

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 -

Osteoblasten-Mikromassenkultur

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Brickwedde, Katharina

aus Steinfurt

2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Volker Arolt

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2007

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 -
Referent: Priv.-Doz. Dr. Hans-Peter Wiesmann
Koreferent: Prof. Dr. Dr. Ludger Figgenger

Zusammenfassung

Osteoblasten-Mikromassenkultur

Brickwedde, Katharina

Angeborene, traumatische oder entzündliche Knochenläsionen führen häufig zu einem Funktionsverlust des Gewebes. Die Gewinnung von Vitalimplantaten in vitro stellt eine Methode der Regeneration von Knochendefekten dar.

Die vorliegende Arbeit zeigt eine Möglichkeit der In-vitro-Gewinnung eines knochenähnlichen Gewebeeratzes ohne Trägermaterialien. Für den Knochen ist dafür eine vitale Struktur mit funktioneller extrazellulärer Matrix nötig.

Aus bovinem Metacarpusperiost gewonnene Osteoblasten werden zunächst als Monolayer proliferiert und anschließend in mit Agarose beschichtete Bioreaktoren zur Bildung von dreidimensionalen Zellverbänden ausgesiedelt. Zu definierten Zeitpunkten werden die Proliferation und die Differenzierung der Osteoblasten histologisch, immunhistologisch und transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Desweiteren wird die Wechselwirkung der Mikromassenkulturen mit einem natürlichen Biomaterial beobachtet.

Nach wenigen Stunden entstehen in vitro dreidimensionale, rundlich-ovale Mikromassenkulturen, die im zeitlichen Verlauf als Zellsystem stabil bleiben. Morphologisch lassen sich kubische, aktive Osteoblasten, die knochenspezifische Matrixproteine wie Osteokalzin und Osteonektin synthetisieren von flachen und eher inaktiven Osteoblasten unterscheiden. Die Osteoblasten besitzen die Fähigkeit, eine dem natürlichen Knochen ähnliche Matrix mit Ausbildung einer Kollagenstruktur als Voraussetzung einer möglichen Biomineralisation in vitro herzustellen.

Nach der Umsiedelung auf ein geeignetes Biomaterial (verwendet wird hier eine Fibrinmembran) erkennt man eine gute Verteilung der Zellen in und auf das Matrixmaterial.

Die hier entwickelten Mikromassenkulturen stellen somit eine ideale Methode für eine Knochenrekonstruktion zur Gewinnung extrakorporalen, knochenähnlichen Gewebes ohne Trägermaterialien dar. Eine ausreichende Stabilität des Transplantats auch bei größeren und komplexeren Knochendefekten bietet die Kombination der Mikromassenkulturen mit geeigneten Biomaterialien.

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2007

mit größtem Dank meinen lieben Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung	6
2.	Material und Methoden	7
2.1	Material	7
2.1.1	Antikörper / Analysesysteme	7
2.1.2	Einbettung	8
2.1.3	Eindeckelung	8
2.1.4	Färbungen	8
2.1.5	Fixierlösungen	9
2.1.6	Geräte	9
2.1.7	Kälberbeine	10
2.1.8	Kontrastierung	10
2.1.9	Laborbedarf	11
2.1.10	Lösungen und Reagenzien	11
2.1.11	Nährmedien	12
2.1.12	Osteoblasten	13
2.1.13	Puffer	13
2.2	Methoden	14
2.2.1	Übersicht	14
2.2.1.1	Periost-Entnahme	15
2.2.1.2	Gewinnung der Osteoblasten	17
2.2.1.3	Cell- Tracking mit CM-DiI	18
2.2.1.4	Aussiedeln / „Passagieren“ der Zellen	18
2.2.1.5	Herstellung komplexer dreidimensionaler Mikromassenkulturen aus Osteoblasten-ähnlichen Zellen	19
2.2.1.6	Experiment: zeitlicher Verlauf	21
2.2.1.7	Ernte der Mikromassenkulturen	21
2.2.2	Analysemethode: TEM	22
2.2.2.1	Kunsthharzeinbettung	22
2.2.2.2	Befilmen der Objektträgernetzchen	23
2.2.2.3	Ultradünnschnitte	24
2.2.2.4	Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat	24
2.2.2.5	Elektronenmikroskopische Betrachtung	25

2.2.3	Analysemethode: Immunhistochemie	25
2.2.3.1	Fixierung und Konservierung	25
2.2.3.2	Dünnschnitte.....	26
2.2.3.3	Immunhistochemie	26
2.2.4	Analysemethode: Histochemie	27
2.2.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	27
2.2.4.2	Schnellfärbung mit Methylblau-Azur II	28
2.2.5	Mikroskopie.....	28
2.2.5.1	Lichtmikroskopie.....	28
2.2.5.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	28
3.	Ergebnisse	30
3.1	Übersicht einer Mikromassenkultur	30
3.2	Übersicht und zeitlicher Verlauf der Matrixproteinbildung	36
3.3	Wechselwirkung zwischen Mikromassenkulturen und Agarose, Glas und Fibrin..	40
3.3.1	Wechselwirkung zwischen Mikromassenkulturen und der mit Agarose beschichteten Kulturschale.....	40
3.3.2	Wechselwirkung zwischen Mikromassenkulturen und Glas.....	42
3.3.3	Wechselwirkung zwischen Mikromassenkulturen und Fibrin	43
4.	Diskussion.....	44
5.	Schlußfolgerung	50
6.	Ausblicke.....	50
7.	Lebenslauf und Danksagung	51
8.	Literatur-und Abbildungsverzeichnis.....	53

1. Einleitung

Ausgeprägte knöcherne Läsionen, durch Traumata oder Tumorentfernung hervorgerufen, können die Funktion des Knochens und die Ästhetik der Patienten massiv beeinträchtigen. Da diese Defekte spontan eher bindegewebig anstatt knöchern ausheilen, finden autologe beziehungsweise xenogene oder alloplastische Knochenersatzmaterialien zur Wiederherstellung dieser Knochendefekte eine hohe Anwendung. Autologe Transplantate sind jedoch bezüglich ihrer Größe limitiert und mit einem sekundären Eingriff für den Patienten verbunden.

Die Verwendung von xenogenen oder alloplastischen Knochenersatzmaterialien ist zwar eine einfachere und patientenfreundlichere Behandlungsmethode, jedoch besteht die Gefahr einer Fremdkörperabstoßung oder Infektion des Ersatzmaterials.

Bei dem sogenannten „bone tissue engineering“ werden *in vitro* Zellen auf bzw. in einer Matrix / Biomaterial kultiviert und anschließend in den Knochendefekt transplantiert.

Die bisherigen Arbeiten geben Anlass zu der Vermutung, dass sich durch eine trägermaterialfreie *In-vitro*-Kultivierung von Zellen eine deutlich verbesserte Regeneration erzielen lässt.

Knochen ist ein Stützgewebe, das durch die Mineralisation der Grundsubstanz des Knochens (Osteoid) entsteht. Als zelluläre Elemente lassen sich neben den für die Gefäßversorgung wichtigen Endothelzellen vor allem Osteoklasten und Zellen der Osteoblastenreihe unterscheiden. Praeosteoblasten, Osteoblasten und Osteozyten entstammen dem Mesenchym und Osteoklasten sind vermutlich haematopoetischen Ursprungs [18]. Osteoblasten sezernieren die Extrazellulärmatrix, deren organischer Anteil zu ca. 90 % Kollagen Typ I enthält und zu Kollagenfibrillen aggregiert. Eine lokale Anreicherung von Calcium- und Phosphationen führt zu einer Ausfällung von nadelförmigen Hydroxylapatitkristallen, welche sich entlang der Kollagenfibrillen anordnen. Der primär so mineralisierte Knochen wird als Geflechtknochen bezeichnet; höhere funktionelle Beanspruchung führt in der Genese sekundär zu dem Umbau in den sogenannten Lamellenknochen.

Im Verlauf der Knochenbildung ändert sich die Zusammensetzung der Osteoblastensekrete. In der frühen Phase wird Osteonektin, ein nicht-kollagenes Glykoprotein sezerniert. Auf Grund seiner hohen Affinität zu Calcium und Hydroxylapatit aggregiert es *in vitro* als Modulator für Zell-Matrix-Verbindungen. Osteokalzin ist ein nicht-kollagenes Protein, das von den Osteoblasten als letztes sezerniert wird und somit einen relativ späten Knochenmarker sowie Botenstoff darstellt [6],[12]. Diese Proteinsynthese bzw. die Expression der entsprechenden Gene beschreiben die Maturation der Osteoblasten.

Die Indikation zur Transplantation von Knochengewebe und ggf. zum Einsatz von Knochenersatzmaterialien ergibt sich bei vielfältigen Erkrankungen des Skelettsystems wie z.B. schweren Traumen, Knochendefekten nach der Resektion von Tumoren oder Defekten nach Zahnextraktion. Sollten daher Knochenersatzmaterialien die biologische Wertigkeit von Knochengewebe erreichen sowie die natürlichen biologischen Prozesse der Knochenheilung imitieren können, so erscheint ein Einsatz gerechtfertigt [20].

Die *In-vitro*-Kultivierung von dreidimensionalen knochenähnlichen Gewebestrukturen bietet große Vorteile, um den *In-vivo*-Verhältnissen nachzukommen. Die zweidimensionale Kultivierung in Kulturkammern aus Kunststoff z.B. beeinflusst die Morphologie, Differenzierung und Genexpression der Zellen. Es entwickeln sich unnatürliche geometrische und mechanische Formen [19].

Zur Herstellung von dreidimensionalen Gewebeaggregaten *in vitro* werden in der Literatur häufig Verfahren beschrieben, bei denen die Zellen auf bzw. in einer Matrix (Trägermaterial) kultiviert werden. Proteine, Enzyme oder andere osteoinduktive Faktoren werden der Matrix hinzugegeben, welche die Proliferation und Differenzierung der Zellen positiv beeinflussen sollen.

Trägermaterialien stellen eine strukturelle Basis dar, die den Zellen die Möglichkeit bieten, *in vitro* ein dreidimensionales gewebeähnliches Konstrukt auszubilden und gleichzeitig eine Diffusion der Nährstoffe bedingen [14]. Aus diesem Grund sind eine ausreichende Stabilität der Trägermaterialien und ein homogenes, zusammenhängendes internes Netzwerk für die Nährstoffversorgung von Bedeutung.

Trägermaterialien können in synthetisch hergestellte, wie Polyurethane oder Keramiken, und natürlich vorkommende Materialien, wie Gelatine- oder Kollagengele unterteilt werden [15].

Zhang et al. haben als synthetisches, organisches Trägermaterial eine dreidimensionale Matrix aus Polyurethane verwendet, die Ascorbinsäure enthält [30]. Die Matrix schäumt unter Freisetzung von CO₂ beim Kontakt mit Wasser, so dass eine schwammartige, porenhaltige Struktur entsteht, die die Nutrition und Proliferation der Zellen gewährleistet. Das Material ist biologisch abbaubar, zeigt eine hohe molekulare Stabilität in vivo [14] und findet in verschiedenen Dimensionen als Trägermaterial Anwendung. Die beigefügte Ascorbinsäure stimuliert sowohl die Zellproliferation als auch die Synthese von Kollagen I und alkalischer Phosphatase.

Handschel et al. haben als synthetisches, anorganisches Material β -Trikalziumphosphat (TCP) verwendet. Dieses liegt in Granulatform mit interkonnektierenden Mikro- und Makroporen vor. In der Studie wurden Knochendefekte im nicht mechanisch beanspruchten Bereich der Kalotte von Ratten mit TCP-Granulaten gefüllt und in einem Zeitraum von 6 Monaten untersucht. Auch nach 6 Monaten konnten die Keramikgranula ohne Veränderungen bezüglich ihrer Größe und Form nachgewiesen werden. Der von den Randbereichen des Knochendefektes ausgehende reparative Knochen steht nicht in direktem Kontakt zu den Granula, sondern ist durch eine fibröse Hülle von ihnen getrennt. Obwohl keramische Materialien eine besondere Affinität haben, Proteine zu binden, konnte die Osteokonduktivität der Keramik nicht nachgewiesen werden.

Natürliche Trägermaterialien wie die Hydrogele finden im „tissue engineering“ häufig Anwendung, da sie entweder Komponenten oder Eigenschaften besitzen, die der extrazellulären Matrix sehr ähnlich sind. Neben den natürlich vorkommenden Hydrogelen wie Kollagen oder Gelatine werden aufgrund des Infektionsrisikos auch synthetische Hydrogele wie Hydroxypropylmethylzellulose als Trägermaterial für In-vitro-Kulturen benutzt [24].

Dabei hat Kollagen als ein natürliches Hydrogel für die Knochenregeneration eine besondere Bedeutung, da es Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix ist und Kollagen Typ I sowohl die Expression des Osteoblastenphänotypen als auch die Formation der mineralisierten Matrix beeinflusst [16]. Wiesmann et al. haben osteoblastäre Zellen in einem Kollagengel in vitro kultiviert [28]. Dabei durchsetzen die Zellen das Kollagengel und proliferieren. Desweiteren konnten sowohl knochenspezifische Marker wie Kollagen Typ I, Osteokalzin und Osteonektin als auch Matrixvesikel im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) nachgewiesen werden. Dennoch ist trotz guter Biokompatibilität, die mechanische Stabilität von Kollagen-Trägermaterialien limitiert [14].

Yan Y. et al. haben ein Verfahren entwickelt, bei dem das natürlich vorkommende Hydrogel Gelatine als Trägermaterial verwendet wird. Die Technik ermöglicht, eine dreidimensionale Zell-/Biomaterial-Struktur mit definiertem, mikrofeinem Aufbau und dazwischenliegenden Kanälen für die Nährstoffzufuhr herzustellen. Eine computergesteuerte Druck-kontrollierte Spritze appliziert nach einem programmiertem Schema das Biomaterial-/Zellgemisch in mehreren Lagen auf eine Petrischale [29]. Trotz vorheriger chemischer Vernetzung zeigt das Gelatine-Trägermaterial nach zwei Wochen in vitro einen Formverlust und Zeichen zerstörter Struktur [29].

Als synthetisches Hydrogel haben Trojani et al. Hydroxypropylmethylzellulose verwendet. Humane osteoblastäre Zellen werden zunächst als Monolayer ausgesiedelt und dann mechanisch ohne Trypsinbehandlung abgekratzt. Die so erhaltenen Zellaggregate werden dann mit dem flüssigen Trägermaterial vermischt [24] und kultiviert. Auch nach 3 Wochen behalten die Zellen ihre initiale Größe und weisen zentral keine Zeichen einer Nekrose auf.

