Funktionelle Charakterisierung von Zellsubpopulationen aus dem Periost anhand magnetischer Zellseparationen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Marcus Olbrich
aus Sindelfingen

Tübingen
2012

Funktionelle Charakterisierung von Zellsubpopulationen aus dem Periost anhand magnetischer Zellseparationen

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Marcus Olbrich
aus Sindelfingen

Tübingen
2012

Tag der mündlichen Qualifikation:	25.01.2013
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Stevanović
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Siegmar Reinert

Inhalt

Abbildungsverzeichnis 13

Abkürzungsverzeichnis 17

1. Einleitung 19

1.1. Stammzellen 19

1.1.1. Quellen von mesenchymalen Stammzellen 20

1.2. Oberflächenmarker von MSCs 20

1.3. Knochenentwicklung 21

1.4. Struktur des Periosts 22

1.5. Osteogenese 22

1.6. Tissue Engineering 23

1.7. Zellseparation 25

1.8. Fragestellung 26

2. Material und Methoden 28

2.1. Isolation und Kultivierung von humanen Kieferperiost-zellen 28

2.1.1. Grundlagen der Zellkultur 28

2.1.2. Zellkultur 28

2.1.3. Entnahme der Gewebeproben 28

2.1.4. Gewebeaufbereitung 29

2.1.5. Zellen einfrieren und auftauen 29

2.1.6. *In vitro*-Expansion der Kieferperiostzellen 30

2.1.7. Zellzählung 30

2.2. Zellseparationen 30

2.2.1 Separationsmethode der Firma Miltenyi Biotech (MACS) 31

2.2.1.1. Prinzip 31

2.2.1.2. Separation mittels MACS 32

2.2.2. Separationsmethode der Firma StemCell Technologies (EasySep) 33

2.2.2.1. Prinzip 33

2.2.2.2. Herstellung des Selektionscocktails 34
2.2.2.3. Separation mittels EasySep 34
2.3. Differenzierungsexperimente 35
2.3.1. Ansätze 35
2.3.1.1. Induktion 35
2.3.1.2. Osteogene Differenzierung 35
2.3.2. Ansätze für die Untersuchung der Zellseneszenz im Laufe der *in vitro* Expansion 36
2.4. Ermittlung der Verdoppelungszeit 36
2.5. Durchflusszytometrie (FACS) 37
2.5.1. Prinzip 37
2.5.2. Probenvorbereitung 37
2.6. RNA-Extraktion 38
2.7. cDNA-Synthese 39
2.7.1. Bestimmung der RNA-Konzentration 39
2.7.2. Umschreibung der RNA in cDNA 39
2.8. Analyse der Genexpression mittels quantitativer PCR (Polymerase Kettenreaktion) 40
2.8.1. Prinzip der PCR 40
2.8.2. Echtzeit-PCR 40
2.9. Immunhistochemie 41
2.9.1. Nachweis der Kalziumphosphat-Präzipitate 41
2.9.1.1. Alizarin-Färbung 41
2.9.1.2. Quantifizierung der Kalziumphosphat-Präzipitate 42
2.9.2. Nachweis der alkalischen Phosphatase 42
2.9.3. Nachweis der Zell-Seneszenz 43
2.10. Nachweis der Proteinexpression mit Hilfe von Proteom Profiler Arrays 43
2.11. Nachweis der Proliferationsfähigkeit 44

2.12. Besiedelung der 3D-Trägermatritzen 44
2.13. RNA Isolation aus 3D-kultivierten Zellen 45
2.14. Statistische Analyse 46
3. Ergebnisse 47
3.1. Bestimmung der Überlebensrate bzw. des Anteils positiver und negativer Zellfraktionen nach MACS und EasySep Zellseparationen 47
3.2 Analyse der Zellreinheit der mittels MACS und EasySep separierten Zellfraktionen 48
3.3. Mineralisationskapazität der durch MACS und EasySep separierten Zellfraktionen 50
3.4. Bestimmung der Mineralisationskapazität im Laufe der *in vitro* Passagierung 51
3.5. Bestimmung der Zellverdoppelungszeit im Laufe der *in vitro* Passagierung nach MACS und EasySep Separationen 54
3.6. Analyse der mitochondrialen Aktivität von MACS und EasySep separierten Zellfraktionen im Laufe der *in vitro* Passagierung 56
3.6.1. Mitochondriale Aktivität direkt nach der Separation 56
3.6.2. Proliferationsverhalten der Zellfraktionen in den nach der Separation folgenden Passagen 58
3.6.2.1. Zellen der Passage 8 58
3.6.2.2. Zellen der Passage 9 60
3.6.2.3. Zellen der Passage 11 61
3.6.2.4. Zellen der Passage 13 62
3.7. Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (AP) Aktivität in MACS und EasySep separierten Zellfraktionen 64
3.7.1. AP Aktivität in den MACS separierten Zellfraktionen 66
3.7.2. AP Aktivität in den EasySep separierten Zellfraktionen 66
3.8. Untersuchung der Zellseneszenz im Laufe der *in vitro* Passagierung von MACS und EasySep separierten Zellfraktionen 67
3.8.1. ß-Galaktosidase Expression in den MACS separierten Zellfraktionen 69

3.8.2. ß-Galaktosidase Expression in den EasySep separierten Zellfraktionen....70
3.9. Untersuchungen der Genexpression in MACS und Easy Sep separierten Zellfraktionen im Laufe der osteogenen Differenzierung in der Passage nach der Separation 71
3.9.1. Genexpression von Osterix (Osx)....71
3.9.2. Genexpression der alkalischen Phosphatase (AP)....72
3.9.3. Genexpression von runt related transcription factor-2 (Runx-2) 74
3.9.4. Genexpression von Insuline-like growth factor-2 (Igf-2)....75
3.9.5. Genexpression von Interleukin-1 alpha (IL-1α)....76
3.9.6. Genexpression von Interleukin-1 beta (IL-1β)....77
3.9.7. Genexpression von Interleukin-6 (IL-6)....78
3.9.8. Genexpression von Interleukin-8 (IL-8)....79
3.10. Untersuchungen der Genexpression in MACS und Easy Sep separierten Zellfraktionen im Laufe der osteogenen Differenzierung und der *in vitro* Passagierung nach der Separation....81
3.10.1. Genexpression von Osterix (Osx)....81
3.10.2. Genexpression der Alkalischen Phosphatase (AP) 82
3.10.3. Genexpression von Runt related transcription factor-2 (Runx-2)....84
3.10.4. Genexpression von Insuline-like growth factor-2 (Igf-2)....85
3.10.5. Genexpression von Low affinity nerve growth factor receptor (LNGFR)....86
3.10.6. Genexpression von Interleukin-1 alpha (IL-1α)....88
3.10.7. Genexpression von Interleukin-1 beta (IL-1ß)....89
3.10.8. Genexpression von Interleukin-6 (IL-6)....91
3.10.9. Genexpression von Interleukin-8 (IL-8)....92
3.11. Genexpression verschiedener Seneszenzmarker 94
3.11.1. Genexpression der cyclin depending kinase 4 (CDK4)....94
3.11.2. Genexpression des cyclin depending kinase inhibitor 2A (CDKN2A) 96
3.11.3. Genexpression von Insuline-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) 97

3.11.4. Genexpression von Insuline-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) 99
3.11.5. Genexpression von Insuline-like growth factor binding protein-7 (IGFBP-7) 101
3.11.6. Genexpression von Regucalcin (RGN) 103
3.12. Untersuchungen der Proteinexpression in MACS und EasySep separierten Zellfraktionen im Laufe der osteogenen Differenzierung in der Separationspassage 105
3.12.1. Proteinexpression in MACS separierten Zellfraktionen an Tag 10 der osteogenen Stimulation 106
3.12.2. Proteinexpression in MACS separierten Zellfraktionen an Tag 25 der osteogenen Stimulation 106
3.12.3. Proteinexpression in EasySep separierten Zellfraktionen an Tag 10 der osteogenen Stimulation 106
3.12.4. Proteinexpression in EasySep separierten Zellfraktionen an Tag 25 der osteogenen Stimulation 107
3.13. Untersuchungen der Genexpression in MACS und Easy Sep separierten Zellen, die innerhalb dreidimensionaler (3D) Konstrukte kultiviert wurden..... 107
3.13.1. Genexpression von Osterix (Osx) 108
3.13.2. Genexpression der Alkalischen Phosphatase (AP) 109
3.13.3. Genexpression von Runt related transcription factor-2 (Runx-2) 109
3.13.4. Genexpression von Insuline-like growth factor-2 (Igf-2) 110
3.13.5. Genexpression von Low density nerve growth factor receptor (LNGFR) ..111
3.13.6. Genexpression von Interleukin-1 beta (IL-1α) 112
3.13.7. Genexpression von Interleukin-1 beta (IL-1β) 113
3.13.8. Genexpression von Interleukin-6 (IL-6) 114
3.13.9. Genexpression von Interleukin-8 (IL-8) 115

3.14. Untersuchungen der Proteinexpression in MACS und EasySep separierten Zellen, die innerhalb drei-dimensionaler (3D) Konstrukte kultiviert wurden 116

3.14.1. Proteinexpression in MACS separierten Zellfraktionen an Tag 10 der osteogenen Stimulation 117

3.14.2. Proteinexpression in MACS separierten Zellfraktionen an Tag 15 der osteogenen Stimulation 118

3.14.3. Proteinexpression in EasySep separierten Zellfraktionen an Tag 10 der osteogenen Stimulation 118

3.14.4. Proteinexpression in EasySep separierten Zellfraktionen an Tag 15 der osteogenen Stimulation 119

4. Diskussion 120

5. Zusammenfassung 145

6. Summary 147

7. Literaturverzeichnis....149

8. Danksagungen....162

9. Lebenslauf 164

Publikationen und Kongressbeiträge 165

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip des Tissue Engineerings (modifiziert, nach [3]) 24
Abbildung 2: Schema der MACS-Separation 32
Abbildung 3: Schema der EasySep-Separation 34
Abbildung 4: Gesamtüberlebensrate (in %) 47
Abbildung 5: Anteil der überlebenden MSCA-1^- und MSCA-1^+ Zellen (in %) 48
Abbildung 6: Untersuchung der Zellreinheit 49
Abbildung 7: Mineralisationskapazität der MSCA-$1^{-/+}$ Zellfraktionen in der Passage der MACS (A) und EasySep (B) Separationen. 50
Abbildung 8: Mineralisationskapazität von MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen der Passage 8 51
Abbildung 9: Mineralisationskapazität von MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen der Passage 9 52
Abbildung 10: Mineralisationskapazität von MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen der Passage 11 53
Abbildung 11: Mineralisationskapazität von MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen der Passage 13 53
Abbildung 12: Verdoppelungszeit (in Tagen) 56
Abbildung 13: Proliferationsverhalten (gemessen an der mitochondrialen Aktivität; auf der y-Achse ist die optische Dichte dargestellt) in Zellen der Separationspassage 58
Abbildung 14: Proliferationsverhalten (gemessen an der mitochondrialen Aktivität; auf der y-Achse ist die optische Dichte dargestellt) in Zellen der Passage 8 59
Abbildung 15: Proliferationsverhalten (gemessen an der mitochondrialen Aktivität; auf der y-Achse ist die optische Dichte dargestellt) in Zellen der Passage 9 61
Abbildung 16: Proliferationsverhalten (gemessen an der mitochondrialen Aktivität; auf der y-Achse ist die optische Dichte dargestellt) in Zellen der Passage 11 62
Abbildung 17: Proliferationsverhalten (gemessen an der mitochondrialen Aktivität; auf der y-Achse ist die optische Dichte dargestellt) in Zellen der Passage 13 64
Abbildung 18: Aktivität der alkalischen Phosphatase 65

Abbildung 19: Nachweis der Zellseneszenz 69
Abbildung 20: Quantitative Analyse der Osterix (Osx) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. .. 72
Abbildung 21: Quantitative Analyse der alkalischen Phosphatase (AP) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B). 73
Abbildung 22: Quantitative Analyse der runt related transcription factor-2 (Runx-2) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. 74
Abbildung 23: Quantitative Analyse des Insiuline-like growth factor-2 (Igf-2) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. 76
Abbildung 24: Quantitative Analyse der Interleukin-1 alpha (IL-1α) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen 77
Abbildung 25: Quantitative Analyse der Interleukin-1 beta (IL-1β) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen 78
Abbildung 26: Quantitative Analyse der Interleukin-6 (IL-6) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. .. 79
Abbildung 27: Quantitative Analyse der Interleukin-8 alpha (IL-8) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen 80
Abbildung 28: Quantitative Analyse der Osterix (Osx) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) Zellen. 82
Abbildung 29: Quantitative Analyse der alkalischen Phosphatase (AP) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. 83
Abbildung 30: Quantitative Analyse der Runt related transcritpion factor-2 (Runx-2) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. 85
Abbildung 31: Quantitative Analyse der Insuline-like growth factor-2 (Igf-2) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. 86

Abbildung 32: Quantitative Analyse der Low affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. 87
Abbildung 33: Quantitative Analyse der Interleukin-1 alpha (IL-1α) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. 89
Abbildung 34: Quantitative Analyse der Interleukin-1 beta (IL-1β) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. 91
Abbildung 35: Quantitative Analyse der Interleukin-6 (IL-6) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. .. 92
Abbildung 36: Quantitative Analyse der Interleukin-8 (IL-8) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. .. 93
Abbildung 37: Quantitative Analyse der cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. 95
Abbildung 38: Quantitative Analyse der Cyclin-dependent kinase inhibitors 2A (CDKN2A) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. 97
Abbildung 39: Quantitative Analyse der Insuline-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B). 99
Abbildung 40: Quantitative Analyse der Insuline-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. 101
Abbildung 41: Quantitative Analyse der Insuline-like growth factor binding protein-7 (IGFBP-7) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. 103
Abbildung 42: Quantitative Analyse der Regucalcin (RGN) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. 104
Abbildung. 43: Untersuchungen der Proteinexpression in MACS (A, C) und EasySep (B, D) separierten MSCA-$1^{-/+}$ Fraktionen an Tag 10 und 25 der osteogenen Stimulation 105

Abbildung 44: Expression von Osterix in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen. 108
Abbildung 45: Expression der alkalischen Phosphatase in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) Zellfraktionen. 109
Abbildung 46: Expression von Runt related transcription factor 2 in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) Zellfraktionen. 110
Abbildung 47: Expression von Insuline-like growth factor-2 in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) Zellfraktionen. 111
Abbildung 48: Expression von LNGFR in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) Zellfraktionen. 112
Abbildung 49: Expression von Interleukin-1 alpha in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) Zellfraktionen. 113
Abbildung 50: Expression von Interleukin-1 beta in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) Zellfraktionen. 114
Abbildung 51: Expression von Interleukin-6 in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) Zellfraktionen. 115
Abbildung 52: Expression von Interleukin-8 in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) Zellfraktionen. 116
Abbildung 53: Proteinexpression in Überständen von 3D-kultivierten Zellen. 117
Abbildung 54: Aktiver und inaktiver Wnt-Signaltransduktionsweg und seine regulatorische Wirkung auf die Genexpression (nach 81 – 82; Beschreibung siehe Text) 131

Abkürzungsverzeichnis

ALCAM	**a**ctivated **l**eukocyte **c**ell-**a**dhesion **m**olecule
AMCs	**a**mniotic **m**esenchymal **c**ells
AP	**a**lkalische **P**hosphatase
APC	**a**denomatous **p**olyposis **c**olin
BMPRIA	**b**one **m**orphogenetic **p**rotein **r**eceptor **IA**
Ca	Kalzium
Cbfa1	**c**ore **b**inding **f**actor **a**lpha **1**
CD	**c**luster of **d**ifferentiation
CDKN2A	**c**yclin-**d**ependent **k**inase i**n**hibitor **2A**
CDKs	**c**yclin-**d**ependent **k**inases
cDNA	**c**opy **DNA**
CFU-F	**c**olony-**f**orming **u**nit **f**ibroblasr
CMCs	**c**horionic **m**esenchymal **c**ells
DMACS	**d**roppled based **ma**gnetic **c**ell **s**eparation
DMEM	**D**ulbeco's **m**odified **E**agles **m**edium
DMSO	**D**i**m**ethy**ls**ulf**o**xid
DNA	**D**esoxyribo**n**uklein**s**äure
dNTP	**D**esoxy**n**ukelosid**t**ri**p**hosphat
Dsh	**D**i**sh**eveld
ECL	**E**nhanced **C**hemi**l**uminescence
EDTA	**E**thylen**d**iaminte**t**raacetic **a**cid
EZM	**E**xtra**z**elluläre **M**atrix
FACS	**f**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**orting (Durchflusszytometrie)
FCS	**F**ötales **K**älber**s**erum
Fzd	**F**ri**z**zele**d**
GAPDH	**G**lycerin**a**ldehyd-3-**p**hosphat-**D**e**h**ydrogenase
GSK3β	**G**lykogen **S**ynthase **K**inase **3β**
HLA	**h**uman **l**eukocyte **a**ntigen
HRP	**h**ores**r**adish **p**eroxidase
Igf-2	**i**nsuline-like **g**rowth **f**actor**-2**
IGFBP	**i**nsuline-like **g**rowth **f**actor **b**inding **p**rotein
IL	**I**nter**l**eukin
iPS	**i**nduced **p**luripotent **s**tem cells
ITGA5	In**te**g**r**in **a**lpha **5**
JPC	**j**aw **p**eriosteal **c**ells (humane Kieferperiostzellen)
Klf4	**k**ruppel **l**ike **f**actor 4
Ko	**Ko**ntrolle
LNGFR	**l**ow **n**erve **g**rowth **f**actor **r**eceptor
LRP	**l**ow **d**ensity **l**ipoprotein
MACS	**m**agetic **a**ctivated **c**ell **s**orting
Mg	**Mg**nesium
MMP	**M**atrix-**M**etallo**p**rotease
MSC	**m**esenchymal **s**tem **c**ell
MSCA-1	**m**esenchymal **s**tem **c**ell **a**ntigen**-1**
MTT	**M**ikrokultur **Te**t**r**azolium
OB	**O**steo**b**lasten-spezifisches Medium

Oct3/4	**oct**amer binding transcription factor **3/4**
OPLA	**o**pen-cell **p**oly**l**actic **a**cid
OPN	**O**steo**p**onti**n**
Osx	**Os**teri**x**
PBS	**p**hosphat **b**uffered **s**aline
PCR	**p**olymerase **c**hain **r**eaction
PE	**P**hyko**e**rythrin
PESCs	**p**arethogenetische **e**mbryonale **S**tamm**z**ellen
PGA	**P**oly**g**lykol**s**äure
PLA	**P**oly**l**aktid**s**äure
PLGA	**P**oly**l**aktid-**G**lykol**s**äure
PLLA	**P**oly-**L**-**L**aktid-**S**äure
RECK	**re**version-inducing-**c**ystein rich protein with **k**azal motifs
RGN	**R**e**g**ucalci**n**
RNA	**R**ibo**n**uklein**s**äure
Runx-2	**run**t-related transcription factor**-2**
SCID	**s**evere **c**ombined **i**mmuno**d**eficiency
SEM	**s**tandard **e**rror of **m**ean
Sox2	**S**RY-b**ox-2**
STC-1	**St**annio**c**alcin**-1**
TCF/LEF	**t**ranscription**c**omplex T-cell **f**actor/**l**ymphoid **e**nhancer **f**actor
TIMP-4	**t**issue **i**nhibitor of **m**etallo**p**roteinase**-4**
TNAP	**t**issue **n**on-specific **a**lkaline **p**hosphatase
VCAM-1	**v**ascular **c**ell **a**dhesion **m**olecule**-1**
WT	**W**ild**t**yp

1. Einleitung

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie spielt der Knochenersatz eine zunehmend größere Rolle. So wird je nach geographischer Region jedes 300 - 2500. Kind mit einer Kiefer-Gaumen-Spalten geboren [1]. Zudem zeigen sich in einer Gesellschaft, die zunehmend altert durch Knochenrückbildung vermehrt Knochendefekte im Kieferbereich. Krebsarten, die Mund und Rachen befallen, stehen an sechster Stelle der weltweit am häufigsten vorkommenden Krebsarten mit 30.000 neuen Fällen jährlich in den USA, bei 8.000 Todesfällen [2]. Bei Tumorpatienten müssen oft große Teile des befallenen Kieferknochens resiziert werden. Bei diesen Krankheitsbildern ist zur (Wieder-) Erlangung der Lebensqualität mit möglichst geringen Einschränkungen ein Aufbau des entfernten oder fehlenden Knochengewebes nötig. Die Standardtherapie für die Knochenrekonstruktion im Kieferbereich stellt die autologe Knochentransplantation dar, für die in den meisten Fällen Knochenmaterial aus dem Beckenkamm entnommen und an der Defektstelle eingesetzt wird. Hierdurch entsteht jedoch ein zweiter Defekt an der Entnahmestelle, der als Donormorbidität bezeichnet wird.
Als Alternative zu der Goldstandardtherapie Methode bietet sich das Verfahren des Tissue Engineerings an. Hierbei wird aus einem geeigneten Gewebe Stammzellen entnommen, diese *in vitro* auf dreidimensionalen Biomaterialien gezüchtet und den Patienten das angepasste Konstrukt in den Defekt implantiert [3]. Besonders im Bereich der Kieferrekonstruktion bietet sich dieses Verfahren an, da es weniger invasiv als die Entnahme von Knochen aus dem Beckenkamm ist und keine zusätzliche Donormorbidität verursacht.

1.1. Stammzellen

Nach der Befruchtung beginnt die Entwicklung von Säugern mit der totipotenten Zygote, aus der alle spezialisierten Zellen eines Individuums hervorgehen. Im Laufe der Entwicklung des frühen Embryos entsteht die pluripotente innere Zellmasse und das Trophektoderm. Aus der pluripotenten inneren Zellmasse, die auch als embryonale Stammzellen bezeichnet wird, entwickeln sich die drei Keimblätter [4]. Aus diesen gehen die mehr als 200 Zelltypen des erwachsenen Organismus hervor. Im adulten Stadium sind in vielen Gewebetypen multipotente Stammzellen lokalisiert, das Knochenmark beherbergt sowohl hämatopoietische, aus denen die verschiedenen Blutzellen hervorgehen [5] als auch mesenchymale Stammzellen, aus denen die Zellen

des Mesenchyms wie Osteoblasten, Knorpelzellen (Chondrozyten) oder Fettzellen (Adipozyten) hervorgehen [6-7].
Bereits ausdifferenzierte Zellen können durch die Zugabe der Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc in einen Zustand überführt werden, der embryonalen Stammzellen ähnelt. Diese Zellen werden als induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) bezeichnet. Sie besitzen die Morphologie und Wachstumseigenschaften von embryonalen Stammzellen. Zudem bieten iPS-Zellen den Vorteil, dass sie autolog sind und somit das Risiko der Immunabstoßung im therapeutischen Ansatz herabsetzen [8-10].
Mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells = MSCs) werden neben ihrer Fähigkeit in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten zu differenzieren phänotypisch über weitere Merkmale definiert wie die Plastikadhärenz unter normalen Zellkulturbedingungen und die Expression der Oberflächenmoleküle CD105, CD73 und CD90, sowie der fehlenden Expression von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79α oder CD19 sowie HLA-DR [11].

1.1.1. Quellen von mesenchymalen Stammzellen

Als klassische Quelle für MSCs hat sich das Knochenmark etabliert mit einem Anteil von 0,001 – 0,1% [6; 12], neben dieser Quelle können MSCs auch aus Synovialgewebe [13] und Fettgewebe [14] isoliert werden. Letzteres bietet den Vorteil gegenüber dem Knochenmark, dass für entsprechende Behandlungen leichter eine größere Gewebemenge entnommen werden und die anschließende Zellausbeute erhöhen kann. Stammzellen für die osteogene Differenzierung können aus Nabelschnurblut, aus embryonalem Gewebe, aus Muskeln sowie aus dentaler Pulpa gewonnen werden [15]. Neben diesen Quellen finden sich Stammzellen mit mesenchymalen Eigenschaften auch im adulten humanen Periost. Diese Zellen lassen sich unabhängig vom Alter des Spenders zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren [16-17].

1.2. Oberflächenmarker von MSCs

Wie oben bereits erwähnt, definierte Dominici [11] den Phänotyp der MSCs anhand der Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90. Die Expression der Oberflächenantigene CD73 und CD105 wurde auf CD271 (low affinity nerve growth factor receptor = LNGFR) exprimierenden Zellen aus dem Knochenmark detektiert [18]. Neben die-

sen drei Oberflächenmarkern ist noch Stro-1 zur Isolation von MSCs aus dem Knochenmark beschrieben [19-20]. Jones und Kollegen [12] beschrieben MSCs aus dem Knochenmark als Zellen, die neben CD105, LNGFR und CD90 ebenfalls CD10, CD13 und BMPRIA (bone morphogenetic protein receptor IA) exprimierten. Humane Kieferperiostzellen sind CD29, CD73 und CD90 sowie CD105, CD140b und CD166 positiv aber negativ für den hematopoietischen Marker CD45 [21]. CD106 (VCAM-1) ist auf undifferenzierten MSCs exprimiert, wird jedoch wie Stro-1 mit zunehmender Passagenzahl herunterreguliert [22]. Mit W8B2 ist ein Antikörper beschrieben worden, der an plastikadhärente MSCs bindet, die u.a. CD73, CD90 und CD105 exprimieren [23-34]. Er bindet spezifisch an das Antigen MSCA-1 (mesenchymal stem cell antigen-1), welches identisch mit TNAP (tissue non-specific alkaline phosphatase; [25]) ist. In Zellfraktionen, die positiv für MSCA-1 und CD56 waren, zeigte sich der Anteil an MSCs um das 18-fache erhöht. Diese Zellfraktion differenziert nicht zu Adipozyten, die MSCA-1^+ $CD56^-$ Zellfraktion hingegen schon [26]. Aus dem humanen Kieferperiost konnte mithilfe von MSCA-1 Antikörper eine Subpopulation isoliert werden, die ein höheres osteogenes Potenzial als die entsprechende MSCA-1^- Zellfraktion [21] aufweist.

1.3. Knochenentwicklung

Bei Knochen handelt es sich um eine spezialisierte Form von mineralisiertem Bindegewebe. Hierin bilden Osteoblasten eine Matrix aus Kollagen, in die sie Kalziumphophosphat abscheiden, das zu Hydroxyapatit aushärtet. Knochen können sich auf zwei Arten bilden: zum einen über endochondrale Ossifikation. Hierbei entwickeln sich mesenchymale Zellen über Verdichtungen zu Chondrozyten, die als Knorpelvorlage des späteren Knochens dienen. Diese Vorlage wird über Apoptose und Einwanderung von Osteoblasten sowie der Mineralisierung deren extrazellulären Matrix mit Knochensubstanz ersetzt. Im Bereich des Schädels (bestehend aus Neurokranium und Viszerokranium, zu welchem der Kieferbereich zählt) hingegen erfolgt die Osteogenese als direkte Differenzierung aus Mesenchym (desmale Ossifikation). Hierbei bilden mesenchymale Zellen aus dem Neuralkamm kompakte Verdichtungen. Einige dieser Zellen entwickeln sich zu Osteoblasten, die eine spezifische Matrix bilden, die Kalzium bindet. Osteoblasten, die in diese Matrix eingebettet werden, bilden zu einem späteren Zeitpunkt die Osteozyten, die in einen gewissen Ruhezustand übergehen.

1.4. Struktur des Periosts

Das Periost besteht aus drei Zonen. Die osteogenen Vorläuferzellen befinden sich nur in der inneren Kambiumschicht, wohingegen die darauf folgende Zone, die fibröse Schicht, hauptsächlich Fibroblasten enthält. Die dritte Zone besteht in erster Linie aus Kollagenfasern [27-28]. Die Kambiumschicht ist von Blutgefäßen und Nerven durchzogen, was das Periost im Gegensatz zum Knochen schmerzempfindlich macht. Das Periost bedeckt die äußeren Flächen der Knochen, mit Ausnahme der Gelenke und dient als Ansatzpunkt für Sehnen und Muskeln. Darüber hinaus schützt es den umhüllten Knochen. Da eine verlässliche Trennung der verschiedenen Schichten des menschlichen Periostgewebes auf Grund ihrer geringen Dicken schwierig ist, handelt es sich hierbei um eine recht heterogene, gemischte Zellpopulation. Demnach stellt die Identifizierung charakteristischer Marker für osteogene Vorläuferzellen aus dem Periost eine Herausforderung dar.

Zellen aus dem Periost erwachsener Menschen zeigen auf dem Einzelzelllevel unabhängig vom Alter des Spenders Eigenschaften von multipotenten mesenchymalen Stammzellen [17]. Zudem zeigen sie unter Bedingungen, die die Osteogenese fördern höhere Proliferationsraten im Vergleich zu Zellen aus dem Knochenmark und stellen daher eine adäquate Quelle für Knochen Tissue Engineering dar [29]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass Kieferperiostzellen unter experimentellen Bedingungen ein schwächeres osteogenes Potenzial als MSCs aus dem Knochenmark aufwiesen [30].

1.5. Osteogenese

Wie bereits oben erwähnt, können MSCs zu verschiedenen Gewebetypen differenzieren u.a. Knochen, Knorpel, Muskeln und Fett [31]. In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf der Knochenbildung, aus diesem Grund wird im Folgenden der Prozess der Osteogenese genauer aufgeführt. Hierbei entwickeln sich die mesenchymalen Stammzellen über die Stadien der Osteovorläuferzellen zu Präosteoblasten, Osteoblasten und schließlich zu Osteozyten [32]. In der *in vitro* Zellkultur kann die Osteogenese und die damit verbundene Mineralisation der MSCs durch die Zugabe von Vitamin C, β-Glycerolphosphat und Dexamethason eingeleitet werden [33-35]. Dabei durchläuft die Stammzelle mehrere Stufen [33]. Zunächst proliferieren die Zellen stark, um anschließend die für die Bildung der extrazellulären Matrix (EZM) benötigten Proteine auszuschütten und im letzten Schritt erfolgt die Mineralisation der syn-

thetisierten EZM. Jede Stufe ist durch eine charakteristische Gen-/Proteinexpression geprägt. So werden in der frühen Osteogenese die Transkriptionsfaktoren Runx-2 und Osx exprimiert [31]. Das Enzym alkalische Phosphatase stellt ein Frühmarker der Osteogenese dar [36]. Die alkalische Phosphatase produziert anorganische Phosphate durch die Abspaltung von Phosphatgruppen aus Phosphorsäureester. Alkalische Phosphatase beschreibt eine Gruppe verschiedener Isoenzyme, wie TNAP, intestinale AP, plazentale AP und Keimzell-AP, die von mindestens vier verschiedenen Genorten kodiert werden [37]. Die Hemmung der TNAP (tissue non-specific alkaline phosphatase) führt zur Unterdrückung der Mineralisation *in vitro* [38]. Während der Biomineralisation wird Hydroxyapatit (ein Kalziumphosphat) in der EZM abgelagert. Hierbei werden zunächst Hydroxyapatitkristalle innerhalb von Matrix-Vesikeln gebildet, in die EZM abgegeben und dort zwischen Kollagenfibrillen abgelagert. Osteocalcin und Osteopontin werden in der späten Differenzierungsphase zu Osteoblasten exprimiert [39]. Osteopontin inhibiert die Bildung und das Wachstum von Apatit und reguliert die Osteoklastenaktivität [40]. Osteocalcin gilt als einziger wahrer osteoblasten-spezifischer Marker, da er nur in voll ausdifferenzierten Osteoblasten exprimiert wird. Die Osteocalcinexpression wird durch den Transkriptionsfaktor Runx-2 aktiviert [41].
Die Knochenentwicklung ist von anabolen und katabolen Stoffwechselvorgängen geprägt. Hierbei bauen die Osteoblasten den Knochen auf, die Osteoklasten bauen Knochensubstanz ab [42-43].

1.6. Tissue Engineering

Tissue Engineering beschreibt ein Forschungsfeld, das Methoden und Erkenntnisse verschiedener „life sciences“ verbindet mit dem Ziel biologische Ersatzstoffe herzustellen, die Gewebefunktionen ersetzen, erhalten oder verbessern sollen [44]. Für Tissue Engineering Anwendungen müssen drei grundlegende biologische Elemente zusammenspielen: Zellen (meistens handelt es sich um Stammzellen), Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie Trägermatrizen. Dabei wird wie folgt vorgegangen: 1) eine Gewebebiopsie wird zur Gewinnung von Zellen/Stammzellen entnommen, darauf folgt 2) die *in vitro* Expansion der Zellen und die Kultivierung auf einer dreidimensionalen Trägermatrix und 3) die Implantation des hergestellten dreidimensionalen Konstruktes in den Defekt [3] (Abb. 1).

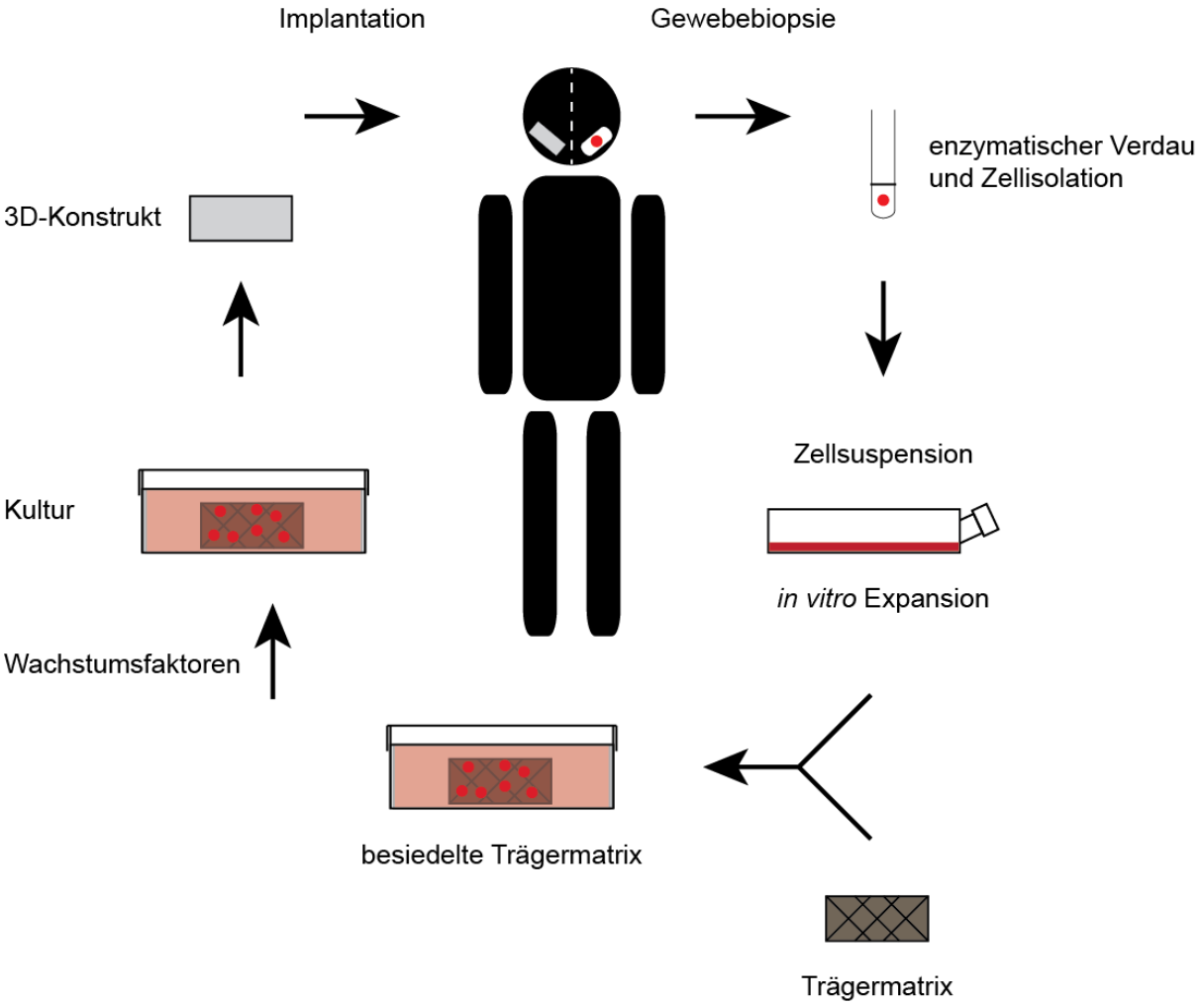


Abbildung 1: Prinzip des Tissue Engineerings (modifiziert, nach [3])

Eine der Hauptherausforderungen stellt hierbei neben der Entwicklung entsprechender Matrizen auch die Vaskularisierung der Konstrukte dar. Das Tissue Engineering bietet großes Potenzial für zukünftige Anwendungen, wie die künstliche Schaffung eines komplexen Organs [45]. So gibt es erste Anwendungen für den Ersatz von Luftröhren, hierbei wurden Spenderröhren dezellularisiert und mit autologen Zellen aus dem Epithel der Atemwege besiedelt. Erste Versuche zur Herstellung von funktionsfähigen Lungen mittels Tissue Engineering wurden an Ratten durchgeführt, ebenso befindet sich auch das Tissue Engineering von Leber und Nieren im experimentellen Stadium [46]. In den letzten Jahren gab es auch zunehmend Versuche zur Regenration des Herzens mittels Tissue Engineering, allerdings stellt das Herz mit seinen unterschiedlichen anatomischen Elementen besondere Anforderungen an das Tissue Engineering, da nicht nur die Regeneration einer einzelnen Zellart nötig ist, sondern auch die komplizierte Struktur dieses komplexen Organs berücksichtigt werden muss [47-48]. Zur Rekonstruktion von alveolären und Kieferknochen können

Transplantate genutzt werden, die durch Tissue Engineering hergestellt werden [49]. Als Trägermatrizen im Knochen Tissue Engineering finden synthetische Biomaterialien auf der Basis von Polylaktidsäure (PLA), Polyglykolsäure (PGA) und ihrem Ko-Polymer Polylaktid-Glykolsäure (PLGA) Verwendung. Für den Einsatz in Trägermatrizen werden sie je nach Anforderungen alleine, oder in Verbindung mit Wachstumsfaktoren oder weiteren osteoinduktiven Stoffen, wie Hydroxyapatit oder Trikalziumphosphat verwendet [3]. Die Matrizen besitzen idealerweise eine hoch poröse, dreidimensionale Struktur, sind biokompatibel und mit kontinuierlicher Rate abbaubar. Zudem begünstigt ihre Oberfläche die Anheftung, Proliferation und Differenzierung der Zellen und entsprechen den mechanischen Eigenschaften des Gewebes, in das sie eingepflanzt werden [50]. Für die Rekonstruktion von Knochendefekten mit Kieferperiostzellen eigneten sich OPLA (open-cell polylactic acid) Matrizen, die Polylaktid als Grundsubstanz enthalten, am besten im Vergleich zu den getesteten Kollagen und Kalziumphosphat Matritzen [51].

1.7. Zellseparation

Zur Untersuchung, Charakterisierung und Kultivierung bestimmter Zellen ist eine Aufreinigung einer heterogenen Gewebeprobe meist unerlässlich. Zellisolationsmethoden werden durch drei Parameter bestimmt: Durchsatz, Reinheit und Ausbeute, wobei sie möglichst schonend für die gewünschte Zellpopulation sein müssen. Einfache Separationsmethoden machen sich physikalische Eigenschaften, wie die Sedimentationsgeschwindigkeit verschiedener Zellen im Lösungsmittel unter dem Einfluss von Zentrifugalkräften zunutze, so dass eine weniger aufwändige Separation bereits über Dichtezentrifugationsschritte erfolgen kann. Dabei schweben Partikel einer bestimmten Dichte in einer umgebenden Lösung mit gleicher Dichte. Basierend auf diesem Prinzip, erfolgt z. B. die Separation von mononukleären Zellen aus Vollblut und Knochenmark. In vielen Fällen sind solche einfache Auftrennungsmethoden sowie die einfachen Zellsiebe mit geringem Durchmesser wenig erfolgreich. Hier werden kompliziertere und aufwändigere Affinitätsverfahren nötig. Verschiedene Methoden haben sich hierbei durchgesetzt. Als weiteres Auftrennverfahren ist die FACS (fluorescence-activated cell sorting) Methode zu nennen. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, dass die Zelle anhand ihrer Größe, Granularität oder Fluoreszenzmarkierung zellspezifischer Antigene verschiedene optische Signale emittiert, wenn sie einen Laserstrahl passiert. Weiterhin ist die magnetische Sepa-

ration aufzuführen. Diese Separationsmethode nutzt die Oberflächenantigenexpression der Zielzellen, um durch eine Antigen-Antikörper-Verbindung (Antikörper sind mit magnetischen Partikeln markiert) die Zielzellen zu detektieren. Die magnetisch markierten Zellen verbleiben in dem vorgesehenen Magnetfeld, während die unmarkierten Zellen im Durchfluss zu finden sind. Im Falle von FACS werden magnetisch markierte Zellen zur Detektion an ein fluoreszierendes Molekül gebunden. Allen Separationsverfahren ist gemeinsam, dass nicht gleichzeitig alle genannten Parameter (Durchsatz, Reinheit, Ausbeute) zufriedenstellend erfüllt werden können. Häufig ist eine Kombination mehrerer Separationsmethoden erforderlich, um gewünschte Ergebnisse zu erreichen [52].

1.8. Fragestellung

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie bieten sich zur Auffüllung von Knochendefekten Tissue Engineering Applikationen an, für die einerseits Kieferperiostzellen und andererseits geeignete strukturgebende Biomaterialien zur Verwendung kommen. Die aus dem Kieferperiost isolierte Zellpopulation ist sehr heterogen und besteht außer aus Vorläuferzellen auch zu einem nicht unerheblichen Anteil aus verschiedenen Zelltypen wie Gewebsfibroblasten, Muskel-, Fett- und Endothelzellen. Da die alleinige Isolation der MSC-haltigen Kambiumschicht aus dem Periost bisher nicht gelungen ist, wird eine Methode zur Isolation der MSCs aus der heterogenen Zellpopulation des Kieferperiosts benötigt. Hierzu bietet sich die magnetische Zellseparation an. Als Goldstandard hat sich die von der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) angebotene magnetische Separation (MACS) etabliert. Diese Methode wird in Detail in der vorliegenden Arbeit mit einer anderen Separationsmethode (EasySep StemCell Technologies Vancouver, Kanada), die auf dem gleichen Prinzip beruht mit dem Unterschied, dass weniger Scherkräfte dabei entstehen, verglichen. Hintergrund dafür ist, dass sich bei der Standardmethode (MACS) oft hohe Mortalitätsraten ergeben, die bei der Arbeit mit primären Zellen zu starken Limitationen führen. Mithilfe beider Methoden soll eine reine osteogene Vorläufersubpopulation anhand eines MSCA-1 spezifischen Antikörpers aus der heterogenen Kieferperiostzellpopulation isoliert werden. Die hierbei gewonnenen Subpopulationen werden hinsichtlich Zellausbeute/Mortalitätsraten, Zellreinheit und das Beibehalten der Differenzierbarkeit genauestens untersucht und charakterisiert. Die Ergebnisse sollen ei-

nen Hinweis auf die besser geeignete Separationsmethode in Bezug auf die Isolation von Vorläuferzellen aus dem Periost geben.

2. Material und Methoden

2.1. Isolation und Kultivierung von humanen Kieferperiostzellen

2.1.1. Grundlagen der Zellkultur

Die nachfolgend beschriebenen Labor-Experimente erfolgten unter Zellkulturbedingungen unter einer Sterilbank (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland sowie MSC Advantage, Thermo Scientific, Bonn, Deutschland). Die Zellen wurden unter kontrollierten Bedingungen (37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit) in einem Zellinkubator (CO_2 Incubator, New Brunswick Scientific/Eppendorf, Hamburg und Hera Cell 150, Thermo Scientific, Bonn, Deutschland) kultiviert.

2.1.2. Zellkultur

Die Kieferperiostzellen wurden im DMEM Medium (Dulbecco's modified Eagel Medium Nutrient Mixture F-12 + Glutamax; Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), sowie 1% Patricin (Biochrom, Berlin, Deutschland) und Penizillin/Streptomycin (Lonza, Basel, Schweiz) kultiviert. Dieses Medium diente als Kontrollmedium und als Ausgangsmedium für die unterschiedlichen Induktionsmedien. Der Medienwechsel erfolgte dreimal in der Woche.

