden, weil sie sonst spröde und schlecht schneidbar wurden. Gerade Collagen I, welches im Rahmen dieser Arbeit mit großem Interesse beobachtet wurde, reagierte besonders empfindlich auf lange Liegezeiten in hochprozentigem Alkohol. Es entstand kein Nachteil durch eine längere Einwirkzeit bei niedrigprozentigem Alkohol [Mulisch et al., 2010].

Die Spheres/Zellen wurden in den Gewebereinbettungskassetten durch diese Alkoholreihe geschickt. Man begann mit 50% Alkohol für 30 Minuten. Anschließend wurden die 70% und 90% Alkoholstufen für je 2x 60 Minuten durchgeführt. Zum Schluss wurde 100% Isopropanol ebenfalls für 2x 60 Minuten hinzugegeben.

2.2.4.2.3 Einbettung in Paraffin

Die Gewebereinbettungskassetten mit den in HistoGelTM eingebetteten Spheres/Zellen wurden nach der aufsteigenden Alkoholreihe in ein Intermedium gegeben. Das Intermedium (Zwischenmedium) hat die Eigenschaft, sich mit dem Alkohol 100% sowie Paraffin zu mischen. Somit entfernt es den Alkohol und ist auch Lösungsmittel für Paraffin. Verunreinigungen im Paraffin durch Alkohol oder Wasser führen zu einer mangelhaften Schneidbarkeit, weshalb sie durch das Intermedium vollständig verdrängt werden sollten. Einige Intermedien sind stark toxisch und gesundheitsschädlich/karzinogen, unter anderem das früher häufig verwendete Xylol. Aus diesem Grund arbeiteten wir mit Zedernholzöl. Die Proben verblieben für 24 Stunden in dem Öl. Während dieser Zeit wurde das Zedernholzöl 3mal gewechselt, damit auch der letzte Rest Isopropanol verdrängt wurde. Es folgte für 2x4 Stunden eine 1:1 Mischung aus Paraffin und Zedernholzöl im Wärmeschrank bei 58 °C. Dann gingen die Kassetten für 4x24 Stunden in ein Gefäß mit 58 °C warmem Paraffin. Das Zedernholzöl mischte sich mit dem Paraffin und wurde von diesem vollständig verdrängt [Mulisch et al., 2010]. Zur Infiltration des Gewebes mit Paraffin musste dieses flüssig sein, weshalb es auf 58 °C erwärmt wurde (der Schmelzpunkt von Paraffin liegt bei 52-60 °C) und die Proben die gesamte Zeit in einem Wärmeschrank verblieben [Lang, 2006].

Das in dieser Arbeit verwendete Paraffin (Paraplast) hatte seinen Schmelzpunkt bei 56 °C und durfte nicht über 62 °C erhitzt werden. Das Material war ein Komplex aus

gereinigtem Paraffin und Kunststoffpolymeren mit einem Zusatz von DMSO (Dimethylsulfoxid) zur Schnellinfiltration des Gewebes.

Waren die Proben nach vier Tagen in flüssigem Paraffin vollständig infiltriert, wurden sie aus den Gewebeeinbettkassetten genommen und in Paraffinblöckchen gegossen. Eine geeignete Ausgießform aus Aluminium wurde randvoll mit Paraffin gefüllt und die Probe hineingelegt. Das Oberteil der Einbettkassette wurde auf die Ausgießform aufgelegt, um später als Blockhalterung zu dienen, und die Form wurde bis zum Rand mit flüssigem Paraffin aufgefüllt. Während des Abkühlens wurde ständig etwas Paraffin nachgegossen, um der nabelartigen Volumenabnahme des abkühlenden Paraffins entgegenzuwirken. Zum Aushärten konnte die Probe in ein Eisfach (-4 °C) gestellt werden, da schnelles Abkühlen zu einem homogenen Ergebnis führte.

2.2.4.3 Paraffinschnitte für die Lichtmikroskopie

Nach Aushärtung wurden die Paraffinblöckchen aus den Einbettkassetten entfernt und die Ränder mit einem Gipsmesser gesäubert. Vorsichtig wurde mit einer Skalpellklinge um die Probe herum ein Trapez geritzt und das überschüssige Paraffin seitlich der Probe entfernt. Das Blöckchen musste nun am Rotationsmikrotom eingespannt und ausgerichtet werden. Rotationsmikrotome eignen sich hervorragend zur Fertigung von 4 µm dünnen Paraffinserienschnitten. Diese mussten auf der Wasseroberfläche gestreckt werden, um anschließend auf Glasobjektträger überführt zu werden. Wir benötigten pro Probe 10 Schnitte, um Collagen Typ I, Osteocalcin, Osteopontin und Osteonectin testen zu können und die dazugehörigen Positiv- und Negativproben herzustellen. Je zwei Schnitte befanden sich auf einem Glasobjektträger, welche auf einer Heizplatte getrocknet wurden. Über Nacht gab man die Schnitte in einen Wärmeschrank bei 42 °C. Dies diente der besseren Anhaftung der Schnitte auf dem Glasobjektträger.

2.2.4.4 Färbung der Paraffinschnitte

Die Matrixproteine Osteonectin, Collagen Typ I, Osteopontin und Osteocalcin wurden bei diesem Teil der Arbeit mittels Immunhistochemie veranschaulicht. Dies geschah als Antigen-Antikörper-Reaktion und beruhte auf der Affinität von Antikörpern zu einer

bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop). Erwünscht war eine spezifische und starke Bindung (Schlüssel-Schloss-Prinzip) zwischen Antikörper und Epitop.

Die verwendeten Antikörper gehörten der Gruppe der Immunglobuline (IgG) an und zeichneten sich durch ihre Ypsilon-Form aus. Die IgG haben einen konstanten Teil (Fc, Fragment constant) und einen modifizierbaren Anteil (Fab, Fragment Antigen binding) (Abb. 18).

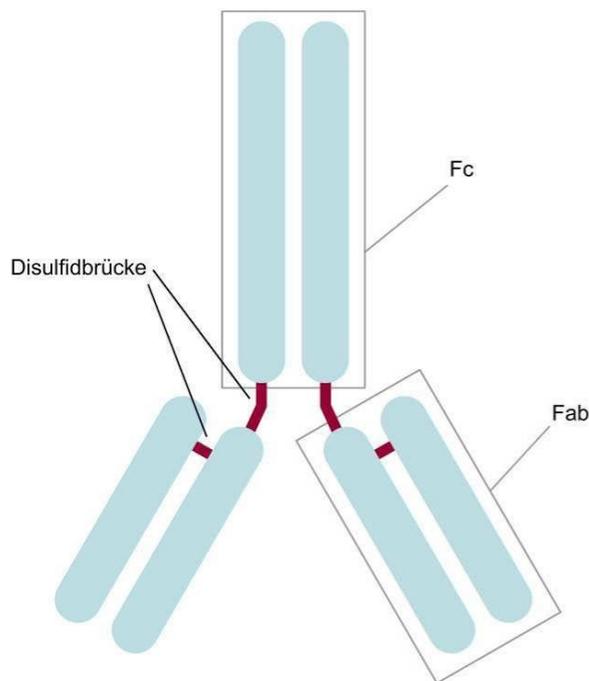


Abb. 18 Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers

Das Fc-Fragment war für die jeweilige Spezies konstant. Der Fab-Teil wurde bei der Synthese dem Epitop angepasst. Würde man diesen Teil der Länge nach halbieren, würde jede Hälfte aus einer langen (heavy chain) und einer kurzen (light chain) Kette, welche mit Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, bestehen.

In dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper verwendet, da sie eine gleichbleibende Qualität und reproduzierbare Ergebnisse erbringen. Außerdem kommt es nur sehr selten zu Kreuzreaktionen.

Die indirekte Methode der Immunhistochemie, bei welcher die Probe mit einem unkonjugierten Primärantikörper inkubiert wurde, eignete sich gut zur Signalamplifikation. Im Anschluss wurde ein konjugierter Sekundärantikörper inkubiert, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet war. Das Signal wurde verstärkt, da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden. Der Sekundärantikörper war mit einem Enzym konjugiert, welches durch Wasserstoffperoxid unter der katalytischen Wirkung von Peroxidase (hier 3-Amino-9-Ethylcarbazol, AEC) schnell in eine farbige, rötliche Substanz umgesetzt wurde (Abb. 19).

Eine Positiv- und eine Negativkontrolle wurden bei jedem Antikörper durchgeführt.

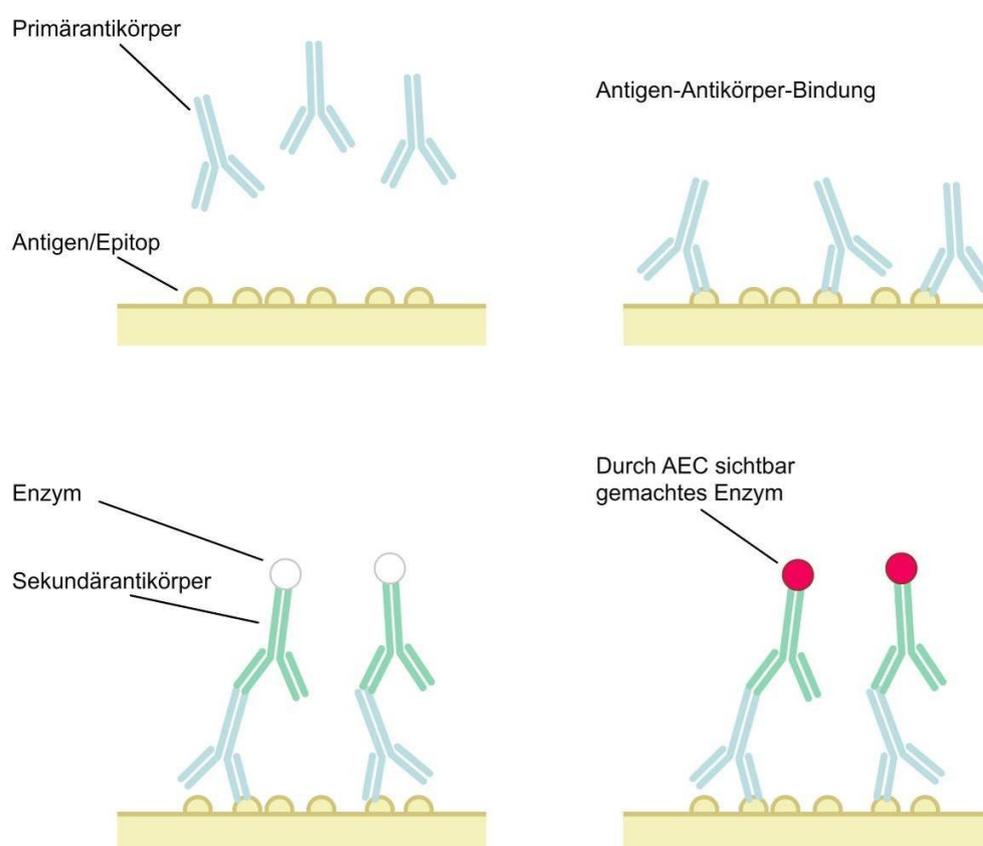


Abb. 19 Schematische Darstellung der Markierung von Proben mit Antikörpern

Die Markierung der Probe mit Antikörpern erfolgte in dieser Arbeit nach der Einbettung in Paraffin, Post-embedding labeling. Das Problem bei dieser Methode war, im Gegensatz zum Prä-embedding labeling, dass Paraffin die antigenpräsentierenden

Stellen der Probe bedeckte und diese für die Antikörper nicht zugänglich waren [Walther, 2001]. Aus diesem Grund wurden die Schnitte entparaffiniert.

Nachdem die Proben über Nacht im Wärmeschrank auf den Glasobjektträgern gelegen hatten, sollten sie erst korrekt beschriftet werden. Danach konnten die Schnitte entparaffiniert werden. Dazu wurde eine absteigende Alkoholreihe gestartet. Für 2x10 Minuten wurden die Proben mit Hilfe eines Färbereinsatzes aus Stahl in eine Küvette mit Xylol gegeben. Anschließend kamen sie für je 2x5 Minuten erst in 100% Isopropanol, in 96% Ethanol und zum Schluss in 70% Alkohol. Zuletzt folgten 5 Minuten in bidestilliertem Wasser. Die Schnitte waren jetzt entparaffiniert und wurden mit dem ImmEdge Pen umrandet. In der Färbebrücke wurden die Schnitte nebeneinander gelegt und für 10 Minuten ein Tropfen 3% H₂O₂ auf den umrandeten Präparaten stehen gelassen. Alle in der Färbebrücke durchgeführten Schritte erfolgten bei Raumtemperatur und bei niedrigster Einstellung auf der Rüttelplatte. Das H₂O₂ wurde abgesaugt und für 5 Minuten der PBS-Puffer mit 0,02% Tween 20 aufpipettiert. Nach dem Absaugen des Puffers folgte für 15 Minuten der Blocking Puffer. Dieser wurde nach Ablauf der Zeit ebenfalls abgesaugt und die ersten Antikörper wurden in der jeweiligen Verdünnung auf die entsprechend umrandeten und beschrifteten Proben gegeben (Abb. 20). Auf die Negativproben wurde statt eines ersten Antikörpers erneut Blocking Puffer gegeben. Zugedeckt blieben die ersten Antikörper über Nacht bei +4 °C im Kühlschrank liegen.

Am nächsten Tag mussten die Schnitte zunächst für 20 Minuten bei Raumtemperatur angewärmt werden. Dann wurde der erste Antikörper vorsichtig abgesaugt. Es folgte eine dreimalige Wäsche mit Hilfe des Färbereinsatzes in PBS-Puffer mit 0,02% Tween 20. Anschließend wurde der zweite Antikörper präzise aufgetragen, welcher später als sichtbarer Marker für das Ausmaß der Proteinexpression der Osteoblasten Spheres analysiert werden konnte. Je nach Herkunft des Primärantikörpers war der Sekundärantikörper speziell gegen den Fc-Teil des mouse- bzw. des rabbit-Antikörpers gerichtet. Die Anti-mouse Antikörper wurden auf die Schnitte für Osteocalcin, Osteonectin und die Negativprobe für Anti-mouse gegeben. Die Anti-rabbit Antikörper gab man auf die Collagen Typ I und Osteopontin Proben, sowie auf die Negativproben für Anti-rabbit. Die zweiten Antikörper wurden nach 2 Stunden, die sie bei Raumtemperatur und auf der Rüttelplatte auf den Proben waren, abgesaugt. Dann erfolgte wieder ein dreimaliges

Waschen mit PBS-Puffer mit 0,02% Tween 20. Nach dem Entfernen des Puffers wurde im Dunkeln auf der Rüttelplatte AEC + Substrat Chromogen für 10 Minuten und dann erneut für 20 Minuten auf die Proben gegeben. Anschließend wurden die Schnitte auf den Färbeeinsätzen dreimal in bidestilliertem Wasser gewaschen.



Abb. 20 Antikörper auf Proben in der Färbebrücke

Zum Schluss wurden die Proben mit Glycergel und Deckgläschen eingedeckelt. Das Glycergel musste vorher auf ca. 60 °C erwärmt werden, die Deckgläschen vorsichtig aufgelegt und eventuell vorhandene Luftblasen ausgedrückt werden. Das Glycergel ließ man abkühlen und entfernte Überschüsse. Anschließend wurden die Schnitte unter dem Lichtmikroskop (Axioplan 2 der Firma Carl Zeiss MicroImaging GmbH) ausgewertet.

2.2.5 Ultrastrukturelle transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

Die nach den im Folgenden beschriebenen Methoden fixierten, eingebetteten, gelabelten und/oder kontrastierten Zellen/Spheres, wurden zur Auswertung unter dem Transmissionselektronenmikroskop der Firma Zeiss (TM902) mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV und einem elektrostatischen Energiefilter betrachtet. Alle transmissionselektronenmikroskopischen Abbildungen in dieser Arbeit wurden digital mit einer integrierten Slow-Scan-CCD-Kamera aufgenommen.

In diesem Teil der Arbeit werden zwei unterschiedliche Fixier- und Einbettmethoden beschrieben und angewandt. Der Übersichtlichkeit halber wird im Folgenden von der chemischen und der physikalischen Methode gesprochen, welche sich wörtlich jedoch nur auf die Fixierung und Entwässerung der Proben bezieht, jedoch nicht auf die Voreinbettung, die Einbettung und die Ultradünnschnitte.

Allgemeine Erklärungen zu den einzelnen Unterpunkten, welche im Kapitel 'Lichtmikroskopie' (Kapitel 2.2.4) behandelt wurden, werden im Folgenden nicht noch einmal aufgegriffen.

2.2.5.1 Fixierung

Die fixierten Proben wurden im Anschluss in Lowicryl® K4M (Fa. Lowi GmbH) eingebettet, geschnitten, gelabelt und kontrastiert.

Um die Entwicklung der Expression der Matrixproteine Osteonectin, Osteopontin, Collagen Typ I und Osteocalcin zu untersuchen, wurden die Zellen nach 30, 60, 90, 120, 240 und 420 Minuten, sowie 1, 7 und 14 Tagen fixiert.

Chemische Methode

Die chemische Fixierung und anschließende Einbettung in Lowicryl einiger Proben erfolgte in Anlehnung an Vahrman [2008]. Die Proben wurden im Anschluss unter dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht.

Vahrman [2008] verwendete ein Gemisch aus Formaldehyd (s. Kapitel 2.2.4.1) und Glutaraldehyd, welches besonders für die Elektronenmikroskopie geeignet war [Karnovsky, 1965].

Bei der Fixierung mit Glutaraldehyd (1,5-Pentandial) entstehen binnen kürzester Zeit irreversible feinmaschige Quervernetzungen der Proteine durch die zwei Arten der funktionellen Aldehydgruppen: terminale und in der Mitte der Kette befindliche Aldehydgruppen [Lang, 2006]. Die Feinstruktur bleibt hervorragend erhalten. Aufgrund ihrer Größe dringen die Glutaraldehydmoleküle jedoch nur langsam ins Gewebe ein [Mulisch et al., 2010].

Mischte man nun niedrige Konzentrationen beider Fixierlösungen (Formaldehyd und Glutaraldehyd), so wurde das hervorragende Penetrationsvermögen des Formaldehyds mit der guten, vernetzenden Wirkung des Glutaraldehyds kombiniert. Das Gewebe wurde in seiner Struktur optimal erhalten und die Lösung drang schnell ein. Diese Mischung war sehr gut zum Fixieren von Proben geeignet, von welchen Ultradünn-

schnitte angefertigt und Immunmarkierungen durchgeführt werden sollten [vgl. Mulisch et al., 2010].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immersionsfixierung angewandt, also das Einlegen der Proben in die Fixierflüssigkeit [Lang, 2006]. Für die Fixierung wurden die ausgereiften Spheres (Proben, welche nach 1,7 oder 14 Tagen fixiert wurden) im Rahmen dieser Arbeit mit 200 μ l Arbeitsvolumen in ein Rollrandglas pipettiert. In jedes Rollrandglas wurden ca. 1 ml einer Fixierlösung aus 100 μ l Glutaraldehyd 25%, 100 μ l Formaldehyd 37% und 9,8 ml PBS 0,1 mol gegeben, einmal geschwenkt und über Nacht bei + 4 °C verschlossen im Kühlschrank stehen gelassen.

Da sich die Zellen der Proben, welche nach 30 bis 420 Minuten fixiert werden sollten, nicht pipettieren ließen (Kapitel 2.2.4.1), wurde auch hier die Fixierlösung bei der Fixierung vorsichtig in die einzelnen Wells pipettiert. Nachdem 150 μ l Nährlösung mit größter Vorsicht abgesaugt waren, wurden 200 μ l der Fixierflüssigkeit nach 30, 60, 90, 120, 240 und 420 Minuten auf die Proben gegeben.

Physikalische Methode

Bei der Kryofixierung wurden biologische Proben durch sehr schnelle Abkühlung (Schockfrostung bei etwa -135 °C) gefestigt und fixiert. Der Vorteil dieser Methode war, dass sich die Probenbestandteile nicht oder nur gering verschoben und somit die momentane Verteilung aller Zellen erhalten blieb. Das Wasser kristallisierte nicht, sondern bildete vitrifiziertes Eis und verhinderte dadurch lokale Veränderungen der Zellen. Bei der Kryofixierung wurde dem vorgebeugt, indem die Probe schnell in eine Kühlflüssigkeit, meist Propan oder Äthan, getaucht wurde, welche das Wasser in einen amorphen (nicht kristallinen) Zustand versetzte. Die Kühlrate war bei dieser Methode so hoch, dass die Größe der Kristallisationskeime nicht die für das Kristallwachstum kritischen Maße erreichte. Proben konnten so bis zu einer Tiefe von 45 μ m ohne Kristallisation des Wassers fixiert werden.

In dieser Arbeit wurde flüssiges Propan als Kryogen angewandt, nach einer von Robards [1985] beschriebenen Methode. Diese gestattete eine Fixierung ohne vorherige Infiltration, wobei vom ‚Plunging Freeze‘ gesprochen wird [Möller, 2008].

Durch sehr schnelles Abkühlen (Einfrieren) der Proben wurden die Stoffwechsellvorgänge der Zellen abrupt beendet, wodurch ein nahezu realistisches, zeitlich genaues Bild der Spheres entstand [Mulisch et al., 2010]. Dazu wurde handelsübliches Propan durch ein mit flüssigem Stickstoff gekühltes, wendelförmig gedrehtes Rohr aus Kupfer geleitet und in einem Behälter aufgefangen (Abb. 21). Dieser Behälter stand in flüssigem Stickstoff, um das dort hineintropfende flüssige Propan bei -190 °C zu kühlen. Die in Agarose liegenden Spheres wurden mit einem Spatellöffel vorsichtig den Wells entnommen und sofort in das flüssige Propan getaucht. Nach ca. 20 Sekunden wurden sie wieder aus dem Propanbad herausgeholt, vom Löffel gelöst und in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Cryo TubeTM untergebracht (Abb. 22). Dort konnten sie aufbewahrt werden.



Abb. 21 Wendelförmig gedrehtes Rohr mit Styroporauffangbehälter

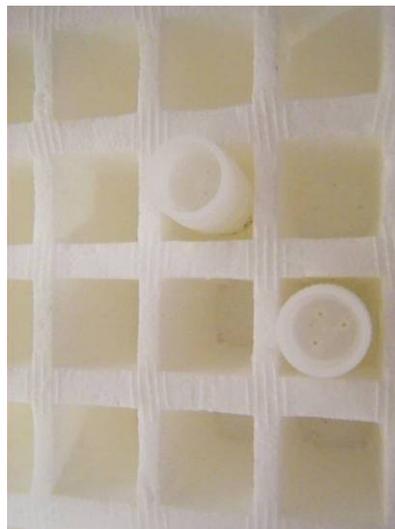


Abb. 22 Nahaufnahme der Cryo TubesTM

2.2.5.2 Einbettung

Die chemisch und physikalisch fixierten Proben sollten in einen Zustand gebracht werden, welcher es erlaubt, nanometerdünne Schnitte dieser Proben herzustellen, um sie anschließend unter dem TEM zu untersuchen. Dafür musste man sie dem Einbettungsprozess unterziehen, in dem man die Flüssigkeit die die Hohlräume der Proben ausfüllt, entfernt und durch eine andere nachfolgende Lösung substituiert. Die Flüssigkeit, welche die Vakuolen ausfüllt, wurde zunächst durch Fixierlösung ersetzt. Danach wurde

diese wiederum (teilweise über Zwischenschritte) durch Einbettmedium ausgetauscht [vgl. Plate et al., 1992].

Im Kapitel Lichtmikroskopie wurde über Einbettmedien gesprochen, welche thermoplastisch sind und sich durch Herunterkühlen verfestigen. Andere Einbettmedien liegen in ihrer monomeren Form flüssig vor, infiltrieren die Probe und erhärten durch Polymerisation (z.B. Lowicryl) [Lang, 2006].

2.2.5.2.1 Voreinbettung

Die Voreinbettung war in dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung. Ohne diesen Arbeitsschritt wäre ein weiteres Arbeiten mit den Proben unmöglich geworden.

Chemische Methode

Hatten sich nach einem Tag Inkubationszeit Spheres gebildet, konnten alle folgenden Schritte ohne Probleme durchgeführt werden. Wie in Kapitel 2.2.4.2.1 jedoch bereits beschrieben, mussten die Zellhaufen (welche nach 30-420 Minuten noch vorlagen) zur Entwässerung und weiteren Bearbeitung voreingebettet werden. Hierzu wurde für die Elektronenmikroskopie Agar verwendet.

Nach der ‚über Nacht Fixierung‘ der Zellen in Glutaraldehyd, Formaldehyd und PBS wurde für die Einbettung in Lowicryl nun das Agar hinzugegeben. Dazu wurde 1 g Agar mit 25 ml Aqua dest. aufgekocht und anschließend auf 50 °C abgekühlt. 1 ml der mit den Zellen bestehenden Fixierlösung wurde mit 1 ml Agar aufgefüllt. Bei 44 °C erstarrte die Agarmasse und konnte in ca. 1x1 mm kleine Blöckchen geschnitten werden. Es war darauf zu achten, dass die Zellen mittig im Blöckchen lagen.

2.2.5.2.2 Entwässerung

Chemische Methode

Ebenso wie Formalin ist auch Glutaraldehyd mit Wasser mischbar, das Einbettmedium Lowicryl ist allerdings hydrophob. Um die Proben nun von der hydrophilen in die hydrophobe Phase zu überführen, mussten im Verlauf Flüssigkeiten zwischengeschaltet

werden, welche sich sowohl mit Wasser als auch mit organischen Lösungsmitteln vermischen ließen. Das Wasser wurde möglichst vollständig aus den Proben entfernt bzw. verdrängt [Lang, 2006], wie in Kapitel 2.2.4.2.2 beschrieben.

Die in Agar voreingebetteten Spheres zur Einbettung in Lowicryl wurden in ‚safe lock-tubes‘ überführt und der aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol) zugeführt, um die Proben zu entwässern [Mulisch et al., 2010]. Dies geschah bei +4 °C.

Physikalische Methode

Die in Propan durch Schockgefrierung fixierten Proben wurden durch Gefrier-trocknung entwässert, um anschließend eingebettet zu werden. Das gefrorene Wasser wurde durch Sublimation entfernt.



Die Entwässerung wurde in der Edwards und Haake Kühlung bei einem Vakuum von < 300 Pascal (Pa) und eine Tellertemperatur von < -40 °C durchgeführt. Der Probenrevolver wurde mit Flüssigstickstoff vorgekühlt und die nummerierten Bohrungen zur Probenaufnahme bis zur Hälfte mit Flüssigstickstoff gefüllt. Die Proben wurden unmittelbar aus den Cryo-TubesTM in den Probenrevolver überführt und auf den Kühltisch in die Vakuumkammer gestellt. Letztere wurde schnell verschlossen, um ein Vakuum über Roughing (s. Geräteanleitung) zu ziehen. Dieses Vakuum wurde für 3 Tage belassen, um die Feuchtigkeit aus den Proben zu ziehen.

2.2.5.2.3 Einbettung in Lowicryl

Die Spheres wurden in Lowicryl® K4M (Fa. Lowi GmbH) eingebettet, um anschließend Ultradünnschnitte für das TEM anfertigen zu können. Lowicryl K4M ist eine hochvernetzende Acryl- und Methacrylverbindung [Carlemalm et al., 1982]. Die Tieftemperatur-Einbettung in Lowicryl K4M-Harz erfolgte nach einem bei Roth et al. [1981] und Carlemalm et al. [1982] beschriebenen Verfahren. Die Lowicryl-Einbettung eignet sich besonders für kleine Gewebeteilchen, welche anschließend zu Semi- und Ultradünns-

schnitten weiterverarbeitet werden. Histochemische Färbungen und Untersuchungen können durchgeführt werden [Roth et al., 1981].

Chemische Methode

Nach der Entwässerung durch die aufsteigende Alkoholreihe begann die Überführung in Lowicryl K4M-Harz. Dabei wurden die Proben erst für eine Stunde bei -20 °C einer 2:1 Lösung aus Isopropanol und Lowicryl K4M-Harz ausgesetzt. Danach wurden die Proben für eine Stunde bei -20 °C in eine 1:2 Mischung aus Isopropanol und Lowicryl-Harz gegeben. Daraufhin folgte die Inkubation der Proben in 100% Lowicryl-Harz bei -20 °C für zwei Stunden und anschließend erneut in 100% Lowicryl K4M-Harz bei -20 °C über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Proben in Gelkapseln auf einem vorbereiteten Ständer überführt, mit frischem Lowicryl-Harz überzogen und in einen Metallbehälter in der UV-Polymerisationskammer gegeben. In flüssigem Methanol bei -40 °C und unter UV-Licht polymerisierten die Proben für 24 Stunden (Abb. 23). Die endgültige Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur und unter UV-Licht für 48 Stunden (Abb. 24).



Abb. 23 UV-Polymerisationskammer mit flüssigem Methanol

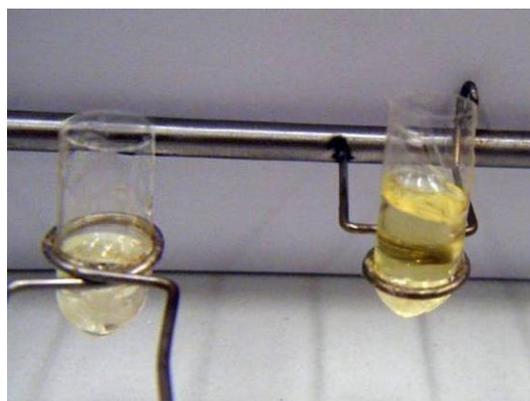


Abb. 24 Auspolymerisierte Probe (Gelkapsel) im Ständer

Physikalische Methode

Waren die Proben in der Edwards-Anlage vollständig entwässert, wurden sie ebenfalls in Lowicryl eingebettet. Zuerst musste das Lowicryl jedoch entgast werden. Dazu gab

man 10 ml Lowicryl in den Erlenmeyerkolben der Edwards-Vakuumanlage. Ein Vakuum wurde angelegt und das Lowicryl auf diese Art für ca. 20 Minuten entgast. Anschließend wurde das entgaste Lowicryl langsam auf die Proben gegeben und die Proben im Vakuum für 48 Stunden bei -25 °C mit dem Einbettmedium durchtränkt. Um sie nach 2 Tagen polymerisieren zu können, mussten die Proben aus der Edwards-Anlage entnommen und in Gelkapseln auf einen vorbereiteten Ständer überführt werden. Die Gelkapseln wurden mit Lowicryl aufgefüllt und in den Metallbehälter der UV-Polymerisationskammer gegeben. Dort verblieben sie ebenfalls 24 Stunden bei -40 °C in flüssigem Methanol, um unter UV-Licht zu polymerisieren. Die Nachpolymerisation erfolgte für 48 Stunden unter UV-Licht bei Raumtemperatur.