So hat jedes Trägermaterial seine speziellen Nachteile und keines kann den autogenen Gewebeersatz im klinischen Gebrauch aktuell perfekt ersetzen [15]. Daher stellt die Gewinnung trägermaterialfreier Systeme eine Weiterentwicklung und Verbesserung dar.

Anderer und Libera entwickelten bereits ein System zur Gewinnung trägermaterialfreier, autologer Mikromassenkulturen aus Chondrozyten [1]. Die Chondrozyten werden bei Kniegelenksoperationen aus humanem Gelenkknorpel gewonnen. Nach der Kultivierung als Monolayer werden die Zellen abgelöst und in mit Agarose beschichteten 96-well-Platten ausgesiedelt und nach 2 Stunden mit Medium versorgt. Nach einem Tag aggregieren die Chondrozyten zu sphärischen Mikromassenkulturen. Das in vitro generierte knorpelähnliche Gewebe ist durch eine gesteigerte Expression von Kollagen Typ II, S-100 und knochenspezifischen Proteoglykanen charakterisiert, die eine Differenzierung erkennen lassen.

Davon abzugrenzen ist das sogenannte Durchflusssystem. Es handelt sich dabei um ein System zur Gewinnung von Mikromassenkulturen, das nicht abgeschlossen ist und bei dem sich die Nährstoffversorgung in ständigem Wechsel befindet.

Humane osteoblastäre Zellen werden unter gefäßähnlicher Nährstoffversorgung eine Woche in vitro kultiviert, indem in einer dreidimensionalen Kulturkammer eine künstliche, gefäßähnliche, semipermeable Membran aus Polysulfon einen kontinuierlichen Medienfluss gewährleistet. Die Zellen wachsen dreidimensional um das Zentralgefäß und bilden eine extrazelluläre Matrix, die Kollagen Typ I und Fibronectin beinhaltet [23]. Dadurch soll das Problem der Unterversorgung ab einer kritischen Größe umgangen werden.

1.1 Zielsetzung

Wie zuvor diskutiert, kann bei einigen Verfahren zur Herstellung von Knochengewebe *in vitro* mit Trägermaterialien das osteogene Potential und die biomechanische Langzeitstabilität derselben limitiert sein.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, *in vitro* knochenähnliche, dreidimensionale Mikromassenkulturen ohne Trägermaterialien für die Behandlung von Knochendefekten zu gewinnen. Diese sollen im Sinne eines Vitalimplantates zur funktionellen Regeneration von Knochendefekten führen.

Der Einsatz von Mikromassenkulturen ohne jegliche Form von Trägermaterialien oder Wachstumsfaktoren könnte eine deutliche Verbesserung darstellen, da weder Diffusionsbarrieren oder Zelladhäsionsprobleme noch persistierende Abbauprodukte die knöcherne Heilung negativ beeinflussen. Außerdem besteht kein Risiko einer Fremdkörperabstoßung oder Infektion.

Dabei ist vor allem eine gute Nutrition der dreidimensionalen Gewebekonstrukte wichtig, um ein zusammenhängendes, homogenes Zellnetzwerk zu erhalten.

Für eine mögliche klinische Implantation der Mikromassenkulturen wäre es wünschenswert, vitale Konstrukte als Gewebeersatz mit knochenspezifischen Markern und einer mineralisationsfähigen Matrix zur Knochenregeneration nachweisen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Für die vorliegende Studie werden folgende Materialien verwendet.

2.1.1 Antikörper / Analysesysteme

- DAKO Cytomation, EnVision™ +HRP, Anti-Mouse (DAKO Diagnostik GmbH, Hamburg)
2-Schritt-Detektionssystem
Code –Nr. K4001
- Mouse monoclonal to Collagen I (Abcam Ltd., Cambridge, England)
Product Code: ab6308
100 microlitres (µl)
1:100 (4 µl Ak + 396 µl 1% BSA / PBS)
- Monoclonal antibody to Osteonectin (TaKaRa BIO Inc., Otsu, Japan)
Code No. M124
Clone No. OSN4-2
Size: 0,1 mg mouse Ig
1:300 (5 µl AK + 1495 1% BSA / PBS)
- Monoclonal Antibody to Bovine Osteocalcin (TaKaRa BIO Inc., Otsu, Japan)
Code No. M041
Clone No. OC4-30
Size: 0,1 mg mouse Ig
1:100 (5 µl Ak + 495 µl 1% BSA / PBS)

2.1.2 Einbettung

- Aralditeinbettung

Herstellung Araldit 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

0,2 mol Phosphatpuffer 1:1 mit Aqua dest. Mischen

Propylenoxid (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

Isopropanol

- Paraffineinbettung

2.1.3 Eindeckelung

- Deckgläser (Engelbrecht, Labor- u. Medizintechnik, Edermünde)
- Depex (Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg)
- Kaiser`s Glyceringelantine (Merck KGaA, Darmstadt)

2.1.4 Färbungen

- Cell-Tracker CM-DiI (Molecular Probes, Leiden, Holland)
- Hämatoxylin-Eosin
Eosin
2 g Eosin in 100 ml Aqua dest.
100 ml 96%iges Ethanol
Hämatoxylin nach Mayer

1 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua dest.

0,2 g Natriumjodat

50 g Kalialaun

50 g Chloralhydrat

1 g krist. Citronensäure

- Methylenblau- Azur II

1%iges Methylenblau in 1%iger Boraxlösung

1%iges Azur II in Aqua-dest.

2.1.5 Fixierlösungen

- Formalin, gepuffert, 4%ig, 500 ml

75 ml 37%iges Formalin

75 ml 0,2%iger Phosphatpuffer

350 ml 0,1%iger Phosphatpuffer

- Methanol
- Osmiumtetroxid

Bei 4 °C / im Eisbad frisch unter dem Abzug ansetzen :

1 Ampulle Osmium (20 ml) (Chempur, Karlsruhe)

2 ml 25%iges Glutaraldehyd (Sigma Chemie GmbH, Steinheim)

1,75 ml 10%iges Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)

1,25 ml 24%ige Sucrose (Sigma Chemie GmbH, Steinheim)

10 ml 0,2 molarer Phosphatpuffer (Merck, Darmstadt)

5 ml 4%iges Osmiumtetroxid (Chempur, Karlsruhe)

2.1.6 Geräte

- Abzug
- Computer-Counter-System Casy® 1 Modell TT (Schärfe System GmbH, Reutlingen, Germany)
- Inkubator (Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf)
- Lichtmikroskop (Diaphot-TMD, Nikon Kogaku K., Tokyo, Japan)

- Magnetrührer (Ika-Labortechnik)
- Mikrotom (RM 2155, Leica)
- Transmissionselektronenmikroskop (Philips)
- Ultracut (Reichert-Jung, Wien, Österreich)
- Vakuumpumpe (neoLab)
- Waage (Kern & Sohn GmbH, Deutschland)
- Werkbank (Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf)
- Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R (Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf)

2.1.7 Kälberbeine

Frisch geschlachtet von der Westfleisch Vieh- und Fleischzentrale Hamm

2.1.8 Kontrastierung

- Bleicitrat
 - 30 ml Aqua dest.
 - 1,33 g Bleinitrat
 - 1,76 g Natriumcitrat
 - 30 min durchgehend schütteln
 - 8 ml frische 1 N NaOH zugeben
 - (0,4 g NaOH-Plätzchen in 8 ml Aqua dest. lösen, mit 2 ml Aqua dest.
 - auf 10 ml auffüllen und anschließend 2 ml Lösung verwerfen)
 - mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen
- Uranylacetat, 2 %ig
 - 10 ml Aqua dest.
 - 0,2 g Uranylacetat
 - eine Nacht auf dem Magnetrührer mischen lassen, abgedunkelt lagern

2.1.9 Laborbedarf

- Chamber Slides, Lab Tek, 8 Kammern, Glas / Permanox, steril (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Coulter-Gefäße (Engelbrecht GmbH, Edermünde)
- DakoCytomation Pen (DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark)
- Einmalskalpelle steril (pfm, Köln)
- Filtrationssysteme (Biochrom AG seromed®, Berlin)
- Kunststoffeinbettform (Agar Aids Ltd.)
- Mesh Hexagonal Nickel, 100, 3.05 mm (Agar Scientific)
- Parafilm "M" Laboratory Film (American National Can™, Greenwich)
- Platten, 96-well (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Rasierklingen (Invatech, Hamburg)
- Rollrandschnappdeckelgläser
- Super Frost® Plus Objektträger (R. Langenbrink, Teningen, Deutschland)
- Zellkulturschalen 150 x 20 mm (Biochrom AG seromed®, Berlin)
- Zentrifugenröhrchen 15ml, 50ml (Biochrom AG seromed®, Berlin)

2.1.10 Lösungen und Reagenzien

- Agarose (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Germany)
- Aqua dest. (Hausapotheke UKM)
- Casyton / Casyclean (Schärfe System GmbH, Reutlingen)
- Collagenase
 - 500 ml HAMS F10 (Biochrom AG seromed®, Berlin)
 - 10 ml HEPES (Biochrom AG seromed®, Berlin)
 - 200 mg Collagenase (Biochrom AG seromed®, Berlin)
- Dibromol® Tinktur (Trommsdorf GmbH & Co.)
- DMSO (Sigma® Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
- Earle`s Salzlösung I

- 50 ml Earle`s Salzlösung (Merck, Darmstadt)
- 3 ml 7,5%iges NaHCO_3 (Merck, Darmstadt)
- Earle`s Salzlösung II
 - 200 ml Earle`s Salzlösung (Merck, Darmstadt)
 - 2 ml Amphotericin (Biochrom AG seromed®, Berlin)
 - 2 ml Penicillin / Streptomycin (Biochrom AG seromed®, Berlin)
- Ethanol, 80%ig, vergällt, gefärbt, filtriert (Apotheke, UKM)
- Kochsalzlösung, steril, 0,9%ig (Braun Melsungen AG, Melsungen)
- Polyvinylformaldehyd, 0,3-0,5%ig (Formvar:
0,3 g bzw. 0,5 g Formvar in 100 ml Chloroform lösen)
- Tyrode-Lösung
 - 8 g NaCl (Merck, Darmstadt)
 - 0,2 g KCl (Merck, Darmstadt)
 - 1 g NaHCO_3 (Merck, Darmstadt)
 - 0,0565 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)
 - 0,3 g Titriplex III = EDTA-Na-Salz (Merck, Darmstadt)
 - 1 g Glucose (Merck, Darmstadt)

2.1.11 Nährmedien

- MM1 f –Medium
 - Standardmedium MMO
 - 25 $\mu\text{g/ml}$ L-Ascorbinsäure (Sigma, Steinheim)
 - 10 mmol / l β -Glycerolphosphat (Sigma, Steinheim)
- MMO-f-Medium
 - 500 ml High GEM = High Growth Enhancement Medium (MP = Molecular Probes, Leiden, Holland)
 - 60 ml FKS (Biochrom AG seromed®, Berlin)
 - 5 ml Glutamin (Biochrom AG seromed®, Berlin)
 - 5 ml Amphotericin B (Biochrom AG seromed®, Berlin)
 - 5 ml Penicillin / Streptomycin (Biochrom AG seromed®, Berlin)

2.1.12 Osteoblasten

Primäre bovine Osteoblasten-ähnliche Zellen aus dem Periost frisch geschlachteter Kälberbeine

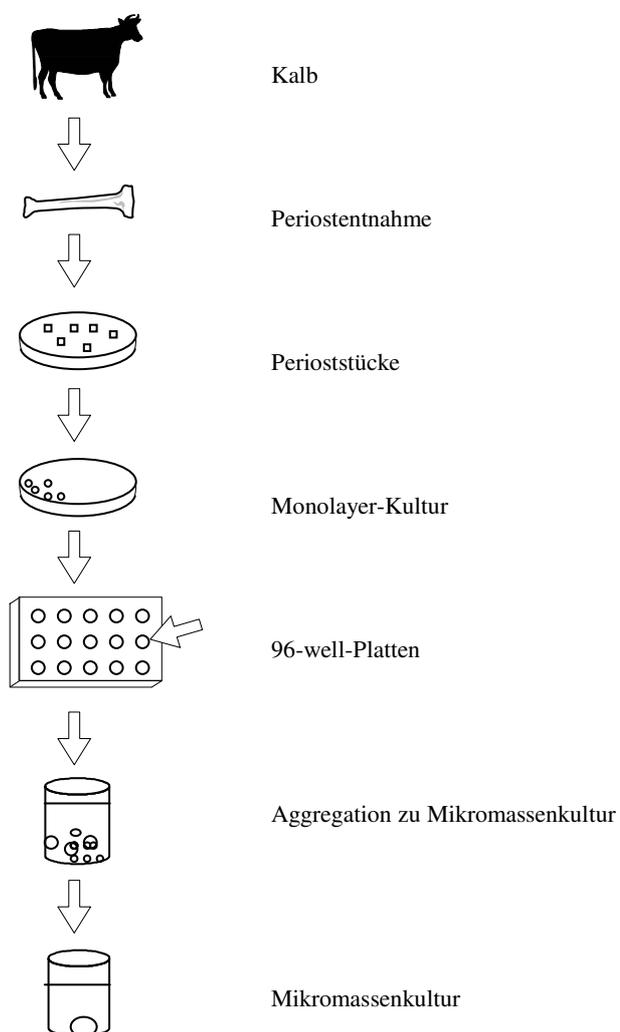
2.1.13 Puffer

- PBS steril, pH 7,4, ohne Ca^{2+} u. Mg^{2+} (Apotheke UKM)
 - 4 g NaCl (Merck, Darmstadt)
 - 0,1 g KCl (Merck, Darmstadt)
 - 0,72 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)
 - 0,1 g KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt)
 - ad 500 ml Aqua dest. (Hausapotheke UKM)

2.2 Methoden

2.2.1 Übersicht

Das folgende Schema stellt die Zellgewinnung dar. Kälberbeine werden präpariert und aus den entnommenen Perioststücken werden die Osteoblasten gewonnen und als Monolayer proliferiert. Diese werden nach ihrer Ablösung in mit Agarose beschichtete 96-well-Platten umgesiedelt und aggregieren dann zu rundlichen, dreidimensionalen Mikromassenkulturen.