Das verwendete FCS wurde zunächst 30 Min. bei 56°C hitzeinaktiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Aktivkohle (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 30-minütiges Ausschütteln (Shaker DOS-10L, NeoLab, Heidelberg, Deutschland) bei Raumtemperatur. Vor der Zugabe zum DMEM/F-12 + Glutamax wurde das FCS steril filtriert (Steritop Express Plus 0,22 µm, Millipore, Billerica, USA).

2.1.3. Entnahme der Gewebeproben

Nach vorheriger Einverständniserklärung seitens der Patienten wurde während Routineeingriffen in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Biopsien menschlicher Kieferknochenhaut entnommen. In diese Arbeit wurden Proben von insgesamt

23 Spendern in Übereinstimmung mit der örtlichen Ethikkommission (Ethikvotum Nr. 194/2008BO2) eingeschlossen.

2.1.4. Gewebeaufbereitung

Die ca. 1 cm^2 großen Kieferperiostproben wurden mit PBS in einer Petrischale (Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) mit Skalpellen (Braun, Melsungen, Deutschland) mechanisch zerkleinert, anschließend in ein 50 ml Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) überführt und mit PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne Ca und Mg; PAA, Pasching, Österreich) auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach der Zentrifugation (350 x g, 7 Min., 8°C; Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und dem Absaugen des Überstandes erfolgte eine 90-minütige enzymatische Verdauphase in 3 ml Typ XI Kollagenase (1500 U/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) bei 37°C. Die Kollagenaseaktivität wurde durch die Zugabe desselben Volumens DMEM Medium gestoppt und mit PBS herausgewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in DMEM Medium aufgenommen und abhängig von der Größe auf eine bis mehrere Zellkulturflaschen (75 cm^2, Corning Incorporated, Corning, USA) aufgeteilt.

Während der ersten Medienwechsel der Primärkultur wurde zunächst nur ein Drittel des Mediums ersetzt, später dann die Hälfte und gegen Ende der Primärkulturphase wurde der komplette Austausch des Kulturmediums vorgenommen.

2.1.5. Zellen einfrieren und auftauen

Kieferperiostzellen wurden im DMEM F-12 Glutamax, das 20% FCS und 10% DMSO enthielt, in speziellen Cryo-Röhrchen (Cryo S., Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) im Stickstofftank (MVE Cryosystem 4000, Chart Biomed, Ball Ground, USA) bis zur Verwendung eingefroren. Zum Auftauen wurden die Cryo-Röhrchen für maximal 3 Min. im 37°C warmen Wasserbad (22 l; Memmert, Schwabach, Deutschland) aufgetaut und anschließend sofort in 8 ml Medium überführt. Die Probe wurde bei 350 x g und 8°C für 7 Min. zentrifugiert und das Pellet in einer definierten Menge Medium resuspendiert.

2.1.6. *In vitro*-Expansion der Kieferperiostzellen

Bei Erreichen der 100%-igen Konfluenz, meistens nach 10 Tagen, wurden die Zellen passagiert. Zunächst erfolgte das Absaugen (Absaugvorrichtung, NeoLab, Heidelberg, Deutschland) des Mediums, gefolgt von einem Waschschritt mit PBS. Nach dem Entfernen der Waschlösung, wurden 2 ml Trypsin-Versen EDTA (1x, Lonza, Basel, Schweiz) hinzu pipettiert. Nach einer Inkubation im Brutschrank und nach Erreichen der benötigen Zellvereinzelung (mikroskopische Kontrolle) wurde die Trypsin-Aktivität durch die Zugabe von 3 ml DMEM Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Anschließend erfolgte das Resuspendieren des Zellpellets sowie erneutes Aussäen der Zellen in Zellkulturflaschen oder Platten. Pro 75 cm^2 Zellkulturflasche wurden $4{,}5x10^5$ Zellen ausgebracht. In ein Well einer 6-Well Platte (Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) wurden $3{,}5x10^4$ Zellen ausgebracht. Ein Well einer 96-Well Platte (Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) wurde mit $1{,}5x10^3$ Zellen besiedelt.

2.1.7. Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl der gut gemischten Zellsuspension in 20 µl Trypanblau (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) aufgenommen. Nach kurzer Inkubationszeit erfolgte das Auszählen in einer Neubauer Zählkammer (Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland). Die Berechnung der Zellzahl erfolgte mittels der Formel:

$$x = \frac{y * 2 * 10.000 * V}{4}$$

x = Zellzahl

y = Anzahl der gezählten Zellen

V = Volumen der Zellsuspension (in ml)

2.2. Zellseparationen

Die Isolation der MSCA-1 (mesenchymal stem cell antigen-1) positiven Zellfraktion aus der Gesamtpopulation der dem Kieferperiost entstammenden Zellen erfolgte mittels zweier magnetischer Separationsmethoden: MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) und EasySep (StemCell Technologies, Köln, Deutschland). Zur Vorbereitung auf die Zellseparation wurden die entsprechenden Zellen bis zu 90 Min. in Trypsin-Versen EDTA bis zur vollständigen Zellvereinzelung inkubiert.

Zellen der Passagen fünf bis sieben wurden für die nachfolgenden Experimente benutzt. Lediglich mineralisierende Zellen, die in der Lage waren *in vitro* Kalziumphosphat-Präzipitate zu bilden [21], fanden für die folgenden Versuche Verwendung.

2.2.1 Separationsmethode der Firma Miltenyi Biotech (MACS)

2.2.1.1. Prinzip

Die MACS-Methode beruht auf einem Durchflusssystem. Die Separationssäule befindet sich in einem starken Magnetfeld. Die magnetisch markierte Zellsuspension wird auf die Säule gegeben und fließt auf Grund der Schwerkraft durch die Säule. Die magnetisch markierten Zellen bleiben in der Säule im Magnetfeld haften (Abb. 2), während sich die unmarkierten Zellen im Durchfluss befinden.

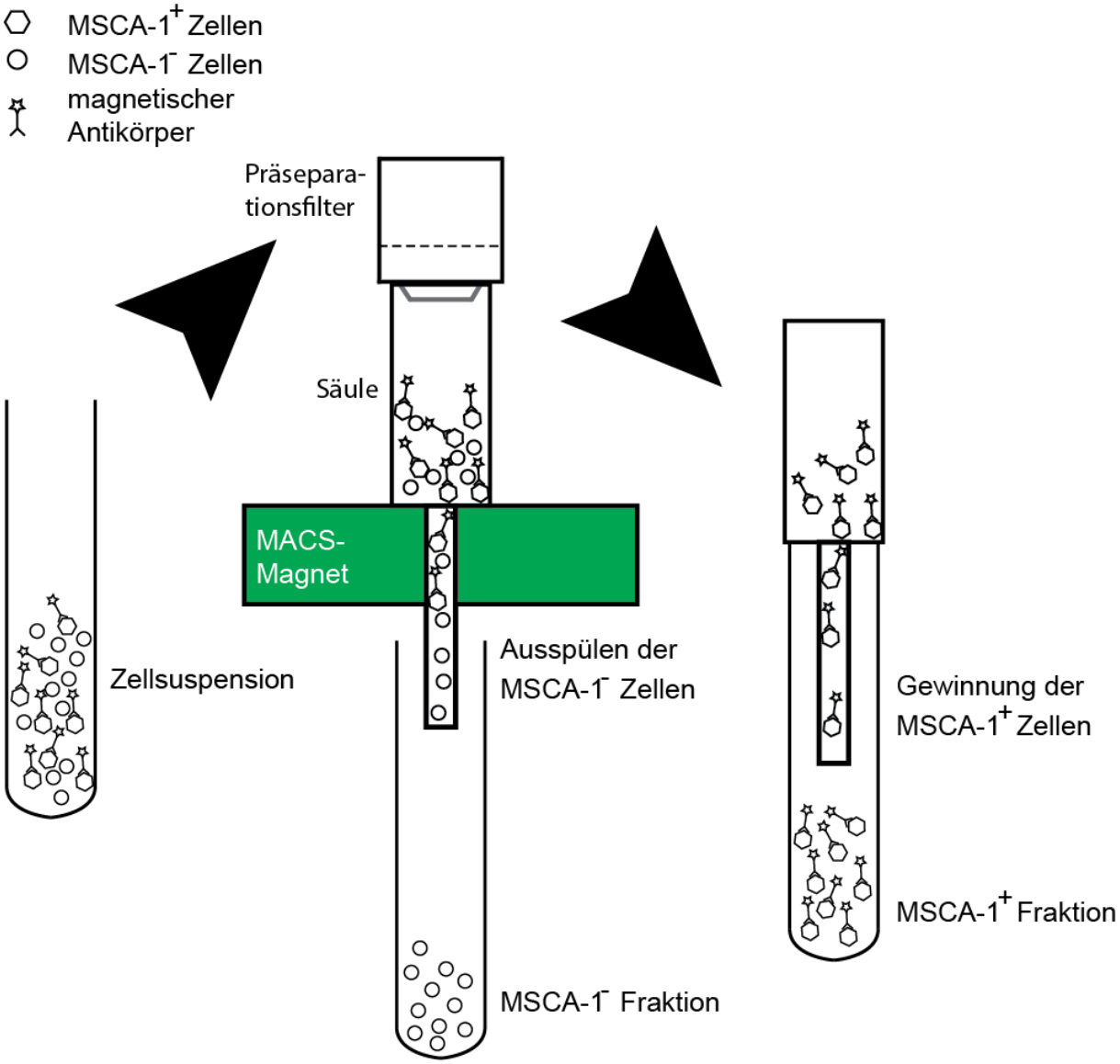


Abbildung 2: Schema der MACS-Separation

2.2.1.2. Separation mittels MACS

Bis zu 2x10^8 Kieferperiostzellen wurden nach dem Ablösen aus den Gewebekulturflaschen bei 300 x g für 10 Min. zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 1,2 ml MACS-Puffer (PBS pH 7,2; 0,5% BSA (bovines Serum Albumin; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 2 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Deutschland)) resuspendiert. 400 µl FcR Blocking Reagenz und 400 µl der anti-MSCA-1 MicroBeads (MicroBead Kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurden hinzuzugeben, gemischt und für 20 Min. bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschritt mit 20 ml MACS-Puffer wurde die Zellsuspension bei 300 x g für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die markierten Zellen wurden in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert und je 1 ml auf einen Präseparationsfilter (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,

Deutschland) auf einer MS Säule gegeben, um Zellklumpen zu vermeiden. Pro Separation wurden zwei Säulen genutzt, um eine effektivere Auftrennung zu gewährleisten und das Risiko einer Verstopfung von Filter und Säule zu minimieren. Nach dreimaligem Waschen mit je 500 µl PBS-Puffer wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die MSCA-1^+ Fraktion mit 1 ml MACS-Puffer aus der magnetischen Säule ausgespült.

2.2.2. Separationsmethode der Firma StemCell Technologies (EasySep)

2.2.2.1. Prinzip

Das Prinzip von EasySep basiert auf einem Magnetblock, in das ein Röhrchen mit der markierten Zellsuspension hinein gestellt wird. Nach der vorgeschriebenen Inkubationszeit, in der sich die positiv markierten Zellen an der Außenwand des Röhrchens anlagern, kann die negative Fraktion einfach durch das Umdrehen des Magnetblocks, in dem das Röhrchen noch steckt, abgekippt werden (Abb. 3).

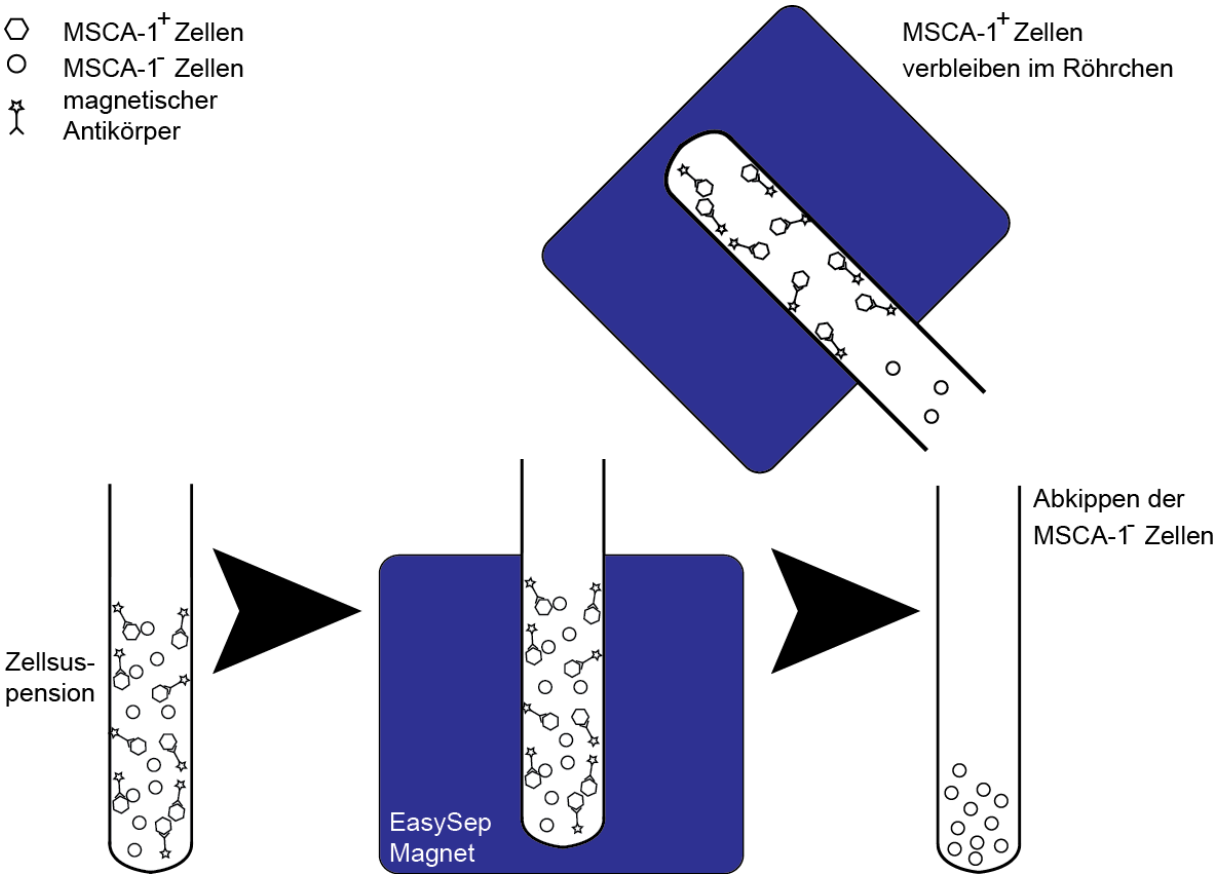


Abbildung 3: Schema der EasySep-Separation

2.2.2.2. Herstellung des Selektionscocktails

Vor der Separation musste zunächst der Selektionscocktail hergestellt werden. Hierzu wurden 15 µg eines anti-MSCA-1 Antikörpers (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) zu 100 µl der Komponente A des humanen „do-it-yourself“ positivem Auswahl Kits (StemCell Technologies, Köln, Deutschland) gegeben und gut gemischt. Nach der Zugabe von 100 µl der Komponente B wurde der Cocktail gut gemischt und in einem geschlossenen Reaktionsgefäß über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 100 µl der Komponente C und nachdem der Cocktail gut durchmischt wurde, wurde auf ein Gesamtvolumen von 1 ml mit sterilem PBS aufgefüllt.

2.2.2.3. Separation mittels EasySep

Bis zu $1x10^8$ Kieferperiostzellen wurden von den Gewebekulturflaschen abgelöst und bei 350 x g für 7 Min. zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 µl des positiven Selektionscocktails aufgenommen und für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. 55 µl der EasySep magnetischen Nanopartikel wurden zum Zell-Antikörpergemisch gegeben

und für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit Easy-Sep-Puffer (PBS, 2% FCS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 1 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Deutschland)) auf ein Gesamtvolumen von 2,5 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Suspension in den Magnet gestellt und für 10 Min. inkubiert. Zum Auffangen der MSCA-1^- Fraktion wurde der Magnet mit der Zellsuspension auf den Kopf gestellt, während die MSCA-1^+ Fraktion im Inneren des Röhrchens verblieb. Dieser Schritt (Zugabe von 2,5 ml Puffer, Resuspendieren, Inkubation, Umdrehen des Magneten) erfolgte insgesamt drei Mal, dann wurde das Röhrchen aus dem Magneten entnommen und die MSCA-1^+ Zellen in Kulturmedium resuspendiert.

2.3. Differenzierungsexperimente

Die nachfolgenden Experimente wurden jeweils für die MSCA-1^- und MSCA-1^+ Zellfraktion der beiden Separationsmethoden durchgeführt.

2.3.1. Ansätze

Die Zellen wurden nach der Separation in unterschiedlich großen Zellkulturgefäßen kultiviert. In 75 cm^2 Zellkulturflaschen wurden $4{,}5x10^5$ Zellen ausgesät. Ein Well einer 6-Well Platte (Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) wurde mit $3{,}5x10^4$ Zellen besiedelt und in ein Well einer 96-Well Platte (Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) wurden $1{,}5x10^3$ Zellen aufgebracht.

2.3.1.1. Induktion

Pro Zellfraktion wurden Dupplets ausgesät, sodass zu jedem Induktionsexperiment eine entsprechende unbehandelte Kontrolle zur Verfügung stand. Die Kontrollen wurden für den gleichen Zeitraum mitgeführt, wie die entsprechend induzierten Zellen. Die Erstinduktion erfolgte 1 bis 2 Tage nach der Separation, bzw. nach der Passagierung.

2.3.1.2. Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung wurde durch das Zusetzen von osteogenen Stimulanzien zum normalen Zellkulturmedium (DMEM F-12) durchgeführt. Hierzu wurde zu DMEM/F-12 + Glutamax 10 mM β-Glycerolphosphat (AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 100 µM L-Ascorbinsäure 2-Phosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim,

Deutschland) und 4 µm Dexamethason (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zugegeben. Dieses Medium wird im Weiteren als OB-Medium bezeichnet. Die Zellen wurden für 30 Tage mit diesem Medium behandelt, der Medienwechsel erfolgte dreimal pro Woche.

2.3.2. Ansätze für die Untersuchung der Zellseneszenz im Laufe der *in vitro* Expansion

Einige Patientenzellen wurden für die Untersuchung der Zellseneszenz bzw. um zu ermitteln, ob die separierten Fraktionen auch länger kultiviert werden können, über viele Passagen (bis 17P) *in vitro* kultiviert. Hierzu wurde neben den üblichen Ansätzen von jeder Zellfraktion nach Möglichkeit eine 6-Well Platte zur Expansion mit Zellen besiedelt, die nach 10 Tagen der *in vitro* Kultivierung weiter passagiert wurde. Sofern genügend Zellen zur Verfügung standen, wurden für jede Passage folgende Ansätze vorbereitet:

Quantifizierung der Kalziumphosphat-Präzipitate in 6-Well Platten

je Fraktion zweimal 3,5x10^4 Zellen

Nachweis der Proliferationsfähigkeit (4 Zeitpunkte) in 96-Well Platten

je Fraktion sechsmal 1,5x10^3 Zellen

Nachweis der Seneszenz in 6-Well Platten

je Fraktion zweimal 3,5x10^4 Zellen

RNA-Isolation (maximal 3 Zeitpunkte) in 6-Well Platten

je Fraktion zwölf mal 3,5x10^4 Zellen

2.4. Ermittlung der Verdoppelungszeit

Die zur Expansion vorgehaltenen Zellen wurden nach 10 Tagen der Kultur passagiert. Hierbei wurde für die entsprechenden Fraktionen die Zellzahl ermittelt. Aus diesen Daten ließ sich die Verdoppelungszeit der einzelnen Passagen ermitteln. Es wurde ein exponentielles Wachstum vorausgesetzt.

$$Nt = N0 * e^{kt}$$

Nt: Zellzahl zum Zeitpunkt t

N0: Zellzahl zum Zeitpunkt 0

k: konstante

t: Anzahl Tage in Kultur

t‘: Anzahl Tage bis zur Verdoppelung der Ausgangszellzahl

Hieraus ergab sich zunächst für jede Fraktion jedes Patienten ein individueller Wert *k*.

$$k = \frac{\ln(\frac{Nt}{N0})}{t}$$

Mit den individuellen k-Werten ließ sich nun die Verdoppelungszeit t‘ der einzelnen Fraktionen jedes Patienten errechnen.

$$t' = \frac{\ln(\frac{Nt'}{N0})}{k}$$

Mit:

$$Nt' = 2 * N0$$

Folgt:

$$t' = \frac{\ln(\frac{2 * N0}{N0})}{k} = \frac{ln2}{k}$$

2.5. Durchflusszytometrie (FACS)

2.5.1. Prinzip

Die Durchflusszytometrie beruht auf der Analyse von Einzelzellen während diese in einem Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen fokussierten Laserstrahl fließen. Im vorliegenden Fall wurden die gesuchten Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern markiert, um den Anteil der MSCA-1^{+} Zellen in der jeweiligen Zellfraktion zu bestimmen.

2.5.2. Probenvorbereitung

Die separierten Zellfraktionen (MSCA-$1^{-/+}$) wurden bei 350 x g für 7 Min. bei 8°C zentrifugiert, anschließend in 20 µl 10%igem Gamunex (humane Immunglobulin Fraktion, Talerics Biotherapeutics, Frankfurt am Main, Deutschland) resuspendiert und für 15 Min. bei 4°C inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl FACS-Puffer (PBS, 0,1% BSA, 0,1% Natrium-Azid (Sigma-Aldrich, Steinheim. Deutschland)) wurden die Zellen mit anti-MSCA-1 Überständen [22] gemischt und für weitere 15 Min. bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden je zwei Mal zentrifugiert (350 x g, 7 Min., 8°C) und mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellpellets mit 10 µl des sekundären Phykoerythrin (PE) -markierten polyklonalen Ziegen anti-Maus Antikörpers (Dako, Glostrup, Dänemark) für 15 Min. bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Wa-

schen und Zentrifugieren erfolgte das Resuspendieren der Zellen in 200 µl FACS-Puffer zur Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen.
Die Messung erfolgte mit einem FACScan Gerät der Firma Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA). Als negative Kontrollen dienten Zellen, die nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert waren. Die Datenauswertung erfolgte mithilfe der Software CellQuestPro.

2.6. RNA-Extraktion

Die Zellen zur RNA-Extraktion wurden entweder in 75 cm^2 Zellkulturflaschen oder in 6-Well-Platten kultiviert. In letzterem Ansatz hing die Anzahl der besiedelten Wells von der Menge der gewonnen Zellen einer Fraktion ab.
Die Isolation der RNA aus Zellproben der mittels MACS und EasySep Separation gewonnen Zellfraktionen erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (RNeasy Microkit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Zu definierten Zeitpunkten (5, 10 und 30 Tage nach der osteogenen Erstinduktion) wurden die Zellen geerntet. Nach dem Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen in eiskaltem PBS aufgenommen und auf Eis mit Hilfe eines Zellschabers (Corning Incorporated, Corning, USA) abgelöst. Die resultierende Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (350 x g, 7 Min., 8°C) und die Aufnahme des Zellpellets in 350 µl RLT-Puffer (mit 1% Mercaptoethanol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)) für die Zelllyse. Nach der Zugabe von 350 µl 70%-igem Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) für die Nukleinsäurepräzipitation wurden die lysierten Zellen mittels einer Insulinspritze (BD, S. Augustín, Madrid, Spanien) homogenisiert. Die osteogen induzierten Proben enthielten z.T. zahlreiche Kalziumphosphat-Präzipitate, die die RNA-Extraktion durch das Verstopfen der Säulchenmembran stören. Aus diesem Grund wurden die erhaltenen Zelllysate bei 180 x g für 3 Min. und 8°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend auf eine Elutionssäule pipettiert und bei 9.300 x g für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach einem Waschvorgang mit 350 µl RW1-Puffer folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt. Anschließend wurden 80 µl DNAse-Lösung (10 µl DNAse Stammlösung und 70 µl RDD-Puffer) auf die Säulchenmembran pipettiert und für 20 Min. inkubiert. Danach schlossen sich ein RW1-Wasch- und ein Zentrifugationsschritt an, gefolgt von der Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und einem erneuten Zentrifugationsschritt. Nach der Zugabe von 500 µl 80%-igem Ethanol wurde für 2 Min. zentrifu-

giert. Es folgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 16.000 x g. Die Säulchenmembran wurde mit 14 µl RNAse-freiem Wasser überschichtet und nach einer Minute Inkubationszeit für eine Minute bei 16.000 x g zentrifugiert. Die eluierte RNA wurde bei -70°C (VIP-Series, Ultra-Low, Sanyo, San Diego, USA) bis zur Umschreibung in cDNA gelagert.

2.7. cDNA-Synthese

2.7.1. Bestimmung der RNA-Konzentration

Für die Messung der RNA-Konzentration wurden 1,4 µl RNA-Probe mit 68,6 µl Ampuwa (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) verdünnt (1:50 Verdünnung) und gut gemischt. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte mit einem GeneQuant Pro Photometer (GE Healthcare, München, Deutschland). Pro Probe wurden jeweils zwei Messungen durchgeführt. Aus den gemessenen Konzentrationen wurde die tatsächliche RNA-Konzentration der Probe errechnet und anschließend der Mittelwert der beiden Messwerte gebildet.

$$c = \frac{c_{gem} * Verdünnungsfaktor}{1.000}$$

c: zu ermittelnde Konzentration (in µg/µl)

c_{gem}: gemessene Konzentration (in µg/ml)

Verdünnungsfaktor = 50

2.7.2. Umschreibung der RNA in cDNA

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mithilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (Advantage RT-for-PCR Kit, Clonetech, Mountain View, USA). Pro Probe wurde 1 µg RNA umgeschrieben, das Volumen wurde auf 12,5 µl mit RNAse-freiem Wasser aufgefüllt. Zu diesem Mix wurde 1 µl Oligo-dT-Primer pipettiert und für 2 Min. bei 70°C in einem MasterCycler Personal (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zur Bindung der mRNA aus der Gesamt-RNA vorinkubiert und anschließend für 2 Min. auf Eis abgekühlt. Pro Probe wurden 6,5 µl Mastermix bestehend aus 4 µl 5x Reaktionspuffer, 0,5 µl rekombinanter RNAse Inhibitor und jeweils 1 µl dNTP-Mix und Reverse Transkriptase zugegeben. Dieser Ansatz inkubierte für eine Stunde bei 42°C im Thermoblock zur Umschreibung der RNA in cDNA und wurde anschließend für 5 Min. auf 95°C erhitzt, um die Doppelstränge zu denaturieren. Nach dem Abkühlen

erfolgte die Zugabe von 80 µl RNAse-freiem Wasser zum Gesamtvolumen von 100 µl.

2.8. Analyse der Genexpression mittels quantitativer PCR (Polymerase Kettenreaktion)

2.8.1. Prinzip der PCR

Die PCR dient der Vervielfältigung von DNA. Sie besteht aus mehreren Zyklen, die sich im Wesentlichen aus drei Schritten zusammensetzen. Zunächst erfolgt die Denaturierung des DNA-Strangs bei 95°C, um Einzelstränge zu erhalten. Im nächsten Schritt lagern sich nach einer Absenkung der Temperatur (abhängig von den verwendeten Primern) die zugegebenen Primer an die Einzelstränge an, bevor im letzten Schritt die DNA-Polymerase ausgehend von den Primern die an die Einzelstränge angelagerten Nukleotide zu neuen Hälften des DNA-Strangs verbindet. Für diesen Schritt ist die Temperatur abhängig vom Wirkungsoptimum der verwendeten Polymerase. Mit jedem durchgeführten Zyklus verdoppelt sich theoretisch die Menge des PCR-Produktes. Die Echtzeit-PCR macht sich dies zunutze, indem ein durch eine bestimmte Wellenlänge angeregter Farbstoff (hier: SybrGreen, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) in die doppelsträngige DNA eingebaut wird. Die Fluoreszenzintensität wird nach jedem Elongationsschritt vom Gerät erfasst und die Zunahme ist für jede einzelne Probe auf dem Monitor sichtbar [53-54].

2.8.2. Echtzeit-PCR

Für die Durchführung der quantitativen PCR wurde das LightCycler 1.5 Gerät (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) verwendet. Die benötigten Primer stammten von Search-LC (Heidelberg, Germany) und wurden speziell für dieses Gerät optimiert. Für jede Probe wurde zusätzlich zum Zielgen auch die Analyse des Housekeeping Gens GAPDH (Glyceraldhyde-3-Phosphat Dehydrogenase) mitgeführt [55]. Anhand einer definierten Standardreihe mit vorgegebenen Kopienzahlen an GAPDH ist das Gerät in der Lage, über die Messung der Fluoreszenzintensität die Kopienzahlen für verschiedene Zielgene in den entsprechenden Proben zu ermitteln. Pro 2 µl cDNA Probe wurden 14 µl Wasser, 2 µl Primer und 2 µl MasterSybrGreen Fast (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) zugegeben. Nach einem anfänglichen De-

naturierungsschritt bei 95°C für 10 Min. erfolgte die Vervielfältigung der DNA in drei Schritten: Auftrennung der DNA bei 95°C für 10 Sekunden, Anlagerung der spezifischen Primer bei 68°C für 10 Sekunden (mit Absenkung der Annealing Temperatur um 0,5°C pro folgendem Zyklus bis auf 58°C) gefolgt von der Synthese des neuen cDNA-Strangs bei 72°C für 16 Sekunden. Die Temperaturveränderung betrug jeweils 20°C pro Sekunde. Dieser Vorgang wurde je nach Zielgen 35, 40 oder 45 Mal wiederholt, um die Detektion schwach exprimierter Gene ebenfalls zu ermöglichen. Zum Abschluss des Vorgangs wurde durch beständiges Erhitzen auf 95°C eine Schmelzkurve erstellt. Nach der anschließenden Abkühlung auf 40°C war die PCR beendet. Die ermittelten Kopienzahlen für die gesuchten Zielgene wurden für jede Probe ins Verhältnis gesetzt zur jeweiligen Kopienzahl für GAPDH (Zielgen/GAPDH*1000) einer Probe [55]. Das errechnete Verhältnis der behandelten (induzierten) Probe wurde durch das Verhältnis der unbehandelten Probe dividiert und daraus ein Induktions- oder Repressionsfaktor ermittelt.

2.9. Immunhistochemie

2.9.1. Nachweis der Kalziumphosphat-Präzipitate

2.9.1.1. Alizarin-Färbung

Der Nachweis der von osteogen stimulierten Zellen gebildeten Kalziumphosphat-Präzipitate erfolgte mittels Alizarin-Rot Färbung. Hierzu wurden die Zellen nach einem Waschschritt in PBS in eiskaltem Methanol (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankreich) für 2 Min. fixiert und anschließend luftgetrocknet. Einem zweiminütigen Waschschritt in demineralisiertem Wasser folgte die 20-minütige Färbung mit dem Alizarin-Rot-Farbstoff (40 mM, pH 4,0). Nach vier fünfminütigen Waschschritten mit demineralisiertem Wasser auf einem Schüttler wurden die Zellen mit PBS für 15 Min. gewaschen und mit eiskaltem Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) entwässert. Anschließend trockneten die gefärbten Monolayer an der Luft. Die Kalziumphosphat-Präzipitate färbten sich leuchtend rot.

2.9.1.2. Quantifizierung der Kalziumphosphat-Präzipitate

Zur Quantifizierung der Alizarin-Rot Färbung wurde ein kommerzielles Osteogenese Quantifizierungs-Kit (Millipore, Billerica, USA) eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte nach den Herstellerangaben. Zunächst wurden 1920 µl 10%-iger Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) in jedes Well einer 6-Well Platte pipettiert. Die Inkubation für 30 Min. auf einem Schüttler löste den Alizarin-Rot Farbstoff aus dem Monolayer. Die Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers (Corning Incorporated, Corning, USA) von der Zellkulturplatte gelöst und die Zelllösung in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Die Proben wurden für 10 Min. auf 85°C (Thermomixer compact; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) erhitzt und anschließend für 5 Min. auf Eis abgekühlt. Nach der Zentrifugation (20.000 x g, 15 Min., 4°C) wurden 400 µl der Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt und mit 150 µl 10%-igem Ammoniumhydroxid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) neutralisiert. Um die Kalziumphosphat Ablagerungen zu quantifizieren erfolgte eine optische Dichtemessung bei 405 nm im Verhältnis zu einer Verdünnungsreihe des Alizarin-Farbstoffes bekannter Konzentrationen (30 µM, 15 µM, 7,5 µM, 3,75 µM, 1,88 µM, 0,94 µM, 0,47 µM). Die Messungen wurden mit einem ELx800 Elisa Reader (Bio-Tek, Winooski, USA) ermittelt. Die Datenauswertung erfolgte mittels einer KC4 Software. Die gemessenen Ergebnisse der osteogen stimulierten Zellfraktionen wurden ins Verhältnis zur jeweils unbehandelten Kontrolle gesetzt, um das Vielfache der stimulierten Fraktion zu erhalten.

2.9.2. Nachweis der alkalischen Phosphatase

Zum Nachweis der alkalischen Phosphataseaktivität wurden die Zellen zunächst mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung für 30 Sekunden mit einer Fixierlösung aus zwei Teilen 2,04%-iger Zitratlösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und drei Teilen Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland). Nach einem Waschschritt in demineralisiertem Wasser wurden 2 ml des Naphtol-AS-Farbstoffs (0,01% Naphtol-AS-Mix in Diazoniumsalz; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) pro Well zugegeben und für 30 Min. im Dunkeln inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschritte mit 2 ml demineralisiertem Wasser für je 2 Min., anschließend wurden die Zellkerne mit 1 ml filtriertem Mayers Hämatoxylin für 10 Min. angefärbt und die Wells zwei Mal mit 2 ml filtriertem Leitungswasser gewaschen.

2.9.3. Nachweis der Zell-Seneszenz

Der Nachweis der Seneszenz erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Seneszenz Nachweiskits (MBL, Woburn, USA). Die Zellen wurden mit 2 ml PBS je Well gewaschen und mit 1 ml der im Kit enthaltenen Fixierlösung für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 2 ml PBS erfolgte die Inkubation mit 1 ml der ebenfalls enthaltenen Färbelösung mit 1% Färbepräparat und 1 mg/ml X-Gal (in DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gelöst) über Nacht im Inkubator bei 37°C. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung durch 70% Glycerol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) ersetzt. Die seneszenten Zellen waren auf Grund ihrer β-Galactosidase-Aktivität schwach bis dunkel blau angefärbt.

2.10. Nachweis der Proteinexpression mit Hilfe von Proteom Profiler Arrays

Für den gleichzeitigen Nachweis von verschiedenen löslichen Rezeptoren und verwandten Proteinen wurde ein kommerzieller nicht-haematopoietischer Proteome Profiler Array (R&D Systems, Abingdon, UK) verwendet. Auf den mitgelieferten Nitrozellulosemembranen sind bereits die Primärantikörper gegen die gesuchten Proteine hybridisiert. Diese binden an die entsprechenden Antigene aus den Zellkulturüberständen. Für den ersten Schritt wurden die Membranen zunächst für eine Stunde mit 2 ml 8/1 Puffer (10% Puffer 8, 90% Puffer 1, jeweils frisch angesetzt) gewaschen. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden auf einem Kippschüttler (Shaker DRS-12; NeoLab, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranen über Nacht bei 4°C mit den Zellkulturüberständen (500 µl Überstand, 300 µl Puffer 8 und 2200 µl Puffer 1) von durch MACS und EasySep aufgetrennten Zellfraktionen. Am nächsten Tag wurden die Membranen drei Mal für 10 Min. mit Waschpuffer gewaschen. Die mitgelieferten lyophilisierten biotynilierten sekundären Nachweis-Antikörper für die Nitrozellulosemembranen wurden in 100 µl demineralisiertem Wasser gelöst und pro Membran wurden 30 µl Antikörper in 1,5 ml 8/1 Puffer verdünnt. Hierauf folgte die Inkubation mit den sekundären biotynilierten Nachweis-Antikörper-Mischungen für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen wurden die Membranen für 30 Min. mit Streptavidin-HRP (1:1.000 Verdünnung in 8/1 Puffer) inkubiert und wiederum drei Mal gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für 5 Min. chemiluminiszierenden Reagenzien (ECL

Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare, München, Deutschland) ausgesetzt. Zur Visualisierung der Spots auf den Membranen wurde ein Röntgenfilm (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) für 60, 90 und 120 Sekunden den behandelten Membranen zur Belichtung ausgesetzt. Nach der Entwicklung wurden die Filme eingescannt und die Pixelintensität der positiven Signale mit der Software ImageJ1.4 und dem Plugin DotBlotAnalyzer ausgewertet.

2.11. Nachweis der Proliferationsfähigkeit

Zur Ermittlung der Zellproliferationsraten der Kieferperiostzellen bzw. der gewonnenen Zellfraktionen (MSCA-$1^{-/+}$) während der Osteogenese wurde ein kommerziell erhältliches Kit (EZ4U, Biomedica, Wien, Österreich) verwendet. Dieser Test beruht auf der Umwandlung von farblosen Tetrazoliumsalzen in farbige Formazanderivate. Dabei gelangen die Tetrazoliumsalze in die Zellen und werden in den Mitochondrien in die stark gefärbten Derivate umgesetzt. Als Vergleich dienten undifferenzierte Kontrollzellen der jeweiligen Fraktion. Nach den Zellseparationen wurden $1{,}5x10^3$ Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. Für jede gewonnene Fraktion wurden zwei Triplikate angesetzt (ein Triplikat für die undifferenzierte Kontrolle, das zweite Triplikat für die osteogen stimulierte Probe). Nach der Zellaussaat folgte eine über Nacht Inkubation, anschließend wurde das Kulturmedium entfernt und durch Medium mit und ohne osteogenen Stimulanzien (OB) ersetzt. Zu definierten Zeitpunkten (5 Tage, 10 Tage, 20 Tage und 30 Tage nach der Erstinduktion) wurde nach einem Medienwechsel 20 µl Substratlösung (ein Fläschchen Substratpulver wurde mit 2,5 ml Aktivatorlösung gemischt) in jedes Well (zu den 200 µl DMEM F-12 Medium) gegeben und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Quantifizierung der Zellproliferation erfolgte mittels optischer Dichtemessung bei 450 nm und 620 nm Referenzwellenlänge mittels eines ELx800 Elisa Readers (Bio-Tek, Winooski, USA) sowie der KC4-Software zur Datenauswertung.

2.12. Besiedelung der 3D-Trägermatritzen

Zur Untersuchung der Zellen in dreidimensionalen Strukturen wurden Kieferperiostzellfraktionen auf OPLA-Trägermatrizen der Firma BD Biosciences (Franklin Lakes, USA) aufgebracht. Die Trägermatrizen bestanden aus D,D-L,L Polylaktidsäure. Sie besaßen eine zylindrische Form von 5 mm Durchmesser und einer Höhe von 3 mm. Ihr Volumen belief sich auf 0,039 cm^3 bei einer Hydratationskapazität von 30 µl. Die

durchschnittliche Porengröße der nicht komprimierbaren schwammähnlichen Struktur lag zwischen 100 und 200 µm.
Zur Besiedelung wurden die Trägermatrizen zunächst für 30 Min. in Zellkulturmedium vorinkubiert. Die zur Besiedelung vorgesehenen Zellfraktionen wurden auf eine Konzentration von 1.000 Zellen/µl eingestellt. Die vorinkubierten Trägermatrizen wurden in 96-Well Platten überführt und je Matrix mit 50 µl der vorbereiteten Zellsuspensionen beträufelt. Die sich im Well sammelnde Zellsuspension wurde zweimal wieder aufgenommen und erneut auf die Matrix pipettiert, um sicher zu stellen, dass möglichst viele Zellen tatsächlich in den Matrizen haften bleiben und sich nicht am Boden sammeln. Nach zweistündiger Inkubationszeit bei 37°C im CO_2-Inkubator, wurde das Gesamtvolumen je Well auf 200 µl aufgefüllt. In die Wells um die besiedelten Trägermatrizen wurde eine Verdunstungsbarriere aus PBS pipettiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Matrizen in eine neue 96-Well Platte überführt, in die entsprechend Kontroll- und OB-Medium vorgelegt war.

2.13. RNA Isolation aus 3D-kultivierten Zellen

Um die RNA aus den 3D-kultivierten Zellen gewinnen zu können, musste zunächst die Trägermatrix zerstört werden. Eine Ablösung der Zellen mittels Trypsin scheiterte an einer zu geringen Ausbeute. Die Trägermatrizen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden drei zellbesiedelte Matrizen in ein MagNA-Lyser Green Beads (Keramikbeads) Röhrchen (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mit 800 µl RLT-Puffer (Lysispuffer, siehe 2.6.) überführt. Die Keramikbeads Röhrchen wurden bei 6.500 rpm für 60 Sekunden in einem MagNA-Lyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) zentrifugiert. Hierbei wurden durch die im Röhrchen enthaltenen Beads (Kugeln) die Matrizen klein geschlagen. Der Flüssigkeitsüberstand einer Fraktion mit den enthaltenen Kleinstpartikeln der Trägermatrizen wurde in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und für 3 Min. bei 180 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon Röhrchen überführt und entweder bei -70°C aufbewahrt oder mit der gleichen Menge 70%-igem Ethanol aufgefüllt und anschließend portionsweise auf die Säulchen zur RNA-Isolation aufgetragen (siehe 2.6.).

2.14. Statistische Analyse

Die Daten sind als Mittelwert ± SEM (standard error of mean = mittlerer Fehler des Mittelwertes) angegeben. Die statistische Analyse wurde mit dem Programm MedCalc (MedCalc Software, Mariakerke, Belgien) durchgeführt. Die Daten wurden mittels D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung getestet. War diese gegeben, so erfolgte eine Analyse mit Hilfe des t-Tests oder des Welch-Tests. Waren die Daten nicht normalverteilt, so wurden sie mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test verglichen. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung der Überlebensrate bzw. des Anteils positiver und negativer Zellfraktionen nach MACS und EasySep Zellseparationen

Kieferperiostzellen (JPCs) von jeweils 19 Patienten (n = 19) wurden vor und direkt nach jeder magnetischen Separation mittels MACS und EasySep gezählt. Daraus wurde für jede Separationsmethode Überlebensrate und Sterblichkeit (Mortalität) errechnet. Die Überlebensrate für beide Separationsmethoden errechnete sich aus der Gesamtzellzahl, die für die Separation eingesetzt wurde bzw. aus der Anzahl der resultierenden MSCA-1^- und MSCA-1^+ Zellen nach der Separation. Mittels MACS Separation überlebten 58,02% ± 1,75 der Zellen, während die Separation mit EasySep eine Überlebensrate von 79,68% ± 4,06 der Zellen erreichte (Abb. 4). Somit zeigten die Überlebensraten beider Separationsmethoden einen signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$). Aus dieser Kalkulation ergab sich auch der prozentuale Anteil der positiven und negativen Fraktionen in Bezug auf die überlebenden Zellen (Abb. 5). Nach MACS Separation belief sich der Anteil an MSCA-1 positiven Zellen auf 2,88% ± 0,20. Wohingegen EasySep einen Anteil von 13,41% ± 2,48 positiver Zellen erbrachte. Der Unterschied zwischen den beiden positiven Fraktionen war signifikant ($p < 0,0001$).