Nachdem die ersten Proben auf diese Weise behandelt worden waren und mit den chemisch fixierten Proben verglichen werden konnten, wurde diese Methode jedoch eingestellt. Es zeigte sich, dass die Proben milchig weiß aussahen. Anscheinend war es doch zur Kristallisation gekommen. Vermutlich waren die Proben zu ‚dick‘, da sie mit der Agarose in das flüssige Propan getaucht worden waren. Durch diese Verfärbung war die Probe im Lowicrylblockchen nicht zu lokalisieren. Die chemisch fixierten Proben waren klar im gelblich durchsichtigen Lowicryl zu erkennen. Die Ergebnisse beziehen sich demnach nur auf die Proben, welche der chemischen Methode zuzuordnen sind.

2.2.5.3 Befilmen der Objektträgernetzchen

Bevor mit dem Schneiden der in Lowicryl eingebetteten Proben am Ultramikrotom begonnen werden konnte, mussten die Objektträgernetzchen, auf welchen die Schnitte aufgenommen wurden, zunächst befilmt werden.

Die Objektträgernetzchen (Grids) bestanden aus Kupfer. In dieser Arbeit wurden mit Formvar befilmte 100 Mesh Grids (Objektträgernetzchen mit 100 Maschen) verwendet. Dieser Film bestand aus 0,35%igem Formvar (Polyvinylformaldehyd) und wurde auch als Trägerfolie bezeichnet. Sie zeichnete sich durch eine hohe Stabilität gegenüber mechanischen Einflüssen aus.

Zur Herstellung wurden 0,35 g Formvar in 100 ml Chloroform über 3-4 Stunden auf einem Magnetprüher gelöst. Eine Küvette wurde ca. zur Hälfte mit der Formvarlösung

befüllt. In eine Schale wurde Aqua bidest. gegeben. Zwei Glasobjektträger wurden mit einem sauberen Leinentuch und Wasser sehr gründlich gereinigt, um Staub und andere Verunreinigungen restlos zu entfernen. Nun wurden die sauberen Objektträger für ca. 4 s in die Formvarlösung gestellt. Anschließend hob man die Träger an und beließ sie für 10 s im Chloroformdampf. Unter einer Lampe wurden die Filme getrocknet. Waren die Objektträger trocken, wurde der Film kräftig angehaucht und langsam ins Wasser geführt. Der Formvarfilm sollte sich ablösen und auf der Wasseroberfläche als gräulicher Schleier schwimmen. Trocknete die nicht auf der Wasseroberfläche liegende Seite, wurde der Film fast durchsichtig und die Grids konnten platziert werden (Abb. 25). Um den mit Grids belegten Formvarfilm von der Wasseroberfläche abheben zu können, wurde ein Parafilm langsam auf die Grids gebettet und vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Wasser gezogen. Zum Trocknen wurde der Parafilm in eine Petrischale gelegt. Wichtig war, dass die Grids nach oben zeigten und die Petrischale geschlossen war, um ein unnötiges Einstauben zu vermeiden (Abb. 26).

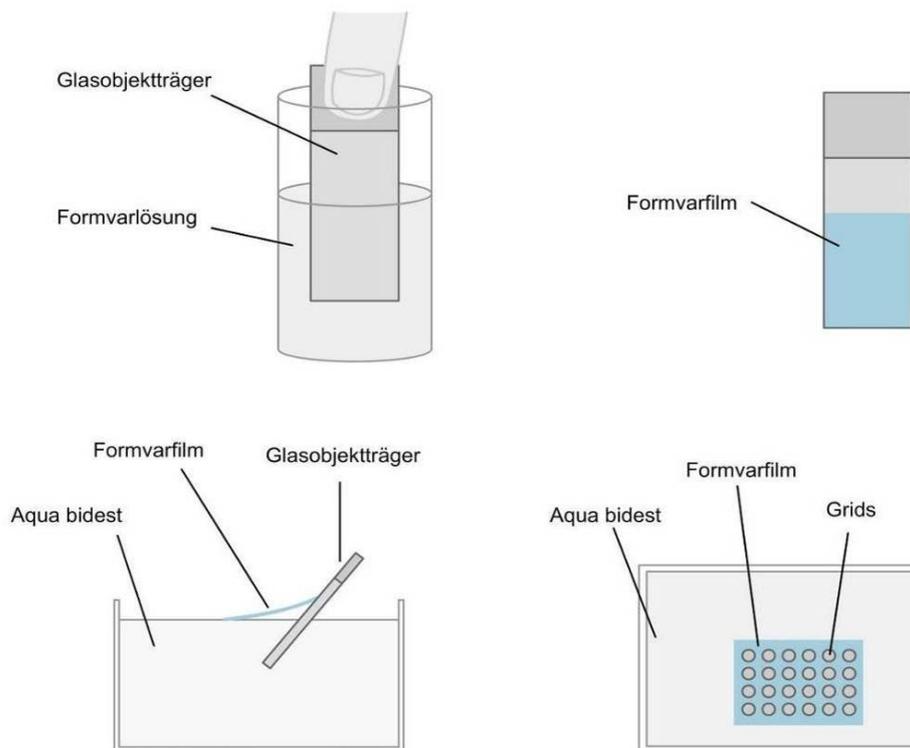


Abb. 25 Schematische Darstellung der Befilmung von Objektträgernetzen

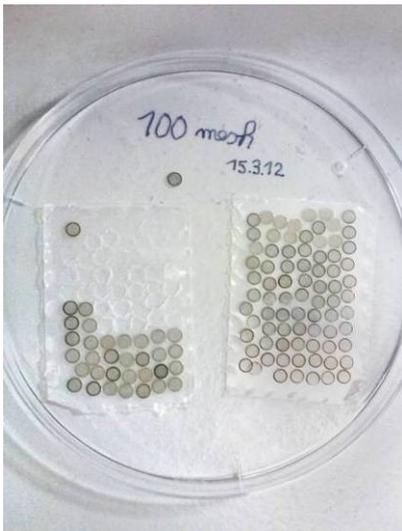


Abb. 26 Mit Grid belegter Parafilm in Petrischale



Abb. 27 Leica Ultracut E, Ultramikrotom

2.2.5.4 Ultradünnschnitte für die Transmissionselektronenmikroskopie

Mit dem Leica Ultracut E, einem Ultramikrotom, konnten gleichmäßige Ultradünnschnitte von ca. 70 nm für die Transmissionselektronenmikroskopie hergestellt werden (Abb. 27).

Um mit dem Schneiden beginnen zu können, wurden die Proben in den Probenhalter eingelegt und fest angezogen. Unter dem Mikroskop suchte man die Probe und spitzte das Lowicrylblockchen um die Probe herum mit einem scharfen Präparationsmesser trapezförmig an. Hierbei wurde eine für Ultradünnschnitte angepasste Form hergestellt.

War die Probe lokalisiert und grob von Lowicrylüberschüssen befreit, wurde sie in den Probenarm gelegt und gut festgezogen. Der Messerblock mit einem Glasmesser wurde ins Mikrotom eingespannt. Wichtig war nun das Glasmesser und die Probe so einzustellen, dass sie in einem für die Ultradünnschnitte günstigen Winkel aufeinander trafen. Mit dem Glasmesser wurde das Blockchen so lange ‚getrimmt‘, bis die Probe erreicht war. Dies geschah in ca. 1 μm Schritten.

Anschließend wurde das Glasmesser entfernt und ein Diamantmesser mit breiter Schneide eingespannt. Es diente dem Schneiden von Semidünnschnitten. Mit Hilfe des Lichtspaltes wurde der Diamant möglichst nah und gerade an die angeschnittene Probe

platziert. Der Messertrog war mit destilliertem Wasser gefüllt. Es musste aufgrund der hydrophilen Eigenschaften des Lowicryl ein abgesenkter Wasserspiegel im Trog vorherrschen. Das Mikrotom schnitt Semidünnschnitte, welche auf der Wasseroberfläche des Messertroges schwammen. Mit einem Rothaarmarderpinsel oder besser einem Pinsel aus weißem Dalmatinerhaar wurden je 3 Schnitte auf einen Glasobjektträger aufgezogen. Diese trockneten auf der warmen Heizplatte.

Um nun die Schnitte beurteilen zu können, wurden sie mit einer Übersichtsfärbung mit Toluidinblau als Schnellfärbung sichtbar gemacht. Durch Toluidinblau wurden basophile (z.B. Zellkern) und osmiophile Strukturen der Probe blau angefärbt. Toluidinblau wurde mit Hilfe einer Spritze auf die Proben aufgebracht und 1 Minute auf der 60 °C warmen Heizplatte inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger mit Aqua bidest. gespült und erneut auf der Heizplatte trocknen gelassen. Unter dem Mikroskop war die Probe nun gut sichtbar und konnte auf ihre Vollständigkeit hin überprüft werden. War die Probe komplett angeschnitten und befanden sich keine Risse oder Falten darin, konnte mit dem Ultradünnschneiden begonnen werden.

Dazu wurde ein Diamantmesser mit schmaler Schneide in das Mikrotom eingespannt und ebenso wie der Diamant für die Semidünnschnitte so nah und gerade wie möglich zur angeschnittenen Probenfläche ausgerichtet. Hierzu war der Lichtspalt ein sehr nützliches Hilfsmittel. Wenn die Schnitte auf der Wasseroberfläche im Messertrog silbrig/golden schimmerten, konnte begonnen werden. Die Interferenzfarbe der Ultradünnschnitte gab in Näherung die Dicke der geschnittenen Probe an. Es war darauf zu achten, dass die Schnitte eine silbrige Interferenz hatten, da sie dann eine gut brauchbare Schichtstärke aufwiesen (ca. 70-80 nm) (Abb. 28 und 29).



Abb. 28 Ultracut mit eingespannter Probe und Diamantmesser

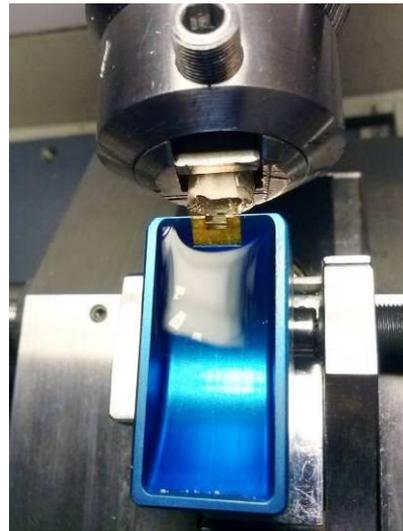


Abb. 29 Ultradünnschnitte auf der Wasseroberfläche des Messertroges

Mehrere Ultradünnschnitte mit einer Schnittstärke von ca. 70-80 nm wurden hergestellt. Die Schnitte glitten erneut auf die Wasseroberfläche des Messertroges, von welcher sie mit befilmten Objektträgernetzchen (Grids) gefischt wurden.

Nach dem Abfischen der Ultradünnschnitte von der Wasseroberfläche, wurde das Grid so eben auf den Rand eines Fotoklebers auf dem Rundfilterpapier gesetzt, welches in einer unsterilen Petrischale fixiert war (Abb. 30).

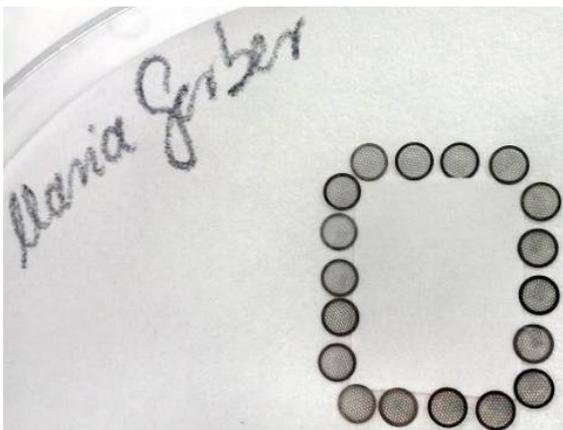


Abb. 30 Ultradünnschnitte auf Grids

2.2.5.5 Immunogoldmarkierung

Die ultradünn geschnittenen, in Lowicryl eingebetteten Proben wurden in dieser Arbeit mit Goldkügelchen ($\varnothing \sim 20$ nm) markiert und nach Reynolds [1963] kontrastiert, um sie anschließend unter dem TEM auszuwerten.

Diese Art der Mikroskopie ermöglichte es, hochauflösende Bilder von Proben auf zellulärer und subzellulärer Ebene zu erhalten. Die biologischen Proben mussten dazu fixiert, entwässert, eingebettet, ultradünn geschnitten, mit Goldkügelchen markiert und mit Schwermetallsalzen (z.B. Uranylacetat, Bleicitrat) kontrastiert sein.

Dafür wurden die Proben für 15 Minuten auf einen Tropfen 5%iges BSA in PBS-BSA (pH 7,4) gegeben. Dies erfolgte in kleinen, mit Wachs ausgegossenen Petrischalen als feuchte Kammern (Abb. 31). Es folgten die primären Antikörper, welche in PBS-BSA (pH 7,4) verdünnt über 2 Stunden einwirkten. In Vorversuchen wurden mit allen Antikörpern Verdünnungsreihen durchgeführt und die Verdünnungen 1/50, 1/100, 1/200 und 1/400 getestet. Die Verdünnung mit den aussagekräftigsten Ergebnissen wurde für die Hauptversuche übernommen. Die Collagen I Antikörper wurden in eine Verdünnung von 1:50, die Osteonectin Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 und die Osteopontin Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Danach wurden die Proben fünf Mal für 5 Minuten in einem Tropfen PBS-BSA (pH 7,4) auf Parafilm gewaschen (Abb. 32).

Im Anschluss wurde für 5 Minuten ein Tris-BSA Puffer (pH 8,2) zum Waschen verwendet, da die sekundären Antikörper mit Tris-BSA Puffer um 1:100 verdünnt waren.

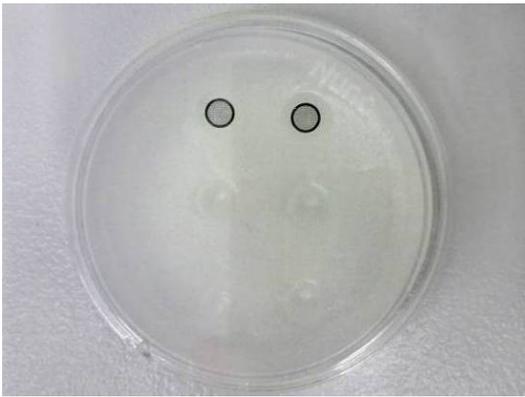


Abb. 31 Grids in Petrischale als feuchte Kammer



Abb. 32 Grids auf Wassertropfen zum Waschen

Nun wurde der sekundäre, mit Goldkügelchen gekoppelte Antikörper (Abb. 33) verdünnt in Tris-BSA (pH 8,2) für 1 Stunde auf die Proben gegeben. War diese Zeit verstrichen, folgte erneut das fünfmalige Waschen, diesmal jedoch mit Tris-BSA (pH 8,2) für je 5 Minuten. Dann wurde ebenfalls für 5 Minuten mit Aqua bidest. gewaschen und die Probe ganz vorsichtig mit einer Spritzflasche mit Aqua bidest. abgespült.

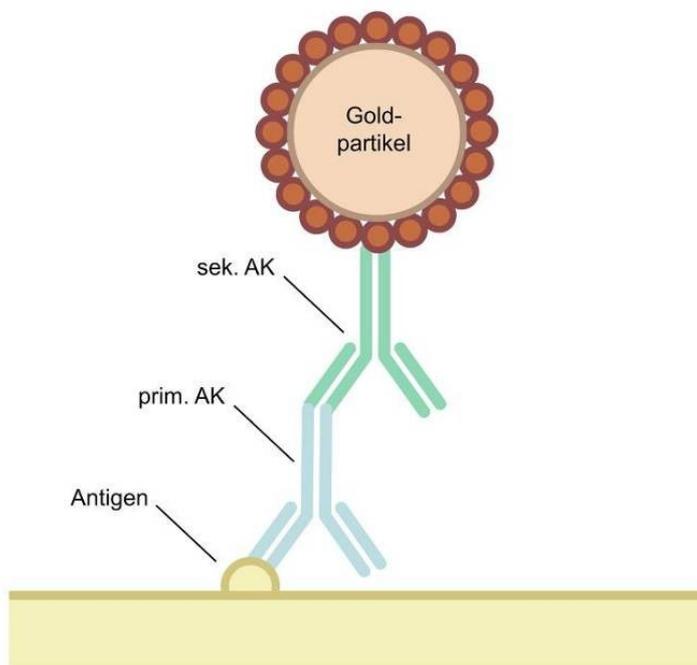


Abb. 33 Schematische Darstellung eines mit Gold gekoppelten sekundären Antikörpers

2.2.5.6 Schnittkontrastierung

Die Schnittkontrastierung der ultradünn geschnittenen und immunogoldmarkierten Proben erfolgte im Standardverfahren nach Reynolds [1963] mit Uranylacetat und Bleicitrat.

Der mit Alufolie abgedunkelte Boden einer Petrischale wurde mit Parafilm ausgekleidet und die befilmten Grids wurden mit den Proben nach oben hineingelegt. Auf die Proben pipettierte man nun mehrere isolierte Tropfen 2%iges Uranylacetat. Dieses verweilte für 3 bis 5 Minuten auf den Ultradünnschnitten. Anschließend folgte eine Spülung mit Aqua bidest. Die Objektträgernetze wurden hierzu mit einer Pinzette vorsichtig aufgenommen, gespült und mit Filterpapier getrocknet.

Die Petrischale wurde erneut mit Parafilm ausgelegt und am Rand wurden Natriumhydroxid-Plättchen verteilt (Abb. 34). Diese verhinderten eine Reaktion zwischen dem Stickstoff der Luft und dem Bleicitrat zu Bleinitrat, welches als Niederschlag die Proben verunreinigt hätte. Die Grids wurden mit der Pinzette für 5 bis 15 Sekunden in einen Tropfen Bleicitrat gehalten. Wiederum wurden sie mit Aqua bidest. gespült und mit Filterpapier getrocknet.

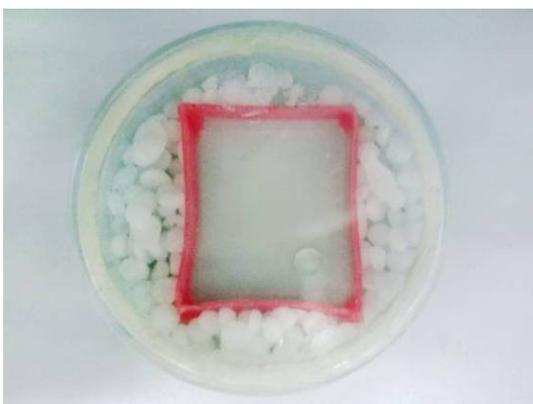


Abb. 34 Petrischale mit einem Tropfen Bleicitrat

Anschließend wurden die Netzchen unter dem Transmissionselektronenmikroskop (TM902 der Firma Zeiss) betrachtet und für die Auswertung Aufnahmen angefertigt.

2.2.6 Ultrastrukturelle rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Proben für die Rasterelektronenmikroskopie wurden nach denselben Methoden fixiert, voreingebettet und entwässert, wie in den Kapiteln 2.2.5.1, 2.2.5.2.1 und 2.2.5.2.2 unter ‚chemische Methode‘ beschrieben wurde. Sie wurden zur Auswertung unter dem REM bei unterschiedlichen Vergrößerungen betrachtet.

Um den Restwasseranteil aus den Proben zu entfernen, wurden sie für 30 Minuten in ein 1:1 Gemisch aus HMDS (Hexamethyldisilazan) und Isopropanol gegeben. Anschließend wurden sie für 12 Stunden unter dem Abzug in 100% HMDS getrocknet. Die vollständig entwässerten Proben wurden auf Leit-Tabs Stiftprobentellern befestigt.

2.2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die lichtmikroskopisch ausgewerteten Mikromassenkulturen herangezogen. Für den Mittelwert und die Standardabweichung wurde mit Microsoft Office Excel 2007 gearbeitet. Der Mann-Whitney U-Test wurde mit SPSS Statistics 23 durchgeführt.

Die Mikromassenkulturen wurden zu definierten Zeitpunkten unter dem Lichtmikroskop (Axioplan 2 der Firma Carl Zeiss MicroImaging GmbH) ausgewertet, gemessen und die Werte wurden notiert. Aus diesen Werten wurden der Mittelwert des Durchmessers in μm (größter und kleinster Durchmesser gemittelt), die Streuung (Standardabweichung) sowie der Bereich (Minimum – Maximum) bestimmt, welche in Tab. 1 deskriptiv dargestellt sind.

Zur quantitativen Einstufung der Expression der Matrixproteine wurden stichprobenartig zwei bis drei Bereiche jeder Mikromassenkultur betrachtet und mehrheitlich das Verhältnis von angefärbten zu nicht angefärbten Zellen bestimmt. Für die Mikromassenkulturen mit unterschiedlicher Dichte wurde Bereiche aus den verschiedenen Dichten gewählt. Die Einstufung erfolgte in 5 Kategorien. Mit 0 wurden Bereiche beschrieben, in denen weniger als 5 % der Zellen angefärbt waren. In + Bereichen waren 5-25 % der Zellen angefärbt. ++ entsprach einer 25-50 %igen, +++ einer 50-75

%igen Quote. Mit ++++ sind Bereiche mit über 75 % angefärbter Zellen beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 – 4 dargestellt.

Um zu überprüfen, ob sich die Zahl der entsprechend angefärbten Zellen signifikant vom Ausgangswert (30 Minuten) unterscheidet, wurden die beobachteten Messwerte der 32 Mikromassenkulturen eines jedem Beobachtungszeitpunktes in 5 Kategorien eingeteilt und mit 0 bis 4 codiert. Veränderungen zwischen einem Zeitpunkt und dem Ausgangswert wurden mit Hilfe des rang-statistischen U-Test nach Mann und Whitney überprüft. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

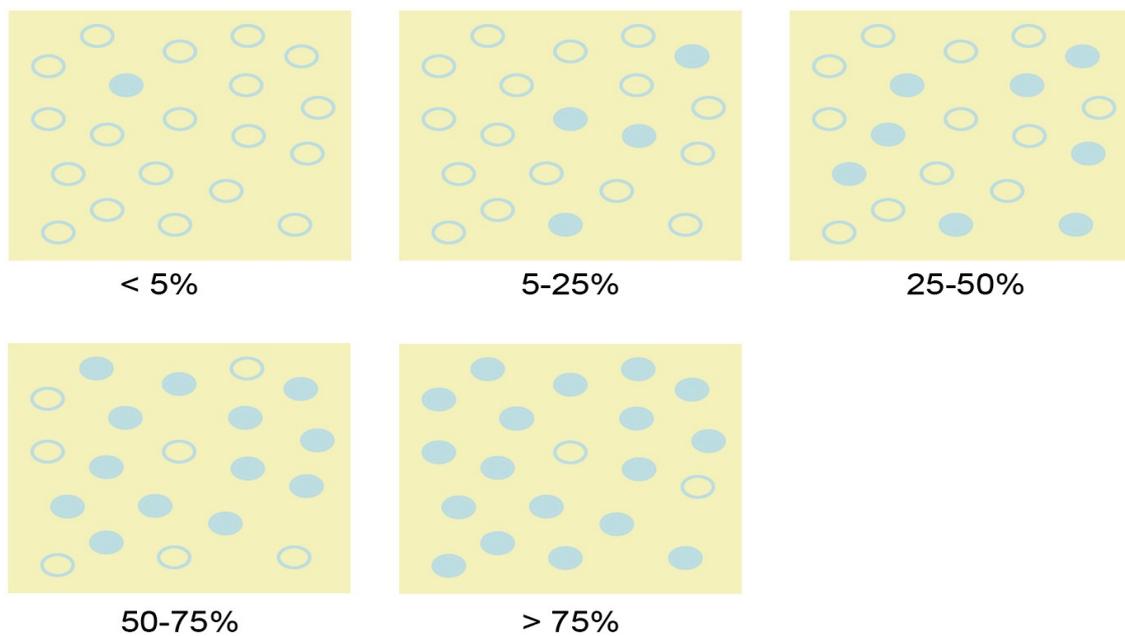


Abb. 35 Schematische Darstellung der Intervalle der quantitativen Einstufung der Menge der gebildeten Matrixproteine

3 Ergebnisse

Die Gewinnung der Osteoblasten erfolgte aus dem Periost boviner Metacarpi. Nach 21 Tagen in einer Kulturschale konnten die Zellen abgelöst und passagiert werden. Sie wurden in eine 96-Well-Platte gegeben, je 200.000 Zellen pro Well. Für jede Untersuchungsmethode wurden bei jedem Versuchsdurchgang 8 Mikromassenkulturen pro Zeitpunkt verwendet (lichtmikroskopisch 4-mal; elektronenmikroskopisch 2-mal). Aus dieser Anzahl an Mikromassenkulturen ergibt sich die Fallzahl n pro Zeitpunkt (lichtmikroskopisch $n=32$, elektronenmikroskopisch $n=16$). Die Ergebnisse stimmen in allen Wiederholungen qualitativ überein.

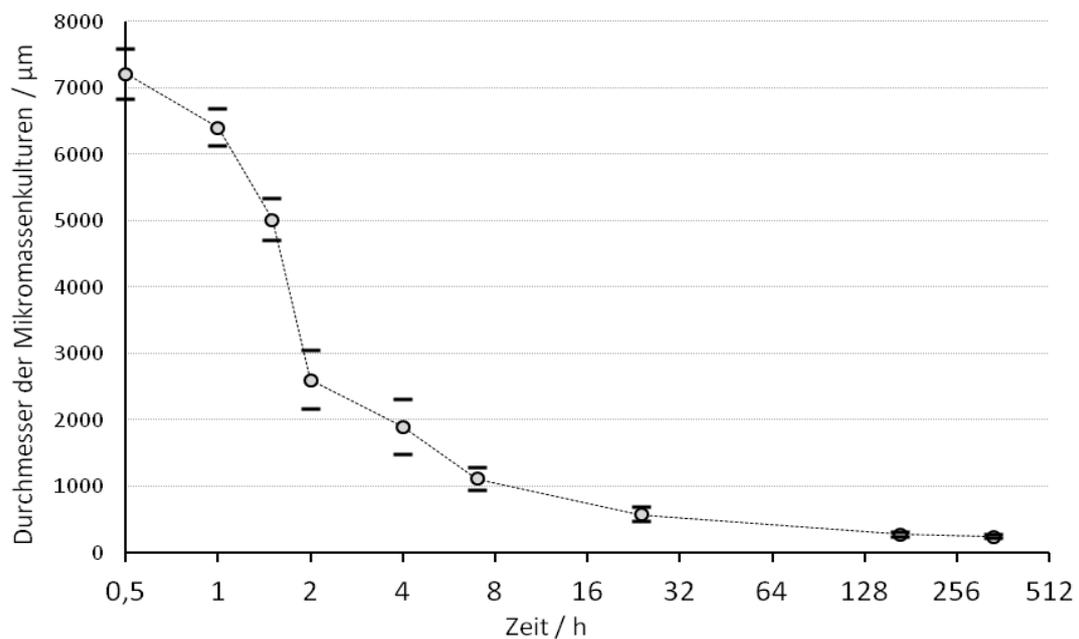
Bereits nach 30 Minuten war unter dem Lichtmikroskop zu erkennen, dass die Zellen sich zueinander hin bewegt hatten. Die Zellen strömten einem Schwerpunkt entgegen. Die Zellwanderung wurde zu allen Fixierzeitpunkten unter dem Mikroskop betrachtet, und es konnte ein Fortschreiten der Zellaggregation beobachtet werden. Die Mittelwerte der Durchmesser und die Streuung zum jeweiligen Fixierzeitpunkt sind in Tab. 1 sowie Abb. 36 dargestellt.

Bei einer Fallzahl von $n=32$ sind Mittelwert-Unterschiede ab einer halben Standardabweichung oder mehr statistisch signifikant ($p<0,05$; Student's t-test).