Figur 1: Schematische Darstellung der Zellgewinnung von der Kälberbeinpräparation bis hin zur Gewinnung der Mikromassenkulturen

2.2.1.1 Periost-Entnahme



Abbildung 1: Frisch geschlachtetes Kälberbein



Abbildung 2: Grobpräparation des Kälberbeines



Abbildung 3: Feinpräparation des Kälberbeines

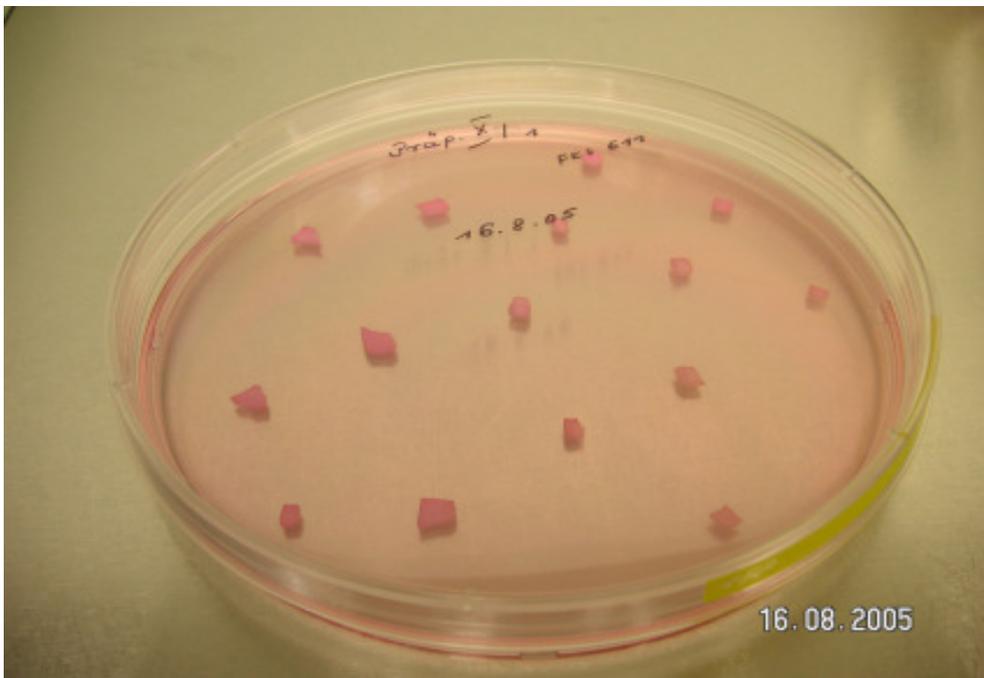


Abbildung 4: Perioststücke in der Zellkulturschale

Für die Periost-Entnahme werden frisch geschlachtete Kälberbeine von der Westfleisch-Vieh- und Fleischzentrale Hamm präpariert (**Abb. 1**).

Zunächst erfolgt die Grobpräparation (**Abb. 2**), bei der unter normalen Laborbedingungen mit einem Allesschneider die Haut eines Rinderbeines längs und danach mit etwas Abstand zum Huf senkrecht zu dem Längsschnitt durchtrennt wird. Mit einem Einmalskalpell (Nr. 21) wird die Haut abpräpariert und das Fussgelenk eröffnet, so dass der Huf mit kompletter Haut und Bindegewebe entfernt werden kann. Der verbliebene Metacarpus wird gründlich unter fließendem Wasser gereinigt und zur Desinfektion mit 80%igem vergällten, gefärbten und filtrierten Ethanol von allen Seiten benetzt.

Die Feinpräparation findet unter sterilen Bedingungen statt und beinhaltet das sorgfältige Abpräparieren von dem Periost aufliegenden Sehnen und Geweben. Anschließend wird das Bein mit 0,9%igem NaCl gewaschen. Das Periost wird mit einem neuen Skalpell sowohl links als auch rechts außen zirkulär durchtrennt und dann werden in Längsrichtung schmale, ca. 0,5 cm breite Perioststreifen geschnitten und abgezogen (**Abb. 3**).

2.2.1.2 Gewinnung der Osteoblasten

Zur Zellgewinnung wird in dieser Arbeit ein von Jones & Boyde [10] beschriebenes Verfahren verwendet, welches auf der Fähigkeit der Osteoblasten beruht, unter geeigneten Kulturbedingungen aus Gewebe auszuwachsen.

Dabei werden die Perioststreifen zweimal in einer Glasflasche mit vorgewärmter Earle`s-I-Salzlösung 10 min lang bei 37 °C auf einem Magnetprüher unter Bewegung gespült und anschließend 10 min lang bei 37 °C mit vorgewärmter Earle`s II Salzlösung. Nach Entnahme der Streifen werden diese mit einem Skalpell in ca. 0,5 x 0,5 cm breite Rechtecke geschnitten und jeweils 15 - 20 Stück werden mit der osteogenen Seite nach unten auf eine sterile Zellkulturschale mit ausreichendem Abstand gelegt (**Abb. 4**), um ein bestmögliches Wachstum zu gewährleisten. Nach 20 minütiger Anheftungsphase werden jeder Schale 20 ml MMO-f-Medium hinzugegeben

und in einem CO₂-Inkubator bei 100%iger Luftfeuchtigkeit, einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert.

Das Medium wird jeden zweiten Tag ausgetauscht, und nach ca. 3 - 5 Wochen entsteht ein konfluenter Monolayer von Osteoblasten.

2.2.1.3 Cell- Tracking mit CM-DiI

Um später die Mikromassenkulturen im Fluoreszenzmikroskop betrachten zu können, wird ein Teil adhärenter Osteoblasten als Monolayer mit dem Fluoreszenzfarbstoff CM-DiI angefärbt, der sich irreversibel in die Zellmembran einlagert.

Nach Entfernung des Mediums erfolgt ein zweimaliger Spülvorgang mit 8 ml PBS. Dann werden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff (50 µl DMSO pro Aliquot CM-DiI) für 15 min im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Dieser wird durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Abschließend werden die Zellen mit frischem Medium versorgt und für eine eintägige Erholungsphase im Brutschrank belassen.

2.2.1.4 Aussiedeln / „Passagieren“ der Zellen

Das „Passagieren“ dient dem Ablösen der Osteoblasten aus den Zellkulturschalen und der anschließenden Aussiedlung.

Unter sterilen Bedingungen wird nach 28 Tagen zunächst das Medium der Zellkulturschalen mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Perioeststücke werden entfernt, bevor die Schalen mit je 6 ml Kollagenase-Lösung für 20 Minuten in einen CO₂-Inkubator bei 37 °C inkubiert werden. Nach zweimaligem Spülen mit je 8 ml PBS werden je 8 ml Tyrode-Lösung hinzugegeben und die Schalen erneut für max. 20 min in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C aufbewahrt. Bevor die Tyrode-Zell-Suspension mit einer Einmalpipette sorgfältig aufgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben wird, werden 100 µl der Suspension entnommen und in 10 ml Casyton-Lösung in ein Coulter-Gefäß gegeben. Somit lassen sich in einem Zellzählssystem die Zellzahl

pro ml Tyrode-Lösung und die Zellgrößen-Verteilung bestimmen. Die Suspension wird 10 min lang bei 1200 U/min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Tyrode-Überstandes wird das resultierende Zellpellet mit dem Mineralisationsmedium MM1 resuspendiert. Dabei werden pro 1 Million Zellen 1 ml Medium hinzugegeben.

2.2.1.5 Herstellung komplexer dreidimensionaler Mikromassenkulturen aus Osteoblasten

Die Vorbereitung beinhaltet die Beschichtung der 96-well-Platten mit einem Gemisch aus Agarose und MM1-Medium ohne Amphotericin und Penicillin und wird einen Tag vor dem Aussiedeln der Osteoblasten hergestellt. Die Beschichtung mit Agarose nimmt den Zellen die Gelegenheit, sich an der Unterlage festzuhaften und als Monolayer zu proliferieren. So adhären die Zellen unter der Ausbildung sphärischer Formationen -Mikromassenkulturen- untereinander.

Unter sterilen Bedingungen werden 50 ml MM1-Medium in eine sterile 100 ml Glasflasche pipettiert. In einem Wiegeschiffchen werden 1g Agarose-Pulver abgewogen, unter der Sterilbank in die bereits mit Medium gefüllte Glasflasche gegeben und unter leichtem Schwenken der Flasche untergemischt. Zur Sterilisation wird das Agarose-Medium-Gemisch mit einem gesättigten, gespannten Dampfdruck von 1-1,2 bar und einer Temperatur von 115-120 °C 20 min lang autoklaviert. Das sterilisierte Agarose-Medium-Gemisch ist warm und flüssig und sollte deswegen schnell weiterverarbeitet werden.

Die 96-well-Platten werden unter der Bank ausgepackt, beschriftet und zur besseren Einsicht etwas schräg gehalten. Jeweils 50 µl des Agarosegemisches werden nun zügig in ein Well pipettiert. Dabei wird die Pipettenspitze an die Wand der Kammer gelegt und der Inhalt schnell abgegeben, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden. Anschließend lässt man die verschlossenen Platten noch etwa eine Stunde unter der Bank zum Abkühlen ruhig stehen, bevor sie in einem Gefrierbeutel luftdicht verpackt und in einem Kühlschrank bei 4 °C inkubiert werden.



Abbildung 5: 96-well-Platte mit Agarose beschichtet

Nach der eintägigen Lagerung werden die vorbereiteten Platten unter der Bank geöffnet. Das Zentrifugenröhrchen mit den in dem Medium befindlichen Osteoblasten wird immer wieder leicht geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu bekommen. Dann werden 200 μ l aus dem Zentrifugenröhrchen mit einer sterilen Pipette aufgenommen und zügig zentral in ein Well pipettiert. Es werden dabei 200.000 Osteoblasten pro Well ausgesiedelt (**Abb. 5**), die zur Entstehung einer Mikromassenkultur benötigt werden.

Die Kultivierung der 96-well-Platten findet in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5%iger Luftfeuchtigkeit statt. Die Entstehung der Mikromassenkulturen wird täglich unter dem Phasenkontrastmikroskop überprüft und dauert in der Regel 1-2 Tage.

Um das Wachstum und die Vitalerhaltung der sphärischen Formationen zu gewährleisten, wird das Medium 2 x pro Woche gewechselt. Dabei wird nicht das ganze Medium, sondern nur die Hälfte (100 μ l) ausgetauscht. Vor und nach jedem Mediumwechsel werden die Aggregate unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert, um routinemäßig einen Überblick über den Zustand der Vitalität und Morphologie zu bekommen.

2.2.1.6 Experiment: zeitlicher Verlauf

Um die Mikromassenkulturen im zeitlichen Verlauf analysieren zu können, werden die Zellen in 96-well-Platten in einem CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5prozentiger Luftfeuchtigkeit kultiviert und 2 x pro Woche die Hälfte des Mediums (100 µl) mit einer variablen Volumenpipette aufgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Dabei wird das Standardmedium durch das Mineralisationsmedium MM1 ersetzt.

Nach 3, 7, 14 und 28 Tagen werden jeweils 50 Mikromassenkulturen geerntet, von denen 40 mit CM-DiI gefärbte Mikromassenkulturen mit 4%igem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und für anschließende histologische und immunhistochemische Untersuchungen geschnitten werden. Die restlichen 10 Proben werden für transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen synchron mit Osmiumtetroxid fixiert, in Araldit eingebettet und ultradünn geschnitten.

Weitere 64 mit CM-DiI gefärbte Mikromassenkulturen werden auf jeweils vier 8ter Chamber-Slides aus Glas und Permanox gegeben und unter gleichen Bedingungen kultiviert und gefüttert. Die Ernte erfolgt auch nach 3, 7, 14 und 28 Tagen, wobei diese mit – 20 °C kaltem Methanol fixiert werden. Nach Abnahme der Kammerunterteilung werden die Glas-Chamber-Slides mit Hämatoxylin-Eosin und die Permanox-Chamber-Slides mit Methyleneblau-Azur II nach Richardson gefärbt.

2.2.1.7 Ernte der Mikromassenkulturen

Vor der Ernte nach 3, 7, 14 und 28 Tagen wird nochmals der Zustand der Mikromassenkulturen unter dem Mikroskop überprüft. Auf dem Deckel der Platten werden die Wells, die eine Mikromassenkultur enthalten, mit einem Marker punktförmig gekennzeichnet. Die geöffneten Platten werden unter der Bank zur besseren Einsicht schräg gehalten. Zur Entnahme wird die Pipettenspitze zentral und unmittelbar über den Mikromassenkulturen gehalten und der gesamte Inhalt (200 µl) mit Schwung und unter leichten kreisenden Bewegungen aufgenommen. Dabei sollte die Pipettenspitze die Agarose möglichst nicht berühren. Mit bloßem Auge wird der Inhalt der Pipette

kontrolliert, ob die Mikromassenkultur aufgenommen wurde; dann wird diese in ein Rollrandschnappgläschen zur weiteren Fixierung gegeben. Um sicher zu gehen, dass wirklich alle Mikromassenkulturen geerntet wurden, werden die Wells zum Schluss noch einmal unter dem Mikroskop betrachtet.

2.2.2 Analysemethode: TEM

2.2.2.1 Kunstharzeinbettung

Pro Zeitpunkt werden 10 ungefärbte Mikromassenkulturen geerntet und das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Da die Mikromassenkulturen aufgrund ihrer hellen Farbe sehr schwer mit dem Auge zu erkennen sind, muss sorgfältig gearbeitet und der Inhalt der Pipette regelmäßig kontrolliert werden, um möglichst keine Probe zu verlieren. Anschließend findet eine 30-minütige Fixierung im Eisbad mit deutlicher Schwärzung der sphärischen Formationen statt. Nach der Fixierung erfolgt die Entwässerung und Einbettung der Mikromassenkulturen. Aus Sicherheitsgründen wird unter Verwendung doppelter Handschuhe vorsichtig unter dem Abzug gearbeitet.

Die Fixierlösung wird durch Waschvorgänge mit 0,1-molarem Phosphatpuffer im Eisbad ausgewaschen. Um Zerreißen und Schrumpfen zu vermeiden, wird die Entwässerung stufenweise vorgenommen, indem man von niedrigprozentigem zu hochprozentigem Alkohol überträgt. Nachdem die Proben in reinem Propylenoxid waren, werden sie in ein Propylenoxid-Araldit-Gemisch im Verhältnis 2:1 und dann 1:1 gegeben. Der Anteil an Epoxidharz im Gemisch wird zunächst auf das Mengenverhältnis 1:2 erhöht. Zum Schluss befinden sich die Mikromassenkulturen in reinem Araldit; dabei bleiben die Rollrandschnappgläser 4 Stunden lang offen unter dem Abzug bei Raumtemperatur stehen, damit überschüssiges Propylenoxid verdunsten kann.