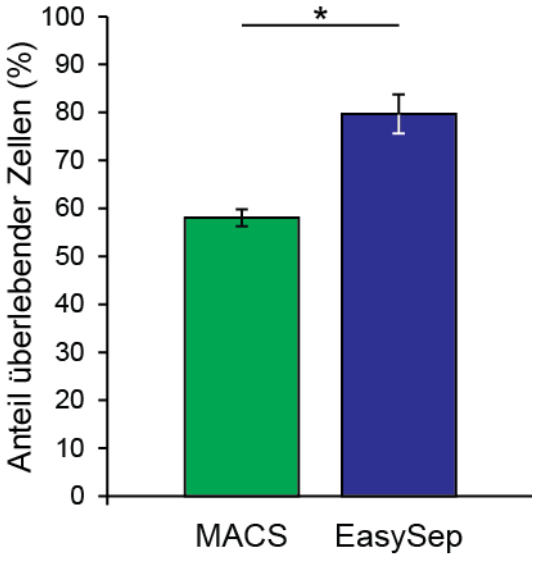


Abbildung 4: Gesamtüberlebensrate (in %)
nach MACS und EasySep Separationen

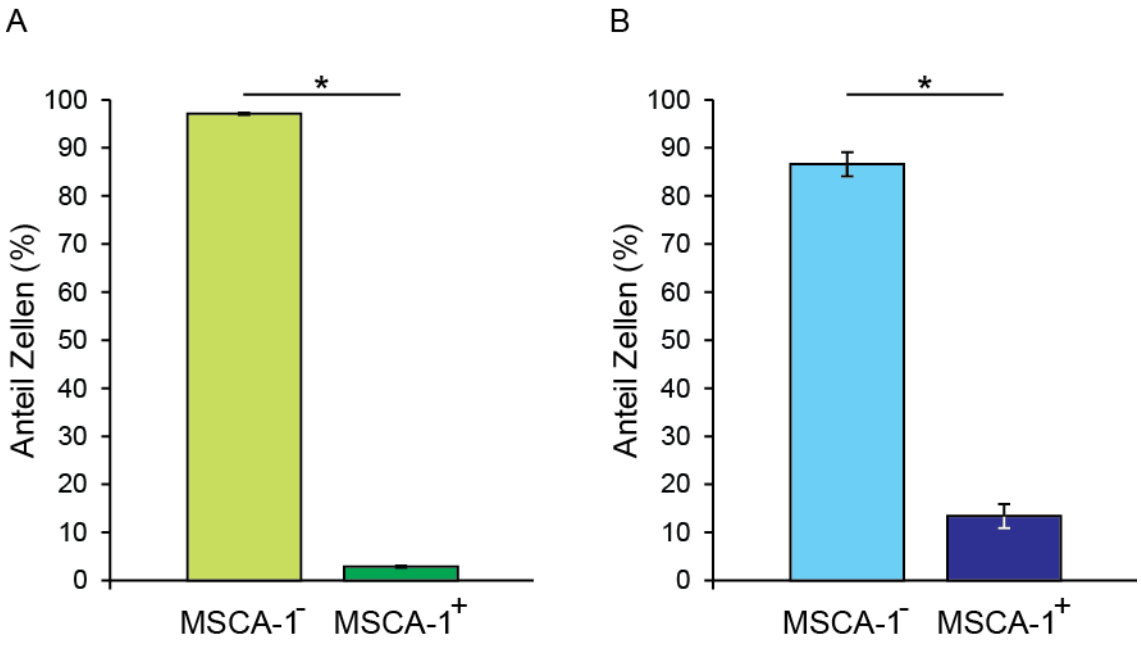


Abbildung 5: Anteil der überlebenden MSCA-1$^-$ und MSCA-1$^+$ Zellen (in %) nach MACS (A) und EasySep Separationen (B).

3.2 Analyse der Zellreinheit der mittels MACS und EasySep separierten Zellfraktionen

Die MSCA-1 Expression und somit die Reinheit der separierten MSCA-1$^-$ und MSCA-1$^+$ Zellfraktionen wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen (flow cytometry analysis, FACS) untersucht. Nach der magnetischen Separation wurden die separierten Zellen mit anti-MSCA-1 Überständen [23] und anschließend mit PE-markierten sekundären Antikörpern markiert. Abb. 6 vergleicht die MSCA-1 Expression der MSCA-1$^-$ und MSCA-1$^+$ Zellfraktionen nach der MACS (Abb. 6 C) und der EasySep (Abb. 6 D) Separation (n = 4). Während die MSCA-1 Expression zwischen der MSCA-1$^-$ (11,15 ± 3.17) und MSCA-1$^+$ (44,26 ± 5,24) Zellfraktion nach MACS Separation signifikant ($p < 0,021$) unterschiedlich war, konnte keine höhere MSCA-1 Expression in der MSCA-1$^+$ (18,95 ± 9,73) gegenüber der MSCA-1$^-$ Zellfraktion (27,69 ± 10,10; n.s.) nach der Separation mit EasySep beobachtet werden. Diese Fraktionen verhielten sich entgegengesetzt der Erwartungen. Abb. 6 A und B zeigen repräsentative Histogramme (schwarz: PE-Kontrolle, rot: MSCA-1 exprimierende Probe) der durchflusszytometrischen Analysen für die MSCA-1$^{-/+}$ Zellfraktionen nach beiden Separationsmethoden. Die MSCA-1 Expression in den MSCA-1$^+$ Fraktionen von MACS und EasySep unterschieden sich signifikant ($p < 0,044$).

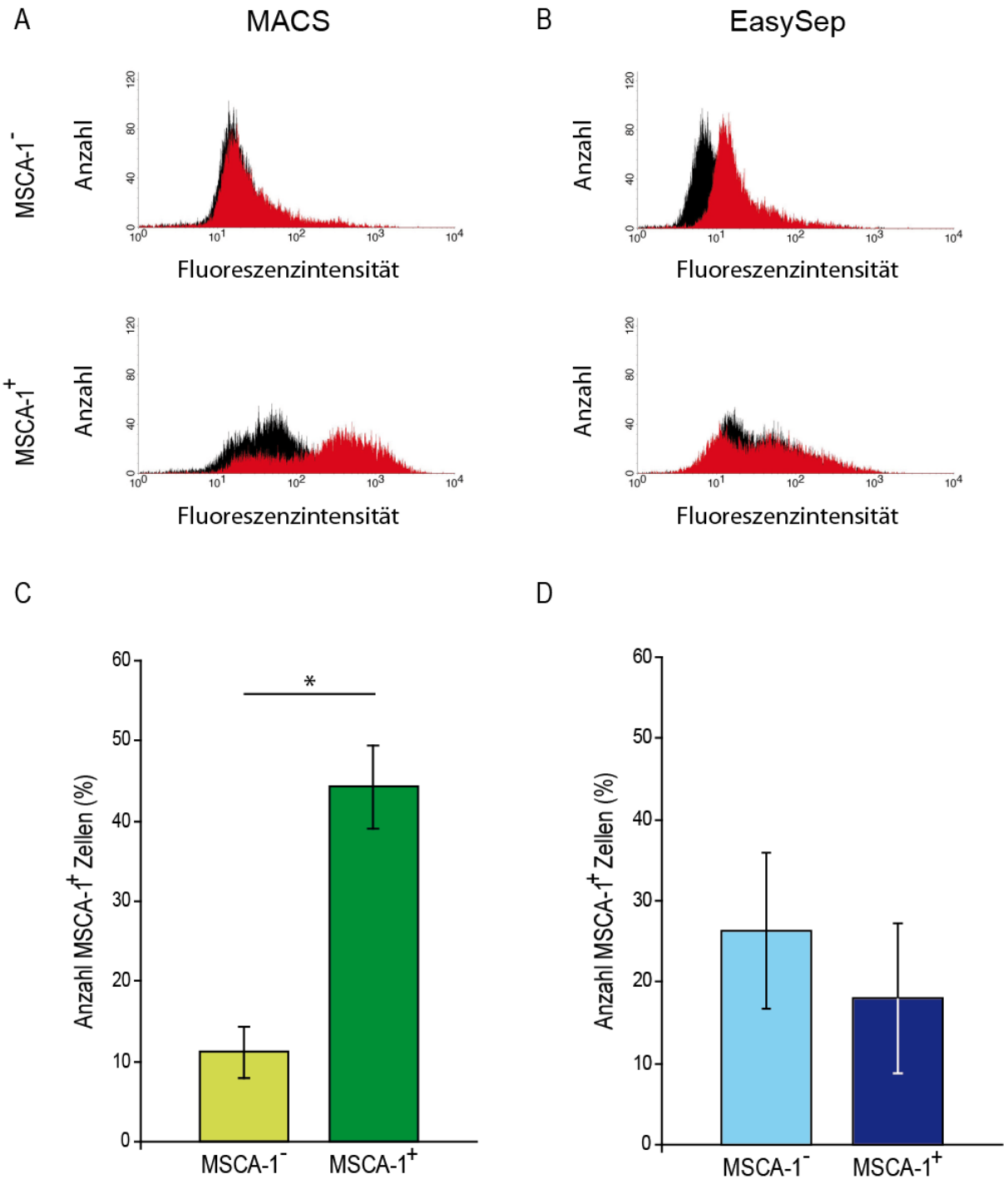


Abbildung 6: Untersuchung der Zellreinheit

repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen der MACS- (A) und EasySep- (B) separierten Zellfraktionen. Quantitative Auswertung der gemessenen Anzahl (in %) der MSCA-1$^+$ Zellen in den Fraktionen nach MACS (C) und EasySep Separationen (D).

3.3. Mineralisationskapazität der durch MACS und EasySep separierten Zellfraktionen

Nach der Separation der MSCA-1$^{-/+}$ Zellfraktionen durch MACS und EasySep (n = 15 für jede Methode), wurden die Zellen in 6-Well Platten ausgesät und für 30 Tage osteogen stimuliert. Die Mineralisationskapazität der Fraktionen wurde mittels Alizarin-Rot Färbung analysiert, anschließend wurden die Kalziumphosphat-Präzipitate photometrisch quantifiziert. Die so ermittelten Werte der osteogen differenzierten Zellfraktionen wurden ins Verhältnis zu den entsprechenden unbehandelten Kontrollen gesetzt (Induktionsindex: x-fach). Die MSCA-1^{+} Zellfraktionen in der Passage nach der MACS-Separation zeigten eine höhere Mineralisationskapazität (Induktionsindex: 73,37 ± 39,98-fach) als die MSCA-1^{-} Zellfraktionen (14,05 ± 4,29-fach). In Abbildung 7 A ist zu erkennen, dass die MSCA-1^{+} Zellfraktionen einen fünffach höheren Anteil an Kalziumphosphat-Präzipitaten vorwiesen. EasySep hingegen lieferte nahezu identische Mineralisationskapazitäten (Abb. 7 B) für die MSCA-1^{+} Zellfraktionen (58,24 ± 25,52-fach) sowie für die MSCA-1^{-} Zellfraktionen (58,86 ± 23,41-fach).

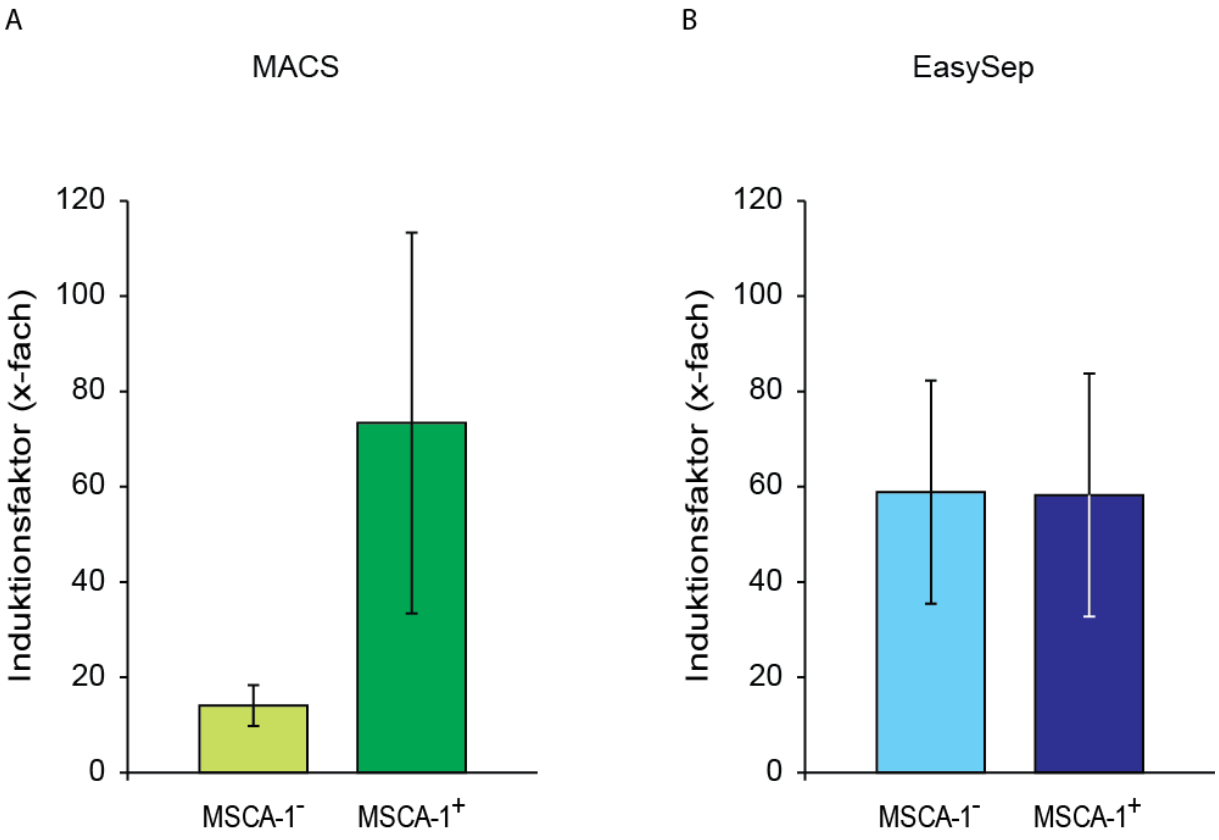


Abbildung 7: Mineralisationskapazität der MSCA-1$^{-/+}$ Zellfraktionen in der Passage der MACS (A) und EasySep (B) Separationen.

3.4. Bestimmung der Mineralisationskapazität im Laufe der *in vitro* Passagierung

Im Verlaufe der weiteren *in vitro* Passagierung, wurde die Mineralisationskapazität für beide Separationsmethoden untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Passagen 8, 9, 11 und 13 verglichen. Das Mineralisationsverhalten der Zellen änderte sich im Laufe der Passagen im Vergleich zur Separationspassage dahingehend grundlegend, dass in den Passagen 8, 9, 11 und 13 die MSCA-1$^-$ Zellfraktionen eine höhere Mineralisationskapazität aufwiesen.

In Passage 8 (n = 4, für beide Separationsmethoden, Abb. 8) zeigten die osteogen stimulierten MACS MSCA-1$^-$ Zellfraktionen eine um 27,22 ± 8,01-fach höhere Mineralisationskapazität, als die unstimulierten Kontrollzellen. Bei den MSCA-1$^+$ Zellfraktionen belief sich die Mineralisationskapazität lediglich auf das 18,71 ± 2,13-fache der unstimulierten Zellen. Die aus EasySep resultierenden Fraktionen zeigten geringere Mineralisationskapazitäten. Die MSCA-1$^-$ Zellfraktionen wiesen eine 20,28 ± 4,62-fach höhere Mineralisationskapazität und MSCA-1$^+$ 9,30 ± 2,71-fach höhere Kapazität, als die unbehandelten Kontrollzellen auf.

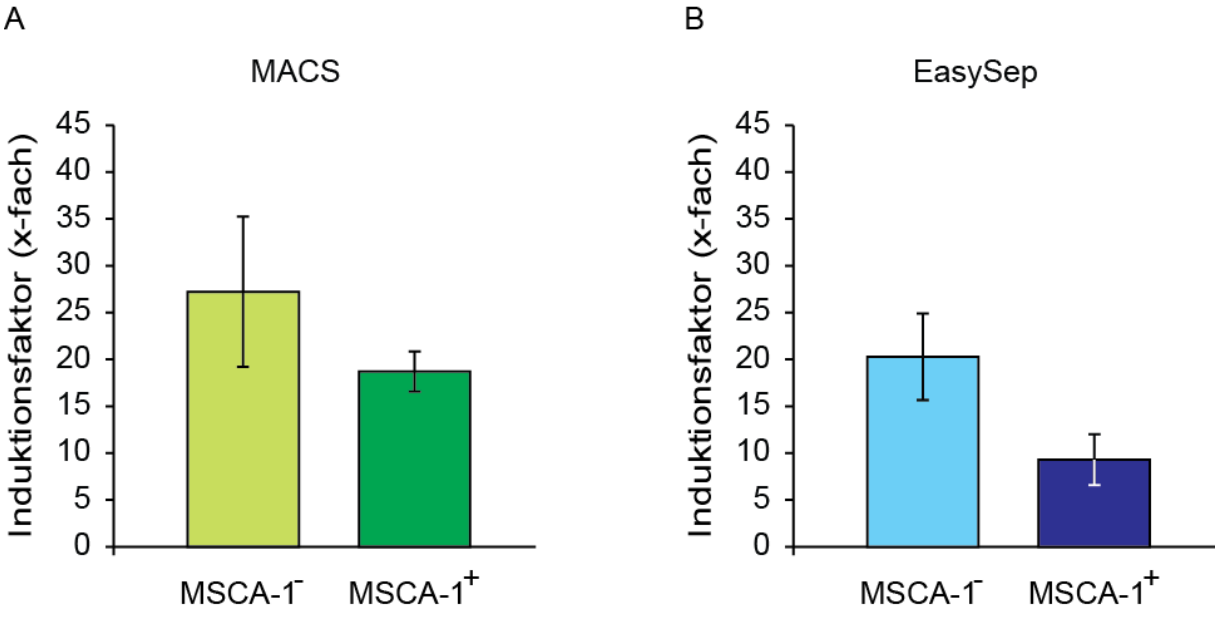


Abbildung 8: Mineralisationskapazität von MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen der Passage 8

MACS separierte Zellfraktionen zeigten in Passage 9 (Abb. 9) bereits eine Abnahme der Mineralisationskapazität auf 8,53 ± 4,00-fach für MSCA-1$^-$ und 3,59 ± 2,01-fach für MSCA-1$^+$ Zellfraktionen (n = 4). EasySep separierte Zellen zeigten geringere Ver-

änderungen. Lediglich die Mineralisationsfähigkeit der MSCA-1$^-$ Zellfraktion nahm auf das 17,54 ± 3,28-fache ab, wohingegen in der MSCA-1$^+$ Zellfraktion eine Zunahme auf das 13,21 ± 4,89-fache der unbehandelten Kontrolle verzeichnet wurde (n = 4).

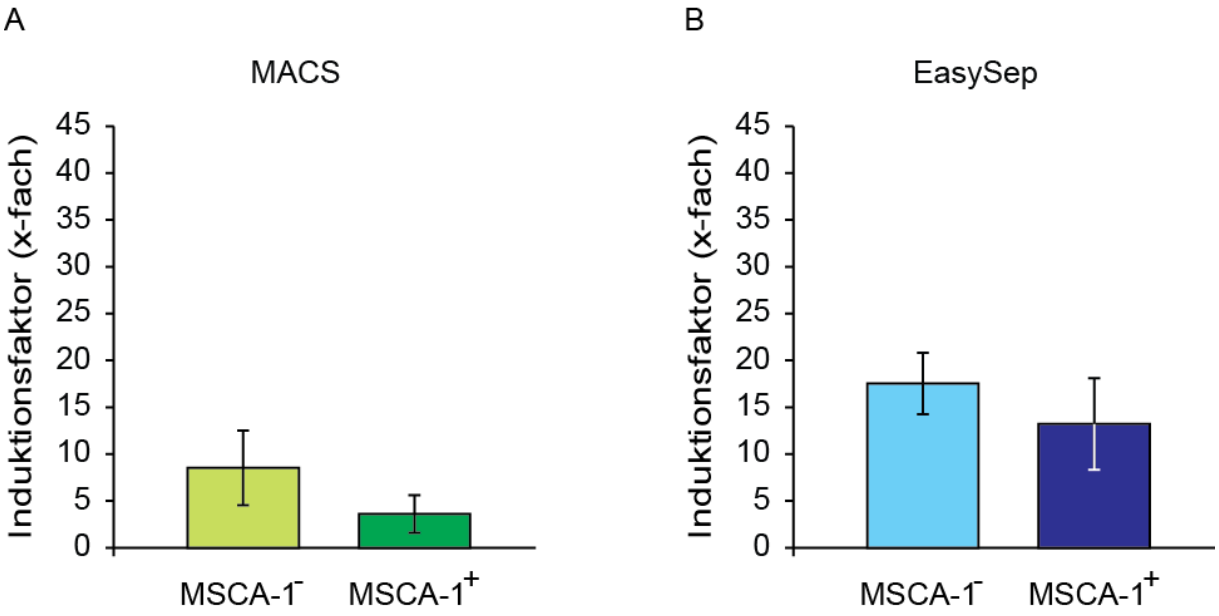


Abbildung 9: Mineralisationskapazität von MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen der Passage 9

MSCA-1$^-$ Zellen der Passage 11 (Abb. 10) erreichten nach der MACS-Separation (n = 4) das 19,48 ± 11,75-fache der unbehandelten Kontrollen und die osteogen stimulierten MSCA-1$^+$ Zellfraktionen zeigten das 17,72 ± 8,42-fache Mineralisationspotenzial der unbehandelten Kontrollen. EasySep separierte Zellfraktionen hingegen zeigten nur noch die 4,89 ± 2,01-fache (MSCA-1$^-$, n = 4), bzw. 3,62 ± 0,95-fache (MSCA-1$^+$, n = 4) Mineralisationskapazität der Kontrollzellen.

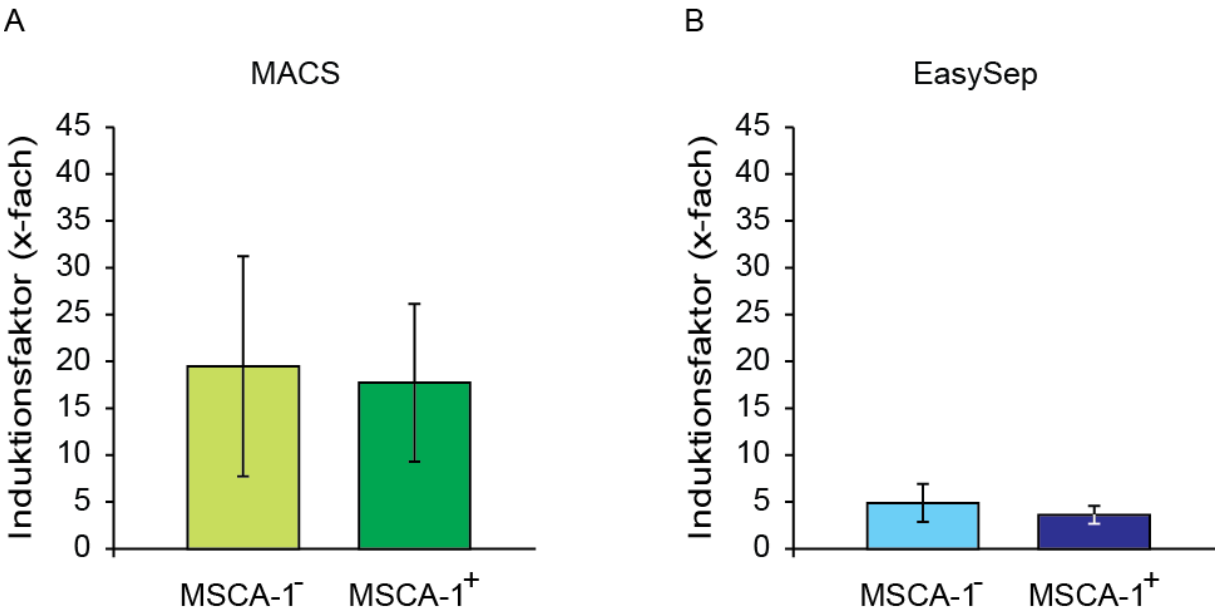


Abbildung 10: Mineralisationskapazität von MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen der Passage 11

Die mittels MACS separierten Zellen erbrachten selbst in Passage 13 (Abb. 11, n = 2) eine relativ hohe Mineralisationskapazität von 20,67 ± 19,07-fach in der MSCA-1$^-$ und 15,74 ± 14,09-fach in der MSCA-1$^+$ Fraktion. Nach den EasySep Separationen (n = 2) hingegen zeigten sich deutlich niedrigere Werte mit 3,69 ± 1,84-fach (MSCA-1$^-$) und 1,95 ± 0,25-fach (MSCA-1$^+$).

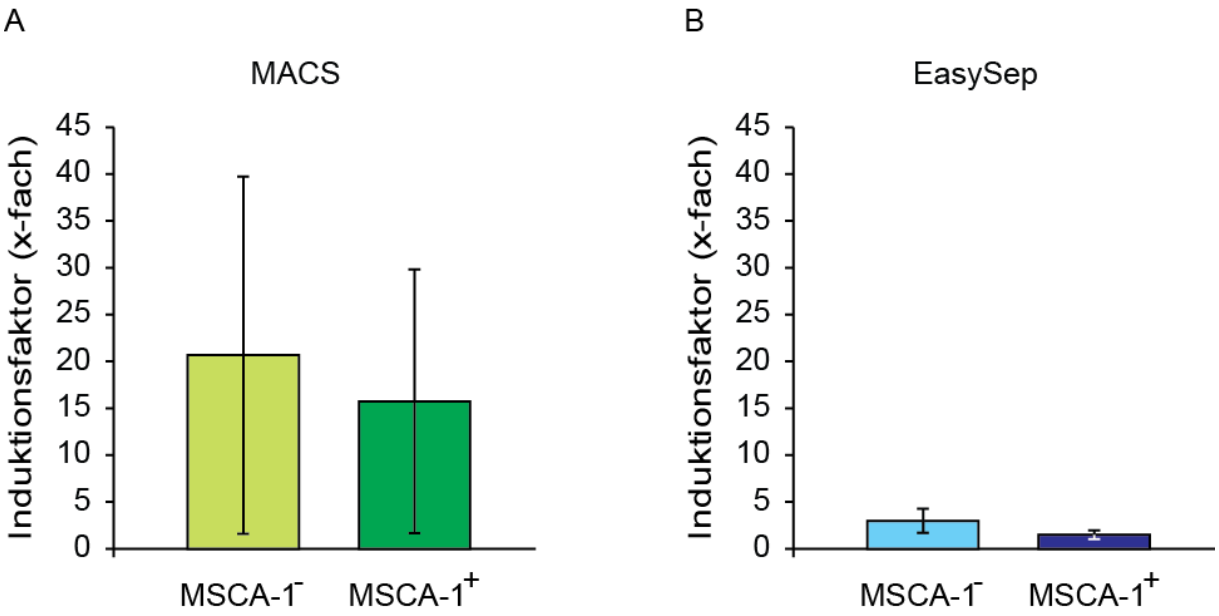


Abbildung 11: Mineralisationskapazität von MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen der Passage 13

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MSCA-1$^+$ Zellfraktion direkt nach der Separation eine 5-fach höhere Mineralisationskapazität als die MSCA-1$^-$ Zellfraktion direkt nach der MACS Separation zeigte. EasySep separierte Zellen zeigten in der gleichen Passage keinen Unterschied. Im Laufe der weiteren *in vitro* Passagierung zeigten MSCA-1$^+$ Zellen im Allgemeinen eine niedrigere osteogene Kapazität, als die MSCA-1$^-$ Zellen unabhängig von der Separationsmethode. Zudem nahm mit zunehmender Passage die Mineralisationskapazität ab. Lediglich MACS separierte Zellen der Passage 9 zeigten einen starken Einbruch, so dass in Passage 11 und 13 die Mineralisationskapazität wieder etwas höher lag. Ungeachtet der Tatsache, dass die MSCA-1$^+$ Fraktionen der Passagen niedrigere Mineralisationskapazitäten zeigten, als die MSCA-1$^-$ Fraktionen, so war das osteogene Potenzial der MACS separierten MSCA-1$^+$ Zellen durchgehend höher, als das von EasySep separierten Zellen, mit Ausnahme der bereits erwähnten Passage 9.

3.5. Bestimmung der Zellverdoppelungszeit im Laufe der *in vitro* Passagierung nach MACS und EasySep Separationen

Aus den Zellzahlen der nach den Separationen weiter kultivierten Zellen wurde für jede Passage die Verdoppelungszeit der einzelnen Fraktionen errechnet. Im Folgenden werden ebenfalls die Verdoppelungszeit der Passage, zu deren Anfang die Separation stand, sowie die Passagen 8, 9, 11 und 13 betrachtet.

Die Verdoppelungszeit der beiden Zellfraktionen nach der MACS Separation (Abb. 12 A) lag in der Passage der Separation (n = 5) bei 6,42 Tage ± 1,20 (MSCA-1$^-$) und 11,71 Tage ± 4,26 (MSCA-1$^+$). In Passage 8 (n = 5) sank die Verdoppelungszeit von MSCA-1$^-$ Zellen auf 5,60 Tage ± 0,66 und 6,46 Tage ± 0,58 für die MSCA-1$^+$-Zellfraktion. Ab Passage 9 (n = 5) war eine Zunahme der Verdoppelungszeit zu erkennen: 6,68 Tage ± 0,90 (MSCA-1$^-$) und 7,10 Tage ± 1,24 (MSCA-1$^+$). Dies setzte sich ebenso in Passage 11 (n = 4) mit 13,53 Tage ± 4,27 der MSCA-1$^-$ Zellfraktion und 11,59 Tage ± 2,26 der MSCA-1$^+$ Zellfraktion fort. In Passage 13 (n = 2) brach dieser Trend wieder ein (MSCA-1$^-$: 7,26 ± 0,93 Tage; MSCA-1$^+$: 8,66 ± 0,58 Tage), die Zellen proliferierten überraschenderweise schneller.

EasySep separierte Zellen zeigten mit 6,24 Tagen ± 0,71 ähnliche Werte für die Verdoppelungszeit (Abb. 12 B) der MSCA-1$^-$ Zellfraktion in der Passage der Separation (n = 5) wie die MACS separierten Zellen. Ebenfalls ähnliche Ergebnisse wie nach der

MACS-Methode wurden bzgl. der Verdoppelungszeit der MSCA-1$^+$ Zellfraktion mit 11,82 Tagen ± 4,16 ermittelt. In Passage 8 (n = 5) stieg die Verdoppelungszeit der MSCA-1$^-$ Fraktion an (9,42 Tage ± 2,98), die der MSCA-1$^+$ Zellfraktion sank (9,42 Tage ± 2,32). Zu Passage 9 (n = 5) war eine deutliche Zunahme der Verdopplungszeit zu verzeichnen (MSCA-1$^-$: 18,98 Tage ± 11,02 Tage; MSCA-1$^+$: 14,34 Tage ± 3,64 Tage). In Passage 11 (n = 4) sanken die Verdoppelungsraten wieder. Die MSCA-1$^-$ Zellfraktion brauchte 7,05 Tage ± 0,76 zur Verdoppelung, die MSCA-1$^+$ Zellfraktion 6,82 Tage ± 0,44. Während die MACS separierten Zellen in Passage 13 wieder schneller proliferierten, folgte bei EasySep auf die kurze Verdoppelungszeit in Passage 11 eine deutlich längere Verdoppelungszeit der MSCA-1$^+$ Zellfraktion in dieser Passage (15,48 Tage ± 3,52; n = 2), während bei der MSCA-1$^-$ Fraktion kaum Änderungen zu Passage 11 auftraten (7,54 Tagen ± 0,45; n = 2).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach beiden Separationsmethoden eine recht hohe Zellverdoppelungszeit zu erkennen war. Die MSCA-1$^-$ Zellfraktionen bildeten hier mit niedrigeren Verdoppelungszeiten eine Ausnahme. Die Verdoppelungszeiten nach der Separation sanken im Allgemeinen bis Passage 8, von diesem Zeitpunkt aus war für die nachfolgenden Passagen eine Zunahme der Verdoppelungszeit zu erkennen. Allerdings zeigten beide Separationsmethoden hier jeweils eine Ausnahme. Während MACS separierte Zellen der Passage 13 nochmals niedrigere Verdoppelungszeiten aufwies, war dies bei EasySep separierten Zellen bereits in Passage 11 der Fall.

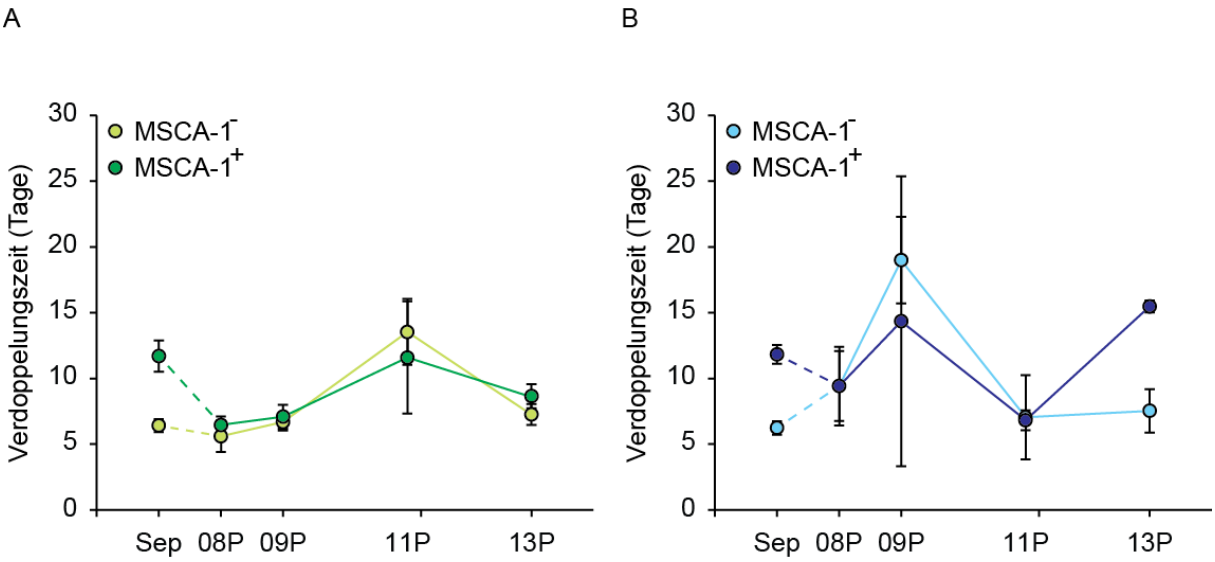


Abbildung 12: Verdoppelungszeit (in Tagen) nach der MACS (A) und EasySep (B) Separation

3.6. Analyse der mitochondrialen Aktivität von MACS und EasySep separierten Zellfraktionen im Laufe der *in vitro* Passagierung

Ähnlich wie in den vorhergehenden Analysen, wurde die mitochondriale Aktivität in der Passage untersucht, in der die Separation stattgefunden hat. In den darauf folgenden Passagen (8, 9, 11 und 13) wurde ebenfalls die Zellproliferationsfähigkeit der MSCA-1$^-$ und MSCA-1$^+$ Zellfraktionen beider Separationsmethoden analysiert. Es wurden pro Separationsmethode und jeweilige Passage Zellen von 4 Patienten verwendet (n = 4).

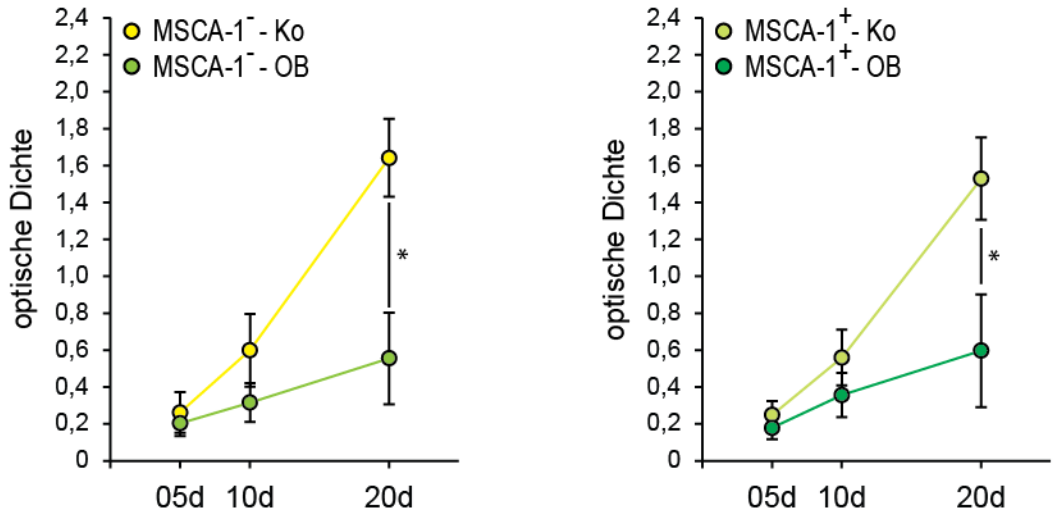
3.6.1. Mitochondriale Aktivität direkt nach der Separation

Proliferationsraten von mit MACS (Abb. 13 A) und EasySep (Abb. 13 B) separierten MSCA-1$^{-/+}$ Zellen wurden an Tag 5, 10 und 20 der osteogenen Differenzierung (OB) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen analysiert. MACS separierte Zellen zeigten ein sehr ähnliches Proliferationsverhalten an Tag 5 (MSCA-1$^-$ Kontrolle im Vergleich zu OB: 0,26 ± 0,11 im Vergleich zu 0,20 ± 0,07; MSCA-1$^+$ Kontrolle im Vergleich zu OB: 0,24 ± 0,08 im Vergleich zu 0,18 ± 0,06). Eindeutige Unterschiede zwischen unbehandelten und osteogen induzierten Zellen wurden an Tag 10 (MSCA-1$^-$ Kontrolle verglichen mit OB: 0,60 ± 0,20 zu 0,32 ± 0,11; MSCA-1$^+$ Kontrolle im Vergleich zu OB: 0,56 ± 0,15 zu 0,36 ± 0,126) und Tag 20 (MSCA-1$^-$ Kontrolle

gegenüber OB: 1,65 ± 0,33 zu 0,56 ± 0,25; MSCA-1$^+$ Kontrolle zu OB: 1,53 ± 0,22 zu 0,60 ± 0,31) festgestellt. Mit einer Ausnahme wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proliferationsraten der MSCA-1$^+$ und der entsprechenden MSCA-1$^-$ Zellfraktion zu den analysierten Zeitpunkten festgestellt. MACS separierte Zellen an Tag 20 zeigten signifikante Unterschiede (MSCA-1$^-$: $p < 0,044$; MSCA-1$^+$: $p < 0,044$) zwischen undifferenzierten und osteogen induzierten Ansätzen für MSCA-1$^-$ und MSCA-1$^+$ Zellen.

EasySep separierte Zellfraktionen proliferierten sehr ähnlich, annähernd parallel, wie die Progressionskurve in Abb. 13 B an Tag 5 und 10 zeigt (MSCA-1$^-$: Kontrolle gegenüber OB: 0,90 ± 0,18 gegen 0,70 ± 0,10; MSCA-1$^+$ Kontrolle zu OB: 0,75 ± 0,13 zu 0,60 ± 0,06). Geringe Unterschiede konnten an Tag 20 (MSCA-1$^-$ Kontrolle verglichen mit OB: 1,72 ± 0,34 gegenüber 1,34 ± 0,38; MSCA-1$^+$ Kontrolle zu OB: 1,58 ± 0,25 zu 1,17 ± 0,28) festgestellt werden. Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten zwischen den undifferenzierten und osteogen stimulierten Zellen oder zwischen MSCA-1$^+$ und der zugehörigen MSCA-1$^-$ Zellfraktion beobachtet werden.

A



B

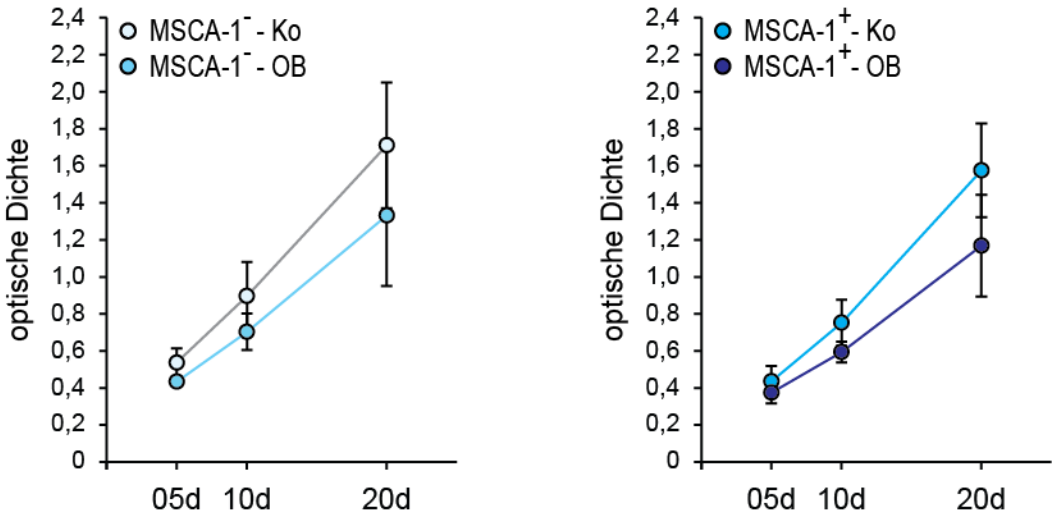


Abbildung 13: Proliferationsverhalten (gemessen an der mitochondrialen Aktivität; auf der y-Achse ist die optische Dichte dargestellt) in Zellen der Separationspassage

3.6.2. Proliferationsverhalten der Zellfraktionen in den nach der Separation folgenden Passagen

3.6.2.1. Zellen der Passage 8

In Passage 8 zeigten die MACS separierten Zellen (Abb. 14 A) an Tag 5 ein sehr ähnliches Proliferationsverhalten der beiden Fraktionen (MSCA-1$^-$: Kontrolle versus OB: 0,66 ± 0,10 versus 0,44 ± 0,09; MSCA-1$^+$: Kontrolle gegen OB: 0,50 ± 0,11 gegen 0,39 ± 0,12). An Tag 10 (MSCA-1$^-$ Kontrolle im Vergleich zu OB: 1,34 ± 0,11 zu 0,90 ± 0,08; $p < 0,044$; MSCA-1$^+$ Kontrolle gegen OB: 1,30 ± 0,15 gegen 0,67 ± 0,10; $p < 0,021$) und Tag 20 (MSCA-1$^-$: Kontrolle: 2,21 ± 0,10, OB: 1,58 ± 0,17; MSCA-1$^+$: $p < 0,044$; Ko: 1,86 ± 0,12 und OB: 1,24 ± 0,09; $p < 0,021$) zeigten sich auch in dieser Passage deutlichere Unterschiede, die für Tag 10 und Tag 20 signifikant verschieden waren.

EasySep zeigte auch in Passage 8 (Abb. 14 B) nur sehr geringe Unterschiede zwischen Kontrollen und den osteogen stimulierten Zellen einer Zellfraktion. An Tag 5 waren kaum erkennbare Unterschiede zu verzeichnen (MSCA-1$^-$: Kontrolle: 0,54 ±

0,20; OB: 0,71 ± 0,30; MSCA-1^{+}: Kontrolle: 0,52 ± 0,22, OB: 0,42 ± 0,17). Auch an Tag 10 (MSCA-1^{-} Kontrolle gegen OB: 1,16 ± 0,28 gegen 1,04 ± 0,36; MSCA-1^{+} Kontrolle zu OB: 0,97 ± 0,22 zu 0,92 ± 0,33) und Tag 20 (MSCA-1^{-} Kontrolle und OB: 1,71 ± 0,33 und 1,43 ± 0,28; MSCA-1^{+} Kontrolle im Vergleich zu OB: 1,69 ± 0,23 zu 1,41 ± 0,33) zeigten die mitochondrialen Aktivitäten der Zellen nur sehr geringe Unterschiede.

