

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

- Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h.c. Ulrich Joos -

**Das Potenzial von Kokulturen aus Osteoblasten und
Endothelzellen für das Bone Tissue Engineering**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Jacoby, Inga

aus Warstein

2009

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

Dekan : Univ.-Prof. Dr. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Hans-Peter Wiesmann

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ludger Figgner

Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefergesichtschirurgie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. h.c. U. Joos -
Referent: Priv.-Doz. Dr. Hans-Peter Wiesmann
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ludger Figgener

ZUSAMMENFASSUNG

Das Potenzial von Kokulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen für das Bone Tissue Engineering

Jacoby, Inga

Für eine erfolgreiche Knochenregeneration ist ein sensibles Zusammenspiel verschiedener für die Knochenbildung verantwortlicher Zelltypen notwendig. Neben der Fähigkeit der Zellen zur Proliferation, Migration und Differenzierung sind insbesondere die Prozesse der Neovaskularisation von größter Wichtigkeit, um die Nährstoffversorgung des extrakorporal kultivierten knochenähnlichen Gewebes sicher zu stellen.

Ziel dieser Arbeit war es, Möglichkeiten der *ex vivo* Kultivierung von osteoblastenähnlichen Zellen und Endothelzellen in direkten 2- und 3-dimensionalen Kokultursystemen unter Verzicht von Trägermaterialien zu entwickeln.

Es wurden osteoblastenähnliche Zellen aus dem Periost boviner Metacarpalia und Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen gewonnen, proliferiert und sowohl in Monolagen als auch in Form von 3D-Mikromassenkulturen kultiviert. In definierten Zeitabständen erfolgten histologische, immunhistochemische (Nachweise von Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin, Kollagen I, von-Willebrand-Faktor und CD-31) und transmissionselektronenmikroskopische Vergleiche der beiden Kultursysteme in Bezug auf Entwicklung, Proliferationsverhalten und Anzeichen von Strukturbildungen.

Sowohl in den zwei- als auch in den dreidimensionalen Kulturen formierten sich über den Beobachtungszeitraum stabile und vitale Zellverbände. Die Osteoblasten der 3-D-Kultur sezernieren Matrixproteine wie Osteokalzin und Osteonectin, die im Weiteren eine kollagenhaltige Matrixstruktur bilden. Während in den 2-dimensionalen Kokulturen clusterartige Osteoblastenverbände im Verbund mit Endothelzellen auftreten, formieren sich in den 3 D-Kokulturen sphäritische Mikrogewebe, die mit der Ausbildung präangiogener Strukturen in Form endothelzellbegrenzter Lumina Anzeichen beginnender Neovaskularisation zeigen. Die hier entwickelten Mikromassenkulturen stellen aufgrund ihrer Dreidimensionalität eine dem Knochen/Gewebe ähnliche Vorläuferstruktur dar, die für eine trägermaterialfreie Transplantation in Knochensubstanzdefekte vielversprechend sein kann.

Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2009

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Bone Tissue Engineering	1
1.2	Endothelzellen und Angiogenese	2
1.3	Osteoblasten und Osteogenese	4
1.4	Zielsetzung	6
2	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1	Material	7
2.1.1	Die Zellkultur	7
2.1.2	Histologie	10
2.1.3	Immunhistochemie	11
2.1.4	Geräte	11
2.2	Methoden	13
2.2.1	Gewinnung der Osteoblasten	12
2.2.2	Gewinnung der Endothelzellen	16
2.2.3	Cell-Tracking	19
2.2.4	Zellmonolagenkultur	20
2.2.5	Mikromassenkulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen	22
2.2.6	Histologie	25
3	ERGEBNISSE	27
3.1	Zellanalyse von Monolagenkulturen	27
3.1.1	Osteoblasten und Endothelzellen	27
3.1.2	Cell-Tracking mit CM-DiI und SP-DiOC18	28
3.1.3	Gemischte Monolagekultur aus Osteoblasten und Endothelzellen	29
3.1.3.1	Histologische Auswertung	29
3.1.3.2	Immunhistochemische Auswertung	30
3.1.4	Osteoblastenmonolagekultur mit sekundärer Endothelzellzugabe	36
3.2	Übersichten von Mikromassenkulturen	38
3.2.1	Mikromassenkulturen aus Osteoblasten	38
3.2.2	Mikromassenkulturen aus Endothelzellen	39
3.2.3	Gemischte Mikromassenkulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen	40

3.2.3.1	Histologische Auswertung	40
3.2.3.2	Immunhistochemische Auswertung	41
3.2.3.3	Transmissionselektronenmikroskopische Auswertung (TEM)	45
3.2.4	Mikromassenkulturen aus Osteoblasten mit Endothelzell- Ummantelung	48
3.2.4.1	Immunhistochemische Auswertung	48
4	DISKUSSION	51
4.1	Zur Technik der Kokultivierung von Osteoblasten und Endothelzellen	51
4.2	Engineering von dreidimensionalen Kokulturen ohne Verwendung von Biomaterialien	53
4.2.1	Angiogenese in vitro	54
4.3	Das Potenzial der Endothelzell-/Osteoblasten-Kokultur für das Bone Tissue Engineering	55
4.4	2D-Kultur	56
4.5	3D-Mikromassenkulturen	57
4.5.1	Kulturtechniken und Bioreaktoren	57
4.5.2	„Cell-Tracking“- Vitale Zellverfolgung mit Fluoreszenzfarbstoffen	58
4.5.3	Osteospheres mit sekundärer Anlagerung von Endothelzellen	59
4.5.4	Synchron gemischte Mikromassenkulturen aus osteoblastenähnlichen Zellen und Endothelzellen	60
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick	62
5	LITERATURVERZEICHNIS	63
6	DANKSAGUNG	68
7	LEBENS LAUF	69
8	ANHANG	I

1 EINLEITUNG

1.1 Bone Tissue Engineering

Die Regeneration großer Knochendefekte stellt immer noch eine Herausforderung an die heutige rekonstruktive Chirurgie dar. Defekte, bedingt durch kongenitale Nichtanlagen oder erworben durch Verlust von Knochensubstanz durch Trauma oder nach Tumorentfernung bringen für den Patienten eine erhebliche funktionelle als auch ästhetische Beeinträchtigung mit sich. Überschreiten diese Defekte eine bestimmte Größe, werden sie als „critical size defects“ bezeichnet. Ihre Größe ist meist so ausgedehnt, dass ihre Ausheilung schwierig ist. Da diese als „critical size defects“ charakterisierten Läsionen nicht im Sinne einer restitutio ad integrum ausheilen, sondern häufig spontan Ersatzgewebe in Form funktionsloser bindegewebiger Narben ausbilden, finden in der augmentativen Chirurgie unterschiedlichste Knochenersatzmaterialien ihre Anwendung bei der Defektauffüllung. Dabei werden vermehrt auch auto-, allo- oder xenogene Knochenersatzmaterialien angewendet.

Neben autologem Knochen finden heute insbesondere alloplastische Materialien wie Hydroxylapatit, Tricalciumphosphat, Calciumcarbonat oder Keramik aber auch allogener oder xenogener Knochenersatz in Form von demineralisiertem Knochen Verwendung. Die unterschiedlichen Materialien bringen in der Anwendung verschiedene Nachteile mit sich. Das autologe Knochenangebot ist limitiert und die Entnahme größerer Mengen weist eine erhöhte Entnahmemorbidität beim Patienten auf. Das Auffüllen großer Defekte mit alloplastischem und xenogenem Knochenersatzmaterial stellt zwar eine patientenfreundliche, einfache Behandlungsmethode dar, jedoch besitzen diese Materialien keine osteoinduktiven und osteogenetischen Eigenschaften [Petite et al., 2008]. Auch unterliegen diese Materialien keinem natürlichen Ab- bzw. Umbauprozess. Sie werden nach Implantation nicht völlig ab- und umgebaut und lassen sich noch lange Zeit nach Insertion in unveränderter Form und Konsistenz im Bereich des aufgefüllten Defektes wieder finden.

Allogene und xenogene Knochenersatzmaterialien können zudem Immunreaktionen bis hin zu Abstoßungsreaktionen hervorrufen. Ebenso können Krankheiten durch sie übertragen werden und es besteht eine erhöhte Infektionsgefahr.

Um die angesprochenen Nachteile bei der Anwendung alloplastischer Knochenersatzmaterialien zu umgehen, werden sie mit osteoinduktiven Materialien oder mit autologen Zellen und Geweben kombiniert. Mit dieser Form des Knochenersatzes beschäftigen sich viele Arbeitsgruppen, die sich dem *Tissue Engineering* verschrieben haben.

Das klassische Konzept des *Tissue Engineerings* basiert auf der Isolation und Vermehrung autologer Zellen *ex vivo* und ihrer Aussiedelung auf ein Gerüst oder in eine Matrix vor der Implantation *in vivo*. Um komplexe Gewebe zu entwickeln, die für eine Transplantation *in vivo* geeignet sind, müssen die Zellen mit dem individuellen Immunsystem der Patienten kompatibel sein. Ein Nachteil bei der Züchtung von autologem Knochen ist die Notwendigkeit der Gewinnung und somit die Entnahmemorbidity und der Sekundäreingriff.

Im Bereich des *Bone Tissue Engineering*, der experimentellen Knochengewebeherstellung werden heutzutage Zellen *ex vivo* auf einem Bio-Trägermaterial kultiviert, proliferiert und dann in den Knochendefekt replantiert. Das dafür benötigte Zellvolumen, bzw. die Größe des Transplantates birgt jedoch das Problem der Nährstoffversorgung in sich. Die in vielen Fällen unzureichende Versorgung mit Nährstoffen führt zum Absterben der Gewebe und Zellen vor allem in der ersten Zeit nach Transplantation [Kneser et al., 1999].

1.2 Endothelzellen und Angiogenese

Endothelzellen sind mesenchymaler Herkunft und kleiden die Innenseite aller Blutgefäße als eine epitheliale Monolage aus. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Hämostase, in der Permeabilität von Blutgefäßen und der Antwort der Blutgefäße auf physiologische und pathologische Stimuli. Sie sind stoffwechselaktive Zellen, haben eine Größe von ungefähr 50 µm und variieren je nach Organ sehr stark in ihrer

Morphologie. Für *Tissue Engineering*-Zwecke können sie aus sehr großen Gefäßen wie boviner Aorta [Schwartz et al., 1997] oder humaner Nabelschnurvene [Gimbrone et al., 1974; Jaffe et al., 1973] gewonnen werden. Die Endothelzellen haben eine wichtige Funktion bei der Angiogenese.

Die Angiogenese ist ein fundamentaler Prozess in der Knochenentstehung und -reparatur [Carano et al., 2003]. Dabei kommt es zum Zusammenspiel unterschiedlichster Zellarten, vor allem aber zu Zell-Zell-Interaktionen zwischen Osteoblasten und Endothelzellen. Neovaskularisation ist ein kritischer Faktor im modernen „bone tissue engineering“, da die Implantation großer Gewebekonstrukte in knöcherne Defekte ohne eine suffiziente Vaskularisierung, bedingt durch ein nur sehr langsames Einwachsen von Blutgefäßen, zu einem hypoxischen Zelltod der produzierten Gewebe führt [Kneser et al., 1999]. Ein Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff ist vor allem im Zentrum großer dreidimensionaler Gewebekonstrukte zu beobachten.

Die Größe der engineerbaren Konstrukte wird durch das Problem der mangelhaften Versorgung mit Nährstoffen bislang stark limitiert [Ochoa et al., 2002]. Strategien, die die Angiogenese vorantreiben, dürften demnach positive Effekte auf die gesamte Knochenregeneration haben. Mit diesem Ziel wurden in einigen Arbeiten angiogene Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) oder Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) verwandt [Perets et al., 2003]. Hierdurch sollte es zu einer Beschleunigung des Einsprossens kapillärer Strukturen in hypoxische Gewebe kommen [Kneser et al., 1999; Peters et al., 2002].

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Neovaskularisation ist, mit der jeweiligen Zellart Endothelzellen zu kokultivieren, um den ortsständigen Gefäßen die Möglichkeit zu geben, an einen in die Kokultur integrierten, primitiven Gefäßplexus Anschluss zu finden. So könnte dann eine funktionelle Zirkulation im implantierten Gewebe erreicht werden [Stahl et al., 2005; Nor et al., 2001; Choong et al., 2006]. Verschiedene dreidimensionale Zellkultur-Systeme aus humanen primären Osteoblasten und humanen Endothelzellen wurden bereits zur Verbesserung der Angiogenese *ex vivo* im Knochen Tissue Engineering vorgestellt.

Beispielsweise konnten Wenger et al. ein dreidimensionales Kokulturmodell aus Endothelzellen und Fibroblasten im Kollagengerüst herstellen und untersuchen, um die Angiogenese im *Tissue Engineering* zu verbessern. [Wenger et al., 2005].

Eine weitere Herausforderung bezüglich der Vaskularisierung großer Gewebekonstrukte stellt die Gewinnung adäquater Mengen autologer Endothelzellen dar. So sollten die autologen Endothelzellen möglichst minimalinvasiv in benötigter Anzahl beim Patienten entnommen werden. Auch hier sollte die geringe Entnahmemorbidität für den Patienten als auch die möglichst einfache Art und der geringe Umfang des Eingriffs im Vordergrund stehen. Eine erfolgsversprechende Quelle für autologe Endothelzellen stellt die periphere Blutbahn dar, welche Subpopulationen endothelialer Vorläuferzellen enthält [Asahara et al., 1997]. Eine weitere Zellpopulation, die aus endothelialen peripheren Vorläuferzellkulturen hervorgebracht wurde, wird als ausgewachsene Endothelzellen beschrieben (OECs = Outgrowth Endothelial Cells) [Gulati et al., 2003; Hur et al., 2004; Lin et al., 2000.]. Sie erscheinen als Kolonien mit dem äußeren Erscheinungsbild und der Morphologie von Endothelzellen.

1.3 Osteoblasten und Osteogenese

Osteoblasten synthetisieren die extrazelluläre Matrix und sind so direkt an der Knochenbildung beteiligt. Es handelt sich bei ihnen um hochspezialisierte Zellen, die anhand der Produktion von Kollagen Typ I, der nicht-kollagenen Matrixproteine Osteocalcin und Osteonectin und einer mineralisierten extrazellulären Matrix zu erkennen sind. Die von den Osteoblasten gebildete extrazelluläre Matrix hat einen hohen organischen Anteil, welcher zu 90% aus Kollagen Typ I besteht. Die Osteoblasten synthetisieren Tropokollagen und Proteoglykane, die sie dann in den Extrazellularraum sezernieren. Hier formieren sich dann Kollagenfibrillen, es entsteht nichtmineralisierte Interzellulärsubstanz des Knochens, das Osteoid. Osteoprogenitorzellen stellen eine Vorläuferzellart der Osteoblasten dar, die aus dem Knochenmark stammen, sehr teilungsfähig und in der Lage sind, spontan Knochen zu bilden. Osteoprogenitorzellen können durch Hormone wie Parathormon (PTH), Calcitriol und die indirekt wirkenden Wachstumshormone und Schilddrüsenhormone

FT3 und FT4 stimuliert werden und sich innerhalb von Stunden zu reifen, knochenbildenden Osteoblasten umwandeln. Osteoklasten sind knochenabbauende Zellen und im Wechsel mit Osteoblasten für einen stetigen Auf- und Abbau des Knochens zuständig.

Um funktionellen Knochen zu erhalten, bedarf es außer der oben genannten zellulären Anteile auch azellulärer Komponenten wie Hydroxylapatit, kollagener und nicht-kollagener Matrixproteine wie Kollagen Typ I, Osteocalcin, Osteonectin, Bonesialoprotein, Osteopontin sowie Proteoglykane. Bei der Knochenbildung entsteht zunächst eine Knochenvorstufe, das bereits genannte Osteoid. Primär durch Mineralisation des Osteoids entstandener Knochen wird als Geflechtknochen bezeichnet. Dieser kann durch eine adäquate Belastung und funktionelle Beanspruchung zu Lamellenknochen umgebaut werden.

In den unterschiedlichen Stadien der Knochenneubildung ändert sich die Sekretion der von Osteoblasten sezernierten Proteine. Das nicht-kollagene Glykoprotein Osteonectin wird in einem sehr frühen Stadium sezerniert. Es weist eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit und Calcium auf. Das ebenfalls nicht-kollagene Protein Osteokalzin ist ein später Marker, da es in einer späten Phase der Differenzierung von den Osteoblasten sezerniert wird [Perets et al., 2003; Nor et al., 2001]. Die Maturation der Osteoblasten ist erkennbar anhand der entsprechenden Proteinsynthese.

Schechner et al. [2000] zeigten in Versuchen mit immungeschwächten Mäusen, dass in einem Kollagen-Fibronectin-Gel gezüchtete HUVECs die gefährliche direkte posttransplantationale Phase überleben und funktionstüchtige Mikrogefäße ausbilden.

1.4 Zielsetzung

Wie zuvor beschrieben, kann bei *ex vivo* auf Trägermaterial engineerem Knochen die biomechanische Stabilität, das osteogene Potential und vor allem die Vaskularisierung und damit die Nährstoffversorgung limitiert sein.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, osteoblastenähnliche Zellen und Endothelzellen *ex vivo* in zwei- und dreidimensionalen Systemen zu kultivieren. Dabei besteht die hauptsächliche Zielsetzung darin, dreidimensionale Kultursysteme für osteoblastenähnliche Zellen und Endothelzellen unter Verzicht von Trägermaterialien zu entwickeln, in denen die Zellen über längere Zeit vital gehalten werden können. Auf den Zusatz von Wachstumsfaktoren wird zugunsten einer reinen Autogenität der Kulturen verzichtet. Durch eine Kokultivierung mit Endothelzellen soll die Durchblutung und Nährstoffversorgung des Gewebes verbessert werden. Der Verzicht auf Trägermaterialien soll das Risiko einer Infektion oder Fremdkörperreaktion minimieren. Im Vergleich zwischen zweidimensionalen und dreidimensionalen Kokulturen aus primären osteoblastenähnlichen Zellen und Endothelzellen sollen Unterschiede und Ähnlichkeiten hinsichtlich der Morphologie, dem biologischen Verhalten der Zellen und der Interaktion zwischen den beiden Zelltypen herausgearbeitet werden. Desweiteren soll durch geringe Änderungen der Kulturbedingungen in den 3D-Kokulturen eine Mineralisation der extrazellulären Matrix induziert werden. Die Beobachtung des Zellverhaltens wird während der gesamten Kulturdauer hauptsächlich mit Hilfe von lichtmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Die Zellkultur

- **Zellen:** primäre bovine Osteoblasten-ähnliche Zellen aus dem Periostgewebe vom Metacarpus frisch geschlachteter Kälber und primäre Endothelzellen aus humaner Vena umbilica (HUVEC)

- **Nährmedien:**
 - **MM0-Medium:** High Growth Enhancement Medium (500ml High-GEM, ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) + 60 ml FKS = fetales Kälberserum (Biochrom AG seromed®, Berlin) + 5 ml Amphotericin B (Biochrom AG seromed®, Berlin) + 5 ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG seromed®, Berlin) + 5 ml L-Glutamin (Biochrom AG seromed®, Berlin)

 - **Endothelial Cell Growth Medium** (Promocell, Heidelberg): 0,4% ECGS/H + 2% FKS + 1,0 µg/ml Hydrocortison + 0,1 ng/ml Epidermal Growth Factor + 1,0 ng/ml Basic Fibroblast Factor + 50 ng/ml Amphotericin B + 50 µg/ml Gentamicin

 - **MM1-Medium:** MM0-Medium + 10 mmol/l β -Glycerophosphat (Sigma, Taufkirchen) + 25µg/ml L-Ascorbinsäure (Sigma, Taufkirchen)

- **Reagenzien und Lösungen**

- Collagenase (0,04%ig) (Biochrom AG seromed®, Berlin):
Die Collagenase wird für das Ablösen der Osteoblasten und die Isolierung von Endothelzellen aus humaner Nabelschnur verwendet. Zu 500 ml HAMS F10 (Biochrom AG seromed®, Berlin) werden 200 mg Collagenase und 10 ml HEPES (Biochrom AG seromed®, Berlin) zugegeben. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C im Kühlschrank.
- Earl's Salze:
13,60 g NaCl (Merck, Darmstadt)
0,80 g KCL (Merck, Darmstadt)
0,28 g NaH₂PO₄ · H₂O (Merck, Darmstadt)
0,40 g MgSO₄ · 7 H₂O (Merck, Darmstadt)
0,52 g CaCl₂ · 2 H₂O (Merck, Darmstadt)
2,00 g Glucose (Merck, Darmstadt)
4,40 g NaHCO₃ (Merck, Darmstadt)
20,00 mg Phenolrot (Riedel de Haen)
ad 2000 ml Aqua dest., steril filtrieren. Lagerung bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank.
- PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline) ohne Ca²⁺, Mg²⁺; pH 7,4, steril (Apotheke Universitätsklinikum Münster):
8,00 g NaCl (Merck, Darmstadt)
0,2 g KCl (Merck, Darmstadt)
0,2 g KH₂PO₄
1,44 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
ad 1000ml Aqua dest. und steril filtrieren. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank.