Tab. 1 Mittelwert, Streuung (Standardabweichung) und Bereich (Minimum-Maximum) des Durchmessers der Zellansammlungen in Abhängigkeit vom Fixierzeitpunkt; (n ~ Anzahl der Mikromassenkulturen)

Fixierzeitpunkt	n	Mittelwert	Streuung	Bereich
30 Minuten	32	7217 μm	380	6780-7700
60 Minuten	32	6405 μm	281	6135-7001
90 Minuten	32	5019 μm	309	4690-5605
2 Stunden	32	2600 μm	441	2180-3280
4 Stunden	32	1898 μm	417	1365-2437
7 Stunden	32	1115 μm	176	978-1500
1 Tag	32	579 μm	102	420-800
7 Tage	32	275 μm	36	232-342
14 Tage	32	243 μm	30	212-320

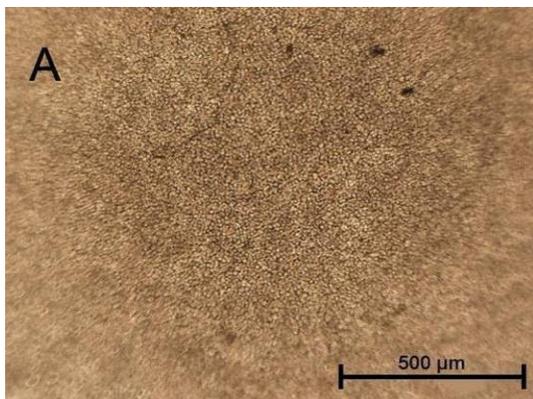
Abb. 36 Mittelwert und Standardabweichung des Durchmessers der Osteoblastenansammlungen in Abhängigkeit vom Zeitraum zwischen Aussiedlung und Fixierung. Die Abszisse ist logarithmisch skaliert; die Fehlerbalken zeigen die zweifache Standardabweichung. Die durchgezogene Linie dient lediglich der Augenführung



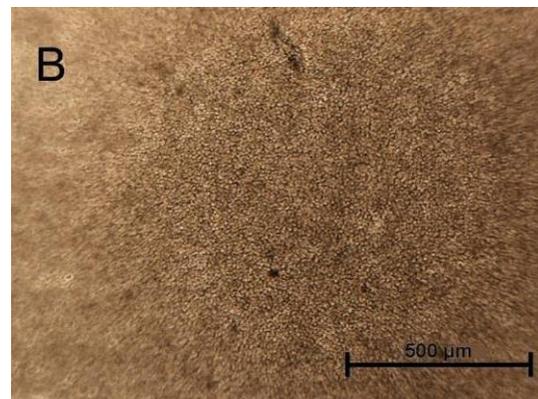
3.1 Übersicht der Mikromassenkulturen auf Agarose

Es wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Mikromassenkulturen unmittelbar vor den Fixierzeitpunkten unter dem Umkehrmikroskop (Diaphot-TMD der Firma Nikon mit der Kamera DS-Fi1 von Nikon) angefertigt. Es wurde eine 4fache Vergrößerung gewählt. Die Kulturen befanden sich zu dem Zeitpunkt der Aufnahme noch in den mit Agarose beschichteten 96-Well-Platten. Die Fixierzeitpunkte waren nach 30, 60, 90, 120, 240 und 420 Minuten sowie nach 1, 7 und 14 Tagen festgesetzt.

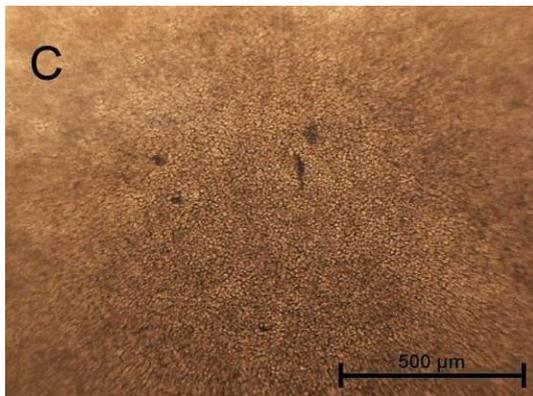
Abb. 37 Lichtmikroskopische Aufnahmen mit 4facher Vergrößerung von aggregierenden Zellen auf Agarose unmittelbar vor der Fixierung (nicht gefärbt)



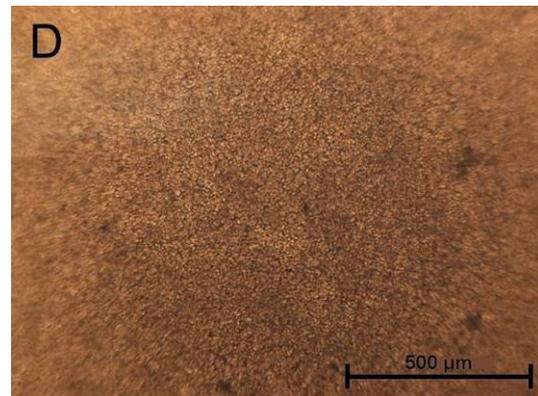
nach 30 Minuten



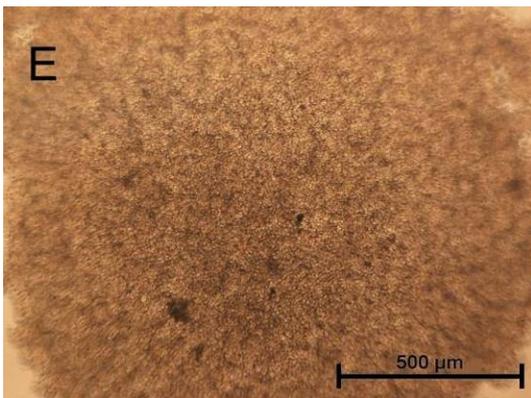
nach 60 Minuten



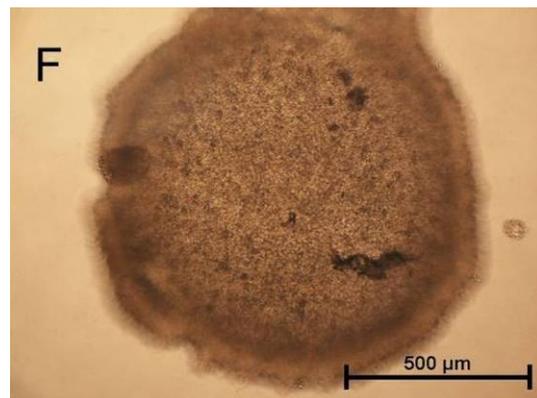
nach 90 Minuten



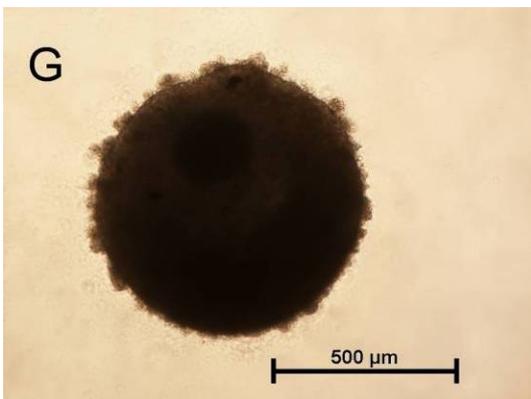
nach 120 Minuten



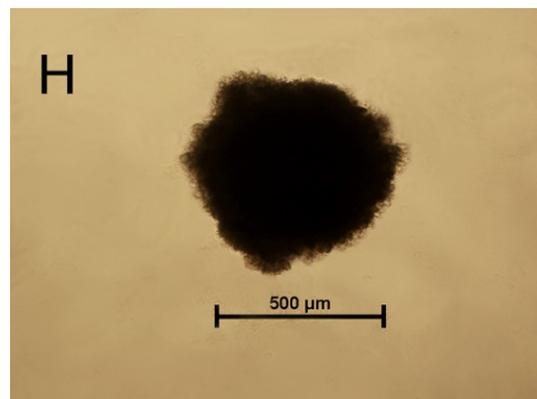
nach 240 Minuten



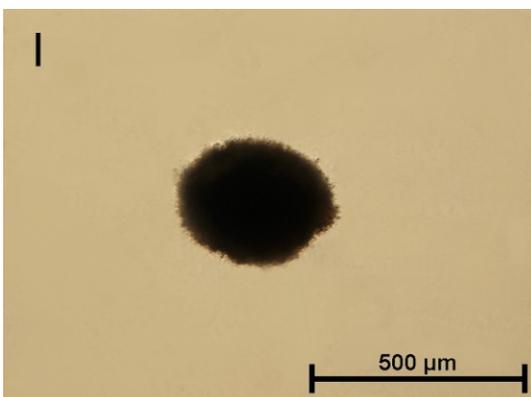
nach 420 Minuten



nach 1 Tag



nach 7 Tagen



nach 14 Tagen

30 Minuten (A)

Bereits 30 Minuten nach Aussiedelung der Osteoblasten in die 96-Well-Platten zeigten sich erste Zellverdichtungen. Diese fanden sich meist in der Mitte des Well, in welcher zudem vereinzelt Zellaggregationen sichtbar waren. Die Zellzahl in den Randbereichen wurde deutlich weniger.

60 Minuten (B)

Nach 60 Minuten konzentrierten sich die Zellen deutlich mehr zum Schwerpunkt der gesamten Zellen. Die Ränder waren fast vollständig frei von Zellen. Es zeigten sich deutlich mehr Zellaggregationen, an welchen zudem mehr Zellen beteiligt waren.

90 Minuten (C)

Nach 90 Minuten befanden sich an den Rändern des Well vereinzelte Zellen. Die Aggregate wurden größer und wanderten weiter in Richtung des lokalen Schwerpunktes des Well.

120 Minuten (D)

Bereits nach 2 Stunden deutete sich die Bildung mehrschichtiger Zellaggregate an. Diese sind auf dem Bild an den dunkleren Bereichen zu erkennen, welche auf eine Mehrschichtigkeit der Zellen hindeuteten. Der große Teil der Zellen hatte sich zu einem noch losen Netzwerk zusammengeslossen, in welchem noch deutlich zellfreie Bereiche zu sehen waren. Es lagen nur noch vereinzelt ‚freie‘ Zellen vor.

240 Minuten (E)

Nach 4 Stunden schlossen sich vermehrt die zellfreien Bereiche, und es zeigte sich eine fast alle Zellen einschließende Zellaggregation. Diese war ebenfalls als dreidimensional anzusehen.

420 Minuten (F)

Nach 7 Stunden ließ sich bei 4facher Vergrößerung bereits eine Mikromassenkultur (äußerliche Verbindung von Elementen, hier Zellen) erahnen. Die Zellen schlossen sich zu einem runden Gebilde zusammen, welches einzelne, zelldichtere Bereiche aufwies. Die Mikromassenkultur war klar von der Umgebung abzugrenzen.

1 Tag (G)

Die 24 Stunden zuvor in eine 96-Well-Platte mit Leibovitz-Medium ausgesiedelten Osteoblasten schließen sich zu rundlichen Mikromassenkultur zusammen. Sie sind stabil und können mit einer Pipette bewegt werden, ohne dass die Zellen auseinanderdriften. Sie haben einen Durchmesser von etwa 600 - 700µm. Die lokale Mitte, der Schwerpunkt dieser Spheres, ist vollständig mit Zellen ausgefüllt, welche jedoch unter dem Mikroskop noch lichtdurchlässig sind. Dies lässt darauf schließen, dass die Dichte der Zellen nicht sehr hoch ist. Es ist eine unregelmäßige Struktur zu erkennen. In den dunkleren Bereichen sind die Zellen dichter angesiedelt als in den etwas helleren Bereichen.

7 Tage (H)

Nach 7 Tagen zentrieren sich die Osteoblasten weiter in dem lokalen Schwerpunkt, welcher sich deutlich dunkler abzeichnet. Dies lässt auf eine sphärische, kugelige Form schließen. Die Zelldichte im Inneren ist höher als an der Peripherie; dort werden sie etwas lichter. Im Randbereich unmittelbar um den Kern herum zeigt sich wiederum eine wolkige Struktur, welche die Folgerung zulässt, dass eine vermehrte Dichte der Zellen in den dunkleren Bereichen besteht. Die Spheres sind etwa halb so groß im Durchmesser als die Spheres nach einem Tag. Nach 7 Tagen beträgt der Durchmesser ca. 500 µm.

14 Tage (I)

Nach 14 Tagen sind die Spheres nur noch etwa halb so groß wie nach sieben Tagen. Die Zellen verdichten sich im lokalen Schwerpunkt deutlich und bilden eine kreisförmige, rundlichere Form. Der um den Kern befindliche Bereich ist mit einzeln erkennbaren Zellen gesäumt, welche zum Sphere hinströmen. Dieser Bereich hat sich jedoch auch deutlich verkleinert. Er wird von der Peripherie zum Sphere hin dunkler und somit zellreicher.

Resümee

Im zeitlichen Verlauf verändern die Spheres ihre Form, ihre Größe und ihre Zelldichte. Nach 1 Tag zeigen sie sich eher flach und kreisförmig, wohingegen nach 14 Tagen eine

kugelige Form vorliegt. Im Laufe der 14 Tage werden die Zellverbände im Durchmesser immer kleiner und die Zelldichte nimmt zu.

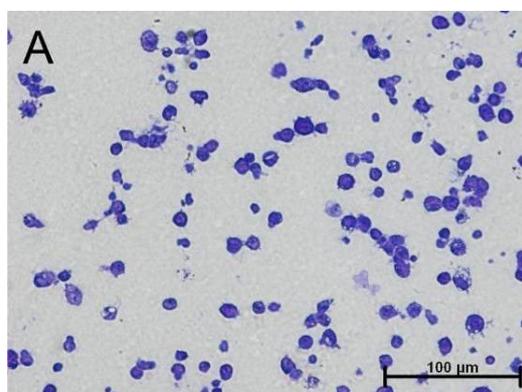
3.2 Übersicht der fixierten Mikromassenkulturen

3.2.1 Toluidinblau gefärbte Semidünnschnitte

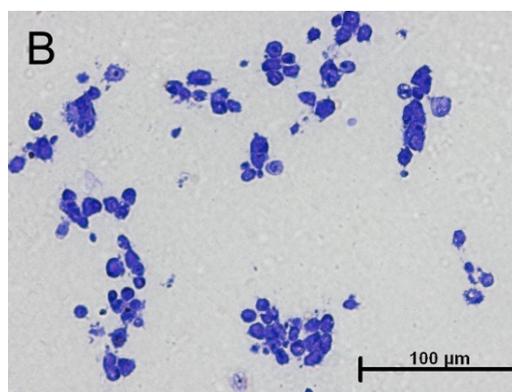
Bevor die in Lowicryl eingebetteten Proben mit dem Mikrotom ultradünn geschnitten wurden, war nachzuweisen, dass sich in der angeschnittenen Fläche Zellen befanden, welche anschließend untersucht werden konnten. Zu diesem Zweck wurden Semidünnschnitte angefertigt, auf Glasträger gezogen und mit Toluidinblau, einer Übersichtsfärbung, angefärbt. Gleichzeitig konnten so die Anordnung der Zellen, die Form der Zellanhäufung und das Fortschreiten der Aggregation der Zellen beurteilt werden (Veränderung durch Fixierung möglich). Bei nicht fixierten und zeitlich terminiert fixierten Proben lagen dieselben Ergebnisse bei der Sphärebildung vor. Die Zellaggregationen wurden nicht oder gering verändert, selbst bei den eher losen Zellverbänden.

Die in diesem Unterpunkt gezeigten Bilder sowie die lichtmikroskopischen Aufnahmen in Kapitel 3.3 wurden zur Auswertung unter dem Lichtmikroskop (Axioplan 2 der Firma Carl Zeiss MicroImaging GmbH) betrachtet. Alle lichtmikroskopischen Abbildungen in dieser Arbeit wurden mit der Kamera AxioCam MRC der Firma Carl Zeiss MicroImaging GmbH aufgenommen.

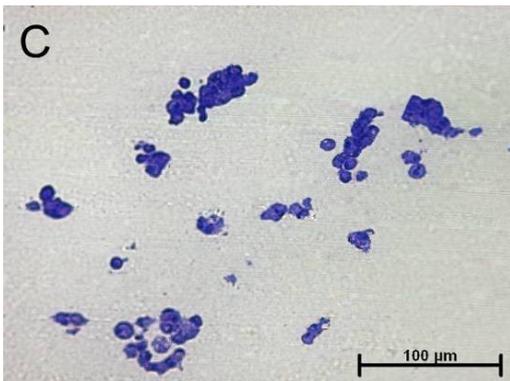
Abb. 38 Lichtmikroskopische Aufnahme mit 20facher Vergrößerung von, mit Toluidinblau angefärbten, Zellen; Semidünnschnitt



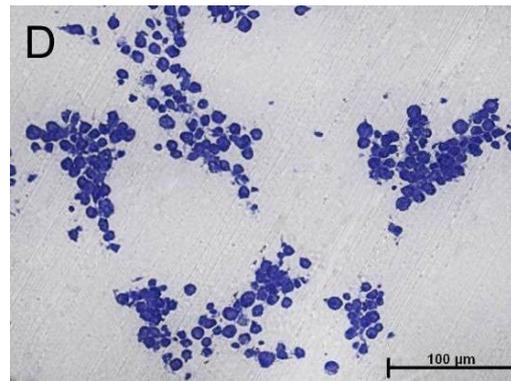
nach 30 Minuten



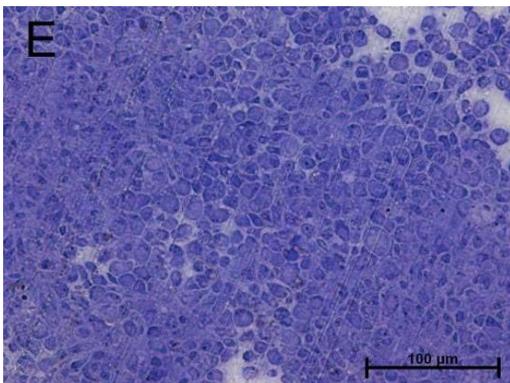
nach 60 Minuten



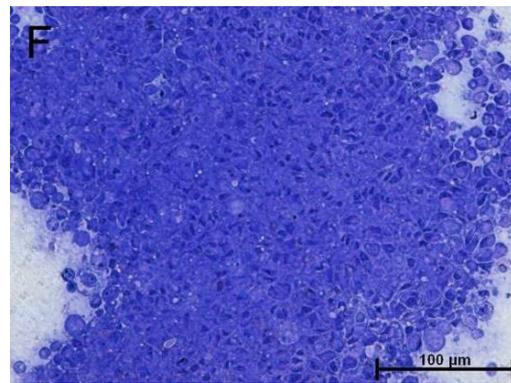
nach 90 Minuten



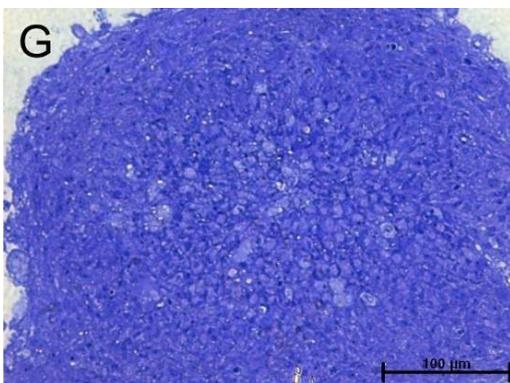
nach 120 Minuten



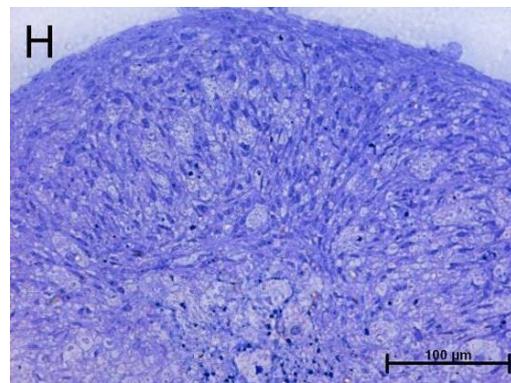
nach 240 Minuten



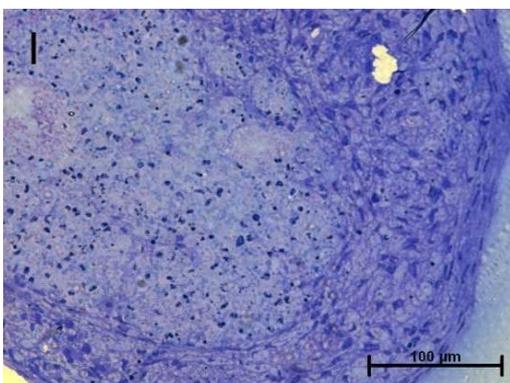
nach 420 Minuten



nach 1 Tag



nach 7 Tagen



nach 14 Tagen

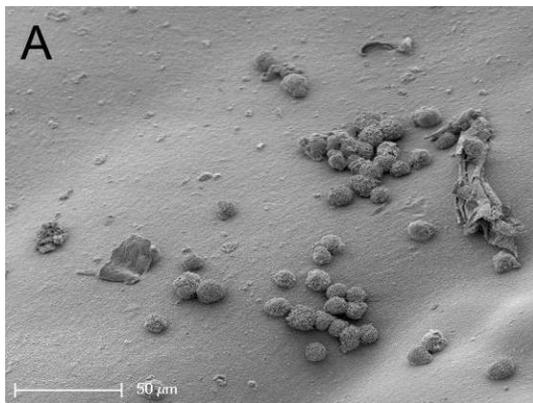
Diese Übersichtsfärbung mit Toluidinblau bestätigte die Ergebnisse der Übersicht der Mikromassenkulturen. Die nach 30 Minuten fixierten Osteoblasten zeigten bereits erste Zellverdichtungen und Aggregationen vereinzelter Zellen. Nach 60, 90 und 120 Minuten wurden die Zellzusammenschlüsse deutlich größer, enthielten zunehmend mehr Zellen und die singulären Osteoblasten nahmen sichtbar ab. Dies steigerte sich auch nach 4 Stunden. In einer hier nicht abgebildeten Aufnahme, welche einen Längsschnitt durch den entstandenen Sphere zeigte, wurde deutlich, dass die Spheres in der Entstehung primär flach bzw. fladenartig waren. Nach 7 Stunden wurde ihre Form rundlicher und kugelähnlich. Die Zellen rückten noch enger zusammen. Nach 1 Tag entstand eine sphärische Form mit eher runden Zellen in der Mitte der Spheres und abgeflachten Zellen an der Peripherie der Spheres. Nach 7 bzw. 14 Tagen verdichteten sich die Zellen weiter, wodurch der Durchmesser der Spheres kleiner wurde.

Im zeitlichen Verlauf veränderten die Spheres ihre Form, ihre Größe und ihre Zelldichte. Im Laufe der 14 Tage wurden die Zellverbände im Durchmesser immer kleiner und die Zelldichte nahm zu. Die Zellen strebten einem Verbund und einer kugeligen Form entgegen. Das Auftreten der extrazellulären Matrix variierte in Abhängigkeit von der Kulturdauer und der Lage im Sphere. Mit zunehmender Kulturdauer der Spheres stieg auch der Anteil an extrazellulärer Matrix. Im Kern der Spheres war im Gegensatz zum Randbereich deutlich mehr extrazelluläre Matrix zu erkennen (Abb. 2I).

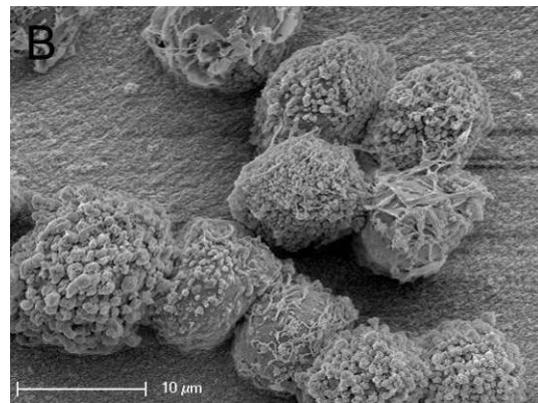
3.2.2 Auswertung der REM-Aufnahmen

Die im Folgenden gezeigten Bilder wurden zur Auswertung unter dem Rasterelektronenmikroskop (ESEM XL 30 der Firma Philips) betrachtet. Der Arbeitsabstand betrug 7,5mm, die Beschleunigungsspannung 5,0 kV. Alle rasterelektronenmikroskopischen Abbildungen in dieser Arbeit wurden unter Verwendung eines Everhart-Thornley-Detektors aufgenommen. Eine separate Kamera ist bei diesem Gerät nicht erforderlich.

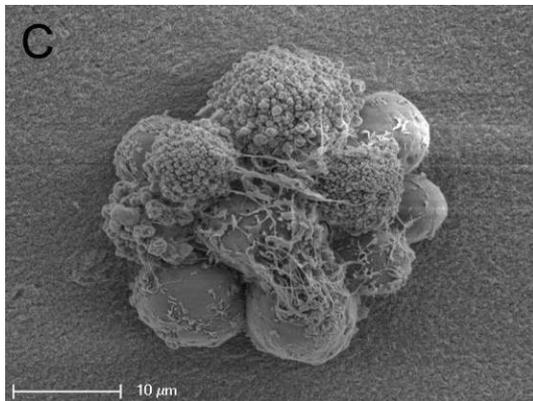
Abb. 39 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von mit 2nm Platin besputterten Osteoblasten (mit Dank an Dr. Jörg Neunzehn, TU Dresden)



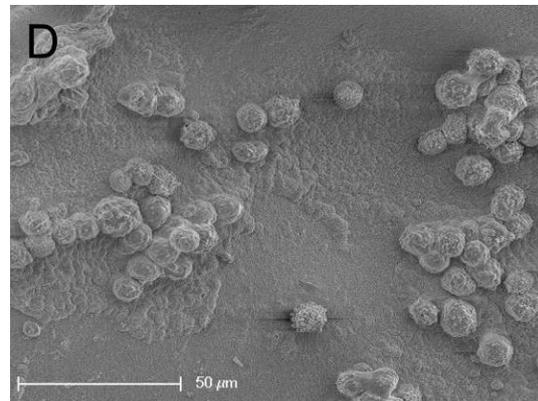
nach 30 Minuten



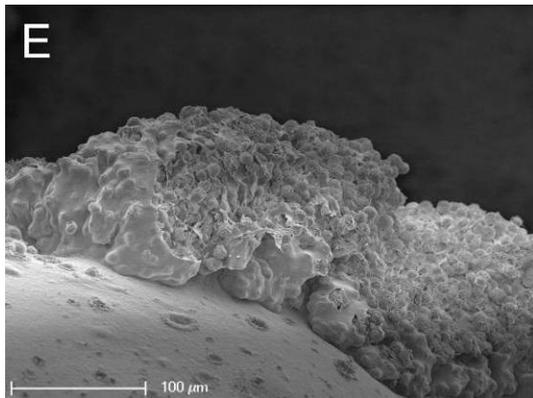
nach 30 Minuten



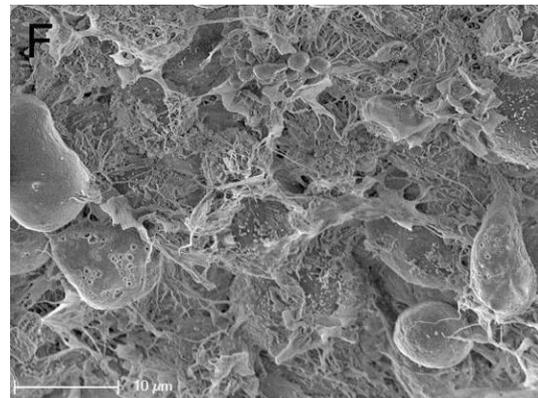
nach 60 Minuten



nach 90 Minuten



nach 120 Minuten



nach 240 Minuten

Die nach 30 Minuten fixierten Osteoblasten zeigten bereits erste, vereinzelte Zellzusammenschlüsse (A, B). Die Zellen lagerten sich in einer Ebene aneinander. Bereits nach 60 Minuten ließen sich erste dreidimensionale Zellaggregationen erkennen (C), welche sich schon zu diesem frühen Zeitpunkt rundlich darstellten. Nach 90 Minuten wurden die Zellzusammenschlüsse deutlich größer, enthielten zunehmend mehr Zellen

und blieben dreidimensional (D). In Abbildung E ist eine Übersichtsaufnahme von einem Zellzusammenschluss nach 120 Minuten zu sehen. Schon zu dieser Zeit konnte von einem Sphere gesprochen werden. Die Zellen lagerten sich zu wenigen, bereits verbundenen Aggregaten zusammen. Es waren keine einzelnen Zellen mehr zu erkennen. Deutlich hob sich der Sphere vom eher flachen Untergrund ab. Nach 240 Minuten (F) zeigten sich noch dichtere Zellzusammenschlüsse (ein Sphere). Die Zellen waren komplett von extrazellulärer Matrix umgeben.

3.3 Auswertung der lichtmikroskopischen Aufnahmen

Nachdem die Spheres zu den jeweiligen Zeitpunkten mit 4%igem Formalin fixiert und in HistoGelTM eingefügt worden waren, konnten sie einzeln in Paraffin eingebettet werden. Mit einem Rotationsmikrotom wurden 4µm dünne Serienschnitte hergestellt. Die Charakterisierung der Expressionsmuster und der Struktur der von den Osteoblasten in den jeweiligen Versuchszeiträumen exprimierten Proteine erfolgte anhand einer Analyse der ausgewählten, immunhistochemisch markierten Matrixproteine Osteonectin, Collagen Typ I, Osteopontin und Osteocalcin. Durch die immunhistochemische Markierung wurde das Vorhandensein der Matrixproteine durch eine in Intensität und Verteilung differenzierte Rotfärbung dargestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2-4 zusammengefasst.

Unter dem Lichtmikroskop sind bereits nach einem Tag deutlich zwei unterschiedliche Zellformen zu erkennen. Der Sphere wird umgeben von einer 1- bis 2-reihigen Zellschicht, welche eine flache und längliche Form aufweisen. Im Inneren des Sphere zeigen sich die Zellen deutlich größer und haben eine kubische Form.