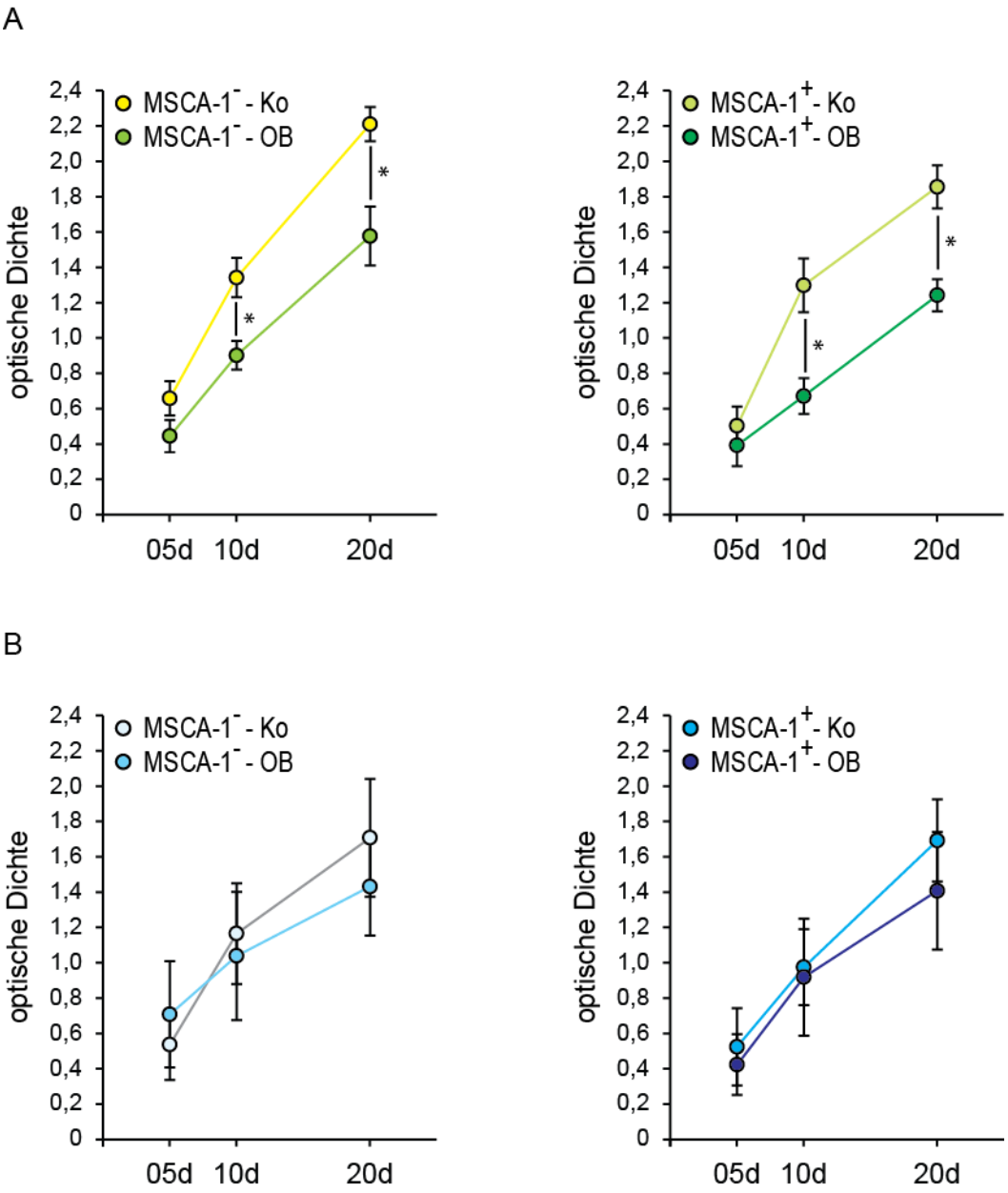


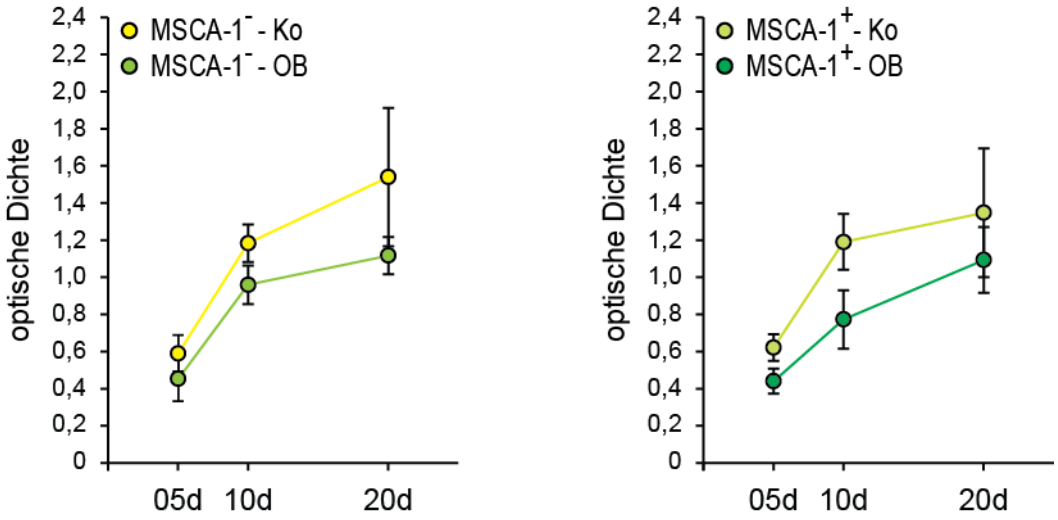
Abbildung 14: Proliferationsverhalten (gemessen an der mitochondrialen Aktivität; auf der y-Achse ist die optische Dichte dargestellt) in Zellen der Passage 8

3.6.2.2. Zellen der Passage 9

Die mitochondriale Aktivität der MACS separierten Zellen der Passage 9 (Abb. 15 A) begann an Tag 5 mit sehr geringen Unterschieden (MSCA-1$^-$: Kontrolle: 0,59 ± 0,10, OB: 0,45 ± 0,12; MSCA-1$^+$: Kontrolle: 0,62 ± 0,07, OB: 0,44 ± 0,07). Die MSCA-1$^-$ Fraktion zeigte an Tag 10 ebenfalls geringe Unterschiede zwischen unstimulierten und osteogen stimulierten Zellen (Kontrolle: 1,18 ± 0,10 zu OB: 0,96 ± 0,10). Diese Unterschiede wurden an Tag 20 deutlicher (Kontrolle: 1,53 ± 0,37, OB: 1,11 ± 0,10). Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion zeigten hingegen eine etwas gegenläufige Entwicklung: an Tag 10 war der Unterschied der mitochondrialen Aktivitäten der differenzierten versus denen der undifferenzierten Zellen größer (Ko: 1,19 ± 0,15; OB: 0,77 ± 0,16) als an Tag 20 (Ko: 1,34 ± 0,35; OB: 1,09 ± 0,18).

EasySep separierte Zellfraktionen zeigten in Passage 9 (Abb. 15 B) kaum nennenswerte Unterschiede weder an Tag 5 (MSCA-1$^-$ Kontrolle: 0,50 ± 0,05; OB: 0,53 ± 0,05; MSCA-1$^+$: Kontrolle: 0,46 ± 0,06; OB: 0,41 ± 0,08) noch an Tag 10 (MSCA-1$^-$: Kontrolle: 0,77 ± 0,11; OB: 0,78 ± 0,12; MSCA-1$^+$: Kontrolle: 0,82 ± 0,08; OB: 0,72 ± 0,18) oder an Tag 20 (MSCA-1$^-$: Kontrolle: 1,36 ± 0,27; OB: 1,19 ± 0,29; MSCA-1$^+$: Kontrolle: 1,24 ± 0,18; OB: 1,19 ± 0,39).

A



B

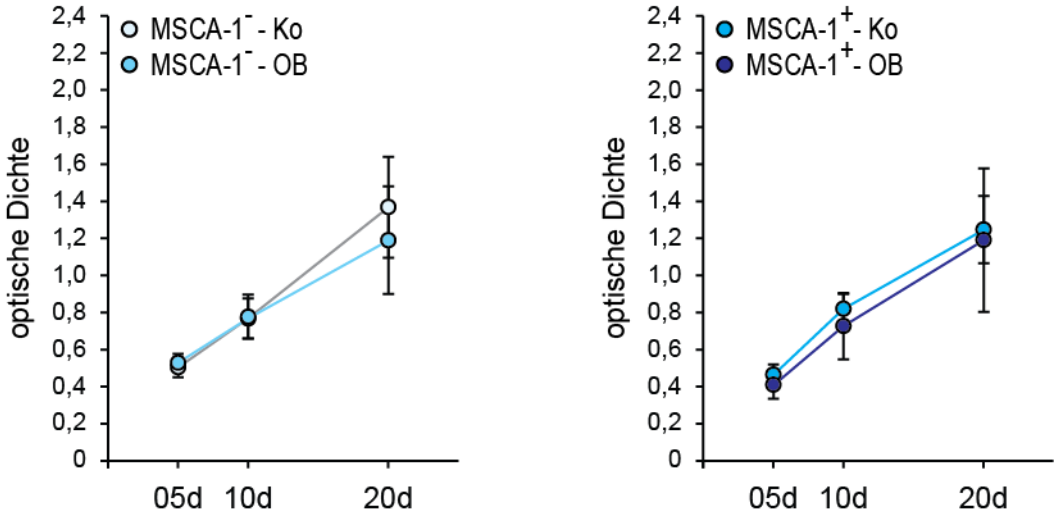


Abbildung 15: Proliferationsverhalten (gemessen an der mitochondrialen Aktivität; auf der y-Achse ist die optische Dichte dargestellt) in Zellen der Passage 9

3.6.2.3. Zellen der Passage 11

In Passage 11 nahm die Proliferationsaktivität der mit MACS separierten Zellfraktionen (Abb. 16 A) im Allgemeinen leicht ab (MSCA-1$^-$ Kontrolle gegen OB: 0,64 ± 0,14 gegen 0,52 ± 0,03und MSCA-1$^+$ Kontrolle im Vergleich zu OB: 0,54 ± 0,10 zu 0,34 ± 0,02). An Tag 10 (MSCA-1$^-$: Kontrolle zu OB: 0,94 ± 0,19 zu 0,79 ± 0,17 und MSCA-1$^+$: Kontrolle versus OB: 0,77 ± 0,16 versus 0,60 ± 0,10) und Tag 20 (MSCA-1$^-$: Kontrolle: 1,36 ± 0,21; OB: 1,04 ± 0,20; MSCA-1$^+$: Kontrolle: 1,15 ± 0,15; OB: 0,84 ± 0,17) waren die Unterschiede ähnlich den vorangegangenen Passagen.

EasySep separierte Zellfraktionen zeigten in Passage 11 (Abb. 16 B) an Tag 5 nur geringfügige Unterschiede (MSCA-1$^-$: Kontrolle: 0,49 ± 0,04; OB: 0,50 ± 0,08; MSCA-1$^+$: Kontrolle: 0,52 ± 0,08; OB: 0,40 ± 0,03). An Tag 10 waren ebenfalls lediglich geringe Unterschiede für MSCA-1$^-$ (Kontrolle: 0,88 ± 0,17; OB: 0,62 ± 0,05) und für MSCA-1$^+$ (Kontrolle: 0,67 ± 0,11; OB: 0,52 ± 0,06) zu erkennen. An Tag 20 zeigten sich deutlichere Unterschiede zwischen den unbehandelten Kontrollen und den osteogen induzierten Zellen sowohl für die MSCA-1$^-$ Fraktion ($p > 0,021$) mit 1,63 ± 0,08 (Kontrolle) und 1,17 ± 0,08 (OB) als auch für die MSCA-1$^+$ Fraktion ($p < 0,021$): 1,63 ± 0,18 (Kontrolle) zu 0,91 ± 0,09 (OB).

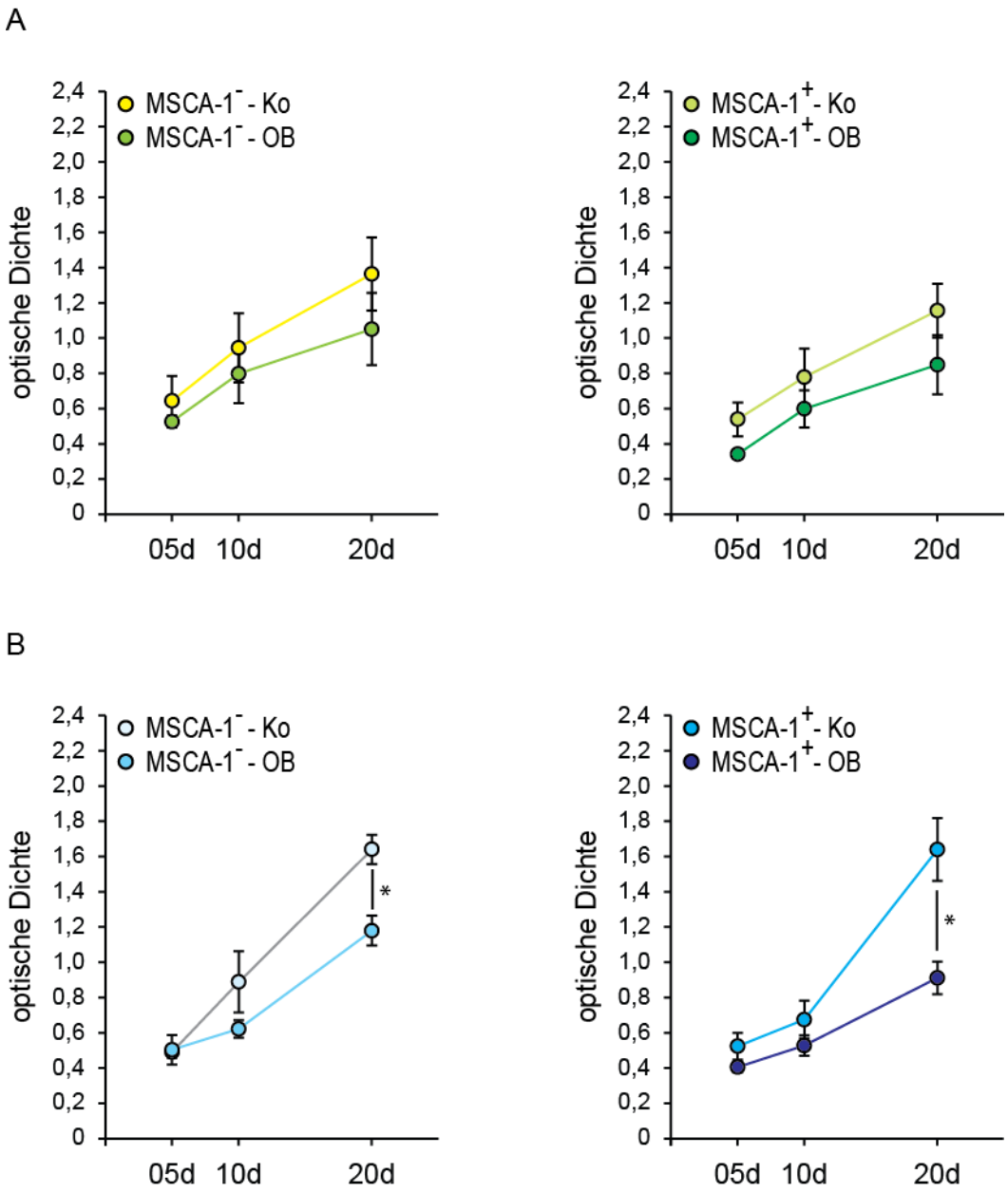


Abbildung 16: Proliferationsverhalten (gemessen an der mitochondrialen Aktivität; auf der y-Achse ist die optische Dichte dargestellt) in Zellen der Passage 11

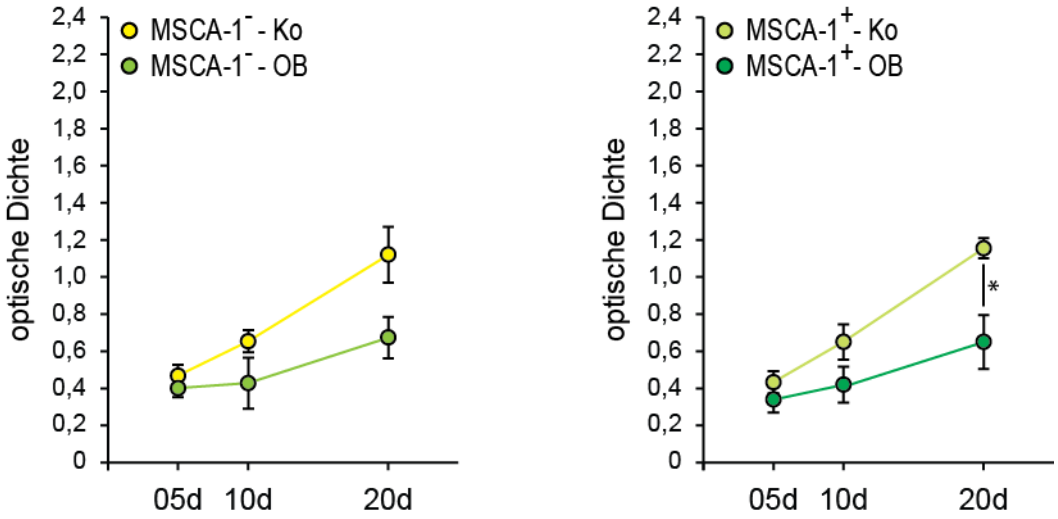
3.6.2.4. Zellen der Passage 13

Auch in Passage 13 zeigten die MACS separierten Zellfraktionen (Abb. 17 A) das gewohnte Bild. Während an Tag 5 kaum Unterschiede bzgl. der mitochondrialen Aktivität der Zellen zu erkennen waren (MSCA-1$^-$: Kontrolle gegen OB: 0,46 ± 0,06 gegen 0,40 ± 0,05; MCA-1$^+$: Kontrolle zu OB: 0,43 ± 0,06 zu 0,34 ± 0,07) konnten teilweise signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und osteogen differenzierten Zellen an Tag 10 (MSCA-1$^-$: Kontrolle und OB: 0,65 ± 0,06 und 0,42 ± 0,13;

MSCA-1$^+$: Kontrolle zu OB 0,64 ± 0,09 zu 0,41 ± 0,1) sowie an Tag 20 (MSCA-1$^-$: Kontrolle: 1,11 ± 0,15; OB: 0,67 ± 0,11; MSCA-1$^+$: Kontrolle: 1,14 ± 0,05; OB: 0,64 ± 0,14; $p < 0,021$) beobachtet werden.

EasySep separierte Zellfraktionen zeigten ebenfalls in Passage 13 (Abb. 17 B) an Tag 5 keine Unterschiede zwischen osteogen stimulierten Zellen und den entsprechenden Kontrollen (MSCA-1$^-$: Kontrolle zu OB: 0,57 ± 0,08 zu 0,61 ± 0,11; MSCA-1$^+$ Kontrolle im Vergleich mit OB: 0,61 ± 0,03 mit 0,41 ± 0,02). An Tag 10 waren leichte Unterschiede (MSCA-1$^-$ Kontrolle und OB: 0,82 ± 0,03 und 0,56 ± 0,16; MSCA-1$^+$ Kontrolle zu OB: 0,63 ± 0,07 zu 0,40 ± 0,10) zu verzeichnen. An Tag 20 wurden ähnliche Ergebnisse der Proliferationsfähigkeit wie in Passage 11 detektiert: MSCA-1$^-$: 1,24 ± 0,13 (Kontrolle) und 0,81 ± 0,20 (OB) sowie MSCA-1$^+$ ($p < 0,044$): 1,15 ± 0,14 (Kontrolle) zu 0,62 ± 0,15 (OB).

A



B

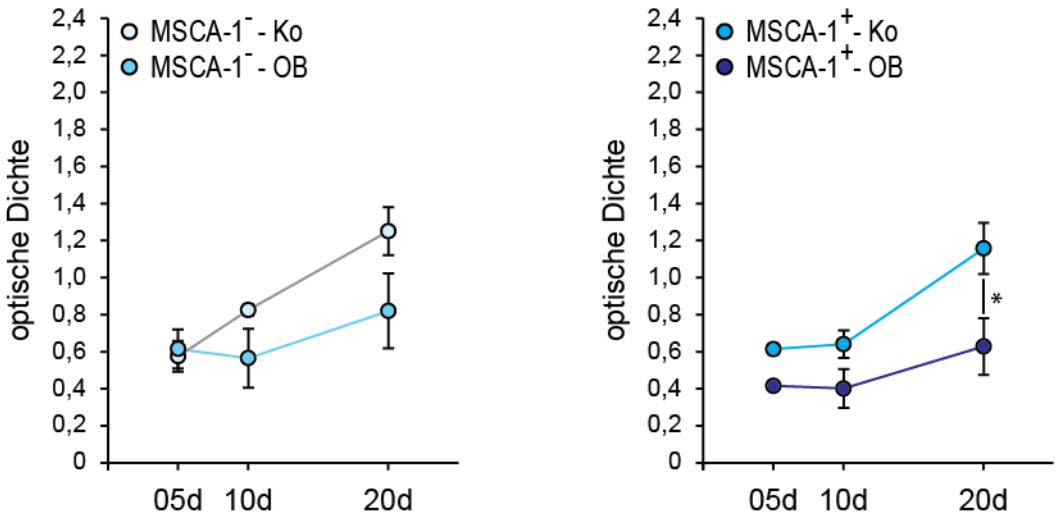


Abbildung 17: Proliferationsverhalten (gemessen an der mitochondrialen Aktivität; auf der y-Achse ist die optische Dichte dargestellt) in Zellen der Passage 13

Aus den oben genannten Ergebnissen bzgl. der mitochondrialen Aktivität von MACS und EasySep separierten Zellfraktionen im Laufe der *in vitro* Passagierung können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- in der Passage der Separation wurden bei MACS separierten Zellfraktionen signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und den osteogen stimulierten Zellen detektiert, während bei EasySep separierten Zellen dieser Nachweis nicht gelang
- dieser Trend setzte sich in den folgenden Passagen mit einer Ausnahme (EasySep Fraktionen der Passage 11) fort
- während der *in vitro* Passagierung nahm im Allgemeinen die Proliferationsfähigkeit (gemessen an der mitochondrialen Aktivität) der unbehandelten Kontrollzellen mit zunehmender Passagenzahl ab

3.7. Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (AP) Aktivität in MACS und EasySep separierten Zellfraktionen

Nach der Separation wurde nach 5, 10 und 30 Tagen der osteogenen Stimulation der Zellen der Nachweis der alkalische Phosphatase im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen durchgeführt.

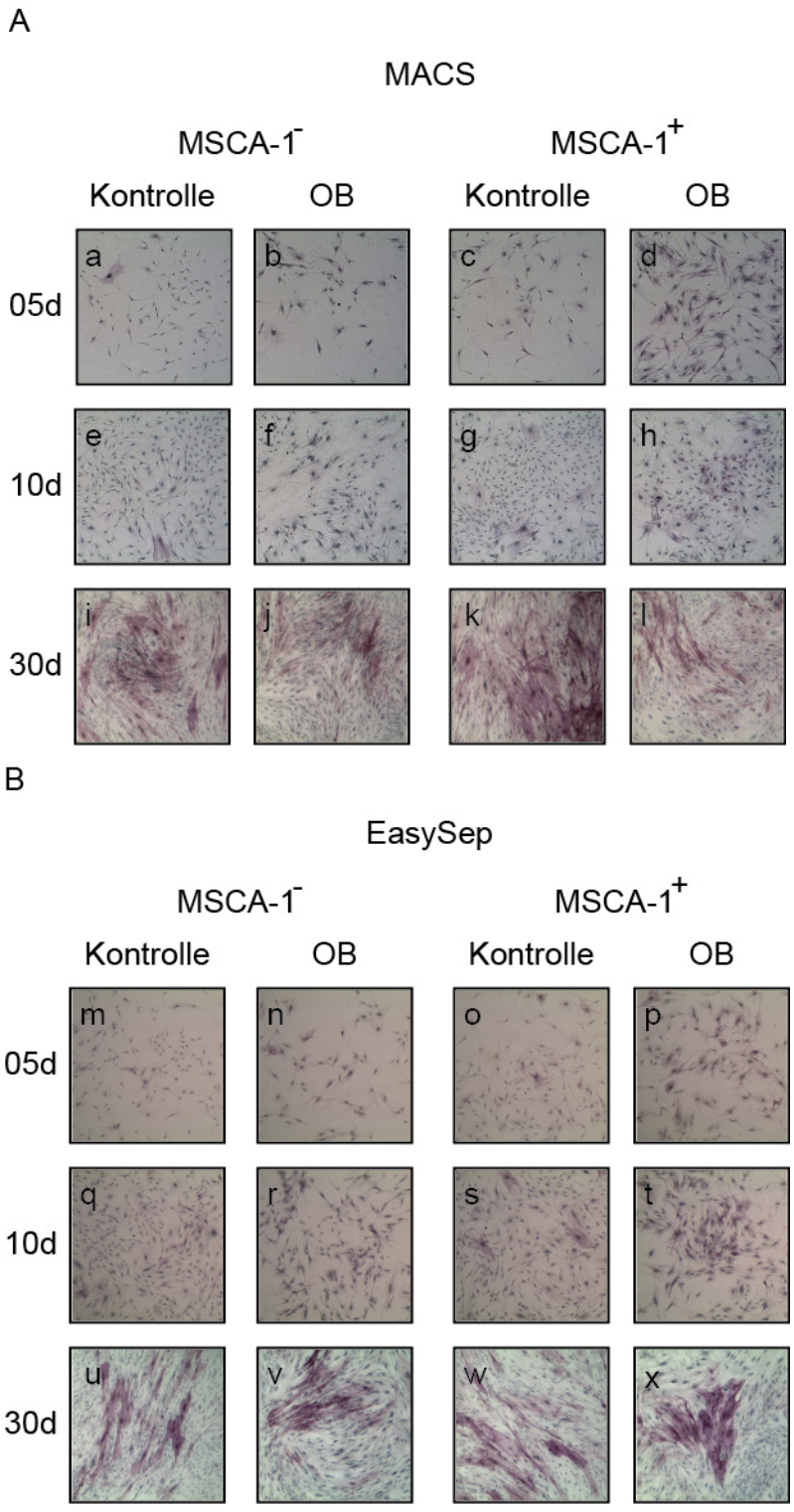


Abbildung 18: Aktivität der alkalischen Phosphatase in MACS (A) und EasySep (B) separierte Fraktionen. Gezeigt werden jeweils unbehandelte Kontrollen und osteogen stimulierte (OB) Proben der MSCA-1- und MSCA-1+ Zellfraktionen an den Tagen 5, 10 und 30 nach der Erstinduktion. Rosa-violett – AP, dunkelblau – Zellkerne

3.7.1. AP Aktivität in den MACS separierten Zellfraktionen

Die Zelldichte der mit MACS (Abb.18 A) separierten Zellen nahm im Laufe der Kultivierung zu. Nach 5 Tagen waren nur einzelne Zellen zu entdecken. Hiervon zeigten auch nur sehr vereinzelte Zellen eine Färbung. Die MSCA-1$^-$ Zellfraktion zeigte eine etwas dichtere Besiedelung der Kulturoberfläche in der Kontrollzellgruppe (Abb. 18 a) im Vergleich zur osteogen stimulierten Gruppe (Abb. 18 b). Letztere zeigte eine geringfügig höhere AP Aktivität. Im Gegensatz dazu, war der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (Abb. 18 c) und den osteogen stimulierten Zellen (Abb. 18 d) der MSCA-1$^+$ Zellfraktion an Tag 5 deutlich zu erkennen. Die osteogen induzierten Zellen bildeten einen dichteren Rasen aus und zeigten eine deutlich höhere AP Aktivität, sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch im Vergleich zur MSCA-1$^-$ Fraktion.

An Tag 10 wurde der Zellmonolayer dichter und die AP Aktivität nahm leicht zu. Wie bereits an Tag 5 wurde auch an Tag 10 eine höhere Zelldichte in den Kontrollzellen (Abb. 18 e) der MSCA-1$^-$ Zellfraktion gegenüber den osteogen induzierten Zellen (Abb. 18 f) festgestellt. Dies traf ebenfalls auf die MSCA-1+ Zellfraktion zu (Abb. 18 g und h). Auch nach 10 Tagen war die Aktivität der alkalischen Phosphatase in der OB-Gruppe deutlich höher als in der Gruppe der unbehandelten Kontrollen.

Nach 30 Tagen in Kultur war in allen Zellgruppen ein dichter Zellrasen gewachsen. Die MSCA-1$^-$ Zellfraktion zeigte nun in der Kontrollgruppe (Abb. 18 i) eine höhere AP Aktivität als in den osteogen stimulierten Zellen (Abb. 18 j). Ein identisches Bild bot sich in der MSCA-1$^+$ Zellfraktion (Abb. 18 k und l).

3.7.2. AP Aktivität in den EasySep separierten Zellfraktionen

Wie nach MACS Separationen, nahm auch nach EasySep Separationen die Zelldichte zu (Abb. 18 B). An Tag 5 waren in der MSCA-1$^-$ Zellfraktion einzelne Zellen zu sehen. Die Kontrollgruppe (Abb. 18 m) zeigte eine etwas höhere Zelldichte als die osteogen behandelten Zellen (Abb. 18 n). Allerdings zeigten letztere eine höhere AP Aktivität als die unbehandelten Zellen. In der MSCA-1$^+$ Zellfraktion konnten bezüglich der Zelldichte keine relevanten Unterschiede zwischen Kontroll- (Abb. 18 o) und OB-Gruppe (Abb. 18 p) festgestellt werden. Aber auch hier wurde eine höhere AP Aktivität in den OB-behandelten Zellen beobachtet.

An Tag 10 stieg die Zelldichte in allen EasySep Fraktionen (Kontrolle und OB) an. Die Zelldichte der MSCA-1$^-$ Fraktion war in den unbehandelten Kontrollen (Abb. 18 q)

wiederum höher, als in den osteogen stimulierten Zellen (Abb. 18 r). Allerdings zeigte sich hinsichtlich der AP Aktivität kein bemerkenswerter Unterschied. Auch in der MSCA-1$^+$ Fraktion war die Zelldichte in der Kontrollgruppe (Abb. 18 s) höher. Die osteogen stimulierten Zellen (Abb. 18 t) zeigten jedoch eine stärkere AP Aktivität.
An Tag 30 bildete sich ein geschlossener und dichter Zellrasen, der in der MSCA-1$^-$ Kontrollgruppe (Abb. 18 u) dichter schien, als in der OB-Gruppe (Abb. 18 v). Die Aktivität der alkalischen Phosphatase zeigte sehr geringe Unterschiede mit einer leicht stärkeren Tendenz in den osteogen induzierten Zellen. Die Zelldichte der MSCA-1$^+$ Fraktion war in der osteogen induzierten Gruppe (Abb. 18 w) höher als in den unbehandelten Kontrollen (Abb. 18 x). Auch schien hier eine geringfügig stärkere AP Aktivität gegeben zu sein.
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass an den frühen Zeitpunkten (Tag 5, Tag 10) nach beiden Separationsmethoden eine stärkere AP Aktivität in den osteogen stimulierten Zellgruppen zu beobachten war, unabhängig der separierten Fraktion. Für beide Methoden war jedoch die stärkste Aktivität in den MSCA-1$^+$ Fraktionen zu verzeichnen. An Tag 30 änderte sich dieses Muster. MACS separierte Zellen zeigten zu diesem Zeitpunkt eine stärkere AP Aktivität in den unbehandelten Kontrollen, allerdings zeigt hierbei die MSCA-1$^+$ Fraktion eine stärkere Aktivität, als die MSCA-1$^-$ Fraktion. EasySep separierte Zellen zeigten an Tag 30 keine Unterschiede zwischen der MSCA-1$^-$ und der MSCA-1$^+$ Zellfraktion. Auch die jeweiligen Kontrollen sowie die osteogen stimulierten Zellen zeigten eine sehr ähnliche AP Aktivität.

3.8. Untersuchung der Zellseneszenz im Laufe der *in vitro* Passagierung von MACS und EasySep separierten Zellfraktionen

Mittels der ß-Galaktosidase Färbung wurde die Zellseneszenz untersucht. Dies erfolgte sowohl in unbehandelten als auch in osteogen stimulierten Zellen 11 Tage nach der Erstinduktion. Die seneszenten Zellen wurden durch eine Blaufärbung der exprimierten ß-Galaktosidase markiert.

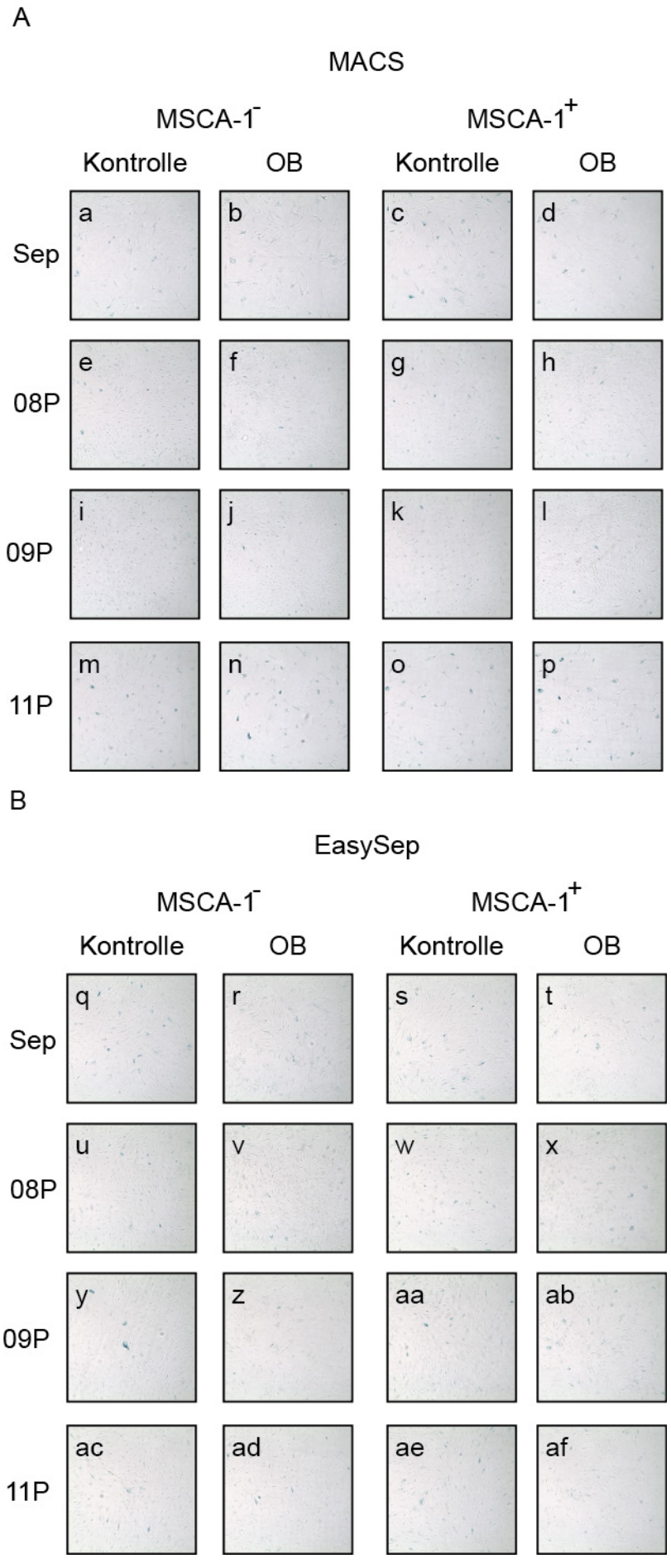

A
MACS
MSCA-1-
MSCA-1+
Kontrolle
OB
Kontrolle
OB
Sep
08P
09P
11P
a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
B
EasySep
MSCA-1-
MSCA-1+
Kontrolle
OB
Kontrolle
OB
Sep
08P
09P
11P
q
r
s
t
u
v
w
x
y
z
aa
ab
ac
ad
ae
af

Abbildung 19: Nachweis der Zellseneszenz
mittels ß-Galaktosidase Färbung (blau) der nach MACS (A) und EasySep (B) gewonnenen Zellfraktionen. Dargestellt sind jeweils unbehandelte Kontrollen und osteogen stimulierte (OB) Proben der MSCA-1$^-$ und MSCA-1$^+$ Zellfraktionen in der Separationspassage, in der achten, neunten und elften Passage.

3.8.1. ß-Galaktosidase Expression in den MACS separierten Zellfraktionen

In der Passage der Separation zeigten sich sowohl in der Kontrolle (Abb. 19 a), als auch in OB (Abb. 19 b) induzierten Zellen der MSCA-1$^-$ Zellfraktion einzelne größere leicht blau gefärbte Zellen. Die MSCA-1$^+$ Zellen zeigten in der Kontrollgruppe (Abb. 19 c) eine stärkere Blaufärbung, wohingegen die osteogen stimulierten Zellen eine geringere Färbung aufzeigten (Abb. 19 d). Diese fiel sogar schwächer als die der MSCA-1$^-$ Fraktion aus.
Die MSCA-1$^-$ Fraktion der Passage 8 zeigte eine sehr schwache Färbung, die in der Kontrollgruppe (Abb. 19 e) etwas stärker war, als in den osteogen stimulierten Zellen (Abb. 19 f). Das gleiche Muster, allerdings etwas weniger intensiv zeigte sich auch in der MSCA-1$^+$ Zellfraktion (Abb. 19 g und 19 h). Beide Fraktionen zeigten eine geringere Färbung, als in der Passage der Separation.
Ähnlich verhielten sich die Zellen der Passage 9 (Abb. 19 i - l). Auch hier waren einzelne Zellen mit einer schwach bläulichen Färbung zu entdecken. Das Grundmuster einer stärkeren Färbung der Kontrollen jeder Fraktion blieb bestehen, ebenso war eine geringfügig stärkere Färbung in der MSCA-1$^-$ Fraktion ersichtlich.
Waren bisher eher leichte bläuliche Schleier in den Zellen zu entdecken gewesen, so zeigte sich in Passage 11 eine starke Färbung einzelner Zellen in allen Fraktionen. Hier war die OB-Gruppe (Abb. 19 m) der MSCA-1$^-$ Zellfraktion erstmalig stärker gefärbt, als die entsprechende Kontrolle (Abb. 19 n). Die MSCA-1$^+$ Zellfraktion schien in beiden Gruppen annähernd gleich intensiv gefärbt (Abb. 19 o und 19 p).

3.8.2. ß-Galaktosidase Expression in den EasySep separierten Zellfraktionen

Die EasySep separierte MSCA-1$^-$ Zellfraktion zeigte in der Passage der Separation in einzelnen Zellen eine leichte blaue Färbung. Wie bereits bei MACS separierten Zellfraktionen festgestellt, war auch hier die Kontrollgruppe intensiver gefärbt (Abb. 19 q), als die mit OB stimulierten Zellen (Abb. 19 r). Die Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion zeigten eine weniger starke Färbung, als die entsprechenden MSCA-1$^-$ Gruppen. Auch hier waren die Kontrollen (Abb. 19 s) im Verhältnis stärker gefärbt, als die osteogen induzierte Gruppe (Abb. 19 t).
Im Vergleich zur Passage der Separation war in Passage 8 eine deutlich geringere Farbintensität der ß-Galaktosidase zu beobachten. In der MSCA-1$^-$ Zellfraktion zeigte sich nur ein minimaler Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (Abb. 19 u) und den osteogen stimulierten Zellen (Abb. 19 v), während die Kontrolle der MSCA-1$^+$ Zellfraktion (Abb. 19 w) eine etwas intensivere Färbung zeigte, als die entsprechenden OB stimulierten Zellen (Abb. 19 x).
Die Kontrollzellen der MSCA-1$^-$ Fraktion der Passage 9 (Abb. 19 y) zeigten eine etwas intensivere Färbung, als die entsprechende Gruppe in Passage 8, während die osteogen stimulierten Zellen (Abb. 19 z) eine geringere Färbung aufwiesen, als in Passage 8. Auch die Kontrollen der MSCA-1$^+$ Fraktion (Abb. 19 aa) zeigten eine geringfügig stärkere Färbung, als in Passage 8. In der Gruppe der osteogen stimulierten Zellen (Abb. 19 ab) war kein wirklicher Unterschied zu erkennen.
In Passage 11 schien die ß-Galaktosidase Expression der Kontrollgruppe der MSCA-1$^-$ Fraktion (Abb. 19 ac) weniger stark als in Passage 9 und als in der zugehörige OB-Gruppe (Abb. 19 ad) ausgeprägt zu sein. Diese wiederum war Nuancen stärker gefärbt als in Passage 9. Die Kontrolle der MSCA-1$^+$ Fraktion (Abb. 19 ae) war stärker gefärbt als die entsprechenden OB stimulierten Zellen (Abb. 19 af). Auch zeigte sich kein Unterschied zu Passage 9. Die osteogen stimulierten Zellen waren weniger stark gefärbt als in Passage 9.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den Passagen der Separation sowohl MACS als auch EasySep Fraktionen eine höhere Seneszenz aufwiesen als in den darauf folgenden Passagen. Auffallend war, dass fast durchgängig die Kontrollgruppen eine höhere Seneszenz aufwiesen, als die osteogen stimulierten Zellen aller Fraktionen. Die stärkste Seneszenz zeigte sich in den MACS separierten Zellen der

elften Passage, wohingegen die Zellen von EasySep in dieser Passage nur sehr geringe Änderungen zu Passage 9 aufwiesen.

3.9. Untersuchungen der Genexpression in MACS und Easy Sep separierten Zellfraktionen im Laufe der osteogenen Differenzierung in der Passage nach der Separation

In den separierten Zellen wurde die Genexpression von osteogenen Marker (Osx – Osterix; AP - alkalische Phosphatase; Runx-2 - runt related transcription factor-2; Igf-2 - Insuline-like growth factor-2) sowie von einigen Interleukinen (IL-1α – Interleukin-1 alpha; IL-1β – Interleukin-1 beta; IL-6 – Interleukin-6; IL-8 – Interleukin-8) untersucht. Hierzu wurde an Tag 5, 10 und 30 nach der erstmaligen osteogenen Induktion mRNA aus den Proben isoliert, anschließend in cDNA umgeschrieben und diese mittels Echtzeit-PCR vervielfältigt und quantitativ erfasst. Die Werte wurden jeweils ins Verhältnis zu dem Housekeeping Gen GAPDH gesetzt und die Ratios der osteogen stimulierten Zellen in Bezug zu denen der unbehandelten Kontrollen gesetzt (Induktionsindex – x-fach).

3.9.1. Genexpression von Osterix (Osx)

Die Quantifizierung der Expressionslevels von Osx nach der MACS (Abb. 20 A) Separation zeigte für die MSCA-1$^-$ Zellfraktion lediglich eine sehr geringe Zunahme an Tag 5 der Osteogenese (1,13 ± 0,40-fach; n = 2). An Tag 10 und 30 war eine leichte Zunahme der Genexpression zu verzeichnen (Tag 10: 1,73 ± 1,40-fach; n = 3; an Tag 30: 1,84 ± 0,28-fach, n = 4). Die MSCA-1$^+$ Zellfraktion zeigte eine insgesamt höhere Osx Expression während der Osteogenese als die Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion. Während die mRNA Levels in osteogen stimulierten Zellen an Tag 5 9,96 ± 5,42-fach (n = 2) höher waren als in den unstimulierten Kontrollen, konnte an Tag 10 eine 5,22 ± 5,09-fach (n = 3) und an Tag 30 eine 9,78 ± 7,52-fach (n = 4) höhere Expression detektiert werden.

Die EasySep separierte MSCA-1$^-$ Fraktion (Abb. 20 B) zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie die MACS separierte Fraktion, allerdings bei etwas höheren Induktionsindices. Beginnend an Tag 5 mit einem Induktionsindex von 2,23 ± 1,46-fach (n = 2), nahm die Expression langsam zu und erreichte Werte von 2,86 ± 1,11-fach (n = 3) an Tag 10 und 4,71 ± 4,47-fach (n = 4) an Tag 30. Die MSCA-1$^+$ Zellfraktion

zeigte eine geringere Osx Expression als die MSCA-1$^-$ Fraktion, bzw. als die entsprechende MACS Fraktion. Eine leichte Expressionszunahme von Tag 5 (0,43 ± 0,40-fach; n = 2) zu Tag 10 (3,80 ± 1,53-fach; n = 3) und Tag 30 (2,76 ± 1,31-fach; n = 4) konnte in den osteogen stimulierten Zellen nachgewiesen werden.

Während die MACS separierte MSCA-1$^+$ Fraktion zu allen Zeitpunkten eine deutlich höhere Osx Induktion als die MSCA-1$^-$ Fraktion zeigte, war dies in den EasySep Fraktionen gerade andersherum der Fall. In der MSCA-1$^-$ Fraktion konnten höhere Induktionsindices als in der entsprechenden MSCA-1$^+$ Fraktion nachgewiesen werden.