Die vorgefertigten Kunststoffformen sind mit sogenannten „Bettchen“ vorbereitet, damit die Mikromassenkulturen später zentral im Blöckchen liegen. Dabei wird der Boden der Hohlform mit Kunststoff bedeckt und auspolymerisiert.

Nun werden ca. 3-4 Mikromassenkulturen sorgfältig mit einem feinen Metallspatel aufgenommen und hintereinander auf den „Bettchen“ appliziert. Nachdem ein mit Bleistift beschriftetes Papierstück eingelegt worden war, wird der verbliebene Rest der Form vorsichtig mit Araldit aufgefüllt, um ein Verrutschen der Mikromassenkulturen zu verhindern. Die Polymerisation findet 3 Tage lang im Wärmeschrank bei 60 °C statt.

2.2.2.2 Befilmen der Objektträgernetzchen

Die verwendeten Objektträgernetzchen (Grids) aus Nickel mit 100 Maschen pro cm² werden zunächst mit einer Trägerfolie versehen, damit die Schnitte bei Bestrahlung mit Elektronen weniger davontreiben. Die Folien sind aus 0,3-0,5%igem Polyvinylformaldehyd (Handelsname Formvar) und zeigen eine hohe Stabilität gegenüber mechanischen Einflüssen und keine Veränderungen im Elektronenstrahl. Dazu werden 0,3 g bzw. 0,5 g Formvar in 100 ml Chloroform gelöst. Die Glasobjektträger werden mit einem sauberen Leinentuch gründlich gereinigt, um eventuell vorhandene Staubpartikel zu entfernen. Dann wird der Objektträger 1 sec lang in das Formvar getaucht, weitere 10 s lang im Chloroformdampf belassen und zum Abtropfen überschüssiger Flüssigkeit senkrecht auf ein Filterpapier gestellt. Zum Abflottieren des Films wird eine saubere, bis zum Überlaufen mit Aqua bidest. gefüllte Glasschale, die auf einem reflexfreien, schwarzen Untergrund steht, verwendet. Der Objektträger wird nun langsam in einem Winkel von etwa 30 °C ins Wasser getaucht und angehaucht, wobei der Formvarfilm langsam abschwimmt. Dann werden die Netzchen zügig mit der matten Seite auf die schwimmende Folie aufgelegt, um ein unnötiges Einstauben zu vermeiden. Die Formvarfolie und die Netzchen werden mit einem Parafilm belegt und mit einer Pinzette vorsichtig aus dem Wasser gezogen, bevor sie zum Trocknen mit den Objektträgernetzchen nach oben in eine verschlossene Petrischale gelegt werden.

2.2.2.3 Ultradünnschnitte

Das Ultramikrotom erlaubt das Herstellen von regelmäßigen Ultradünnschnitten für das Elektronenmikroskop.

Die Kunstharzblöckchen werden mit einer Rasierklinge trapezförmig zugespitzt bzw. getrimmt, damit die spätere Schneidefläche möglichst nur von einer Mikromassenkultur ausgefüllt ist. Dabei werden Randpartien, die reines Einbettungsmedium enthalten, entfernt. Die raue Oberfläche wurde nach der Herstellung von Semidünnschnitten mit dem Glasmesser abgetragen. Mit einem Diamantmesser werden nun Ultradünnschnitte mit einer Schnittdicke von 70-90 nm hergestellt. Wenn die Schnitte auf der Wasseroberfläche des Messertroges schwimmen, gibt die Interferenzfarbe der Schnitte ein ungefähres Bild der Dicke wieder. Eine „silbrige“ Interferenz ist gut brauchbar. Dann werden die Schnitte mit der befilmten Seite des Netzchens aufgenommen.

2.2.2.4 Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat

Um qualitativ aussagekräftige Bilder zu bekommen, werden die biologischen Ultradünnschnitte nach dem Standardverfahren mit Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds kontrastiert.

Dieses Schwermetall lagert sich an die lipidhaltigen Zell- und Organellmembranen an und macht sie elektronendichter, was auf dem Bild zu einer Schwärzung führt.

Der Boden einer mit Alufolie abgedunkelten Glaspetrischale wird mit Parafilm ausgelegt. Dann werden mit einer Pasteurpipette mehrere isolierte Tropfen 2%iges Uranylacetat auf den Parafilm aufpipettiert. Die befilmten Grids werden jeweils mit den Schnitten nach unten auf die Tropfen gelegt und 30 min lang kontrastiert. Anschließend muß man die Objektträgernetzchen mit einer Pinzette aufnehmen, mit Aqua dest. spülen und mit Filterpapier vom Rande her trocknen.

Dann wird eine Glaspetrischale mit Parafilm ausgelegt, und am Rand werden Natriumhydroxid-Plätzchen verteilt. Dadurch wird verhindert, dass sich der Stickstoff der Luft mit dem Bleicitrat verbindet und Bleinitratniederschläge die Proben

verunreinigen. Auf mehrere isolierte Bleicitrat-Tropfen wird wiederum jeweils ein Netzchen mit dem Schnitt nach unten gelegt und für 3 min kontrastiert. Die Netzchen muß man kurz mit Aqua dest. waschen und mit einem Filterpapier trocknen.

Alle Arbeiten werden vorsichtig und sorgfältig mit Handschuhen unter dem Abzug erledigt, da Uranylacetat toxisch und radioaktiv und Bleicitrat toxisch ist.

2.2.2.5 Elektronenmikroskopische Betrachtung

Als Transmissionselektronenmikroskop dient das Gerät Zeiss 902 mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV. Nach Zero-loss-Filterung werden sowohl analog durch Belichtung von Fotoplatten als auch digital mit einer integrierten Slow-Scan-CCD-Kamera Fotos gemacht. Es werden folgende Vergrößerungsstufen genutzt: 10-fache, 20-fache und 40-fache Vergrößerung.

2.2.3 Analysemethode: Immunhistochemie

2.2.3.1 Fixierung und Konservierung

Pro Zeitpunkt werden 40 gefärbte Mikromassenkulturen aus den 96-well-Platten nach der Absiedelung mit frisch hergestelltem, 4%ig gepufferten Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Nach Auswaschung des Fixans unter fließendem Leitungswasser werden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 75 %, 90 % Ethanol und 100 % Isopropanol) stufenweise bei Raumtemperatur entwässert. Die Proben werden 1 h lang in Zedernholzöl aufbewahrt, um dann jeweils 3 x eine Stunde lang mit Paraplast plus bei 60 °C im Wärmeschrank in vorgefertigte Kunststoffkörbchen eingebettet werden zu können.

2.2.3.2 Dünnschnitte

Aus den Paraffinblöckchen werden am Rotationsmikrotom mit Hilfe einer Einmalmikrotomklinge 4 µm dünne Serienschnitte angefertigt und auf Glasobjektträger aufgebracht. Abschließend erfolgt die Trocknung der Schnitte auf der Heizplatte.

2.2.3.3 Immunhistochemie

Um die Mikromassenkulturen im zeitlichen Verlauf weiter analysieren zu können, werden immunhistochemische Verfahren angewandt.

In den Proben vorhandene antigene Determinanten (Ag) können mit spezifischen Primärantikörpern (Ak), die wiederum mit Enzymen (Peroxidase) gekoppelten Sekundärantikörpern reagieren, identifiziert werden. Dabei werden Chromogene, die von entsprechenden Enzymen katalysiert werden, eingesetzt. Die entstehenden Ag-Ak-Komplexe können somit lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Die hier verwendeten monoklonalen Antikörper sind nur gegen eine antigene Determinante gerichtet und besitzen dadurch eine höhere Spezifität.

Um optimale Färbungen und aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen, werden die Ak gegen Osteokalzin und Collagen Typ I auf 1:100 und die Ak gegen Osteonektin auf 1:300 verdünnt.

Zur Entfernung des Paraffins werden die Schnitte in Xylol eingebracht und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 % und 70 % Ethanol) rehydriert. Es folgen Waschvorgänge mit PBS und 0,02%igem Tween 20, und dann werden die Proben in einer feuchten Kammer mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach weiteren Spülvorgängen kann der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, einwirken. Nach erneuten Spülvorgängen erfolgt das Aufbringen der chromogenen Substratlösung (DAKO ENVISION™-System) für weitere 30 min an einem lichtgeschützten Ort. Als Chromogen wird in diesem Fall 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) verwendet, das mit dem Substrat ein rotes

Farbprodukt bildet. Die Proben werden gründlich mit Aqua dest. gespült und durch Eindecken in ein wässriges Medium (Kaisers Glyzerol Gelatine) konserviert.

Die Betrachtung erfolgt sowohl im Licht- als auch im Fluoreszenzmikroskop.

2.2.4 Analysemethode: Histochemie

Zur histochemischen Analyse werden weitere Paraffinschnitte und die Glas-Chamber-Slides mit Hämatoxylin-Eosin und die Permanox-Chamber-Slides mit Methyleneblau-Azur II gefärbt.

2.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Diese Routinefärbung nach Mayer dient der Übersichtsdarstellung der Mikromassenkulturen.

Die Proben werden für 5-20 min mit Hämatoxylin nach Mayer fixiert. Dabei wird zeitweise der Stand der Färbung unter dem Mikroskop kontrolliert, um ein Überfärben der Proben zu verhindern. Nach Entfernen des Farbstoffes unter fließendem Leitungswasser für 10 - 20 Minuten, werden die Proben 2 - 20 min mit Eosin als zweiten Farbstoff behandelt und anschließend mit Aqua dest. gespült. Das Entwässern und die gleichzeitige Differenzierung erfolgt in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 2 x 5 min in 70 %, 96 % und 100 % Ethanol), die Entfernung des Alkohols wieder 2 x 5 min lang in Xylol. Nach Eindeckung mit DePeX werden die Proben eine Stunde beschwert waagrecht hingelegt, um anschließend nach Reinigung der Objektträger unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden zu können.

Die Färbung zeigt Zellkerne und saure Substanzen blau und alles Übrige in den verschiedenen Tonabstufungen rot.

2.2.4.2 Schnellfärbung mit Methylblau-Azur II

Auch die Färbung nach Richardson dient der Übersichtsdarstellung der Mikro-massenkulturen.

Die Färbung arbeitet mit einer Mischung aus 1%iger Methylblau in 1%iger wässriger Boraxlösung und 1%igem Azur II in Aqua dest. Diese beiden Stammlösungen werden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Proben werden auf der Heizplatte bei 60 °C für 1 - 2 min mit der vorgewärmten Farblösung gefärbt, unter fließendem Aqua dest. gespült und dann an der Luft getrocknet.

Die basophilen und osmiophilen Strukturen färben sich blau und die metachromatischen Substanzen rotviolett.

2.2.5 Mikroskopie

2.2.5.1 Lichtmikroskopie

Das verwendete Lichtmikroskop ist ein motorisiertes Mikroskop (Carl Zeiss Axioplan 2) mit integrierter Farbkamera (Carl Zeiss Axio Cam HRc). Die Mikroscanning-Auflösung von 1300 x 1030 garantiert eine optimale Farbqualität. Die Bilder werden mit 10- und 20-facher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 1 ms bis zu 600 Sekunden aufgenommen und im TIF-Format abgespeichert.

2.2.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird das Objekt mit kurzwelligem Licht beleuchtet und das von manchen Strukturen oder Farbstoffen unter diesen Bedingungen emittierte Licht (Fluoreszenzlicht) beobachtet. Zur Anregung wird langwelliges, grünes Licht (553 nm) benutzt. Ein Sperrfilter im Strahlengang nach dem Objekt lässt das Erregerlicht

nicht in das Okular eintreten. Das im Präparat erzeugte Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von 570 nm kann den Sperrfilter passieren. Durch den in der Zellmembran der Osteoblasten irreversibel eingelagerten Farbstoff CM-Dil, leuchten die Mikro-massenkulturen im Fluoreszenzmikroskop orange auf dunklem Untergrund.

3. Ergebnisse

Nach der Gewinnung werden die Osteoblasten in mit Agarose beschichtete 96-well-Platten ausgesiedelt. Nach einigen Stunden entstehen unregelmäßige Herde, die nach eintägiger Kultivierung der Zellen zu dreidimensionalen, sphärischen Mikromassenkulturen aggregieren.

3.1 Übersicht einer Mikromassenkultur

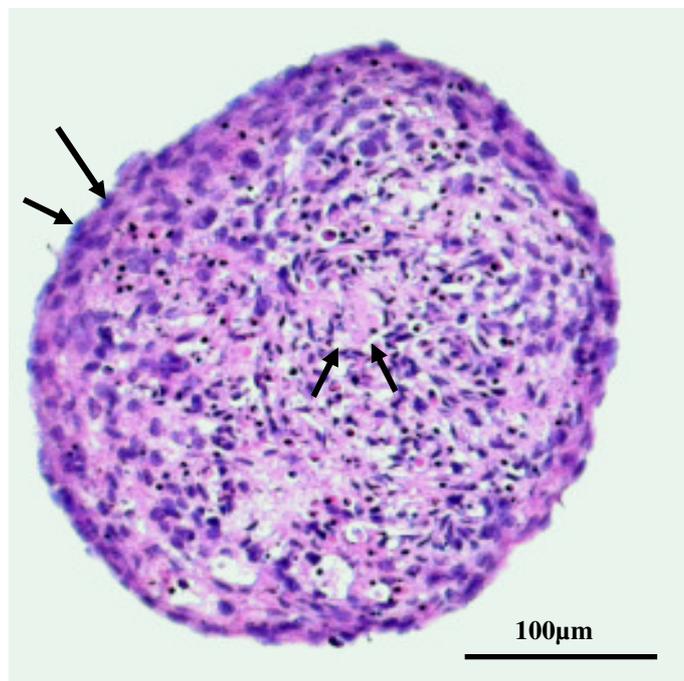


Abbildung 6: Übersicht eines Querschnittes durch die Mitte einer Mikromassenkultur, Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Alter der Kultur: 3 Tage

In der lichtmikroskopischen Auswertung einer Mikromassenkultur in einem mit Agarose beschichtetem Kulturboden nach 3 Tagen lassen sich folgende Ergebnisse erkennen:

Die Mikromassenkultur zeigt sich als ein kugelig bis elliptischer sowie abgeschlossener Zellverband. Die äußeren 2 - 3 Zellschichten haben begonnen, eine

intensiv violett gefärbte Abschlußzellschicht zu bilden, die den Verband nach außen begrenzt. Im Innern sind erste Strukturbildungen sichtbar (**Abb. 6, Pfeil innen**).