3.3.1 Osteonectin

Abb. 40 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Mikromassenkulturen, immunhistochemische Färbung für Osteonectin (Monoclonal Antibody to bovine Osteonectin / SPARC, mouse IgG)

10fache Vergrößerung

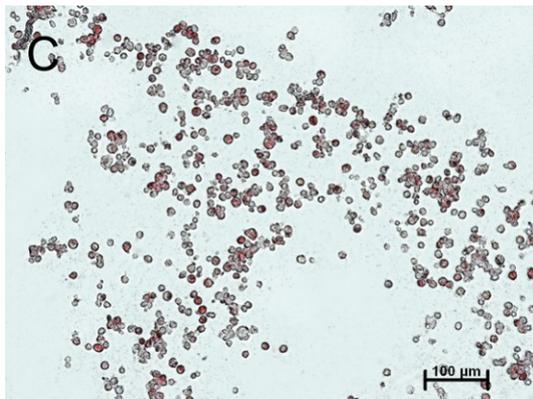


nach 30 Minuten

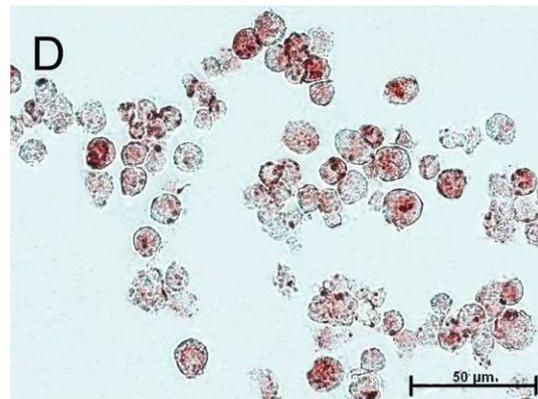
40fache Vergrößerung



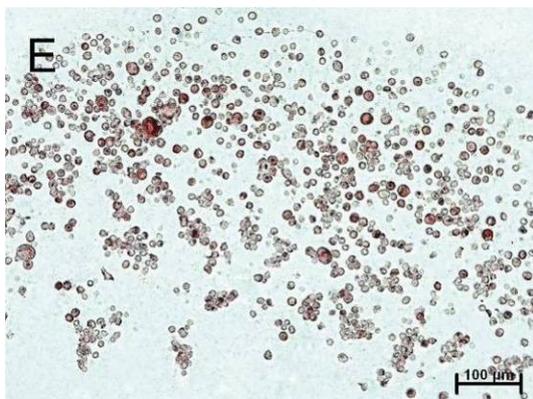
nach 30 Minuten



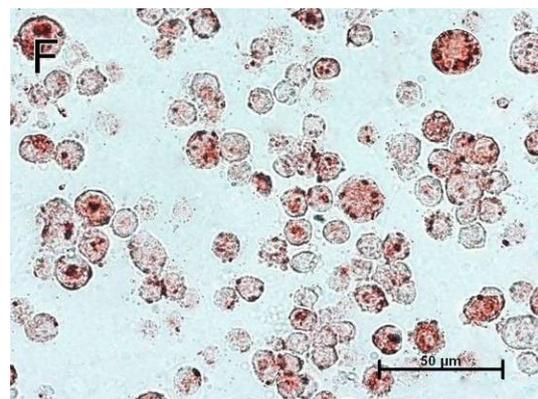
nach 60 Minuten



nach 60 Minuten

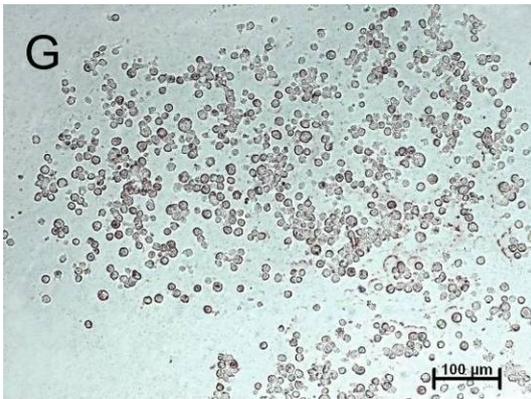


nach 90 Minuten

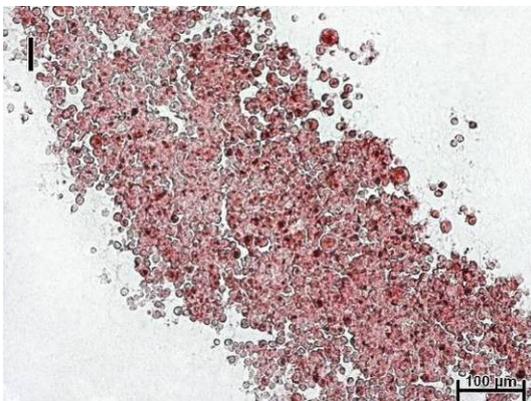


nach 90 Minuten

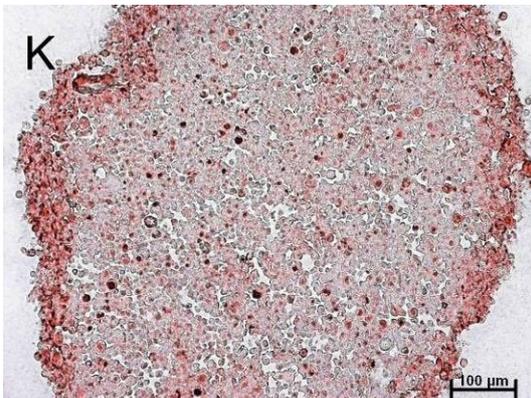
10fache Vergrößerung



nach 2 Stunden

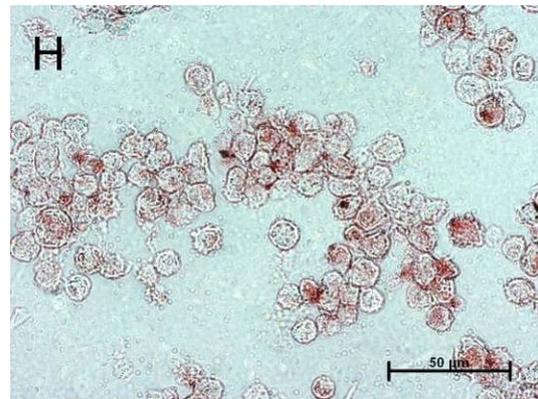


nach 4 Stunden

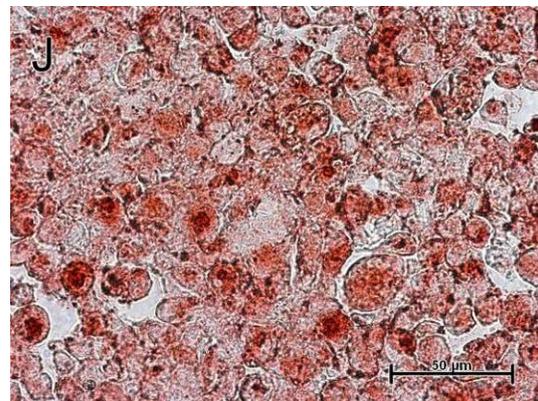


nach 7 Stunden

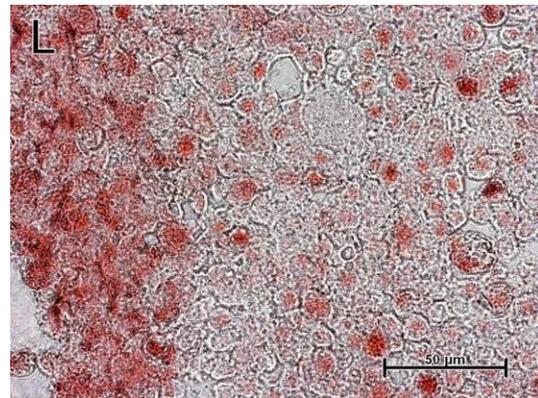
40fache Vergrößerung



nach 2 Stunden



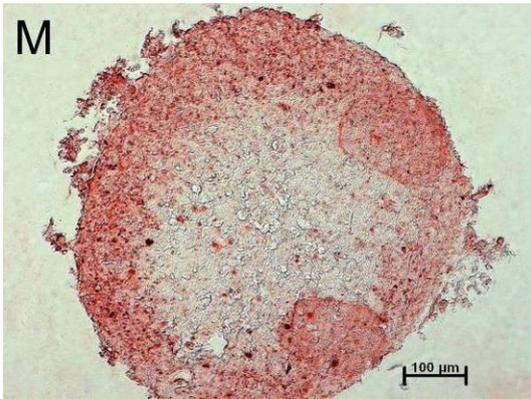
nach 4 Stunden



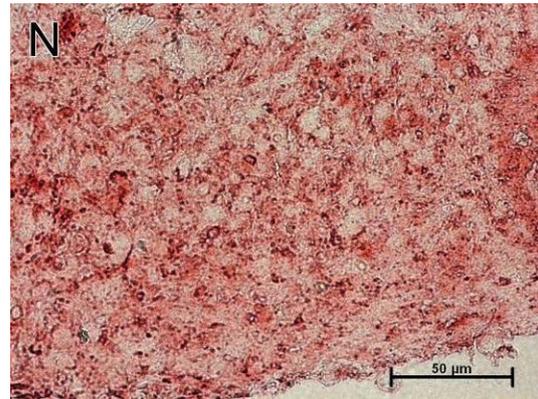
nach 7 Stunden

10fache Vergrößerung

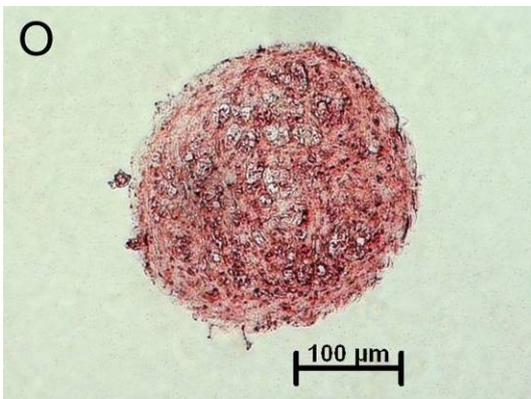
40fache Vergrößerung



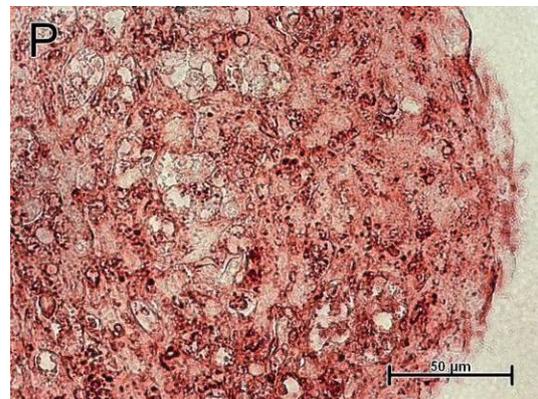
nach 1 Tag



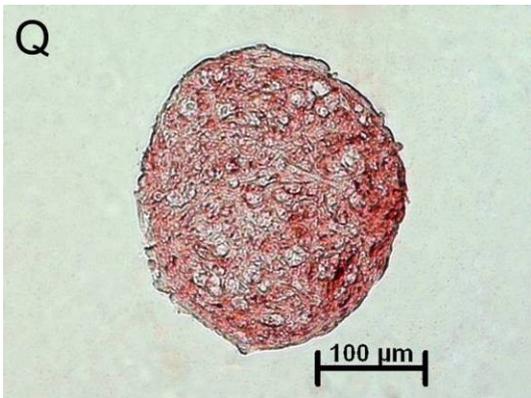
nach 1 Tag



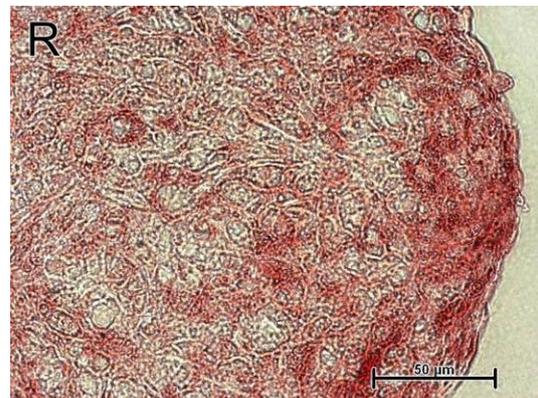
nach 7 Tagen



nach 7 Tagen



nach 14 Tagen



nach 14 Tagen

30 Minuten (A,B)

Bereits 30 Minuten nach Aussiedelung der Osteoblasten in die 96-Well-Platten zeigten sich erste Zellverdichtungen (Abb. 35A). Die Zellverdichtungen in einem 4µm dünnen Schnitt darzustellen, erwies sich als sehr schwierig. Es zeigten sich nur vereinzelte Kontakte zwischen Zellen. Die Mehrzahl der Zellen hatte zudem keine Rotfärbung,

welche auf das Vorhandensein von ON schließen ließe. Nur partiell waren kleine Bereiche einzelner Zellen schwach rötlich gefärbt. Wirklich sichtbar wurde die Färbung erst bei einer 40fachen Vergrößerung.

60 Minuten (C,D)

Nach 60 Minuten waren vermehrt Zellaggregationen zu erkennen. Fast alle Zellen zeigten eine Rotfärbung. Teilweise war sie über die gesamte Zelle verteilt, manchmal aber auch nur stellenweise zu sehen. Die Färbung variierte zwischen dunkel- und hellrot. In den Zellen waren vereinzelte dunkelrote Sprenkel zu erkennen. Die unterschiedlichen Rotfärbungen zeigten keine Korrelation mit der Aggregation der Zellen.

90 Minuten (E,F)

Die Zellaggregate wurden größer und die Rotfärbung nahm zu. Ansonsten waren dieselben Abstufungen und Variationen wie bereits nach 60 Minuten zu sehen.

120 Minuten (G,H)

Nach 2 Stunden wurden die Zellzusammenschlüsse deutlich größer, enthielten zunehmend mehr Zellen und die singulären Osteoblasten nahmen sichtbar ab.

240 Minuten (I,J)

Nach 4 Stunden nahmen die dunkelrot gefärbten Zellen deutlich zu. Die Zellaggregation hatte einen relativ homogenen Grundton, welcher nur durch vereinzelte sehr dunkle Bereiche unterbrochen wurde. Die Sprenkelung innerhalb einiger Zellen war immer noch zu erkennen.

420 Minuten (K,L)

Nach 7 Stunden war bei 10facher Vergrößerung bereits eine rundliche Mikromassenkultur zu erkennen. Deutlich zeigte sich ein etwa 50 µm breiter Randsaum, welcher eine dunklere Rotfärbung aufwies als das Innere der Kultur. Beide Bereiche waren relativ

homogen rötlich gefärbt. Unterbrochen wurde diese Harmonie nur durch singuläre Zellen, welche deutlich dunkler gefärbt waren als die sie umgebenden Zellen.

1 Tag (M,N)

Die Expression des nicht-kollagenen Matrixproteins ON war nach einem Tag deutlich zu erkennen. Die Mikromassenkultur wies eine ausgeprägte Rotfärbung auf. An den Randbereichen der Kultur war sie am dunkelsten rot gefärbt; dort wurde am meisten ON synthetisiert. Es waren keine nicht gefärbten Bereiche zu erkennen. Die einzelnen Zellen zeigten sich hellrot, mit dunkelroten Sprenkeln. Dies ließ darauf schließen, dass in den Zellen zunächst punktuell ON exprimiert wurde.

7 Tage (O,P)

Nach 7 Tagen war die Expression von ON in den einzelnen Zellen deutlich erhöht. Die gesamte Zelle war rot angefärbt. Bei Ansicht der Mikromassenkultur fiel auf, dass die Färbung homogen über diese verteilt ist, jedoch immer noch eine Sprenkelung der hellroten Grundfläche mit dunkelroten Bereichen vorlag. Die Masse der dunkelroten Bereiche hatte deutlich zugenommen. Zwischen den Zellen waren kleine Vakuolen zu erkennen, welche nicht angefärbt waren.

14 Tage (Q,R)

Nach 14 Tagen nahm die Färbung der Mikromassenkulturen für ON weiter zu. Sie wurde homogener, und es waren nur noch wenige hellrote Bereiche zu sehen. Einige vermehrte, nicht gefärbte, Vakuolen unterbrachen die Homogenität.

Tab. 2 Quantitative Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen osteoblastärer Zellmikromassen in Übersicht. Ab dem Zeitpunkt 60 Minuten unterscheiden sich die Befunde signifikant vom Ausgangswert ($p < 0,001$); (n ~ Anzahl der Mikromassenkulturen)

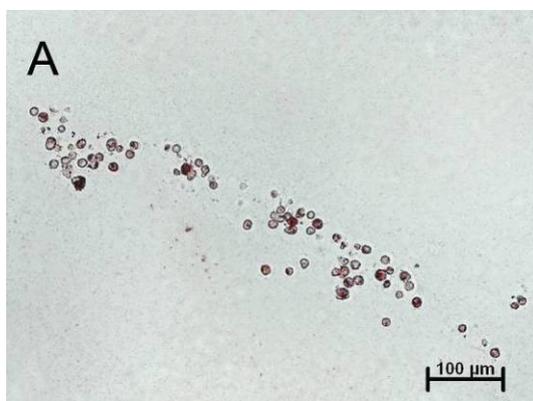
Quantitative Einstufung der Expression von Osteonectin: (++++) > 75%; (+++) < 75%; (++) < 50%; (+) < 25%; (0) < 5%						
Fixierzeitpunkt	n	++++	+++	++	+	0
30 Minuten	32	0	1	5	18	8
60 Minuten	32	21	8	3	0	0
90 Minuten	32	29	3	0	0	0
2 Stunden	32	29	3	0	0	0
4 Stunden	32	30	2	0	0	0
7 Stunden	32	30	2	0	0	0
1 Tag	32	31	1	0	0	0
7 Tage	32	32	0	0	0	0
14 Tage	32	32	0	0	0	0

3.3.2 Collagen Typ I

Abb. 41 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Mikromassenkulturen, immunhistochemische Färbung für Collagen Typ I (Rabbit anti bovine Collagen I, Polyclonal IgG)

10fache Vergrößerung

40fache Vergrößerung

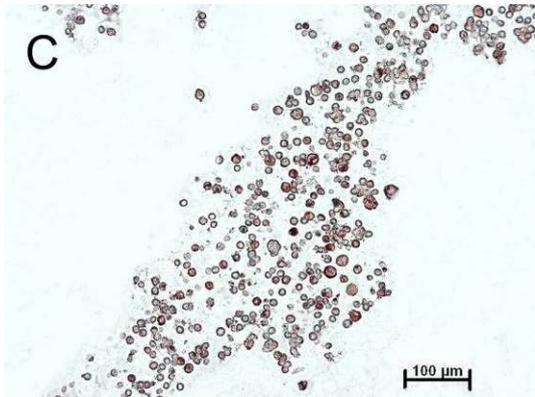


nach 30 Minuten

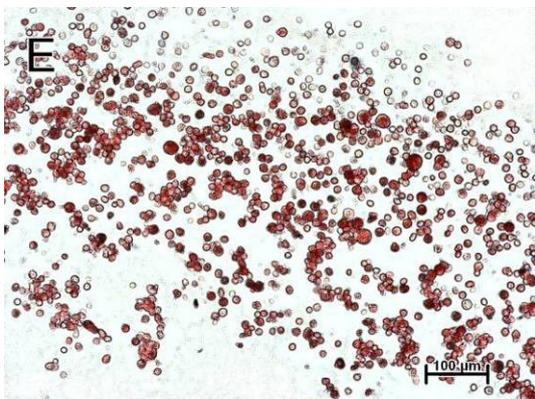


nach 30 Minuten

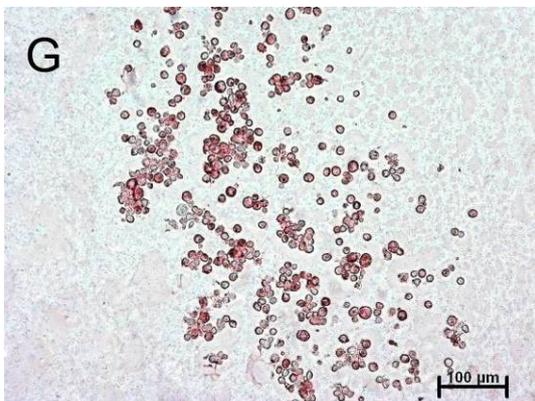
10fache Vergrößerung



nach 60 Minuten

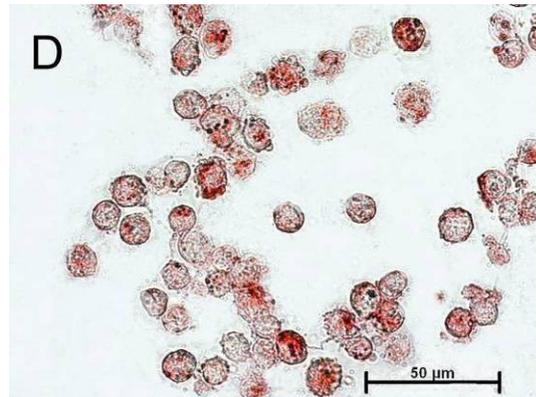


nach 90 Minuten

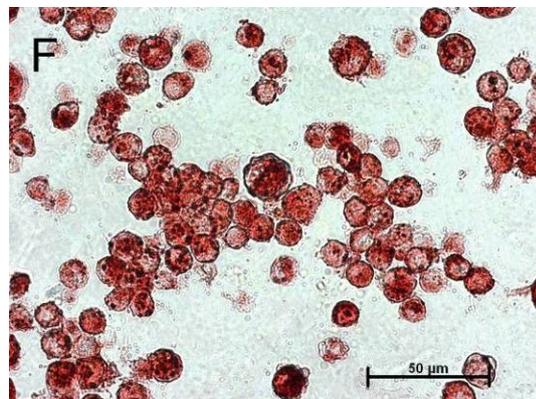


nach 2 Stunden

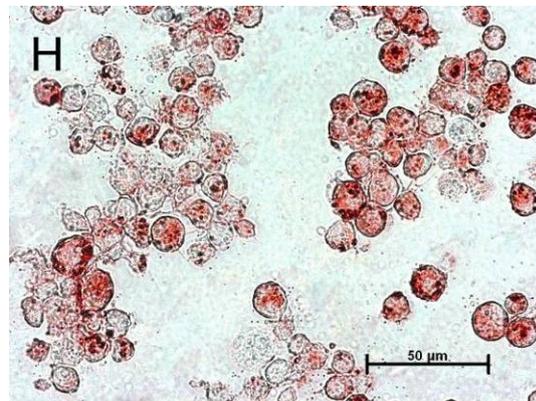
40fache Vergrößerung



nach 60 Minuten



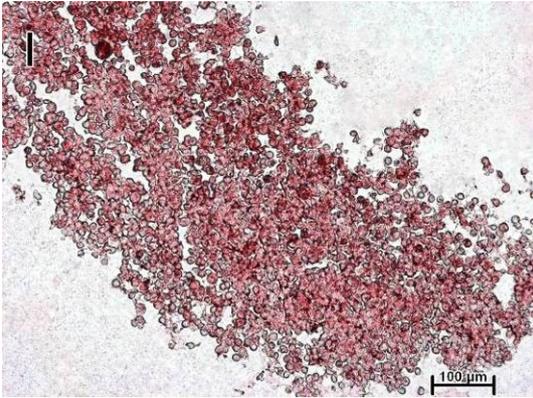
nach 90 Minuten



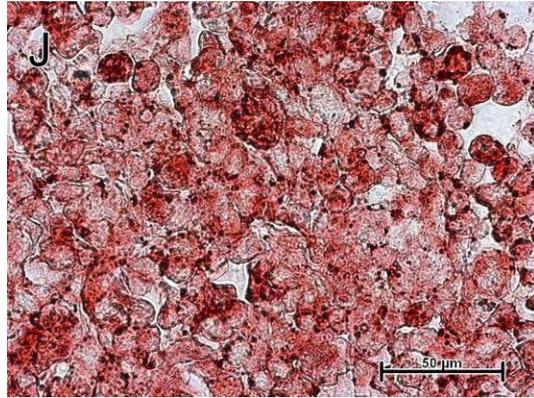
nach 2 Stunden

10fache Vergrößerung

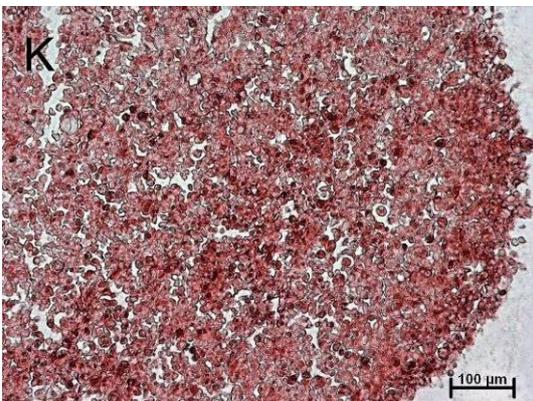
40fache Vergrößerung



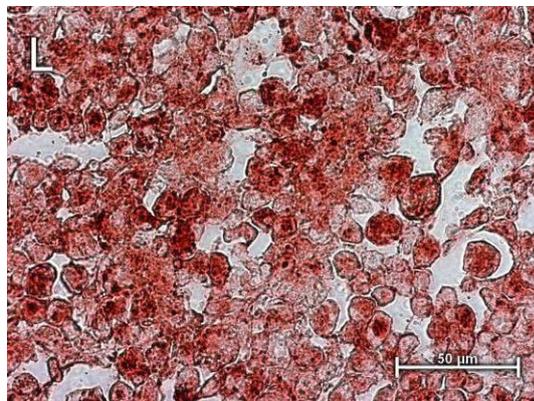
nach 4 Stunden



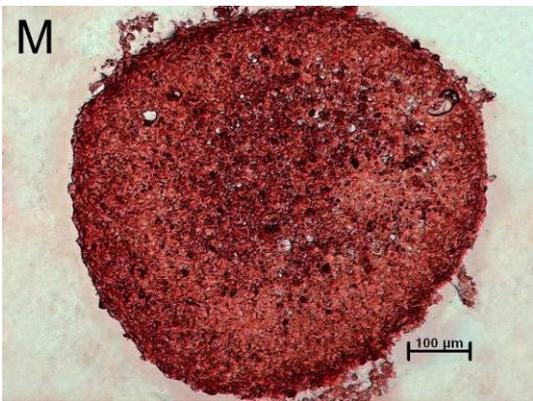
nach 4 Stunden



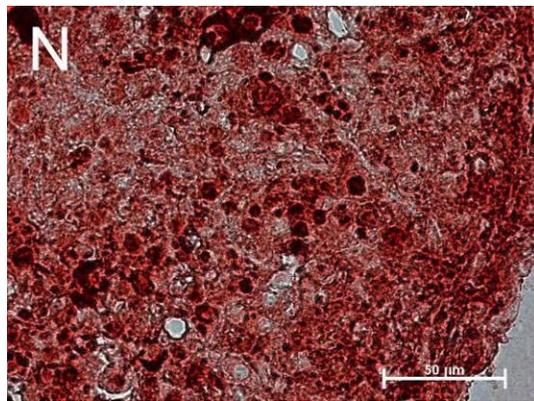
nach 7 Stunden



nach 7 Stunden



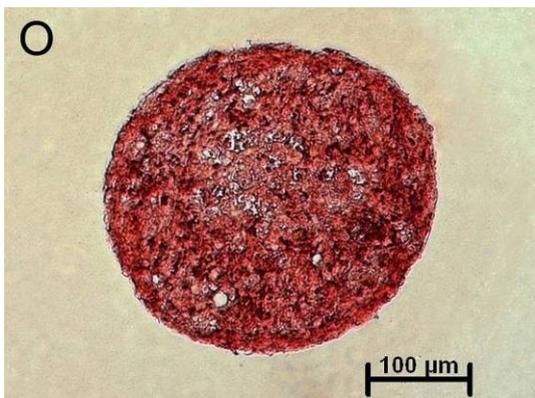
nach 1 Tag



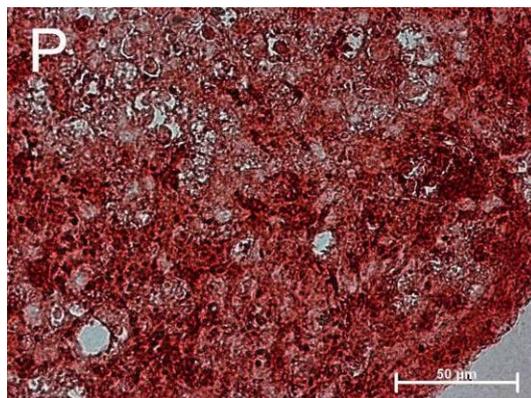
nach 1 Tag

10fache Vergrößerung

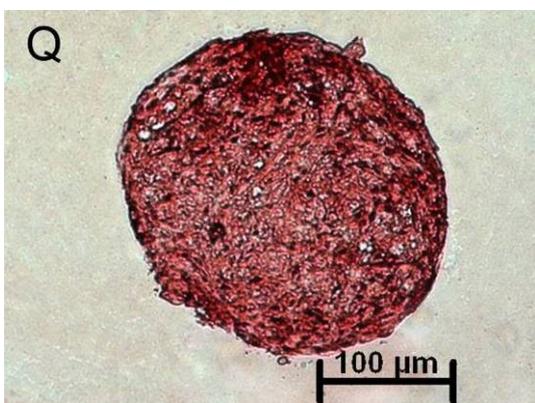
40fache Vergrößerung



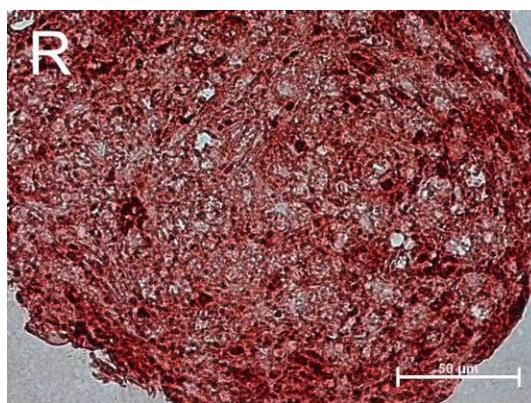
nach 7 Tagen



nach 7 Tagen



nach 14 Tagen



nach 14 Tagen

30 Minuten (A,B)

Nach 30 Minuten zeigten sich nur vereinzelte Kontakte zwischen Zellen. Etwas mehr als die Hälfte der angeschnittenen Zellen wiesen eine dezente Rotfärbung auf, welche auf das Vorhandensein von Collagen Typ I hindeutete. Die rötlichen Bereiche ließen sich nur partiell in den einzelnen Zellen erkennen. In einigen angefärbten Zellen zeigten sich punktuell dunklere Nuancen der Rotfärbung.

60 Minuten (C,D)

Die Mehrheit der Zellen zeigte eine immer noch dezente Rotfärbung. Teilweise war sie über die gesamte Zelle verteilt, manchmal aber auch nur stellenweise zu sehen. Die Färbung variierte zwischen dunkel- und hellrot. In den Zellen waren vereinzelte dunkelrote Sprenkel zu erkennen. Die unterschiedlichen Rotfärbungen zeigten keine Korrelation mit der Aggregation der Zellen.