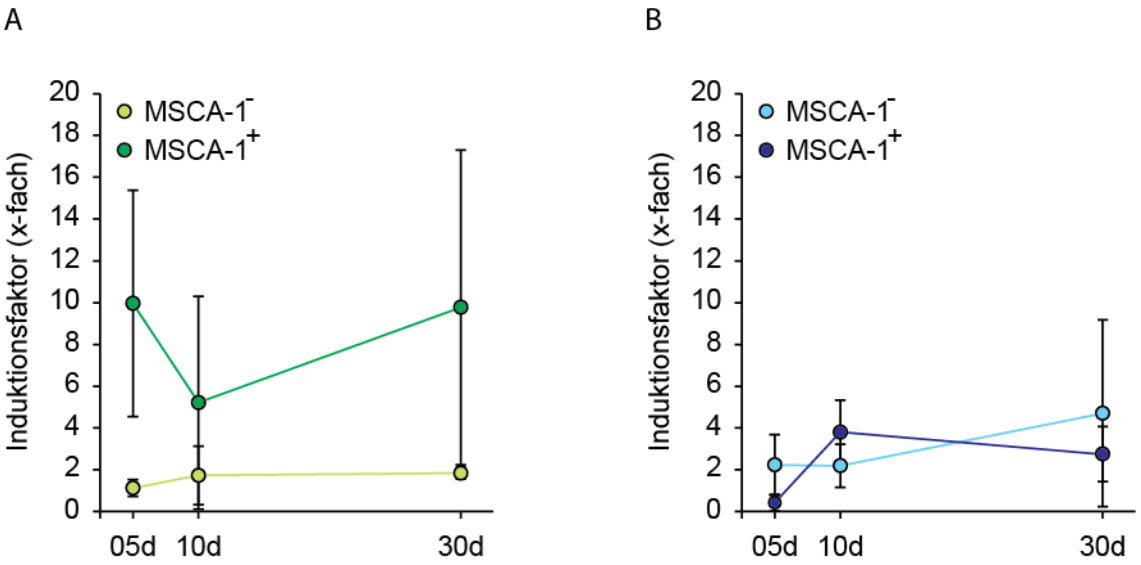


Abbildung 20: Quantitative Analyse der Osterix (Osx) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Zeitpunkte (Tag 5, 10 und 30) der Osteogenese dar.

3.9.2. Genexpression der alkalischen Phosphatase (AP)

Tendenziell wurde die alkalischen Phosphatase in beiden MACS-Fraktionen ähnlich exprimiert (Abb. 21 A), die Expression nahm von Tag 5 zu Tag 30 der Osteogenese ab, allerdings unterschiedlich stark. Osteogen stimulierte Zellen der MSCA$^-$ Zellfraktion zeigten an Tag 5 eine 12,85 ± 6,63-fache Induktion (n = 2), an Tag 10 eine 4,85 ± 1,04-fache (n = 3) und an Tag 30 eine 2,05 ± 0,48-fache (n = 4) in Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. In den differenzierenden Zellen der MSCA-1$^+$ Zellfraktion

wurde an Tag 5 eine 7,46 ± 2,29-fache (n = 2), an Tag 10 eine 6,41 ± 3,50-fache (n = 3) und an Tag 30 eine 1,95 ± 0,68-fache (n = 4) Induktion der AP Expression im Vergleich zu den Kontrollen detektiert.

Das Expressionsmuster der AP in den EasySep separierten Fraktionen (Abb. 21 B) lieferte ein etwas anderes Bild. Die MSCA-1$^-$ Zellfraktion zeigte an Tag 5 eine 8,67 ± 5,71-fache (n = 2), an Tag 10 eine 2,24 ± 0,85-fache (n = 3) und an Tag 30 eine 5,46 ± 2,16-fache (n = 4) Induktion der AP Expression in osteogen stimulierten Zellen. In der MSCA-1$^+$ Zellfraktion wurden niedrigere Induktionsindices detektiert: an Tag 5: 1,23 ± 0,82-fach (n = 2), an Tag 10: 4,00 ± 2,08-fach (n = 3) und an Tag 30 annähernd auf dem gleichen Niveau: 3,48 ± 0,95-fach; (n = 4).

Das Expressionsmuster der alkalischen Phosphatase zeigte nach beiden Separationsmethoden einen ähnlichen Verlauf. An Tag 10 wurden höhere Induktionsindices in den MSCA-1$^+$ Fraktionen als in den MSCA-1$^-$ Fraktionen detektiert, an den beiden anderen Zeitpunkten lagen diese unter denen der MSCA-1$^-$ Fraktionen.

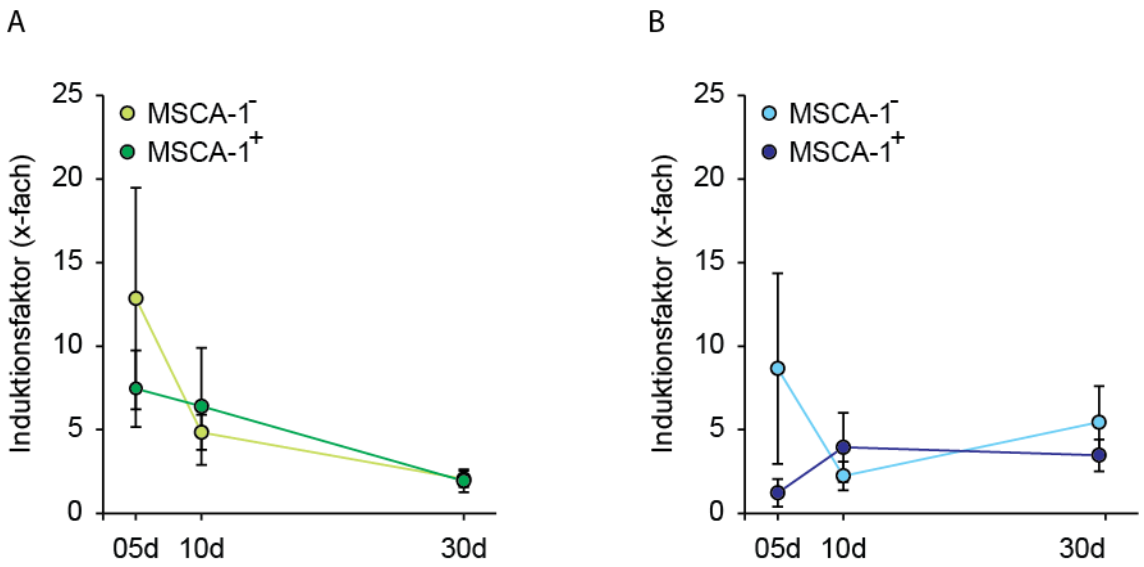


Abbildung 21: Quantitative Analyse der alkalischen Phosphatase (AP) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.
Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Zeitpunkte (Tag 5, 10 und 30) der Osteogenese dar.

3.9.3. Genexpression von runt related transcription factor-2 (Runx-2)

Nach der MACS Separation (Abb. 22 A) konnte in osteogen stimulierten Zellen der MSCA-1$^-$ Zellfraktion eine 3,11 ± 1,52-fache (n = 2) an Tag 5, eine 3,00 ± 0,95-fache (n = 3) an Tag 10 und eine 5,20 ± 1,20-fache (n = 4) Induktion an Tag 30 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen nachgewiesen werden. Zellen der MSCA-1$^+$ Zellfraktion zeigten ähnliche Induktionswerte an allen analysierten Zeitpunkten: Tag 5: 3,66 ± 2,83-fach (n = 2), Tag 10 3,31 ± 0,55-fach (n = 3) und Tag 30 2,96 ± 1,30-fach (n = 4).

Die osteogen stimulierten Zellen der mittels EasySep (Abb. 22 B) isolierten MSCA-1$^-$ Zellfraktion zeigten im Vergleich zu unstimulierten Zellen eine sehr schwache Runx-2 Induktion (Tag 5: 1,22 ± 0,37-fach; n = 2; Tag 10: 1,48 ± 0,45-fach; n = 3; Tag 30: 1,42 ± 0,30-fach; n = 4). In der entsprechenden MSCA-1$^+$ Zellfraktion wurden zunehmende Runx-2 Transkriptionslevels im Laufe der Osteogenese detektiert: an Tag 5: 1,00 ± 0,90-fach (n = 2), an Tag 10: 2,82 ± 0,44-fach (n = 3) und an Tag 30: 4,01 ± 1,99-fach (n = 4).

Ein deutlicher Trend bzgl. der Runx-2 Expression war nicht ersichtlich. In osteogen stimulierten Zellen wurden mit Ausnahme der MSCA-1$^-$ EasySep Fraktion etwa dreifach höhere Levels detektiert

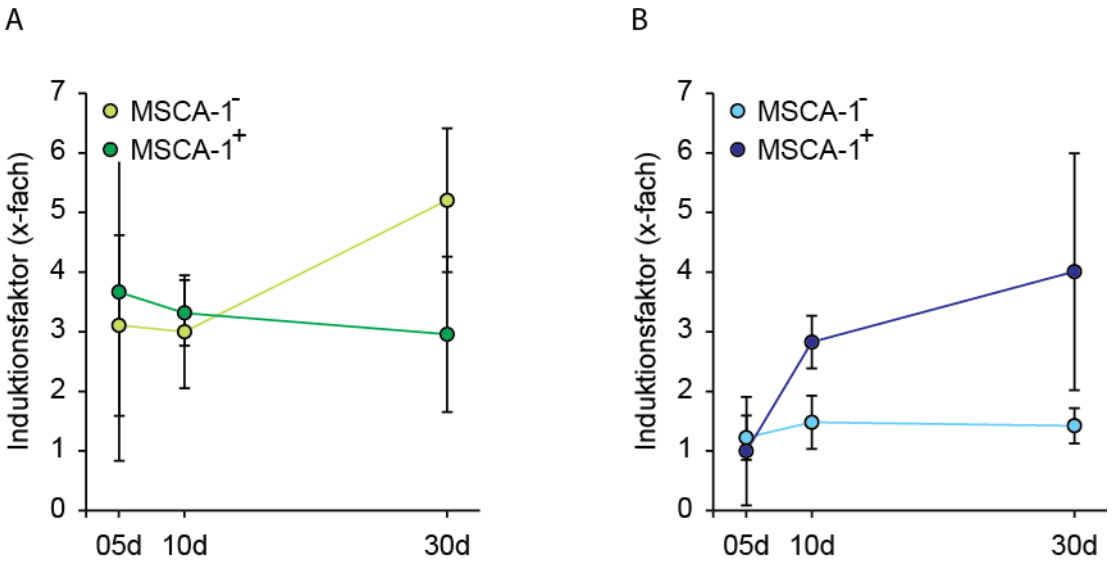


Abbildung 22: Quantitative Analyse der runt related transcription factor-2 (Runx-2) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.

Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Zeitpunkte (Tag 5, 10 und 30) der Osteogenese dar.

3.9.4. Genexpression von Insuline-like growth factor-2 (Igf-2)

Das Expressionsniveau von Igf-2 wies in beiden durch MACS gewonnenen Zellfraktionen hohe Levels auf (Abb. 23 A). Osteogen induzierte Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion steigerten ihre Igf-2 Expression an Tag 5 auf das 5,72 ± 3,61-fache (n = 2), an Tag 10 auf das 31,42 ± 24,07-fache (n = 3) und an Tag 30 auf das 22,76 ± 15,50-fache (n = 4). Differenzierende Zellen der MSCA-1$^+$ Zellfraktion zeigten an Tag 5 9,19 ± 2,24-fach (n = 2), an Tag 10 21,88 ± 5,68-fach (n = 3) und an Tag 30 47,45 ± 40,15-fach (n = 4) höhere Transkriptlevels verglichen mit unbehandelten Kontrollen.
Zellen beider mittels EasySep isolierten Fraktionen (Abb. 23 B) zeigten tendenziell eine etwas schwächere Igf-2 Induktion. Osteogen stimulierte Zellen der MSCA-1$^-$ Zellfraktion zeigten an Tag 5 noch keine nennenswerte Igf-2 Induktion (1,45 ± 2,99-fach, n = 2). An Tag 10 wurde jedoch eine 17,62-fache ± 9,19 (n = 3) Induktion erreicht, um an Tag 30 wieder auf das 13,19 ± 10,69-fache zu sinken. Die Igf-2 Induktion in Zellen der MSCA-1$^+$ Zellfraktion verlief relativ ähnlich (Tag 5: 0,82 ± 5,28-fach; n = 2; Tag 10: 22,88 ± 16,71-fach; n = 3; Tag 30: 14,99 ± 12,96-fach).
Insgesamt konnten höhere Induktionslevels der Igf-2 Expression in den MACS separierten Zellfraktionen im Vergleich zu den EasySep isolierten Subpopulationen detektiert werden. Während die MACS separierte MSCA-1$^+$ Zellfraktion einen stetigen Anstieg der Igf-2 Induktionsindices im Verlauf der Osteogenese zeigte, waren bei der entsprechenden EasySep Fraktion eine maximale Induktion an Tag 10 zu verzeichnen.

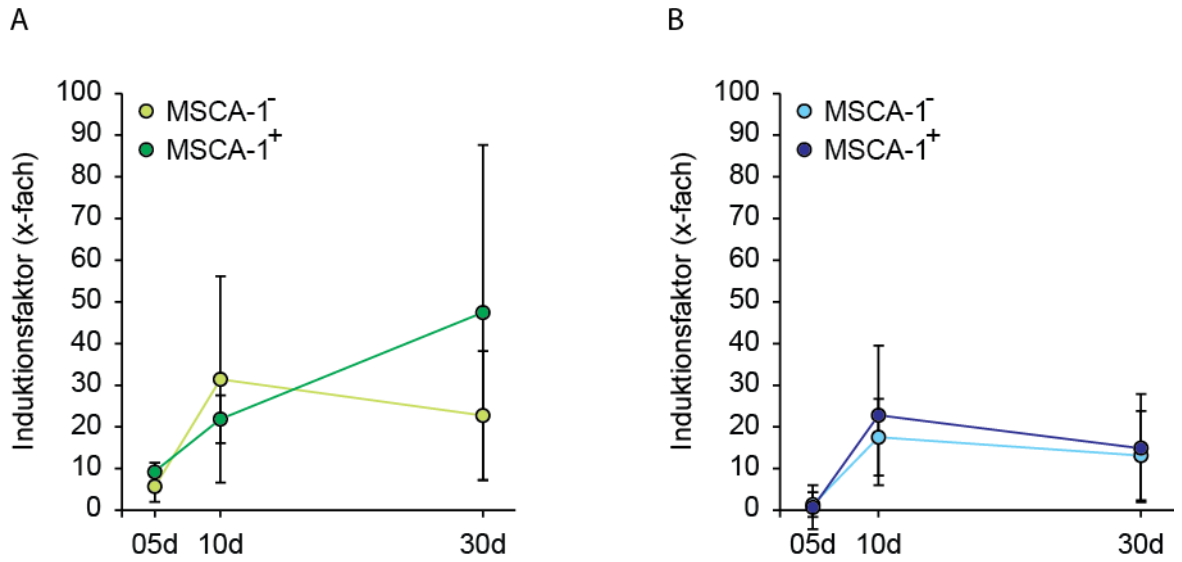


Abbildung 23: Quantitative Analyse des Insuline-like growth factor-2 (Igf-2) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.
Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Zeitpunkte (Tag 5, 10 und 30) der Osteogenese dar.

3.9.5. Genexpression von Interleukin-1 alpha (IL-1α)

MSCA-1$^{-/+}$ Zellfraktionen zeigten insgesamt sehr niedrige Genexpressionslevels von IL-1α. Osteogen induzierte Zellen der MACS (Abb. 24 A) separierten MSCA-1^{-} Zellfraktion zeigten eine Inhibition der Transkriptlevels im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen (0,28 ± 0,24-fach an Tag 5 (n = 2), 0,17 ± 0,07-fach an Tag 10 (n = 3) und 0,84 ± 0,67-fach (n = 4) an Tag 30). Auch differenzierende Zellen der MSCA-1^{+} Zellfraktion reduzierten ihre IL-1α Transkriptlevels während der Osteogenese (0,80 ± 0,31-fach an Tag 5 (n = 2), 0,47 ± 0,31-fach an Tag 10 (n = 3) und 0,44 ± 0,67-fach an Tag 30 (n = 4).

Nach der EasySep Separation (Abb. 24 B) zeigten die Zellen der MSCA-1^{-} Zellfraktion tendenziell eine noch stärkere Reduktion der IL-1α Expressionslevels (0,10 ± 0,04-fach an Tag 5 (n = 2), 0,16 ± 0,08-fach (n = 3) an Tag 10, 0,16 ± 0,06-fach (n = 4) an Tag 30) verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Während die Zellen der MSCA-1^{+} Fraktion an Tag 5 die IL-1α Expression fast einstellten (0,04 ± 0,02-fach, n = 2) wurde an Tag 10 und 30 vergleichbare Repressionslevels wie bei der MACS separierten Fraktion detektiert (0,32 ± 0,27-fach, n = 3; 0,47 ± 0,17-fach, n = 4).

Insgesamt zeigten osteogen induzierte Fraktionen eine starke Repression der IL-1α Expressionslevels unabhängig von der Separationsmethode. Die stärkste Inhibition der IL-1α Genexpression wurde in der EasySep separierten MSCA-1$^-$ Zellfraktion detektiert.

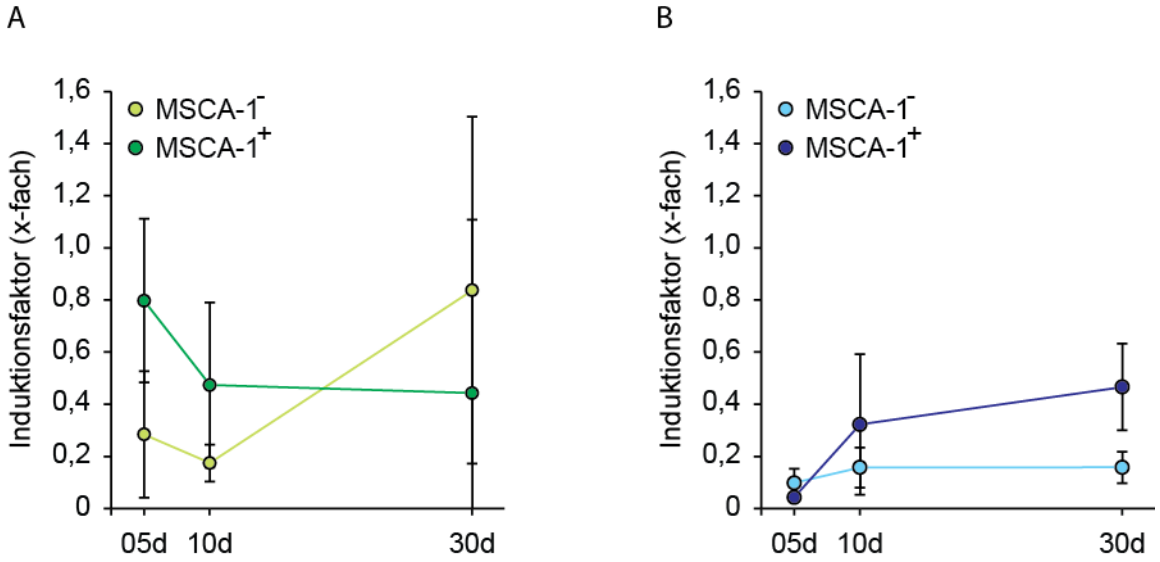


Abbildung 24: Quantitative Analyse der Interleukin-1 alpha (IL-1α) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.
Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Zeitpunkte (Tag 5, 10 und 30) der Osteogenese dar.

3.9.6. Genexpression von Interleukin-1 beta (IL-1β)

Die mRNA Levels für Interleukin-1 beta zeigten ähnlich wie für IL-1α insgesamt eine sehr niedrige Expression und eine tendenziell noch stärkere Repression während der Osteogenese. Die durch MACS-Separation (Abb. 25 A) gewonnene MSCA-1$^-$ Fraktion zeigte einen Repressionsindex von 0,02 ± 0,01-fach (n = 2) an Tag 5, von 0,06 ± 0,02-fach an Tag 10 (n = 3) und von 0,21 ± 0,12-fach an Tag 30 (n = 4). Ähnlich niedrige Werte wurden in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion nachgewiesen (Tag 5: 0,16 ± 1,12-fach, n = 2; Tag 10: 0,09 ± 0,02-fach, n = 3; Tag 30: 0,03 ± 0,01-fach, n = 4).
Die IL-1β Expression der osteogen induzierten MSCA-1$^-$ Zellen der EasySep Methode (Abb. 25 B) reduzierte sich an Tag 5 auf das 0,09 ± 0,04-fache (n = 2) an Tag 10 auf das 0,04 ± 0,02-fache (n = 3) und an Tag 30 auf das 0,04 ± 0,03-fache (n = 4).

Die Zellen der MSCA-1$^+$ Zellfraktion zeigten ähnliche Repressionsindices: an Tag 5: 0,02 ± 2,12-fach (n = 2), an Tag 10: 0,11 ± 0,03-fach (n = 3) und an Tag 30 0,09 ± 0,03-fach (n = 4).

Die oben genannten Ergebnisse schildern eine nahezu Einstellung der IL-1ß Genexpression während der Osteogenese.

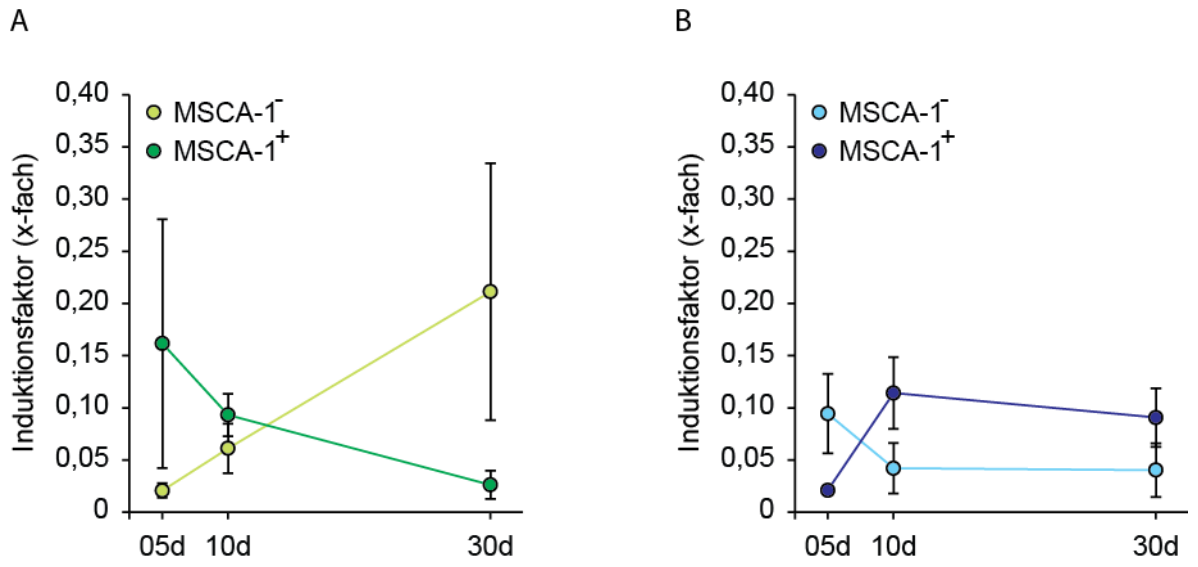


Abbildung 25: Quantitative Analyse der Interleukin-1 beta (IL-1β) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.

Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Zeitpunkte (Tag 5, 10 und 30) der Osteogenese dar.

3.9.7. Genexpression von Interleukin-6 (IL-6)

Die Quantifizierung der IL-6 Transkriptlevels in osteogen stimulierten MACS-Fraktionen zeigte eine relativ starke Repression während der Differenzierung (Abb. 26 A). Die Zellen der MSCA-1$^-$ Zellfraktion reduzierten ihre mRNA Levels an Tag 5 auf das 0,40 ± 0,09-fache (n = 2), an Tag 10 auf das 0,31 ± 0,14-fache (n = 3) und an Tag 30 auf das 0,31 ± 0,17-fache (n = 4). Eine etwas schwächere Inhibition der IL-6 Levels wurden in Zellen der MSCA-1$^+$ Zellen detektiert (Tag 5: 0,90 ± 0,01-fach, n = 2; Tag 10: 0,61 ± 0,28-fach, n = 3; Tag 30: 0,76 ± 0,42-fach n = 4).

Während die osteogene Induktion der Zellen der MACS-Fraktionen die IL-6 Expression eher supprimierte, konnten in den Fraktionen der EasySep-Methode z. T. auch

Steigerungen während der Osteogenese detektiert werden (Abb. 26 B), allerdings mit sehr hohen Abweichungen. So zeigten Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion an Tag 5 eine 0,31 ± 0,14-fache (n = 2) und an Tag 10 eine 0,23 ± 0,08-fache (n = 3) Reduktion der IL-6 Transkriptlevels im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. An Tag 30 konnte eine 2,98 ± 3,00-fach (n = 4) höhere IL-6 Genexpression in den gleichen Zellen nachgewiesen werden. In Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion wurde eine Induktion der IL-6 Genexpression an Tag 10 detektiert (Tag 5: 0,27 ± 0,15-fach (n = 2); Tag 10: 2,96 ± 2,46-fach (n = 3); Tag 30: 1,65 ± 1,70-fach (n = 4), allerdings, wie schon erwähnt, mit einer sehr hohen Abweichung.

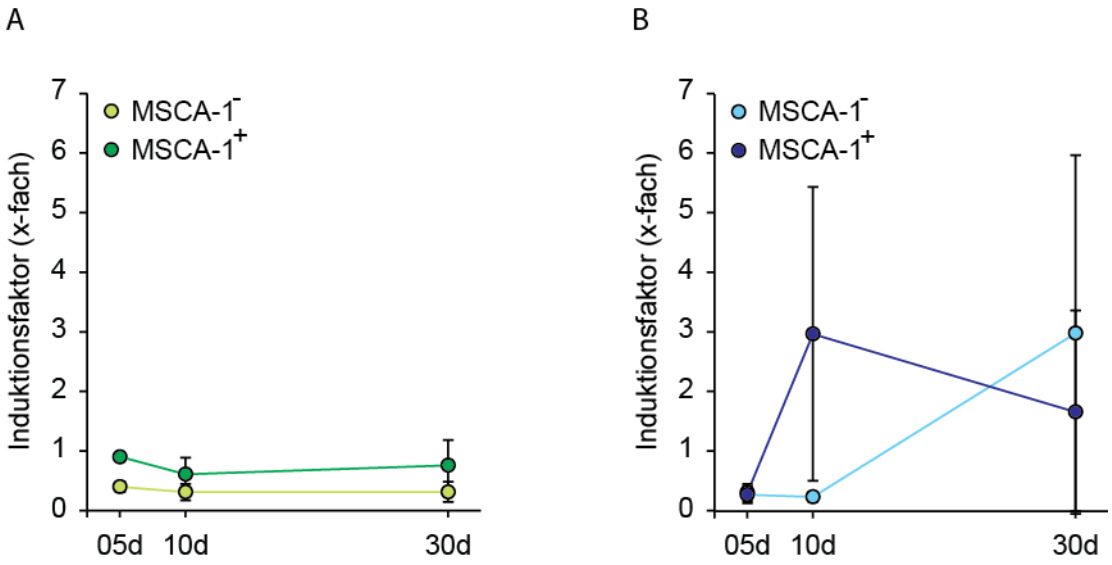


Abbildung 26: Quantitative Analyse der Interleukin-6 (IL-6) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Zeitpunkte (Tag 5, 10 und 30) der Osteogenese dar.

3.9.8. Genexpression von Interleukin-8 (IL-8)

Die osteogene Induktion beider Fraktionen der MACS-Separation zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der IL-8 Expression (Abb. 27 A). Die IL-8 Transkriptlevel der MSCA-1$^-$ Zellfraktion an Tag 5 auf das 9,26 ± 0,77-fache (n = 2) an. An Tag 10 konnten 34,10 ± 8,69-fach (n = 3) höhere und an Tag 30 77,89 ± 18,13-fach (n = 4) höhere Expressionslevels als in den unbehandelten Kontrollen detektiert werden. Ein ähnlicher Trend konnte auch in osteogen stimulierten Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion de-

tektiert werden. Beginnend mit 6,64 ± 3,34-fach (Tag 5, n = 2) stiegen die Induktionsindices der IL8 Expression auf 22,16 ± 6,10-fach (Tag 10, n = 3) und auf 32,64 ± 8,81-fach an Tag 30 (n = 4).

Auch in den Fraktionen der EasySep-Separation war ein stetiger Anstieg der IL8 Expression während der Osteogenese zu verzeichnen (Abb. 27 B). Die MSCA-1$^-$ Zellfraktion exprimierte an Tag 5 8,22 ± 5,17-fache (n = 2), an Tag 10 20,75 ± 7,71-fache (n = 3) und an Tag 30 90,45 ± 35,60-fache (n = 4) IL-8 Transkriptlevels als in unbehandelten Kontrollen. Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion zeigten ein ähnliches Expressionsmuster. Ausgehend von einem Induktionsindex von 5,68 ± 3,25-fach an Tag 5 (n = 2) steigerte sich die IL-8 Expression an Tag 10 auf das 36,69 ± 20,72-fache, (n = 3) und erreichte an Tag 30 die höchste Induktion von 122,95 ± 69,99-fach (n = 4) verglichen mit den Levels der Kontrollen.

Insgesamt schien die osteogene Stimulation der analysierten Fraktionen die IL-8 Expression in hohem Maße zu steigern, unabhängig von der Separationsmethode. Allerdings zeigte die MACS separierte MSCA-1$^-$ Fraktion höhere Induktionslevels als die entsprechende MSCA-1$^+$ Fraktion, bei den EasySep separierten Fraktionen zeigte sich das umgekehrte Bild.

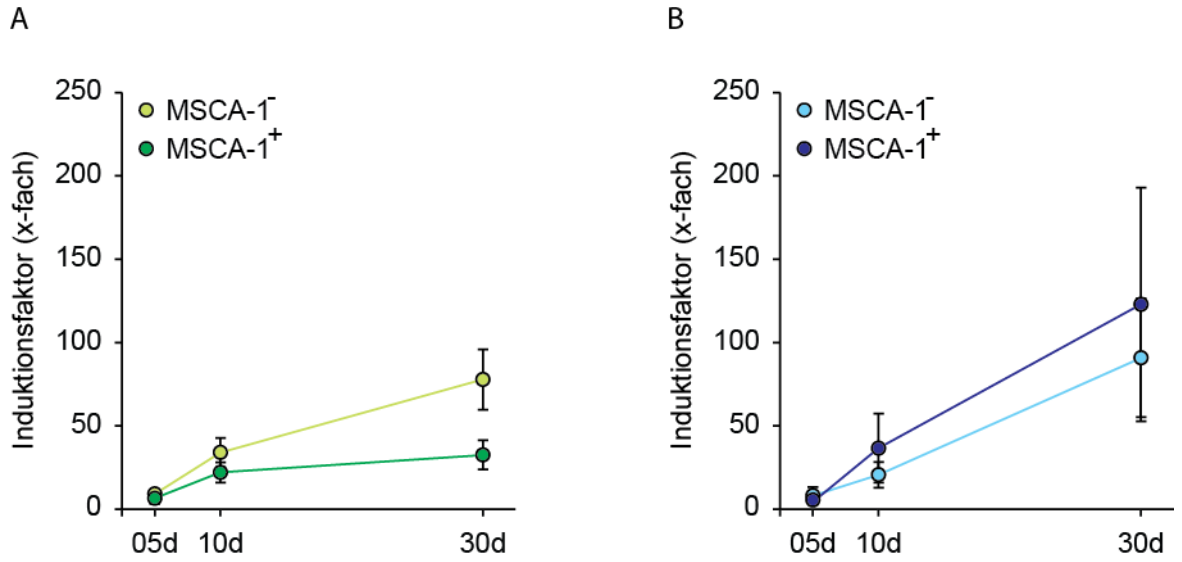


Abbildung 27: Quantitative Analyse der Interleukin-8 (IL-8) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Zeitpunkte (Tag 5, 10 und 30) der Osteogenese dar.

3.10. Untersuchungen der Genexpression in MACS und Easy Sep separierten Zellfraktionen im Laufe der osteogenen Differenzierung und der *in vitro* Passagierung nach der Separation

Für die Expressionsanalysen über die weitere *in vitro* Passagierung, wurden Daten von 3 Patienten (n = 3) für jede Passage erhoben. Die abgebildeten Ergebnisse beziehen sich immer auf Tag 10 der osteogenen Stimulation. Ein weiterer Zeitpunkt konnte aufgrund der limitierten Zellzahl nicht untersucht werden. Im Folgenden wird jeweils der Induktionsindex eines Gens, also das Vielfache der Genexpression in osteogen stimulierten Zellen im Verhältnis zu derjenigen der unbehandelten Kontrollen angegeben.

3.10.1. Genexpression von Osterix (Osx)

Der Verlauf der Osterix Expression begann mit einer 1,68 ± 1,43-fachen Induktion in osteogen stimulierten Zellen der MACS MSCA-1$^-$ Zellfraktion in der Passage der Separation (Abb. 28 A). Zellen der Passage 8 und 9 zeigten im Vergleich dazu eine Verdoppelung dieser Induktion: 2,80 ± 1,53-fach bzw. 2,92 ± 0,31-fach. Differenzierende Zellen der MSCA-1$^+$ Zellfraktion zeigten 6,89 ± 4,51-fach höhere Transkriptlevels von Osx als unbehandelte Kontrollen in der Passage der Separation. In Passage 8 konnte keine Induktion der Expressionslevels nachgewiesen werden (1,12 ± 0,66-fach) um dann wieder auf das 5,89 ± 5,34-fache der Kontrollzellen in Passage 9 anzusteigen.

Nach der EasySep Separation (Abb. 28 B) zeigte die Quantifizierung der mRNA Expression in osteogen stimulierten Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion keine gesteigerten Levels im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (0,91 ± 0,32-fach). Eine 2,50 ± 2,50-fach Induktion von Osx konnte in Zellen der Passage 8 detektiert werden. Im Verlauf der weiteren in vitro Passagierung wurde die Osx Expression in Zellen der Passage 9 unterdrückt (0,25 ± 0,14-fach). Die EasySep separierte MSCA-1$^+$ Zellfraktion erreichte ihr höchstes Expressionsniveau in Passage 8 (9,04 ± 4,54-fach), in der darauffolgenden Passage war eine 6,17 ± 1,58-fache Induktion zu verzeichnen und in Zellen der Passage 9 wurde die Osx Expression wieder stark reprimiert (0,29 ± 0,27-fach). Der Unterschied zwischen der Repression in der MSCA-1$^-$ und der Induk-

tion von Osx in der MSCA-1$^+$ EasySep Fraktion in der Passage der Separation war signifikant ($p < 0,05$).

Im Verlauf über mehrere Passagen stieg das Expressionsverhältnis von Osx in den differenzierenden Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion tendenziell an. Sie zeigten höhere Induktionsindices als die MSCA-1$^-$ Fraktion, mit Ausnahme von Passage 8. Die MSCA-1$^-$ Fraktion von EasySep verhielt sich ähnlich wie die MACS separierte, wohingegen die MSCA-1$^+$ Fraktion von EasySep von der Separationspassage auf Passage 8 zunahm, um dann in Passage 9 ihre Osx Expression stark abzusenken.

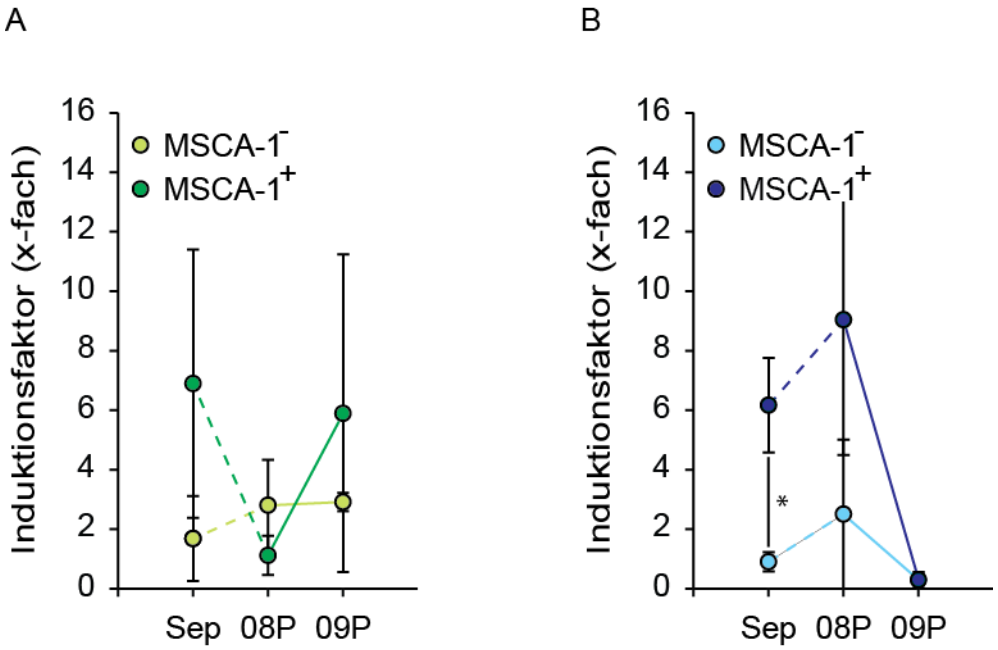


Abbildung 28: Quantitative Analyse der Osterix (Osx) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.10.2. Genexpression der Alkalischen Phosphatase (AP)

Nach der MACS-Separation sank die Transkriptlevelinduktion der alkalischen Phosphatase (Abb. 29 A) der MSCA-1$^-$ Fraktion von der Passage der Separation (15,21 ± 11,08-fach) über Passage 8 (12,42 ± 9,55-fach) bis zu Passage 9 (8,87 ± 6,03-fach) kontinuierlich. Die osteogen stimulierten Zellen der MSCA-1$^+$ Zellfraktion zeigten einen Induktionswert von 21,88 ± 15,10-fach in der Passage der Separation, um in der

folgenden Passage 8 auf 8,72 ± 5,90-fach zu sinken und in Passage 9 auf 13,68 ± 12,68-fach anzusteigen.

Die AP Expression in den EasySep Fraktionen (Abb. 29 B) waren tendenziell etwas niedriger, allerdings mit geringeren Abweichungen als in den entsprechenden MACS Fraktionen. Die Induktionsindices der MSCA-1$^-$ Fraktion begannen bei 2,49 ± 0,61-fach, stiegen in Passage 8 auf 7,40 ± 1,26-fach und blieben auf diesem Niveau in Passage 9 (7,64 ± 1,40-fach). In den osteogen induzierten Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion wurden in der Passage der Separation 2,80 ± 0,41-fach höhere Expressionslevels als in den unbehandelten Kontrollen detektiert. Diese blieben unverändert auf dem gleichen Niveau in Passage 8 (3,56 ± 1,55-fach) und 9 (3,56 ± 1,94-fach).

Das Expressionsmuster von MACS und EasySep Fraktionen zeigten in Bezug auf die alkalische Phosphatase zwar tendenziell unterschiedliche Niveaus (die MACS Fraktionen zeigten im Durchschnitt höhere Induktionsindices als die EasySep Fraktionen), die aber auf Grund der hohen Abweichungen nicht signifikant waren.

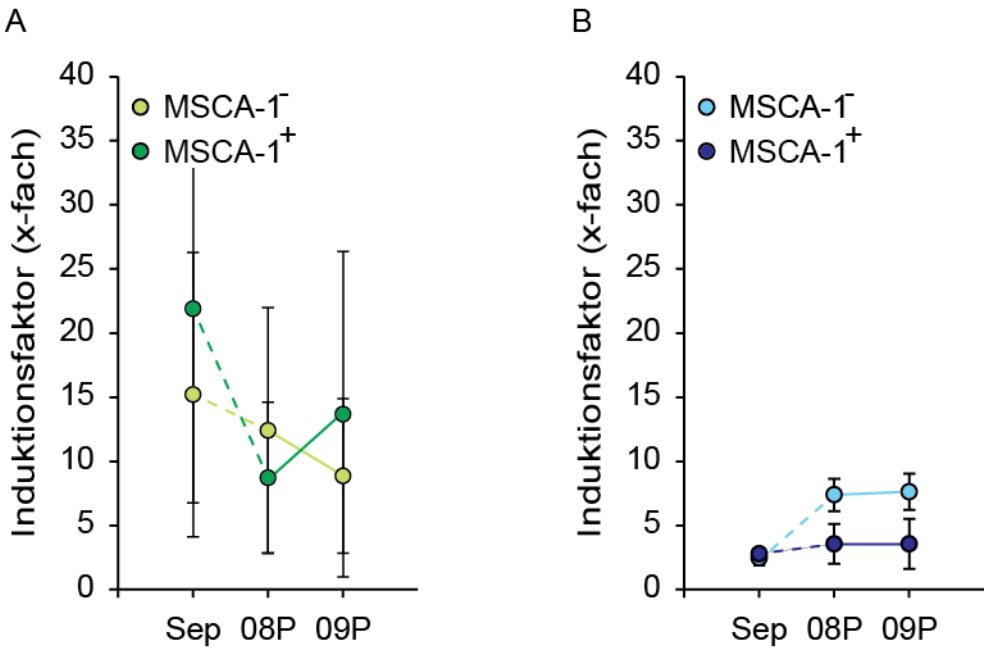


Abbildung 29: Quantitative Analyse der alkalischen Phosphatase (AP) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.

Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.10.3. Genexpression von Runt related transcription factor-2 (Runx-2)

Die Runx-2 Expression zeigte direkt nach der MACS Separation (Abb. 30 A) einen 3,82 ± 0,56-fachen Anstieg von Runx-2 verglichen mit Kontrollzellen, um dann in Passage 8 und 9 leicht abzunehmen (1,25 ± 0,13; 1,81-fach ± 0,20). Osteogen stimulierte Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion zeigten ebenfalls eine kontinuierliche Abnahme der Runx-2 Induktion von der Separationspassage (3,50 ± 0,72-fach) über Passage 8 (2,67 ± 0,58-fach) zu Passage 9 (1,43 ± 0,36-fach).

Nach der EasySep Separation (Abb. 30 B) nahm die Runx-2 Induktion in der MSCA-1$^-$ Fraktion stetig zu (Separationspassage: 1,72 ± 0,47-fach; Passage 8: 4,69 ± 1,80-fach; Passage 9: 6,73 ± 3,38-fach), während osteogen stimulierte Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion recht konstante Induktionen über die weitere Passagierung zeigten (Separationspassage: 2,57 ± 0,69-fach; Passage 8: 3,74 ± 2,20-fach; Passage 9: 2,33 ± 1,17-fach).

Die Runx-2 Induktion nahm in beiden MACS Fraktionen ausgehend von der Separation tendenziell im Laufe der *in vitro* Passagierung ab, in Passage 8 war der Unterschied zwischen der Induktion in beiden Passagen signifikant ($p < 0,05$). Bei osteogen stimulierten EasySep Fraktionen hingegen war die Tendenz eher steigend, allerdings mit höheren Abweichungen.

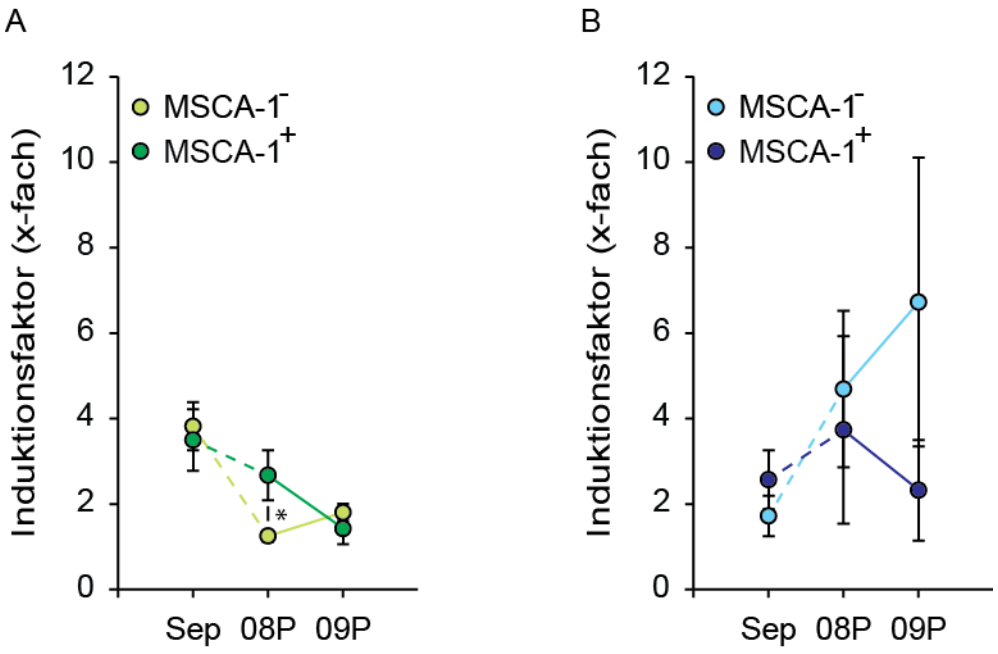


Abbildung 30: Quantitative Analyse der Runt related transcritpion factor-2 (Runx-2) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.
Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.10.4. Genexpression von Insuline-like growth factor-2 (Igf-2)

Die Igf-2 Induktion in osteogen stimulierten Zellen der MACS (Abb. 31 A) separierten MSCA-1$^-$ Fraktion nahm zunächst ab (Separationspassage: 34,17 ± 23,12-fach; Passage 8: 5,18 ± 2,41-fach), um in Passage 9 wieder anzusteigen (12,98 ± 9,33-fach). In der MSCA-1$^+$ Fraktion konnte eine stetige Abnahme der Induktionsindices von der Separation aus detektiert werden (Separationspassage: 20,71 ± 6,61-fach; Passage 8: 12,86 ± 3,54-fach; Passage 9: 6,78 ± 2,86-fach).
Die aus der EasySep-Methode (Abb. 31 B) resultierende MSCA-1$^-$ Fraktion zeigte einen ständigen Zuwachs der Igf-2 Induktion ausgehend von der Separation (2,95 ± 1,14-fach; Passage 8: 3,37 ± 1,17-fach; Passage 9: 10,62 ± 5,35-fach), wohingegen die MSCA-1$^+$ Fraktion eine relativ konstante und schwache Igf-2 Induktion zeigte (Separationspassage: 2,34 ± 0,97-fach; Passage 8: 2,52 ± 1,43-fach; Passage 9: 2,19 ± 0,44-fach).
Die ermittelten Induktionswerte der Igf-2 Expression waren nach der MACS Separation tendenziell höher als nach der EasySep Separation. Die Induktion von Igf-2 in der MSCA-1$^+$ Fraktion von MACS war in der Separationspassage ($p < 0,05$) und in Passage 8 ($p < 0,05$) signifikant höher, als in der MSCA-1$^+$ Fraktion von EasySep. Es zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied für die Induktion zwischen den MSCA-1$^-$ Fraktionen in der Separationspassage ($p < 0,05$).