- TBST (Tris Buffered Saline) mit 0,1% Tween 20 (Apotheke Universitätsklinikum Münster):
 - 52,6 g Tris
 - 87,8 g NaCl
 - 10 ml Tween 20
 - 400 ml 1N HCl
 - ad 10 kg Aqua dest.
 - Tyrode- Lösung (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} ; Merck, Darmstadt)
 - 8,00 g NaCl
 - 0,02 g KCl
 - 1,00 g NaHCO_3
 - 56,5 mg NaH_2PO_4
 - 0,30 g Tritriplex III (=EDTA- Na- Salz)
 - 1,00 g Glucose
 - ad 1000 ml Aqua dest., steril filtrieren. Lagerung bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank.
 - Methanol
 - CasyTon-Lösung
 - CasyClean-Lösung
 - autoklaviertes Aqua dest.
- **Färbungen**
 - CM-DiI (Molecular Probes, Niederlande; Best.-Nr.C 7000)
 - SP-DiOC18 (Molecular Probes, Niederlande ; Best.-Nr.D-7778)
 - Hämatoxylin-Eosin
 - Eosin
 - 2 g Eosin in 100 ml Aqua dest.
 - 100 ml 96%iges Ethanol
 - Hämatoxylin nach Mayer

- Methylenblau-Azur II (Richardson)
1%iges Methylenblau in 1% iger wässriger Boraxlösung (1:1 gemischt) und
1% Azur II in Aqua dest.

2.1.2 Histologie

- **Fixierung:**

- Neutralformol 3,7%, pH 7,4:
50 ml 37%iges Formalin (Waldeck GmbH & Co.KG, Division Chroma,
Münster)
- Alkoholreihe: 50%, 70%, 90%, 96%, 100%, Isopropanol (Merck,
Darmstadt)
- Zedernholzöl (Merck, Darmstadt)

- **Einbettung:**

- Paraffineinbettung (Paraplast PLUS, Kendall, Tyco Healthcare Group
LP, Mansfield, USA)
- Aralditeinbettung
Herstellung unter dem Abzug: 20 ml Araldit CY 212 (M), 21 ml DDSA,
0,5 l MNA, 1,1 ml BDMA
Herstellung von 100 ml 0,2 mol Phosphatpuffer: 19 ml Stammlösung I:
27,58 g NaH_2PO_4 in 100 ml Aqua bidest. auflösen
81 ml Stammlösung II: 28,38 g NaH_2PO_4 in 100 ml Aqua bidest.
auflösen
Herstellung 0,1 mol Phosphatpuffer 1:1 mit Aqua dest. mischen,
Propylenoxid (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

2.1.3 Immunhistochemie

- **Primär-Antikörper**

- Anti-Osteopontin, monoclonal , (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan); mouse
- Anti-Osteocalcin, monoclonal, Cat. No. M041, Clone No. OC4-30 (TaKaRa BIO Inc., Otsu, Japan); mouse
- Anti-Osteonectin, monoclonal, Cat. No. M124, Clone No. OSN4-2 (TaKaRa BIO Inc., Otsu, Japan); mouse
- Anti-Collagen I, monoclonal (Abcam Ltd., Cambridge, England); mouse
- Anti-Von-Willebrand-Faktor, polyclonal (Sigma, Saint Louis, USA); rabbit
- Anti-Bone-Sialoprotein, monoclonal (Immunodiagnosics Systems Ltd.); rabbit
- Anti-CD31 PE-CAM-1 Cat. No. C7714(Sigma, Saint Louis, USA); mouse
- Anti- α -Smooth Muscle Actin, monoclonal; mouse

- **Sekundär-Antikörper**

- DAKO Cytomation, EnVision^{TM+}-Analysesystem + HRP, Anti-mouse (DAKO Diagnostik GmbH, Hamburg) für den Antigennachweis, Code-Nr. K4001
- Alkalische Phosphatase

2.1.4 Geräte

- 4-well chamber slides (NUNC, Wiesbaden)
- 96-well-Platten (NUNC, Wiesbaden)
- Abzug

- CO₂-Inkubator (Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf)
- Deckgläschen
- Einbettkassetten (Microm)
- Einmalklingen Nr. 21 für Mehrwegskalpelle (Bayha, Tuttlingen)
- Einmalskalpelle Nr. 21 (Bayha, Tuttlingen)
- Fluorecence Mounting Medium (DAKO, Cat.No. S3023)
- Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2[®] HBO100 (Carl Zeiss, Jena)
- große und kleine Pinzette
- Lichtmikroskop Diaphot-TMD (Nikon Kogaku K.K., Tokyo, Japan)
- Magnetrührer (Ika-Labortechnik)
- Mikrotom (RM 2155[®], Leica und Auto Cut 1140 von Reichert Jung)
- Peel-A-ways (Tissue Embedding Molds; Ted Pella, Inc., No.27112)
- Rollrandgläser
- Skalpellhalter
- Spiegelreflexkamera Nikon 801 (Nikon Kogaku K.K., Japan)
- sterile Tücher
- Sterile Werkbank (Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf) mit üblichem Zubehör wie Pipettus, Einmalpipetten, sterilisierte Pasteurpipette, Absaugvorrichtung
- sterile Zentrifugenröhrchen (NUNC, Wiesbaden)
- Ultracut (Reichert-Jung, Wien, Österreich)
- Vakuumpumpe (neoLab)
- Wasserbad (GFL[®], 37 °C)
- Zellkulturschalen 144 cm², Arbeitsvolumen 35 ml (Biochrom AG Seromed[®], Berlin)
- Zellkulturschalen 21,5 cm², Arbeitsvolumen 5 ml (Biochrom AG Seromed[®], Berlin)
- Zellkulturschalen 56,7 cm², Arbeitsvolumen 12,5 ml (Biochrom AG Seromed[®], Berlin)
- Zellzähl-System CASY[®] I, Modell TT (Schärfe System GmbH, Reutlingen)
- Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R[®] (Karl Willers Laborbedarf OHG)

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung der Osteoblasten

Die Gewinnung von primären Osteoblasten-ähnlichen Zellen, im folgenden Osteoblasten genannt, erfolgte durch die Entnahme von Periost aus bovinen Metacarpalia. Hierfür wurden am Tag der geplanten Präparation Beine von frisch geschlachteten Rindern von der Westfleisch Vieh- und Fleischzentrale Hamm bezogen. Das Prinzip, welches zur Zellgewinnung benutzt wurde, wurde erstmals 1977 von Jones und Boyde beschrieben und beruht auf der Fähigkeit der Osteoblasten, unter geeigneten Kulturbedingungen aus Periostgewebestücken herauszuwachsen.

Die Präparation der Kälberbeine erfolgte wenige Stunden nach Tötung der Tiere. Unter normalen Laborbedingungen erfolgte zuerst die Grobpräparation, dass heisst, Fell und Hufe wurden entfernt (*Abb. 2.1A*). Anschließend wurden die Beine gründlich mit Wasser abgespült und mit 80% igem Ethanol (vergällt, gefärbt und filtriert, Apotheke UKM) desinfiziert (*Abb. 2.1B*).

Die Feinpräparation erfolgte daraufhin unter semi-sterilen Bedingungen im Zellkulturraum. Nach Entfernung des Weichgewebes mit Skalpell und Pinzette (*Abb. 2.1C*) wurde das Bein mit 0,9% -igem NaCl gewaschen und dann das freiliegende Periost im Bereich der Metaphyse in Längsstreifen geschnitten und vom Knochen abgezogen (*Abb. 2.1D*). Die Perioststreifen wurden mehrmals mit Earl's Salzen gewaschen (*Abb. 2.1E*), danach in ca. 5 x 5 mm² große Stücke geschnitten und mit der klebrigen, osteogenen Seite nach unten in Kulturschalen gelegt (*Abb. 2.1F*). Die Kulturschalen haben einen Durchmesser von 13,5 cm. Pro Schale werden 15 bis 20 Stücke verteilt. Die Perioststücke wurden 20 Minuten ruhen gelassen, bis sie sich am Polystyrolboden der Petrischale anhefteten. Dann wurde jede Schale mit 20 ml 37 °C warmem MM0 f- Nährmedium versorgt. Dabei muss auf die feste Anhaftung der Perioststreifen am Schalenboden geachtet werden. Die Schalen wurden vorsichtig in einen CO₂-Inkubator gegeben.

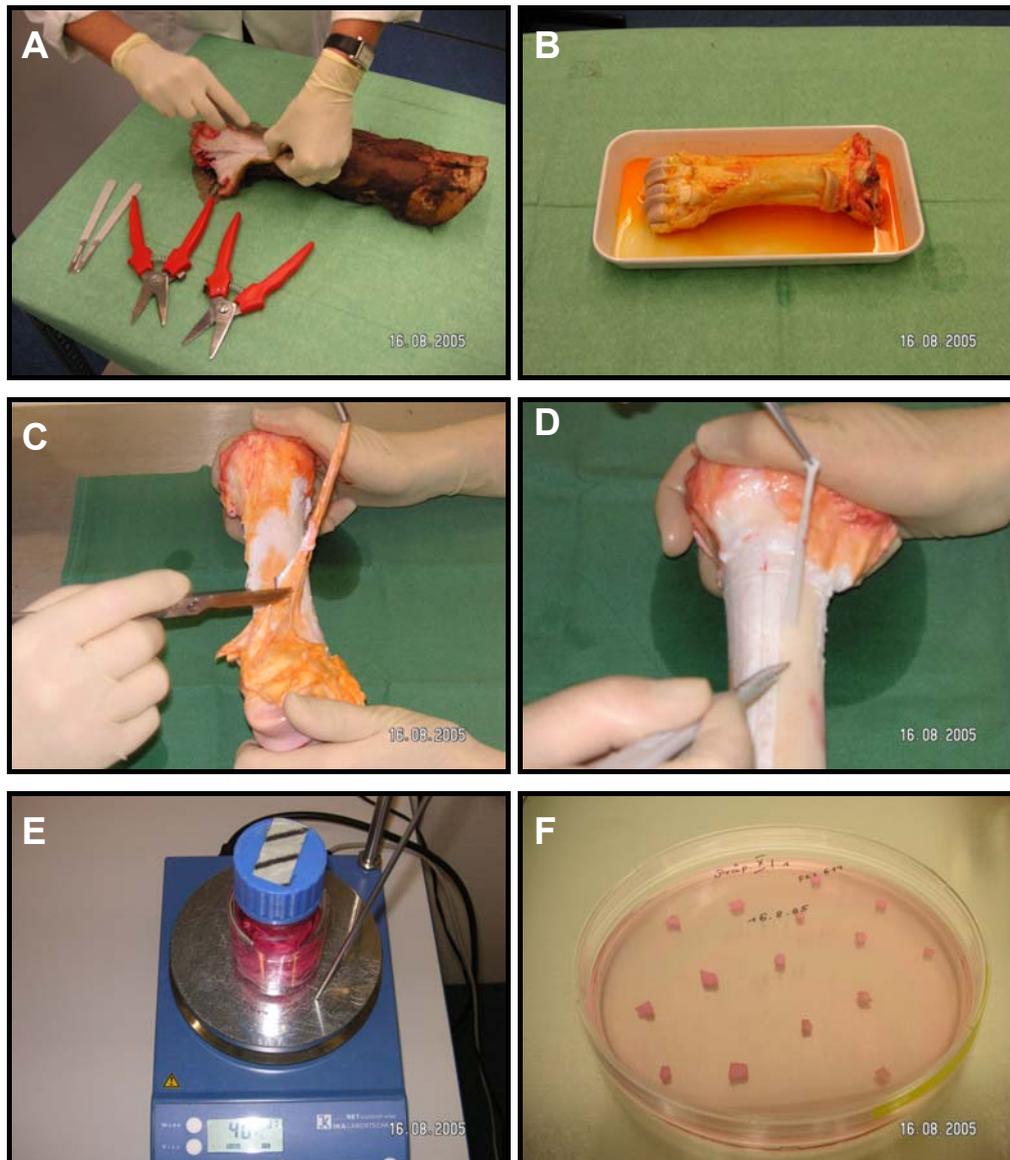


Abbildung 2.1A-F: Präparation der Kälberbeine und Periostentnahme

- A: Grobpräparation des frisch geschlachteten Kälberbeines
- B: Desinfektion des grobpräparierten Kälberbeines
- C: Entfernung des Weichgewebes
- D: Feinpräparation: Abziehen der Perioststreifen
- E: Waschen der Perioststreifen in Earl's Salzen
- F: Perioststücke in der Zellkulturschale

Das zuvor schon als MM0-Medium bezeichnete Nährmedium ist ein Standardmedium für die Osteoblasten-Zellkultur und wurde in diesen Versuchen für 3 bis 5 Wochen der Osteoblastenproliferation verwendet. Der Mediumwechsel erfolgte einmal wöchentlich, indem das Medium behutsam mit einer Wasserstrahlpumpe vollständig abgesaugt und

durch die gleiche Menge frisches MM0-Medium ersetzt wurde. Die Zellen wurden in einem CO₂- Inkubator bei 100% Luftfeuchtigkeit, einer Temperatur von 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert. Die Perioeststücke wurden je nach Proliferation der Zellen nach 2 bis 3 Wochen aus den Schalen entfernt. Waren die Zellen nach 3 bis 5 Wochen zu einem konfluenten Monolayer ausgewachsen, konnten sie abgelöst, passagiert und für verschiedene Versuche weiterverwendet werden.

Die auf dem Polystyrolboden der Kulturschale gewachsenen und darauf haftenden Osteoblasten wurden, um sie für weitere Versuche verwenden zu können, vorsichtig abgelöst. Dazu wurde das MM0- Medium sorgsam mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Zellen mit 0,04 % Collagenase bedeckt und für 20 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Hierbei wurden pro 13,5 cm Durchmesser-Schale 6 ml Collagenase benötigt. Anschließend wurde mehrmals mit PBS gewaschen.

Dann wurde der Zellmonolayer für maximal 20 Minuten mit Tyrode-Lösung inkubiert. Unter einem Mikroskop konnte die Ablösung der Zellen zwischendurch kontrolliert und eventuell die Inkubationszeit auf 10 bis 12 Minuten verkürzt werden. Um die Osteoblasten-ähnlichen Zellen möglichst vollständig abzulösen, wurde die Tyrodelösung mit einer Einmalpipette mehrmals vom Schalenboden aufgenommen und wieder in die Schale gespült. Die abgelösten Zellen waren bei Schräghalten der Schale als grauer Schleier in der Tyrodelösung zu erkennen. Der Schalenboden glänzte, sobald alle Zellen abgelöst waren.

Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert, ein 100 µl-Aliquot entnommen, und mit Hilfe eines Zellzähl-Gerätes (CASY®I Modell TT, Schärfe System GmbH, Reutlingen) wurden Zellzahl und Zellgrößenverteilung bestimmt. Das Zentrifugenröhrchen mit der Zellsuspension wurde bei 500 U/min und 20 °C 5 Minuten lang zentrifugiert.

Nach Zentrifugation wurde die Tyrodelösung vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet mit frischem MM0-Medium versetzt. Gemäß den anstehenden Versuchen konnte nun die benötigte Menge Zellsuspension entnommen und verwendet werden.

2.2.2 Gewinnung der Endothelzellen

Die Gewinnung von Endothelzellen erfolgte durch Isolierung der Zellen aus humaner Nabelschnur (HUVEC= Human umbilical vein endothelial cells). Die Nabelschnüre wurden von der Geburtsabteilung des UKM bezogen und direkt nach Ankunft im Zellkulturraum weiterverarbeitet. Die gesamte Nabelschnurpräparation erfolgte unter sterilen Bedingungen im Zellkulturraum unter der Sterilbank.

Zuerst wurde die Nabelschnur aus dem Transportmedium genommen, in 70% iger Alkohol gewaschen und zur Präparation in eine Maxi-Kulturschale überführt. Dann folgte das Aufsuchen der Vene, in die vorsichtig eine Spülkanüle eingeführt und mit einer Scherenklemme fixiert wurde (Abb. 2.2A). Eine Nabelschnur hat 3 Gefäße, 2 Arterien und eine Vene. Die beiden Arterien sind an ihren im Verhältnis zur Vene kleineren Lumina und ihrer größeren Wanddicke zu erkennen.

Die Nabelschnur wurde mit fixierter Spülkanüle über ein großes Becherglas gehängt und mit warmem PBS Dulbecco (Biochrom AG seromed®, Berlin) solange gespült, bis die Spülflüssigkeit klar war. Dann wurde auch das andere Ende der Nabelschnur mit einer Scherenklemme verschlossen (Abb. 2.2B). Über die Spülkanüle wurde die Nabelschnur mit 0,05 %iger Collagenase A befüllt und 10 Minuten bei 37 °C im vorbereiteten Becherglas inkubiert (Abb. 2.2C). Der Inhalt der Nabelschnur tropfte durch die Spülkanüle in ein Medium enthaltendes Falconröhrchen (Abb. 2.2D). Das Medium aus einem zweiten Falconröhrchen wurde zu gleichen Zwecken über die Spülkanüle in die Nabelschnur gegeben und tropfte nach kurzer Massage in das Röhrchen zurück. Beide Röhrchen wurden für 7 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde bis auf einen kleinen, das Pellet schützenden Rest abgesaugt. Abschließend wurde das Pellet mit frischem Medium resuspendiert und in einer gelatinebeschichteten Zellkulturschale ausgesiedelt (Abb. 2.2E).

Für die Anzucht der Endothelzellen wurden Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 90 mm verwendet. Die Schalen wurden zuvor mit Gelatine beschichtet. Dazu wurde eine Flasche mit 2 %iger Gelatine (Sigma, Saint Louis, USA) im Wasserbad erwärmt und dann mit PBS Dulbecco auf 0,5 % verdünnt, d.h. 5 ml Gelatine (2%) wurden mit 15 ml PBS Dulbecco gemischt.

Anschließend wurden in jede Schale ca. 5 ml Gelatine gegeben, so dass der Schalenboden vollständig bedeckt war, und zur Inkubation für 20 Minuten in den Brutschrank (37 °C) gegeben. Nach Ende der Inkubationszeit konnten die Schalen entweder bis zu eine Woche im CO₂-Inkubator aufbewahrt werden, oder direkt zu Versuchszwecken weiter verwendet werden. Kurz bevor die Schalen mit Zellen besiedelt wurden, mussten sie zweimal mit PBS Dulbecco gewaschen werden. Danach wurden sofort die Zellen ausgesiedelt.

Das Arbeitsvolumen betrug 10 ml in einer 90'er- Schale. Als Nährmedium wurde Endothelial Cell Growth Medium (Promocell, Heidelberg) verwendet (Abb. 2.2F)

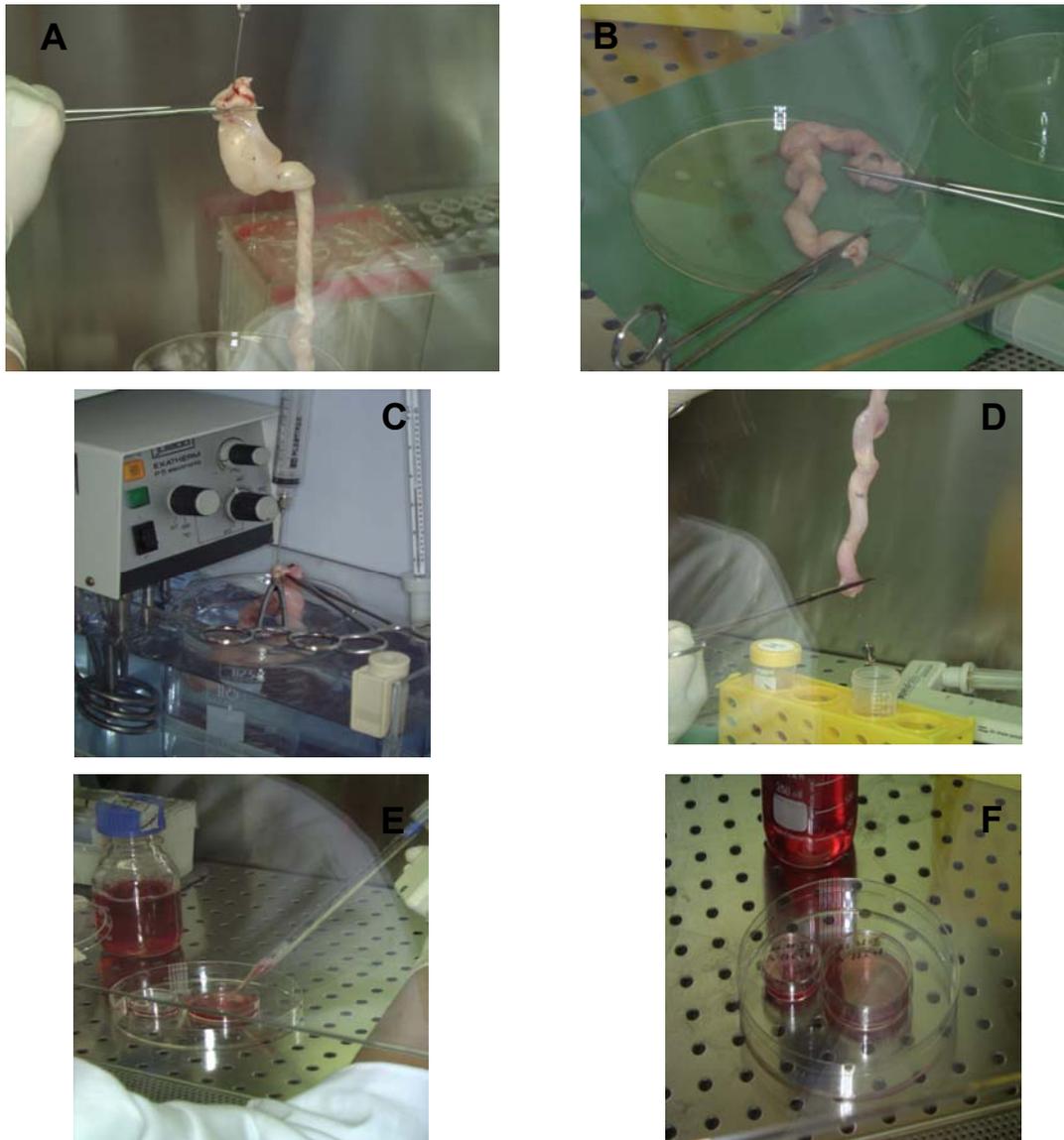


Abbildung 2.2: Gewinnung von Endothelzellen

A Einführen der Kanüle in die Vene, **B** Verschluss des anderen Endes der Vene mit Arterienklemme, **C** Inkubation der mit Collagenase gefüllten Vene, **D** Nabelschnurinhalt tropft in Falconröhrchen, **E** Zellaussiedelung in Schale mit Medium, **F** Zellkulturschalen mit Endothelial Cell Growth Medium.