90 Minuten (E,F)

Die Zellaggregate wurden größer und die Rotfärbung nahm deutlich zu. Fast alle Zellen zeigten eine prägnante, kräftige Rotfärbung. Der Rotton wurde insgesamt dunkler und die Zellen wiesen alle eine Unterbrechung dieser Homogenität durch dunklere Bereiche/Sprenkelungen auf.

120 Minuten (G,H)

Nach 2 Stunden wurden die Zellzusammenschlüsse deutlich größer, enthielten zunehmend mehr Zellen und die singulären Osteoblasten nahmen sichtbar ab. Die Zellen konzentrierten sich auf einen kleineren Bereich, wodurch sie enger zusammrückten.

240 Minuten (I,J)

Nach 4 Stunden hatte die Zellaggregation einen relativ homogenen Grundton, welcher nur noch durch vereinzelte sehr dunkle Bereiche unterbrochen wurde. Die Sprenkelung innerhalb einiger Zellen hatte deutlich abgenommen.

420 Minuten (K,L)

Nach 7 Stunden war bei 10facher Vergrößerung bereits eine rundliche Mikromassenkultur zu erkennen. Die Rotfärbung wurde insgesamt dunkler, jedoch auch unruhiger. Es waren viele verschiedene Farbnuancen zu erkennen. Singuläre Zellen waren deutlich dunkler gefärbt als die sie umgebenden Zellen.

1 Tag (M,N)

Die Expression des Matrixproteins CO war auch am ersten Tag sichtbar. Die Bereiche stellten sich unter dem Lichtmikroskop rötlich dar. Im Zellverband war eine inhomogene und sehr unregelmäßige Färbung zu erkennen. Der Schwerpunkt der Zellmikromassen und der Randbereich wiesen eine stärkere Rotfärbung auf als die dazwischenliegenden Bereiche (Abb. 39M). Besonders im Schwerpunkt der Zellmikromassen zeigten sich vereinzelte Zellen, welche deutlich dunkler gefärbt waren.

7 Tage (O,P)

Nach sieben Tagen zeigte sich die Färbung der Mikromassenkultur deutlich homogener und auch die Intensität war verstärkt. Der Schwerpunkt der Mikromassenkultur wies eine geringere Rotfärbung auf als der Rand. Eine vermehrte Expression fand somit in den Randbereichen (ca. 40 µm breiter Randsaum) der Zellmikromassen statt.

14 Tage (Q,R)

Nach 14 Tagen stellte sich die Färbung noch intensiver und homogener dar. Es war wahrscheinlich insgesamt mehr CO exprimiert worden. Im Randbereich (jetzt ca. 60 µm) zeigte sich wieder die höchste Dichte an CO. Die Homogenität in den Zellmikromassen wurde teilweise durch nicht gefärbten Extrazellularraum unterbrochen, welcher sich vermehrt darstellte.

Tab. 3 Quantitative Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen osteoblastärer Zellmikromassen in Übersicht. Ab dem Zeitpunkt 90 Minuten unterscheiden sich die Befunde signifikant vom Ausgangswert ($p < 0,001$; 30 versus 60 Minuten: $p = 0,40$); (n ~ Anzahl der Mikromassenkulturen)

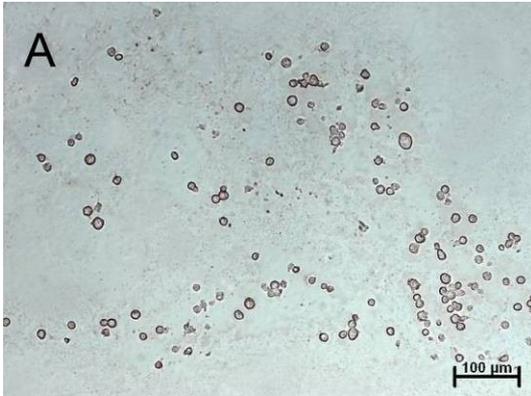
Quantitative Einstufung der Expression von Collagen Typ I: (++++) > 75%; (++++) < 75%; (++) < 50%; (+) < 25%; (0) < 5%						
Fixierzeitpunkt	n	++++	+++	++	+	0
30 Minuten	32	0	25	6	1	0
60 Minuten	32	1	26	4	1	0
90 Minuten	32	27	4	1	0	0
2 Stunden	32	29	3	0	0	0
4 Stunden	32	29	3	0	0	0
7 Stunden	32	30	2	0	0	0
1 Tag	32	30	2	0	0	0
7 Tage	32	32	0	0	0	0
14 Tage	32	32	0	0	0	0

3.3.3 Osteopontin

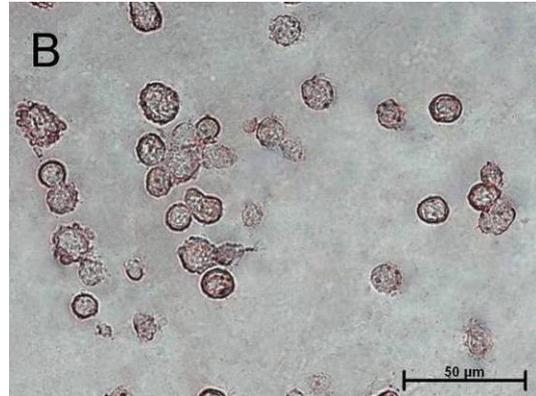
Abb. 42 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Mikromassenkulturen, immunhistochemische Färbung für Osteopontin (Rabbit anti human Osteopontin)

10fache Vergrößerung

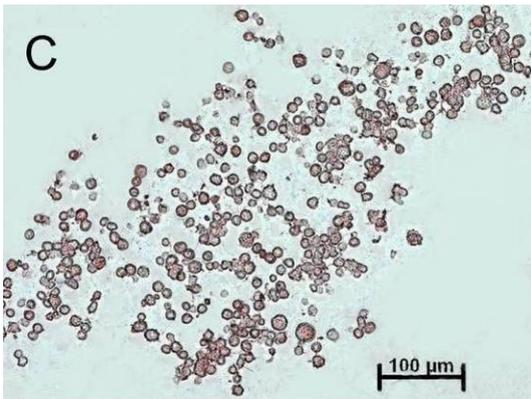
40fache Vergrößerung



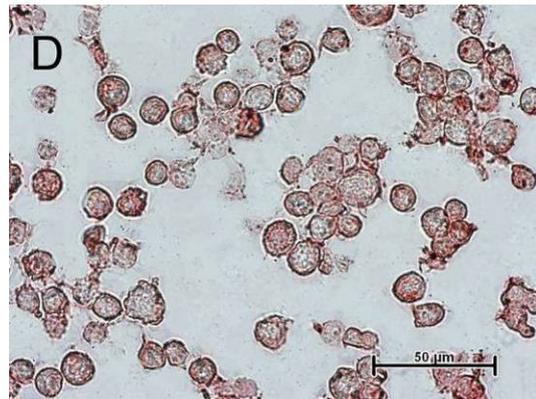
nach 30 Minuten



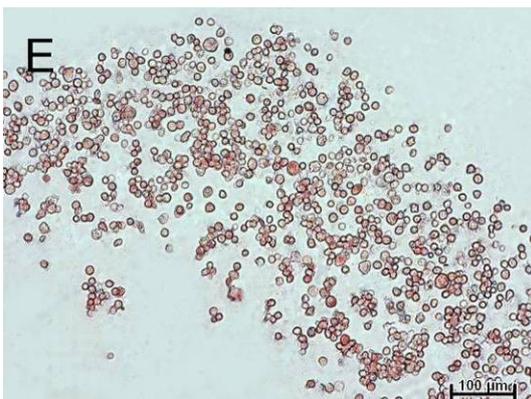
nach 30 Minuten



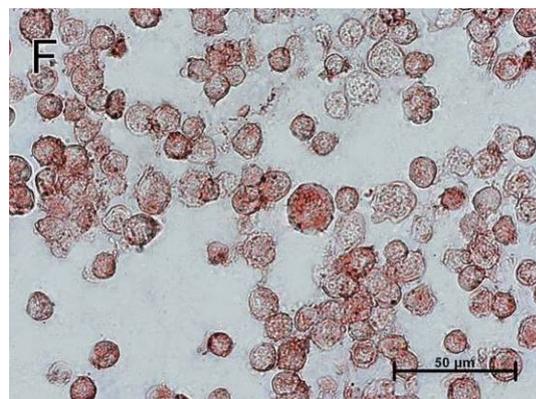
nach 60 Minuten



nach 60 Minuten



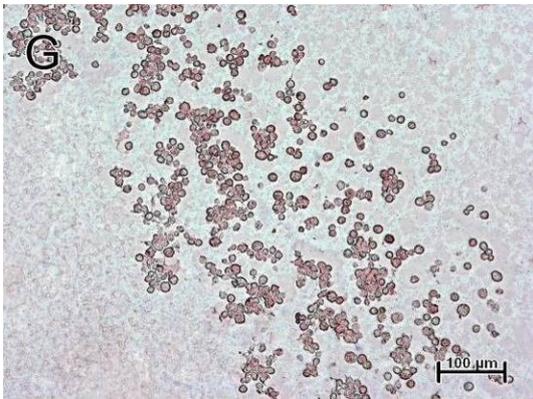
nach 90 Minuten



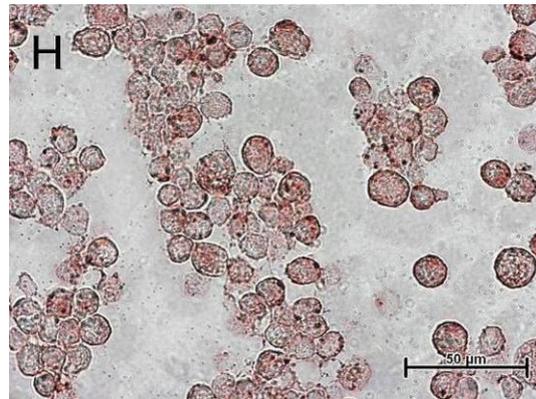
nach 90 Minuten

10fache Vergrößerung

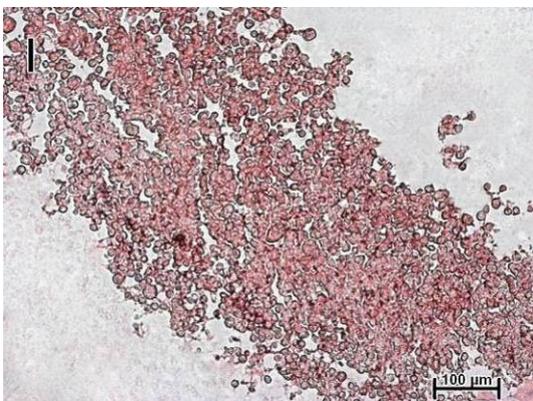
40fache Vergrößerung



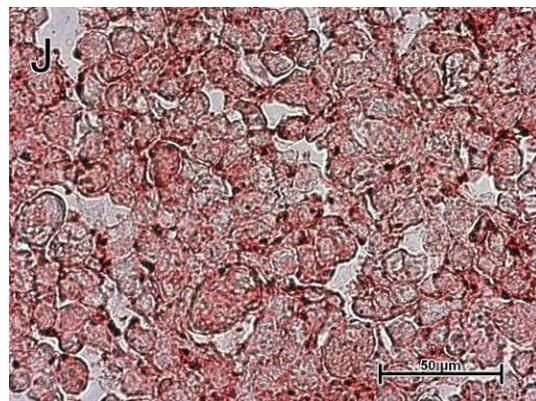
nach 2 Stunden



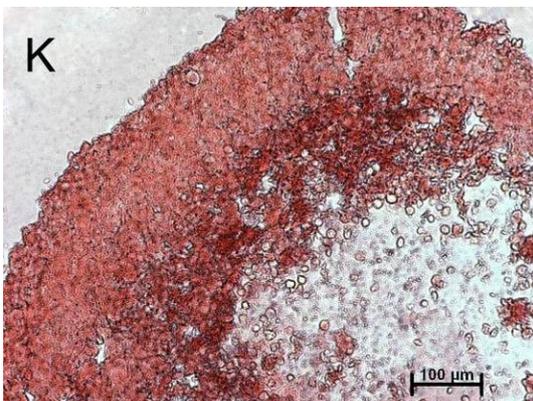
nach 2 Stunden



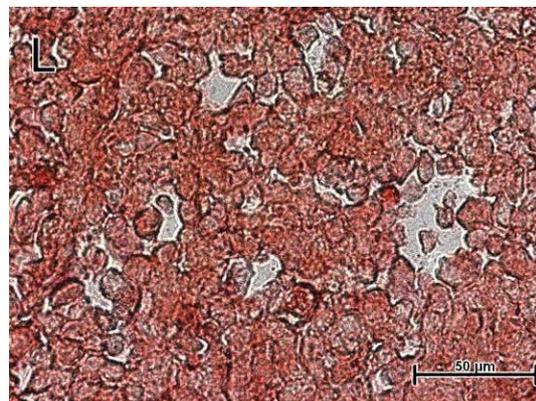
nach 4 Stunden



nach 4 Stunden

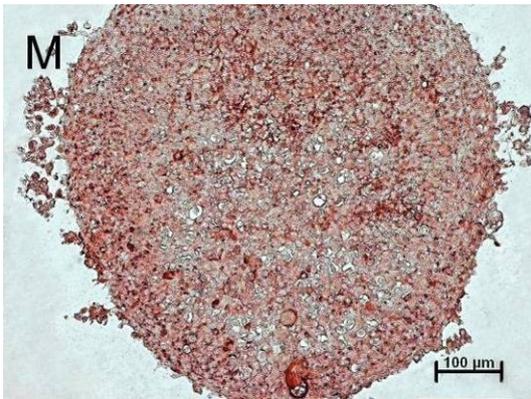


nach 7 Stunden



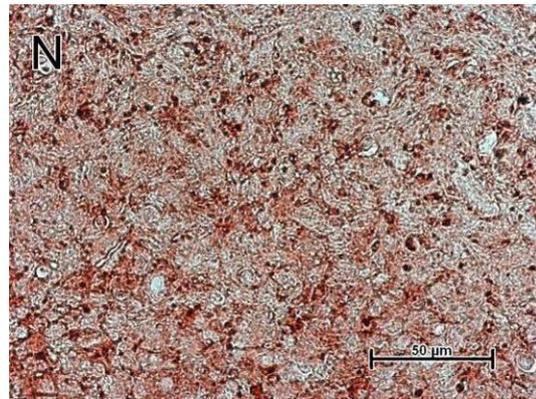
nach 7 Stunden

10fache Vergrößerung

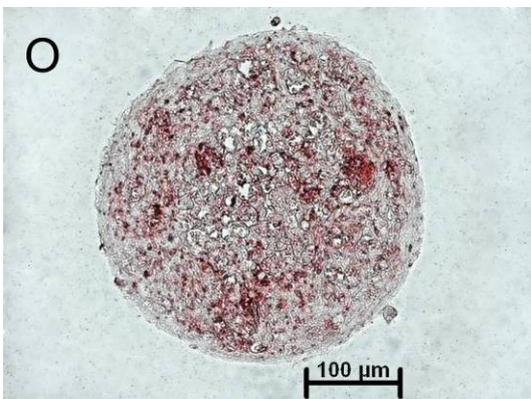


nach 1 Tag

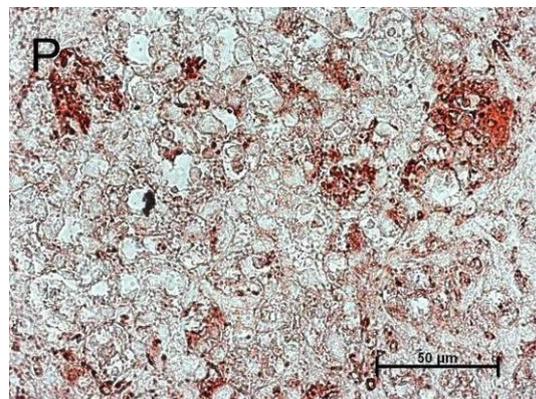
40fache Vergrößerung



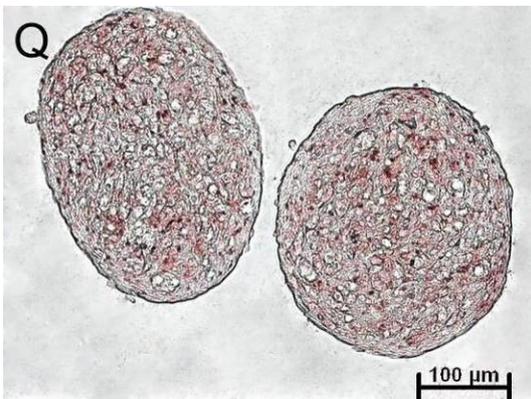
nach 1 Tag



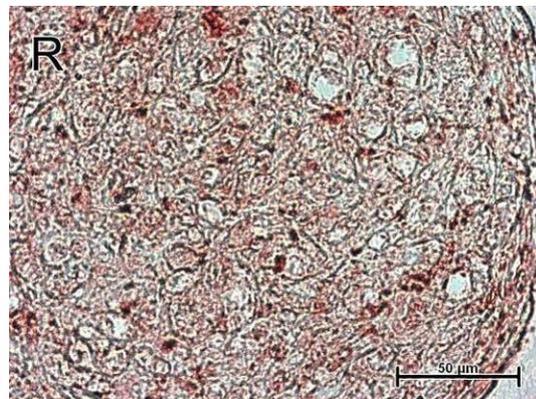
nach 7 Tagen



nach 7 Tagen



nach 14 Tagen



nach 14 Tagen

30 Minuten (A,B)

Die Mehrzahl der Zellen wies nach 30 Minuten noch keine Rotfärbung auf. Nur partiell waren kleine Bereiche einzelner Zellen schwach rötlich gefärbt. Wirklich sichtbar wurde die Färbung erst bei einer 40fachen Vergrößerung. Besonders Randbereiche der Zellen wiesen eine rötliche Nuance auf.

60 Minuten (C,D)

Nach 60 Minuten zeigte die Mehrheit der Zellen eine dezente bis deutliche Rotfärbung. Teilweise war sie über die gesamte Zelle verteilt, manchmal aber auch nur stellenweise zu sehen (vornehmlich im Randbereich der Zelle). Die Färbung variierte zwischen dunkel- und hellrot, wobei der Großteil der Zellen blass rot gefärbt ist. Die unterschiedlichen Rotfärbungen zeigten keine Korrelation mit der Aggregation der Zellen.

90 Minuten (E,F)

Nach 90 Minuten waren ca. 70% der Zellen angefärbt. Die meisten hatten einen homogenen, dezent rötlichen Ton. Vereinzelt zeigten sich prägnant rot gefärbte Zellen. Der Rotton wurde nicht dunkler; es waren jedoch deutlich mehr Variationen der Rotfärbung zu sehen als nach 60 Minuten. Im Allgemeinen waren sie homogener.

120 Minuten (G,H)

Nach 2 Stunden wurden die Zellzusammenschlüsse deutlich größer, enthielten zunehmend mehr Zellen und die singulären Osteoblasten nahmen sichtbar ab. Alle Zellen wiesen mindestens eine dezente, relativ homogene Grundfärbung auf. Stellenweise waren dunklere Zellen, bzw. dunklere Bereiche in einzelnen Zellen zu erkennen.

240 Minuten (I,J)

Nach 4 Stunden hatte die Zellaggregation einen relativ homogenen Grundton, welcher kaum durch dunkelrote Bereiche unterbrochen wurde. Es zeigten sich kleine, dunkle Punkte innerhalb weniger Zellen. Am auffälligsten war in Abb. 40I jedoch die farbliche Homogenität.

420 Minuten (K,L)

Nach 7 Stunden war bei 10facher Vergrößerung bereits eine rundliche Mikromassenkultur zu erkennen. Die Rotfärbung wurde insgesamt dunkler. Die Mikromassenkultur ließ sich in 2 Bereiche unterteilen: einen äußeren Ring (ca. 150-200 µm breit) und einen

inneren Bereich. Der äußere Ring war sehr homogen in der Färbung, aber nicht sonderlich dunkel im Rotton. Der innere Bereich zeigte eine intensive dunkelrote Farbe.

1 Tag (M,N)

Die Expression des Matrixproteins Osteopontin wurde am ersten Tag wieder geringer als nach 7 Stunden. Im Zellverband war nun eine relativ inhomogene und unregelmäßige Färbung zu erkennen. Im Randbereich war eine ca. 70 µm breite Zellschicht etwas stärker rot gefärbt. Im gesamten Sphere zeigten sich viele vereinzelte Zellen, welche deutlich dunkler gefärbt waren.

7 Tage (O,P)

Nach sieben Tagen nahm die Intensität der Färbung der Mikromassenkultur weiter ab. Es zeigten sich einzelne Zellen und auch punktuelle Zellverbände, welche noch eine prägnante Rotfärbung aufwiesen. Der Großteil der Zellmikromassen war nur noch sehr schwach rötlich markiert.

14 Tage (Q,R)

Nach 14 Tagen stellte sich die Färbung noch geringer dar. Die punktuellen Zellverbände, welche stärker rötlich erschienen, waren nun deutlich kleiner geworden und auch farbärmer. Eine blasse Hintergrundfärbung zeichnete den gesamten Sphere aus. Punktuell und sehr vereinzelt waren dunklere und deutlichere Färbungen zu erkennen.

Tab. 4 Quantitative Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen osteoblastärer Zellmikromassen in Übersicht. Ab dem Zeitpunkt 60 Minuten unterscheiden sich die Befunde signifikant vom Ausgangswert ($p < 0,001$); (n ~ Anzahl der Mikromassenkulturen)

Quantitative Einstufung der Expression von Osteopontin: (++++) > 75%; (+++) < 75%; (++) < 50%; (+) < 25%; (0) < 5%						
Fixierzeitpunkt	n	++++	+++	++	+	0
30 Minuten	32	0	0	5	25	2
60 Minuten	32	0	11	13	8	0
90 Minuten	32	1	23	7	1	0
2 Stunden	32	18	10	4	0	0
4 Stunden	32	20	11	1	0	0
7 Stunden	32	25	7	0	0	0
1 Tag	32	29	3	0	0	0
7 Tage	32	32	0	0	0	0
14 Tage	32	31	1	0	0	0

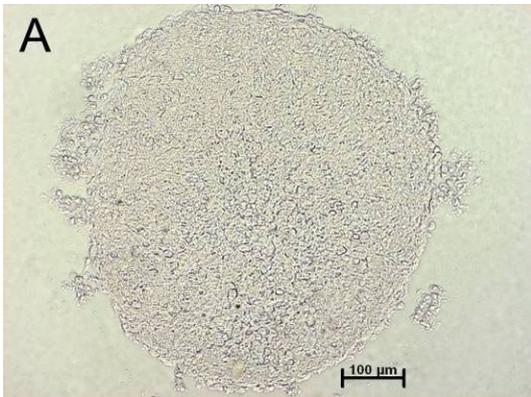
3.3.4 Osteocalcin

Weder nach einem noch nach sieben oder 14 Tagen waren die Färbungen für Osteocalcin bei den Paraffinschnitten der Mikromassenkulturen positiv. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in der Arbeit die Färbungen der nach 30-420 Minuten fixierten Proben ausgelassen. Es konnte keine statistische Auswertung vorgenommen werden.

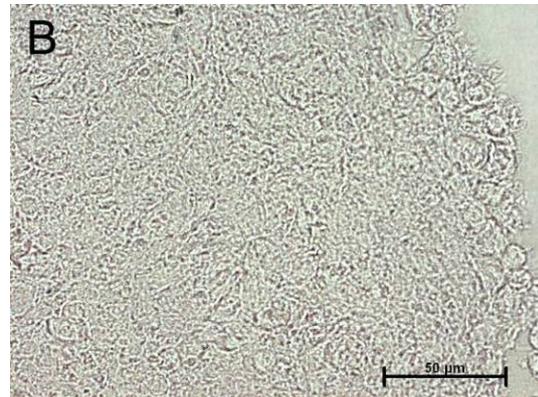
Abb. 43 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Mikromassenkulturen, immunhistochemische Färbung für Osteocalcin (Monoclonal Antibody to bovine Osteocalcin, mouse IgG)

10fache Vergrößerung

40fache Vergrößerung



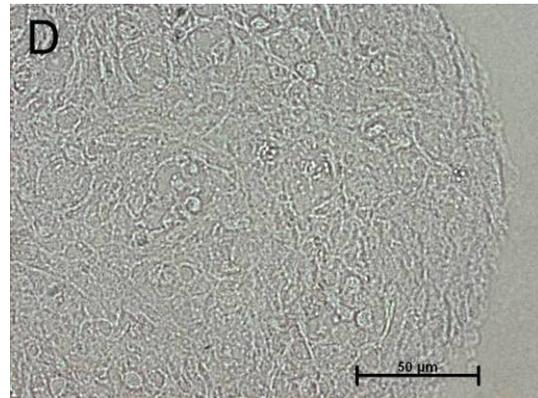
nach 1 Tag



nach 1 Tag



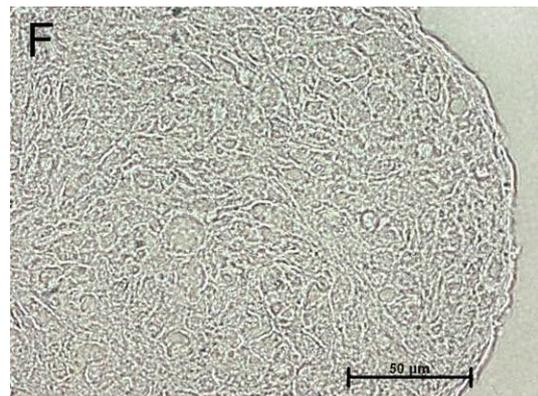
nach 7 Tagen



nach 7 Tagen



nach 14 Tagen



nach 14 Tagen

3.4 Auswertung der TEM-Aufnahmen

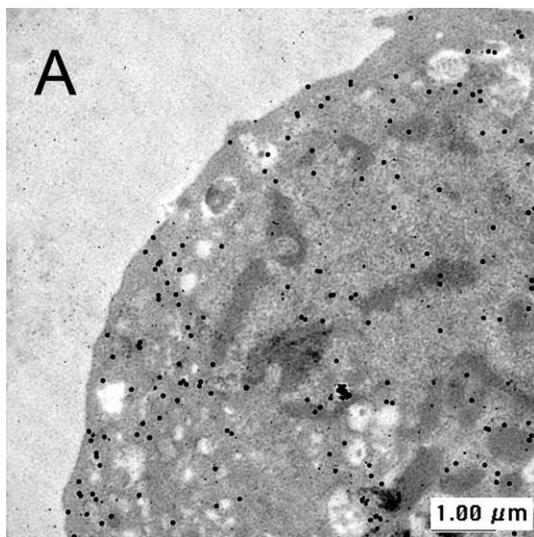
Nachdem die Zellmikromassen zu den jeweiligen Zeitpunkten mit einem Gemisch aus Formaldehyd und Glutaraldehyd fixiert und in Agar voreingebettet worden waren, konnten sie in Lowicryl® K4M-Harz eingebettet werden. Mit dem Ultramikrotom wurden gleichmäßige Ultradünnschnitte von ca. 70 nm Dicke hergestellt und auf Grids aufgezogen. Um die Entwicklung der Expression der Matrixproteine Osteonectin, Osteopontin und Collagen Typ I zu untersuchen, wurden die Proben bei den immunhistochemischen Untersuchungen mit Goldkügelchen ($\text{\O} \sim 20 \text{ nm}$) markiert und nach Reynolds [1963] kontrastiert. Durch die Immunogoldmarkierung ("Immunogold-Labeling") wurde das Vorhandensein und die Verteilung der Matrixproteine durch die im TEM sichtbaren Goldkügelchen dargestellt.