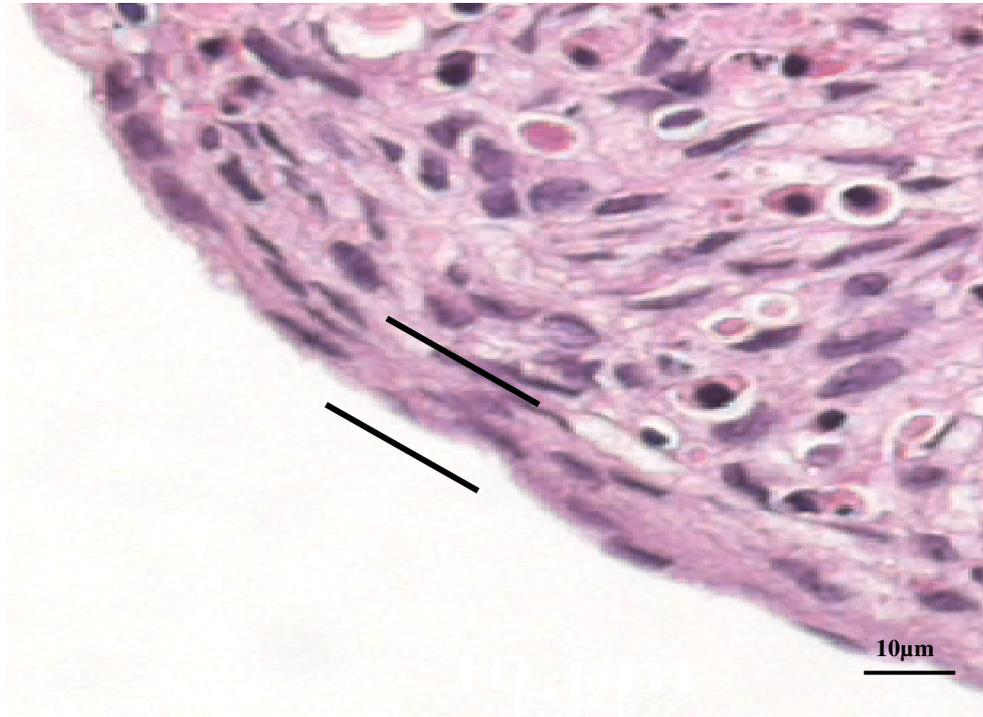


Abbildung 7: Vergrößerter Ausschnitt einer sphärischen Formation aus Osteoblasten, Abschlußzellschicht aus 2 - 3 Zelllagen, Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Alter der Kultur: 3 Tage

Die **Abbildungen 6 u. 7** zeigen den äußeren Bereich einer 3 und 7 Tage alten Mikro-massenkultur. 2 - 3 Zelllagen bilden eine Art Abschlußschicht, die die Formation nach außen hin begrenzt. Die Zellen der Abschlußschicht sind dünn und flach, mit großen, gestreckten Zellkernen und rundlichen Nuclei, die zueinander versetzt in Lagen angeordnet sind. Im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen bleibt diese Abschlußschicht nahezu unverändert bestehen.

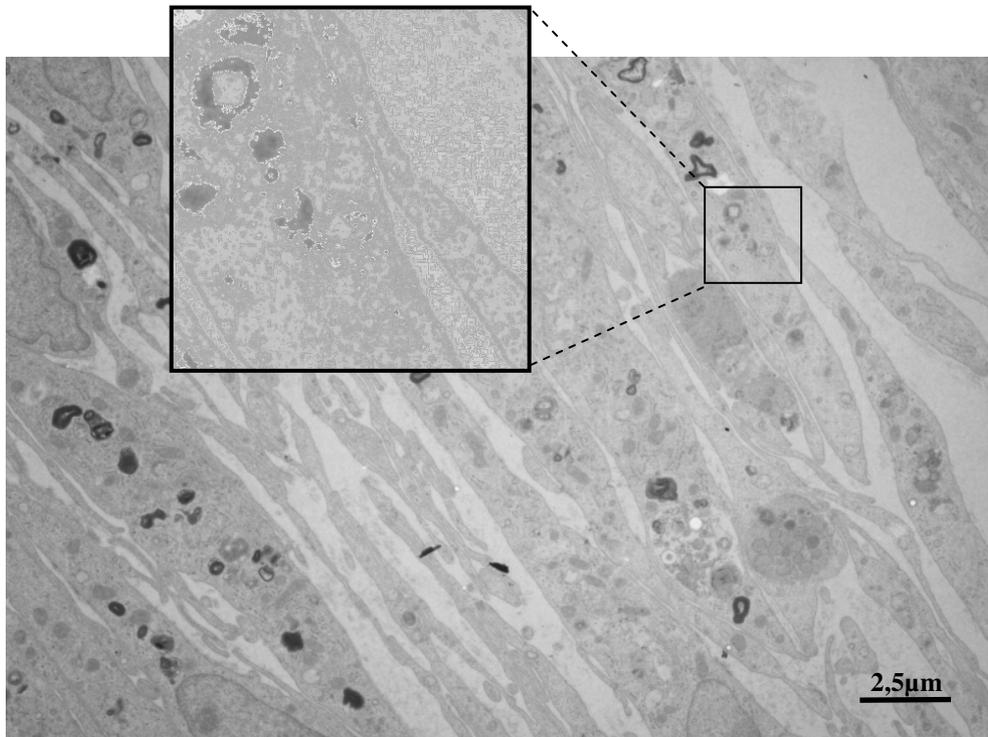


Abbildung 8: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme, Ausschnitt aus einer Mikromassenkultur, 2 - 3-lagige Abschlußzellschicht, Alter der Kultur: 7 Tage

Zwischen den Zellen befinden sich schmale, langgestreckte Interzellularräume, welche vereinzelt extrazelluläre Matrix enthalten. Am äußeren Bildrand sind zwei benachbarte Zellen sichtbar, die dicht aneinanderliegen und Membranverdichtungen aufweisen (Abb. 8, vergrößerter Ausschnitt).

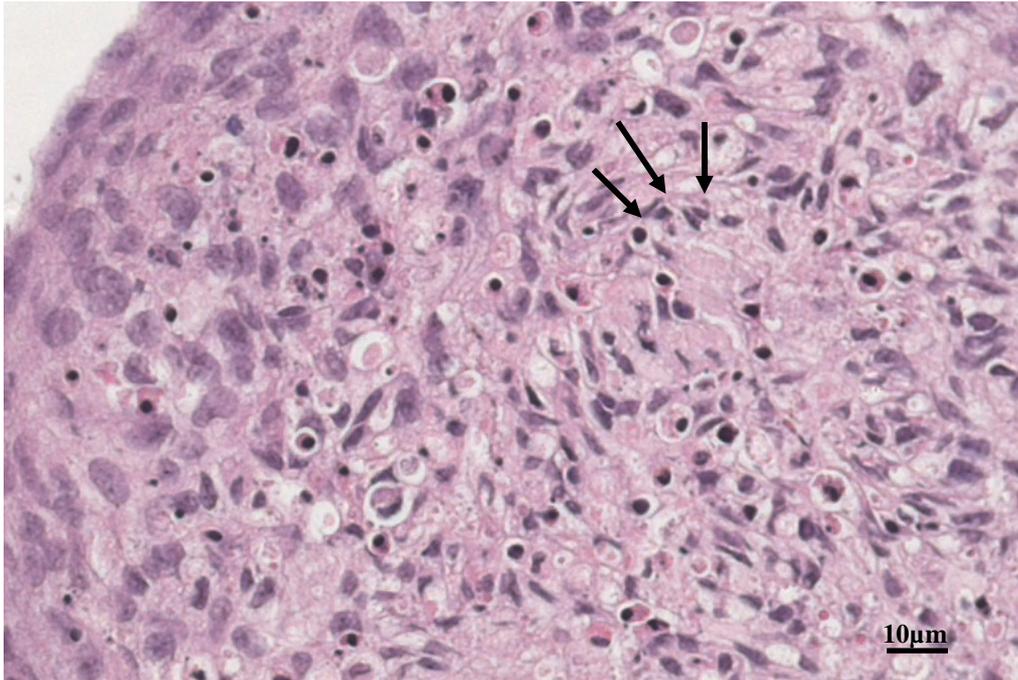


Abbildung 9: Ausschnitt einer Mikromassenkultur, Innenbereich, erste Anzeichen von Strukturbildungen, Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Alter der Kultur: 3 Tage

Im Innenbereich der Mikromassenkultur gibt es Zellanhäufungen und Matrix nebeneinander. Die vorhandenen Zellen sind kubisch bis prismatisch. Die Zellkerne sind unterschiedlich groß, rundlich bis länglich oval und intensiv violett gefärbt. Im Zellinnern sind Mitochondrien, endoplasmatische Retikuli und Golgi-Apparate zu erkennen. Nach 3 Tagen zeigen sich im Innenbereich bereits unregelmäßige Strukturen. Die Zellen liegen dicht und teilweise bandartig angeordnet nebeneinander und umgeben Matrixbereiche (**Abb. 9, Pfeil**). Diese Strukturen ähneln der Vorstufe von Knochenbälkchen.

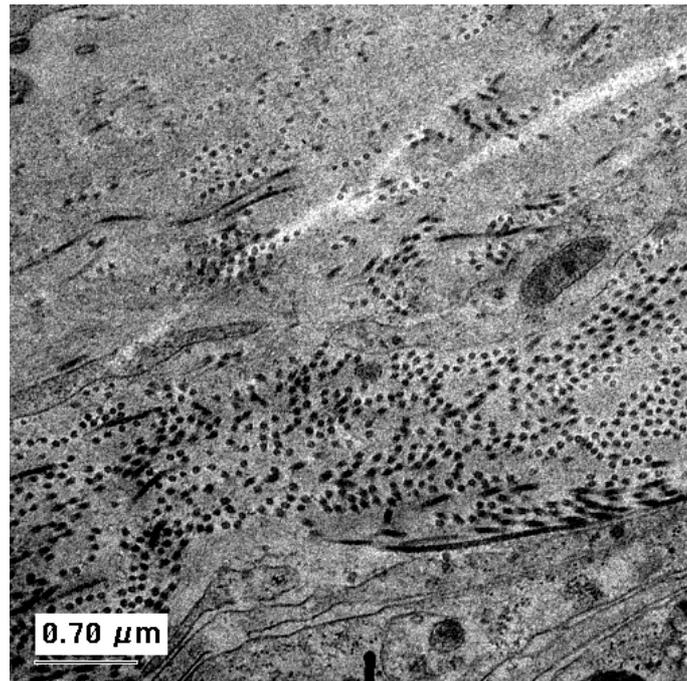


Abbildung 10: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme, Innenbereich einer Mikromassenkultur, Alter der Kultur: 21 Tage, Kollagenfibrillen quer und längs getroffen

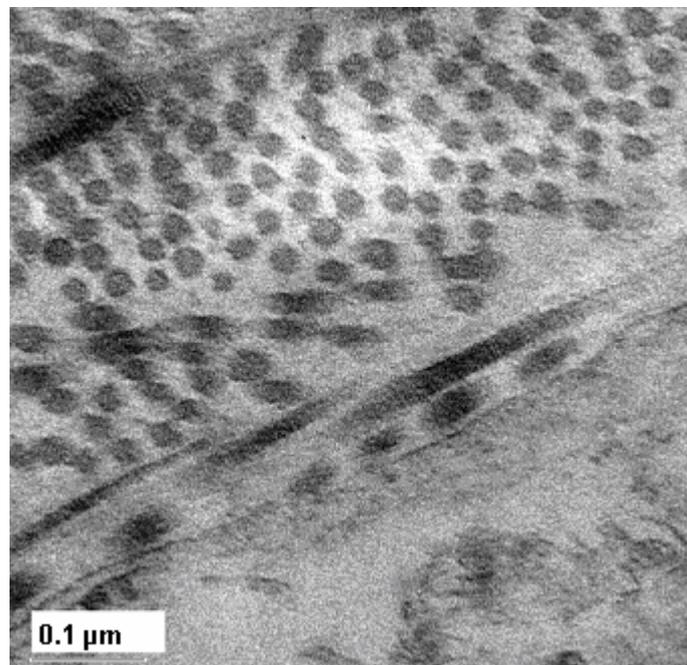


Abbildung 11: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen, Innenbereich einer Mikromassenkultur, Alter der Kultur: 21 Tage, Kollagenfibrillen quer getroffen

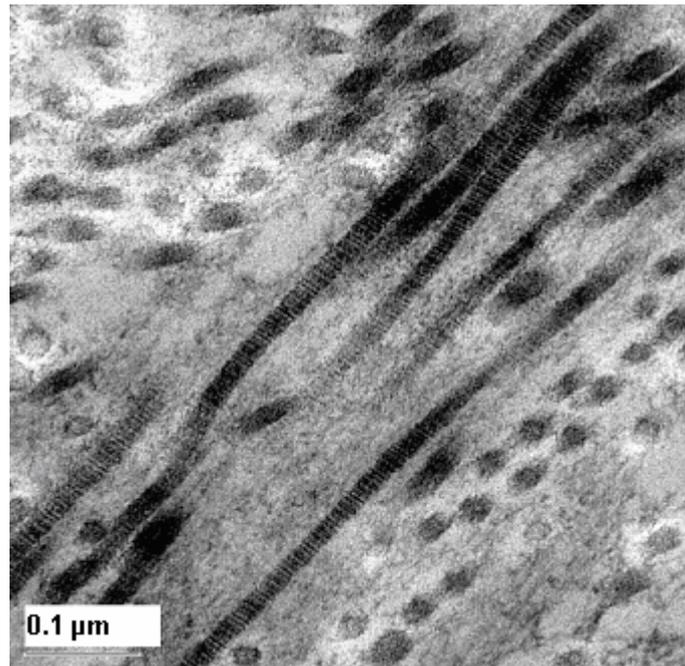


Abbildung 12: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen, Innenbereich einer Mikromassenkultur, Alter der Kultur: 21 Tage, Kollagenfibrillen längs getroffen

Unter dem Transmissionselektronenmikroskop können die bisher gefundenen Ergebnisse untermauert werden.

So zeigen sich nach 21 Tagen im Bereich der extrazellulären Matrix Ansammlungen von Kollagenfibrillen (**Abb. 10, 11 und 12**). Sie liegen dicht nebeneinander und weisen eine gewisse Ordnung auf. Es wechseln sich Bereiche längs angeschnittener mit quer angeschnittenen Kollagenfibrillen ab. Die längs angeschnittenen Fibrillen zeigen eine deutlich sichtbare periodisch gegliederte Querstreifung. Der Durchmesser der Kollagenfibrillen liegt zwischen 60 nm und 70 nm.