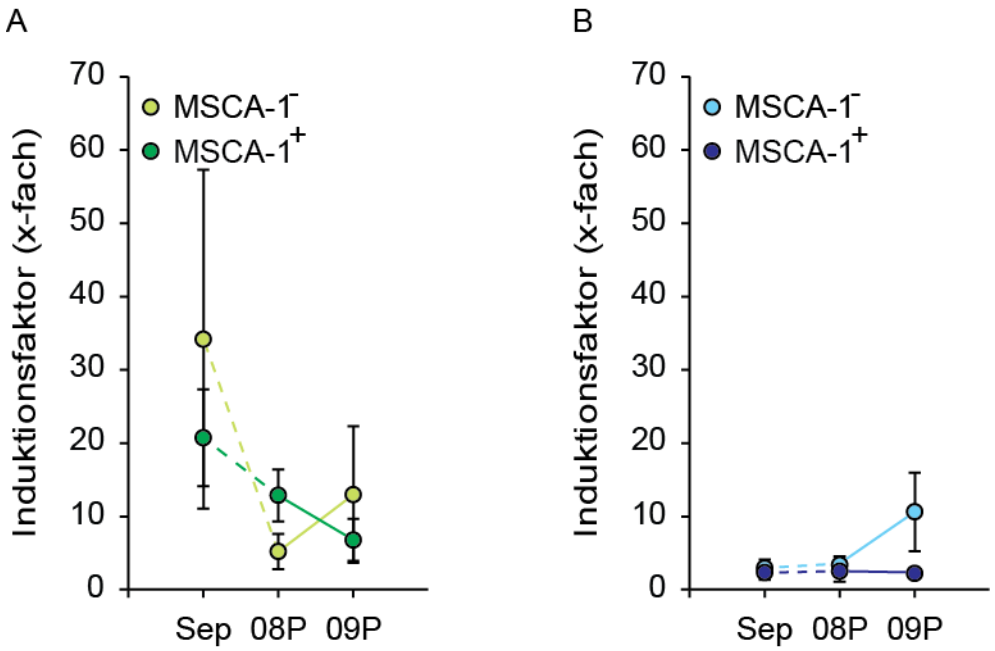


Abbildung 31: Quantitative Analyse der Insuline-like growth factor-2 (Igf-2) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.
Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.10.5. Genexpression von Low affinity nerve growth factor receptor (LNGFR)

Im Verlaufe der Passagen wurde neben den bereits genannten osteogenen Markern und Entzündungsmediatoren auch der Low affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) als früher osteogener Marker untersucht. Die MACS separierten (Abb. 32 A) MSCA-1$^-$ Zellen zeigten eine gegenläufige LNGFR Expression im Vergleich zu der entsprechenden MSCA-1$^+$ Zellen. Während sich in der Separationspassage Induktionswerte von 4,21 ± 2,92-fach für die MSCA-1$^-$ und 46,69 ± 44,65-fach für die MSCA-1$^+$ Fraktion gegenüberstanden, näherten sich die Werte in Passage 8 deutlich an (MSCA-1$^-$: 8,25 ± 5,31-fach; MSCA-1$^+$: 12,73 ± 10,33-fach). In Passage 9 stieg die LNGFR-Expression der MSCA-1$^-$ Zellfraktion deutlich an (48,48 ± 23,06-fach), während in der MSCA-1$^+$ Zellfraktion unter Berücksichtigung der Abweichungen lediglich ein leichter Anstieg (20,92 ± 19,07-fach) verzeichnet wurde.

Nach der EasySep Separation (Abb. 32 B) verlief die LNGFR Expression in beiden Fraktionen recht ähnlich. Während in der Separationspassage hohe Induktionswerte ermittelt wurden (MSCA-1$^-$: 42,23 ± 41,47-fach; MSCA-1$^+$: 20,28 ± 17,79-fach), fiel die LNGFR Expression in den darauf folgenden Passagen tendenziell ab. In Passage 8 zeigten osteogen induzierte Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion eine 2,68 ± 1,37-fach höhere LNGFR Expression und Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion eine 2,63 ± 0,78-fach höhere Expression als in unbehandelten Kontrollen. Zu Passage 9 ergaben sich nur geringe Änderungen der LNGFR Expression (MSCA-1$^-$: 2,21 ± 0,44-fach; MSCA-1$^+$: 0,38 ± 0,19-fach, $p < 0,05$).

Im Laufe der *in vitro* Passagierung zeigte die Untersuchung der LNGFR Expression einen gegensätzlichen Verlauf in Abhängigkeit von der Separationsmethode. Während in beiden Fraktionen der MACS Separation tendenziell eher ein stetiger Anstieg der LNGFR Expression zu verzeichnen war, fielen die LNGFR Levels in beiden Fraktionen der EasySep Separation eher ab. Der Vergleich der Induktion von LNGFR zwischen den beiden Separationsmethoden zeigte signifikante Unterschiede in Passage 9. Hier unterschieden sich sowohl die beiden MSCA-1$^-$ Fraktionen ($p < 0,05$), wie auch die beiden MSCA-1$^+$ Fraktionen ($p < 0,05$).

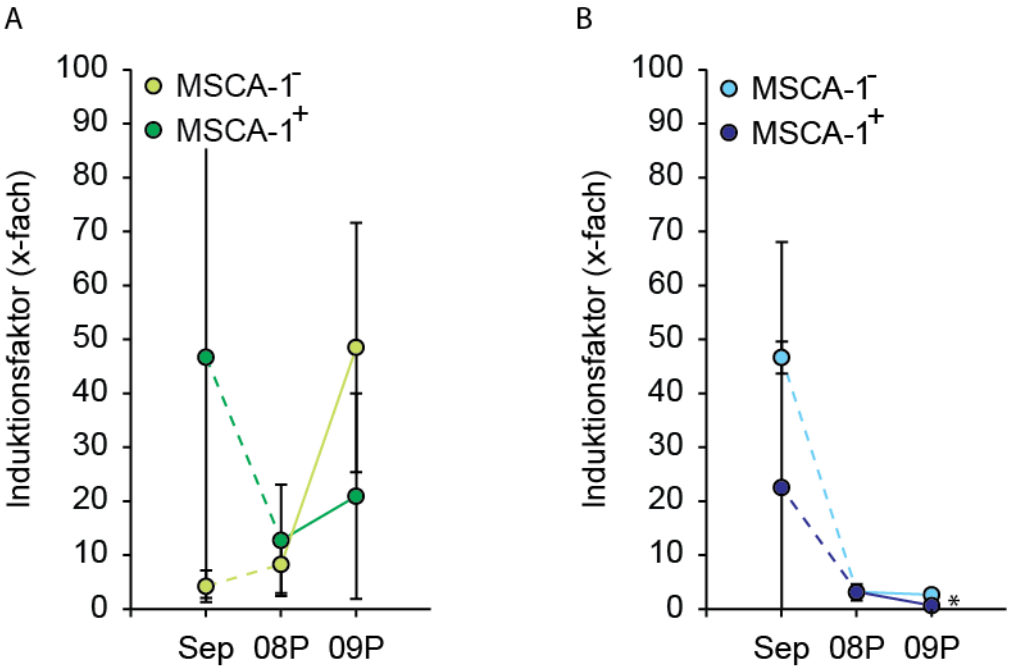


Abbildung 32: Quantitative Analyse der Low affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.

Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.10.6. Genexpression von Interleukin-1 alpha (IL-1α)

In den Kontrollzellen der MACS Fraktionen, war IL-1α über alle Passagen sehr schwach exprimiert. Die konstitutive IL-1α Expression in Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion änderte sich insofern über die Passagen, als dass kurzfristig höhere Expressionslevels in Passage 8 detektiert wurden, die in Passage 9 wieder die Levels der Separationspassage erreichten (Ratio IL-1α/GAPDH: Separationspassage 0,02 ± 0,02; Passage 8: 0,07 ± 0,02; und in Passage 9: 0,02 ± 0,00). In Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion war der gleiche Expressionstrend zu beobachten (Separationspassage: 0,02 ± 0,01; Passage 8: 0,19 ± 0,17; Passage 9: 0,03 ± 0,02).

Beim Vergleich der IL-1α Expression in Kontrollzellen der EasySep Fraktion zeigten sich im Trend etwas höhere Expressionslevels verglichen mit Kontrollzellen der MACS Separation. In Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion wurden folgende IL-1α Expressionslevels detektiert: Separationspassage: 0,10 ± 0,07; Passage 8: 0,06 ± 0,04; Passage 9: 0,41 ± 0,25. Die MSCA-1$^+$ Zellen zeigten ähnliche IL-1α Levels (Separationspassage: 0,06 ± 0,02; Passage 8: 0,48 ± 0,46; Passage 9: 0,28 ± 0,21).

In der MACS separierten (Abb. 33 A) MSCA-1$^-$ Fraktion sank der Repressionsindex von 0,83 ± 0,60-fach in der Passage der Separation auf 0,51 ± 0,25-fach in Passage 8 und blieb in Passage 9 auf diesem Niveau (0,51 ± 0,42-fach). Osteogen behandelte Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion zeigten in der Passage der Separation einen Repressionsindex von 0,69 ± 0,25-fach, der in Passage 8 weiter sank (0,30 ± 0,14-fach) und sich in Passage 9 nur geringfügig änderte (0,42 ± 0,36-fach).

Die EasySep separierten (Abb. 33 B) und osteogen stimulierten MSCA-1$^-$ Zellen zeigten nur sehr geringe Änderungen der IL1α Repression (Separationspassage: 0,08 ± 0,03-fach; Passage 8: 0,07 ± 0,07-fach; Passage 9: 0,21 ± 0,10-fach). Ähnlich verhielten sich induzierte MSCA-1$^+$ Zellen, wenn man die hohe Abweichung in Passage 9 berücksichtigt (Separationspassage 0,15 ± 0,07-fach; Passage 8: 0,21 ± 0,10-fach; Passage 9: 0,85 ± 0,77-fach).

Im Allgemeinen konnte in osteogen stimulierten Fraktionen eine Repression der IL-1α Expression nachgewiesen werden, die sich auch im Laufe der weiteren *in vitro*

Passagierung fortführte. Die Ergebnisse beider Methoden unterschieden sich diesbezüglich nicht signifikant voneinander.

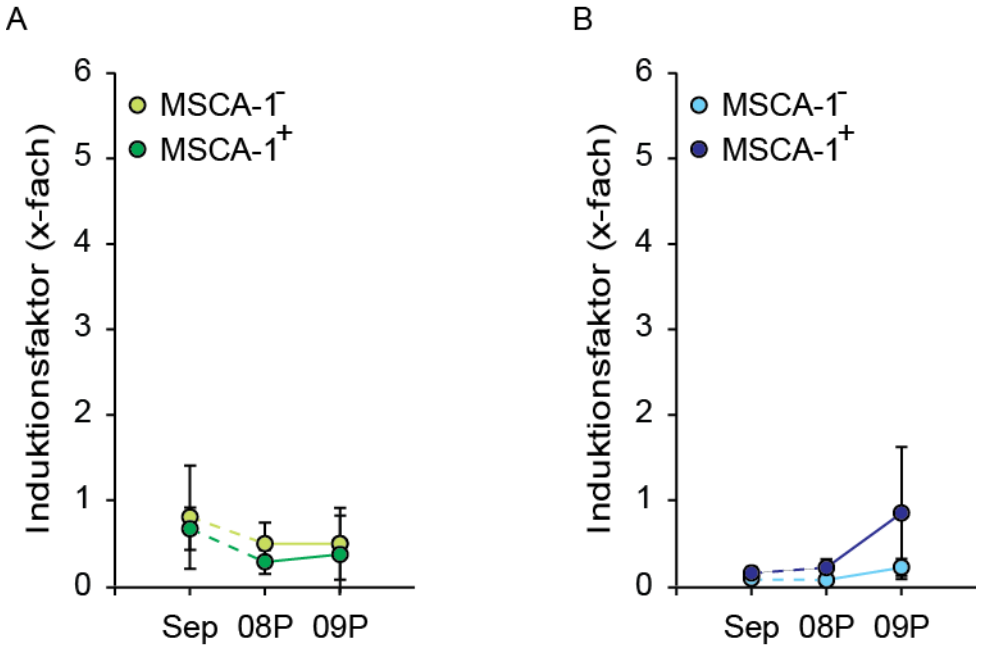


Abbildung 33: Quantitative Analyse der Interleukin-1 alpha (IL-1α) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.
Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.10.7. Genexpression von Interleukin-1 beta (IL-1ß)

Wie bereits oben für IL-1α beschrieben, waren auch die konstitutiven IL-1β Levels in Kontrollzellen der MACS-Fraktionen sehr niedrig. In MSCA-1$^-$ Zellen wurden folgende Expressionslevels detektiert: Separationspassage: 0,08 ± 0,07; Passage 8: 0,10 ± 0,07; Passage 9: 0,07 ± 0,02. Die MSCA-1$^+$ Zellen zeigten im Vergleich zur MSCA-1$^-$ Fraktion ähnliche Expressionslevels: Separationspassage: 0,11 ± 0,09; Passage 8: 0,19 ± 0,14; Passage: 9 0,10 ± 0,00).

Die Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion der EasySep Methode exprimierten IL-1β zu einem höheren Level: Separationspassage: 0,43 ± 0,16; Passage 8: 0,29 ± 0,17; Passage 9: 0,52 ± 0,29. Die konstitutiven IL-1β Levels in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion beweg-

ten sich auf etwa gleichem Niveau (Separationpassage: 0,36 ± 0,10; Passage 8: 0,33 ± 0,27; Passage 9: 0,23 ± 0,12).

Osteogen stimulierte Zellen der MACS separierten (Abb. 34 A) MSCA-1$^-$ Fraktion zeigten einen IL1β Induktionsindex von 6,20 ± 6,11-fach nach der Separation. In Passage 8 sank dieser auf 1,68 ± 1,30-fach und in Passage 9 stieg er wieder auf 4,84 ± 4,75-fach, wobei die hohen Abweichungen auch berücksichtigt werden müssen. Behandelte Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion zeigten in der Separationspassage bzw. in Passage 8 keine relevanten Änderungen der IL-1ß Expression (0,63 ± 0,54-fach bzw. 0,51 ± 0,46-fach) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, während in Passage 9 eher eine IL-1ß Induktion ermittelt wurde, die aber aufgrund der hohen Abweichung nicht signifikant unterschiedlich von derjenigen der Kontrollen war (3,37 ± 3,36-fach).

Die behandelten Proben der EasySep Fraktionen (Abb. 34 B) zeigten insgesamt sehr niedrige, reprimierte IL1β Expressionslevels im Vergleich zu unbehandelten Proben. Dabei zeigten Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion minimale Unterschiede der Repressionslevels (Separationspassage: 0,18 ± 0,13-fach; Passage 8: 0,14 ± 0,12-fach; Passage 9: 0,20 ± 0,17-fach). Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion verhielten sich ähnlich (Separationspassage: 0,13 ± 0,07-fach; Passage 8: 0,29 ± 0,14-fach; Passage 9: 0,25 ± 0,15-fach).

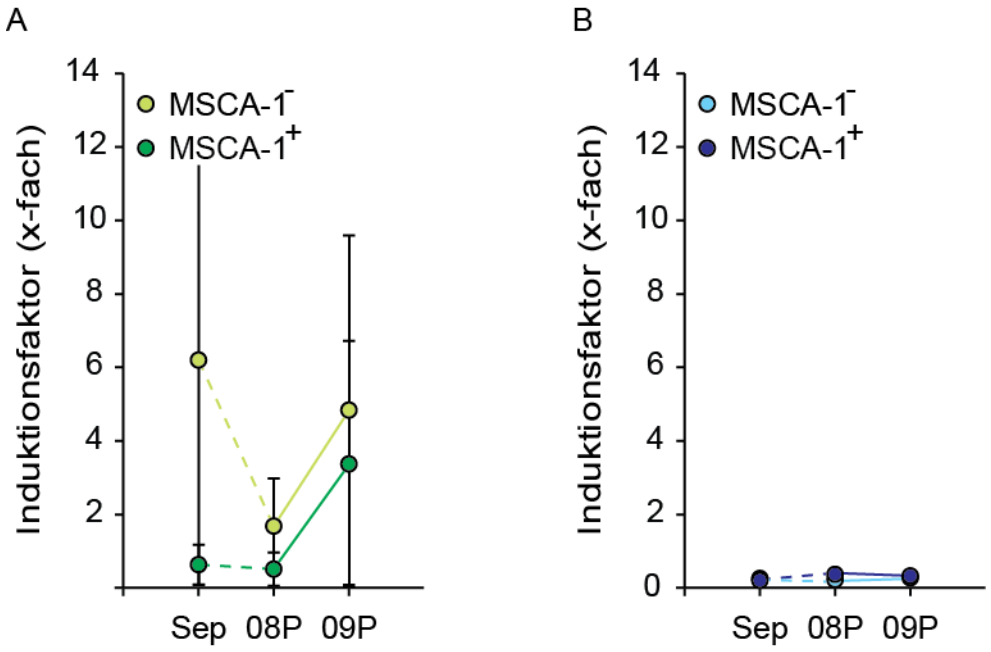


Abbildung 34: Quantitative Analyse der Interleukin-1 beta (IL-1β) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.
Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.10.8. Genexpression von Interleukin-6 (IL-6)

Die Untersuchung der konstitutiven IL-6 Expression in Kontrollzellen der MACS separierten MSCA-1$^-$ Zellen zeigte sehr hohe Basallevels (Separationspassage: 2,76 ± 1,23; Passage 8: 10,78 ± 7,70; Passage 9: 8,84 ± 5,24). Die konstitutive IL-6 Expression zeigte in Zellen der MSCA-1$^+$ Zellfraktion steigende Levels im Laufe der *in vitro* Passagierung (3,34 ± 1,86; Passage 8: 8,64 ± 5,14; Passage 9: 9,39 ± 6,30).
In der Separationspassage von EasySep waren die Grundlevels von IL-6 in beiden Fraktionen deutlich stärker exprimiert, als in den MACS Fraktionen (MSCA-1$^-$: 6,90 ± 2,98; MSCA-1$^+$: 9,96 ± 3,70). Die IL-6 Expressionslevels der MSCA-1$^-$ Zellen sanken in Passage 8 auf 2,32 ± 0,91 um dann in Passage 9 wieder anzusteigen (8,47 ± 7,63). Die Grundlevels der MSCA-1$^+$ Zellen zeigten in den darauf folgenden Passagen eine abnehmende Tendenz (Passage 8: 2,17 ± 0,29 und Passage 9: 2,38 ± 0,57).
In der Passage der Separation zeigten MACS separierte (Abb. 35 A) und osteogen stimulierte Zellen eher einen Rückgang der IL-6 Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (MSCA-1$^-$: 0,21 ± 0,04-fach; MSCA-1$^+$: 0,51 ± 0,33-fach). Zellen der Passage 8 zeigten keine signifikante Änderung der IL-6 Expression (MSCA-1$^-$: 1,10 ± 0,81-fach; MSCA-1$^+$: 1,32 ± 1,16-fach), während Zellen der Passage 9 eine deutlich inhibierte IL-6 Expression (MSCA-1$^-$: 0,60 ± 0,23-fach; MSCA-1$^+$: 0,39 ± 0,09-fach) in Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen zeigten.
Zellen der EasySep separierten (Abb. 35 B) und osteogen induzierten Fraktionen zeigten ebenfalls eine Inhibition der IL-6 Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. In der MSCA-1$^-$ Fraktion wurden folgende Repressionsindices ermittelt: Separationspassage: 0,30 ± 0,08-fach; Passage 8: 0,82 ± 0,35-fach. Zellen der Passage 9 zeigten im Durchschnitt das gleiche IL-6 Expressionsniveau wie unbehandelte Proben (1,09 ± 0,60). Osteogen behandelte Zellen der MSCA-1$^+$ Zellfraktion zeigten

ebenfalls einen Rückgang der IL-6 Expression auf Genebene (Separationspassage: 0,41 ± 0,18-fach; Passage 8: 0,58 ± 0,10-fach; Passage 9: 0,39 ± 0,26-fach).

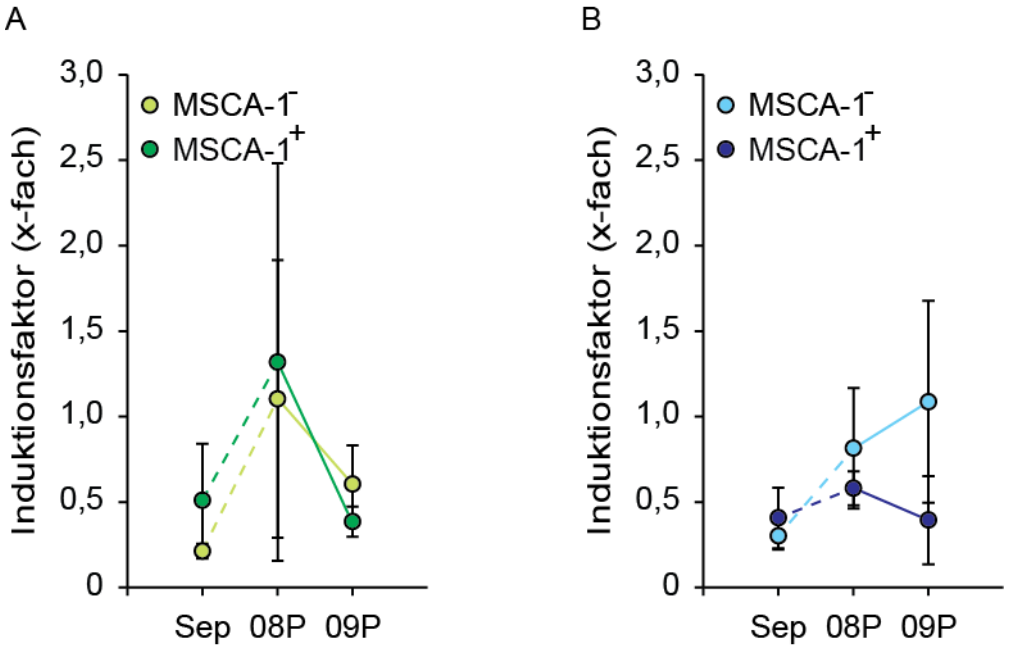


Abbildung 35: Quantitative Analyse der Interleukin-6 (IL-6) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.10.9. Genexpression von Interleukin-8 (IL-8)

Die höchsten IL-8 Basallevels in Kontrollzellen der MACS Separation wurden für beide Fraktionen in Passage 8 detektiert (MSCA-1$^-$: 17,74 ± 17,46; MSCA-1$^+$: 10,11 ± 9,82), allerdings zeigten diese sehr hohe Abweichungen. Die IL-8 Grundexpression war in den umgebenden Passagen reduziert (in der Passage der Separation: MSCA-1$^-$: 0,20 ± 0,06; MSCA-1$^+$: 0,17 ± 0,03; Passage 9: MSCA-1$^-$: 0,18 ± 0,04; MSCA-1$^+$: 0,22 ± 0,12).

In den Fraktionen von EasySep gab es keine nennenswerten Schwankungen der basalen IL-8 Expression. Die MSCA-1$^-$ Zellen zeigten in der Separationspassage Levels von 0,36 ± 0,23, in der Passage 8: 0,96 ± 0,73, in der Passage 9: 0,11 ± 0,05. Die Expression in den Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion verlief auf einem relativ einheitli-

chen Niveau (Separationspassage: 0,49 ± 0,22; Passage 8: 0,44 ± 0,32; Passage 9: 0,45 ± 0,36).

Die quantitativen Analysen der IL-8 Expression zeigten in allen Fraktionen eine Induktion in osteogen induzierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Proben. In der Separationspassage belief sich der Induktionsindex der MACS separierten (Abb. 36 A) MSCA-1$^-$ Fraktion auf 26,67 ± 12,81-fach. Dieser sank in Passage 8 auf 9,78 ± 5,55-fach und stieg in Passage 9 wieder auf 33,49 ± 4,00-fach. Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion zeigten etwas niedrigere Induktionen der IL-8 Expression in osteogen stimulierten Zellen versus Kontrollen (Separationspassage: 13,71 ± 7,58-fach; Passage 8: 9,88 ± 1,01-fach; Passage 9: 25,18 ± 12,10-fach).

In der EasySep separierten (Abb. 36 B) MSCA-1$^-$ Fraktion zeigten sich ähnliche Induktionsindices (Separationspassage: 8,54 ± 0,76-fach; Passage 8: 9,55 ± 4,74-fach; Passage 9: 18,83 ± 13,70-fach). Die MSCA-1$^+$ Fraktion zeigte in der Separationspassage einen Anstieg der IL-8 Expression auf das 10,10 ± 0,54 -fache, um dann in den darauf folgenden Passagen etwas abzusinken (Passage 8: 14,93 ± 6,73-fach; Passage 9: 7,18 ± 3,48-fach).

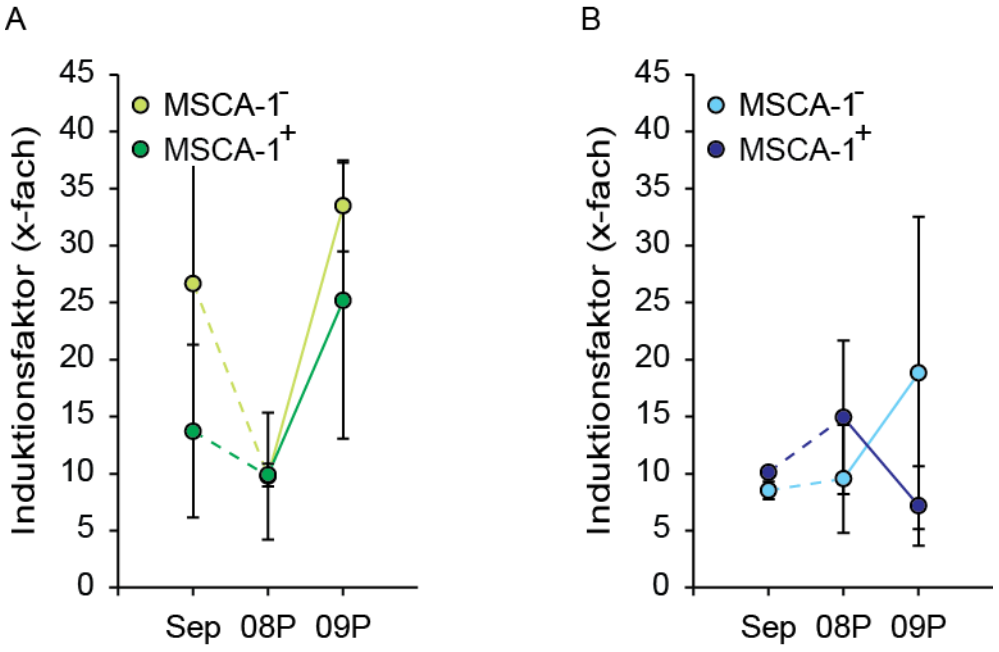


Abbildung 36: Quantitative Analyse der Interleukin-8 (IL-8) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen. Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetra-

gen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.11. Genexpression verschiedener Seneszenzmarker

Die Genexpression mehrerer Seneszenzmarker wurde in drei Passagen jeweils an Tag 10 untersucht. Die Analysen erfolgten in der Passage, in der die Separation stattfand und in den Passagen 8 und 9 (n = 3, je Fraktion, Separationsmethode und Passage). Es wurden die Seneszenzmarker Cyclinabhängige Kinase 4 (cyclin-dependent kinase 4, CDK4), Cyclinabhängige Kinase Inhibitor 2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A), Insuline-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2), IGFBP-3, IGFBP-7 und Regucalcin (RGN, Seneszenz Marker Protein 30) untersucht. Die Werte werden als Induktionsfaktoren angegeben, also als ein Vielfaches der Expression in osteogen induzierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen derselben Zellfraktion.

3.11.1. Genexpression der cyclin depending kinase 4 (CDK4)

Die Analyse der CDK4 Grundexpression in Kontrollzellen beider Fraktionen und Methoden ergab hohe Expressionslevels, die zeigten, dass CDK4 in EasySep Fraktionen meist stärker exprimiert wird, als nach der MACS Separation. Die Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion von MACS zeigten über die Passagen eine Abnahme der CDK4 Level (Separationspassage: 27,61 ± 9,46; Passage 8: 22,04 ± 5,80; Passage 9: 13,66 ± 4,22). Die CDK4 Grundexpression in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion nahmen von der Separationspassage (14,84 ± 5,60) aus zu (Passage 8: 24,11 ± 7,36) und blieben auf diesem Niveau (Passage 9: 23,82 ± 2,64).

In Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion von EasySep stiegen die basalen CDK4 Level kontinuierlich an (Separationspassage: 14,33 ± 7,88; Passage 8: 32,27 ± 9,24; Passage 9: 46,31 ± 23,14). In MSCA-1$^+$ Zellen wurden zunächst ansteigende CDK4 Level detektiert (Separationspassage: 13,26 ± 10,81; Passage 8: 40,85 ± 10,17), um in Zellen der Passage 9 wieder abzunehmen (34,00 ± 6,27).

Osteogen induzierte MSCA-1$^-$ Zellen zeigten direkt nach der MACS Separation (Abb. 37 A) eher eine Repression der CDK4 mRNA Levels (0,48 ± 0,06-fach), während in den darauf folgenden Passagen die CDK4 Expression stetig anstieg (Passage 8: 1,33 ± 0,13-fach; Passage 9: 2,45 ± 0,32-fach). Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion verliefen gegensätzlich: in der Separationspassage waren in stimulierten Zellen

2,94 ± 0,65-fach höhere CDK4 Levels im Vergleich zu Kontrollen zu verzeichnen. In Passage 8 näherte sich die CDK4 Expression derjenigen in MSCA-1$^-$ Zellen mit Induktionslevels von 1,43 ± 0,77-fach an, die in Passage 9 weiter auf 0,97 ± 0,33-fach absanken und somit leicht reprimiert war.

MSCA-1$^-$ und MSCA-1$^+$ Zellfraktionen der EasySep Separation (Abb. 37 B) zeigten bezüglich der CDK4 Expression nahezu identische Muster. In der Separationspassage wurden in osteogen stimulierten Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion keinen Unterschied im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen detektiert (Induktionsfaktor: 0,99 ± 0,14-fach), während in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion 2,09 ± 0,94-fach höhere Transkriptlevel nachgewiesen wurden. In Passagen 8 (MSCA-1$^-$: 0,48 ± 0,07-fach; MSCA-1$^+$: 0,64 ± 0,14-fach) und 9 (MSCA-1$^-$: 0,73 ± 0,26-fach; MSCA-1$^+$: 0,63 ± 0,19-fach) konnten Repressionslevel in beiden Fraktionen ermittelt werden.

Die CDK4 Expression zeigte sich insgesamt in beiden Zellfraktionen der EasySep Separation, sowie in der MACS separierten MSCA-1$^+$ Fraktion tendenziell abfallend im Laufe der *in vitro* Passagierung, während in Zellen der MACS separierten MSCA-1$^-$ Fraktion eher steigende CDK4 Level detektiert wurden. Die unterschiedliche Induktion von CDK4 in den beiden MACS-Fraktionen war in der Separationspassage ($p < 0,05$) sowie in Passage 9 ($p < 0,05$) signifikant verschieden.

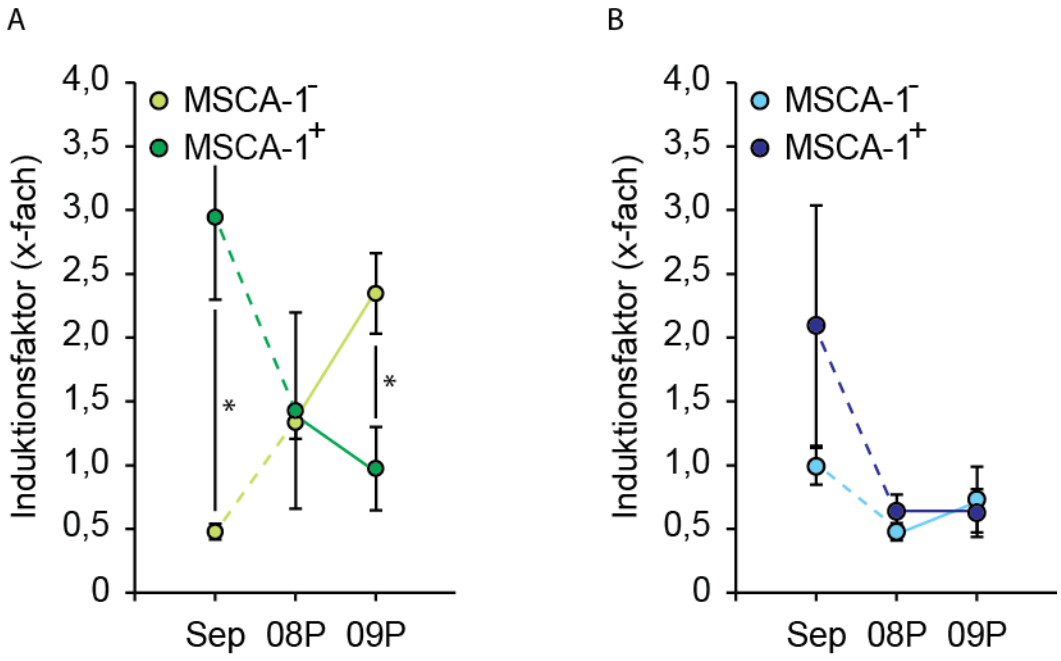


Abbildung 37: Quantitative Analyse der cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.

Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.11.2. Genexpression des cyclin depending kinase inhibitor 2A (CDKN2A)

Der Verlauf der basalen CDKN2A Expressionslevels (CDKN2A/GAPDH) in den unbehandelten Kontrollen der MACS Fraktionen zeigte nur sehr geringe Schwankungen. So exprimierten die MSCA-1$^-$ Zellen CDKN2A durchgehend auf fast identischem Niveau (Separationspassage: 6,63 ± 1,79; Passage 8: 6,45 ± 1,81; Passage 9: 7,58 ± 2,97). Die Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion exprimierten CDKN2A zunächst auf fast gleichem Niveau (Passage der Separation: 7,78 ± 5,26; Passage 8: 6,06 ± 0,82). In Passage 9 stieg die Grundexpression etwas an (9,72 ± 1,15).

In den Fraktionen von EasySep war keine so gleichmäßige Expression zu beobachten. Kontrollzellen der MSCA-1$^-$ Fraktion exprimierten CDKN2A im Verlauf der Passagierung mit zunehmender Stärke (Passage der Separation: 9,83 ± 3,96; Passage 8: 11,79 ± 5,59; Passage 9: 17,39 ± 9,88). In Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion verlief die CDKN2A Expression ähnlich zu der der MACS separierten MSCA-1$^+$ Fraktion (Separationspassage: 6,65 ± 2,60; Passage 8: 5,21 ± 1,56) und nahm dann zu Passage 9 zu (9,53 ± 1,45).

Tendenziell zeigte sich der Verlauf der CDKN2A Expression ähnlich mit dem von CDK4. Dabei konnte ein gegenläufiges Expressionsmuster für MACS (Abb. 38 A) separierte MSCA-1$^-$ und MSCA-1$^+$ Fraktionen beobachtet werden. Während stimulierte Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion in der Passage der Separation 1,35 ± 0,26-fach höhere Expressionslevels zeigten, lagen die Induktionsfaktoren in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion bei 4,59 ± 1,42-fach signifikant höher ($p < 0,05$). Die CDKN2A Expression in Passage 8 war in beiden Fraktionen ähnlich reguliert (MSCA-1$^-$: 1,89 ± 0,38-fach; MSCA-1$^+$: 1,94 ± 1,13-fach). Die CDKN2A Induktion der MSCA-1$^-$ Zellfraktion nahmen in Passage 9 in Vergleich zu Kontrollen auf das 2,81 ± 0,66-fache zu, während diejenige der MSCA-1$^+$ Zellfraktion auf 1,41 ± 0,45-fach abnahm.

Die CDKN2A Expression in den mit EasySep gewonnenen Zellfraktionen (Abb. 38 B) zeigte leichte Unterschiede bei ähnlichem Kurvenverlauf. Während nach der Separation die Expressionslevels bei 1,27 ± 0,45-fach (MSCA-1$^-$) und 1,89 ± 0,38-fach

(MSCA-1$^+$) lagen, nahm die CDKN2A Expression in stimulierten Zellen der MSCA-1$^-$ Zellfraktion über Repressionswerte von 0,84 ± 0,36-fach (Passage 8) auf 0,75 ± 0,20-fach in Passage 9 ab. Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion zeigten in Passage 8 2,14 ± 0,88-fach höhere Expressionslevels, um dann in Passage 9 auf das 1,39 ± 0,52-fache abzusinken.

In der Passage der Separation war das Expressionslevel der MSCA-1$^+$ von MACS signifikant höher, als das in der entsprechenden EasySep Fraktion ($p < 0,05$).

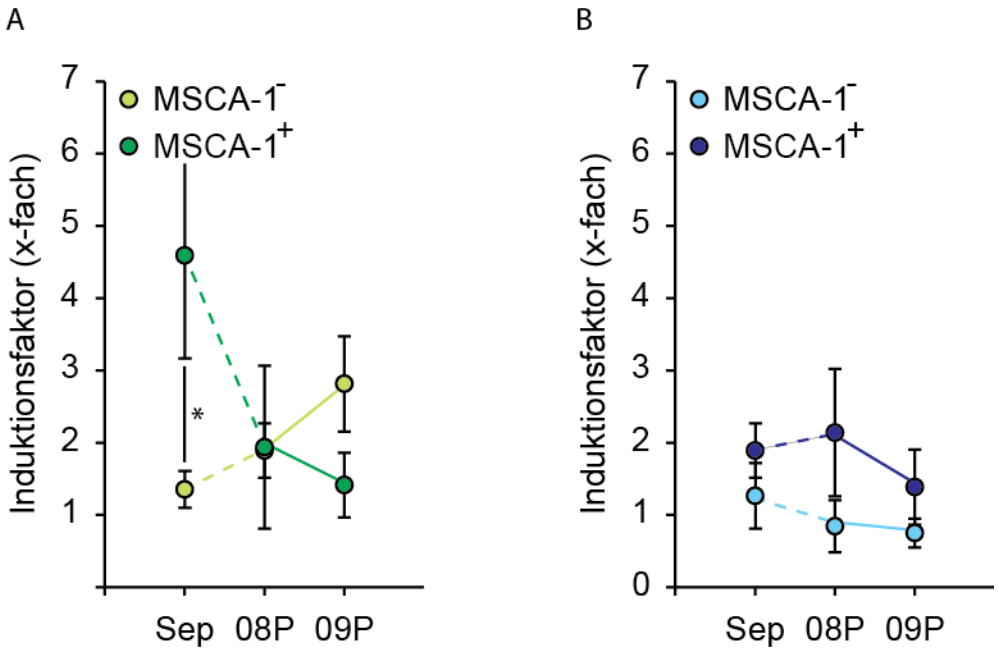


Abbildung 38: Quantitative Analyse der Cyclin-dependent kinase inhibitors 2A (CDKN2A) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.
Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.11.3. Genexpression von Insuline-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2)

Die Untersuchung der IGFBP-2 Grundexpression in Kontrollzellen der mit MACS gewonnenen Zellfraktionen zeigte sich für die MSCA-1$^-$ Zellfraktion der Separationspassage eine Ratio (IGFBP-2/GAPDH) von 2,65 ± 1,37. In den Passagen 8 und 9 sanken die Grundlevels auf 0,68 ± 0,22 (Passage 8) bzw. 0,68 ± 0,09 (Passage 9).

Die Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion zeigten sich diesbezüglich unsteter: Separationspassage: 1,29 ± 0,80; Passage 8: 0,87 ± 0,47, Passage 9: 3,43 ± 1,71.
Nach der EasySep Separation konnten in Kontrollzellen der MSCA-1$^-$ Fraktion hohe IGFBP-2 Grundlevels von 7,82 ± 1,76 ermittelt werden. Hiervon ausgehend sank die Grundexpression in Passage 8 (0,39 ± 0,12), bevor sie in Passage 9 wieder etwas anstieg (1,04 ± 0,91). Der Verlauf der IGFBP-2 Expression in Kontrollzellen der MSCA-1$^+$ Fraktion war der MSCA-1$^-$ Fraktion recht ähnlich, startete aber mit einer doppelt so hohen Ratio in der Separationspassage (15,42 ± 1,97). Die Expression nahm in Passage 8 stark ab (0,21 ± 0,09) und stieg in Passage 9 leicht an (0,94 ± 0,21).
Das Expressionsmuster von IGFBP-2 verlief für beide durch die MACS Separation gewonnenen und osteogen stimulierten Zellfraktionen (Abb. 39 A) ähnlich, mit maximalen Levels in Passage 8. Zunächst lagen die Induktionsfaktoren bei 34,26 ± 15,13-fach (MSCA-1$^-$) und 23,88 ± 10,46-fach (MSCA-1$^+$). Die höchsten Induktionen wurden mit 140,86 ± 124,74-fach (MSCA-1$^-$) sowie 207,87 ± 190,57-fach (MSCA-1$^+$) in Passage 8 detektiert. In Passage 9 sanken die maximalen Levels der IGFBP-2 Induktion auf das 84,42 ± 43,17-fache (MSCA-1$^-$) und das 27,82 ± 23,80-fache (MSCA-1$^+$) der Kontrollzellen.
In osteogen stimulierten Zellen der EasySep Fraktionen (Abb. 39 B) wurden deutlich geringere IGFBP-2 Induktionswerte gemessen, als in den MACS Fraktionen. Die IGFBP-2 Expression in Zellen der MSCA-1$^-$ Zellfraktion zeigte einen langsamen Anstieg im Laufe der Passagen, während für die MSCA-1$^+$ Fraktion ein Expressionstrend wie bei den MACS Fraktionen mit maximalen Levels in Passage 8 festgestellt wurde. Nach der Separation wurden IGFBP-2 Induktionslevels von 9,23 ± 2,45-fach (MSCA-1$^-$) und 9,08 ± 3,61-fach (MSCA-1$^+$) detektiert. In Passage 8 zeigten sich in Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion nur geringfügig höhere Levels (10,42 ± 5,28-fach), während in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion Induktionswerte von 21,58 ± 6,60-fach ermittelt wurden. Die IGFBP2 Induktion nahm in Zellen der MSCA-1$^-$ Zellfraktion auch in Passage 9 weiter zu (18,54 ± 11,02-fach), während sie in der MSCA-1$^+$ Zellfraktion niedrigere Levels zeigte (12,70 ± 5,91-fach).
In Zellfraktionen beider Separationsmethoden zeichnete sich ein ähnlicher Verlauf der IGFBP-2 Expression. Die maximalen IGFBP-2 Levels wurden in Passage 8 detektiert und diese sanken wieder in der darauf folgenden Passage 9. Insgesamt

konnten auch deutlich höhere IGFBP-2 Induktionen in den MACS separierten Fraktionen nachgewiesen werden, allerdings auch mit sehr hohen Abweichungen.