3.4.1 Osteonectin

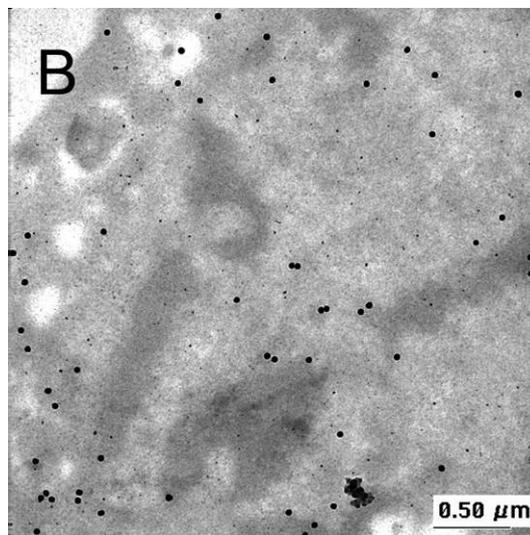
Abb. 44 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen einer Mikromassenkultur, Immunogold Labeling für Osteonectin (Monoclonal Antibody to bovine Osteonectin / SPARC, mouse IgG) und Kontrastierung (mit Dank an Dr. Ulrich Plate, UKM)

3000fache Vergrößerung

7000fache Vergrößerung



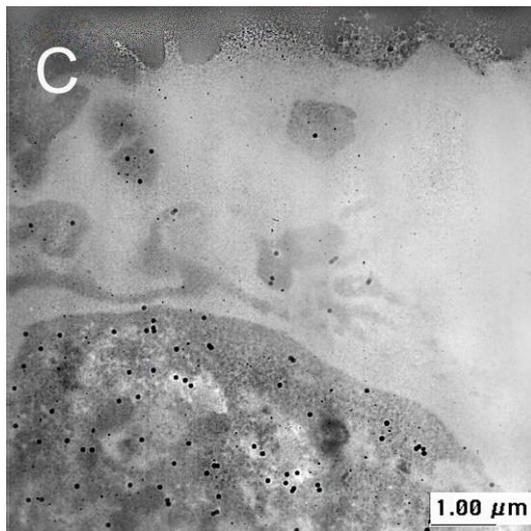
nach 30 Minuten



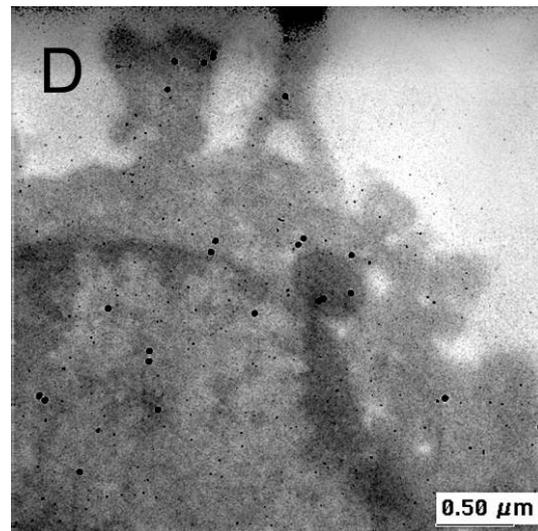
nach 30 Minuten

3000fache Vergrößerung

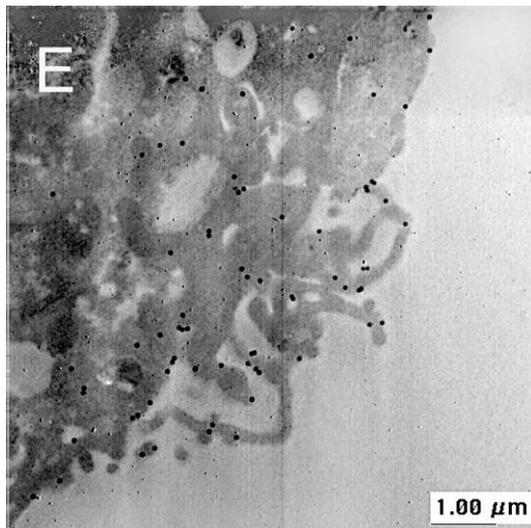
7000fache Vergrößerung



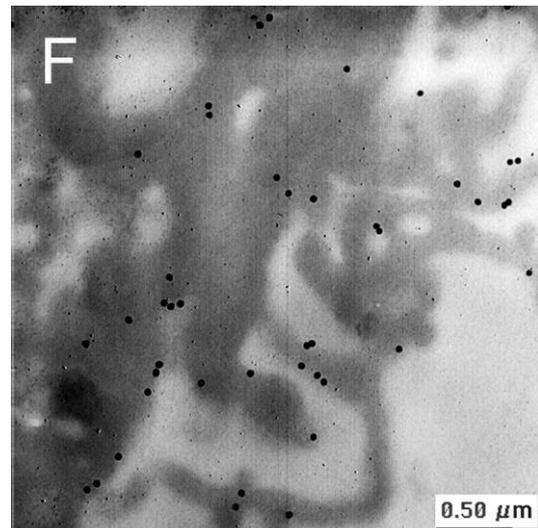
nach 60 Minuten



nach 60 Minuten



nach 90 Minuten



nach 90 Minuten

30 Minuten (A,B)

Bereits 30 Minuten nach Aussiedelung der Osteoblasten in die 96-Well-Platten waren erste Goldkugelchen unter dem TEM zu sehen. Die Kugelchen waren relativ gleichmäßig in der Zelle verteilt. Bei 7000facher Vergrößerung erkannte man zudem, dass bereits kleine Ansammlungen (2 oder mehr) von Goldkugelchen vorhanden waren.

60 Minuten (C,D)

Nach 60 Minuten waren mehr Häufungen von Au-Kügelchen zu erkennen. Sie waren meist in Ansammlungen von zwei beieinanderliegenden Goldkügelchen vorzufinden.

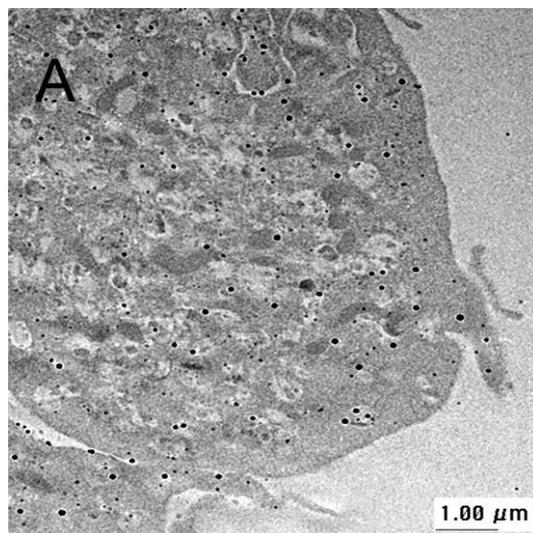
90 Minuten (E,F)

Drei in Reihe liegende Goldkügelchen zeigten sich vermehrt nach 90 Minuten. Sie waren nicht mehr gleichmäßig verteilt sondern wiesen eine gewisse Randständigkeit auf. Die Kügelchen konzentrierten sich in bestimmten Bereichen in der Peripherie der Zelle.

3.4.2 Collagen Typ I

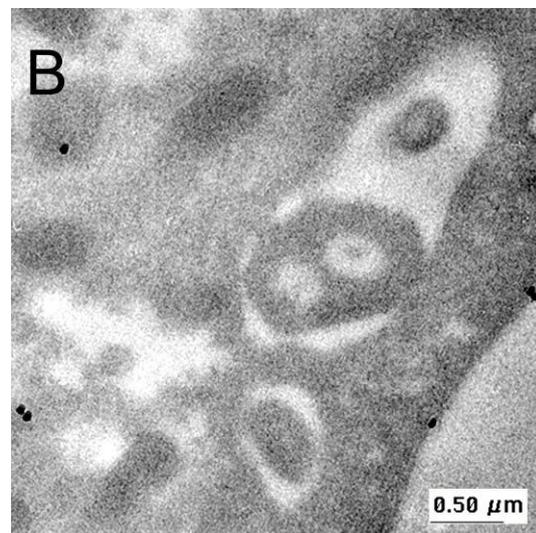
Abb. 45 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen einer Mikromassenkultur, Immunogold-Labeling für Collagen Typ I (Rabbit anti bovine Collagen I, Polyclonal IgG) und Kontrastierung (mit Dank an Dr. Ulrich Plate, UKM)

3000fache Vergrößerung



nach 30 Minuten

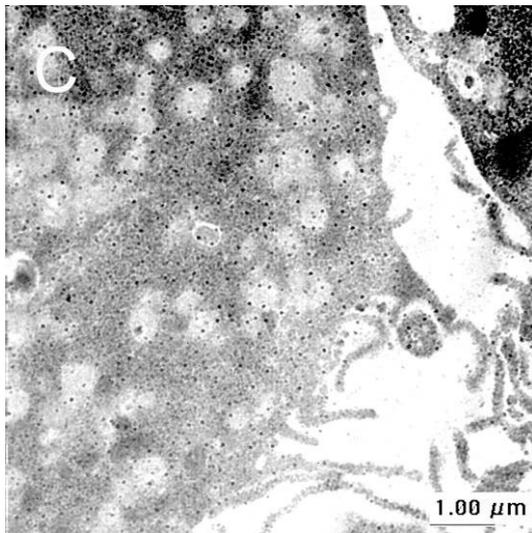
7000fache Vergrößerung



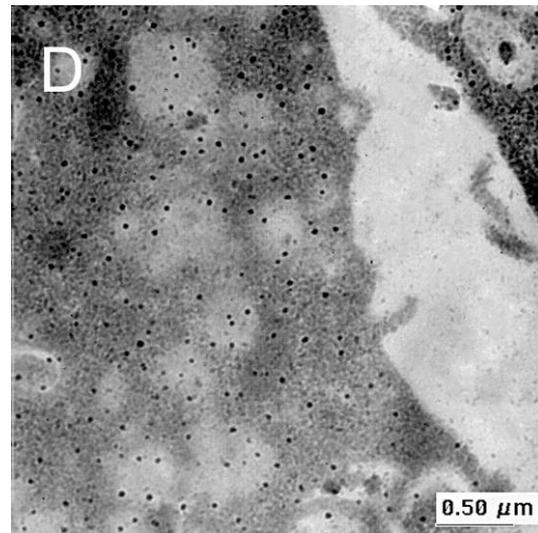
nach 30 Minuten

3000fache Vergrößerung

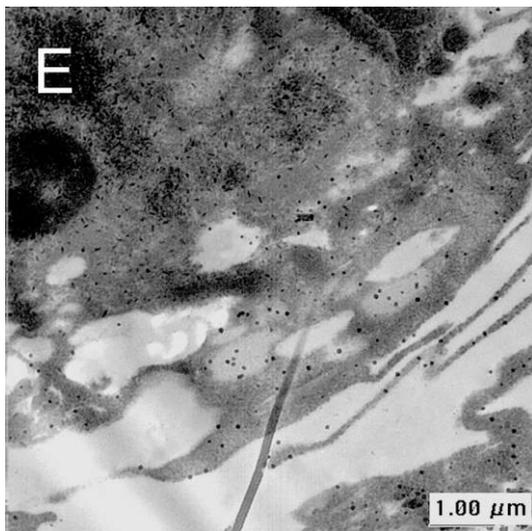
7000fache Vergrößerung



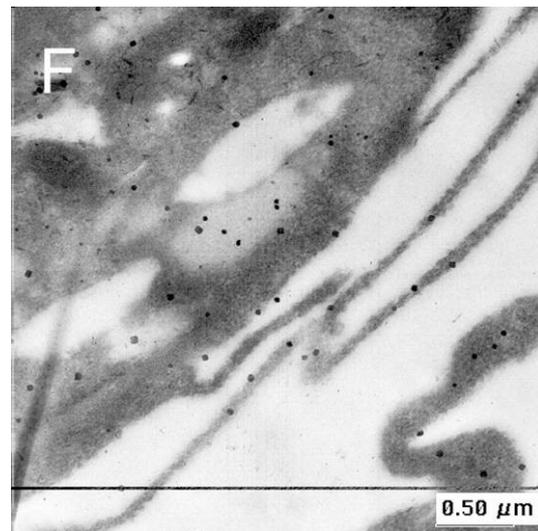
nach 60 Minuten



nach 60 Minuten



nach 90 Minuten



nach 90 Minuten

30 Minuten (A,B)

Bereits 30 Minuten nach Aussiedelung waren erste Goldkugelchen unter dem TEM zu sehen. Die Kugelchen befanden sich eher in der Peripherie der Zelle. Bei 7000facher Vergrößerung erkannte man, dass sich kleine Grüppchen von 2 bis 4 Goldkugelchen gebildet hatten.

60 Minuten (C,D)

Nach 60 Minuten zeigte sich ein deutlicher Anstieg in der Anzahl der Goldkügelchen. Dabei lagen die großen Mengen an Kügelchen, relativ dicht beieinander, wiesen jedoch noch keinen Verbund auf.

90 Minuten (E,F)

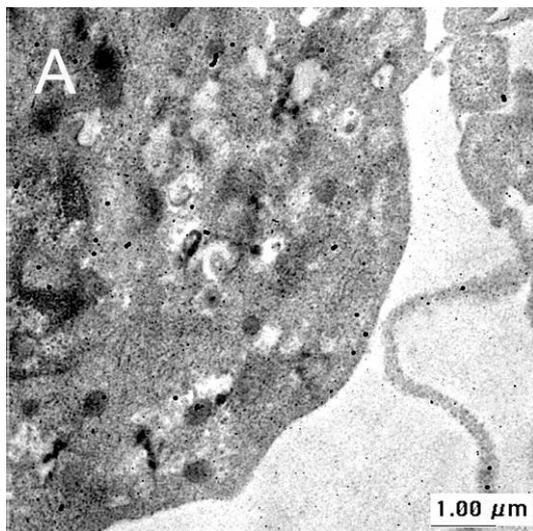
Die Goldkügelchen zeigten eine Tendenz zur Aggregatbildung; es bildeten sich deutlich fibrilläre Strukturen nach 90 Minuten aus.

3.4.3 Osteopontin

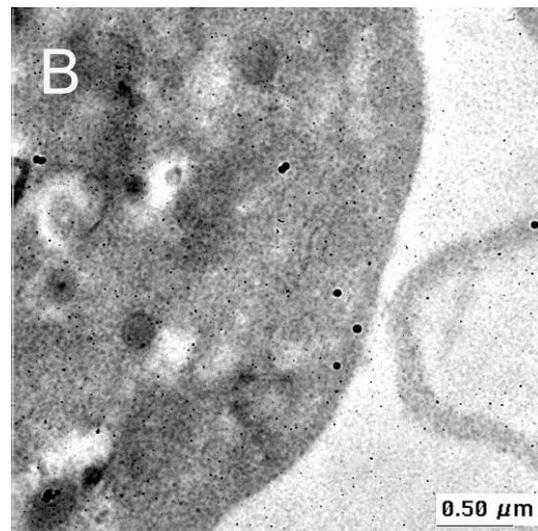
Abb. 46 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen einer Mikromassenkultur, Immunogold-Labeling für Osteopontin (Rabbit anti human Osteopontin, Polyclonal Antibody) und Kontrastierung (mit Dank an Dr. Ulrich Plate, UKM)

3000fache Vergrößerung

7000fache Vergrößerung



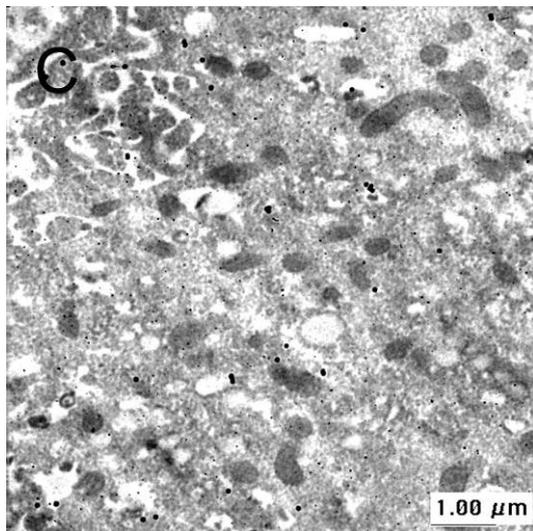
nach 30 Minuten



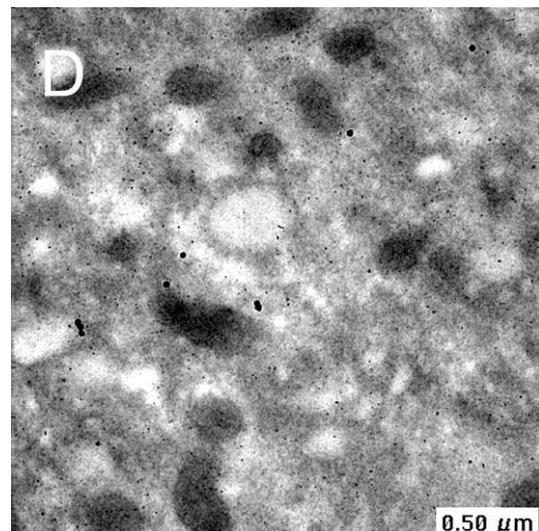
nach 30 Minuten

3000fache Vergrößerung

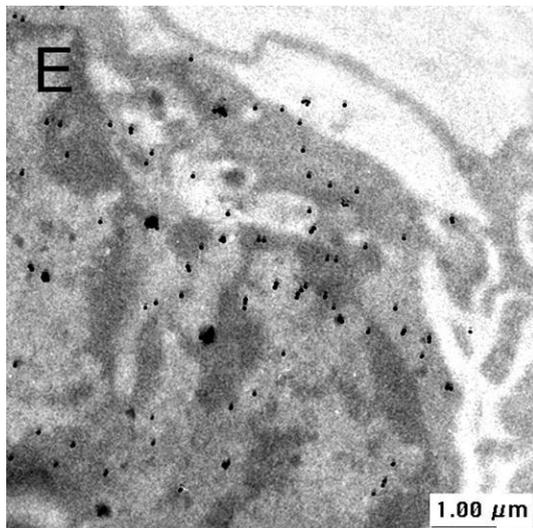
7000fache Vergrößerung



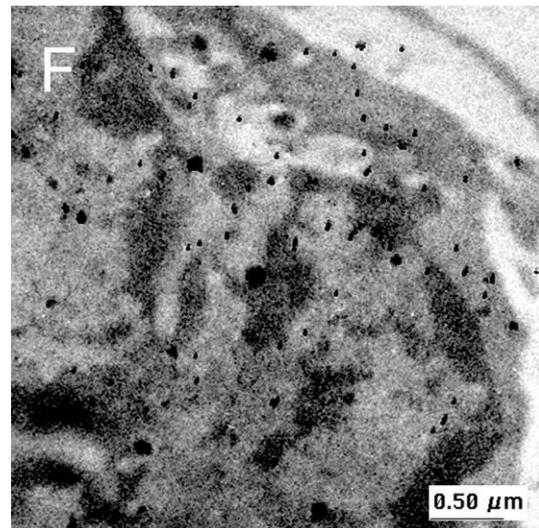
nach 60 Minuten



nach 60 Minuten



nach 90 Minuten



nach 90 Minuten

30 Minuten (A,B)

Nach 30 Minuten waren nur sehr wenig Goldkugelchen zu sehen. Diese lagen jedoch häufig bereits zu diesem frühen Zeitpunkt in Paaren vor. Dies war bei 7000facher Vergrößerung noch deutlicher zu erkennen.

60 Minuten (C,D)

Nach 60 Minuten wuchs die Anzahl der erkennbaren Goldkugelchen an. Die Tendenz zur Grüppchenbildung bestätigte sich.

90 Minuten (E,F)

Es waren nach 90 Minuten deutlich mehr Goldkugelchen zu sehen, welche in relativ großen Aggregaten zusammengeschlossen vorliegen. Die einzelnen Kugelchen sowie die Aggregate aus mehreren Kugelchen sind über die gesamte Zelle verteilt.

4 Diskussion

Ziel des Bone Tissue Engineering ist es, Defekte im verlorengegangenen Knochengewebe zu ersetzen und die Regeneration von funktionstüchtigem Gewebe zu fördern. Die Versorgung im Inneren der dreidimensionalen Zellmikromassen stellt zurzeit den limitierenden Faktor für die Größe von Zellverbänden dar. Durch Diffusion werden die Zellen nur mit einem Abstand von 200 μm ausreichend ernährt [Goldstein et al., 2001]. Werden die Zellverbände zu groß, können die Zellen im Inneren nicht ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden und auch Abbauprodukte von Stoffwechselprozessen nicht abtransportiert werden. Vor diesem Hintergrund wurden im Verlauf dieser Arbeit Zellmikromassen untersucht, welche eine Gesamtzellzahl von 200.000 Zellen pro Sphere aufwiesen.

Die Beobachtung des Zellverhaltens sowie die Charakterisierung der Zellen und der von ihnen synthetisierten Matrixproteine erfolgte anhand lichtmikroskopischer und transmissionselektronenmikroskopischer Untersuchungen sowie des immunhistochemischen Nachweises.

Die Charakterisierung der aus Periost gewonnenen bovinen osteoblasten-ähnlichen Zellen wurde anhand lichtmikroskopischer Untersuchungen der Zellmorphologie und Zellaktivität vorgenommen. Diese Untersuchungen ergeben, dass es sich in der vorliegenden Arbeit um Osteoblasten handelt. Die Zellkulturen lassen den gleichen morphologischen Aufbau erkennen (s. Kapitel 3.2), welcher in anderen Kultursystemen von Osteoblasten beobachtet werden konnte [Auf'mkolk et al., 1985; Gerber et al., 2002; Wiesmann et al., 2003]. Des Weiteren zeichnen sich die Zellen als Osteoblasten durch ihre Fähigkeit aus, phenotypische Marker, u.a. Osteonectin und Collagen Typ I, zu synthetisieren [Cowles et al., 1998; Casser-Bette et al., 1990; Aubin et al., 1996]. Zu allen untersuchten Zeitpunkten bei der Zellmikromassenbildung kann der immunhistochemische Nachweis der Anwesenheit der Knochenmatrixproteine Osteonectin, Collagen Typ I und Osteopontin erbracht werden (s. Kapitel 3.3). Definitionsgemäß ist die Fähigkeit zur Knochenmatrixsynthese und ihrer Mineralisation ebenfalls ein für Osteoblasten typisches Merkmal [Auf'mkolk et al., 1985; Casser-Bette et al., 1990]. Das Protein Osteocalcin konnte nicht nachgewiesen werden. Es wird zeitlich kurz vor

Beginn der Mineralisation synthetisiert. Der Kulturzeitraum von 14 Tagen reicht jedoch nicht aus, um die Eigenschaft der Mineralisation nachweisen zu können.

4.1 Übersicht der Mikromassenkulturen auf Agarose

In der Literatur wurden zur Herstellung von Mikromassenkulturen häufig Trägermaterialien eingesetzt. Als Trägergerüst ("Scaffold") wurden u.a. Materialien wie Collagen [Wiesmann et al., 2003], Gelatineaggregate [Yan et al., 2005], Polysulfonschläuche [Tischer et al., 2004] oder Glas [Brickwedde, 2007] beschrieben. Bei letzterem verloren die Zellmikromassen bereits sieben Tage nach der Umsiedelung auf eine Glasoberfläche ihre dreidimensionale Struktur und die Osteoblasten proliferierten erneut als Monolayer. Im Zusammenhang mit Trägermaterialien gab es oft Probleme. Häufig war eine Fremdkörperreaktion und eine fehlende Langzeitstabilität zu beobachten, welche unter anderem der Resorption der Gerüste zuzuschreiben waren. Das hier beschriebene Verfahren kam ohne Trägermaterial aus und ermöglichte die Herstellung von dreidimensionalen Spheres aus Osteoblasten.

Vor Aussiedlung der Osteoblasten in die 96-well-Platten wurden diese mit einem Gemisch aus Agarose und Leibovitz-Medium präpariert. Die Zellen adhärten auf dem derart beschichteten Kulturboden nicht und proliferierten somit nicht als Monolayer weiter, sondern aggregierten zu sphärischen Mikromassenkulturen (Spheres). Bereits in früheren Untersuchungen bewies sich die Agarose als geeignetes Material bei der Herstellung von Zell-Spheres [Brickwedde, 2007; Jacoby, 2009].

Die hergestellten Zellmikromassen haben je nach Alter einen Durchmesser von 200-700 μm und sind makroskopisch sichtbar bei einer verwendeten Gesamtzahl von 200.000 Zellen. Die Größe der Mikromassen ist u.a. abhängig von der Zellzahl, mit welcher begonnen wird zu arbeiten. Ein Erkennen der Zellmikromassen bereits nach 1 Tag in den 96-Well-Platten ist ohne Probleme möglich. Infolgedessen ist der gezielte Umgang mit den Zellmikromassen bei der Fixierung und Auswertung *in vitro*, ebenso wie der potentielle Einsatz *in vivo* erleichtert möglich. Ein problemloser Umgang mit den Zellmikromassen ist ab dem 1. Tag möglich.

Durch eine Verhinderung der Adhärenz mit den Zellkulturschalen durch Agarose, konnten häufig beschriebene Veränderungen der Zellmorphologie und des Zellverhaltens bei Oberflächenkontakt [Rossi et al., 2005] unterbunden werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Mikromassenkulturen waren von definierter, reproduzierbarer Qualität bezüglich ihrer Form, ihrer Anzahl und des Differenzierungsgrades der Osteoblasten.

Bereits nach 1 Tag schließen sich die Osteoblasten zu stabilen, rundlichen Mikromassenkulturen zusammen. Der Zellverbund zeigt sich eher flach und kreisförmig. Der Schwerpunkt der Mikromassens ist vollständig mit Zellen ausgefüllt. Nach 7 Tagen zentrieren sich die Osteoblasten weiter im lokalen Schwerpunkt. Dieser Trend setzt sich nach 14 Tagen durch. Die Zellmikromassen werden im Durchmesser mit der Zeit kleiner, die Zelldichte nimmt jedoch zu. Zudem bildet sich immer mehr die kugelige, sphärische Form aus.

Diese Beobachtungen machte auch Jacoby [2009]. Sie siedelte Osteoblasten ebenfalls in ein mit Agarose beschichtetes Kulturgefäß aus und setzte ihre Untersuchungszeitpunkte auf 3, 7, 14 und 21 Tage fest. Dabei beschrieb sie kugelige, sphärische Mikromassenkulturen, deren Bildung nach 3 Tagen abgeschlossen wirkte. Diese Aussage kann hier nicht bestätigt werden, da sich die Zellmikromassen in Größe und Zelldichte auch nach dem 3. Kulturtag noch deutlich entwickeln. Brickwedde [2007] ‘erntete‘ ihre Mikromassenkulturen nach 3, 7, 14 und 28 Tagen in den mit Agarose beschichteten Platten. Auch sie schreibt von einem kugeligen bis elliptischen sowie abgeschlossenen Zellverband bereits nach 3 Tagen. In ihrer Arbeit bestätigt sich auch die deutliche Abnahme des Durchmessers der Spheres mit zunehmender Kulturdauer, die sich auch nach 28 Tagen noch zeigt.

In der vorgestellten Untersuchung wird erstmals die Bildung der Mikromassenkulturen aus Osteoblasten lichtmikroskopisch dargestellt. Die Zeitpunkte der Untersuchungen beginnen mit 30 Minuten nach Aussiedelung der Osteoblasten, über 60, 90, 120 und 240 Minuten, und reichen bis hin zu 420 Minuten nach Aussiedelung in mit Agarose beschichtete 96-Well-Platten. Bereits nach 30 Minuten zeigen sich im lokalen Schwerpunkt erste Zellverdichtungen. In den Randbereichen verringert sich die Zellzahl nach

60 Minuten sichtbar und die Zellaggregate werden zeitlich zunehmend größer. Nach 2 Stunden deutet sich erstmals die Bildung von mehrschichtigen Zellaggregaten an, begleitet von zellfreien Bereichen im noch losen, kreisähnlichen Netzwerk aus Osteoblasten. Die Zellen verdichten sich nach 4 Stunden weiter, wodurch die zellfreien Bereiche allmählich geschlossen werden. Die Zellaggregation kann mittlerweile dreidimensional betrachtet werden. Bereits nach 7 Stunden lässt sich eine Mikromassenkultur erahnen, welche klar von der Umgebung abzugrenzen ist.

Diese Ergebnisse lassen sich durch die REM-Untersuchungen bestätigen. Es zeigt sich jedoch bereits nach 60 Minuten, dass erste, vereinzelte dreidimensionale Aggregate entstehen. Im zeitlichen Verlauf werden die Zellzusammenschlüsse ebenfalls größer. Sie behalten ihre dreidimensionale Form.

Diese grobe zeitliche Einteilung der Mikromassenbildung sowie die hier beschriebenen Ergebnisse (s. Kapitel 3.1) wiederholten sich bei jeder Versuchsreihe.

4.2 Übersicht der fixierten Mikromassenkulturen

Die chemische Fixierung mit einem Gemisch aus Formaldehyd und Glutaraldehyd [Karnovsky, 1965] sowie die anschließende Einbettung in Lowicryl einiger Proben erfolgt in Anlehnung an Vahrman [2008]. Das hervorragende Penetrationsvermögen des Formaldehyds wird mit der guten, vernetzenden Wirkung des Glutaraldehyds kombiniert [vgl. Mulisch et al., 2010; Lang, 2006]. Die Fixierung der ausgereiften Zellmikromassen (s. Kapitel 2.2.5.1) ist problemlos durchführbar, da ein gezielter Umgang aufgrund der Größe und Stabilität möglich ist.

Nach dem Zusammenschluss der Zellen zu einer Mikromassenkultur wird der Durchmesser kontinuierlich kleiner. Die Abnahme des Durchmessers könnte einerseits durch Apoptose verursacht sein, welche den Anschein eines physiologischen Prozesses im Verlaufe der Reifung macht. Eine weitere Ursache könnte die abnehmende Verhinderung der Zelladhäsion zur Agarose sein. Während der Medienwechsel in der Kulturzeit sinkt die anfängliche Funktion der Agarose (s. Kapitel 2.2.3), wodurch Zellen aus den Mikromassen auswachsen und somit der Durchmesser der Mikromassenkultur kleiner wird [Neunzehn et al., 2013].

Lichtmikroskopisch sind zwei unterschiedliche Zellformen zu differenzieren, wobei in allen Bereichen der Mikromassenkultur Zellkerne sichtbar sind. Die Zellmorphologie beeinflusst die Proliferation [Chen et al., 1997; Rossi et al., 2005], die Differenzierung und die Genexpression [Rossi et al., 2005].

Im Inneren der Zellmikromassen stellen sich die Zellen in einer kubischen Form dar (s. Kapitel 3.2.1, Abb. 37 G,H,I) und lassen sich von der Matrix abgrenzen. Elektronenmikroskopisch lassen sich große, ovale Zellkerne und ein sich im aktiven Zustand befindliches Organellensystem aus erweitertem, rauem Endoplasmatischem-Retikulum, Mitochondrien, Sekretvesikeln und Gap Junctions darstellen [Neunzehn et al., 2013]. Sie entsprechen der in der Literatur beschriebenen Morphologie von reifen Osteoblasten [Heinemann et al., 2011]. Reife Osteoblasten werden als kuboide, 20-30 µm große Zellen beschrieben, welche sich palisadenartig um die Matrix, die sie synthetisieren, anordnen [Rodan et al., 1995]. Es sind aktive Zellen, die Matrixproteine wie Osteonectin, Collagen Typ I, Osteopontin und Osteocalcin exprimieren. Bedeutend sind diese reifen Osteoblasten für die Mineralisation der Matrix. Der Innenbereich, welcher von den Osteoblasten palisadenartig umgeben ist, ähnelt Knochenbälkchen [Owen et al., 1990]. Die Zellmikromassen enthalten demnach viele reife, aktive Osteoblasten.

Als kubische bis prismatische Zellen mit unterschiedlich großen und geformten Zellkernen sieht Brickwedde [2007] den Innenbereich der Mikromassenkulturen. Ihre Ergebnisse werden durch diese Arbeit bestätigt.