Nach 3 bis 5 Wochen wurden die Endothelzellen, sofern sie zu diesem Zeitpunkt zu einem konfluenten Monolayer ausgewachsen waren, passagiert. Das Passagieren ist das Ablösen und die Neuaussaat der Zellen. Sie konnten dann für weitere Versuchszwecke verwendet werden.

Zum Ablösen der Endothelzellen wurden die 90er Kulturschalen jeweils zweimal mit 10 ml PBS Dulbecco (6 °C) gewaschen. Dann wurden 4 ml einer Lösung aus 0,05 %

Trypsin und 0,02 % EDTA (-20 °C) zugegeben und die Schalen zur Inkubation für 1 bis 2 Minuten in den Brutschrank (37 °C) gegeben. Um die Wirkung des Trypsins aufzuheben, wurden 4 ml Endothelial Cell Growth Medium hinzugegeben.

Das Ablösen erfolgte, wie bei den Osteoblasten, indem die Zellsuspension einige Male mit einer Einmalpipette vom Schalenboden aufgesaugt und unter Schräghaltung wieder in die Schale gespült wurde. Dies erfolgte so häufig, bis der Schalenboden bei Schräghalten der Schale zu glänzen anfangt, und die Zellen in der Lösung als grauer Schleier zu erkennen waren.

Die Zellsuspension wurde mit einer Einmalpipette aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Zur Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung wurden 100 µl entnommen, in ein CasyTon-Gefäß gegeben und in ein Zellzähl-Gerät (CASY® I Modell TT, Schärfe System GmbH, Reutlingen) gegeben, in dem Zellzahl und Zellgröße bestimmt wurden. Zeitgleich wurde die Zellsuspension im Zentrifugenröhrchen 4 Minuten lang bei 1000 U/min und 20 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig bis nahe an das Zellpellet heran abgesaugt. Das Pellet wurde mit 1 ml Endothelial Cell Growth Medium resuspendiert und die benötigten Mengen konnten für die verschiedenen Versuche entnommen werden.

2.2.3 Cell-Tracking

Die Fluoreszenzfarbstoffe CM-DiI (Molecular Probes, Leiden, Niederlande, Best.- Nr. C- 7000) und Sp-DiOC18 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande, Best.- Nr. D- 7778) lagern sich irreversibel in Zellmembranen ein, ohne dabei das Verhalten der Zellen zu verändern. Die beiden Farbstoffe werden bei Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt, sodass die Zellen, die zuvor mit den Farbstoffen markiert wurden, unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2) erkannt und unterschieden werden können. Für CM-DiI liegt die Anregung bei 553 nm (grünes Licht) und die Emission bei 570 nm (oranges Licht). Sp-DiOC18 wird bei 488 nm (blaues Licht) angeregt und die Emission liegt bei 530 nm (grünes Licht). Bevor mit der Färbung begonnen wird, müssen zuerst Stocklösungen und Färbelösungen hergestellt werden. Für die Herstellung der Stocklösungen wird Dimethylsulfoxid (DMSO) benötigt. Die Farbstoffe werden in

DMSO zu 1 mM gelöst. Für die Herstellung der Färbelösungen werden die Stocklösungen 1:100 mit PBS verdünnt (10 μ M). Für eine große Zellkulturschale (144 cm^2) reichen 5 ml Färbelösung.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zunächst zweimal mit 8 ml PBS gewaschen. Auf jede große Schale wurden 5 ml der Färbelösung gegeben, dann wurde 5 Minuten bei 37 °C im Brutschrank und 15 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Nach Inkubation der Zellen mit der Färbelösung wurde dreimal mit PBS gewaschen. Nach den Waschdurchgängen wurden die Zellen abschließend mit 20 ml Medium pro Schale gefüttert und die Schalen in den CO₂-Inkubator zurückgestellt. Nach ein bis zwei Tagen Erholungszeit konnten die Zellen abgelöst und für Versuche weiterverwendet werden.

2.2.4 Zellmonolagenkultur

Herstellungsverfahren A

Osteoblasten und Endothelzellen wurden, nachdem sie passagiert wurden, im Kulturgefäß gemischt und in 8-well chamber slides ausgesiedelt. Die Oberfläche der einzelnen chambers beträgt 0,8 cm^2 und das Arbeitsvolumen 400 μ l. Vor dem Aussiedeln der Zellen wurden die chambers mit Gelatine (0,5%) beschichtet.

Das Verhältnis von Osteoblasten zu Endothelzellen betrug 2 : 1, das heißt pro well wurden 60.000 Osteoblasten und 30.000 Endothelzellen ausgesiedelt. Die Abgabe für die histologische und transmissionselektronenmikroskopische Auswertung erfolgte nach 3 und 7 Tagen. Pro Abgabezeitpunkt wurden zwei chamber-slides verwendet, da für die unterschiedlichen immunhistochemischen Färbungen (Osteocalcin, Osteonectin, Kollagen I, CD-31, vWF, BSP, Actin, α -SMA), eine Übersichtsfärbung (Richardson) sowie eine Negativprobe mehr als 8 wells mit Zellen besiedelt werden mussten.

Zudem wurden zwei wells pro Zeitpunkt entweder nur mit Osteoblasten oder nur mit Endothelzellen besiedelt, um die Proliferation der einzelnen Zellsorten ohne den Einfluss der anderen Zellen beurteilen zu können.

Die Mediumwechsel der Zellen erfolgte zweimal pro Woche mit Endothelial Cell Growth Medium.

Weitere Proben wurden in 4-well chamber slides (Oberfläche 1,8 cm², Arbeitsvolumen 800µl) gezüchtet, die erst nach längerem Zeitraum (nach 7, 14 und 21 Tagen) mit Hilfe von TEM und Histologie untersucht wurden. Vorgehensweise, Zellbedarf und Färbungen entsprachen dem zuvor genannten Versuchsaufbau mit 3 und 7 Tagen. Gefüttert wurde auch in diesem Fall zweimal die Woche, diesmal allerdings mit Endothelial Cell Growth Medium mit Zusatz von MM1, um zu beobachten, ob Mineralisationsvorgänge stattfanden.

Herstellungsverfahren B

Um die gegenseitige Beeinflussung bezüglich Proliferation und Strukturierung der Osteoblasten und Endothelzellen besser untersuchen zu können, wurden in einem weiteren zweidimensionalen Versuchsaufbau zuerst nur Osteoblasten in 8-well-chamber-slides ausgesiedelt und erst dann Endothelzellen dazugegeben, wenn die Osteoblasten zu einem konfluenten Teppich ausgewachsen waren. Dies war ungefähr nach 5 bis 6 Tagen der Fall. Beide Zellarten wurden vor Versuchsbeginn fluoreszenzgefärbt.

Die chamber slide-Proben wurden für histologische bzw. immunhistochemische Zwecke gefärbt. Zur histologischen Übersicht wurde mit Methylenblau- Azur II gefärbt. Diese von Richardson et al. [1960] beschriebene Färbung arbeitet mit einer Mischung aus 1% Methylenblau in 1% iger wässriger Boraxlösung und 1% Azur II in Aqua dest. Diese beiden Lösungen werden 1:1 gemischt. Die Färbelösung wird für eine halbe Stunde bei 37 °C im Wärmeschrank erwärmt. Die Proben werden für 5-10s gefärbt, in Aqua dest. gespült und dann getrocknet. Basophile und osmiophile Strukturen färben sich dabei blau, metachromatische Substanzen rotviolett.

Für die Immunfärbung der Zellen in den chamber slides wurden die Zellen zuerst mit kaltem Methanol fixiert, dann einmal mit TBST gewaschen und für 5 Minuten auf den Schüttler gestellt. Nach Absaugen des TBST wurde in jedes chamber 330µl TBST/BSA (1%; Apotheke Uniklinikum Münster) für mindestens 15 Minuten gegeben.

Zwischenzeitlich werden die Antikörper entsprechend verdünnt und die chambers beschriftet. Die ersten Antikörper werden in die einzelnen chambers pipettiert. Die Inkubationszeit beträgt 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rüttler. Nach erneutem 3maligem Spülen mit TBST wird der Sekundäantikörper aufpipettiert, die Inkubationszeit beträgt auch hier 1 Stunde. Es wird ein letztes Mal mit TBST gewaschen (3mal), die chamber-slides werden etwas trocknen gelassen, bevor die Kammern vorsichtig entfernt und die Proben mit Mounting Medium und Deckgläschen eingedeckelt werden. Die Proben werden im Kühlschrank aufbewahrt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.5 Mikromassenkulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen

In diesen Untersuchungen werden Osteoblasten und Endothelzellen in Zellkulturgefäße ausgesiedelt, in denen sie auf einem Agarosenährboden die Anhaftungsmöglichkeit verlieren und so angeregt werden, eine dreidimensionale sphärische Formation zu bilden. Für die Herstellung dieser Mikromassenkulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen werden agarosebeschichtete 96-well-Platten (Nunc, Wiesbaden) benötigt.

Für die Beschichtung der Platten werden 100 ml DMEM in eine 100 ml Glasflasche gegeben und mit 2 g zuvor abgewogener Agarose vermischt. Die Flasche mit dem Agarose-/DMEM-Gemisch wird autoklaviert. In noch warmem Zustand des Gemisches werden in jedes well 50 µl pipettiert. Die Platten können einige Wochen aufbewahrt werden, sofern sie im Kühlschrank (bei 4 °C) gelagert werden.

Endothelzellenummantelte Osteoblasten- Mikromassenkulturen, „Coated Osteospheres“

Die einen Tag zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff CM-DiI (Molecular Probes, Leiden) gefärbten Osteoblasten werden abgelöst und in 96-well-Platten ausgesiedelt. Pro Platte werden 60 wells mit Osteoblasten besiedelt, in jedes well werden 200.000 Zellen

gegeben. Das Arbeitsvolumen pro well beträgt 200 μ l. Als Medium wird das Endothelial Cell Growth Medium (Promocell, Heidelberg) verwendet, da aus verschiedenen Vorversuchen hervorging, daß sich kombinierte Osteoblasten- und Endothelzellkulturen am besten mit diesem Medium anzüchten lassen.

Nach Aussaat der Osteoblasten werden die 96-well-Platten zurück in den CO₂-Inkubator gegeben und es wird eine Woche gewartet, bis sich ein dreidimensionales, kugelförmiges Gebilde aus Osteoblasten gebildet hat.

Die Endothelzellen werden 6 Tage nach Versuchsbeginn mit dem Fluoreszenz-Marker Sp-DiOC18 (Molecular Probes, Leiden) gefärbt, am siebten Tag abgelöst und zu den Osteospheres in die wells hinzupipettiert.

Dabei beträgt das Verhältnis von Osteoblasten zu Endothelzellen 2 : 1, das heisst zu den 200.000 Osteoblasten die sich zu einer kugelförmigen Mikromassenkultur zusammengelagert haben, werden 100.000 Endothelzellen gegeben. Die Mikromassenkulturen werden nach Zugabe der Endothelzellen 3 bzw. 7 Tage kultiviert.

Gemischte Osteoblasten- und Endothelzellmikromassenkulturen – „Gemischte Osteoblasten- und Endothelzellspheres“

In einer weiteren Untersuchung werden die beiden Zellarten am selben Tag gefärbt, nach einer eintägigen Erholungsphase abgelöst, gemischt und gemeinsam in Agarose-beschichtete 96-well-Platten ausgesiedelt. Die Zellen werden im Verhältnis 3:1 ausgesiedelt, d.h. in jedes well werden 150.000 Osteoblasten und 50.000 Endothelzellen gegeben. Als Medium wird wieder das Endothelial Cell Growth Medium (Promocell, Heidelberg) mit Zusatz von MM1 verwendet. Die gemischten Zellen werden 3, 7, 14 und 21 Tage kultiviert. An allen 4 Abgabeterminen werden jeweils Mikromassenkulturen für die histologische Aufarbeitung und für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung abgegeben.

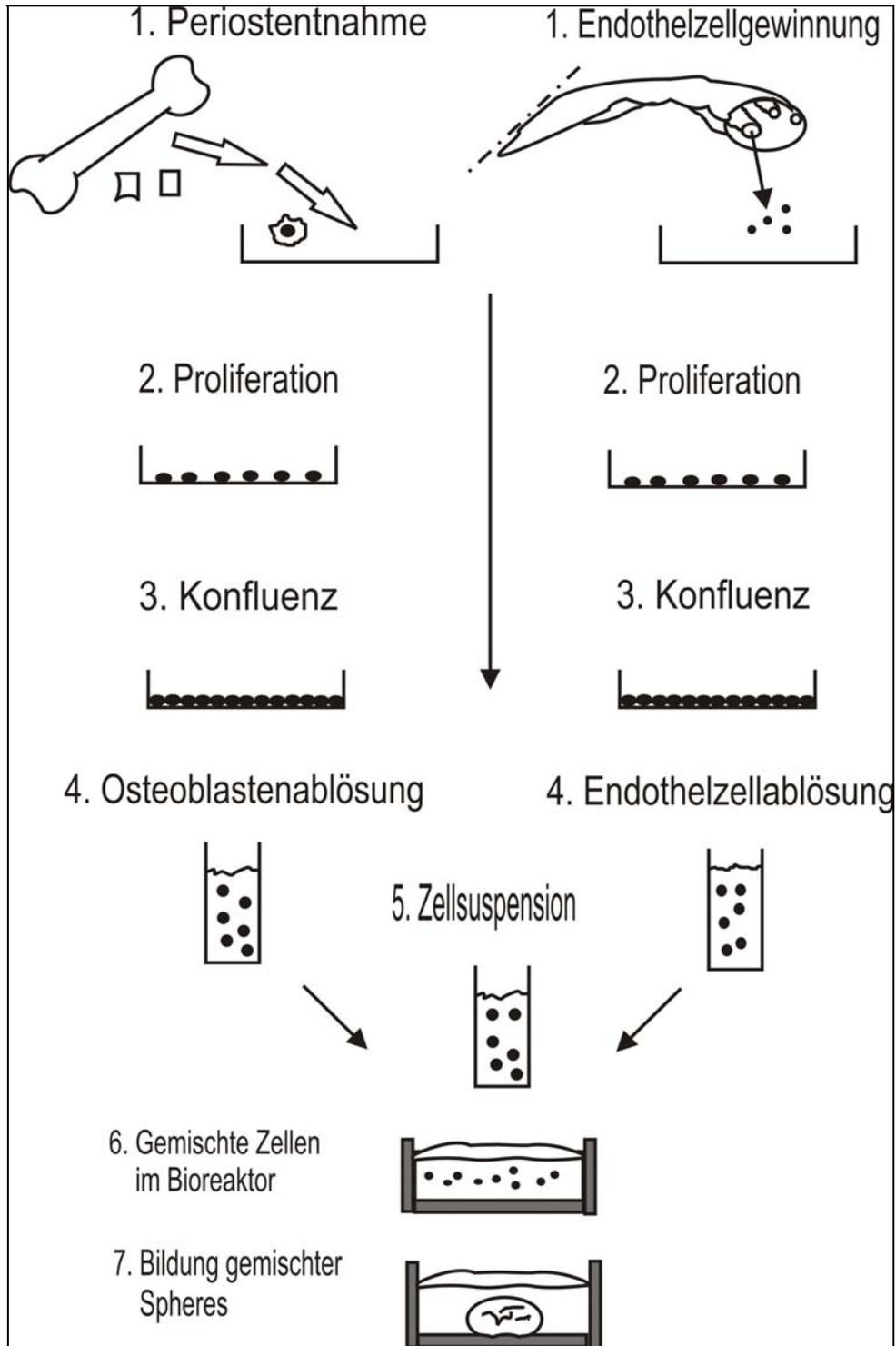


Abbildung 2.3: Herstellungsverfahren von gemischten Mikromassenkulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen in schematischer Darstellung

2.2.6 Histologie

Die Hälfte der Proben der Mikromassenkulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen wurden am jeweiligen Abgabetag fixiert und in Paraffin eingebettet, um später histologische Schnitte anfertigen zu können. Dazu wurden die Mikromassenkulturen mit einer Pipette aus den Wells herausgenommen und in ein Rollrandglas gegeben. Das Medium wurde von den Proben abgesaugt und zur Fixierung 4%iges gepuffertes Formalin zugegeben. Im Anschluss wurden die Proben für 15 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Danach wurde das Formalin abgesaugt und durch Phosphatpuffer ersetzt. Der Phosphatpuffer blieb 10 Minuten auf den Zellen, wurde dann abgesaugt, einmal erneuert und nochmals für 10 Minuten einwirken gelassen. Die Proben wurden nun in der aufsteigenden Alkoholreihe mit 50%, 70%, 90% Isopropanol und 100 % Isopropanol entwässert. Das Isopropanol wurde durch Zedernholzöl ersetzt, welches bei Raumtemperatur verwendet wird und als Intermedium zwischen dem Isopropanol und dem Paraffin diente. Zedernholzöl wurde anstelle von Methylbenzoat verwendet, da es in der Anschaffung günstiger, besser entsorgbar und ungiftig ist. Nach dem Zedernholzöl wurden die Proben nacheinander in drei Gefäße mit 60 °C warmem Paraffin (Paraplast I, II und III) gegeben. In allen drei Gefäßen befand sich das gleiche Paraffin. Durch das mehrfache Umsetzen der Proben wurde gewährleistet, dass jegliche Reste von Zedernholzöl aus den Zellen herausgewaschen wurden. Auch der Alkohol musste durch das Intermedium vollständig verdrängt werden. Abschließend wurden die Zellen in Einbettmols mit frischem Paraffin ausgegossen. Nach dem Auskühlen der Proben konnten mit dem Mikrotom Schnitte angefertigt werden. Die histologische Untersuchung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops.

Für die Untersuchung der Proben unter dem Transmissionselektronenmikroskop wurde eine Synchronfixierung mit Paraformaldehyd, Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid und anschließend eine Standardeinbettung in Araldit vorgenommen.

Für die Synchronfixierung wurde zuerst eine gebrauchsfertige Paraformaldehyd-Glutaraldehyd-Osmiumfixierlösung hergestellt, die bei 4 °C im Eisbad und unter dem Abzug angesetzt wurde. Die Fixierlösung ist eine Standardfixierlösung und wurde nach Arbeitsanweisung hergestellt. Sie wird für jede Fixierung frisch angesetzt, da sie nicht

lagerbar ist. Die Fixierung fand bei 4 °C unter dem Abzug statt und es sollte darauf geachtet werden, dass ausreichend Fixierlösung verwendet wird.