3.2 Übersicht und zeitlicher Verlauf der Matrixproteinbildung

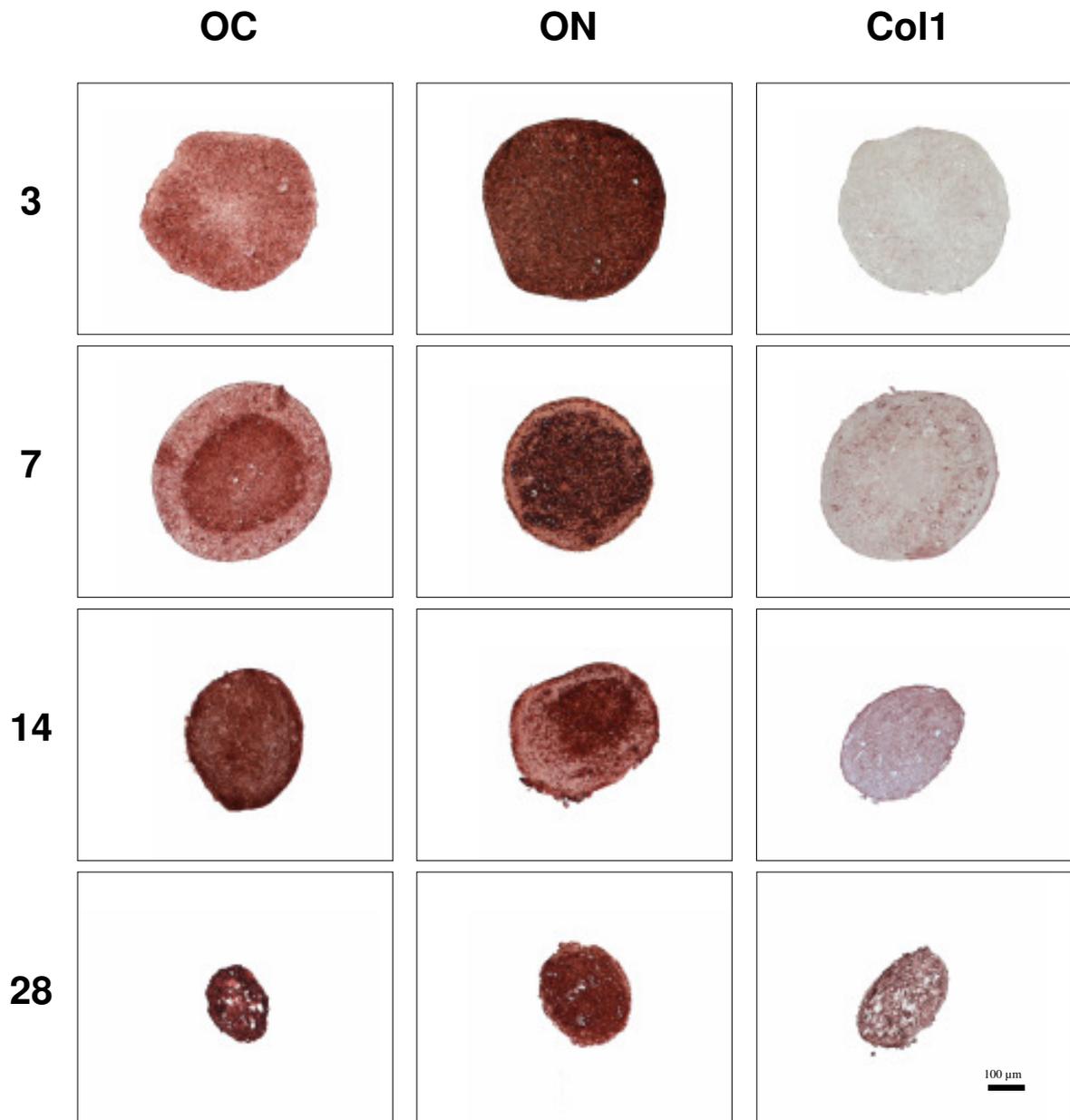


Abbildung 13: Übersicht und zeitlicher Verlauf der Matrixproteinbildung Osteonektin, Osteokalzin und Kollagen in den Mikromassenkulturen nach 3, 7, 14 und 28 Tagen

Abbildung 13 zeigt sowohl eine Übersicht als auch einen Verlauf über 3, 7, 14 und 28 Tagen der Mikromassenkulturen nach immunhistochemischer Färbung mit dem Matrixprotein Kollagen Typ I und den nicht-kollagen Matrixproteinen Osteokalzin und Osteonektin.

Die Mikromassenkulturen sind nach 3 Tagen große und rundliche Zellverbände. Im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen nimmt der Durchmesser der Aggregationen deutlich ab. Ab 14 Tagen sind sie eher rundlich bis oval. Nach 28 Tagen erkennt man im Innenbereich Vakuolen und vermehrt Extrazellularraum.

Die Expression des Matrixproteins Osteokalzin nimmt innerhalb der 28 Tage deutlich zu. Ab dem 7. Tag wird die Intensität im Innenbereich stärker. Ab dem 14. Tag zeigt sich eine starke und homogene Färbung des Zellverbandes. Die Intensität bleibt auch nach 28 Tagen stark, allerdings erscheint sie mit Unterbrechungen inhomogen.

Die Expression des Matrixproteins Osteonektin zeigt sich nach 3 Tagen sehr stark und homogen über die gesamte Mikromassenkultur verteilt. Nach 7 und 14 Tagen ist eine leichte, zirkuläre Abnahme der Intensität in den Randbereichen der Mikromassenkultur zu erkennen. Diese ändert sich auch nach 28 Tagen nicht.

Die Expression des Matrixproteins Kollagen nimmt ab dem 7. Tag an Intensität zu. Dabei beginnt die Expression zunächst multifokal in den Randbereichen der Mikromassenkultur. Die Färbung stellt sich nach 14 Tagen intensiver und homogener dar. Nach 28 Tagen ist eine weitere Zunahme zu erkennen, allerdings unter Verlust der Homogenität infolge eines vermehrten Extrazellularraumes in der Mikromassenkultur.



Abbildung 14: Aufnahme einer Mikromassenkultur, immunhistochemische Färbung für Osteokalzin, Alter der Kultur: 14 Tage

Abbildung 14 zeigt eine immunhistochemische Färbung einer Mikromassenkultur nach 14 Tagen für Osteokalzin. In diesem Beispiel kann man die Expression des Matrixproteins in zwei Bereiche mit erhöhter Expression unterteilen. Es liegt ein Bereich der fortgeschrittenen und ein Bereich der beginnenden Expression vor.

Die fortgeschrittene Expression befindet sich fokal im Innenbereich und nahe der Abschlußzellschicht (**Stern**). Sie ist unregelmäßig begrenzt und sehr intensiv.

Darüber befindet sich auch im Innenbereich der Mikromassenkultur ein Bereich beginnender Expression (**Abb. 14, Pfeil**). In diesem befinden sich 2 - 3 neue und noch relativ schwach ausgeprägte Herde weiterer Expression.

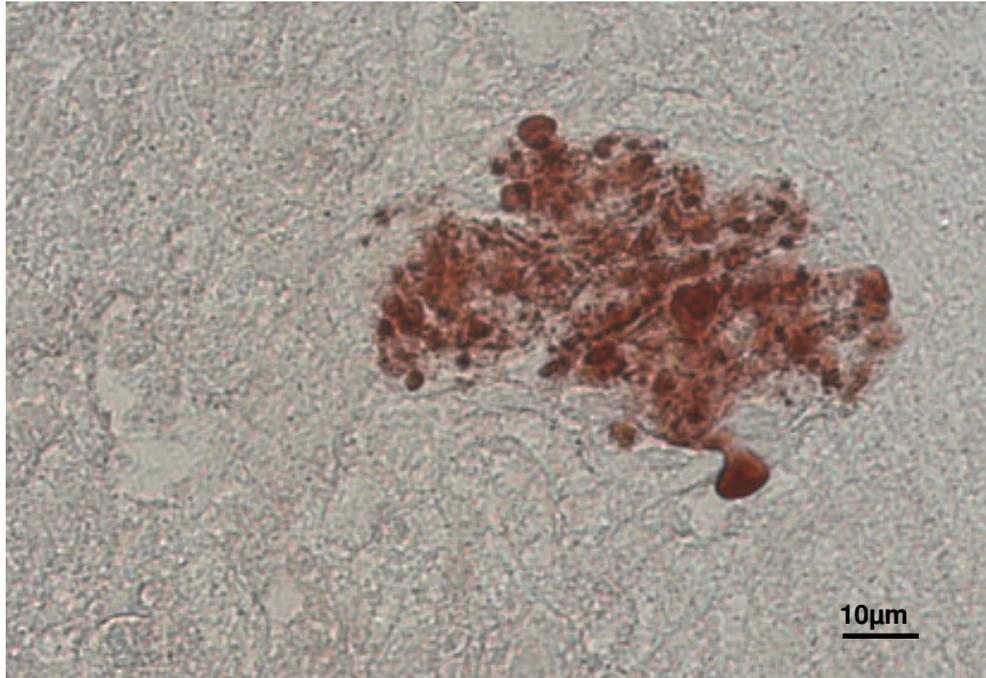


Abbildung 15: Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 14, Innenbereich der Mikromassenkultur, immunhistochemische Färbung für Osteokalzin, Alter der Kultur: 14 Tage

Abbildung 15 ist ein vergrößerter Ausschnitt aus **Abbildung 14**, auf dem die fortgeschrittene Expression des Matrixproteins Osteokalzin zu erkennen ist. Die Expression ist unregelmäßig und unscharf begrenzt. Die Intensität ist inhomogen.

3.3 Wechselwirkung zwischen Mikromassenkulturen und Agarose, Glas und Fibrin

3.3.1 Wechselwirkung zwischen Mikromassenkulturen und der mit Agarose beschichteten Kulturschale

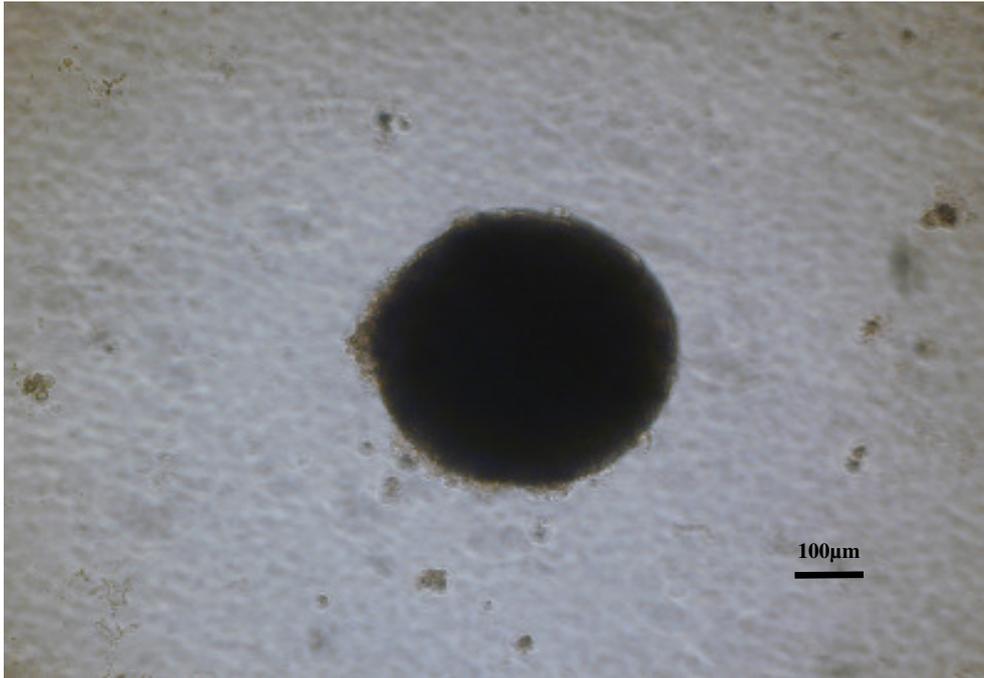


Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Mikromassenkultur auf Agarose, Alter der Kultur: 14 Tage

Abbildung 16 ist ein lichtmikroskopisches Bild einer kugeligen, dreidimensionalen Mikromassenkultur in einer mit Agarose beschichteten 96-well-Platte nach 14 Tagen. Diese ist rundlich und nahezu scharf begrenzt. Es sind keine Zellauswachsungen aus dem Zellverband sichtbar.

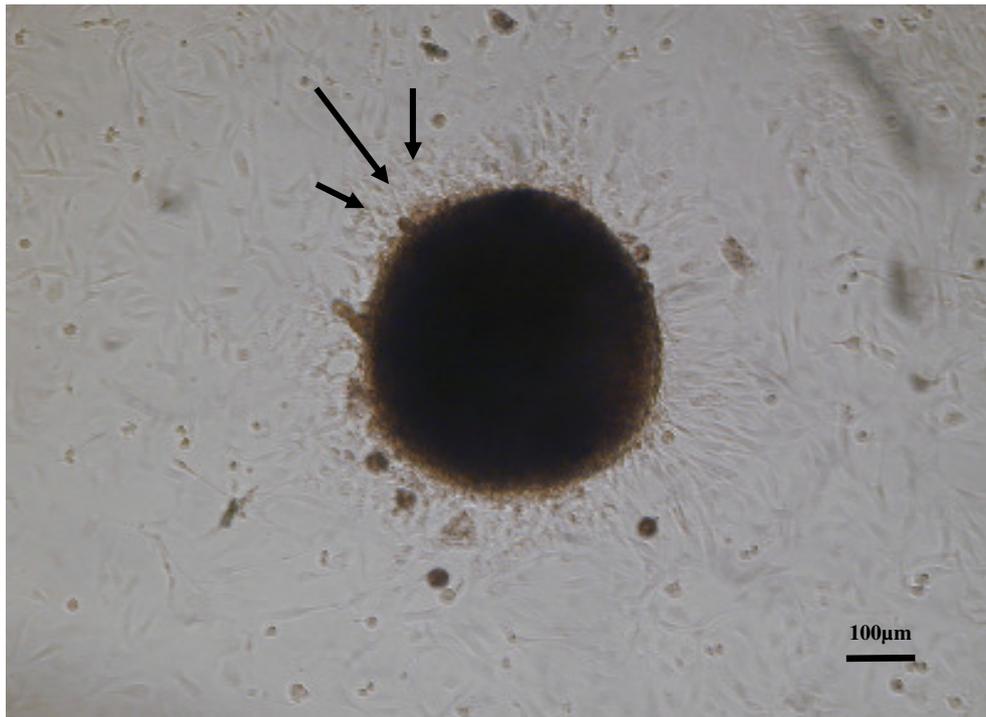


Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Mikromassenkultur auf Agarose, Alter der Kultur: 28 Tage

Abbildung 17 ist eine lichtmikroskopische Aufnahme einer Mikromassenkultur in einer mit Agarose beschichteten 96-well-Platte nach 28 Tagen. Man erkennt von der Mikromassenkultur ausgehende radiäre Zellabschnürungen bzw. Zellauswachsungen. Nahezu der gesamte Kulturboden ist von Osteoblasten besiedelt, wobei die Dichte der Zellen von der Mikromassenkultur ausgehend zum Randbereich hin abnimmt.