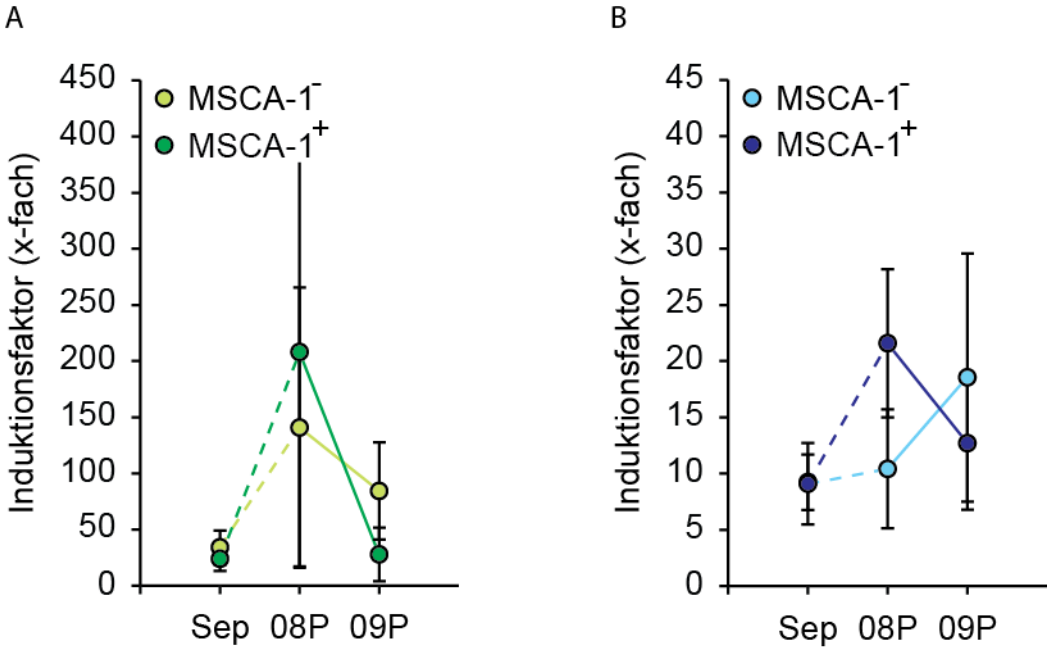


Abbildung 39: Quantitative Analyse der Insuline-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separieren Zellen.
Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar. Zur besseren Verdeutlichung des Verlaufes wurde bei den hier vorliegenden Unterschieden der Induktionsindices die Skalierung für MACS (A) um 10^1 erhöht im Vergleich zu EasySep (B).

3.11.4. Genexpression von Insuline-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3)

Die Analyse der IGFBP-3 Grundexpression zeigte in Zellen aus beiden Separationsmethoden sehr hohe Level. In den Kontrollzellen der MACS separierten MSCA-1^- Fraktion zeigte sich über die untersuchten Passagen ein v-förmiger Verlauf. In der Separationspassage wurde mit 703,86 ± 606,04 der höchste Expressionswert in Passage 8 sank der Expressionslevel auf 171,43 ± 61,42 und stieg anschließend in Passage 9 wieder an (575,17 ± 445,91). In den Kontrollzellen der MSCA-1^+ Fraktion

hingegen war eine konstante Abnahme der basalen IGFBP-3 Expression von der Separationspassage (594,75 ± 483,38) über Passage 8 (364,86 ± 255,11) hin zu Passage 9 (321,65 ± 78,28) zu beobachten.

In beiden EasySep Fraktionen verlief die Expression, wie auch in der MSCA-1$^-$ Fraktion von MACS, v-förmig. Die stärkste Expression wurde jeweils in der Separationspassage ermittelt (MSCA-1$^-$: 612,83 ± 432,52; MSCA-1$^+$: 750,67 ± 563,23). Beide Fraktionen exprimierten in Passage 8 etwas erniedrigte IGFBP-3 Levels (MSCA-1$^-$: 233,74 ± 66,21; MSCA-1$^+$: 237,47 ± 146,81). In Passage 9 nahm die Expression in beiden Fraktionen wieder zu (MSCA-1$^-$: 584,26 ± 365,40; MSCA-1$^+$: 486,71 ± 167,43).

Während die MACS separierte (Abb. 40 A) MSCA-1$^+$ Zellfraktion sehr ähnliche IGFBP-3 Induktionswerte während der *in vitro* Passagierung zeigte (Separationspassage: 2,87 ± 1,47-fach; Passage 8: 3,20 ± 0,78-fach; Passage 9: 3,22 ± 2,07-fach), konnten tendenziell höhere Levels der IGFBP-3 Expression in osteogen stimulierten Zellen der MSCA-1$^-$ Zellfraktion der Passage 8 detektiert werden (Separationspassage: 3,00 ± 0,92-fach; Passage 8: 7,11 ± 4,27-fach; Passage 9: 4,51 ± 3,30-fach), die aber aufgrund der hohen Abweichungen nicht signifikant waren.

MSCA-1$^-$ Zellen der EasySep Separation (Abb. 40 B) zeigten nach der Separation IGFBP-3 Induktionswerte von 2,68 ± 1,09-fach während MSCA-1$^+$ Zellen einen durchschnittlichen Induktionsindex von 1,65 ± 1,29-fach aufwiesen. Die IGFBP-3 Expression blieb in MSCA-1$^-$ Zellen der Passagen 8 (2,35 ± 0,75-fach) und 9 (2,67 ± 2,20-fach) relativ gleich, während Zellen der MSCA-1$^+$ Zellfraktion in Passage 8 höhere (4,42 ± 2,73-fach) Expressionslevels zeigten, allerdings mit hohen Abweichungen, um in Passage 9 wieder auf 1,82 ± 0,39-fach abzusinken.

Bezüglich der IGFBP3 Expression zeigte sich keine großen Unterschiede in Abhängigkeit von der Separationsmethode oder Passage.

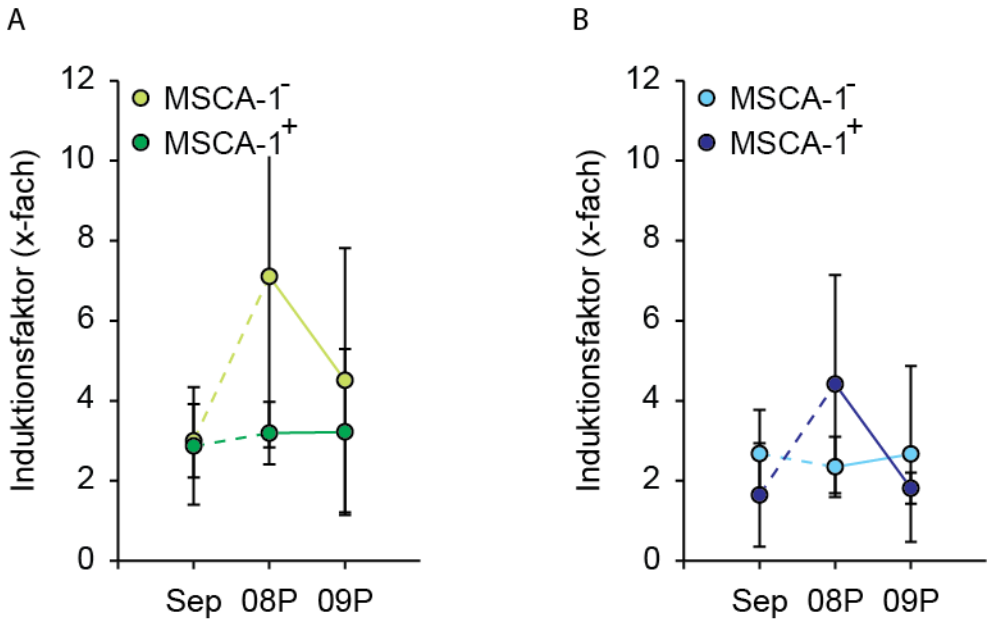


Abbildung 40: Quantitative Analyse der Insuline-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.
Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.11.5. Genexpression von Insuline-like growth factor binding protein-7 (IGFBP-7)

Untersuchungen der IGFBP-7 Expression in den unbehandelten Kontrollzellen der MACS Fraktionen zeigten stetig ansteigende basale IGFBP-7 Expressionslevels (Ratio: IGFBP-7/GAPDH) in der MSCA-1$^-$ Fraktion. Von der Separationspassage ausgehend (235,65 ± 91,75) nahm die Expression über Passage 8 (372,97 ± 314,25) und Passage 9 (395,39 ± 162,46) zu. Unbehandelte Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion zeigten in der Separationspassage IGFBP-7 Grundlevels von 160,03 ± 96,15, die in Passage 8 und 9 anstiegen (266,00 ± 165,44; 253,35 ± 102,06). Zu allen drei Zeitpunkten war das IGFBP-7 Expressionsniveau der MSCA-1$^+$ Zellen geringer, als das der MSCA-1$^-$ Zellen.

Auch in Fraktionen von EasySep zeigten die Kontrollzellen der MSCA-1$^+$ Fraktion eine geringere Expression von IGFBP-7, als die Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion. In beiden Fraktionen ließ sich ein v-förmiger Expressionsverlauf erkennen, der in der Se-

parationspassage die höchsten Expressionslevels zeigte (MSCA-1$^-$: 547,90 ± 135,00; MSCA-1$^+$: 374,22 ± 208,36). In Passage 8 exprimierten beide Fraktionen niedrigere IGFBP-7 Basallevels (MSCA-1$^-$: 166,35 ± 81,42; MSCA-1$^+$: 100,78 ± 32,41). Die Expression nahm in Passage 9 wieder etwas zu (MSCA-1$^-$: 297,81 ± 229,73; MSCA-1$^+$: 250,24 ± 116,45).

Die IGFBP-7 Expression unterschied sich zwischen beiden Fraktionen der MACS-Methode nur in der Separationspassage (Abb. 41 A), während sich die Induktionswerte in osteogen stimulierten Zellen der Passage 8 und 9 annäherten (Separationspassage: MSCA-1$^-$: 2,62 ± 1,20-fach; MSCA-1$^+$: 8,84 ± 6,94-fach; Passage 8: MSCA-1$^-$: 6,61 ± 2,76-fach; MSCA-1$^+$: 7,55 ± 3,96-fach; Passage 9: MSCA-1$^-$: 4,04 ± 1,91-fach; MSCA-1$^+$: 4,28 ± 1,05-fach.

Die mittels EasySep gewonnenen (Abb. 41 B) und osteogen stimulierten Zellfraktionen zeigten in den Expressionslevels von IGFBP-7 nur sehr geringe Unterschiede in den drei untersuchten Passagen. In der Separationspassage ergaben sich IGFBP-7 Induktionswerte von 2,08 ± 0,78-fach (MSCA-1$^-$) und 2,93 ± 2,03-fach (MSCA-1$^+$). Während die MSCA-1$^-$ Zellfraktion nun einen leichten Anstieg verzeichnete (3,67 ± 1,79-fach), blieb das Expressionslevel von MSCA-1$^+$ auf gleichem Niveau (2,94 ± 1,01-fach), um in Passage 9 leicht abzusinken (1,90 ± 0,18-fach). Für die MSCA-1$^-$ Zellen konnte kein Unterschied zu Passage 8 detektiert werden (3,73 ± 2,46-fach).

Die stimulierten Zellen der EasySep Fraktionen zeigten leicht erhöhten, aber während der Passagierung unveränderten Transkriptlevel von IGFBP-7 im Vergleich zu Kontrollzellen. Auch die beiden MACS Fraktionen zeigten erhöhten Transkriptlevel in allen drei Passagen. In der Passage der Separation war hier der größte Unterschied zwischen den Fraktionen zu beobachten, während dieser in Passage 8 und 9 nicht mehr detektierbar war. Insgesamt schienen die Induktionslevels in den MACS Fraktionen etwas höher als in den EasySep Fraktionen zu sein. Diese Beobachtung wurde durch signifikante Unterschiede zwischen den MSCA-1$^+$ Fraktionen beider Methoden in Passage 9 bestätigt ($p < 0,05$).

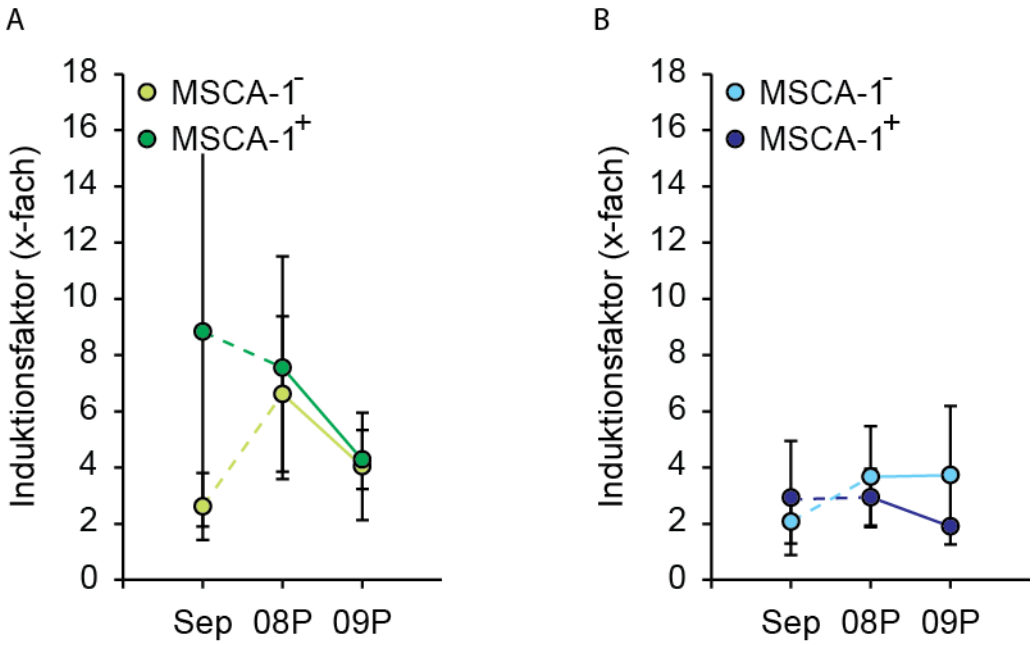


Abbildung 41: Quantitative Analyse der Insuline-like growth factor binding protein-7 (IGFBP-7) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.
Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.11.6. Genexpression von Regucalcin (RGN)

Die Untersuchung in Kontrollzellen bezüglich der basalen RGN Expression zeigte tendenziell etwas niedrigere Levels in MSCA-1$^+$ Zellen der MACS Methode. Während MSCA-1$^-$ Kontrollzellen RGN Grundlevels von 0,83 ± 0,31 in der Separationspassage, von 1,00 ± 0,25 in Passage 8 und von 0,40 ± 0,10 in Passage 9 exprimierten, zeigten MSCA-1$^+$ Kontrollzellen Ratios von 0,46 ± 0,13 (Separationspassage), von 0,57 ± 0,26 (Passage 8) und von 0,19 ± 0,05 (Passage 9).
In den EasySep Fraktionen nahm die Expression von RGN in den Kontrollzellen ausgehend von der Separationspassage stetig zu (MSCA-1$^-$: 0,15 ± 0,10; MSCA-1$^+$: 0,14 ± 0,07). Die Expression stieg über Passage 8 (MSCA-1$^-$: 0,23 ± 0,05; MSCA-1$^+$: 0,18 ± 0,07) zu Passage 9 (MSCA-1$^-$: 0,45 ± 0,39; MSCA-1$^+$: 0,24 ± 0,08). Die Kontrollzellen der MSCA-1$^+$ Fraktion von EasySep exprimierten RGN weniger stark, als die Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion.

Die RGN Expression verlief in osteogen stimulierten Zellen beider MACS Fraktionen (Abb. 42 A) mit einem Tiefpunkt in Passage 8. Zunächst war die RGN Expression leicht induziert mit Werten von 1,44 ± 0,55-fach in Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion und 1,75 ± 0,93-fach in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion. In Zellen der Passage 8 wurde die RGN Expression leicht reprimiert: 0,57 ± 0,20-fach (MSCA-1$^-$) und 0,83 ± 0,38-fach (MSCA-1$^+$), um in Passage 9 erneut leicht anzusteigen (MSCA-1$^-$: 1,24 ± 0,34-fach; MSCA-1$^+$: 1,70 ± 0,53-fach).

Die RGN Expression nach der EasySep-Separation (Abb. 42 B) zeigte für beide Fraktionen maximale Induktionswerte in Passage 8. Während in der Separationspassage ein geringer jedoch signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied auszumachen war (MSCA-1$^-$: 1,73 ± 0,21-fach; MSCA-1$^+$: 1,18 ± 0,09-fach), glichen sich die Expressionslevels in Passage 8 (MSCA-1$^-$: 2,17 ± 0,80-fach; MSCA-1$^+$: 1,98 ± 0,63-fach) und Passage 9 (MSCA-1$^-$: 0,93 ± 0,67-fach; MSCA-1$^+$: 1,05 ± 0,69-fach) immer mehr an.

Insgesamt waren keine Unterschiede bezüglich der RGN Expression in beiden Fraktionen der MACS und EasySep Methode im Laufe der Passagierung zu verzeichnen. Der einzige Trend, der sich leicht zwischen beiden Methoden unterschied war, dass in Zellen der MACS Methode die niedrigsten RGN Levels in Passage 8 beobachtet wurden, während in Zellen der EasySep Methode zu diesem Zeitpunkt die maximalen Levels der RGN Induktion detektiert wurden.

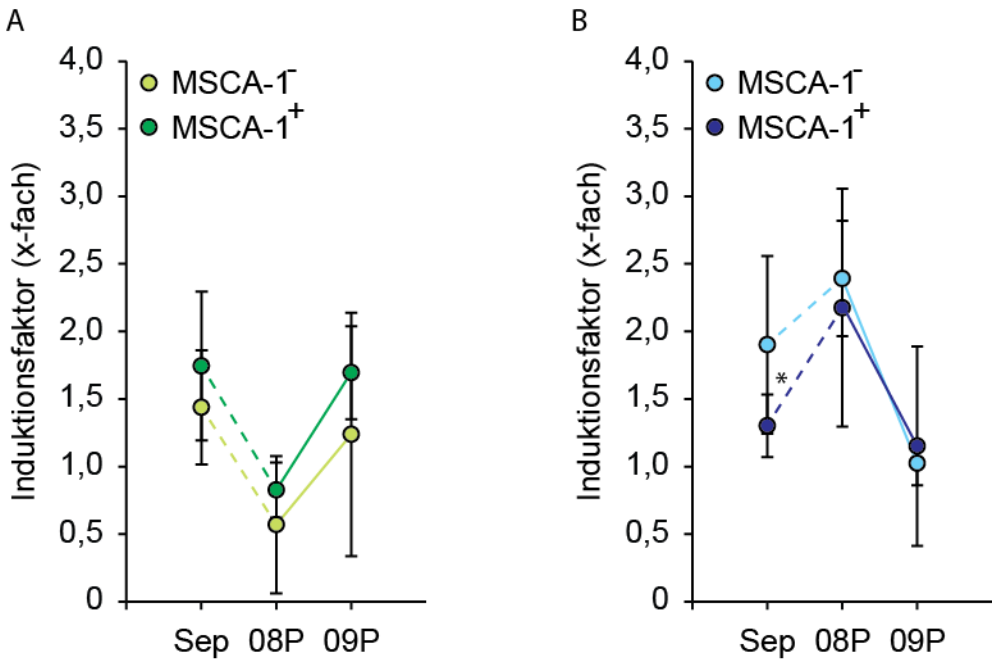


Abbildung 42: Quantitative Analyse der Regucalcin (RGN) Genexpression mittels Echtzeit-PCR in MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellen.

Auf der y-Achse ist der Induktionsindex (x-fach) der Genexpression in osteogen stimulierten versus unstimulierten Zellen aufgetragen. Die x-Achse stellt die 3 untersuchten Passagen (Separationspassage, Passage 8 und 9) dar.

3.12. Untersuchungen der Proteinexpression in MACS und EasySep separierten Zellfraktionen im Laufe der osteogenen Differenzierung in der Separationspassage

Überstände von osteogen differenzierten Zellen und unbehandelten Kontrollen wurden für die Analyse verschiedener löslicher Rezeptoren und verwandter Proteine verwendet. Dafür wurden zwei Zeitpunkte der Osteogenese (Tag 10 und 25) für die Untersuchung der Proteinexpression ausgewählt (siehe Abb. 43).

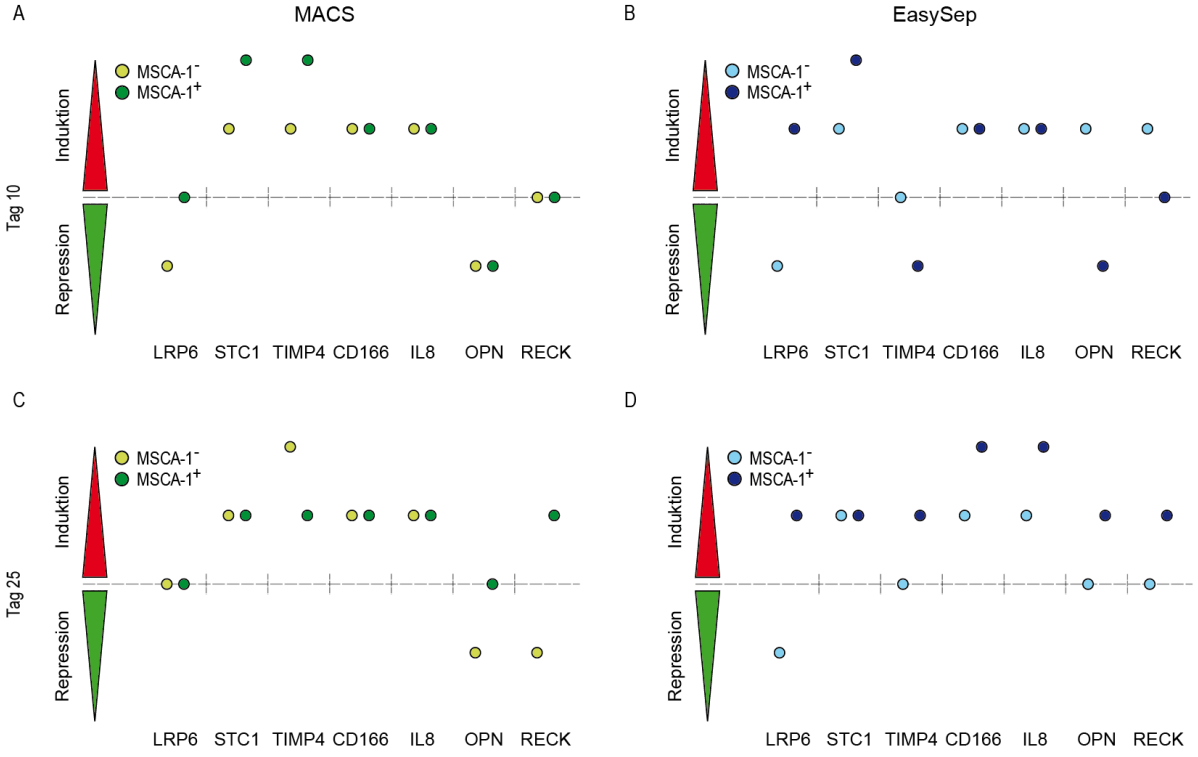


Abbildung. 43: Untersuchungen der Proteinexpression in MACS (A, C) und EasySep (B, D) separierten MSCA-1$^{-/+}$ Fraktionen an Tag 10 und 25 der osteogenen Stimulation

3.12.1. Proteinexpression in MACS separierten Zellfraktionen an Tag 10 der osteogenen Stimulation

Nach 10 Tagen der osteogenen Stimulation zeigten Zellen der MACS separierten MSCA-1$^+$ Fraktion (Abb. 43 A) keine Unterschiede bzgl. der LRP-6 (low density lipoprotein receptor-related protein 6) Expression (OB gegen Kontrolle), wohingegen die LRP-6 Levels der MSCA-1$^-$ Fraktion herunterreguliert waren im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Die Expression von Stanniocalcin-1 (STC-1) und Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 (TIMP-4) waren sowohl in der MSCA-1$^-$ als auch der MSCA-1$^+$ Fraktion an Tag 10 der Osteogenese induziert, mit höheren Levels in der MSCA-1$^+$ Fraktion. Die Proteinexpression von ALCAM/CD166 (Activated leukocyte cell adhesion molecule) und Interleukin-8 (CXCL8/IL-8) zeigten eine Induktion in beiden Fraktionen jeder Methode. Die Osteopontin (OPN) Proteinlevels wurden an dem untersuchten Zeitpunkt in beiden MSCA-1 Fraktionen reprimiert, wohingegen die RECK (reversion-inducing cystein-rich protein with Kazal motifs) Expression keine Unterschiede in den Fraktionen zeigte.

3.12.2. Proteinexpression in MACS separierten Zellfraktionen an Tag 25 der osteogenen Stimulation

Am Tag 25 der Osteogenese konnten bzgl. der LRP-6 Expression keine Unterschiede in stimulierten MSCA-1$^{-/+}$ Fraktionen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen detektiert werden (Abb. 43 C). Die STC-1 Proteinlevels waren an diesem Zeitpunkt in beiden Fraktionen erhöht. Die TIMP-4 Expression war in der MSCA-1$^-$ Fraktion deutlich stärker hochreguliert als in der MSCA-1$^+$ Fraktion. ALCAM (CD166) und IL-8 zeigten die gleichen Expressionslevels wie an Tag 10. Die OPN Expression war nur in der MSCA-1$^-$ Fraktion reprimiert, zeigte jedoch keinen Unterschied zu unbehandelten Kontrollen in der MSCA-1$^+$ Fraktion. Die Proteinlevels von RECK waren in der MSCA-1$^-$ Fraktion reprimiert, während sie in osteogen stimulierten MSCA-1$^+$ Zellen induziert waren.

3.12.3. Proteinexpression in EasySep separierten Zellfraktionen an Tag 10 der osteogenen Stimulation

Nach der EasySep Separation zeigte sich an Tag 10 der Osteogenese ein herunterreguliertes Expressionsmuster der LRP-6 Levels in der MSCA-1$^-$ Fraktion während

diese in der MSCA-1$^+$ Fraktion hochreguliert waren (Abb. 43 B). Die STC-1 Expression zeigte das gleiche Muster wie in MACS separierten Fraktionen: STC-1 war in beiden Fraktionen induziert, in der MSCA-1$^+$ Fraktion allerdings deutlich stärker. Die TIMP-4 Expression zeigte keine Unterschiede in stimulierten Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion im Vergleich zu Kontrollen, wohingegen diese in Überständen von MSCA-1$^+$ Zellen herunter reguliert war. ALCAM (CD166) und IL-8 zeigten das gleiche Expressionsmuster, wie nach der MACS Separation (an Tag 10), beide Fraktionen waren hochreguliert. Die OPN Expression schien in der MSCA-1$^-$ Fraktion induziert, aber in der MSCA-1$^+$ Fraktion reprimiert zu sein. RECK zeigte keine Unterschiede in osteogen versus unstimulierten Kontrollen der MSCA-1$^+$ Fraktion, aber eine Hochregulierung in Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion.

3.12.4. Proteinexpression in EasySep separierten Zellfraktionen an Tag 25 der osteogenen Stimulation

An Tag 25 (Abb. 43 D) der osteogenen Stimulation, zeigte LRP-6 das gleiche Expressionsverhalten wie an Tag 10. Es zeigte sich in der MSCA-1$^-$ Fraktion reprimiert und schien in MSCA-1$^+$ induziert zu sein. Die STC-1 Expression war in beiden Fraktionen hoch reguliert im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Die TIMP-4 Expression zeigte keine Unterschiede im Vergleich zu Kontrollen der MSCA-1$^-$ Fraktion, aber schien in stimulierten Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion induziert zu sein. Die Expression von ALCAM (CD166) und IL-8 waren jeweils in beiden Fraktionen hochreguliert, allerdings in der MSCA-1$^+$ Fraktion jeweils stärker exprimiert. OPN und RECK zeigten keine Unterschiede in stimulierten Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion, eine Induktion konnte aber in der MSCA-1$^+$ Fraktion nachgewiesen werden.

3.13. Untersuchungen der Genexpression in MACS und Easy Sep separierten Zellen, die innerhalb dreidimensionaler (3D) Konstrukte kultiviert wurden

Nachdem sich die Zellen der Separationspassage 15 Tage in der 3D-Kultur befanden (unbehandelt, osteogen stimuliert), wurden die besiedelten Trägermatrizen mechanisch zerkleinert, um die RNA aus den Zellen extrahieren zu können. Nachdem diese in cDNA umgeschrieben wurde, folgte die Untersuchung der Genexpression verschiedener osteogener Marker wie Osx, AP, Runx-2 Igf-2 und LNGFR sowie Entzün-

dungsmediatoren wie IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8. Für beide Methoden konnte nur auf cDNA von zwei Patienten (n = 2) zurückgegriffen werden.

3.13.1. Genexpression von Osterix (Osx)

Die Osterix Expression in den MACS separierten Fraktionen (Abb. 44 A) zeigte insgesamt sehr niedrige, kaum detektierbare Levels. In osteogen stimulierten Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion konnte ein Induktionslevel von 1,62 ± 1,62-fach gemessen werden, der sich aufgrund der hohen Abweichung von den Kontrollzellen nicht unterschied. In Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion konnte keine Osx Induktion nachgewiesen werden. Während die Osx Expression in stimulierten MSCA-1$^-$ Zellen der EasySep-Methode (Abb. 44 B) eher reprimiert wurde (0,29 ± 0,29-fach), konnte eine leichte Induktion in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion detektiert werden (1,52 ± 1,52-fach).

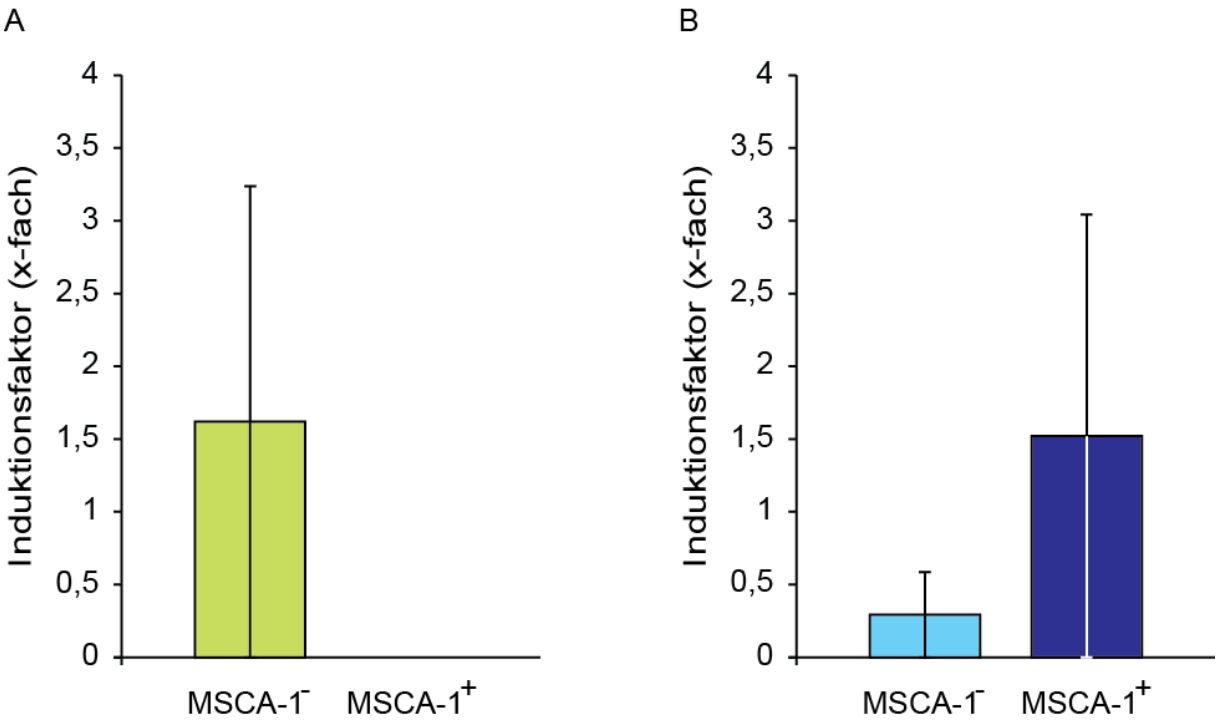


Abbildung 44: Expression von Osterix in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen.
Die Untersuchungen wurden an Tag 15 der *in vitro* Kultivierung durchgeführt.

3.13.2. Genexpression der Alkalischen Phosphatase (AP)

An Tag 15 der osteogenen Stimulation wurde die Expression der alkalischen Phosphatase in Zellen der MSCA-1$^+$ Zellfraktion von MACS (Abb. 45 A; 5,53 ± 4,08-fach) fast doppelt so stark induziert wie in der MSCA-1$^-$ Fraktion (3,10 ± 0,98-fach). Die Expressionslevel der alkalischen Phosphatase lagen an Tag 15 der osteogenen Stimulation nach der EasySep Separation (Abb. 45 B) bei 3,48 ± 0,41-fach in Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion und bei 3,35 ± 0,37-fach in MSCA-1$^+$ Zellen.

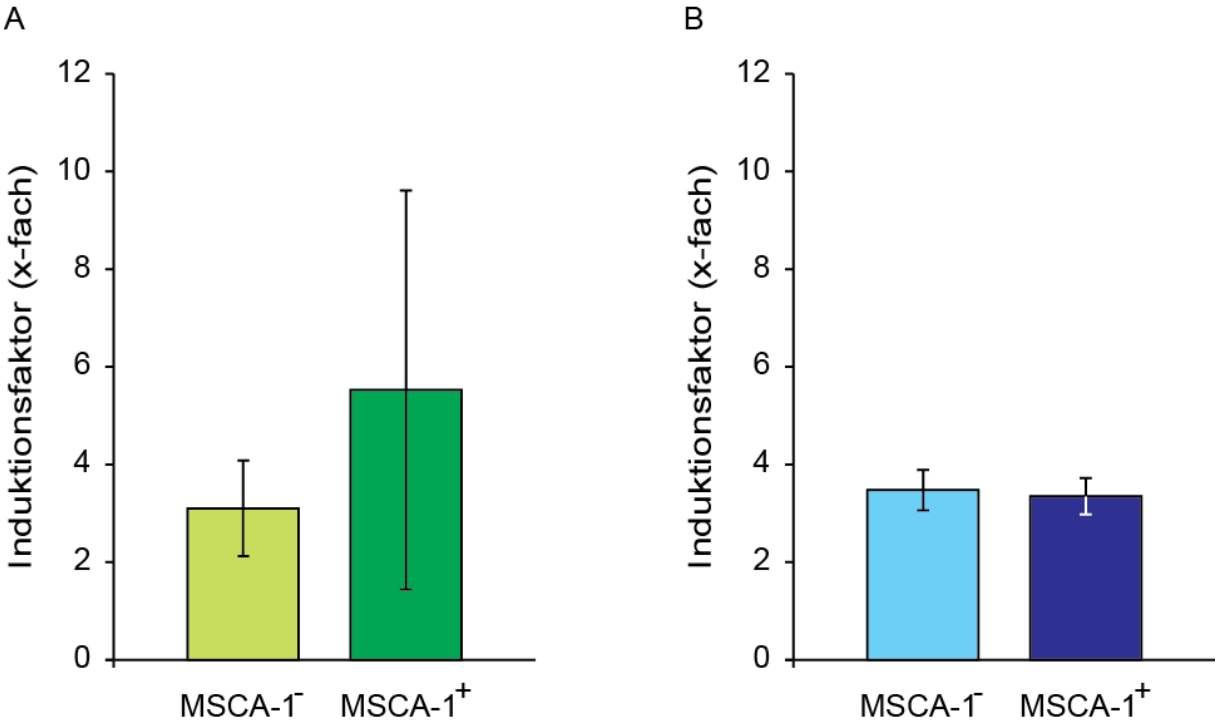


Abbildung 45: Expression der alkalischen Phosphatase in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen.
Die Untersuchungen wurden an Tag 15 der *in vitro* Kultivierung durchgeführt.

3.13.3. Genexpression von Runt related transcription factor-2 (Runx-2)

Die Untersuchung der Runx-2 Expression zeigte keine großen Unterschiede zwischen den Fraktionen oder in Abhängigkeit von der Separationsmethode an Tag 15 der Untersuchung. In Zellen der MSCA-1$^-$ Zellfraktion von MACS (Abb. 46 A) wurden geringfügig höhere (1,73 ± 0,03-fach) Runx-2 Induktionslevels als in der MSCA-1$^+$

Fraktion (1,47 ± 0,27-fach) im Vergleich zu Kontrollzellen detektiert. Runx-2 wurde in stimulierten sowie unbehandelten Zellen der EasySep Fraktionen (Abb. 46 B) auf gleichem Level exprimiert. MSCA-1$^-$ Zellen zeigten dabei einen Repressionsfaktor von 0,83 ± 0,12-fach, MSCA-1$^+$ Zellen von 0,92 ± 0,09-fach. Die Runx-2 Expression war in beiden Fraktionen von MACS induziert in den Fraktionen von EasySep jedoch reprimiert.

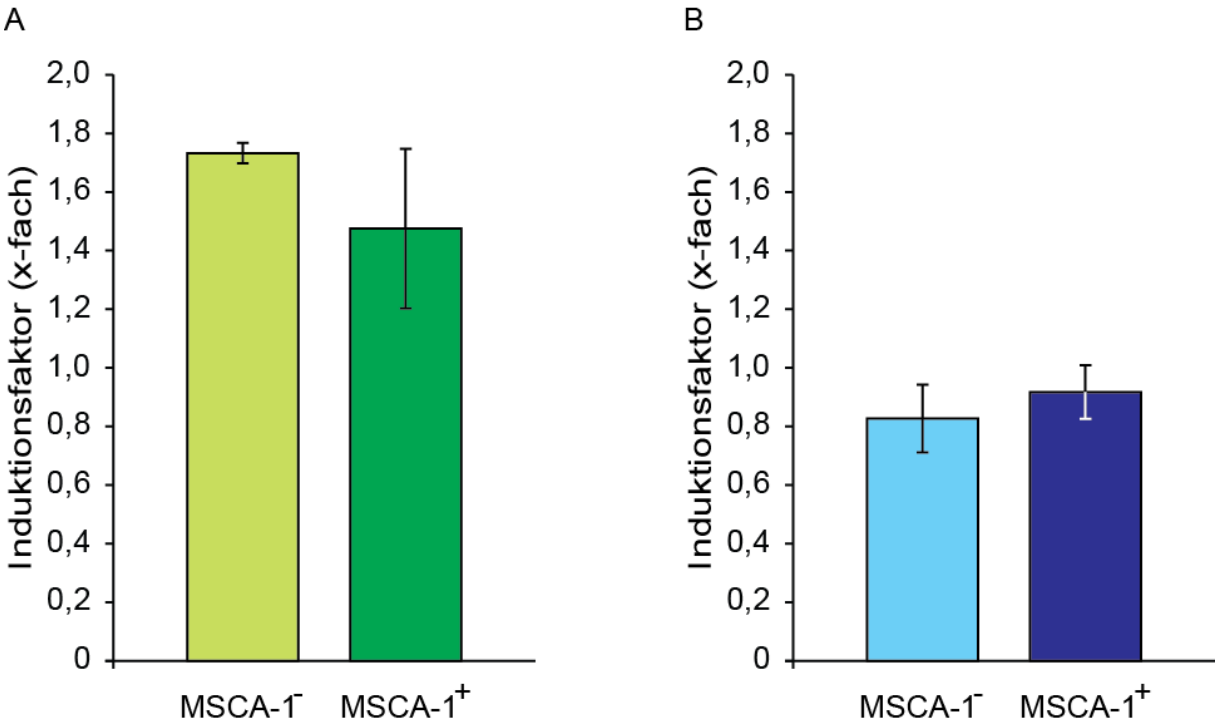


Abbildung 46: Expression von Runt related transcription factor 2 in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen.
Die Untersuchungen wurden an Tag 15 der *in vitro* Kultivierung durchgeführt.

3.13.4. Genexpression von Insuline-like growth factor-2 (Igf-2)

Die Untersuchung der Igf-2 Expression in osteogen stimulierten und 3D-kultivierten Zellen beider Fraktionen zeigte im Allgemeinen eine starke Induktion. Tendenziell fiel die Induktion in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion unabhängig von der Separationsmethode, sowie in Zellen der MACS separierten Fraktionen (Abb. 47 A), höher aus.
Die MACS isolierte MSCA-1$^-$ Fraktion zeigte eine 14,09 ± 9,40-fache Igf-2 Induktion, während in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion eine 17,73 ± 8,53-fache Induktion vorlag. In

osteogen stimulierten Zellen der EasySep isolierten (Abb. 47 B) MSCA-1$^-$ Zellfraktion wurde eine 12,79 ± 4,85-fache Igf-2 Induktion errechnet, während in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktionen eine 20,24 ± 15,90-fache detektiert wurde.

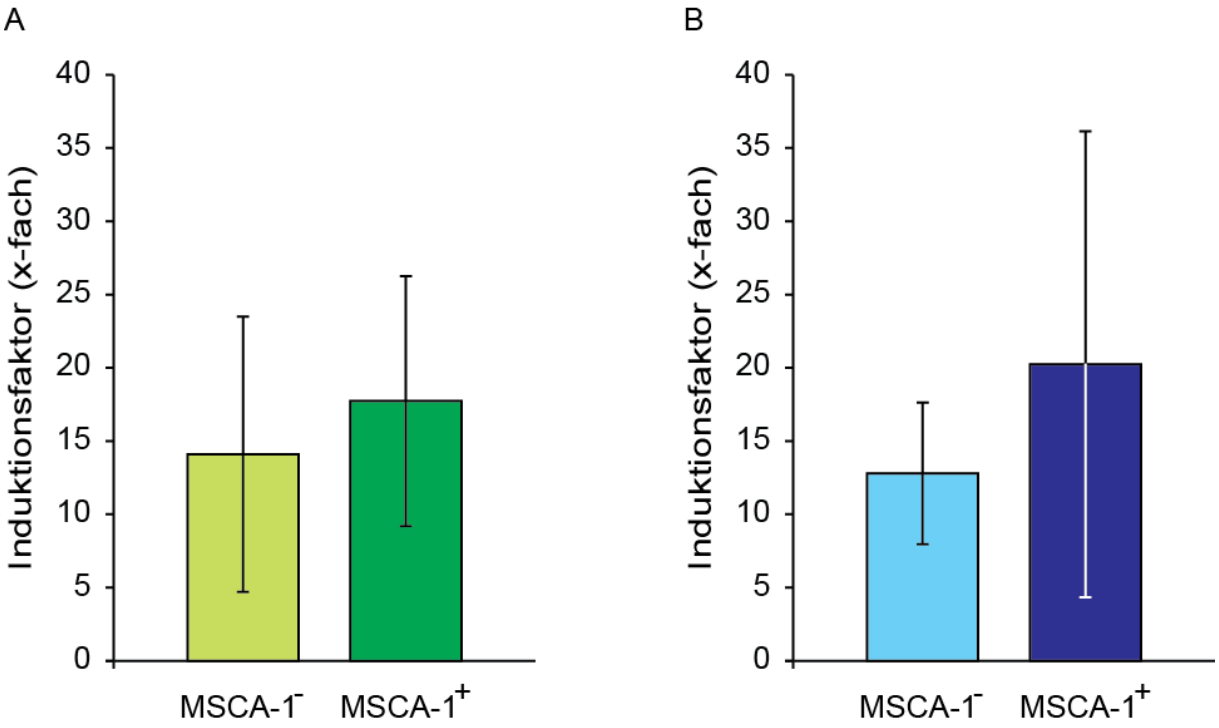


Abbildung 47: Expression von Insuline-like growth factor-2 in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen.
Die Untersuchungen wurden an Tag 15 der *in vitro* Kultivierung durchgeführt.