Die Fixierzeit richtet sich nach Art und Größe der Proben, in diesen Versuchen betrug die Fixierzeit 30 Minuten, da es sich um reine Zellproben handelte. Nach der Fixierlösung wurde 2 mal 10 Minuten mit 0,1 molarem PBS gespült, dann in aufsteigender Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 96%, 100%) jeweils 30 Minuten dehydriert. Im 70%igen Alkohol konnten die Proben mehrere Tage aufbewahrt werden. Nach dem 100%igen Alkohol wurde als Intermedium zwischen der Alkoholreihe und dem Araldit Propylenoxid auf die Proben gegeben. Um die Proben von der Alkoholreihe in das reine Araldit zu überführen, wurden drei Intermedium- Stufen benötigt: Propylenoxid und Araldit werden den Proben im Verhältnis 2:1, 1:1 und dann 1:2 zugegeben. Anschließend folgte die Endeinbettung in reines Araldit. Zur Polymerisation des Araldits wurden die beschrifteten Proben 2 bis 3 Tage bei 60 °C im Wärmeschrank inkubiert.

Die Aralditproben wurden am Ultramikrotom geschnitten und nach Befilmung der Grids mit Pioloform oder Formvar und Kontrastierung mit alkalischen Schwermetallsalzlösungen wie Uranylacetat und Bleicitrat mit Hilfe des Elektronenmikroskops untersucht.

3 ERGEBNISSE

3.1 Zellanalyse von Monolagenkulturen

3.1.1 Osteoblasten und Endothelzellen

Die Osteoblastengewinnung erfolgte aus dem Periost des Metacarpus frisch geschlachteter Kälber. Je nach Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen wurden nach ungefähr 3-5 Wochen die konfluenten Zellen passagiert und für unterschiedliche Versuche verwendet. Schon am Tag 1 der Kultivierung der fluoreszenzgefärbten Osteoblasten-ähnlichen Zellen waren mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops viele Osteoblasten sichtbar (Abb.3.1A). Sie wiesen eine für Osteoblastenmonolagekulturen typische Morphologie (kuboidales Erscheinungsbild) auf. Am ersten Tag nach der Aussiedlung der tags zuvor mit CM-DiI gefärbten Zellen waren diese in spindelförmiger bis ovaler Form zu sehen. Sie wiesen einen zentral gelegenen, im Verhältnis zur Gesamtzellgröße großen Zellkern auf. Im zeitlichen Verlauf der Osteoblastenkultivierung veränderte sich die Form der Osteoblasten. Die äußere Gestalt der Zellen wirkte rundlicher und breiter als in den ersten Tagen, sie bildeten vermehrt Fortsätze aus, die zu einem kubischen, polygonalen Aussehen der Osteoblasten führten.

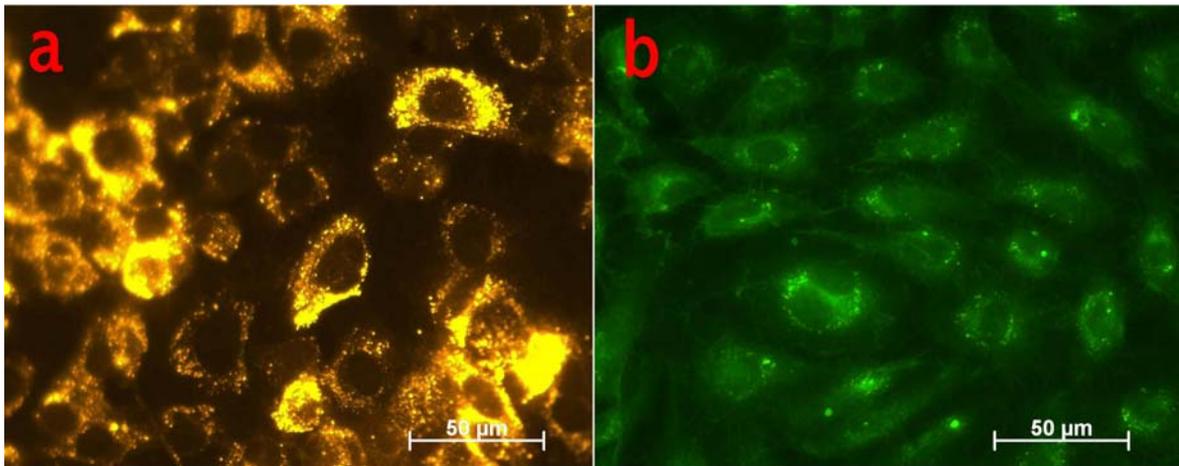


Abbildung 3.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit CM-DiI gefärbten Osteoblastenmonolage an Tag 1 der Kultivierung

(a), fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit Sp-DiOC 18 gefärbten Endothelzellmonolage, ebenso Tag 1 der Kulturzeit (b)

Die Gewinnung der Endothelzellen erfolgte durch Isolierung der Zellen aus humaner Nabelschnur. Die HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) wurden im konfluenten Stadium nach einer Kulturzeit von 3 bis 5 Wochen abgelöst, passagiert und für verschiedene Versuche weiterverwendet.

Am ersten Tag der Kultivierung der zuvor passagierten und mit SP-DiOC18 fluoreszenzgefärbten Endothelzellen stellten sich die Zellen in typischer Morphologie dar. Sie waren als längliche, flache Zellen mit zentral liegendem ovalem Zellkern sichtbar und hatten mehrere Nucleoli (Abb. 3.1B).

3.1.2 Cell-Tracking mit CM-DiI und SP-DiOC18

Die Fluoreszenzfarbstoffe CM-DiI und SP-DiOC18 lagern sich irreversibel in Zellmembranen lebender Zellen ein, ohne das Verhalten der Zellen zu beeinflussen oder zu verändern. Über diese relativ neue Möglichkeit der Fluoreszenzfärbung lassen sich Zellen, die über einen zeitlichen Verlauf beobachtet werden sollen, markieren. Wie in Abb. 3.1A zu sehen, sind die mit CM-DiI gefärbten Osteoblasten bei Anregung mit

grünem Licht (553nm) in hellem Orange und die mit SP-DiOC18 gefärbten Endothelzellen nach Anregung mit blauem Licht (488nm) in Grün (Abb. 3.1B) zu sehen. Die lebenden Zellen wurden zunächst in der Petrischale fluoreszenzgefärbt, nach einer eintägigen Erholungsphase abgelöst und für weitere Versuche in verschiedene Kulturgefäße wieder ausgesiedelt.

3.1.3 Gemischte Monolagekultur aus Osteoblasten und Endothelzellen

3.1.3.1 Histologische Auswertung

Zunächst getrennt in Kulturschalen kultivierte Osteoblasten und Endothelzellen wurden nach Ablösung in einem Röhrchen gemischt und in Gelatine-beschichtete chamber slides ausgesiedelt.

Die lichtmikroskopische Auswertung der gemischten 2D-Kulturen in der Richardson-Färbung nach 3 und 7 Tagen zeigt folgende Ergebnisse (Abb. 3. 2 A-D).

Zu beiden Zeitpunkten sind die Osteoblasten stark dunkel violett angefärbt sichtbar und liegen in Clustern angeordnet unter sehr engem Kontakt zueinander in den Proben vor.

Die Endothelzellen sind weniger stark blau-violett gefärbt und erstrecken sich radiär zwischen den einzelnen Osteoblastenclustern. Sie sind als langgestreckte, flache Zellen mit hellem, zentralem, großem Zellkern und mehreren Nucleoli zu sehen und entsprechen so dem typischen Phänotyp der Endothelzellen. In den Endothelzellbereichen sind noch Freiräume zu sehen. Die Endothelzellen liegen nicht so dicht an dicht wie die Osteoblasten, welche unter engem Kontakt nebeneinander liegen. Beide Zellarten wurden vor dem Aussiedeln gemeinsam im Medium in Suspension gebracht. Die Zellen wurden im Verhältnis 2:1 zusammen gebracht, d.h. pro cm² wurden 60.000 Osteoblasten und 30.000 Endothelzellen ausgesiedelt. Die Zellzahlverhältnisse wurden entsprechend den unterschiedlichen Zellgrößen gewählt. Wie in den Abb.3. 2 A-D gezeigt, bestehen enge Zell-Zell-Kontakte zwischen beiden Zelltypen.

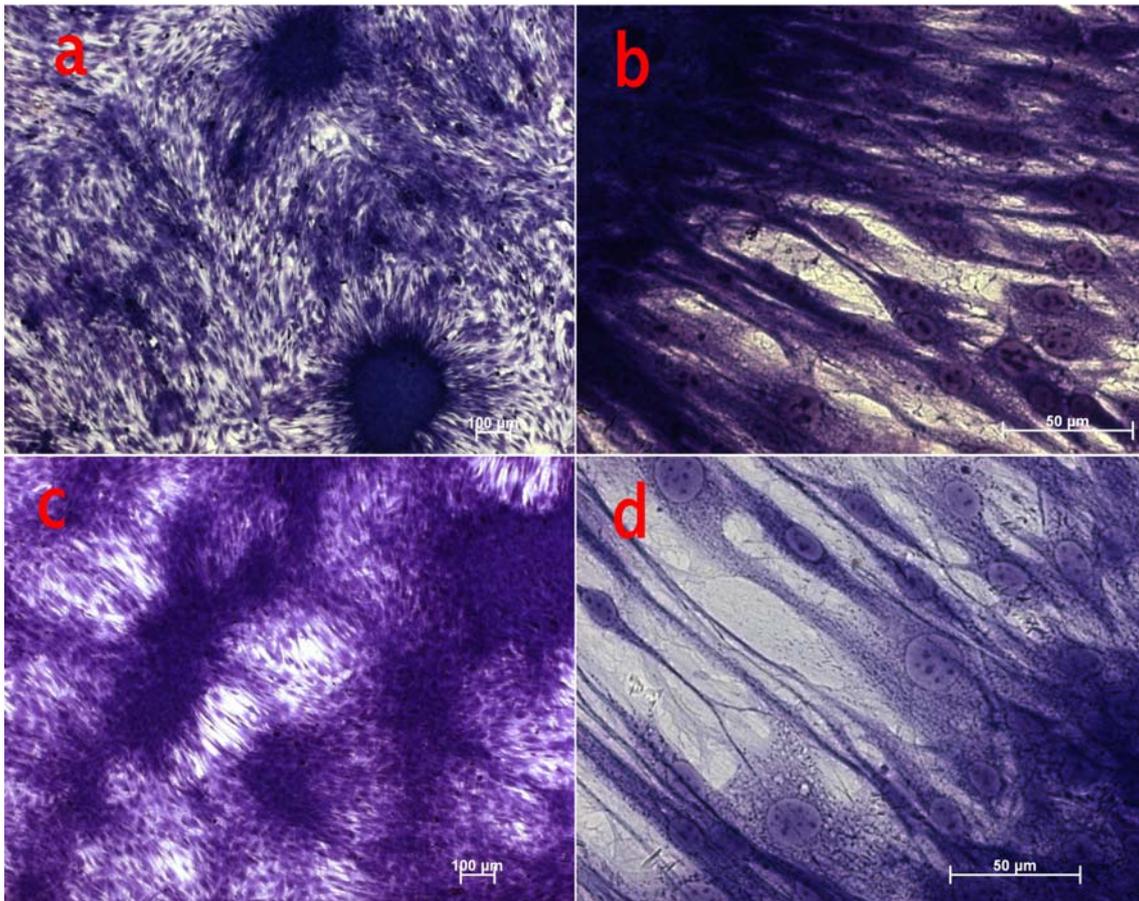


Abbildung 3.2: Histologische Bilder gemischter Monolagekulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen in Richardson-Färbung

Nach 3 Tagen: Übersicht (A), Vergrößerung (B) und 7 Tagen: Übersicht (C), Vergrößerung (D)

3.1.3.2 Immunhistochemische Auswertung

Zusätzlich zur histologischen Auswertung wurden gemischte Monolagekulturen nach Zeitintervallen von 7, 14 und 21 Tagen immunhistochemisch untersucht. Die Auswertung der histologischen Proben wurde durch die immunhistochemischen Ergebnisse bestätigt.

Nach 7 Tagen Kulturzeit war es anhand von immunhistochemischen Färbungen möglich, das Vorhandensein der beiden Zelltypen in einer Probe nachzuweisen und auch eine Unterscheidung zwischen Osteoblasten und Endothelzellen vorzunehmen. Mit Hilfe des Immunmarkers α -Smooth-Muscle-Actin ließen sich die Endothelzellen gut

darstellen (Abb. 3.3 B). In anderen Bereichen der gleichen Zellprobe fanden sich gering bis gar nicht angefärbte Bereiche, in denen es sich um Osteoblastenareale handelt, die kein α -SMA exprimieren (Abb. 3.3 A).

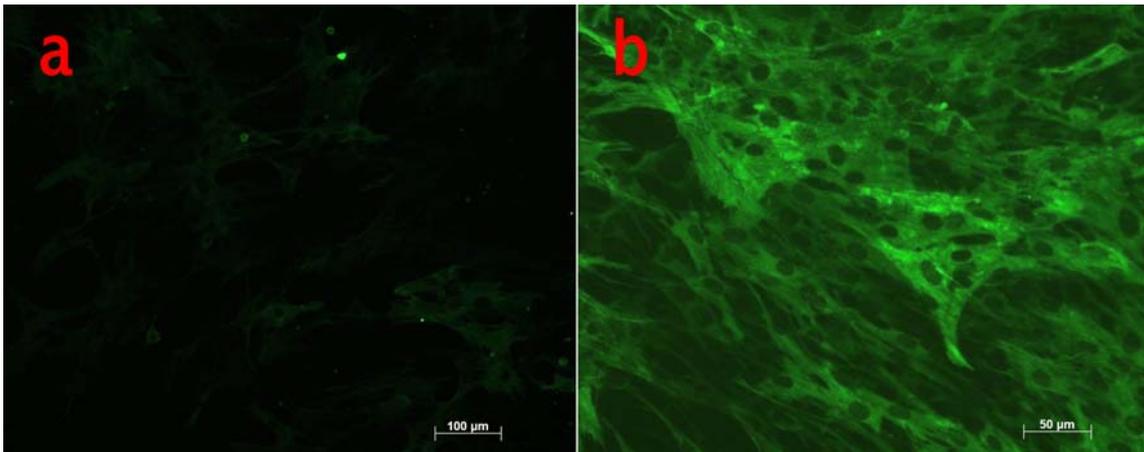


Abbildung 3.3: Immunhistochemische Färbung einer gemischten Monolagekultur mit α -SMA

(a) negativer Nachweis nicht gefärbter Osteoblastenbereiche nach 7 Tagen, (b) positiver Nachweis stark angefärbter Endothelzellen nach 7 Tagen

Zudem zeigte sich bei der gemischten 2D-Kultur eine deutliche Expressierung des von-Willebrand-Faktors im Bereich der Endothelzellen (siehe Bereich E in Abb. 3.4). In der gleichen Aufnahme sind Bereiche nicht gefärbter Osteoblasten sichtbar (siehe Bereich O in Abb. 3.4). Die Endothelzellen liegen innerhalb ihres Areals in zwei unterschiedlichen Phänotypen vor. Während die in der Mitte liegenden Zellen polygonaler Struktur sind, haben die außen liegenden, an das Osteoblastenareal angrenzende Zellen die typische Morphologie eines Endothels. Sie sind schmal konfiguriert, langstreckig und kreisförmig angeordnet und scheinen, ein Lumen zu begrenzen (Abb.3.4 siehe Pfeil).

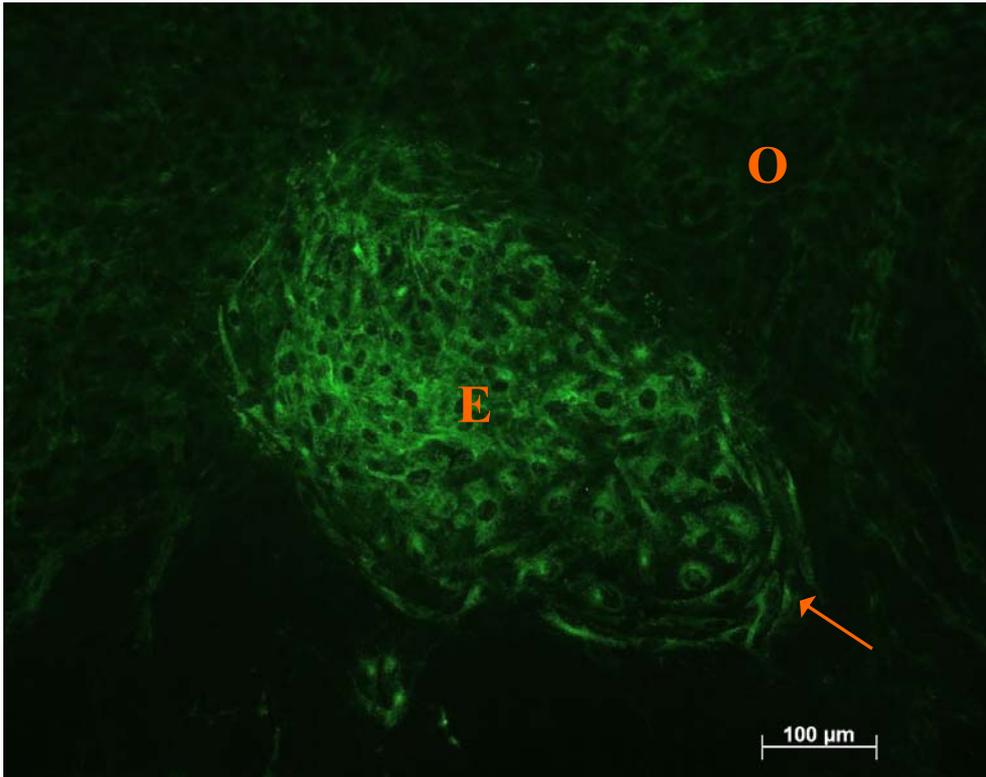


Abbildung 3.4: Immunhistochemische Färbung einer gemischten 2D-Kultur aus Osteoblasten und Endothelzellen mit von-Willebrand-Antikörper nach 14 Tagen

Bereich E: positiver Nachweis der Endothelzellen, Bereich O: negativer Nachweis kaum angefärbter Osteoblasten ; → : flache Endothelzellen im Randbereich

Bei der 14-Tages-Probe ließen sich anhand der immunhistochemischen Färbung mit dem Matrixprotein Kollagen Typ I Osteoblasten mit ihrem typischen Erscheinungsbild nachweisen. Wie Abb.3.5 zeigt, exprimieren sie reichlich Kollagen. Sie sind über ein Kollagennetzwerk miteinander verbunden.

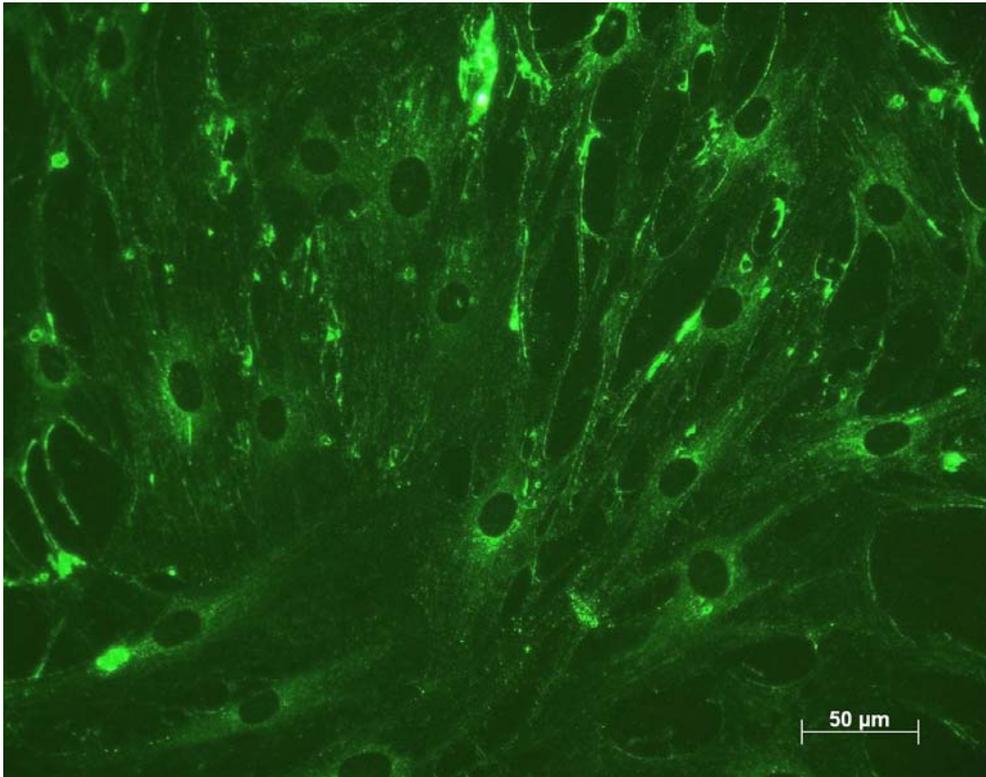


Abbildung 3.5: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ I bei Osteoblasten in der gemischten Osteoblasten-Endothelzell-Monolage-Kultur nach 14 Tagen

Abb. 3.5 zeigt die Expression des Matrixproteins Kollagen einer gemischten Monolagekultur nach 14 Tagen. Die sichtbaren Osteoblasten zeigen große Zellkerne und viele Ausläufer.