Die mehrreihige äußere Zellschicht begrenzt die Zellmikromassen nach außen (s. Kapitel 3.2.1, Abb. 37 G,H,I). Sie besteht aus flachen, länglichen Zellen und ähnelt den von Aubin [1998] als lange und dünne ‚bone-lining cells‘ beschriebenen Zellen. Diese sind zueinander versetzt in 2-3 Lagen angeordnet. Es handelt sich um eine eher inaktive Zellform, welche weniger Zellorganellen enthält [Owen et al., 1990] und typisch für die Knochenoberfläche ist. Die Zellschicht bildet sich nach ca. 1 Tag und bleibt innerhalb der Versuchszeit unverändert. Sie scheint eine ‚epitheliale‘ Funktion zu haben und ist in der Lage, aus der Mikromassenkultur herauszuwachsen, sowie in Oberflächen von Biomaterialien abzuwandern [Neunzehn et al., 2013].

Brickwedde [2007] beschreibt die äußeren 2-3 reihigen Zellschichten als Abschlusszellschicht gegen die Umgebung. Die Zellen sind flach, mit großen, gestreckten Zellkernen und rundlichen Nuclei, die zueinander versetzt in Lagen angeordnet sind. Ihre Versuchsreihe läuft über 28 Tage, während der die Abschlusschicht nahezu unverändert bleibt. Auch Jacoby hat 2009 diese mehrreihige äußere Zellschicht bei 3 Tage alten Mikromassenkulturen wahrgenommen und die Ergebnisse von Brickwedde bestätigt.

4.3 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

Die untersuchten Zellmikromassen weisen durch die Expression kollagener und nicht-kollagener Matrixproteine typische Merkmale eines natürlichen Knochengewebes auf.

Im Verlauf der natürlichen Knochenneubildung ändern sich die von den Osteoblasten sezernierten Proteine. Anfangs wird hauptsächlich Osteonectin gebildet. Es weist eine sehr hohe Affinität zu Calcium und Hydroxylapatit auf. Osteocalcin ist ein späterer Marker für die Ausbildung von apatitischen Knochenmineralien, da es in einer späten Phase der Differenzierung von Osteoblasten sezerniert wird [Perets et al., 2003; Nor et al., 2001]. Dieser Verlauf der sezernierten Matrixproteine zeigt sich auch bei den Zellmikromassen.

Bei der Betrachtung der lichtmikroskopischen Bilder fielen besonders im Inneren der Zellmikromassen, welche nach 14 Tagen fixiert wurden, Vakuolen und vermehrter Extrazellularraum auf (s. Kapitel 3.3.2, Abb. 40 Q). Diese morphologischen Veränderungen könnten durch Apoptose verursacht sein. Apoptose wirkt sich in der späten Mineralisationsphase *in vitro* erheblich bei der Reifung der Osteoblasten und der Mineralisation des Gewebes aus [Lynch et al., 1998]. Auch *in vivo* sichert dieser natürliche Mechanismus die Differenzierung der Osteoblasten während der Reifung und Mineralisation des Gewebes.

Die gemeinsame Expression und Ablagerung der Proteine in der Matrix (u.a. Osteonectin, -calcin, -pontin und Collagen Typ I) durch Osteoblasten ist, obwohl diese Proteine ebenfalls in anderen Geweben existieren, ein Zeichen des biosynthetischen Repertoires der Osteoblasten [Aubin, 1998; Neunzehn et al., 2013].

4.3.1 Osteonectin

Osteonectin (ON) ist ein Kalzium bindendes Glykoprotein, welches sowohl die Mineralisation als auch die Differenzierung der Osteoblasten positiv beeinflusst [Redruello et al., 2005]. Durch in-vitro-Experimente fand man heraus, dass ON Collagen und Hydroxylapatit binden kann und somit die Zellproliferation reguliert [Lane et al., 1994; Young et al., 1992]. Diese Transmembranfunktion zwischen Matrix und Zellen bestimmt die Härte des Knochens [Stryer, 1994]. Dies ist unter anderem bei einigen Osteopenieformen, wie z.B. der Osteogenesis imperfecta, deutlich zu erkennen, bei welcher die Osteonectinexpression stark herabgesetzt ist [Fedarko et al., 1995]. Osteonectin unterstützt demnach den Umbau und den Erhalt der Knochenmasse [Delaney et al., 2000].

In einigen Studien wurde das Glykoprotein ON als knochenspezifischer Nukleator für die Mineralisation bezeichnet [Ayad et al., 1998; Boskey, 1996]; es ist ein stimulierender Faktor im Mineralisationsprozess [Neunzehn et al., 2013]. In anderen Studien wurde wiederum vermutet, dass die Beteiligung von ON an der Initiation der apatitischen Kristallformation unwahrscheinlich ist [Roach, 1994], und es als effektiver Inhibitor im Kristallwachstum fungiert [Romberg et al., 1986].

In dieser Arbeit ist die Expression des Matrixproteins Osteonectin vom ersten Tag an sehr hoch und homogen über die Zellmikromassen verteilt (s. Kapitel 3.3.2, Abb. 40 M,N). Dies ändert sich auch in den folgenden 14 Tagen nicht (s. Abb. 40 O,P,Q,R). Die Färbung wird stärker und in sich homogener, was klar für eine Matrixbildung spricht und Voraussetzung für eine Biomineralbildung ist. Diesen Ergebnissen entsprechend scheint die Expression des Glykoproteins zeitlich mit dem Beginn der Matrixformation und der Initiation der Mineralisation zusammenzuliegen bzw. zeitlich parallel zu verlaufen.

Brickwedde [2007] bezeichnet die Expression des Matrixproteins ON nach 3 Tagen Kulturzeit ebenfalls als sehr stark. Für den von ihr untersuchten Zeitraum von 28 Tagen beschreibt sie eine stetige Zunahme der Intensität der Färbung, welche die Beteiligung von ON an der Matrixformation noch einmal stützt.

Sommer [2007] beschreibt hingegen nur eine intrazelluläre Anfärbung in der Zellkultur nach 1 Woche. Sie erscheint als lockeres zytosolisches Aggregat. Nach 35 Tagen sind die Osteoblasten eingebettet in eine dichte extrazelluläre Matrix. Der Peak, das höchste Ausmaß der Expression von ON, ist nach einer Inkubationszeit von fünf Wochen zu sehen. Zeitlich fällt die Expression des Glykoproteins nicht mit dem Beginn der Matrixformation und der Initiation der Mineralisation zusammen. Sommer geht davon aus, dass die zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen differenziert bestimmte Kristallwachstumsstellen blockieren, und somit einer überschießenden Mineralisation des Hartgewebes vorbeugen können.

Neunzehn et al. [2013] sehen eine leichte Variation in der Expression von ON im Verlaufe der Kulturzeit von 28 Tagen. Sie beschreiben eine erhöhte Verbreitung in der Kernregion der Mikrospheres im Gegensatz zu den äußeren Regionen.

In der hier vorliegenden Arbeit zeigt sich während der Bildung der Mikromassenkulturen ein ähnliches ON-Vorkommen verglichen mit den ausgereiften Spheres. Es findet eine stetige Steigerung der Expression statt. Nach bereits 30 Minuten sind partiell kleine Bereiche einzelner Zellen schwach rötlich gefärbt. Auch nach 60, 90 und 120 Minuten beschränkt sich die Expression von ON noch auf die Zellen selbst. Die Färbung nimmt in dieser Zeit rapide zu. 4 Stunden nach Aussiedelung zeigt sich die Verteilung des Matrixproteins auch im Interzellularraum der Zellaggregate. Die Färbung wird immer homogener, intensiver und Interzellularraum füllender. Nach 7 Stunden ist eine vermehrte Ansammlung von ON im Randbereich der Zellmikromassen zu erkennen (s. Kapitel 3.3.1, Abb. 40 A-L). Diese Ergebnisse lassen sich durch die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigen. Es zeigen sich früh Ansammlungen von Goldkügelchen und eine Konzentration dieser in der Peripherie der Zelle.

4.3.2 Collagen Typ I

Reife Osteoblasten haben die Fähigkeit, Membran-assoziierte Knochenmatrixproteine wie Collagen Typ I (CO) zu synthetisieren. Collagen bildet etwa 90% der organischen Matrix des Knochens [Cowles et al., 1998; Ayad et al., 1998] und ist neben Osteonectin ein frühes Produkt der Osteoblasten [Aubin, 1998]. Für die Struktur und die Funktion von reifem Knochen ist CO somit von entscheidender Bedeutung.

Nach unseren Untersuchungen lässt sich die Expression des Matrixproteins CO bereits nach einem Tag nachweisen, ist jedoch noch leicht inhomogen und unregelmäßig. Nach 7 Tagen fällt eine vermehrte Expression in den Randbereichen der Zellmikromassen auf. Das Matrixprotein wird nach 14 Tagen homogen über die Zellmikromassen verteilt synthetisiert. Es scheint nicht so, als ob der Gipfel der Collagensynthese erreicht ist.

Diese Beobachtungen machten auch Neunzehn et al. [2013]. Die ‚Osteomikrospheres‘ zeigten bereits nach 3 Tagen in den immunhistochemischen Färbungen ein erhöhtes Level an CO, welches sich im Verlauf von 28 Tagen steigerte. Nach 3 Tagen waren erste Bereiche zu erkennen, die sich mit 7 Tagen zu einem heterogenen Bild entwickeln. Nach 14 Tagen Kulturzeit verteilte sich CO homogen über den gesamten Querschnitt des ‚Osteomikrospheres‘.

Nach 7 Tagen konnte Brickwedde [2007] eine Zunahme der Intensität der CO-Expression feststellen. Dabei ist die Färbung multifokal in den Randbereichen am höchsten, wird allerdings im Untersuchungszeitraum über 28 Tage deutlich intensiver und homogener. Unterbrochen wird die Homogenität durch einen vermehrten Extrazellulärraum, lokalisiert im Inneren Bereich der Mikromassenkultur.

Gerber et al. [2002] verglichen Mikromassenkulturen und Monolagenkulturen aus osteoblasten-ähnlichen Zellen. Bereits nach einer Woche lagen zahlreiche Collagenfibrillen in Membranfalten und in der extrazellulären Matrix vor. Diese ordneten sich rechtwinklig an und zeigten die typische Querstreifung. Die Collagenfibrillen in den Membranfalten glichen den in der extrazellulären Matrix vorkommenden im Durchmesser (durchschnittlich 50 nm), im Färbungsmuster und in ihrer Elektronendichte. Nach 2 sowie 3 Wochen waren die Zellen im Inneren der Mikromassenkultur umgeben von mineralisierender Matrix. Die Collagenfibrillen wurden vermehrt und hatten einen Durchmesser von 50-100 nm. Es gab große mineralisierte Bereiche.

Sommer [2007] beschreibt nach 1 Woche intrazellulär angeordnete Färbespots, welche sich nach 21 Tagen zu flächigen Strukturen konzentrieren. Extrazellulär sind Strukturen zu erkennen, die zu kleineren Geflechten konfluieren. Nach 35 Tagen konnte sie mit einer Autofluoreszenzanalyse homogene, mineralisierte Collagenfibrillen nachweisen.

In direkter Umgebung dieser Mikrofibrillen waren initiale Mineralisationskeime zu erkennen, welche entlang der Fasern zu größeren Mineralglobuli verschmolzen. Dies ist für den Beginn der Mineralisation typisch [Wiesmann et al., 2001] und wird auch in weiteren Veröffentlichungen präzisiert [Höhling et al., 1995; Epple et al., 2002; Wiesmann et al., 1995].

Die Collagenfibrillen liegen in der unverkalkten Knochenmatrix (Osteoid) noch ungeordnet vor [Liebich, 1993] und organisieren sich im Verlauf der Mineralisation zu Lamellen. Diese geordneten Collagenfibrillen sind Grundlage für die Bildung von funktionellem Biomineral. Collagenfibrillen dienen der Keimbildung von biologischem Apatit als strukturelle Orientierungshilfe [Boskey, 1996; Landis et al., 1996; Landis, 1999]; sie können die Apatitablagerung jedoch nicht ohne Mitwirkung von weiteren Matrixproteinen auslösen [Termine et al., 1981; Wiesmann et al., 2005]. Es erscheint demnach erforderlich, dass die Formation der Collagenfibrillen vor der Präzipitation des Kalziumphosphates stattfindet. Die biologischen Apatitkristalle wachsen dabei parallel entlang der Längsachse der Collagenfasern [Epple et al., 2002; Wiesmann et al., 2003]. Collagen ist ein eher langsamer Initiator der Mineralisation [Roach, 1994], bietet jedoch als Matrix den nicht-kollagenen Proteinen eine Stelle, an der sie sich platzieren können [Gehron 1992]. Über spezifische Bindungsstellen am CO können u.a. Fibronectin [Cowles et al., 1998], Bone Sialoprotein [Tye et al., 2005] und Osteonectin [Young, 2003] an die Collagenmatrix binden und so den Mineralisationsprozess beeinflussen.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit stimmen mit der Annahme überein, dass Collagen zeitlich vor der Abscheidung von biologischem Apatit exprimiert wird und sich Collagenfibrillen gebildet haben müssen. Auch zur Nieden [2002] ordnet die Sekretion einer kollagenen Matrix zeitlich vor dem Mineralisationsprozess ein. Es folgen Osteonectin und Osteopontin, wobei der Osteocalcinspiegel zu dem Zeitpunkt noch sehr niedrig ist.

Nach 21 Tagen konnte Brickwedde [2007] unter dem TEM eine strukturierte, extrazelluläre Collagenmatrix erkennen. Intrazellulär sind Collagenfibrillen mit der typischen Querstreifung und dem Bandenmuster zu bemerken, welche auf der speziellen Anordnung der Collagenmoleküle beruhen [Welsch, 1997].

Während der Bildung der Mikromassenkulturen zeigt sich ein ähnliches Bild verglichen mit den ausgereiften Zellmikromassen. Es findet eine stetige Steigerung der Expression statt. Nach 30 Minuten kann in ca. der Hälfte der Zellen bereits die Synthese von CO nachgewiesen werden. Diese steigert sich nach 60 Minuten nur langsam, zeigt nach 90 Minuten jedoch einen starken Anstieg. Nahezu alle Zellen expremierten Collagen Typ I. Nach 4 Stunden ist ein relativ homogener Grundton zu erkennen, welcher sich in der folgenden Kulturzeit noch intensiviert. Auch die Ansammlung von Collagen Typ I im Extrazellularraum wird vermehrt sichtbar (s. Kapitel 3.3.2, Abb. 41 A-L). Auch unter dem Transmissionselektronenmikroskop ist der eher langsame Beginn der Expression von CO und der im Anschluss deutliche Anstieg nachzuweisen. Zudem bilden sich nach 90 Minuten bereits erste fibrilläre Strukturen.

In den REM-Aufnahmen zeigt sich, dass die Zellen der Mikromassenkultur bereits nach 4 Stunden komplett von extrazellulärer Matrix umgeben sind (s. Kapitel 3.2.2, Abb. 38 F).

Die extrazelluläre Anordnung des Collagennetzwerkes spielt bei der Matrixorganisation, der Nukleotorenbildung und der Mineralisation eine entscheidende Rolle. Um diese Aufgaben zu erfüllen, muss Collagen schon in einem frühen Stadium synthetisiert werden. Dies wird in dieser Arbeit nachgewiesen (s. Kapitel 3.3.2).

4.3.3 Osteopontin

Osteopontin (OP) ist ebenfalls Bestandteil der extrazellulären Knochenmatrix. Es bindet an Hydroxylapatit und spielt somit eine Schlüsselrolle in der Mineralisation von Knochen und Zähnen [Qin et al., 2004]. OP ist ein wichtiger Faktor bei der Knochengeweberemodellierung (bone remodeling) [Choi et al., 2008]. Es wird angenommen, dass das Protein eine wichtige Rolle bei der Verankerung der Osteoklasten an der mineralischen Matrix von Knochen spielt bzw. diese vermittelt [Reinholt et al., 1990].

Die Expression des Matrixproteins OP ist vom ersten Tag an nachzuweisen. Sie ist relativ inhomogen verteilt. Einzelne Zellen zeigen eine deutlich stärkere Expression.

Nach 7 sowie 14 Tagen ist diese punktuell intensive Färbung noch zu erkennen. Der Großteil der Zellen der Mikromassen ist nur noch sehr schwach angefärbt.

Durch Jacoby [2009] lassen sich diese Ergebnisse bestätigen. Sie weist in einer gemischten Osteoblasten-Endothelzell-Kultur nach 14 Tagen ebenfalls nur punktuell Osteopontin nach.

In den hier gemachten Untersuchungen zeigt sich während der Bildung der Mikromassenkulturen ein umgekehrtes Bild verglichen mit den ausgereiften Zellmikromassen. Es findet eine stetige Steigerung der Expression bis zum Zeitpunkt von 7 Stunden statt. Bereits nach 30 Minuten sind Randbereiche einzelner Zellen rötlich gefärbt, weisen somit eine Expression von OP auf. Eine Stunde nach Aussiedelung hat sich die Expression auf die Mehrheit der Zellen ausgebreitet, und ist deutlich homogener. Nach 90, 120 und 240 Minuten wird die Färbung immer homogener und gleichmäßiger. Zudem sind alle Zellen angefärbt. Es zeigt sich ein homogener Grundton. Den Höhepunkt der Expression von OP erreichen die Zellmikromassen nach 7 Stunden. Die Rotfärbung wird intensiver, dunkler und homogener (s. Kapitel 3.3.3, Abb. 41 A-L). Bereits nach dem ersten Tag nimmt die Intensität der Färbung wieder kontinuierlich ab. Die stetige Steigerung der Expression von OP und eine frühe Grüppchenbildung von Goldkugelchen sind in den TEM-Untersuchungen zu sehen. Nach 90 Minuten sind relativ große Aggregate aus mehreren Kugelchen über die gesamte Zelle verteilt.

4.3.4 Osteocalcin

Osteocalcin (OC) ist Bestandteil der extrazellulären, organischen, nicht-kollagenen Knochenmatrix. Es bindet Hydroxylapatit und Ca^{2+} mit hoher Affinität [Aubin et al., 1996; Karsenty, 1999], ist ein Marker für den Knochenaufbau und fördert die Mineralisation des Knochens. Calcium lagert sich an OC an, wird so lokal im Knochen konzentriert und stellt in Form von biologischem Apatit weitere Kristallisationskeime für Kalzium- und Phosphatmoleküle dar [Helmberg, 2009; Hoang et al., 2003; Hauschka et al., 1982]. Mit dieser Eigenschaft verhindert OC die Präzipitation des schwer löslichen Kalziumphosphats an unerwünschten Stellen im Körper. OC ist ein später Osteoblasten-Marker, da es in einer späten Phase der Differenzierung von Osteoblasten sezerniert wird [Perets et al., 2003; Nor et al., 2001], Zellen synthetisieren

das Matrixprotein, abhängig vom Reifestadium und vom Alter der Osteoblasten [Aubin, 1998]. Die Synthese steigt mit der Ausdehnung der Collagenmatrix und ihrer Kalzifizierung [Poliard et al., 1993].

Brickwedde [2007] zeigt in ihrer Arbeit Bildmaterial, welches die Expression von OC bereits nach dem 3. Kulturtag darstellt. Diese steigert sich innerhalb von 28 Tagen deutlich. Andererseits berichtet sie ebenfalls von der Eigenschaft des Osteocalcins, ein später Marker der Differenzierung der Osteoblasten zu sein. 2009 bestätigt Jacoby diese Eigenschaft. Sie hat nach 14 Tagen Kulturzeit der gemischten Mikromassenkulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen ein schwach positives Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchung auf OC. Nach der Bildung der Matrix, während ihrer Reifung und Mineralisation, steigt die Expression des Osteocalcins merklich an [Franceschi et al., 1992; zur Nieden, 2002]. Die Reifung der Spheres führt zur Erhöhung der Expression von OC gleichmäßig im gesamten Sphere [Neunzehn et al., 2013]. Es ist demnach ein später Marker und innerhalb der in dieser Arbeit untersuchten Zeiträume nicht zu erwarten.

In der vorliegenden Arbeit lässt sich die Expression des Matrixproteins OC innerhalb des Versuchszeitraumes von 14 Tagen in den Osteoblastenspheres nicht nachweisen. Weder nach einem, noch nach sieben oder 14 Tagen sind die Färbungen für OC bei den Paraffinschnitten der Mikromassenkulturen positiv (s. Kapitel 3.3.4, Abb. 42 A-F). Diese Ergebnisse bestätigen die Eigenschaft von Osteocalcin, ein später Osteoblasten-Marker zu sein.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Fähigkeit zur Knochenmatrixsynthese und ihrer Mineralisation zeichnet das osteokonduktive Potential aus.

Um eine spätere klinische Implantation der Mikromassenkulturen zu realisieren, ist es erforderlich, vitale Konstrukte als Gewebeersatz mit knochenspezifischen Markern und einer mineralisationsfähigen Matrix zur Knochenregeneration ausbilden zu können. Diese Arbeit unterstreicht, dass dies in vitro möglich ist.

Es ist gelungen, die Bildung der Zellmikromassen immunhistochemisch zu untersuchen. Die hier vorgelegten Ergebnisse bringen die Forschung einen Schritt näher an das Ziel, ein therapeutisch wirksames Knochenersatzmaterial zu entwickeln. Durch die Erkenntnisse aus dieser Arbeit können die weiterführenden Untersuchungen hin zu einem Knochenersatzmaterial unterstützt und gefördert werden.

Die größte Schwierigkeit dieser Arbeit besteht in der Vorbereitung der Zellen, welche sich im Stadium der ‚Bildung einer Mikromassenkultur‘ befinden. Zur Untersuchung müssen sie fixiert und eingebettet werden. Relativ lose Zellaggregate, Zell-Zell sowie Zell-Matrix-Kontakte sollen nicht zerstört werden. Durch sehr vorsichtiges, behutsames und erschütterungsfreies Arbeiten ist es gelungen, die makroskopische Struktur der Zellansammlungen bei der Fixierung zu erhalten. Die hier angewandte Methode der Voreinbettung stellt sich als geeignet heraus, um die Bildung der Zellmikromassen zu untersuchen und in folgenden Forschungsarbeiten, z.B. für Untersuchungen der Beeinflussung der Matrixsynthese und Mineralisation während der Bildung von Zellmikromassen, Anwendung zu finden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der lichtmikroskopischen Untersuchung der Expression von Matrixproteinen während der Bildung von Zellmikromassen. Dies ist ein wichtiges Thema, denn nur wenn man weiß, wie sich die Zellen einer Mikromassenkultur biochemisch verhalten und zu welchem Zeitpunkt sie anfangen, Matrixproteine evtl. definiert gesteuert zu exprimieren, kann die Mineralisation und die Bildung der Zellmikromassen positiv beeinflusst werden. Es wird gezeigt, dass bereits nach 30 Minuten intrazellulär Matrixproteine wie ON, CO und OP synthetisiert werden. 90 Minuten nach Aussiedelung der Osteoblasten sind erste extrazelluläre Ansammlungen der Proteine zu erkennen, welche nach 4 Stunden die Zellen fast vollständig umschließen. Die sich bildende extrazelluläre Matrix nimmt im Laufe der Kulturzeit deutlich an Masse zu und zeigt erste Anzeichen einer folgenden Mineralisation. Mit diesen Ergebnissen können weitere Studien arbeiten, welche die Expression der Proteine mit biophysikalischer oder biochemischer Stimulation beeinflussen.

Es sollte untersucht werden, welche Modifikationen zu einer vermehrten und früheren Expression und auch Mineralisation der Matrix führen, um die Zellmikromassen evtl.

schneller und besser differenziert im klinischen Alltag anwenden zu können. Die Aktivierung von ortsständigen Zellen (z.B. Distraktionsosteogenese) ist in situ u.a. durch Dehnungsreize [vgl. Meyer et al., 1999a], elektromechanische Reize [Aaron et al., 2004] oder die Stimulation durch Zytokine [Depprich et al., 2005] möglich. In folgenden Arbeiten könnte untersucht werden, inwieweit sich diese Stimulationen auf Mikromassenkulturen auswirken.

Eine gesteigerte Osteoinduktivität kann z.B. erreicht werden, indem die Heparinbindungsfähigkeit von BMP-2 gesteigert wird. Der Wachstumsfaktor FGF-2 führt zu einem ähnlichen Effekt [Richard et al., 1995]. Auch die Matrixproteine selbst könnten beeinflusst werden. Zum Beispiel wird die Bildung des Matrixproteins Osteopontin u.a. durch Calcitriol (1,25-Dihydroxy-vitamin-D3) stimuliert. Eine wichtige Rolle wird Kalium in der Aktivierung der Nukleation sowie in der Verhinderung von unkontrollierter Mineralisation, insbesondere während der initialen Phase der Kalziumphosphat-Abscheidung zugeschrieben [Dambach et al., 2004; Wiesmann et al., 1998].

Auch von Magnesium wird angenommen, ein Co-Faktor im Mineralisationsprozess zu sein und die Größe der Apatitkristalle zu beeinflussen [Wiesmann et al., 1997]. Ein möglicher Einsatz im Zusammenhang mit Mikromassenkulturen müsste jedoch noch untersucht werden. Diese Arbeit kann einen ersten zeitlichen Anhaltspunkt für solche Projekte geben und helfen, den richtigen Zeitpunkt für den Einsatz von Stimulanzen zu finden.

5 Zusammenfassung

Für eine schnelle und erfolgreiche Regeneration von ossären Defekten ist ein sensibles Zusammenspiel verschiedener, für die Knochenbildung verantwortlicher Faktoren notwendig. In diesen vielstufigen Prozess sind bei der Biomineralisation des Knochens anfangs die nicht-kollagenen Matrixproteine Osteonectin (als Verbindung von organischen und anorganischen Anteilen der Matrix), Osteocalcin (zur Bindung von Hydroxylapatit wie auch Calcium) und Osteopontin (als Initiator der Verankerung von Osteoklasten an der mineralischen Matrix) sowie das Matrixprotein Collagen Typ I (als orientierende Matrix für Mineralablagerungen) maßgeblich involviert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bildung und Reifung von Mikromassenkulturen aus Osteoblasten *in vitro*, mit besonderem Augenmerk auf die Matrixproteine Osteonectin, Collagen Typ I, Osteocalcin und Osteopontin immunhistochemisch zu untersuchen.

Zur Herstellung der dreidimensionalen Zellmikromassen wurden primäre Osteoblasten aus dem Periost boviner Metacarpalia gewonnen, als Monolayer proliferiert, passagiert und im Anschluss in 96-Well-Platten auf einem Gemisch aus Agarose und Leibovitz-Medium kultiviert. Zu definierten Zeitpunkten wurde die Entwicklung der Expression der o.g. Matrixproteine untersucht, indem die Zellen/Mikromassen fixiert, voreingebettet, eingebettet, immunhistochemisch markiert und unter dem Lichtmikroskop sowie dem Transmissionselektronenmikroskop begutachtet wurden.

Im Untersuchungszeitraum von 30 Minuten bis zu 14 Tagen strömten die Zellen einem Schwerpunkt entgegen und bildeten bereits nach ca. 90 Minuten lockere Zellmikromassen, wobei sich ihre Form, Größe und Zelldichte im weiteren Verlauf noch wandelte. Die angewandten Methoden führten nicht zu einer Veränderung der Zellaggregation oder der makroskopischen Formation und sind für Untersuchungen zur Bildung von Zellmikromassen geeignet. Der immunhistochemische Nachweis zeigte, dass bereits nach 30 Minuten intrazellulär Matrixproteine wie Osteonectin, Collagen Typ I und Osteopontin synthetisiert wurden. 90 Minuten nach Aussiedelung der Osteoblasten waren erste extrazelluläre Ansammlungen der Proteine zu erkennen, welche nach 4 Stunden die Zellen fast vollständig umschlossen. Die sich bildende extrazelluläre

Matrix nahm im Laufe der Kulturzeit deutlich an Masse zu und zeigte erste Anzeichen einer folgenden Mineralisation. Osteocalcin konnte während des gesamten Versuchszeitraumes nicht nachgewiesen werden, wodurch seine Eigenschaft als später Osteoblasten-Marker bestätigt wurde.

Um die Mineralisation und die Bildung der Zellmikromassen positiv zu beeinflussen, können die Ergebnisse dieser Arbeit genutzt und die Expression der Matrixproteine mit biophysikalischer oder biochemischer Stimulation beeinflusst werden.

6 Literaturverzeichnis

- 1) **Aaron RK, Boyan BD, Ciombor DM, Schwartz Z, Simon BJ (2004):** Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 419:30-37.
- 2) **Abbott A (2003):** Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 424:870-872.
- 3) **Achilles W, Jockel U, Schaper A, Burk M, Riedmiller H (1995):** In vitro formation of "urinary stones": generation of spherulites of calcium phosphate in gel and overgrowth with calcium oxalate using a new flow model of crystallization. *Scanning Microsc* 9:577-585.
- 4) **Adler CP, Thomas C (1992):** Grundlagen der klinischen Medizin Anatomie, Physiologie, Pathologie, Mikrobiologie, Klinik - Knochen und Gelenke. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- 5) **Amling M, Delling G. (1998):** Osteoklastenbiologie Bedeutung im Rahmen von Knochenmetastasen. *Orthopäde* 27:214-23.
- 6) **Amling M. (2003):** Physiologie und Pathophysiologie des Skelettsystems. 3. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Biomechanik (29.-31.5. 2003) Instructional Course II: Biologie und mechanische Kompetenz des Knochens. 31.05.2003; Vorsitz: Claes L, Duda G; S.2-15.
- 7) **Arena J, McEwen BF, Song MJ, Landis WJ (1992):** A study of the mineralisation of bone by high voltage electron microscopic tomography. In: Bailey GW, Bentley J, Small JA (Hrsg) Proc. 50th Annual Meeting of the EMSA. San Francisco Press, San Francisco, 582-583.
- 8) **Arnold S, Plate U, Wiesmann HP, Kohl H, Höhling HJ (1997):** Quantitative electron-spectroscopic diffraction (ESD) and electron-spectroscopic imaging (ESI) analyses of dentine mineralisation in rat incisors. *Cell Tissue Res.*, 288:185-190.
- 9) **Aubin JE, Liu F (1996):** The osteoblast lineage. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds) Principles of bone biology. Academic Press, San Diego, Ca, U.S.A., pp 51-67.
- 10) **Aubin JE (1998):** Advances in the osteoblast lineage. *Biochem. Cell Biol.*, 76:899-910.