3.3.2 Wechselwirkung zwischen Mikromassenkulturen und Glas

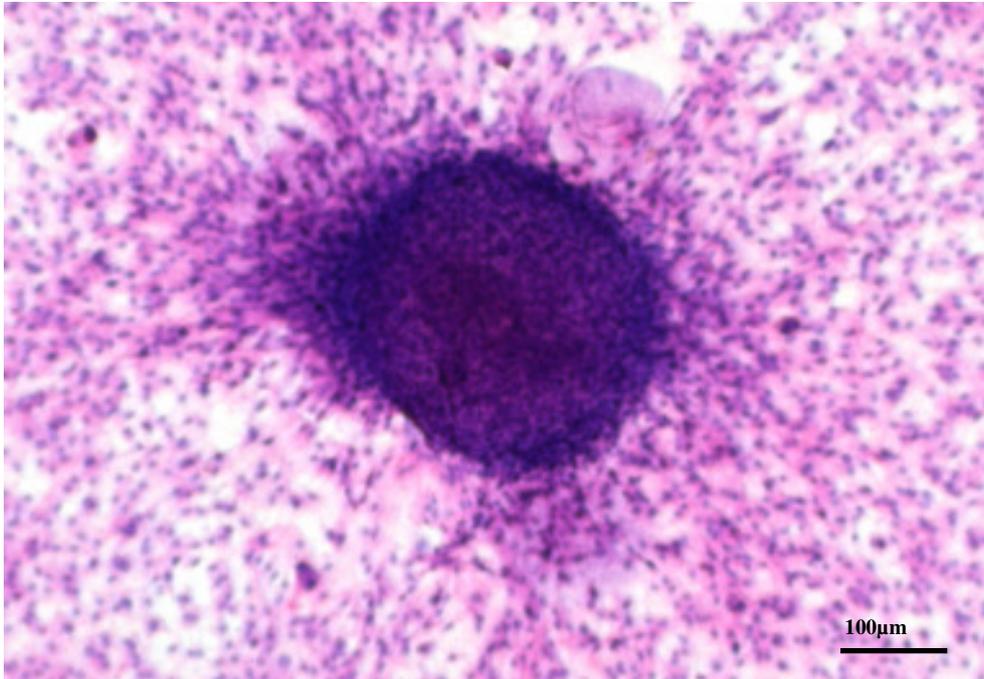


Abbildung 18: Mikromassenkultur, die nach der Kultivierung auf Agarose auf Glas umgesiedelt wurde, Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Alter der Kultur: 7 Tage

Abbildung 18 zeigt eine dreidimensionale Mikromassenkultur, die nach ihrer Entstehung auf Agarose auf Glas umgesiedelt wurde. Nach 7 Tagen erkennt man eine starke, radiäre Zellauswachsung aus dem Zellverband.

Die rundlich-ovale Mikromassenkultur ist allseits von Osteoblasten umgeben, wobei die Dichte im Randbereich abnimmt. Im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen nimmt die Zellauswachsung weiterhin zu, bis schließlich der gesamte Kulturboden homogen und intensiv von Osteoblasten besiedelt ist.

3.3.3 Wechselwirkung zwischen Mikromassenkulturen und Fibrin



Abbildung 19: 7 Tage alte Mikromassenkultur auf Fibrin, Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Alter der Kultur: 3 Tage

Nach 3-tägiger Kultivierung einer Mikromassenkultur auf Agarose wird diese auf eine Fibrinmembran umgesiedelt. **Abbildung 19** zeigt einen Querschnitt des Zellverbandes auf der Fibrinmembran nach weiteren 3 Tagen. Die Mikromassenkultur ist fast vollständig in die lockere Fibrinmembran eingesunken. Die Zellen wachsen aus dem Zellverband sowohl auf die Oberfläche der Fibrinmembran (**Pfeil**) als auch in die poröse Fibrinmembran hinein. Die Zellzahl nimmt nach peripher hin ab.

4. Diskussion

„Tissue engineering“ mit Trägermaterialien setzt eine gute Biodegradierbarkeit voraus, damit diese nicht nur als biologisch passive Implantate oder als Volumenfüller und Platzhalter ihre Anwendung finden. Trotz der interkonnektierenden Porenstruktur der Trikalziumphosphate, können Handschel et al. z.B. für β -TCP zeigen, dass im nicht beanspruchten Knochen eine Biodegradierbarkeit der β -TCP-Keramik als Maß der Integration in den Knochen auch nach 6 Monaten kaum stattfindet. Es resultiert eine lange Verweildauer am Applikationsort. Desweiteren besteht kein direkter Verbund zwischen den Osteoblasten und der Keramik [8]. Rossi et al. diskutieren, dass zweidimensionale Kulturen mit unnatürlichen geometrischen und mechanischen Einschränkungen, künstlichen Polarisierungen und vielen Zelltypen verbunden sind [19]. Daher ermöglichen die dreidimensionalen Mikromassenkulturen eine bessere Zelldifferenzierung und ähneln der In-vivo-Situation des Knochens deutlich mehr.

Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab, einen dreidimensionalen, knochenähnlichen Gewebeersatz – Mikromassenkulturen – aus Osteoblasten, die zunächst als Monolayer kultiviert werden, zu gewinnen. Der wesentliche Vorteil besteht in dem Verzicht auf Trägermaterialien und die damit verbundenen Nachteile wie Fremdkörperreaktion und begrenzte Langzeitstabilität, um ein dem natürlichen Knochen möglichst ähnlichen Gewebeersatz mit initialer Biomineralbildung in vitro zu gewinnen.

Das Verfahren ermöglicht die Herstellung eines dreidimensionalen, knochenähnlichen Konstruktes ohne Trägermaterialien aus Osteoblasten, die vorher als Monolayerkulturen angezüchtet werden.

Die aus dem Periost ausgewachsenen Zellen lassen sich als Monolayer gut proliferieren und differenzieren. Die Differenzierung zu Osteoblasten und die Fähigkeit zur Proliferation bleiben in den Mikromassenkulturen erhalten und stellen die Grundlage für das in vitro angezüchtete Knochengewebe dar. Die Mikromassenkulturen haben

daher osteoinduktive Eigenschaften und ein hohes Potential zur Knochenregeneration *de novo*.

Voraussetzung für eine Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten sowie einer Mineralisation der extrazellulären Matrix ist ein geeignetes Bioreaktorsystem. In den mit Agarose beschichteten Kulturplatten aggregieren die ausgesiedelten Osteoblasten bereits nach einer Stunde spontan zu rundlich-ovalen Mikromassenkulturen. Da die Osteoblasten zunächst nicht auf dem mit Agarose beschichteten Kulturboden adhären, findet ein Zusammenschluss der Osteoblasten zu einer dreidimensionalen Mikromassenkultur statt. Die Agarose erweist sich somit als ein geeignetes Material zur Gewinnung der Mikromassenkulturen. Im Gegensatz dazu, stellt die Glasoberfläche keinen geeigneten Kulturboden dar, denn die Mikromassenkultur, die nach ihrer Herstellung auf eine Glasoberfläche umgesiedelt wird, bleibt nur für einen limitierten Zeitraum bestehen. Bereits nach 7 Tagen verliert die Mikromassenkultur ihre dreidimensionale Struktur und die Osteoblasten proliferieren erneut als Monolayerkultur auf der Glasoberfläche.

Zur Herstellung von Mikromassen-Zellaggregaten sind aus der Literatur auch andere Ansätze bekannt. Yan et al. [29] verwendet beispielsweise ein Gelatine-/Zellaggregat, das zunächst mit einer computergesteuerten, Druck-kontrollierten Spritze nach einem programmierten Schema defektbezogen und relativ homogen hergestellt wird. Allerdings ist das Trägermaterial nur 2 Wochen stabil, bricht zusammen und verliert die Form. Die Voraussetzung für eine langfristige funktionelle Knochenregeneration ist somit nicht ausreichend gegeben. Das von Tischer et al. [23] verwendete System mit gefäßähnlicher Nährstoffversorgung von dreidimensional kultivierten Osteoblasten durch einen Polysulfonschlauch führt zu einer Adhärenz der Zellen auf der Oberfläche des Schlauches. Dieses System ist nicht in sich abgeschlossen und von einem ständigen Durchfluss des Mediums beeinträchtigt. Eine mögliche *in vivo* Verwendung und gezielte spätere Anwendung des Transplantates ist erschwert. Insbesondere stoffwechselaktive Zellen in einer dreidimensionalen Kultur benötigen für ihre Proliferation und Differenzierung eine optimale Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Bei der Verwendung von Trägermaterialien sollen die Poren und Kanäle des Materials diese Versorgung der Zellen gewährleisten. Zhang et al. [30] verwenden

eine schwammartige Matrixstruktur, die durch Aufschäumung unter Freisetzung von CO₂ beim Kontakt mit Wasser entsteht. Die bei der Aufschäumung entstehenden Blasen führen zu einer Porenbildung der Matrix, die eine Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr der Zellen sichern soll. Allerdings entsteht dabei kein homogenes, interkonnektierendes und durchgängiges Porensystem, das eine optimale Versorgung aller Zellen in der dreidimensionalen Kultur sichert.

Die im Rahmen dieser Arbeit engineernten Mikromassenkulturen sind Zellanhäufungen mit definierter reproduzierbarer Qualität bezüglich Anzahl, Form und Differenzierungsgrad. Sie sind rundlich-ovale und ca. 0,2 mm große Sphären, die durch den Zusammenschluss von etwa 200.000 Osteoblasten ohne Trägermaterialien entstehen. Aufgrund ihres Durchmessers sind die Mikromassenkulturen makroskopisch sichtbar und können entsprechend für in vivo Versuche leicht abgelöst und eingesetzt werden. Somit ist eine gezielte Applikation in Knochendefekte zur Regeneration des Gewebes möglich. Sie sind in sich abgeschlossen und stehen in keinem direkten Kontakt mit der Kulturschale. Eine häufig beschriebene deutliche Veränderung der Zellmorphologie oder des Zellverhaltens durch Oberflächenkontakt [19] kann somit vermieden werden.

Dabei enthalten die Mikromassenkulturen differenzierte Osteoblasten in hoher Anzahl. Die lichtmikroskopischen und transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen des Querschnittes der Mikromassenkultur ermöglichen es, zwei unterschiedliche Zelltypen morphologisch zu differenzieren.

Im Innenbereich der Mikromassenkulturen sind vorwiegend kubische Osteoblasten zu erkennen. Diese Zellmorphologie wird von Gideon A. Rodan reifen Osteoblasten zugeordnet. Er beschreibt reife Osteoblasten als kuboide, 20-30 µm große Zellen mit einem relativ länglich-ovalen Nukleus, die sich palisadenartig um die Matrix, die sie synthetisieren anordnen [18]. Sie sind aktiv, exprimieren spezielle Knochenmatrixmoleküle wie Kollagen Typ I und nicht-kollagene Proteine wie Osteokalzin und sind für die Mineralisation der Matrix von Bedeutung.

Die trabekulären Strukturbildungen im Innenbereich der Mikromassenkultur, die von den Osteoblasten leicht palisadenartig umgeben werden [16] ähneln Knochenbälkchen.

Die Expression kollagener und nicht-kollagener Matrixproteine in den Mikromassenkulturen weist charakteristische Muster eines natürlichen Knochens auf. Obwohl diese Makromoleküle auch in anderen Geweben vorkommen, ist ihre gemeinsame Expression und Ablagerung in der Matrix durch die Osteoblasten Ausdruck eines erheblichen biosynthetischen Repertoires der Osteoblasten [2]. Der reife Osteoblast hat die Fähigkeit, Membran-assoziierte Knochenmatrixmoleküle wie Kollagen Typ I zu synthetisieren [2], denn Kollagen Typ I ist ein primäres Produkt der Osteoblasten während der Knochenmatrixformation und macht ungefähr 90 % der gesamten organischen Matrix des reifen Knochens aus [2]. Die transmissionselektronenmikroskopischen Bilder einer 21 Tage alten Mikromassenkultur (Abb. 10,11 u. 12) zeigen, dass die Osteoblasten der Mikromassenkulturen eine strukturierte, extrazelluläre Kollagenmatrix synthetisieren. Es sind interzellulär dichte Ansammlungen von Kollagenfibrillen vorhanden. Diese weisen die für einen Kollagenfibrillentyp typische Querstreifung bzw. Bandenmuster auf. Sie beruht auf einer spezifischen Anordnung der Kollagenmoleküle [27]. Der Durchmesser von 60 - 70 nm der Kollagenfibrillen liegt etwas unterhalb der von Welsch für den Knochen angegebenen Durchschnittswerte von 0,1 μm bis 0,5 μm [5]. Dennoch sind die Kollagenfibrillen in den Mikromassenkulturen in der Regel vergleichbar zum natürlichen Knochen angeordnet. Die geordneten Kollagenfibrillen sind die Voraussetzung für die Bildung von funktionellem Biomineral.

Desweiteren stellt die Immunhistochemie einen positiven Beweis für die Expression der nicht-kollagenen Matrixproteine Osteonektin und Osteokalzin dar.

Redruello et al. [17] beschreiben Osteonektin als ein Kalzium bindendes Glykoprotein, das ein positiver Faktor sowohl in der Mineralisation und als auch in der Differenzierung der Osteoblasten darstellt. Außerdem wird Osteonektin in der Literatur eine Transmembranfunktion zwischen Matrix und Zellen zugeschrieben [21]. Die anfänglich erhöhte und im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen persistierende Expression von

Osteonektin, lässt eine deutliche Matrixbildung erkennen und ermöglicht somit eine Biomineralbildung.