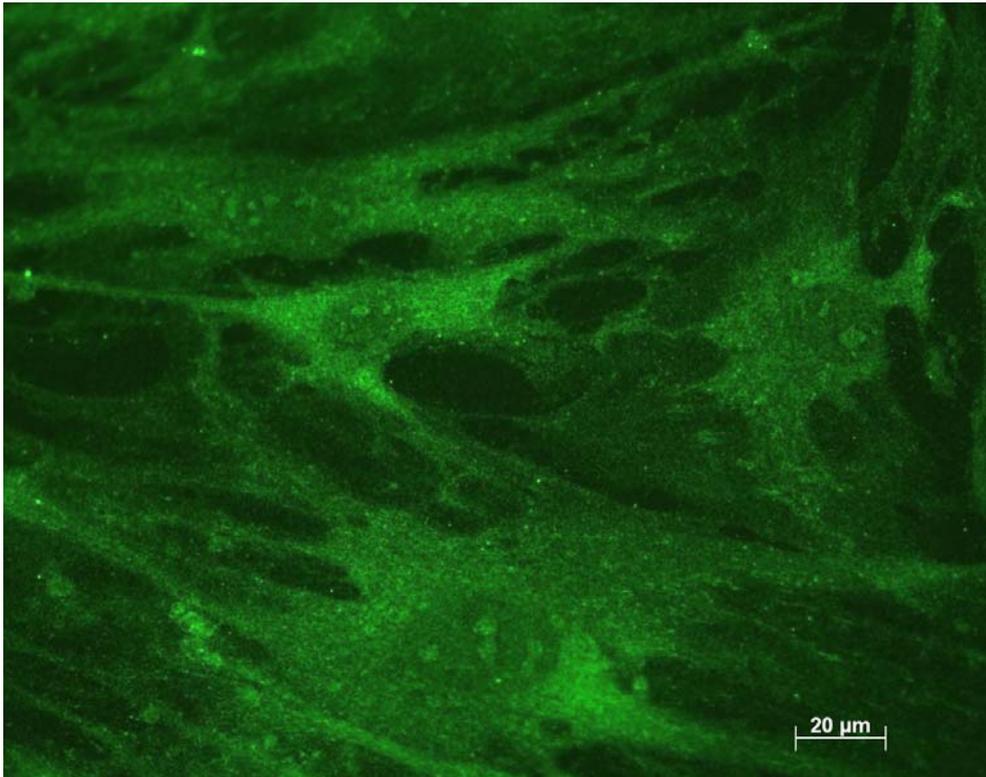


Abbildung 3.6: Immunhistochemischer Nachweis von Osteoblasten in der 2D-Gemischtkultur mittels Bone Sialoprotein nach 21 Tagen

Abb. 3.6 zeigt die Produktion des zellulären Matrixproteins Bone Sialoprotein (BSP) in den Osteoblasten der 2D-Gemischtkultur nach 21 Tagen. Die Osteoblasten haben eine polygonale Form, viele Ausläufer und einen großen, zentral liegenden Zellkern. Es zeigt sich eine Verbindung über multiple Ausläufer in Form von Zell-Zell-Kontakten.

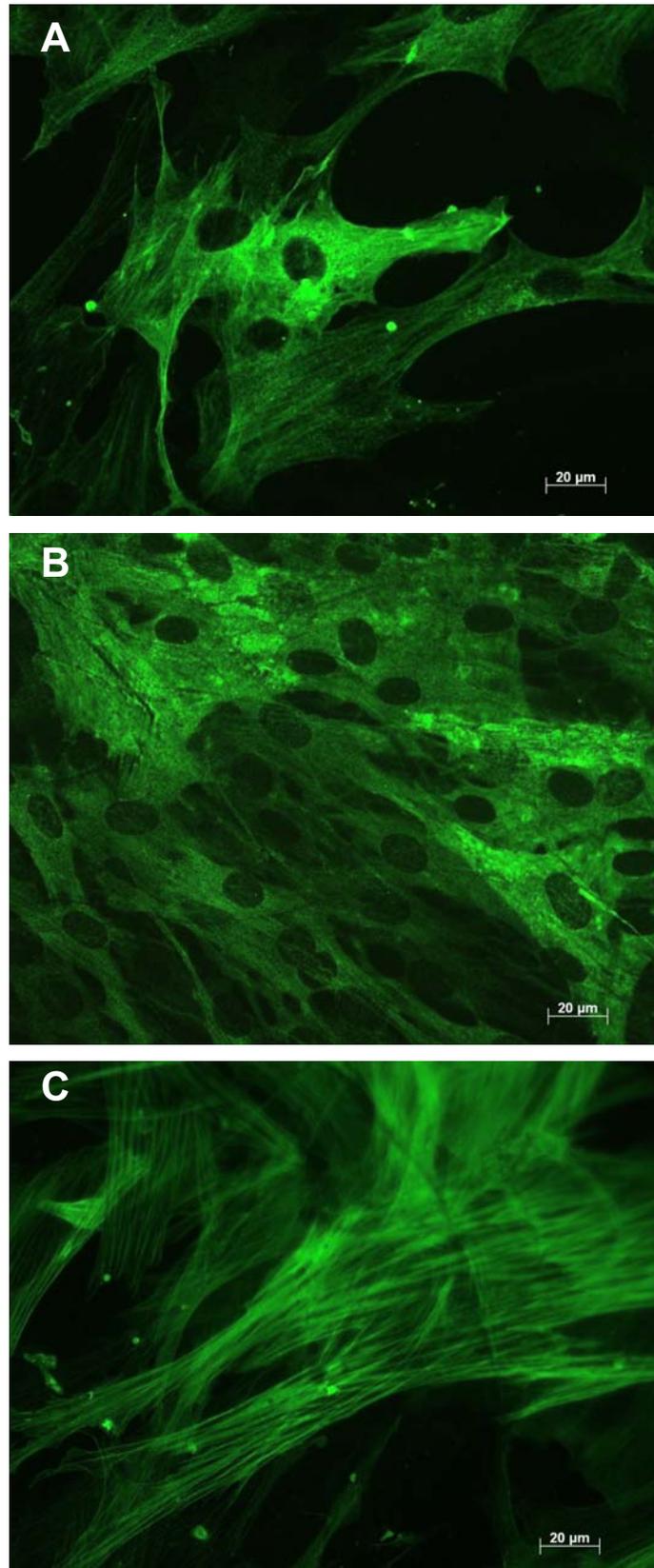


Abbildung 3.7: Immunhistochemischer Nachweis von Endothelzellen in der 2D-Kokultur mit Hilfe von α -SMA nach 7 (A), 14 (B) und 21 Tagen (C)

Mittels des immunhistochemischen Markers alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA) wird in Abb.3.7 der zeitliche Entwicklungsverlauf der Endothelzellen nach 7, 14 und 21 Tagen gezeigt.

Nach einer Kulturzeit von 7 Tagen sind einzelne Endothelzellen sichtbar mit jeweils einem zentral liegenden ovalen Zellkern. Die Aufnahme der 14-Tages-Probe zeigt viele Zellen die enge, flächige Zell-Zell-Kontakte untereinander ausbilden. Nach 21 Tagen verwischen die Konturen der Endothelzellen, die Zellkerne sind nur schlecht zu sehen, die Zellkontakte werden faseriger, langgestreckter und dünner.

3.1.4 Osteoblastenmonolagekultur mit sekundärer Endothelzellzugabe

Abb. 3.8 zeigt eine Monolagekultur aus Osteoblasten und Endothelzellen, die zeitlich versetzt zusammengebracht wurden. Hier zeigt sich ein deutlich anderes Bild als bei den in Suspension gebrachten, zeitgleich ausgesiedelten 2D-Kokulturen. Es ist weder eine Clusterbildung der Osteoblasten und radiäre Ausrichtung der Endothelzellen zu erkennen, wie es bei zeitgleichem Aussiedeln beider Zellarten zu sehen war, noch findet sich eine vergleichbare Anordnung, vielmehr liegen die Osteoblasten und Endothelzellen hier abwechselnd gemischt nebeneinander.

Die 3-Tages-Probe zeigt ein homogeneres Zellbild im Gegensatz zum gemischten 2D-Versuch. Die Osteoblasten sind dunkelblau angefärbt und die Endothelzellen durch einen helleren Blauton charakterisiert. Die Osteoblastencluster sind kleiner als bei den simultan gemischten Kulturen und das gesamte Zellbild ist homogener durchmischt (Abb.3.8 A). In der vergrößerten Aufnahme werden morphologische Unterschiede zwischen beiden Zelltypen deutlich: die stark blau angefärbten Osteoblasten haben eine polygonale Form, einen zentralen großen Zellkern, mehrere Ausläufer und sind größer als die Endothelzellen. Untereinander bilden die Zellen ein Netzwerk. Die Endothelzellen sind in der Richardson-Färbung schwächer angefärbt, langgestreckter und haben einen zentralen Zellkern mit mehreren Kernkörperchen.

Die 7-Tages-Probe zeigt eine vermehrte Clusterbildung der Osteoblasten. Die Endothelzellen sind schmal und extrem langgestreckt. Es sind vermehrt weiße, nicht von Zellen besiedelte Bereiche in der Probe zu sehen. Die Endothelzellen erstrecken sich radiär, fast wellenförmig zwischen der Osteoblastenarealen (Abb.3.8 C).

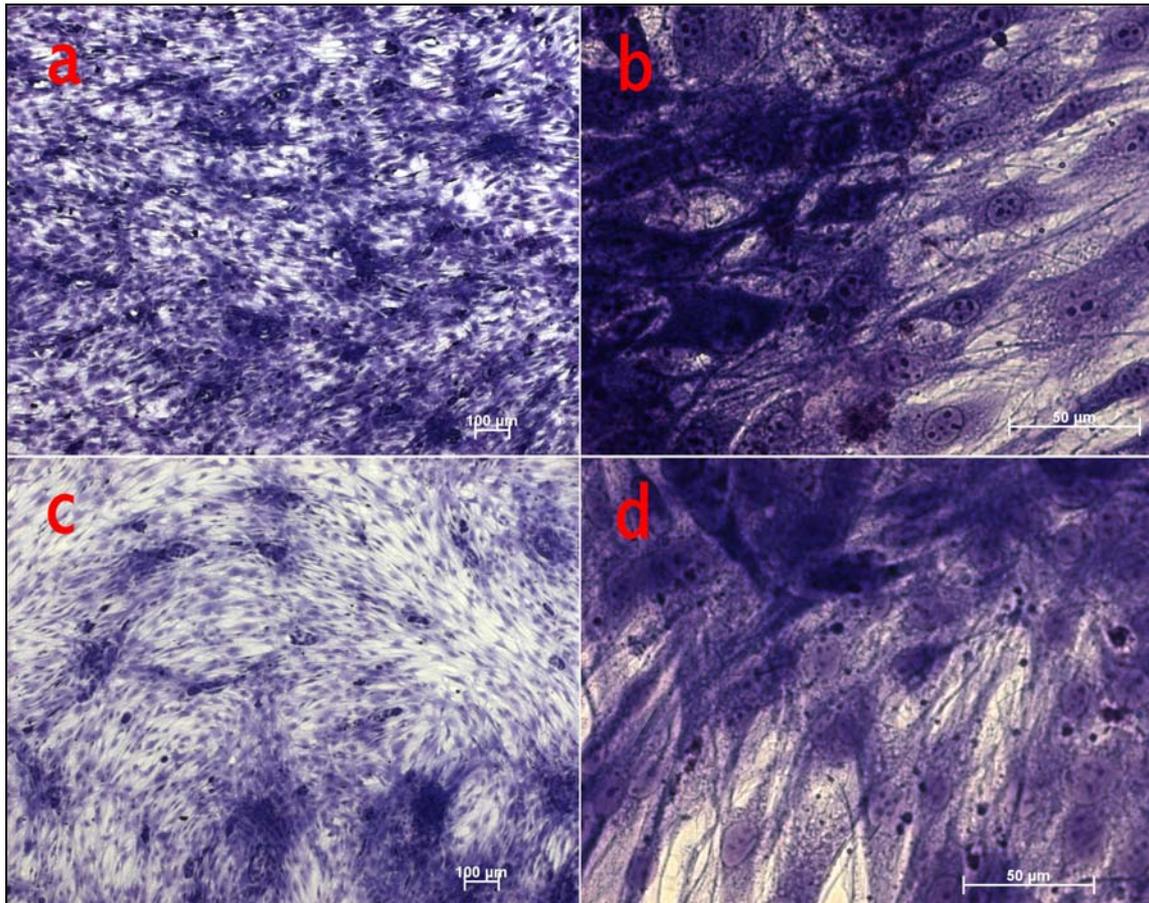


Abbildung 3.8: Osteoblastenmonolagenkultur, zu der nach 2 Tagen Endothelzellen hinzugegeben wurden

(a-b) Übersicht und vergrößerter Ausschnitt 3 Tage nach Endothelzellzugabe, (c-d) Übersicht und vergrößerter Ausschnitt 7 Tage nach Endothelzellzugabe

3.2 Übersichten von Mikromassenkulturen

3.2.1 Mikromassenkulturen aus Osteoblasten

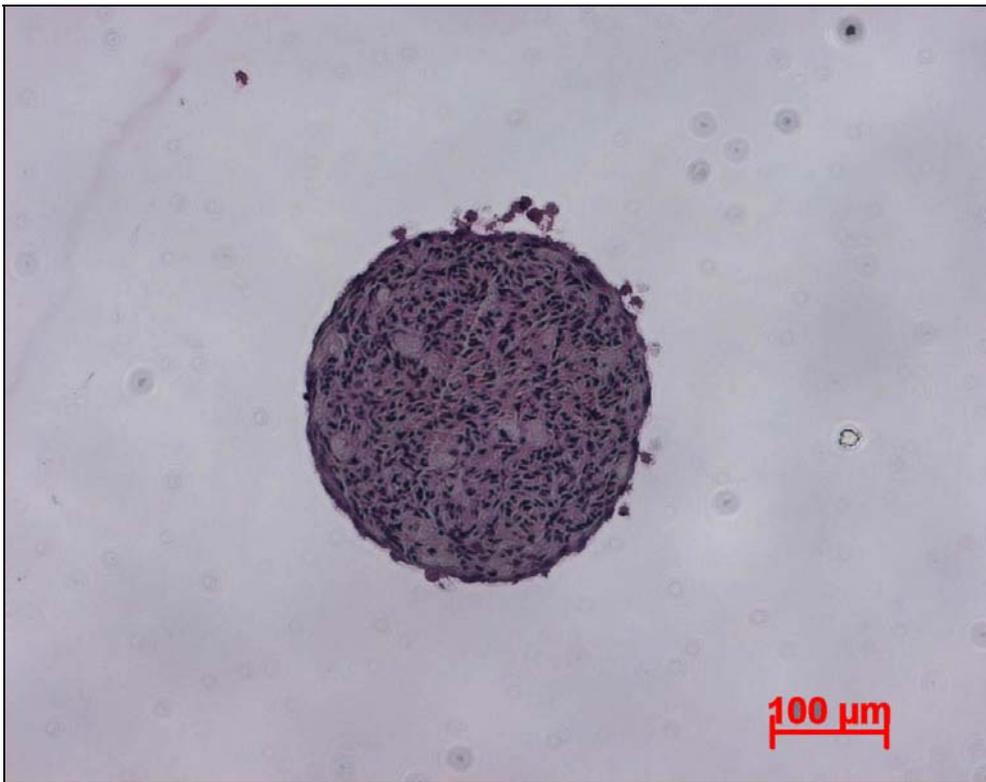


Abbildung 3.9: Übersicht eines Querschnittes durch die Mitte einer 3 Tage alten Mikromassenkultur aus Osteoblasten, Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach Aussiedelung von Osteoblasten in ein geeignetes, mit Agarose beschichtetes Kulturgefäß, zeigt sich in der lichtmikroskopischen Betrachtung, dass sich schon in den ersten Tagen eine kugelige, sphärische Gestalt bildet, deren Ausbildung nach 3 Tagen abgeschlossen scheint (Abb.3.9).

Die Osteoblasten liegen in einem kugeligen Zellverband vor. Im Inneren dieses Zellverbandes sind erste Strukturbildungen sichtbar, außen bilden flache Zellen, die in der Abb. dunkel violett zu sehen sind, einen mehrreihigen Verband und einen Abschluß gegen die Umgebung.

3.2.2 Mikromassenkulturen aus Endothelzellen

Formationen aus Endothelzellen unterscheiden sich in ihrer äußeren Form von den Osteoblastenformationen. Wie Abb. 3.10 zeigt, ist ihre äußere Form nicht rund und sphärisch, sondern halbmond- bis hantelförmig. Dabei fällt die homogene Struktur ihres Zellbildes auf. Phänotypisch scheinen sich die Zellen kaum voneinander zu unterscheiden, sie imponieren formgleich und liegen in dicht gedrängter Struktur nebeneinander. Unterschiedliche Anordnungen bezüglich einer Formation von Zellen wie zuvor bei den Osteoblasten zu sehen, lassen sich innerhalb der gesamten Mikromassenkultur hier nicht erkennen.

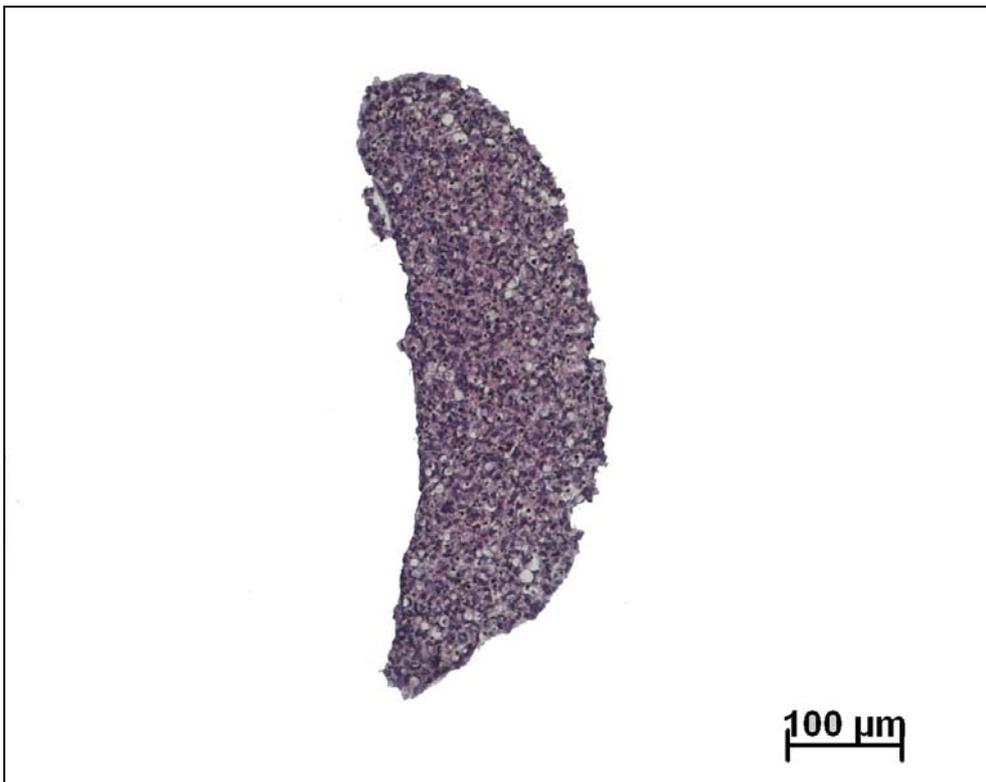


Abbildung 3.10 : Übersicht eines Querschnittes durch die Mitte einer reinen Endothelzell-Mikromassenkultur

Alter der Kultur: 7 Tage, Hämatoxylin-Eosin-Färbung

3.2.3 Gemischte Mikromassenkulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen

3.2.3.1 Histologische Auswertung

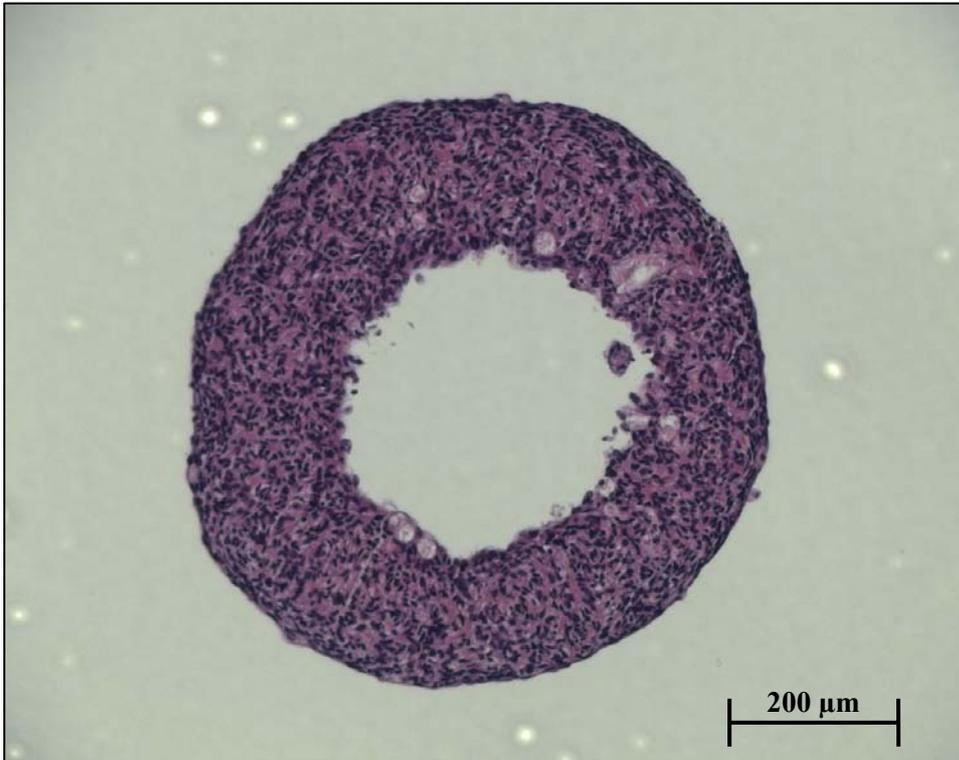


Abbildung 3.11: Übersicht eines Querschnittes durch die Mitte einer gemischten Mikromassenkultur aus Osteoblasten und Endothelzellen nach 7-tägiger Kulturzeit

HE-Färbung, 10-fache Vergrößerung

Abb. 3.11 zeigt eine gemischte Mikromassenkultur. Auffällig ist die kreisrunde, ringförmige Struktur der Kultur im Querschnitt mit Begrenzung eines zentralen Lumens. Das Zellbild ist bunt gemischt, es findet sich eine dezente Verdichtung des Zellbildes am inneren und äußeren Radius des Zellrings, welcher in Form einer flach ausgebildeten zwei- bis dreireihigen Zellschicht imponiert. Dabei erscheinen die Zellen im Außenbereich des Zellrings eher flach und länglich konfiguriert, die im Inneren um ein Lumen liegenden Zellen deutlich runder.