- 11) **Auf'mkolk B, Hauschka PV, Schwartz ER (1985):** Characterization of human bone cells in culture. *Calcif Tiss Int* 37:228-235.
- 12) **Ayad S, Boot-Handford R, Humphries MJ, Kadler KE, Shuttleworth (1998):** The extracellular matrix. Facts book. Academic Press, San Diego.
- 13) **Benninghoff A, Drenckhahn D (2003):** Anatomie Bd. 1, 16. Auflage. Urban&Fischer.
- 14) **Booij A, Raghoobar GM, Jansma J, Kalk WWI, Vissink A. (2005):** Morbidity of chin bone transplants used for reconstructing alveolar defects in cleft patients. *Craniofacial Journal* 42(5).
- 15) **Boskey AL (1996):** Matrix proteins and mineralization: An overview. *Connective Tissue Research* 35:357-363.
- 16) **Boyce T, Edwards J, Scarborough N (1999):** Allograft bone: the influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 30:571-581.
- 17) **Bradt JH (1998):** Assemblierung und Mineralisierung von Kollagen-I und deren Beeinflussung durch anionische Polyaminosäuren. Dissertation Techn. Univ. Dresden.
- 18) **Brickwedde K (2007):** Osteoblasten-Mikromassenkultur. Dissertation Universität Münster.
- 19) **Brown RA, Prajapati R, McGrouther DA, Yannas IV, Eastwood M (1998):** Tensional homeostasis in dermal fibroblasts: mechanical response to mechanical loading in three-dimensional substrates. *Journal of Cellular Physiology* 175:323-332.
- 20) **Burr DB, Robling AG, Turner CH (2002):** Effect of biomechanical stress on bones in animals. *Bone* 30(5):781-86.
- 21) **Carlemalm E, Garavito RM, Villinger W (1982):** Resin development for electronmicroscopy and an analysis of embedding at low temperature. *J. Bacteriol.* 159:138-144.
- 22) **Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Schmidt J (1990):** Bone formation of osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture. *Calcif Tiss Int* 46:46-56.
- 23) **Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE (1997):** Geometric control of cell life and death. *Science* 276:1425-1428.

- 24) Choi ST, Kim JH, Kang EJ, Lee SW, Park MC, Park YB, Lee SK (2008):** Osteopontin might be involved in bone remodelling rather than in inflammation in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 47 (12):1775–9.
- 25) Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA (1998):** Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. *Calcif Tissue Int* 62:74-82.
- 26) Cuhlmann C (2009):** Gesintertes Polylactid-Polyglycolid-Copolymer als individuell dreidimensional konfigurierbares und bioresorbierbares Knochenersatzmaterial. Dissertation Universität Münster.
- 27) Cuisinier FJG, Steuer P, Senger JC, Voegel JC, Frank RM (1993):** Human amelogenesis: high resolution electron microscopy of nanometer-sized particles. *Cell Tissue Res.*, 273:175-182.
- 28) Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM (2001):** Taking cell- matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294:1708-1712.
- 29) Daculsi G, Pilet P, Cottrel M, Guicheux G (1999):** Role of fibronectin during biological apatite crystal nucleation: Ultrastructural characterization. *J Biomed Mater Res* 47:228-233.
- 30) Dambach S, Fartmann M, Kriegeskotte C, Brüning C, Hellweg S, Wiesmann HP, Lipinsky D, Arlinghaus HF (2004):** TOF-SIMS and laser-SNMS analysis of apatite formation in extracellular protein matrix of osteoblasts in vitro. *Surf Interface Anal* 36:711-715.
- 31) Delaney AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E (2000):** Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 105:915-923.
- 32) Depprich R, Handschel J, Sebald W, Kübler NR, Wurzler KK (2005):** Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein (BMP) mutants. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie* 9:363–368.
- 33) El-Amin SF, Lu HH, Khan Y, Burems J, Mitchell J, Tuan RS, Laurencin CT (2002):** Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials* 24:1213-1221.

- 34) Epple M (2003):** Biomaterialien und Biomineralisation. Teubner Verlag, Wiesbaden.
- 35) Epple M, Dorozhkin SV (2002):** Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angew Chem* 114:3260-3277.
- 36) Epple M, Lanzer P (2001):** How much interdisciplinarity is required to understand vascular calcifications? Formulation of four basic principles of vascular calcification. *Z Kardiol* 90:III/2-III/5.
- 37) Fedarko NS, Gehron Robey P, Vetter UK (1995):** Extracellular matrix stoichiometry in osteoblasts from patients with osteogenesis imperfecta. *J. Bone Miner. Res.* 10:1122-1129.
- 38) Franceschi RT, Iyer BS (1992):** Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 7(2):235-246.
- 39) Friedlaender, G.E., Strong, D.M., Tomford, W.W. und Mankin, H.J. (1999):** Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *Orthop Clin North Am* 30:583-588.
- 40) Fuchs S, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ (2006):** Outgrowth endothelial Cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials. *Biomaterials* 27:5399.
- 41) Gehron Robey P, Bianco P, Termine JD (1992):** The cellular biology and molecular biochemistry of bone formation. *Disorders of bone and mineral metabolism*, 241-263.
- 42) Gerber HP, Ferrara N (2000):** Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 10(5):223-8.
- 43) Gerber HP, Thiennu HV, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999):** VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during enchondral bone formation. *Nature Medicine* 5(6):623-8.
- 44) Gerber I, ap Gwynn I, Alini M, Wallimann T (2005):** Stimulatory effects of creatine on metabolic activity, differentiation and mineralization of primary osteoblast-like cells in monolayer and micromass cell cultures. *Eur. Cell Mater.* 10:8-22.

- 45) Gerber I, ap Gwynn I (2002):** Differentiation of rat osteoblast-like cells in monolayer and micromass cultures. *Eur Cell Mater* 3:19-30.
- 46) Gerber I, ap Gwynn I (2001):** Influence of cell isolation, cell culture density, and cell nutrition on differentiation of rat calvarial osteoblast-like cells in vitro. *Eur Cell Mater* 2:10-20.
- 47) Gerstenfeld LC, Lian JB, Gotoh Y, Lee DD, Landis WJ, McKee MD, Nanci A, Glimcher MJ (1989):** Use of cultured embryonic chicken osteoblasts as a model of cellular differentiation and bone mineralization. *Connect Tissue Res* 21:215.
- 48) Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005):** Bone substitutes: an update. *Injury* 36 Suppl 3:20-27.
- 49) Glimcher MJ (1968):** A basic architectural principle in the organization of mineralized tissues. *Clin Orthop* 61:16 36.
- 50) Glimcher MJ (1992):** The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. In: Coe FL, Flavus MJ (Hrsg) *Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. Raven Press, New York, 265-286.
- 51) Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD (2001):** Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* 22:1279–1288.
- 52) Haller O (2005):** Viren als Krankheitserreger/ Prionen. In: Kayser FH (Hrsg) *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart, New York, 11. Auflage, 551-553.
- 53) Handschel JG, Depprich RA, Kubler NR, Wiesmann HP, Ommerborn M, Meyer U (2007):** Prospects of micromass culture technology in tissue engineering. *Head Face Med* 3:4.
- 54) Handschel J, Naujoks C, Depprich R, Lammers L, Kubler N, Meyer U, Wiesmann HP (2011):** Embryonic stem cells in scaffold-free three-dimensional cell culture: osteogenic differentiation and bone generation. *Head Face Med*. 7:12.

- 55) Hartig M, Joos U, Wiesmann HP (2000):** Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro. *European Biophysics Journal* 29:499-506
- 56) Hauschka PV, Carr SA (1982a):** Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* 21:2538-2547.
- 57) Hauschka PV, Carr SA, Biemann K (1982):** Primary structure of monkey osteocalcin. *Biochemistry* 21:638-642.
- 58) Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM (1989):** Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol. Rev.*69:990-1047.
- 59) Heinemann C, Heinemann S, Worch H, Hanke T (2011):** Development of an osteoblast/osteoclast co-culture derived by human bone marrow stromal cells and human monocytes for biomaterials testing. *Eur. Cell Mater.* 21:80-93.
- 60) Helmberg A (2009):** Knochenstoffwechsel. Vorlesungsskript der Universität Innsbruck.
- 61) Hildebrandt H, Dornblüth O, Pschyrembel W (1998):** Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 258. Auflage, de Gruyter, Berlin.
- 62) Hillsley MV, Frangos JA (1994):** Bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow. *Biotechnology and Bioengineering* 43:573-581.
- 63) Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, Yang DSC (2003):** Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature* 425:977-980.
- 64) Höhling HJ (1989):** Special aspects of biomineralisation of dental tissues. In: Oksche A, Vollrath L, (Hrsg) *Handbook of Microscopic Anatomy*. Vol. V/6. Springer Verlag, Berlin, 475-524.
- 65) Höhling HJ, Arnold S, Barckhaus RH, Plate U, Wiesmann HP (1995):** Structural relationship between the primary crystal formations and the matrix macromolecules in different hard tissues. Discussion of a general principle. *Connect Tissue Res* 33:171-178.
- 66) Jacoby I (2009):** Das Potenzial von Kokulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen für das Bone Tissue Engineering. Dissertation Universität Münster.

- 67) Jones SJ, Boyde A (1977):** The Migration of Osteoblasts. *Cell and Tissue Research* 184:179-193.
- 68) Karnovsky MJ (1965):** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27:137-8A.
- 69) Karsenty G (1999):** The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev* 13 (23), 3037-3051.
- 70) Kielty CM, Hopkinson I, Grant ME (1993):** Collagen: the collagen family: structure, assembly and organization in the extracellular matrix. In: Royce PM, Steinmann B *Connective tissue and its heritable disorders.* Wiley-Liss, New York: 103-148.
- 71) Kivirikko KI (1993):** Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann Med*; 25:113-126.
- 72) Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollock JM, Kluth D, Herbst H, Rogiers X (1999):** Long-term differentiated function of heterotopically transplanted hepatocytes on three-dimensional polymer matrices. *J. Biomed. Mater. Res.* 47:494-503.
- 73) Koolman J, Röhm KH (2009):** Taschenatlas Biochemie des Menschen. 4., überarb. u. erw. Aufl. XII, 529 Thieme, Stuttgart.
- 74) Kübler NR, Würzler K, Reuther JF, Sieber E, Kirchner T, Sebald W (2000):** Effect of different factors on the bone forming properties of recombinant BMPs. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie* 4:465-469.
- 75) Kurz, L.T., Garfin, S.R. und Booth, R.E., Jr. (1989):** Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. *Spine* 14:1324-1331.
- 76) Landis WJ, Hodgens KJ, Song MJ, Arena J, Kiyonaga S, Marko M (1996):** Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging. *J Struct Biol* 117:24-35.
- 77) Landis WJ (1999):** An overview of vertebrate mineralization with emphasis on collagen-mineral interaction. *Gravit Space Biol Bull* 12:15-26.
- 78) Lane TF, Sage EH (1994):** The biology of SPARC, a protein that modulated cell-matrix interactions. *FASEB J.* 8:163-173.

- 79) Lang G (2006):** Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. Springer Medizinverlag.
- 80) Langenbach F, Berr K, Naujoks C, Hassel A, Hentschel M, Depprich R, Kubler NR, Meyer U, Wiesmann HP, Kögler G, Handschel J (2011):** Generation and differentiation of microtissues from multipotent precursor cells for use in tissue engineering. *Nat Protoc.* 6(11):1726-35.
- 81) Langer R, Vacanti JP (1993):** Tissue engineering. *Science* 14; 260(5110):920-6.
- 82) LeGeros RZ (1974):** Variations in the crystalline components of human dental calculus. I. Crystallographie. *J Dent Res* 53:45-50.
- 83) LeGeros RZ (1991):** Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci* 15:1-201.
- 84) Lieberman JR, Le LQ, Wu L, Finerman GA, Berk A, Witte ON, Stevenson R (1998):** Regional gene therapy with a BMP-2-producing murine stomal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents. *Journal of Orthopaedic Research* 16:330-339.
- 85) Liebich H.G. (1993):** Funktionelle Histologie: Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere. 2.Auflage Stuttgart; New York: Schattauer.
- 86) Lindl T (2002):** Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Spektrum-Verlag, 5. Auflage Heidelberg, Berlin.
- 87) Löffler G (2008):** Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- 88) Lynch MP, Capparelli C, Stein JL, Stein GS, Lian JB (1998):** Apoptosis During Bone-Like Tissue Development In Vitro. *Journal of Cellular Biochemistry* 68:31-49.
- 89) Lynch MP, Stein JL, Stein GS, Lian JB (1995):** The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotyp in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: Modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res* 216:35-45.
- 90) Marcove RC, Arlen M. (1992):** Atlas of bone pathology: with clinical and radiographic correlations: based on Henry L. Jaffe`s course. Philadelphia: Lippincott.

- 91) Mayer U, Aumailley M, Mann K, Timpl R, Engel J (1991):** Calcium-dependent binding of basement membrane protein BM-40 (osteonectin, SPARC) to basement membrane collagen type IV. *Eur. J. Biochem.* 198:141-150.
- 92) Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J (2002):** Osteopontin - a molecule for all seasons. *QJ Med* 95:3-13.
- 93) Mergenhagen SE, Martin GR, Rizzo AA, Wright DN, Scott DB (1960):** Calcification in vivo of implanted collagen *Biochim Biophys Acta* 43:563-565.
- 94) Meyer U, Meyer T, Vosshans J, Joos U (1999):** Decreased expression of osteocalcin and osteonectin in relation to high strains and decreased mineralization in mandibular distraction osteogenesis. *Journal of Cranio-maxillo-facial Surgery* 27:222-227.
- 95) Meyer U, Meyer T, Wiesmann HP, Stratmann U, Kruse-Lösler B, Maas H, Joos U (1999a):** The effect of magnitude and frequency of interfragmentary strain on the tissue response to distraction osteogenesis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 57(11):1331-1339; Diskussion 1340-1341.
- 96) Meyer U, Wiesmann HP (2005):** Bone and cartilage tissue engineering. Heidelberg.
- 97) Möller J (2008):** Analysen kryopräparierter nicht-dehydrierter Probensysteme mit Hilfe eines neu entwickelten ToF-SIMS-Instruments mit integrierter Hochvakuumkryoschnittapparatur. Dissertation Universität Münster.
- 98) Mulisch M. (Hrsg), Welsch U. (Hrsg) (2010):** Romeis - Mikroskopische Technik, 18. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- 99) Naujoks C, Handschel J, Kübler N (2010):** Aktueller Stand des osteogenen Tissue-Engineerings. In: Neues aus Wissenschaft und Lehre. Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2008/2009:137-152.
- 100) Neidlinger-Wilke C, Wilke HJ, Clases L (1994):** Cycling stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application. *Journal of Orthopaedic Research* 12:70-78.
- 101) Neunzehn J, Heinemann S, Wiesmann HP (2013):** 3-D osteoblast culture for biomaterials testing. *J. Dev. Biol. Tissue Eng.* Vol. 5(1), pp 7-12.

- 102) Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1992):** Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band I Bewegungsapparat. 6. Auflage von Frewein J, Wille KH, Wilkens H. Berlin und Hamburg: Paul Parey.
- 103) Niedhart C, Niethard FU (1998):** Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe. In: Puhl W (Hrsg). Bioceramics in Orthopaedics – New Applications. Enke :46-50.
- 104) Nöbel D (2007):** Untersuchungen zur Osteointegration und Resorbierbarkeit von Implantatbeschichtungen für den Knochenersatz. Dissertation Universität Leipzig
- 105) Nor JE, Peters MC, Christensen JB (2001):** Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. Lab Invest 81:453.
- 106) Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990):** Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol. 143(3):420-30.
- 107) Perets A, Baruch Y, Weisbuch F (2003):** Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. J Biomed Mater Res A 65:489.
- 108) Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunir A, de Pollack C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemin G (2000):** Tissue engineered bone regeneration. Nature Biotechnology 18:959-63.
- 109) Petrides PE, Löffler G, Petro E (1998):** Prionkrankheiten. In: G.Löffler; Petro E. Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage. Springer, 312-313.
- 110) Pihlajaniemi T, Rehn M (1995):** Two new collagen subgroups: membrane associated collagens and types XV and XVII. Prog Nucleic Acid Res; 50:225-262.
- 111) Plate U, Höhling HJ, Reimer L, Barckhaus RH, Wienecke R, Wiesmann HP, Boyde A (1992):** Analysis of the calcium distribution in pre-dentine by EELS and of the early crystal formation in dentine by ESI and ESD. J Microsc. 166(Pt 3):329-41.

- 112) Plate U, Höhling HJ (1994):** Morphological and structural studies of early formation in enamel of rat incisors by electron spectroscopic imaging (ESI) and electron spectroscopic diffraction (ESD). *Cell Tissue Res.*, 277:151-158.
- 113) Plate U, Tkotz T, Wiesmann HP, Stratmann U, Joos U, Höhling HJ (1996):** Early mineralization of matrix vesicles in the epiphyseal growth plate. *J. Microsc.*, 1831:02-107.
- 114) Plate U, Arnold S, Stratmann U, Wiesmann HP, Höhling HJ (1998):** General Principle of Ordered Apatitic Crystal Formation in Enamel and Collagen Rich Hard Tissues. *Connective Tissue Research*; 38:149-157.
- 115) Poliard A, Lamblin D, Marie PJ, Buc-Caron MH, Kellermann O (1993):** Commitment of the teratocarcinoma-derived mesodermal clone C1 towards terminal osteogenic differentiation. *J Cell Sci* 106:503-512.
- 116) Pollard TD, Earnshaw WC (2002):** Cell biology. Philadelphia: Saunders.
- 117) Pretorius JA, Melsen B, Nel JC, Germishuys PJ (2005):** A histomorphometric evaluation of factors influencing the healing of bony defects surrounding implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20(3):387-398.
- 118) Qin C, Baba O, Butler WT (2004):** Post-translational modifications of SIBLING Proteins and their roles in Osteogenesis and Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 15(3):126-136.
- 119) Raghoobar GM, Meijndert L, Kalk WW, Vissink A (2007):** Morbidity of mandibular bone harvesting: a comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 22(3):359-65.
- 120) Redruello B, Estêvão MD, Rotllant J, Guerreiro PM, Anjos LI, Canário AV, Power DM (2005):** Isolation and characterization of piscine osteonektin and downregulation of its expression by PTH-related protein. *J Bone Miner Res.* 20(4):682-92.
- 121) Rehbein M (2008):** Hyaluronsäure als Trägersubstanz für bioaktive Proteine zur Optimierung der Knochendefektheilung. Dissertation Universität Aachen.
- 122) Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D (1990):** Osteopontin-a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(12):4473-5.

- 123) Reynolds ES (1963):** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Cell Biol.* 17:208-12.
- 124) Richard C, Liuzzo JP, Moscatelli D (1995):** Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) can mediate cell attachment by linking receptors and heparan sulfate proteoglycans on neighbouring cells. *The Journal of biological chemistry* 270:24188-24196.
- 125) Roach HI (1994):** Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. *Cell Biol Int* 18:617-628.
- 126) Robards AW, Sleyter UB (1985):** Low temperature methods in biological electronmicroscopy. - Kemen E, *Cytologie und Funktion eines amyloidähnlichen Proteins aus Rostpilzen.* New York: Elsevier, 27.
- 127) Rodan GA, Rodan SB (1995):** The Cells of Bone. *Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management* 2:1-39.
- 128) Romberg WR, Werness PG, Riggs BL, Mann KG (1986):** Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bonespecific and other calcium-binding proteins. *Biochem* 25:1176-1180.
- 129) Rossi MI, Barros AP, Baptista LS, Garzoni LR, Meirelles MN, Takiya CM, Pascarelli BM, Dutra HS, Borojevic R (2005):** Multicellular spheroids of bone marrow stromal cells: a three-dimensional in vitro culture system for the study of hematopoietic cell migration. *Braz. J. of Med and Biol Res* 38:1455-1462.
- 130) Roth J, Bendayan M, Carlemalm E, Villinger W, Garavito RM (1981):** Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatis tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 29:663-671.
- 131) Sage EH, Vernon R, Funk S, Everitt E, Angello J (1989):** SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca²⁺-dependent binding to the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 109:341-356.
- 132) Sándor GKB (2003):** The minimization of morbidity in cranio-maxillofacial osseous reconstructions. Bone graft harvesting and coral-derived granules as a bone graft substitute. Institute of Dentistry, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University of Oulu, Finland.

- 133) Sasso RC, Le Huec JC, Shffrey C (2005):** Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment. *Journal of Spinal Disorders and Techniques* 18 Supplement, 77-81.
- 134) Schäfer S, Dekiff M, Plate U, Szuwart T, Denz C, Dirksen D (2012):** Quantitativ analysis of dynamic behavior of osteoblasts during in vitro formation of micro-mass cell cultures. *J. Biophotonics*.
- 135) Schäfer S (unveröffentlicht):** Quantitative optische Analyse des dynamischen Verhaltens von Osteoblasten während der in vitro Bildung von Mikromassen. Dissertation Universität Münster.
- 136) Schieker M, Heiss C, Mutschler W (2008):** Knochenersatzmaterialien. *Unfallchirurg* 111:613-620.
- 137) Schliephake H (2002):** Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 31:469-484.
- 138) Schmidt-Rohlfing B, Tzioupis C, Menzel CL, Pape HC (2009):** Tissue Engineering von Knochengewebe, Prinzipien und klinische Anwendungsmöglichkeiten. *Unfallchirurg* 112:785-795.
- 139) Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO (1999):** Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *Journal of Orthopaedic Research* 17:269-278.
- 140) Schroeder H (1969):** Formation and inhibition of dental calculus. *J Periodontol* 40: 643-646.
- 141) Schwenger N, Ehrenfeld M (2000):** Plastische und wiederherstellende Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie. In: Schwenger N, Ehrenfeld M, (Hrsg.), *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde, Band 2: Spezielle Chirurgie* 3.Auflage. Thieme, Stuttgart, New York, 379-419.
- 142) Sieminski AL, Hebbel RP, Gooch KJ (2005):** Improved microvascular network in vitro by human blood outgrowth endothelial cells relative to vessel-derived endothelial cells. *Tissue Engineering* 11:1332.

- 143) Sivaraman A, Leach JK, Townsend S, Iida T, Hogan BJ, Stolz DB, Fry R, Samson LD, Tannenbaum SR, Griffith LG (2005):** A microscale in vitro physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction. *Curr. Drug Metab.* 6:569-591.
- 144) Sodek J, Zhu B, Huynh MH, Brown TJ, Ringuette M (2002):** Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. *Conn Tiss Res* 43:308-319.
- 145) Sommer J (2007):** Charakterisierung der Laser Secondary Neutral Mass Spectrometry und Immunfluoreszenz-mikroskopie zur Biomineralisation von Monolagen und 3-dimensionalen Osteoblastenkulturen. Dissertation Universität Münster.
- 146) Stahl A, Wu X, Wenger A, Klagsbrun M, Kurschat P (2005):** Endothelial progenitor cell sprouting in spheroid cultures is resistant to inhibition by osteoblasts: A model for bone replacement grafts. *FEBS Letters* 579(24):5338-5342.
- 147) Stancari F, Zanni B, Bernardi F, Calandriello M, Salvatorelli G (2000):** Use of PLA-PGA (Copolymerised Polylactid/Polyglycolic Acids) as a bone filler. Clinical experience and histologic study of a case. *Quintessenz* 51 (1):47-52.
- 148) Stary HC (2000):** Natural history of calcium deposits in atherosclerosis progression and regression. *Z Kardiol* 89:II/28-II/35.
- 149) Stryer L (1994):** Biochemie Spektrum. Akad. Verl., Heidelberg, 2. korr. Nachdruck, S. 292.
- 150) Tatalovic M (2010):** Deadly proteins: prions. In: Science in school. Issue 15, www.scienceinschool.org.
- 151) Termine JD (1990):** Cellular activity, matrix proteins and aging bone. *Exp Gerontol.* 25(3-4):217-21.
- 152) Termine JD, Kleinmann HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR (1981):** Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26:99-105.
- 153) Tischer T, Schieker M, Stengele M, Pautke C, Neth P, Jochum M, Mutschler W, Milz S (2004):** 3D-Culturing of Human Osteoblastic Cells with Vessel-Like Nutrient Supply. *Z Orthop Grenzgeb* 142:344-349.

- 154) Tortelli F, Cancedda R (2009):** Three-dimensional cultures of osteogenic and chondrogenic cells: a tissue engineering approach to mimic bone and cartilage in vitro. *Eur. Cell Mater.* 17:1-14.
- 155) Tye CE, Hunter GK, Goldberg HA (2005):** Identification of type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction. *J Biol Chem* 280:13487-13492.
- 156) Vahrman A (2008):** Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Funktion des α 14- und des α 19-Giardins in Trophozoiten von *Giardia lamblia*. Dissertation Universität Osnabrück.
- 157) van der Rest M, Garrone R (1991):** Collagen family of proteins. *FASEB J*; 5:2814-2823.
- 158) Van Heest A, Swiontowski M (1999):** Bone-graft substitutes. *Lancet* 353(Suppl 1):28-29
- 159) Villarreal XC, Mann KG, Long GL (1989):** Structure of human osteonectin based upon analysis of cDNA and genomic sequences. *Biochemistry* 28(15):6483-91.
- 160) Walther P (2001):** Immunocytochemische Analyse in der TEM. Universität Ulm.
- 161) Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C, Bissell MJ (1997):** Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J. Cell Biol.* 137:231-245.
- 162) Welsch U, Sobotta J (1997):** Farbatlas der Zytologie, Histologie und Mikroskopischen Anatomie des Menschen. Urban & Schwarzenberg München, 5. Auflage.
- 163) Wiesmann HP, Höhling HJ, Zierold K, Barckhaus RH (1995):** Elemental distributions in predentin associated with dentin mineralization in rat incisor. *Connect Tissue Res* 33:179-184.
- 164) Wiesmann HP, Tkotz T, Joos U, Zierold K, Stratmann U, Szuwart T, Plate U, Höhling HJ (1997):** Magnesium in newly formed dentin mineral of rat incisor. *J Bone Miner Res* 12:380-383.

- 165) Wiesmann HP, Plate U, Zierold K, Höhling HJ (1998):** Potassium is involved in apatite biomineralization. *J Dent Res* 77:1654-1657.
- 166) Wiesmann HP, Hartig M, Stratmann U, Meyer U, Joos U (2001):** Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1538:28-37.
- 167) Wiesmann HP, Nazer N, Klatt C, Szuwart T, Meyer U (2003):** Bone tissue engineering by primary osteoblast-like cells in a monolayer system and 3-dimensional collagen gel. *J Oral Maxillofac Surg* 61:1455-1462.
- 168) Wiesmann HP, Joos U, Meyer U (2004):** Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part II. *J Oral Maxillofac Surg* 33(6):523-530.
- 169) Wiesmann HP, Meyer U, Plate U, Höhling HJ (2005):** Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. *Int Rev Cytol.* 242:121-56.
- 170) Wintermantel E, Ha SW (2002):** *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren.* Springer, Heidelberg.
- 171) Wirth C.J., Windhagen H (2004):** New technologies in tissue engineering. Visions of an unlimited bone generation without problems. *Orthopade* 33,1335-1337.
- 172) Yamada KM, Geiger B (1997):** Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:76-85.
- 173) Yan Y, Wang X, Pan Y, Liu H, Cheng J, Xiong Z, Lin F, Wu R, Zhang R, Lu Q (2005):** Fabrication of viable tissue-engineered constructs with 3D cell-assembly technique. *Biomaterials* 26(29):5864-71.
- 174) Young MF (2003):** Bone matrix proteins: their function, regulation and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int* 14 (Suppl 3):35-42.
- 175) Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Gebron Robey P (1992):** Structure expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin. Orthop.* 281:275-296.
- 176) Zhang JY, Doll BA, Beckmann EJ, Hollinger JO (2003):** Three-dimensional biocompatible ascorbic acid-containing scaffold for bone tissue engineering. *Tissue Engineering* 9 (6):1143-1157.

177) Zur Nieden N (2002): Weiterentwicklung eines in vitro Embryotoxizitätstests mit murinen embryonalen Stammzellen: Verwendung molekularer Marker zur Erfassung verschiedener Differenzierungsendpunkte. Dissertation Universität Essen.

7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h. c. mult. U. Joos für die Unterstützung meines Promotionsvorhabens, das wissenschaftliche Umfeld, welches zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat und der Bereitstellung der Untersuchungsmaterialien.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dieter Dirksen danke ich für sein kurzfristiges Einspringen als Koreferent meine Dissertation zu betreuen und die schnelle, sehr gute Hilfe bei der erneuten Korrektur der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ulrich Plate. Sein Vertrauen und seine uneingeschränkte Unterstützung machten die vorliegende Arbeit erst möglich. Er opferte einen großen Teil seiner Zeit, um die in dieser Arbeit verwendeten TEM-Aufnahmen anzufertigen und stand mir jederzeit mit hilfreichen Hinweisen, wissenschaftlichem Weitblick und motivierender Zuversicht zur Seite.

Bei Herrn Prof. Dr. Rolf Lefering (Universität Witten/Herdecke) bedanke ich mich herzlich für seine Hilfe in statistischen Fragen. Seine große Geduld und Kompetenz ermöglichte mir die Umsetzung der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Frau Susanne Schäfer danke ich für ihre geduldige und jederzeit engagierte Unterstützung und für viele wertvolle Anregungen. Auch danke ich Frau Schäfer für ihre labortechnische Vorarbeit, ohne welche meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen:

Frau Irene Grabiniok für ihre kompetente Hilfe bei den Arbeiten in der Zellkultur.

Frau Gunda Dehmer-Möller für ihre freundliche Unterstützung bei der labortechnischen Umsetzung der Lichtmikroskopischen Untersuchungen.

Frau Hildegard Segbert für ihre geduldige Hilfe bei den Vorbereitungen der TEM-Untersuchungen.

Herrn Johannes Sich danke ich für den technischen Support und die Erstellung der Graphiken.

8 Curriculum vitae