Das Matrixprotein Osteokalzin ist ein sehr später Osteoblasten-Marker, der in Abhängigkeit von dem Reifestadium und dem Alter der Osteoblasten nicht von allen Zellen synthetisiert wird [2]. Eine hohe Expression dieses Matrixproteins setzt nach Aubin et al. [2] die Reife der Osteoblasten voraus. Somit lässt die deutlich zunehmende Expression des Matrixproteins Osteokalzin in den Mikromassenkulturen Rückschlüsse auf eine hohe Anzahl reifer Osteoblasten. Die Aktivitätssteigerung und die damit verbundene hohe Proteinsyntheseleistung der Osteoblasten ermöglichen eine weitere Mineralisation der vorhandenen Matrix *in vitro*.

Die Osteoblasten weisen Kommunikationskontakte [3] auf, die dem Austausch von Informationen zwischen den Osteoblasten dienen. Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen Membranverdichtungen benachbarter, nah beieinander liegender Osteoblasten (siehe Abb. 8) in der Mikromassenkultur. Diese Zellverbindung ähnelt einer „gap junction“. Sie ermöglicht den Osteoblasten einen interzellulären Stoffaustausch [27].

Das Vorhandensein von Zellorganellen wie das endoplasmatische Retikulum ist immer ein morphologischer Ausdruck einer erheblichen Proteinsynthese [27]. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Mikromassenkultur lassen die Zellorganellen der Osteoblasten erkennen. Diese Zellorganellen sind Ausdruck eines hohen Stoffwechsels während der Differenzierung der Zellen und Bildung der extrazellulären Matrix.

Lynch et al. [13] diskutieren, dass die Apoptose in der späten Mineralisationsphase *in vitro* eine entscheidende Rolle spielt und mit der Reifung der Osteoblasten und der Mineralisation des Gewebes verbunden ist. Nach 28 Tagen erkennt man im Innern der Mikromassenkultur Vakuolen und vermehrt Extrazellularraum. Diese morphologischen Veränderungen der Mikromassenkultur sind möglicherweise durch Apoptose verursacht. Dieser natürliche Mechanismus sichert die Differenzierung der Osteoblasten auch *in vivo* während der Reifung und Mineralisation des Gewebes.

In der Abschlußschicht der Mikromassenkultur erkennt man vorwiegend flache Osteoblasten. Diese ähneln den von Aubin et al. [2] beschriebenen langgestreckten und dünnen „Bone lining cells“. Diese Zellart ist eine eher inaktive Form [20], enthält weniger Zellorganellen [16] und kommt auf der Oberfläche des Knochens vor. In dieser Arbeit haben Osteoblasten der Abschlußschicht eher eine „epithelähnliche“ Funktion.

Im zeitlichen Verlauf von 28 Tagen zeigen die immunhistologischen Aufnahmen der Mikromassenkultur morphologische Veränderungen bezüglich der Größe und der Form. Die Mikromassenkultur ist nach 28 Tagen eher oval und mit 100 µm im Durchmesser eher etwas kleiner als in früheren Stadien. Eine mögliche Ursache der abnehmenden Größe der Mikromassenkultur scheint der mit Agarose beschichtete Kulturboden zu sein. Die im zeitlichen Verlauf zunehmende Adhärenz von Proteinen aus dem Kulturmedium führt zu einer Art „Proteinbeschichtung“, die die Adhärenz der Osteoblasten auf dem Kulturboden ermöglicht. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen nach 28 Tagen radiäre Zellauswachsungen aus der Mikromassenkultur.

Um eine optimale Funktion des Bioreaktorsystems zu gewährleisten und eine Bindung von Proteinen an der Oberfläche des Kulturbodens zu verringern, kann die Verwendung von „non-Attachment“-Materialien wie Teflon als Kulturbodenmaterial einen möglichen Vorteil versprechen.

Um auch komplexe und ausgedehnte Knochendefekten versorgen zu können, wird in dieser Arbeit die Co-Kultur von Mikromassenkulturen mit einem natürlichen Trägermaterial untersucht. Da Reparaturvorgänge bzw. Heilungsprozesse im Körper neben der Anwesenheit von Entzündungszellen und vaskulär durchlässigem Stroma gewöhnlich von Fibrin-Ablagerungen begleitet sind [7], wird eine Fibrinmembran als natürliches Trägermaterial verwendet. Hierzu wird die Mikromassenkultur nach ihrer Gewinnung auf eine Fibrinmembran umgesiedelt. Nach 3-tägiger Kultivierung der Co-Kultur erkennt man deutlich eine strukturelle Verteilung der Osteoblasten in und auf das natürliche Trägermaterial. Auf diese Weise kann die Regeneration auch bei komplexen Knochendefekten gewährleistet werden.

5. Schlußfolgerung

Diese Arbeit zeigt ein experimentelles Verfahren des „bone tissue engineering“ zur Gewinnung von knochenähnlichem Gewebe in vitro. Dabei ist es gelungen, Osteoblasten als Monolayer zu kultivieren und anschließend aus diesen Zellen dreidimensionale, stabile Mikromassenkulturen ohne Trägermaterialien herzustellen.

Die Osteoblasten der Mikromassenkulturen weisen deutliche Anzeichen einer Differenzierung mit hohem Reifungsgrad auf. Die Zellen synthetisieren in vitro eine knochenähnliche extrazelluläre Matrix, die eine deutliche Kollagenstruktur mit dem Potential der Biomineralisation erkennen lässt.

Die In-vitro-Rekonstruktion von Knochengewebe ohne Trägermaterial könnte somit eine geeignete Methode zur funktionellen Regeneration des Knochengewebes darstellen.

Für größere und komplexere Knochendefekte könnte die Kombination der Mikromassenkulturen mit einem geeigneten Biomaterial eine Versorgungsmöglichkeit bieten.

6. Ausblicke

Die weitere Forschung und Entwicklung muss zeigen, ob das hohe Potential der mesenchymalen und embryonalen Stammzellen eine Verbesserung der Mikromassenkultur bedeutet.

7. Lebenslauf und Danksagung

Lebenslauf

Name, Vorname:	Brickwedde, Katharina	
Geburtsdatum:	06. Januar 1979	
Geburtsort:	Steinfurt / Nordrhein-Westfalen	
Eltern:	Dipl.-Ing. Werner Antonius Brickwedde Mechthild Elisabeth Martha Brickwedde geb. Schüler	
Geschwister:	Werner Brickwedde jun.	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Schulbildung:	1985 - 1989	Grundschule Marienschule Steinfurt / Nordrhein-Westfalen
	1989 - 1998	Gymnasium Borghorst Steinfurt / Nordrhein-Westfalen
	1998	Abitur
Studium:	1999	Studium der Zahnmedizin Westfälische Wilhelms-Universität Münster / Nordrhein-Westfalen
	2000	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
	2002	Zahnärztliche Vorprüfung
	2005	Zahnärztliche Prüfung und Erhalt der Approbation
Praktikum:	2002, 2003	Prof. Dr. Dr. Georg Habel Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie / Plastische Operationen Münster
Beruf:	seit 2005	wissenschaftliche Mitarbeiterin Poliklinik für Zahnerhaltung / Universitätsklinikum Münster

Münster, den

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. U. Joos möchte ich für die Unterstützung meiner Arbeit danken.

Herrn PD Dr. Hans-Peter Wiesmann danke ich für die Überlassung des Themas meiner Arbeit, seine geduldige und jederzeit engagierte Unterstützung.

Ebenso danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen, Frau Irene Grabiniok, Frau Hildegard Schütte, Frau Anna Struck, Frau Magdalene Hartmann und Frau Claudia Kemming für ihre freundliche labortechnische Hilfe.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. K. Ott, Frau Fatima Abusua und Frau Lydia Lammers für einige sehr wertvolle Anregungen.

8. Literatur-und Abbildungsverzeichnis

Literaturverzeichnis

- [1] Anderer U, Libera J (2002)
In Vitro Engineering of Human Autogenous Cartilage
J Bone Miner Res. 17(8): 1420-9

- [2] Aubin JE (1998)
Advances in the osteoblast lineage
Biochem. Cell Biol., 76: 899-910

- [3] Doty SB (1981)
Morphological evidence of gap junctions between bone cells
Calcif Tissue Int 33: 509-512

- [4] Facer SR et al. (2005)
Rotary culture enhances pre-osteoblast aggregation and mineralization
J Dent Res. 84(6): 542-7

- [5] Ganter S, Arnheim K (1991)
Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie
Verlag Herder Freiburg, Bd. 2, S. 250

- [6] Glowacki J, Altobelli D, Mulliken JB (1981)
Fate of mineralized and demineralised osseous implants in cranial defects
Calcif Tissue Int 33: 71-76

- [7] Gorodetsky R et al. (1999)
Fibrin Microbeads (FMB) as Biodegradable Carriers for Culturing Cells and
for Accelerating Wound Healing
J Invest Derma 22; 866-72

- [8] Handschel et al (2002)
TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model
Biomat. 23: 1689-1695
- [9] Hartig M, Joos U und 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
- [10] Jones SJ and Boyde A, (1977)
The Migration of Osteoblasts
Cell Tiss. Res. 184: 179-193
- [11] Leonhardt H (1990)
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen
Bd.3, Thieme Verlag, Stuttgart
- [12] Lian JB et al. (1984)
Resorption of implanted bone prepared from normal and warfarin-treated rats
J Clin Invest 73: 1223-1226
- [13] Lynch MP et al. (1998)
Apoptosis During Bone-Like Tissue Development In Vitro
Journal of Cellular Biochemistry 68: 31-49
- [14] Meyer U and Wiesmann HP (2006)
Bone and Cartilage Engineering
Springer Verlag

- [15] Meyer U, Joos U and Wiesmann HP (2004)
Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering Part I
Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 33: 325-332
- [16] Owen TA et al. (1990)
Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix
J Cell Physiol. 143 (3): 420-30
- [17] Redruello B et al. (2005)
Isolation and characterization of piscine osteonektin and downregulation of its expression by PTH-related protein
J Bone Miner Res. 20(4): 682-92
- [18] Rodan GA and Rodan SB (1995)
The Cells of Bone
Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management 2: 1-39
- [19] Rossi MID et al. (2005)
Multicellular spheroids of bone marrow stromal cells : a three-dimensional in vitro culture system for the study of hematopoietic cell migration,
Braz. J. of Med and Biol Res 38: 1455-1462
- [20] Soldner E and Herr G (2001)
Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien
Trauma und Berufskrankheit 4: 256-269
- [21] Stryer L (1994)
Biochemie
Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, 2. korr. Nachdruck, S. 292

- [22] Sujata Kale et al. (2000)
Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone
Nat. Am. Inc. Vol 18: 954-958
- [23] Tischer T et al. (2004)
3D-Culturing of Human Osteoblastic Cells with Vessel-Like Nutrient Supply
Z Orthop Grenzgeb 142: 344-349
- [24] Trojani C et al. (2005)
Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel
Biomat. 26 (27): 5509-17
- [25] Van der Kraan et al. (2004)
Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering
Osteoarthritis Cartilage 10(8): 631-7
- [26] Wang Y et al. (2003)
Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials
Rev. Tissue Eng. 9(6):1205-14
- [27] Welsch U, Sobotta J (1997)
Farbaltlas der Zytologie, Histologie und Mikroskopischen Anatomie des Menschen
München, 5. Auflage

- [28] Wiesmann Hans-Peter et al. (2003)
Bone Tissue Engineering by Primary Osteoblast-Like Cells in a Monolayer System and 3-Dimensional Collagen Gel
J Oral Maxillofac Surg 61: 1455-1462
- [29] Yan Y et al. (2005)
Fabrication of viable tissue-engineered constructs with 3D cell-assembly technique
Biomaterials 26(29):5864-71
- [30] Zhang JY, Doll BA, Beckmann EJ, Hollinger JO (2003)
Three-dimensional biocompatible ascorbic acid-containing scaffold for bone tissue engineering
Tissue Engineering 9 (6): 1143-1157

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Frisch geschlachtetes Kälberbein	S. 15
Abb. 2	Grobpräparation des Kälberbeines	S. 15
Abb. 3	Feinpräparation des Kälberbeines	S. 16
Abb. 4	Perioststücke in der Zellkulturschale	S. 16
Abb. 5	96-well-Platte mit Agarose beschichtet	S. 19
Abb. 6	Übersicht eines Querschnittes durch die Mitte einer Mikromassenkultur, Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Alter der Kultur: 3 Tage	S. 29
Abb. 7	Vergrößerter Ausschnitt einer Mikromassenkultur, Abschlußzellschicht aus 2-3 Zellschichten, Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Alter der Kultur: 3 Tage	S. 30
Abb. 8	Vergrößerter Ausschnitt einer Mikromassenkultur, Abschlußzellschicht aus 2-3 Zellschichten, Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Alter der Kultur: 3 Tage	S. 3
Abb. 9	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme, Ausschnitt einer Mikromassenkultur, 2-3 lagige Abschlußzellschicht, Alter der Kultur: 7 Tage	S. 32
Abb. 10 - 12	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen, Innenbereich einer Mikromassenkultur, Alter der Kultur: 21 Tage, Kollagenfibrillen quer und längs getroffen	S. 4

- Abb. 13 Übersicht und zeitlicher Verlauf der Matrixproteine Osteonectin, Osteokalzin und Kollagen in Mikromassenkulturen nach 3, 7, 14 und 28 Tagen S. 35
- Abb. 14 Aufnahme einer Mikromassenkultur, immunhistochemische Färbung für Osteokalzin, Alter der Kultur: 14 Tage S. 7
- Abb. 15 Vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 10, Innenbereich der Mikromassenkultur, immunhistochemische Färbung für Osteokalzin, Alter der Kultur: 14 Tage S. 38
- Abb. 16 Lichtmikroskopische Aufnahme einer Mikromassenkultur auf Agarose, Alter der Kultur: 14 Tage S. 39
- Abb. 17 Lichtmikroskopische Aufnahme einer Mikromassenkultur auf Agarose, Alter der Kultur: 28 Tage S. 40
- Abb. 18 Mikromassenkultur, die nach der Kultivierung auf Agarose auf Glas umgesiedelt wurde, Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Alter der Kultur: 7 Tage S. 41
- Abb. 19 7 Tage alte Mikromassenkultur auf Fibrin, Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Alter der Kultur: 3 Tage S. 42

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

BDMA	N-Benzyl dimethylamine
BSA	Bovines Serum Albumin
Chem.	chemisch
cm	Zentimeter
DDSA	Dodecylbernsteinsäureanhydrid
Dest.	destilliert
DMSO	Dimethyl-Sulfoxide
FKS	Fetales Kälberserum
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
Krist.	kristallisiert
MNA	Methylnadicanhydride
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
PBS	Phosphate Buffered Saline