3.2.3.2 Immunhistochemische Auswertung

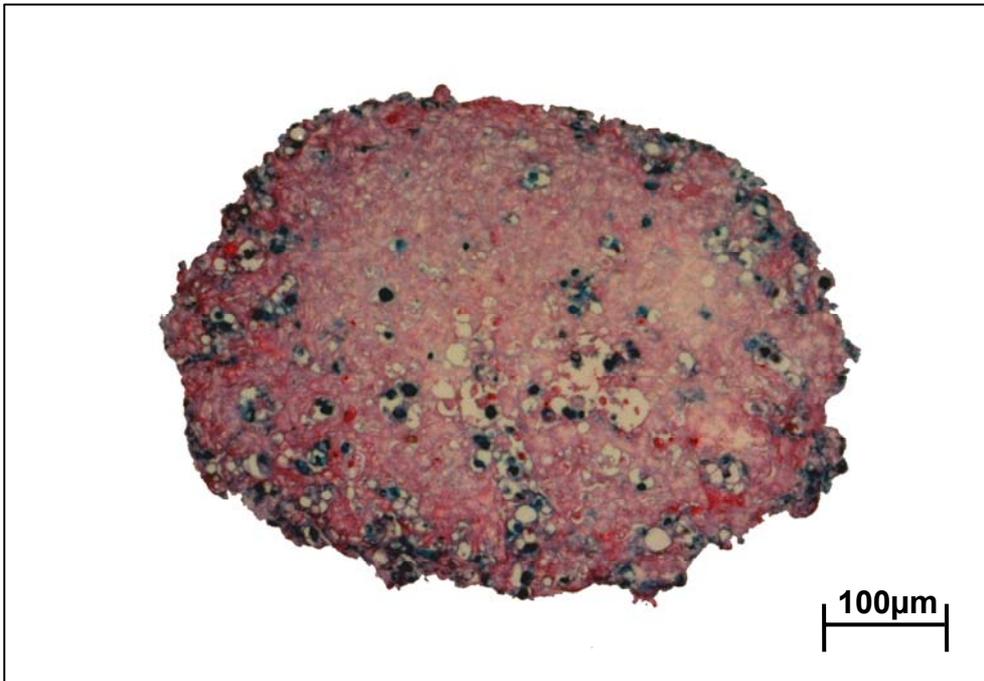


Abbildung 3.12: Übersicht einer gemischten Mikromassenkultur aus Osteoblasten und Endothelzellen

Alter der Kultur: 3 Tage, immunhistochemische Doppelfärbung mit Osteonectin (rot) und von-Willebrand- Faktor (grün), 10-fache Vergrößerung

In Abb. 3.12 ist eine 10-fache Vergrößerung einer gemischten 3 Tage alten Mikromassenkultur aus Osteoblasten und Endothelzellen mit einer immunhistochemischen Doppelfärbung gegen Osteonectin und vWF zu erkennen. Innerhalb der sphäroiden Form finden sich neben den rot angefärbten Osteoblasten vereinzelt grün angefärbte Endothelzellen, die sich zu lockeren Verbänden von mehreren Zellen hauptsächlich in der Nähe nicht angefärbter Bereiche (Lumina) zusammenschließen und diese teilweise unvollständig begrenzen.

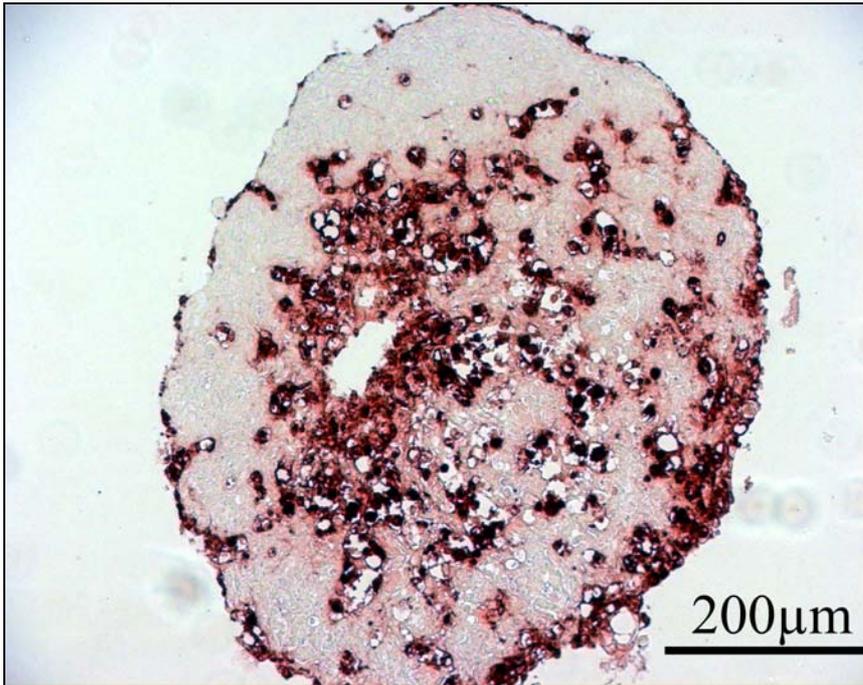


Abbildung 3.13: Übersicht einer gemischten Mikromassenkultur aus Osteoblasten und Endothelzellen

Alter der Kultur 3 Tage, Färbung: von-Willebrand-Faktor

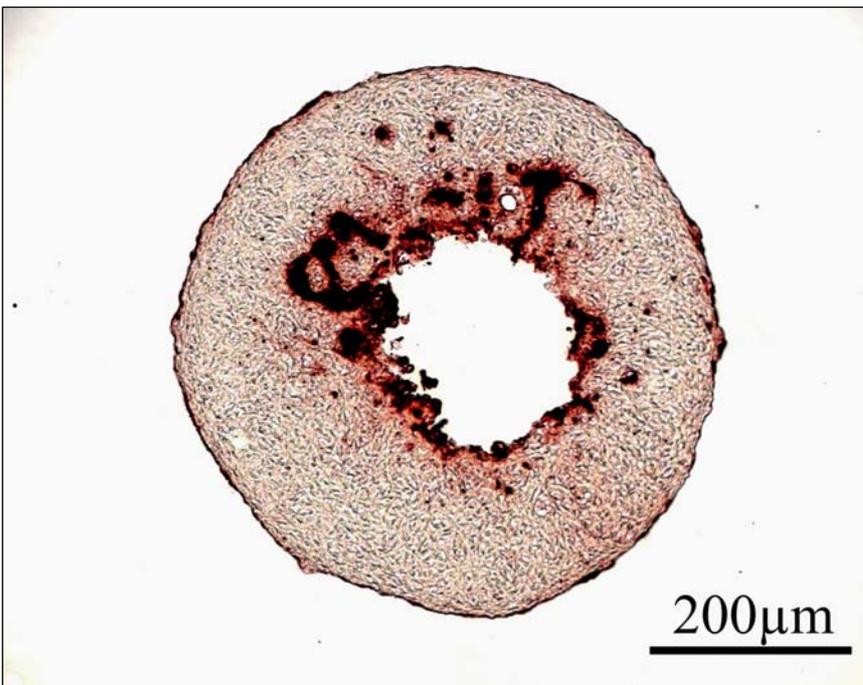


Abbildung 3.14: Übersicht einer gemischten Mikromassenkultur aus Osteoblasten und Endothelzellen

Alter der Kultur: 7 Tage, Färbung: von-Willebrand-Faktor

Abb. 3.13 und 3.14 zeigen gemischte Mikromassenkulturen nach 3 und 7 Tagen. Die Endothelzellen begrenzen nicht angefärbte Hohlräume (nach 3 Tagen) und sogar ein großes zentrales Lumen (nach 7 Tagen). Ebenso findet sich eine einlagige Schicht an Endothelzellen am Rand der Mikromassenkultur und bildet hier einen Abschlusszellschicht gegen die Umgebung. Im Laufe der Kulturzeit kommt es zu einer sichtbaren Ordnung der Osteoblasten und Endothelzellen, wobei die Endothelzellen einen Abschluss gegen die äußere Umgebung als auch gegen das innere Lumen bilden und die Osteoblasten dazwischen liegen (nicht angefärbte Bereiche in Abb. 3.13 und 3.14)



Abbildung 3.15: Übersichten von gemischten Mikromassenkulturen nach einer Kulturzeit von 14 Tagen

Bone Sialoprotein (oben), Osteocalcin (Mitte), Osteopontin (unten)

3.2.3.3 Transmissionselektronenmikroskopische Auswertung (TEM)

Abb. 3.16 zeigt die transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer dreidimensionalen Kokultur aus Osteoblasten und Endothelzellen nach siebentägiger Kulturzeit. Die Zellen bilden ein Netzwerk über Zellfortsätze. Die Zellen variieren in ihrer äußeren Form.

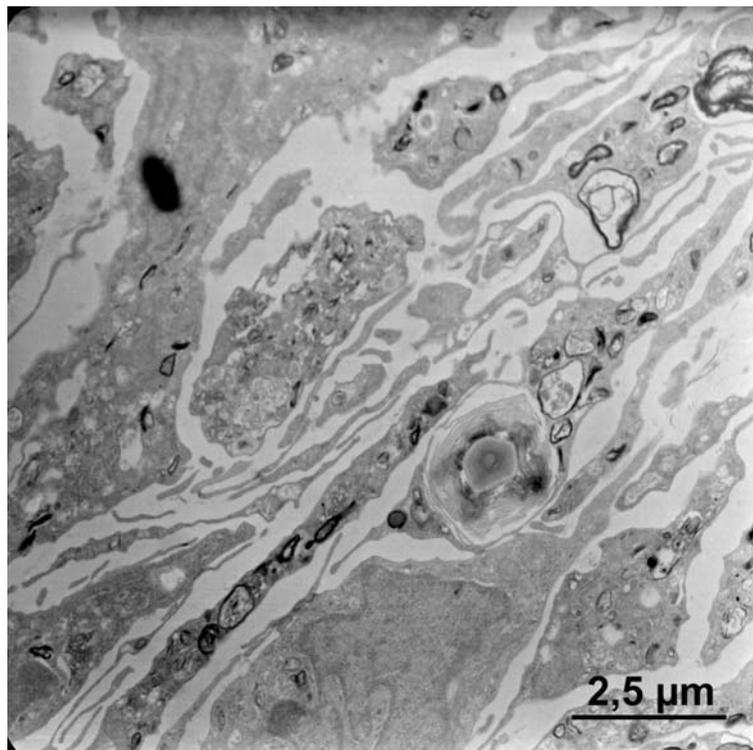


Abbildung 3.16: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung einer 7 Tage alten gemischten Mikromassenkultur

Die Abb. 3.17 zeigt ebenso wie die vorherige eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer gemischten Mikromassenkultur nach siebentägiger Kulturzeit. Auffallend sind hier die im Zellinneren gelegenen vesikulären Strukturen, die man als sekundäre-tertiäre Lysosomen oder besser als multivesikuläre Körperchen betiteln kann.

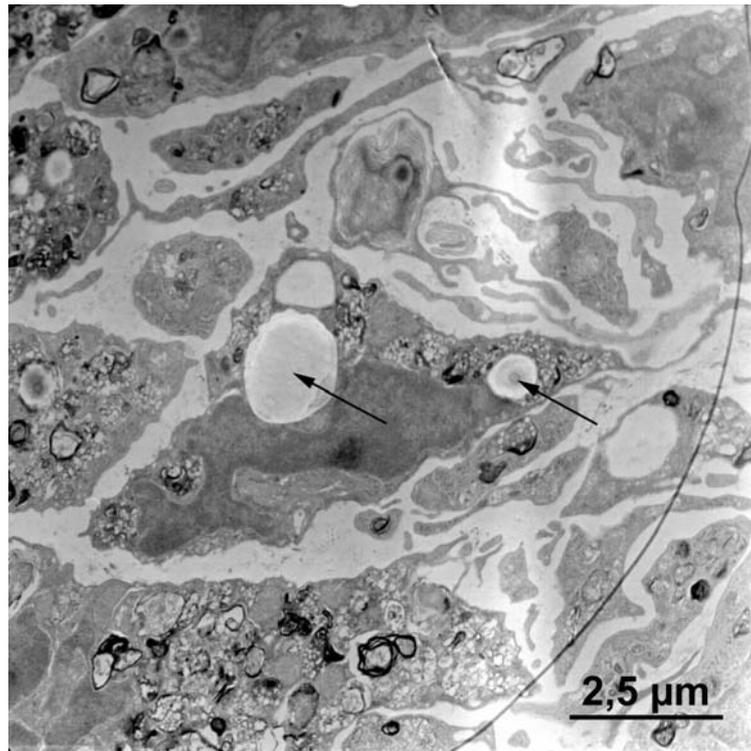


Abbildung 3.17: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung einer 7 Tage alten gemischten Mikromassenkultur, mit Vesikeln (siehe Pfeile)

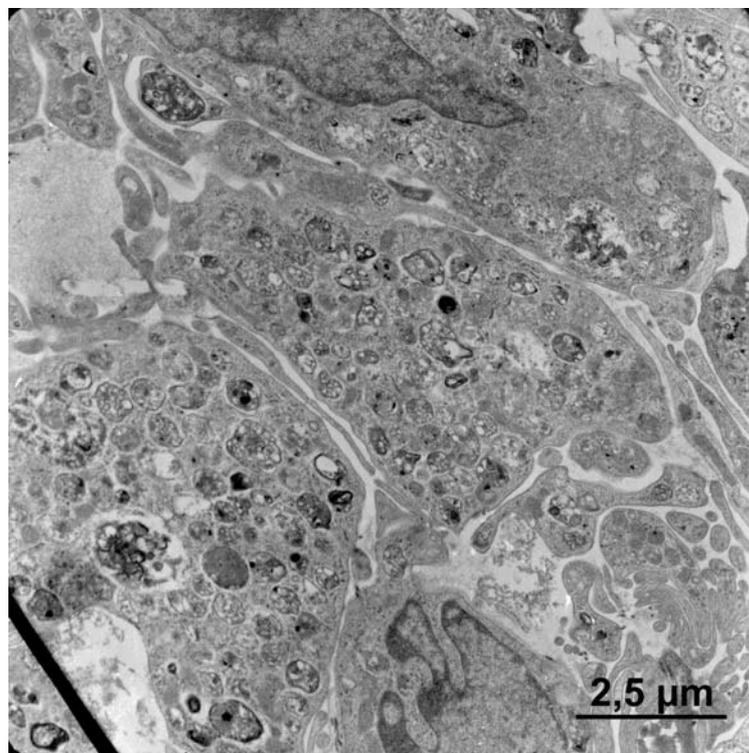


Abbildung 3.18: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung einer 14 Tage alten gemischten Mikromassenkultur

Abb. 3.18 zeigt eine gemischte Mikromassenkultur nach 14 Tagen. Im Inneren der einzelnen Zellen ist viel rauhes endoplasmatisches Retikulum (RER) sichtbar, im Zellkern befindet sich viel Euchromatin, ein Zeichen für aktive Zellen, und nur sehr wenig Heterochromatin. Zwischen den Zellen befinden sich viele Zellfortsätze.

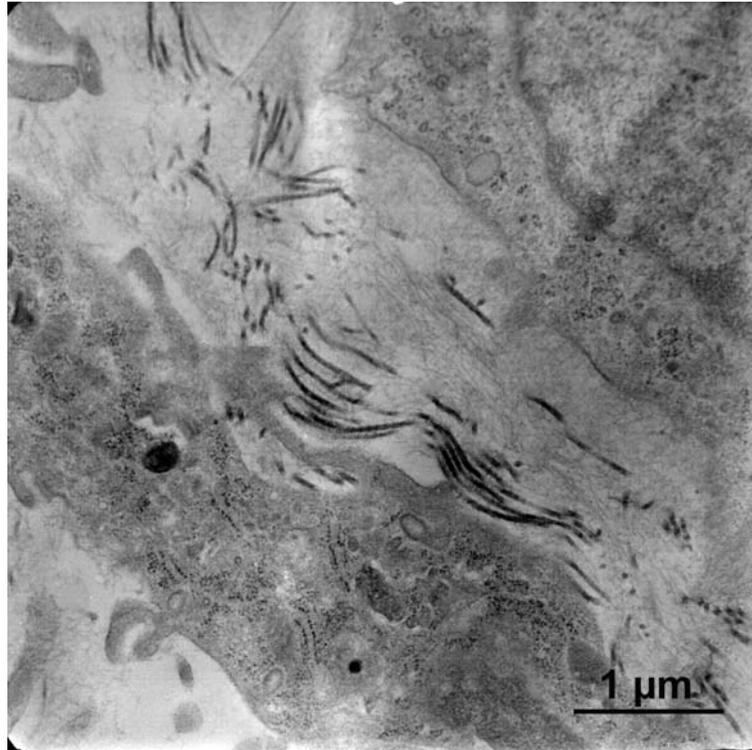


Abbildung 3.19: Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung einer 21 Tage alten gemischten Mikromassenkultur, Kollagenfasern

Nach 21 Tagen Kulturzeit zeigt das transmissionselektronenmikroskopische Bild den Interzellularraum einer gemischten Mikromassenkultur kultiviert mit MM1-Medium (MM0 + β -Glycerophosphat + Ascorbinsäure) aus osteoblastenähnlichen Zellen und Endothelzellen (Abb.3.19) mit längs und quer angeschnittenen Kollagenfibrillen deren Durchmesser 40-50 nm beträgt.

3.2.4 Mikromassenkulturen aus Osteoblasten mit Endothelzell-Ummantelung

3.2.4.1 Immunhistochemische Auswertung

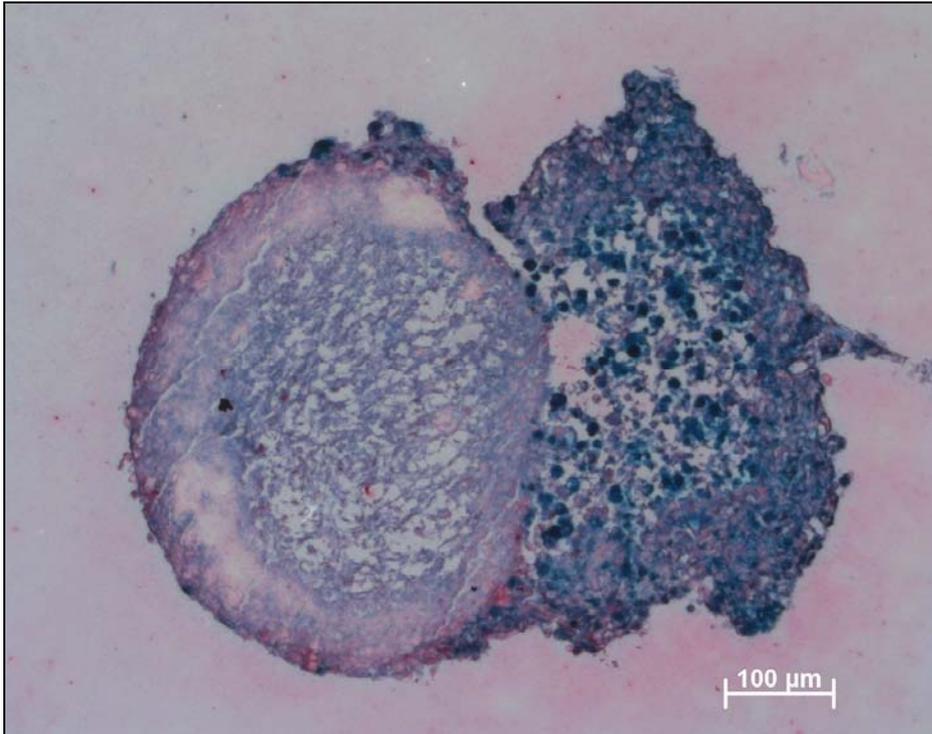


Abbildung 3.20: Übersicht einer Mikromassenkultur aus Osteoblasten und zeitversetzt hinzugegebenen Endothelzellen

Zeitpunkt 3 Tage nach Zugabe der Endothelzellen, immunhistochemische Doppelfärbung mit Osteonectin (rot) und von-Willebrand-Faktor (grün).

Abb. 3.20 zeigt eine Mikromassenkultur aus Osteoblasten, zu der nach einer Woche Kulturzeit Endothelzellen hinzugegeben wurden. Die kugelig bis sphärische Formation aus in der Abb. rötlich dargestellten Osteoblasten ist in den äußeren Bereichen mit grünen Endothelzellen ummantelt. Weitere Endothelzellen haben sich zu einem Konglomerat zusammengelagert und sitzen der Formation haubenartig auf.

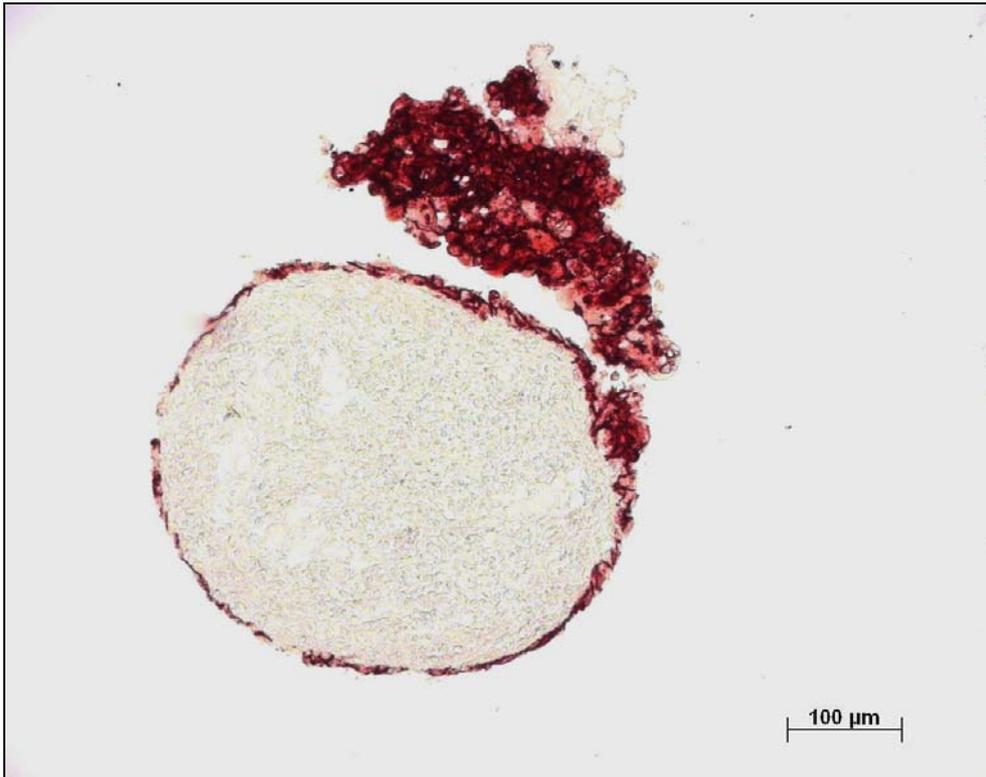


Abbildung 3.21: Endothelzell-ummantelte Osteoblastenmikromassenkultur

Immunhistochemische Färbung mit dem Endothelzellmarker CD-31 (rot), Zeitpunkt 3 Tage nach Zugabe der Endothelzellen

Auch Abb. 3.21 unterstreicht nochmals das zu Abb. 3.20 Beschriebene: hier handelt es sich um eine Probe, die mit dem immunhistochemischen Endothelzellmarker CD-31 gefärbt wurde und zeigt ebenso eine endothelzell-ummantelte Osteoblastenmikromassenkultur zum Zeitpunkt 3 Tage nach Zugabe der Endothelzellen. Die Osteoblasten wurden eine Woche vor Endothelzellzugabe in einem well zu einer sphärischen Formation kultiviert.

Es zeigt sich eine nahezu kugelförmige, sphärische, nicht angefärbte Osteoblastenformation mit einem Randsaum aus einlagigen Endothelzellen (mit Hilfe von CD-31 rot gefärbt). Auch hier ist ersichtlich, daß die Osteoblastenkultur rundherum mit Endothelzellen besetzt ist und weitere Endothelzellen konglomeriert in unmittelbarer Nachbarschaft zur Kultur liegen, dieser aufzusitzen scheinen. Eine Durchmischung der verschiedenen Zellarten ist nicht zu beobachten.

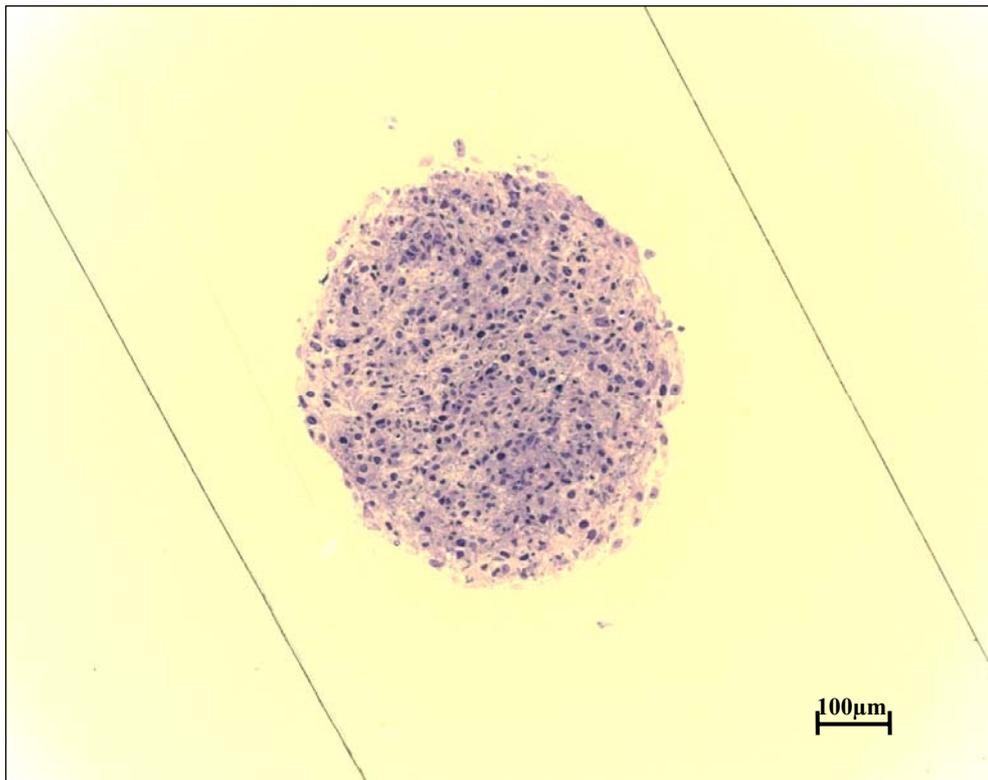


Abbildung 3.22: Übersicht durch die Mitte eines Semidünnschnittes einer endothelzell-ummantelten Mikromassenkultur 7 Tage nach Endothelzell-Zugabe

Die Aufnahme durch die Mitte eines Semidünnschnittes zeigt eine mit Endothelzellen ummantelte Mikromassenkultur nach insgesamt zweiwöchiger Kulturdauer (Abb. 3.22). Das hier sichtbare Zellbild ist sehr homogen bezüglich der Durchmischung der beiden Zellarten. Es sind zwei unterschiedliche Zellformen zu sehen. Runde Zellen im Innenbereich der Mikrokultur und flache Zellen im Randbereich.

4 DISKUSSION

Für das Knochen *Tissue Engineering* kleiner oder mittlerer Defekte wird heute in der Regel frisch entnommenes autologes Knochenmaterial oder ein degradierbares Knochenersatzmaterial verwendet, das gegebenenfalls mit Zytokinen wie z. B. VEGF [Gerber et al., 1999; Gerber et al., 2000] oder mit ex vivo proliferierten Zellen kombiniert wird. Hierbei kommen meist Zellen eines Typs, in der Regel autologe Osteoblasten, zum Einsatz. Einen möglichen Alternativansatz stellt die gleichzeitige Verwendung unterschiedlicher Zelltypen in Form von Kokulturen dar, bei der die natürliche Interaktion der jeweiligen Zelltypen genutzt werden kann. Da Angiogenese und Osteogenese sich gegenseitig bedingen und beeinflussen sind Osteoblasten und Endothelzellen viel versprechende Kandidaten für eine solche Kokultur. Die vorliegende Arbeit untersucht daher das Potenzial von trägerfrei gebildeten Mikrogeweben aus Osteoblasten in Kombination mit Endothelzellen und verwendet bovine osteoblastenähnliche Zellen und HUVECs.

4.1 Zur Technik der Kokultivierung von Osteoblasten und Endothelzellen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass beide Zelltypen zusammen vital und ohne Verlust charakteristischer Eigenschaften kultiviert werden können.

Da es eine Zielsetzung dieser Arbeit war, Möglichkeiten für das autologe *Tissue Engineering* zu untersuchen, werden ausschließlich primäre Zellen verwendet. Während die Endothelzellen aus den humanen Nabelschnüren ausreichend gewonnen werden können, steht humanes Spendermaterial zur Gewinnung von Osteoblasten nicht in geeignetem Umfang zur Verfügung. Deshalb erfolgt die Entnahme der Osteoblasten aus bovinen Metacarpalia und die Gewinnung der Endothelzellen aus humanen Nabelschnüren.

Sowohl die primäre Gewinnung der Endothelzellen aus den humanen Nabelschnüren als auch die Kälberbeinpräparation erfolgt nach bewährten Protokollen und ist problemlos. Auf der Grundlage von Boyde und Jones [1977] und Hartig [2000], werden die aus dem Periost ausgewachsenen osteoblastenähnlichen Zellen in der Monolage kultiviert. Sie zeigen während der Kultivierung auf dem Polystyrolboden der Kulturschalen eine gute Proliferation und Differenzierung. Auch eine *in vitro* Monolage-Kultivierung der Endothelzellen ist möglich.

In der histologischen Auswertung zeigt sich, dass Differenzierung und Proliferation der osteoblastenähnlichen Zellen und Endothelzellen in den Mikromassenkulturen erhalten bleiben.

Die Endothelzellen sind in den 2D- wie auch in den 3D-Kulturen in ihrer typischen Morphologie als homogene, nah aneinander liegende, große und polygonale Zellen mit einem zentral gelegenen Zellkern und undeutlichen Zellgrenzen zu erkennen. Sie zeigen damit einen charakteristischen Phänotyp, der auch von Jaffe et al. [1973] beschrieben wurde. Ihre Größe beträgt in den hier zugrunde liegenden Untersuchungen 15-18µm, die Osteoblasten dieser Arbeit sind damit etwas kleiner als in den Untersuchungen von Jaffe et al.

Prinzipiell werden beim *Tissue Engineering* große Zellzahlen und somit verwertbare Zellverbände bzw. Mikrogewebe angestrebt.

Für das *Tissue Engineering* spielt auch die Relation von Osteoblasten zu Endothelzellen bezüglich der Zellzahl eine wichtige Rolle.

Limitierend für die Größe der Zellverbände ist die Stoffwechsellage im Innern der dreidimensionalen Mikrogewebe. Übersteigen Kulturen eine gewisse Größe, verschlechtert sich zunehmend die Stoffwechselsituation im Zentrum. Im Innern liegende Zellen werden nur unzureichend mit Nährstoffen versorgt, gleichzeitig erschwert sich der Abtransport von Stoffwechselendprodukten und apoptotischem Zellmaterial.

In den hier zugrunde liegenden Untersuchungen ist die Gesamtzellzahl so gewählt, dass eine makroskopische Sichtbarkeit und Identifikation der Mikromassenkulturen möglich ist. Dies soll die Handhabung der entstandenen Spheres bei der Explantation aus dem Nährmedium sowie das Handling bei Fixierung und Auswertung erleichtern. Die untersuchten sphäroiden Mikrogewebe haben einen Durchmesser von 200-400µm.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen morphologisch gut strukturierte Spheres, was auf eine ausgewogene Größe und ein gutes Verhältnis der Zellzahlen von Osteoblasten zu Endothelzellen schließen lässt.

Es lässt sich beobachten, dass beide Zellarten in der Kokultur sowohl bei den 2D-als auch bei den 3D-Kokulturen weiter proliferieren und differenzieren.

Im Rahmen der 2D-Untersuchungen werden Osteoblasten und Endothelzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zusammen kultiviert. In einem ersten Versuchsaufbau werden Osteoblasten ausgesiedelt und wachsen gelassen. Zu den in Monolagen ausgewachsenen Osteoblasten werden nach einer Woche Endothelzellen zugegeben. Eine zweite Untersuchung enthält Kokultur-Monolagen aus simultan gemischten und ausgesiedelten Osteoblasten und Endothelzellen. Morphologisch zeigt sich in den Ergebnissen ein sehr unterschiedliches Bild. Eine prävasculäre Lumenbildung kann nicht beobachtet werden.

Ebenso gestaltet sich der Versuchsaufbau bei den dreidimensionalen Kokulturen. In der einen Versuchsreihe werden zunächst Osteoblasten ausgesiedelt und zu Sphäroiden wachsen gelassen. Eine Woche später werden Endothelzellen zugegeben und es entstehen sogenannte „coated spheres“. Eine zweite Versuchsreihe enthält ein Gemisch aus Osteoblasten und Endothelzellen, die simultan in nicht-adhärente wells pipettiert werden. Hier bilden sich durchmischte kugelige Mikrogewebe. Diese Simultan-Kokulturen zeigen strukturelle Anzeichen einer Lumenbildung der Endothelzellen in verschiedenen Bereichen der Kultur.

4.2 Engineering von dreidimensionalen Kokulturen ohne Verwendung von Biomaterialien

Die Herstellung von kombinierten Osteoblasten- und Endothelzellkulturen ohne Matrix oder Trägermaterial sowohl in den Monolayer-Kulturen als auch bei der Kultivierung als Spheres und der Verzicht auf die Zugabe von Wachstumsfaktoren ist einer der Hauptansätze dieser Arbeit.

Während andere Arbeitsgruppen [Stahl et al., 2005; Wenger et al., 2004; Fuchs et al., 2006; Sieminski et al., 2005] Mikrogewebe auf Trägermaterialien wie Kollagen, Fibrinmembran, etc. züchten, wird in der vorliegenden Arbeit auf Trägermaterialien verzichtet. Der Verzicht auf Trägermaterialien soll in einer späteren *in vivo*-Anwendung der osteoinduktiven Konstrukte den Vorteil bringen, dass die Gefahr einer zusätzlichen Fremdkörperreaktion minimiert wird und sich eine gewisse Langzeitstabilität erreichen lässt, indem auf Gerüste verzichtet wird, die der Resorption unterliegen. In dieser Arbeit werden Mikromassenkulturen engineered, die aus immer gleichen reproduzierbaren Zellzahlen hergestellt werden.

Es werden dreidimensionale Kulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen hergestellt. Als Medium findet ein für Endothelzellen spezifisches Medium Verwendung.

Anderer und Libera [2002] beschreiben ein Herstellungsverfahren für knorpelähnliches Gewebe im Sinne von 3D-Mikromassen-Zellkulturen aus humanen Chondrozyten ohne Trägermaterialien und ohne die Verwendung von Wachstumsfaktoren. Als Medium verwenden sie ein Medium mit Zusatz eines humanen Serums. Nach Anderer und Libera führt der Ersatz des Humanserums durch fetales Kälberserum zur Destruktion des Inneren der Mikromassenkultur, was ein Hinweis auf Antigenität sein könnte. Dieses kann in den hier vorliegenden Untersuchungen nicht beobachtet werden. Es findet nur fetales Kälberserum Anwendung.

4.2.1 Angiogenese in vitro

Die Kokultivierung von Fibroblasten und Endothelzellen als angiogenetisches System wurde schon vor einigen Jahren vorgestellt. Dabei handelt es sich um *in vitro* Monolagekulturen aus humanen Fibroblasten und HUVECs, bei denen die Bildung tubulärer Strukturen zu erkennen ist [Leoni et al., 2006]. In nachfolgenden Untersuchungen wurde ein dreidimensionales Kokultivierungssystem mit Endothelzellen und Fibroblasten entwickelt, um die Auswirkung nichtendothelialer Zellen auf die Funktion der Endothelzellen zu untersuchen [Wenger et al., 2005].

Korff et al. machen Untersuchungen mit Kokulturen aus Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur, welche sie ähnlich den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit in nicht-adhärenenten, runden 96-well-Platten kultivieren um gemischte Endothelzell-/glatte Muskelzell-Sphäroide zu formieren [Korff et al., 2001].

Eine neue Studie von Fuchs et al. [Fuchs et al., 2007] zeigt, dass aus den Wänden peripherer humaner Blutgefäße ausgewachsene Endothelzellen in 2D- und 3D-Kokulturen mit primären humanen Osteoblasten hoch organisierte mikrogefäßähnliche Strukturen bilden können. In ihren Versuchen siedelten Fuchs et al. zunächst Osteoblasten aus und gaben nach drei Tagen ausgewachsene Endothelzellen oder HUVECs hinzu, zunächst Endothelzellen und später Osteoblasten oder beide Zelltypen simultan. Analysiert wurden diese Ko-Kulturen nach einer Woche mittels der Immunfluoreszenzmarker vWF und CD31 für Endothelzellen.

4.3 Das Potenzial der Endothelzell-/Osteoblasten-Kokultur für das Bone Tissue Engineering

Bei Osteoblasten und Endothelzellen handelt es sich um Zellarten, die an der Ausbildung oder Regeneration vitalen Knochens massgeblich beteiligt sind.

In den hier zugrunde liegenden Untersuchungen wurden 2-D-Monolagekultur-Systeme und 3D-Mikromassenkultur-Systeme verglichen. Die Untersuchungen der 2D-Monolagenkulturen zielen hierbei auf eine spätere *in vivo*-Verwendung der Zellen in Kombination mit unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien ab [Handschel et al., 2002]. Die in Monolagekulturen gezüchteten Kokulturen müssen vor ihrer Einbringung in den Körper zunächst abgelöst und die Osteoblasten und Endothelzellen in Suspension gebracht werden. Andererseits ist denkbar, die Zellsuspension direkt in die Defekte einzubringen, wie beispielsweise bei der Regeneration von Knorpelgewebe häufig verfahren wird.

4.4 2D-Kultur

Im Gegensatz zu der Zellmorphologie der Einzelkulturen zeigen die histologischen Untersuchungen gemischter 2D-Kulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen sehr unterschiedliche Ergebnisse, wobei der Zeitpunkt des Zusammenbringens der beiden Zellarten für das phänotypische Erscheinungsbild verantwortlich sein dürfte. Bei synchroner Aussiedelung beider Zellarten in gemeinsame Kulturgefäße zeigt sich eine deutliche Clusterbildung der osteoblastenähnlichen Zellen und radiäre Anordnung der Endothelzellen zwischen den Clustern. Die Osteoblastenkulturen zu denen erst zwei Tage später Endothelzellen hinzugegeben werden, zeigen ein anderes Bild. Hier haben sich die Osteoblasten auf der Unterlage ausgebreitet und die Endothelzellen schwimmen in zweiter Reihe oder Lage.

Vitales autologes Knochenmaterial gilt heute häufig noch als "Goldstandard" für die Versorgung von Knochendefekten. Bei guter Präparation sind die besonderen Eigenschaften des autologen Knochens, insbesondere auch durch seine vitalen Zellen wie zum Beispiel Osteoblasten und Endothelzellen bestimmt. Nachteile bei der Verwendung von autologem Knochenmaterial ergeben sich bei der Gewinnung durch die Morbidität an der Entnahmestelle [Raghoobar et al., 2007; Booij et al., 2005]. Darüber hinaus ist der Abbau von autologem Knochen in vivo nur bedingt, insbesondere durch die Größe der eingebrachten Knochengranula, einstellbar. Gerade bei kleineren Defekten kann es daher auch schnell zu einer verzögerten Knochenregeneration durch noch nicht abgebautes eingebrachtes Knochenmaterial kommen. Resorption des eingebrachten Materials und Knochenregeneration sollten simultan verlaufen.

Alternativ zum autologen Knochen kommen alloplastische Materialien wie zum Beispiel Hydroxylapatite, Calciumphosphate oder Komposite in der rekonstruktiven craniofacialen Chirurgie zum Einsatz. Die Standzeit bei insbesondere Kompositmaterial ist dabei gut einstellbar [Mai et al., 2008]. Nachteilig bei der Verwendung von Knochenersatzmaterialien sind Faktoren wie die im Laufe der Zeit entstehenden Abbauprodukte. Das Einbringen von Knochenersatzmaterial ist immer artifiziell und birgt eine Infektionsgefahr, da diese Materialien vom Körper als Fremdmaterial erkannt werden und Abstoßungsreaktionen nicht ausgeschlossen sind.

Biologische Komplikationen wie z.B. Entzündungen und ungewollte Immunreaktionen des Gewebes auf eingebrachtes Fremdmaterial sind möglich.

Eine gute Biokompatibilität und Resorbierbarkeit wird für Knochenersatzmaterialien als zwingend nötig erachtet.

4.5 3D-Mikromassenkulturen

Die im Rahmen dieser Arbeit kultivierten Mikromassenkulturen aus Osteoblasten und Endothelzellen bilden kleine gewebeartige Strukturen die in sich abgeschlossen sind. Diese Mikrogewebe können direkt in die Knochendefekte eingebracht werden, ein Biomaterial als Gerüstsubstanz ist hierfür nicht erforderlich. Damit entfallen nicht nur die schon angesprochenen Nachteile wie z.B. die Degradationszeit von Biomaterial. Darüberhinaus zeigen die Ergebnisse, dass die dreidimensionalen Mikromassenkulturen eine deutlich bessere Zelldifferenzierung aufweisen und so der *in vivo*-Situation des Knochens mehr entsprechen als 2D-Kulturen.

4.5.1 Kulturtechniken und Bioreaktoren

Bei Aussiedelung der beiden Zelltypen zusammen in ein geeignetes mit Agarose beschichtetes Bioreaktorsystem, findet schon bald eine Aggregation der Zellen zu rundlichen Mikromassenkulturen statt. Die Agarose verhindert eine Adhäsion der Zellen auf dem Boden der Kulturgefäße und eignet sich zur Herstellung von Mikromassenkulturen. Sowohl Mikromassenkulturen aus nur einer Zellart als auch dreidimensionale Co-Spheres aus osteoblastenähnlichen Zellen und Endothelzellen lassen sich auf einer Agarose-beschichteten Unterlage kultivieren. Die hier engineernten gemischten Mikromassenkulturen sind prinzipiell reproduzierbar bezüglich Größe und Zelldifferenzierung. Sie haben einen Durchmesser von ungefähr 300 µm, eine sphärische Form und sind aufgrund ihres Durchmessers makroskopisch sichtbar. Die Sichtbarkeit mit dem bloßen Auge erleichtert die Entnahme der Spheres aus den

Kulturgefäßen. Diese erleichterte Handhabung ist für die Weiterverarbeitung und die zukünftliche Verwendung *in vivo* von Vorteil.

4.5.2 „Cell Tracking“-Vitale Zellverfolgung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Osteoblasten wurden mit dem Fluoreszenzmarker CM-DiI und die Endothelzellen mit Sp-DiOC18 markiert, um in den direkten Kokulturen zwischen beiden Zellarten differenzieren zu können. Beide Farbstoffe haben die Zellen zuverlässig über die gesamte Versuchsdauer markiert. Für CM-DiI liegt die Anregung bei 553 nm (grünes Licht) und die Emission bei 570 nm (oranges Licht). Sp-DiOC18 wird bei 488 nm (blaues Licht) angeregt und die Emission liegt bei 530 nm (grünes Licht). Es zeigte sich, dass die CM-DiI gefärbten Osteoblasten erwartungsgemäß nur bei Anregung mit grünem Licht (553 nm) orange leuchteten (Abb.4) und bei Anregung mit blauem Licht der Wellenlänge 488 nm nicht sichtbar waren. Die SP-DiOC18 gefärbten Endothelzellen hingegen fluoreszierten bei verschiedenen Wellenlängen. Das spricht dafür, dass die Anregungsbereiche mit Licht für die beiden hier verwandten Fluoreszenzfarbstoffe überlappen und somit eine Anwendung beider Farbstoffe innerhalb einer Probe nicht optimal ist. Die beiden verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe CM-DiI und Sp-DiOC18 lassen sich somit nicht gut in Kombination verwenden, um zwei Zelltypen innerhalb einer Zellkulturschale über einen bestimmten Zeitraum zu verfolgen. Für die Anwendung zweier Fluoreszenzmarker müssten weiterreichende Untersuchungen erfolgen. Bei der Vielzahl der auf dem Markt erhältlichen Farbstoffe könnte es Marker geben, die besser zusammen anzuwenden sind und deren Anregungsbereiche mit unterschiedlichen Wellenlängen weit genug auseinander liegen um überlappende Wellenlängenbereiche zu vermeiden.

4.5.3 Osteospheres mit sekundärer Anlagerung von Endothelzellen

Bei Aussiedelung von osteoblastenähnlichen Zellen in ein mit Agarose beschichtetes Kulturgefäß und Zugabe von Endothelzellen eine Woche später, ist eine einschichtige Anlagerung CD-31-positiver Endothelzellen um die vorher gebildeten Osteospheres (Abb.3.21) zu beobachten. Die Endothelzellen, die auf der sphärischen Oberfläche der Osteospheres keinen Platz finden, lagern sich zu einem Konglomerat zusammen und sitzen der Mikromassenkultur haubenförmig auf. Es zeigt sich sehr deutlich in der Anfärbung der Osteoblasten-ähnlichen Zellen mittels Osteonectin (rot) und der Endothelzellen mit von-Willebrand-Faktor (grün), dass sich die Zellen zu einem Kern aus osteoblastenähnlichen Zellen mit einer äußeren Anlagerung von Endothelzellen organisieren (Abb.3.20). Eine Durchmischung der beiden Zelltypen oder Einwandern von Endothelzellen in das Innere der Osteospheres ist nicht zu beobachten. Ein Grund für die nicht zu beobachtende Durchmischung der beiden Zellarten könnte sein, dass die epithelartige Abschlusszellschicht der Osteoblasten eine Barriere gegen das Eindringen von Endothelzellen bildet. Sowohl Osteoblasten als auch Endothelzellen gehen bevorzugt interzelluläre Kontakte zur jeweils anderen Zellart ein, was die zunächst stattfindende mantelförmige einschichtige Anlagerung der Endothelzellen um die Osteospheres erklären könnte. Darüberhinaus versuchen die übrigen Endothelzellen wahrscheinlich aus thermodynamischen Gründen, eine energieeffiziente Formation zu bilden, was zur beobachteten haubenförmigen Anlagerung eines Konglomerats aus Endothelzellen führt.

Ähnliche Beobachtungen beschreiben Stahl et al. [2004] in Untersuchungen mit gemischten Kokulturen aus humanen Osteoblasten und humanen Endothelzellen. Allerdings handelt es sich bei ihnen um simultan ausgesiedelte Zellen. Die bei Stahl et al. verwendeten Marker CD-31 für Endothelzellen und alkalische Phosphatase für Osteoblasten sind in einem Zeitraum von vier Tagen in unterschiedlichen Bereichen der sphäroiden Kulturen zu sehen. Im Gegensatz zu Tag 1, an dem CD-31-positive Endothelzellen sowohl im Zentrum als auch in der Peripherie der Kultur zu finden sind, zeigt sich nach 4 Tagen eine ringförmige Struktur aus Endothelzellen im Außenbereich der Kokultur. Der Innenbereich hingegen ist negativ für CD-31 und enthält demnach keine Endothelzellen. Alkalische Phosphatase-markierte Osteoblasten sind zentral in der

Kokultur lokalisiert, wohingegen die Randbereiche alkalische-Phosphatase-negativ sind. Es zeigt sich also eine Entmischung der Zellen nach anfänglich simultaner Aussiedelung.

4.5.4 Synchron gemischte Mikromassenkulturen aus osteoblastenähnlichen Zellen und Endothelzellen

Die in der vorliegenden Arbeit engineernten 3D-Kokulturen zeitgleich ausgesiedelter Endothelzellen und osteoblastenähnlichen Zellen zeigen eine Durchmischung der Zellen. Innerhalb der kompakten Osteoblastenareale befinden sich kleine Endothelzellkonglomerate, welche durch ringförmige Anordnung ein Lumen bilden (Abb.3.13). Diese Lumina können möglicherweise als erste Anzeichen für die Ausbildung mikrovaskulärer Strukturen interpretiert werden. Daraus lässt sich folgern, dass bei synchroner Aussiedelung osteoblastenähnlicher Zellen und Endothelzellen Spheres entstehen, in denen erste Anzeichen einer Bildung von Mikro-Neovesseln zu erkennen sind.

Das angiogene Potential von Endothelzellen in der Kokultivierung mit einer zweiten Zellart wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Wenger et al. [2005] entwickelten Kokulturen aus HUVECs und humanen primären Fibroblasten. Dabei änderten die dreidimensionalen Kulturen ihr morphologisches Erscheinungsbild mit andauernder Kulturdauer. So waren die Endothelzellen in der Kokultur am Tag 1 gleichmäßig in der Kultur verteilt, nach 3 Tagen Kokultivierung waren CD31-positive HUVECs im Zentrum der Kultur lokalisiert, während die Peripherie der Cospheres für CD31 negativ war. Es war also eine Organisation der Zellen zu sehen, mit Lokalisation der HUVECS im Inneren und peripherer Lokalisation der Fibroblasten.

Auch Wenger et al. [2004] züchteten dreidimensionale Endothel-Sphäroide, zu denen sie zur Bildung heterogener Co-Sphäroide humane Osteoblasten zugaben. Diese Co-Sphäroide wurden in eine Kollagenmatrix inkorporiert um ein Aussprossen der Endothelzellen und Bildung gefäßähnlicher tubulärer Strukturen zu induzieren. Allerdings wurde beobachtet, dass die Fähigkeit der HUVEC-Sphäroide, gefäßähnliche

Strukturen unter Zugabe von VEGF und BFGF zu bilden, durch die Anwesenheit der humanen Osteoblasten unterdrückt wurde. Zell-Zell-Interaktionen verhindern die Formation von „Neovesseln“ [Wenger et al., 2004]. Auch Stahl et al. [2005] machten die Erfahrung, dass in eine Kollagenmatrix eingebrachte Endothelzell-Mikromassenkulturen ein gewisses angiogenes Potential aufwiesen, welches durch Osteoblasten unterdrückt werde. Diese Hemmung, welche auf Zell-Zell-Interaktionen beruht, scheint charakteristisch für reife Endothelzellen zu sein, die aus Gefäßen oder aus Hautgeweben isoliert wurden. Die in dieser Arbeit verwandten Zellen sind osteoblastenähnliche Zellen und daher eher als Vorläuferzellen anzusehen. Im Gegensatz zur Hemmung reifer Endothelzellen durch Osteoblasten wird die angiogene Potenz von endothelialen Vorläuferzellen, die aus peripherem Blut oder Knochenmark stammen können, nicht durch die Anwesenheit von Osteoblasten beeinflusst oder gehemmt. Diese Tatsache macht endotheliale Vorläuferzellen zu einer für das Knochen Tissue Engineering erfolgsversprechenden Zellart.

Fuchs et al. [2007] wiederum beschreiben aufgrund ihrer Untersuchungen zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen teilweise gegenteilige Beobachtungen. Sie untersuchten 2D- und 3D-Kokulturen aus der Osteoblastenzelllinie MG 63 oder primären humanen Osteoblasten auf der einen Seite und aus peripheren Gefäßen ausgewachsenen Endothelzellen oder HUVECs auf der anderen Seite. Ihre Ergebnisse zeigten, dass ausgewachsene Endothelzellen in Kokultivierung mit den Osteoblasten oder auch mit primären humanen Osteoblasten in der Lage sind, im Gegensatz zu HUVECs hoch organisierte mikrotubuläre, prävasculäre Strukturen zu bilden [Fuchs et al., 2007]. In der hier vorliegenden Arbeit ist dieses Phänomen der prävasculären Strukturbildung auch bei den HUVECs zu beobachten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei der *ex vivo* Kokultivierung von HUVECs und osteoblastenähnlichen Zellen Lumina als Anzeichen primitiver prävasculärer Strukturen entstehen. Von einer Hemmung der Endothelzellen durch Osteoblasten kann nicht berichtet werden.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Endothelzellen sind wichtig für die Entstehung von Osteoblasten und damit auch für Angio- und Osteogenese [Schmid et al., 1997]. Eine Neovaskularisation ist im Bereich des Knochen Tissue Engineerings ein entscheidendes Kriterium, da die Implantation größerer Transplantate ohne eine suffiziente Vaskularisierung häufig im hypoxischen Zelltod im Inneren der Transplantate resultiert. Kombinationen von gefäßbildenden Endothelzellen in Ergänzung zu den für die Knochenbildung notwendigen Osteoblasten erscheinen geeignet, dieses Problem zu lösen. Die Endothelzellen sollen dabei die Versorgung des Gewebes gewährleisten.

Diese Arbeit unterstreicht, dass es *ex vivo* möglich ist, Osteoblasten und Endothelzellen zu kombinieren. Dabei ist es gelungen, Osteoblasten und Endothelzellen sowohl in Monolagen zu kokultivieren als auch dreidimensionale Mikromassenkulturen ohne Verwendung von Trägermaterialien herzustellen. In den Kokulturen ist im Laufe der Kulturzeit durch Einbeziehung der Endothelzellen eine Ausbildung prävasculärer Strukturen zu erkennen. Die Osteoblasten bilden unter diesen Bedingungen extrazelluläre Matrixstruktur.

Der hier beschriebene Ansatz der Osteoblasten-/Endothelzell-Kokulturen hat ein großes Potential für das Knochen Tissue Engineering. Dennoch müssen vor der Anwendung am Patienten bei der man zum Beispiel Zellen entnimmt, sie *ex vivo* proliferiert, ein Vorläufergewebe engineeriert und sie dann zur Geweberekonstruktion replantiert, eine Reihe weiterer Arbeiten folgen. *Ex vivo* sind vor allem noch Fragen offen bezüglich Eigenblutkulturen, Kulturdauer und Größe der Spheres, während *in vivo* systematische tierexperimentelle Studien noch vollständig fehlen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Literaturverzeichnis

1. **Akiyama M, Nonomura H, Kamil SH, Ignatz RA** (2006) Periosteal cell pellet culture system: a new technique for bone engineering. *Cell Transplant* 15(6):521-32
2. **Anderer U, Libera J** (2002) In vitro engineering of human autogenous cartilage. *J Bone Miner Res. Aug;17(8):1420-9*
3. **Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al.** (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964
4. **Bishop ET, Bell GT, Bloor S, Broom IJ, Hendry NF, Wheatley DN** (1999) An in vitro model of angiogenesis: basic features. *Angiogenesis* 3:335-344
5. **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):
6. **Carano R A, Filvaroff S, Guillet S, Zlot M, Bao M, Ingle G, Steinmetz H, Hoeffel J, Bunting S, Ross J, Carano L, Powell-Braxton L, Wagner G F, Eckert R** (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov.Today* 8:980-989
7. **Choong CS, Hutmacher DW, Triffitt JT** (2006) Co-Culture of bone marrow fibroblasts and endothelial cells on modified polycaprolactone substrates for enhanced potentials in bone tissue engineering. *Tissue Eng* 12:2521
8. **Donovan D, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE** (2001) Comparison of three in vitro human "angiogenesis" assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis* 4:113-121

9. **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
10. **Fuchs S, Hofmann A, Kirkpatrick CJ** (2007) Mikrovessel-like Structures from Outgrowth Endothelial Cells from Human Peripheral Blood in 2-Dimensional and 3-Dimensional Co-Cultures with Osteoblastic Lineage Cells. *Tissue Engineering* 13(10):2577-88
11. **Gerber HP, Thienu 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
12. **Gerber HP, Ferrara, N.** (2000) Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 10(5):223-8
13. **Gimbrone MA, Cotran RS, Folkman J** (1974) Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 60:673-684
14. **Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE et al.** (2003) Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res* 93:1023
15. **Handschel et al.** (2002) TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model *Biomater.* 23:1689-1695
16. **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. *Eur Biophys J* 29:499-506
17. **Hofman A, Ritz U, Ackermann A, Kuntz M, Reimann S, Schwartz C** 3D-Kokulturmodelle für Tissue Engineering des Knochengewebes

- 18. Hur J, Yoon CH, Kim HS et al.** (2004) Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascuogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:288
- 19. Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.J.** (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52:2745
- 20. Jarrahy R, Huang W, Rudkin GH, Lee JM, Ishida K, Berry MD, Sukkarieh M, Wu BM, Yamaguchi DT, Miller TA** (2005) Osteogenic differentiation is inhibited and angiogenic expression is enhanced in MC3T3-E1 cells cultured on three-dimensional scaffolds. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:408-414
- 21. Jones SJ, Boyde A** (1977) The migration of osteoblasts. *Cell Tissue Res* 184:179-93
- 22. Kirmeier R, Payer M, Wehrsuetz M, Jakse N, Platzer S, Lorenzoni M.** (2008) Evaluation of three-dimensional changes after sinus floor augmentation with different grafting materials. *Clin Oral Implants Res.* 19(4): 366-72
- 23. 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
- 24. Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G, Augustin HG** (2001) Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J* 15:447-457
- 25. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP** (2000) Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105:71

- 26. Mai R, Reinstorf A, Pilling E, Hlawitschka M, Jung R, Gelinsky M, Schneider MD, Loukota R** (2008) Histologic study of incorporation and resorption of a bone cement-collagen composite: an in vivo study in the minipig. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105:e9-e14
- 27. Nor JE, Peters MC, Christensen JB et al.** (2001) Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest* 81:453
- 28. Ochoa ER, Vacanti JP** (2002) An overview of the pathology and approaches to tissue engineering. *Ann. NY Acad. Sci.* 979:10-26
- 29. Perets A, Baruch Y, Weisbuch F et al.** (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
- 30. Peters MC, Polverini PJ, Mooney DJ** (2002) Engineering vascular networks in porous polymer matrices. *J. Biomed. Mat. Res.* 60:668-678
- 31. 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
- 32. 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
- 33. Richardson KC, Jarett L, Finke EH** (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* 35:313
- 34. Schmid J, Wallkamm B, Hammerle CH, et al.** (1997) The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res* 8:244

- 35. Schwartz MA** (1997) Integrins, oncogenes, and anchorage independence. *J Cell Biol.* 139:575-578
- 36. Stahl A, Wenger A, Weber H, Stark GB, Augustin HG, Finkenzeller G** (2004) Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochem Biophys Res Commun* 322(2):684-92
- 37. 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):5338-42
- 38. 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
- 39. Wenger A, Stahl A, Weber H, Finkenzeller G, Augustin HG, Stark GB, Kneser U** (2004) Modulation of *in vitro* angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue engineering* 10(9-10):1536-47
- 40. Wenger A, Kowalewski N, Stahl A, Mehlhorn AT, Schmal H, Stark GB, Finkenzeller G** (2005) Development and Characterization of a Spheroidal Coculture Model of Endothelial Cells and Fibroblasts for Improving Angiogenesis in Tissue Engineering. *Cells Tissues Organs* 181:80-88

6 DANKSAGUNG

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Ulrich Joos möchte ich für die Unterstützung meines Promotionsvorhabens danken.

Herrn PD Dr. Hans-Peter Wiesmann danke ich für die Überlassung des Themas, seine jeder Zeit engagierte Unterstützung und für die wertvollen Anregungen.

Mein größter Dank gilt Frau Dr. Beate Lüttenberg und Frau Lydia Lammers für viele gute und wertvolle Anregungen und ihre Unterstützung bei der Anfertigung der schriftlichen Arbeit.

Ebenso danke ich den Medizinisch - Technischen Assistentinnen, Frau Magdalene Hartmann, Frau Hildegard Schütte, Frau Irene Grabiniok, Frau Anna Struk, Frau Gunda Dehmer-Möller und Frau Claudia Kemming für ihre hilfreiche Unterstützung in labortechnischen Umsetzungen.

7 LEBENSLAUF

8 ANHANG**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
α -SMA	alpha-Smooth Muscle Actin
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovines Serum Albumin
BSP	Bone Sialoprotein
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
dest.	Destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxide
FKS	Fetales Kälberserum
HGEM	High Growth Enhancement Medium
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
KCL	Kaliumchlorid

KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
OEC	Outgrowth Endothelial Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PTH	Parathormon
TBST	Tris Buffered Saline
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
UKM	Universitätsklinikum Münster
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von-Willebrand-Faktor