3.13.5. Genexpression von Low density nerve growth factor receptor (LNGFR)

Die MACS separierten Zellen (Abb. 48 A) zeigten geringere Expressionslevel von LNGFR als die mit EasySep gewonnenen Zellen (Abb. 48 B). Für beide Methoden zeigten die MSCA-1$^-$ Zellen eine stärkere LNGFR Induktion als die entsprechenden MSCA-1$^+$ Zellen. Die Induktionsindices in osteogen stimulierten MSCA-1$^-$ Zellen von MACS beliefen sich auf 2,83 ± 2,83-fach, in den MSCA-1$^+$ Zellen betrug die Induktion das 2,07 ± 2,07-fache gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. Die durch EasySep gewonnene MSCA-1$^-$ Zellfraktion zeigte LNGFR Induktionslevels von 6,13 ± 4,59-fach. Wohingegen die MSCA-1$^+$ Zellen lediglich eine Induktion von 4,10 ± 0,14-

fach in der osteogen behandelten Gruppe gegenüber den unbehandelten Zellen zeigte.

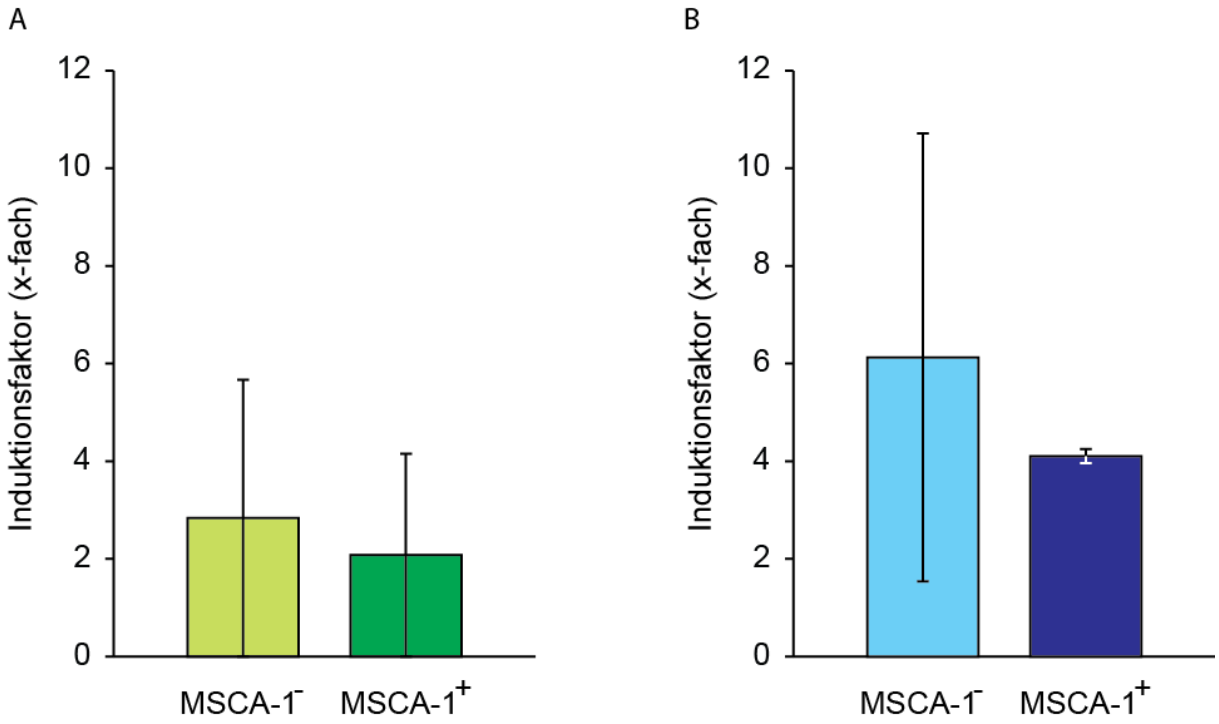


Abbildung 48: Expression von LNGFR in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) Zellfraktionen.
Die Untersuchungen wurden an Tag 15 der *in vitro* Kultivierung durchgeführt.

3.13.6. Genexpression von Interleukin-1 beta (IL-1α)

Im Allgemeinen zeigten MACS separierte Zellen (Abb. 49 A) höhere Expressionslevels von Interleukin-1 alpha als die EasySep (Abb. 49 B) separierten, allerdings ergab sich aufgrund der Abweichungen auch bei diesen keinen Unterschied zu den unbehandelten Kontrollen. Osteogen stimulierte Zellen der 3D-kultivierten MSCA-1$^-$ Fraktion zeigten einen Repressionslevel von 0,77 ± 0,71-fach, während diejenigen der MSCA-1$^+$ Fraktion einen Wert von 0,89 ± 0,75-fach aufzeigten. Die IL-1α Expressionslevels wurden in MSCA-1$^-$ Zellen der EasySep Methode noch stärker auf das 0,27 ± 0,08-fache sowie in MSCA-1$^+$ Zellen auf das 0,17 ± 0,09-fache reprimiert.

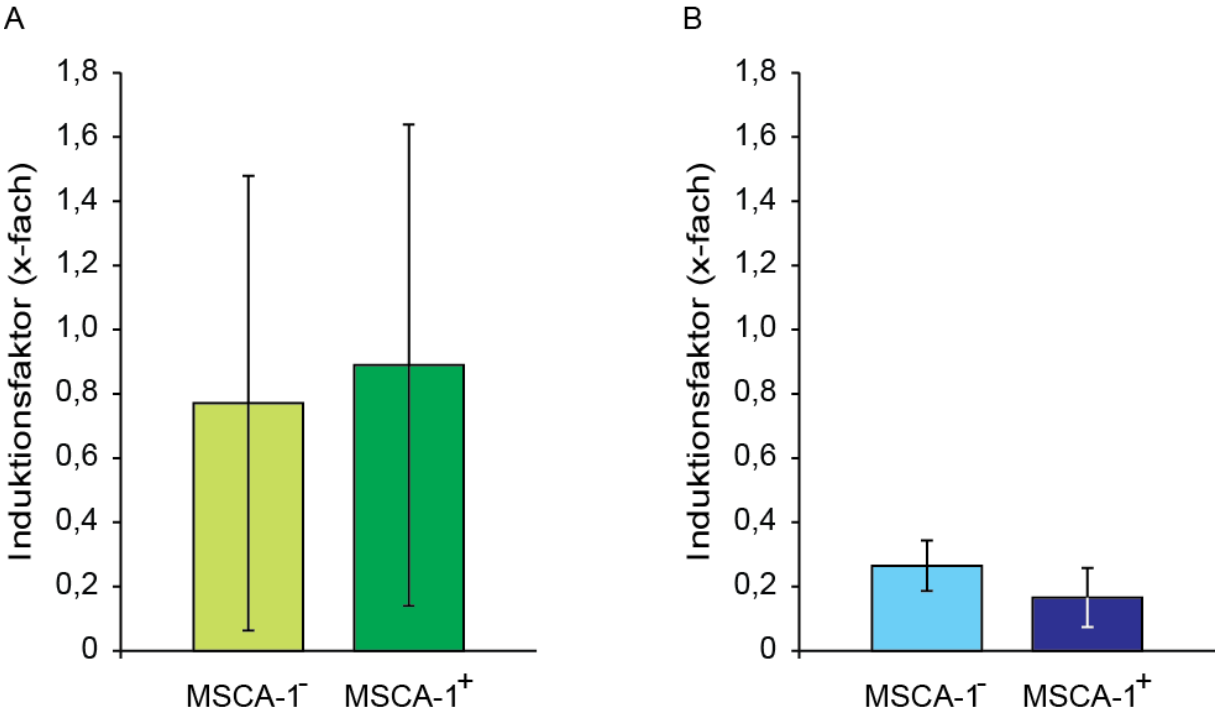


Abbildung 49: Expression von Interleukin-1 alpha in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen.
Die Untersuchungen wurden an Tag 15 der *in vitro* Kultivierung durchgeführt.

3.13.7. Genexpression von Interleukin-1 beta (IL-1β)

Tendenziell zeigte sich in 3D-kultivierten Zellen, ähnlich wie bei der IL-1α Expression, aber in einem noch höherem Maße, eine starke Repression der IL-1ß Levels in osteogen stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen. Im Trend schien die Repression in EasySep (Abb. 50 B) separierten Zellen noch stärker zu sein.
Nach der MACS Separation (Abb. 50 A) wurden IL-1ß Repressionslevels von 0,39 ± 0,32-fach (MSCA-1$^-$) und 0,32 ± 0,26-fach (MSCA-1$^+$) ermittelt. In EasySep Fraktionen wurden die IL-1β Expressionslevels noch stärker inhibiert auf das 0,13 ± 0,10-fache in MSCA-1$^-$ Zellen und auf das 0,06 ± 0,00-fache in MSCA-1$^+$ Zellen.

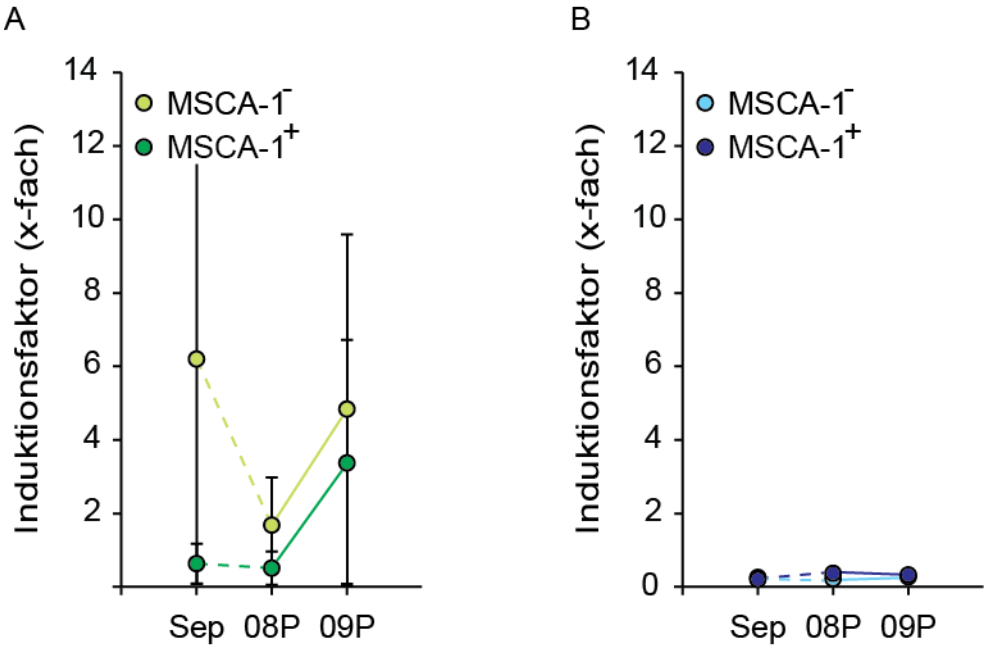


Abbildung 50: Expression von Interleukin-1 beta in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen.
Die Untersuchungen wurden an Tag 15 der *in vitro* Kultivierung durchgeführt.

3.13.8. Genexpression von Interleukin-6 (IL-6)

Die IL-6 Expression war in Zellen beider Separationsmethoden recht stark reprimiert. In stimulierten Zellen der MACS Fraktionen (Abb. 51 A) wurden nahezu identische Levels von 0,14 ± 0,04-fach (MSCA-1$^-$) und 0,12 ± 0,07-fach (MSCA-1$^+$) ermittelt. Ähnlich niedrige Repressionslevels von IL-6 wurden auch in den Zellfraktionen von EasySep (Abb. 51 B) nach der Kultivierung auf Trägermatrizen detektiert (MSCA-1$^-$: 0,16 ± 0,12-fach; MSCA-1$^+$: 0,18 ± 0,00-fach). Die IL-6 Expression wurde in allen Fraktionen von EasySep annähernd gleich stark reprimiert.

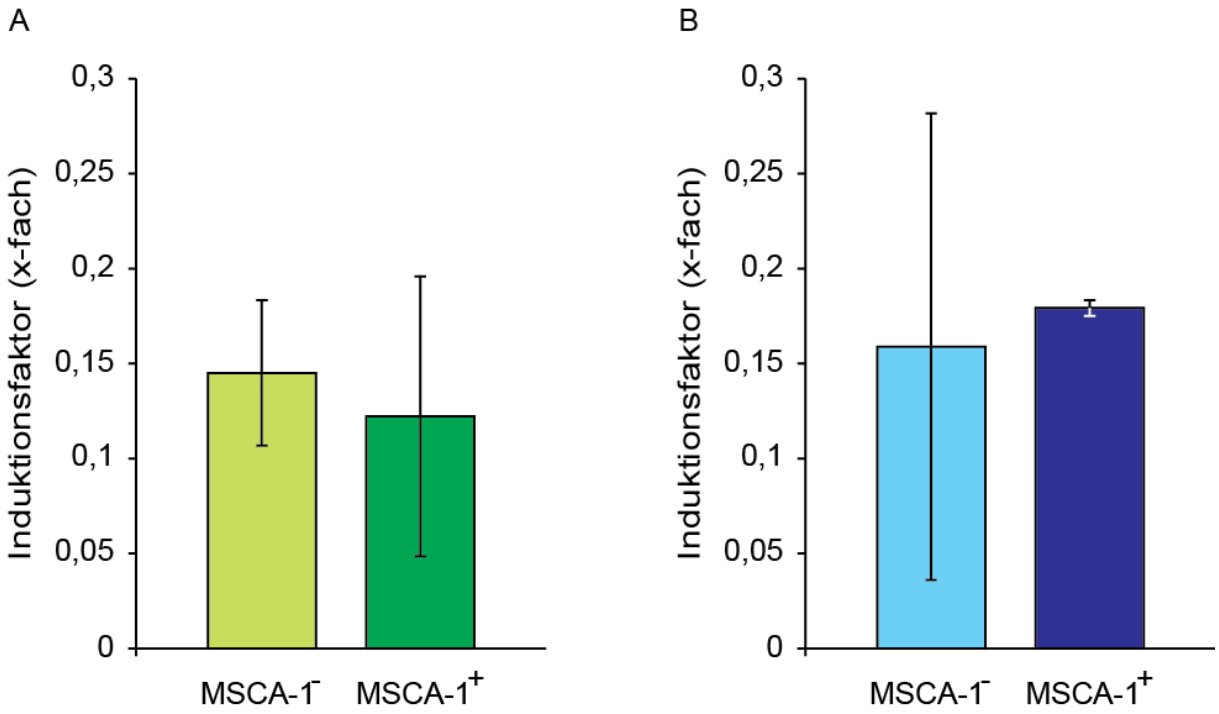


Abbildung 51: Expression von Interleukin-6 in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen.
Die Untersuchungen wurden an Tag 15 der *in vitro* Kultivierung durchgeführt.

3.13.9. Genexpression von Interleukin-8 (IL-8)

Osteogen stimulierte Zellen beider Fraktionen zeigten insgesamt eine fast identische Genregulation von IL-8. Tendenziell wurden höhere Induktionsfaktoren in den Fraktionen von EasySep ermittelt.

In 3D-kultivierten MSCA-1$^-$ Zellen der MACS Methode (Abb. 52 A) wurden IL-8 Induktionswerte von 6,22 ± 4,19-fach und in MSCA-1$^+$ Zellen von 5,63 ± 2,94-fach errechnet.

Die IL-8 Expression zeigte sich in stimulierten MSCA-1$^-$ Zellen der EasySep Methode (Abb. 52 B) um das 15,76 ± 7,12-fache und in MSCA-1$^+$ Zellen um das 18,01 ± 11,70-fache im Vergleich zu den Kontrolllevels hochreguliert.

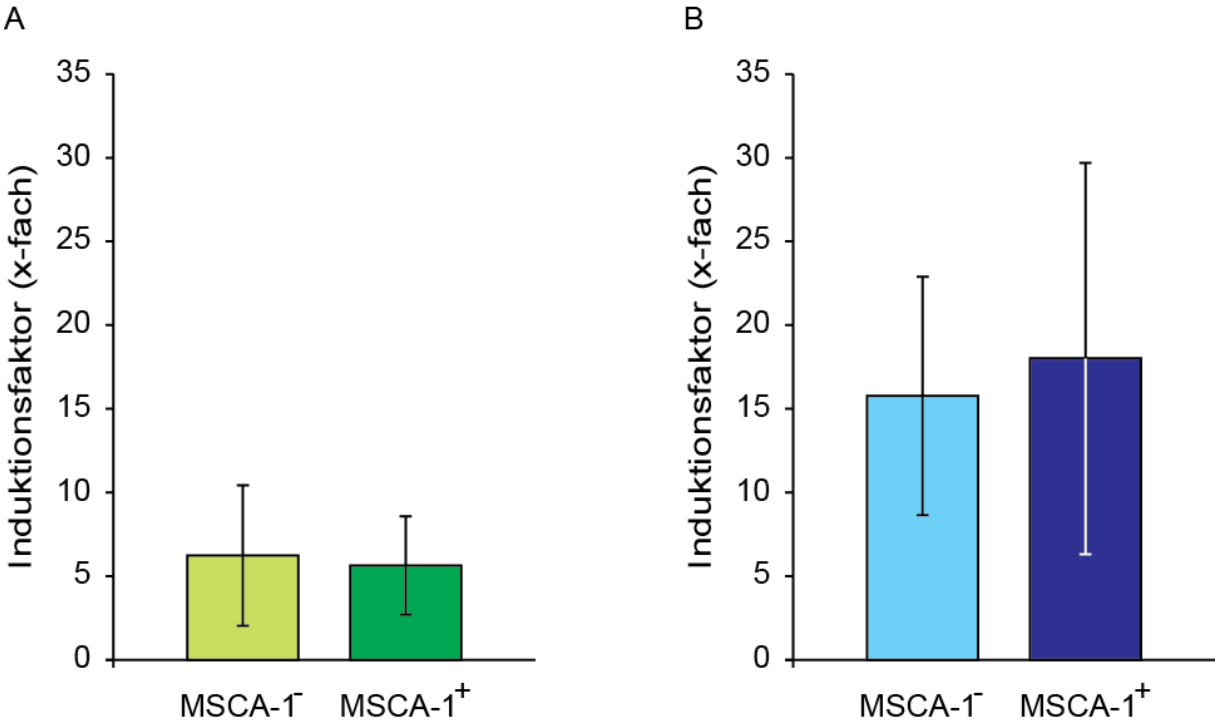


Abbildung 52: Expression von Interleukin-8 in 3D-kultivierten (Induktionsindex, x-fach: osteogen stimulierte gegen unbehandelte Zellen) MACS (A) und EasySep (B) separierten Zellfraktionen.
Die Untersuchungen wurden an Tag 15 der *in vitro* Kultivierung durchgeführt.

3.14. Untersuchungen der Proteinexpression in MACS und EasySep separierten Zellen, die innerhalb dreidimensionaler (3D) Konstrukte kultiviert wurden

Während der Kultivierung der separierten Zellen auf den dreidimensionalen Trägermatrizen wurde an Tag 10 und Tag 15 (an diesem Zeitpunkt wurde die RNA gewonnen) Überstände gesammelt, um die Expression von löslichen Rezeptoren und verwandten Proteinen zu untersuchen. Dabei wurden Überstände von osteogen induzierten Zellen einer Fraktion mit denen der dazugehörigen Kontrollzellen verglichen (für MACS separierte n = 3, für EasySep separierte n = 2) um festzustellen, ob ein Rezeptor bzw. ein Protein induziert oder reprimiert ist. Die Ergebnisse sind in Abb. 53 dargestellt.

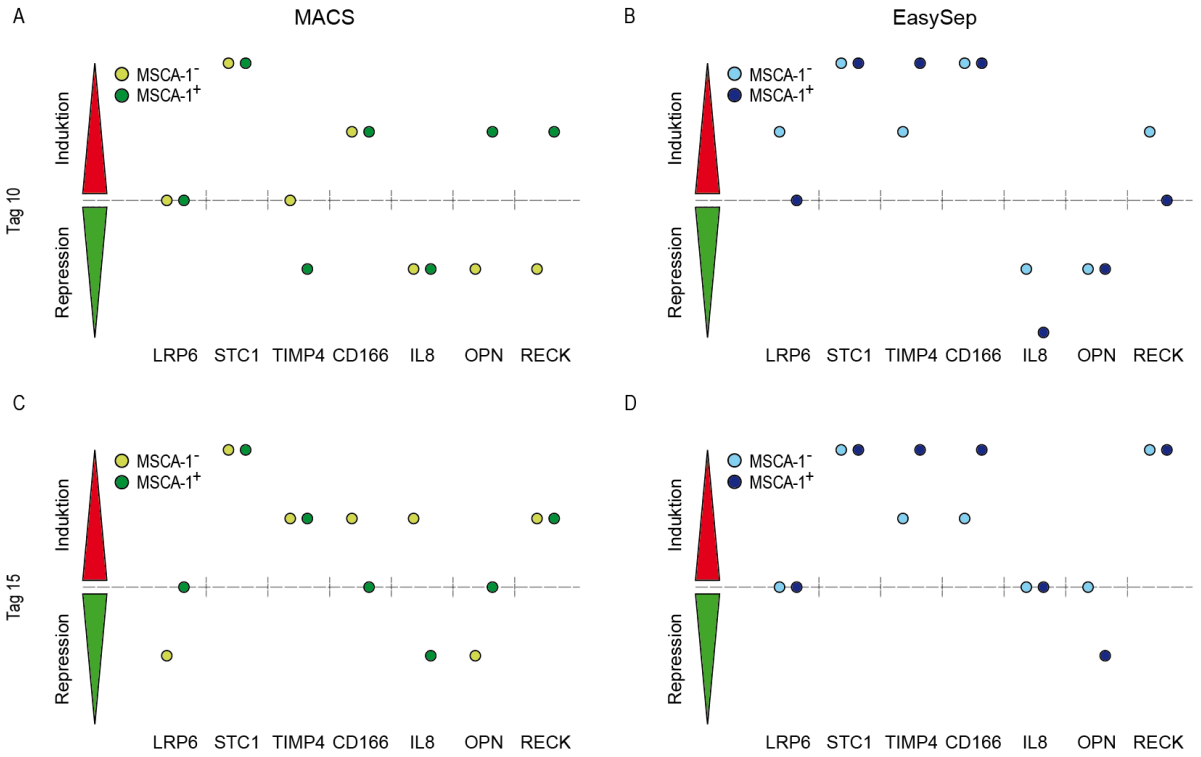


Abbildung 53: Proteinexpression in Überständen von 3D-kultivierten Zellen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse der MACS separierten Fraktionen an Tag 10 (A) und Tag 15 (C) der osteogenen Stimulation, sowie der EasySep separierten Fraktionen an Tag 10 (B) und Tag 15 (D). Induzierte Expressionslevels sind rot, reprimierte Levels grün dargestellt.

3.14.1. Proteinexpression in MACS separierten Zellfraktionen an Tag 10 der osteogenen Stimulation

Die LRP-6 (low densitiy lipoprotein receptor-related protein-6) Expression war in osteogen induzierten, 3D-kultivierten MSCA-$1^{-/+}$ Zellen an Tag 10 (Abb. 53 A) unverändert im Vergleich zu Kontrollzellen. Die Stanniocalcin-1 (STC-1) Expression hingegen zeigte sich in beiden Fraktionen stark induziert verglichen zu Kontrollzellen. TIMP-4 (tissue inhibitor of metalloproteinase-4) zeigte in Zellen der MSCA-1^{-} Fraktion keine Änderung, während in der MSCA-1^{+} Fraktion die TIMP-4 Expression reprimiert war. An Tag 10 der osteogenen Aktivierung wurde in beiden Fraktionen eine ALCAM/CD166 (activated leukocyte cell adhesion molecule) Induktion detektiert. Interleukin-8 (CXCL8/IL-8) zeigte ebenfalls in beiden Fraktionen ein reprimiertes Expressionsmuster. Osteopontin (OPN) und RECK (reversion-inducing cytein rich protein with Kazal motifs) zeigten ein ähnliches Proteinexpressionsmuster. Während

beide Proteine in stimulierten Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion jeweils reprimiert waren, zeigten sie in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion eine Induktion verglichen zu Kontrollzellen.

3.14.2. Proteinexpression in MACS separierten Zellfraktionen an Tag 15 der osteogenen Stimulation

An Tag 15 der osteogenen Stimulation zeigte sich die LRP-6 Expression in der MSCA-1$^-$ Fraktion (Abb. 53 C) unverändert zu Tag 10, während diese in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion reprimiert zu sein schien. Die STC-1 Expression wurde hingegen nach wie vor in beiden Fraktionen unverändert hoch induziert. TIMP-4 zeigte sich in beiden Fraktionen leicht induziert. CD166 war lediglich in der MSCA-1$^-$ Fraktion leicht induziert, während Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion keine Expressionsänderungen im Vergleich zu Kontrollzellen zeigten. Die MSCA-1$^-$ Fraktion zeigte eine leicht induzierte IL-8 Expression, während in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion die Expression leicht reprimiert war. Die OPN Expression schien zu diesem Zeitpunkt in der MSCA-1$^-$ Fraktion leicht reprimiert zu sein, in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion ergaben sich keine Änderung zu Kontrollzellen. In beiden Fraktionen wurden erhöhte RECK Proteinlevels im Vergleich zu Kontrollzellen detektiert.

3.14.3. Proteinexpression in EasySep separierten Zellfraktionen an Tag 10 der osteogenen Stimulation

Die Untersuchung der LRP-6 Expression an Tag 10 der osteogenen Stimulation (Abb. 53 B) zeigte nur in Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion erhöhte Levels, in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion ergaben sich keine Unterschiede zu den Kontrollzellen. Die STC-1 Expression zeigte sich in beiden Fraktionen stark induziert. Die TIMP-4 Expression war zu diesem Zeitpunkt der osteogenen Stimulation in beiden Fraktionen induziert, in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion etwas stärker als in MSCA-1$^-$ Zellen. CD166 war in beiden Fraktionen gleich stark induziert. Die IL-8 Proteinexpression schien in beiden Fraktionen inhibiert zu sein, in MSCA-1$^+$ Zellen sogar stärker als in MSCA-1$^-$ Zellen. Die OPN Expression wurde ebenfalls in beiden Fraktionen an diesem Untersuchungszeitpunkt unterdrückt. Der Proteingehalt von RECK zeigte sich in Zellen der MSCA-1$^-$ Fraktion leicht erhöht zu sein, während in Zellen der MSCA-1$^+$ Fraktion unveränderte Levels zu Kontrollzellen nachzuweisen waren.

3.14.4. Proteinexpression in EasySep separierten Zellfraktionen an Tag 15 der osteogenen Stimulation

Die LRP-6 Expression zeigte an Tag 15 nach der EasySep Separation (Abb. 53 D) in beiden Fraktionen keine Änderung zu derjenigen der Kontrollzellen. Die Proteinlevels von STC-1 waren in beiden Fraktionen stark induziert, wie bereits an Tag 10 bzw. in Fraktionen der MACS Separation. TIMP-4 und CD166 zeigten ebenfalls in osteogen stimulierten MSCA-1$^-$ Zellen eine leicht erhöhte Expression, in der MSCA-1$^+$ Fraktion wurden stark erhöhte Proteinlevel detektiert. Die IL-8 Proteinexpression zeigte sich in beiden Fraktionen unverändert zu Kontrollzellen. Die OPN Expression in MSCA-1$^-$ Zellen zeigten sich zu diesem Zeitpunkt unverändert, während diese in MSCA-1$^+$ Zellen leicht reprimiert zu sein schien. RECK war hingegen in stimulierten Zellen beider Fraktionen stark induziert.

4. Diskussion

In früheren Arbeiten aus unserem Labor konnten wir zeigen, dass die mittels MACS separierte MSCA-1$^+$ Zellfraktion eine höhere osteogene Kapazität aufweist als die entsprechende MSCA-1$^-$ Fraktion [21]. Obwohl die MACS Zellseparation einen brauchbaren Ansatz für die Isolation der MSCA-1$^+$ Zellen aus der heterogenen Periostzellpopulation darstellt, war die Zellausbeute sehr gering auch auf Grund von hohen Mortalitätsraten. Nicht nur für verschiedene Ansätze in der Grundlagenforschung, sondern auch für spätere klinische Tissue Engineering Anwendungen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie wird jedoch eine hohe Zellzahl benötigt. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit mit EasySep eine zweite Separationsmethode in Betracht gezogen, die mehr überlebende Zellen und eine höhere Anzahl MSCA-1$^+$ Zellen liefern sollte.

Um eine Abhängigkeit der Überlebensraten von einzelnen Spendern auszuschließen, wurden beide Separationen (MACS und EasySep) anfänglich mit Zellen des gleichen Spenders durchgeführt: unmittelbar vor der Separation wurden die Zellen auf die beiden Methoden aufgeteilt. Bis zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen einer identischen Kulturbehandlung unterworfen, was die Möglichkeit bot, beide Methoden mit identischem Zellmaterial zu starten. Diese frühen Versuche bestätigten eine Abhängigkeit zwischen der Separationsmethode und der Zellüberlebensrate und widerlegten die Vermutung einer Abhängigkeit zwischen Spender und Separationsmethode.

Alipoor und Kollegen [56] nutzten die MACS Methode zur Isolation von Spermatogonien-Stammzellen aus vorpubertärem Maushoden. Sie erzielten hierbei eine Zellüberlebensrate von 96,20%. Mucci et al. [57] isolierten CD14$^+$ Monozyten mit der MACS und EasySep Methode und berichteten über hohe Überlebensraten von über 90%. Kim und Mitarbeiter [58] separierten CD45$^+$ Zellen aus dem Knochenmark mithilfe eines Tropfen-basierten magnetisch aktivierten Zell Separators (DMACS) und MACS. Mittels DMACS überlebten 94,59% der Zellen, wohingegen MACS nur eine Überlebensrate von 62,69% erreichte. Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der Literatur, so zeigt nicht einmal die EasySep Separation (79,68%) so hohe Überlebensraten (Abb. 4). Auch die Zellüberlebensrate mittels DMACS ist höher, als die hier besprochenen Ergebnisse nach EasySep, wohingegen die vorliegenden MACS-Ergebnisse (58,02%; Abb. 4) denen von Kim veröffentlichten recht ähnlich sind. Es ist möglich, dass Periostzellen oder aus Knochenmark isolierte hä-

matopoietische Zellen während des Separationsvorganges mittels MACS leichter beschädigt oder abgetötet werden als Monozyten oder Spermatogonien-Stammzellen. Die niedrigeren Überlebensraten der mit MACS separierten Kieferperiostzellen rühren vermutlich daher, dass höhere Scherkräfte auftreten, während die Zellen durch die Säule und die enge Säulenöffnung gespült werden, wohingegen die Zellsuspension der EasySep Methode in einem mit Puffer gefüllten Röhrchen mit einer deutlich größeren Öffnung verbleibt. Daher wirken beim Abgießen nach EasySep weniger starke Kräfte auf die Zellen.

Pafumi et al. veröffentlichten ihre Daten zur Anreicherung von $CD34^+$ Stammzellen, die sie aus Nabelschnurblut gewonnen haben [59]. Dazu nutzten sie zwei Methoden: Stem Sep zur negativen und Mini MACS zur positiven Zellselektion, letztere Methode erreichte eine Reinheit von 99%, Stem Sep hingegen nur von 80%. Handgretinger und Kollegen [60] isolierten mit MACS $CD133^+$ Zellen aus peripherem Blut. Hierbei erreichten sie eine Reinheit von 94%.

Mithilfe der durchflusszytometrischen Analysen detektierten wir 44% MSCA-1^+ Zellen in der positiven MACS Fraktion und 19% MSCA-1^+ Zellen in der positiven EasySep Fraktion. Diese Ergebnisse sind einerseits darin begründet, dass die Kieferperiostzellen zur Verklumpung neigen, was eine genaue Auftrennung zwischen positiven und negativen Zellen erschwert. Außerdem erkennt der MSCA-1 Antikörper vermutlich ein Antigen, das möglicherweise auf allen Kieferperiostzellen, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert sein könnte, was eine eindeutige Separation ebenfalls erschweren könnte. Ein weiterer Grund der unterschiedlichen Reinheit nach MACS und EasySep Separation könnte der Waschvorgang sein. Der Säulen-Aufbau der MACS-Separation weist vermutlich eine höhere Reinheit auf, da hier der Waschpuffer durch die Säule fließt und Zellen auswäscht, die nicht magnetisch markiert sind. Der EasySep-Aufbau bietet evtl. die Möglichkeit, dass sich unmarkierte Zellen leicht zwischen magnetisch markierten Zellen verfangen. Die vom Hersteller empfohlenen drei Waschvorgänge sind vermutlich nicht ausreichend, um alle unmarkierten eingefangenen Zellen auszuwaschen. Andererseits zeigten sich 28% der Zellen in der MSCA-1^- Fraktion von EasySep (im Vergleich zu 11% der MSCA-1^- Fraktion von MACS) für das MSCA-1 Antigen positiv (Abb. 6 C + D). Die deutlich geringere Aufreinigungseffizienz von EasySep kann auch auf Grund eines geringeren magnetischen Feldes im Inneren des Röhrchens zustande kommen, oder durch schwächere magnetische Beads für die Zellmarkierung. Auch ist der Durchmesser des Röhrchens

um ein Vielfaches größer, als der Durchmesser der MACS-Säule, die sich im Magnetfeld befindet, so dass bei EasySep ein Zusammenspiel von Röhrchendurchmesser und schwächerem Magnetfeld stärkere Auswirkungen auf die Aufreinigung hätte, als dies bei MACS der Fall ist. Ein weiterer Grund für die Reinheitsunterschiede könnte in der Art der genutzten Antikörper liegen. Die für die MACS Separation erhältlichen MSCA-1 Antikörper sind bereits magnetisch markiert, so dass ein sehr stabiles Produkt vorliegt. Für EasySep müssen zunächst unmarkierte MSCA-1 Antikörper mit den verschiedenen Komponenten des „do it yourself" Kits zur Herstellung des Selektionscocktails (siehe Abschnitt 2.2.2.2. „Herstellung des Selektionscocktails" im Material/Methoden Teil) gebunden werden. Dies könnte dazu führen, dass das Produkt, welches für die EasySep Zellmarkierung benutzt wird, nicht optimiert und somit nicht ganz so gut wie der MACS Separationskit geeignet ist. Dieser Cocktail muss anschließend in der Zellsuspension an das MSCA-1 Antigen binden, bevor die nachfolgend zugegebenen magnetischen Partikel an die Antikörper des Cocktails binden.

Alizarin-Rot ist als Nachweismethode zur Analyse der osteogenen Mineralisation veröffentlicht [61]. Ebenso ist die Quantifizierung der Mineralisation durch die Wiedergewinnung der Alizarin-Rot Färbung beschrieben [62]. Kitamura et al. [63] untersuchten die osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark. Diese wurden auf Aluminium-Keramik-Scheiben kultiviert. Die Ergebnisse wurden mit Zellen verglichen, die in normalen 6-Well Polystyren Zellkulturplatten wuchsen. Die Osteogenese induzierten sie mit Kulturmedium, das Ascorbinsäure, β-Glycerophosphat, Magnesiumsalz N-Hydrat und Dexamethason enthielt. Für beide Trägermaterialien konnte eine Zunahme der Kalziumphosphat-Präzipitate mittels Alizarin-Rot Färbung in der osteogen stimulierten Fraktion festgestellt werden. In einer Studie, die den Einfluss des p53 Tumorsuppressorgens auf die Osteogenese in mesenchymalen Stammzellen von Mäusen untersucht, verglichen Tatari et al. [64] Wildtyp (WT) Zellen mit Zellen von Mäusen, denen das p53 Gen fehlt. Um die Mineralisation der extrazellulären Matrix zu analysieren führten sie Alizarin-Rot Färbungen mit anschließender Quantifizierung durch. Keine der unstimulierten Kontrollfraktionen zeigte Präzipitate, wohingegen die $p53^{-/-}$ Zellen bereits nach 14 Tagen Präzipitate zeigten. Nach 21 Tagen osteogener Stimulation entwickelten die WT Zellen eine 4-fach höhere Menge an Präzipitaten, als die entsprechenden

Kontrollen. Die $p53^{-/-}$ Mutanten zeigten eine höhere Menge an Präzipitaten als die entsprechenden WT Zellen nach 21 Tagen.

In den Daten der vorliegenden Arbeit wurde nach der Quantifizierung der Präzipitate in den Separationspassagen eine 5-fach höhere Kapazität in den MSCA-1^+ Zellen nach der MACS Separation im Vergleich zu den MSCA-1^- Zellen detektiert. Der Unterschied im Mineralisierungspotential der MSCA-1^- und MSCA-1^+ Fraktion war signifikant (Abb. 7 A). Nach der Separation mit EasySep zeigten die MSCA-1^+ Zellen im Vergleich zu der zugehörigen MSCA-1^- Fraktion keinen Unterschied in Bezug auf die Menge der Präzipitate (Abb. 7 B). Der durchflusszytometrische Nachweis bezüglich Zellreinheit (Abb. 6) untermauert die Ergebnisse der Mineralisationskapazität in der Separationspassage. So war der Anteil an MSCA-1^+ Zellen in der MSCA-1^+ Fraktion in der Passage der MACS-Separation 4-fach höher, als in der MSCA-1^- Fraktion. Nach der EasySep Separation zeigten die durchflusszytometrischen Analysen, dass der Anteil der MSCA-1^+ Zellen in der MSCA-1^+ Fraktion sogar 0,7-fach geringer war, als in der MSCA-1^- Fraktion, was sich in einen fehlenden Unterschied der Mineralisationskapazität ausdrückte.

Lai und Kollegen [65] kultivierten kommerziell erhältliche humane mesenchymale Knochenmarkszellen auf Plastik zur Konfluenz und stellten aus diesen zellfreie extrazelluläre Matrix her (EZM). Anschließend kultivierten sie humane Knochenmarkszellen entweder auf Plastik oder auf der hergestellten EZM über mehrere Passagen. In jeder Passage (3 – 7) wurden Zellen mit einem Transplantationsvehikel aus Hydroxyapatit/Trikalziumphosphat Keramikpulver oder Gelfoam (Pfizer) gemischt und 10 Wochen alten immunodefizienten Mäusen subkutan transplantiert. Nach 8 Wochen ernteten sie die Transplantate und bestimmten die Knochenbildung histomorphometrisch. Die Menge an gebildetem Knochen vor Passage 4 war für beide Kultivierungsmethoden sehr ähnlich. Ab Passage 5 nahm die Fähigkeit Knochen zu bilden der auf Plastik gezüchteten MSCs stark ab. Während beide Methoden in Passage 4 noch 20% Knochen in der untersuchten Fläche vorwiesen, waren es in Passage 7 noch 15% für die auf EZM kultivierten Zellen und lediglich 2% für die Zellen, die auf Plastik wuchsen. Soncini et al. [66] isolierten mesenchymale Zellen aus dem Amnion (AMCs) und dem Chorion (CMCs). Mittels FACS-Analyse zeigten sie, dass AMCs und CMCs die gleichen Oberflächenmarker exprimieren wie MSCs aus dem Knochenmark. Sie differenzierten die Zellen erfolgreich in chondrogene, adipogene und osteogene Richtungen. Zudem isolierten sie CD271$^+$ AMCs und CMCs mittels

MACS, die eine signifikant höhere Anzahl an Kolonien im CFU-F (colony formning unit – fibroblast) Assay gegenüber CD271$^-$ Zellen zeigten. Sie beobachteten eine Abnahme des Differenzierungspotenzials ausgehend von frisch isolierten AMCs und CMCs. AMCs zeigten noch in Passage 8 die Bildung von Kalziumphosphat-Präzipitaten.

In den weiterführenden Passagen der *in vitro* Passagierung (8, 9, 11, 13) der vorliegenden Arbeit zeigten die MSCA-1$^-$ Zellen unabhängig der Separationsmethode eine höhere Mineralisationskapazität, als die MSCA-1$^+$ Zellen (Abb. 8 – 11). Auch nahm, mit einer Ausnahme (MACS, Passage 9), die Mineralisationskapazität kontinuierlich weiter ab. Die Zellen der MACS-Methode zeigten während allen Passagen, ausgenommen Passage 9, ein höheres osteogenes Potenzial, als die Zellen, die mit EasySep separiert wurden. In den hier beschriebenen Versuchen nahm die Mineralisationskapazität von der Passage der Separation in der MSCA-1$^+$ Fraktion von MACS bis zu Passage 13 um 80% ab, während in der MSCA-1$^-$ Fraktion sogar ein Anstieg um 33% zu beobachten war. Die Abnahme des osteogenen Potenzials von EasySep lag in der MSCA-1$^+$ Fraktion bei 95%, in der MSCA-1$^-$ Fraktion bei 96%. Diese Daten zeigen eine ähnliche Abnahme des osteogenen Potenzials wie in den oben beschriebenen Studien von Lai und Kollegen sowie von Soncini und Kollegen. Die Ergebnisse der durch MACS isolierten Fraktionen der Passage 9 sind vermutlich auf die normalen Schwankungen zwischen Patientenzellen zurückzuführen.

Dmitrieva und Kollegen [67] verglichen mesenchymale Stammzellen, die sie aus dem Knochenmark isoliert hatten, mit solchen, die sie aus subkutanem Fettgewebe gewannen bezüglich der Zellverdopplungsraten. Hierbei ermittelten sie eine Verdoppelungszeit von 3,4 Tagen (81,6 Stunden) für die MSCs aus dem Knochenmark und von 3 Tagen (72 Stunden) für die Zellen aus dem Fettgewebe für die Passagen 2 bis 4. Zhang und Kollegen [68] verglichen die osteogene Kapazität von fötalen sowie perinatalen (die sie aus der Nabelschnur isolierten) mit adulten mesenchymalen Stammzellen für Knochen Tissue Engnieering. Hierbei ermittelten sie eine Verdoppelungszeit in der 2D-Kultur von 32,3 Stunden für die fötalen MSCs, 54,7 Stunden für die MSCs aus der Nabelschnur und 116,6 Stunden für die adulten MSCs aus dem Knochenmark. Diese Experimente führten die Autoren in Passage 4 durch. Die Unterschiede zwischen den Verdopplungszeiten, die in verschiedenen Studien veröffentlich wurden, kommen sicherlich durch abweichende Kulturbedingungen bzw. Rechnungsmethoden zustande, sodass diese nicht direkt vergleichbar sind, auch

wenn sie als Untersuchungsgrundlage dieselben Zellen auswählen. Außerdem sollte bedacht werden, dass Zellen von unterschiedlichen Patienten stark abweichende Proliferationsraten aufweisen können. In den hier diskutierten Versuchen konnte nach der MACS Separation Verdoppelungszeiten von 6,42 Tage (bzw. 154,08 Stunden) für die MSCA-1$^-$ Fraktion, sowie von 11,71 Tage (bzw. 281,04 Stunden, MSCA-1$^+$) ermittelt werden (Abb. 12 A). Die Verdoppelungszeiten nach der EasySep Methode (Abb. 12 B) beliefen sich auf 6,24 Tage (149,76 Stunden; MSCA-1$^-$) und 11,82 Tage (283,68 Stunden, MSCA-1$^+$). Die ermittelten Verdoppelungszeiten der beiden MSCA-1$^-$ Fraktionen liegen etwas höher als diejenigen, die Zhang und Ko-Autoren für die adulten MSCs aus dem Knochenmark publizierten. Allerdings sind sowohl diese Werte als auch die hier vorliegenden Werte fast doppelt so hoch, wie die Daten, die Dmitrieva für die MSCs aus dem Knochenmark ermittelte. Allerdings liegt bei beiden zitierten Veröffentlichungen keine vorangegangene magnetische Separation vor und die Untersuchungen der Verdopplungszeiten erfolgten in einer niedrigeren Passage. Die zusätzlichen Passagen bis zur Separation mit MACS und EasySep beeinflussen mit Sicherheit die Verdoppelungszeit, sowie die Vitalität der Zellen, so dass sich die Stressfaktoren durch eine magnetische Separation, wie Scherkräfte und der Einfluss des Magnetfeldes, eine stärkere Auswirkung auf die MSCA-1$^+$ Zellen haben, wie es möglicherweise in Passage 2 der Fall wäre. Die Daten von Zhang, die auf Passage 4 beruhen, liegen sehr nahe an den ermittelten Werten der MSCA-1$^-$ Fraktionen, was einen Effekt durch das zunehmende Alter der Zellkultur untermauert. Die in der vorliegenden Arbeit diskutierten Separationen fanden frühestens zu Beginn von Passage 5 statt.

Neben der Passage scheint die Zelldichte beim Aussäen der Zellen einen gewissen Einfluss auf die Verdoppelungszeit zu haben, wie Neuhuber et al. [69] nachweisen konnten. Sie kultivierten Stromazellen aus dem Knochenmark bei einer Dichte von 20, 200 und 2.000 Zellen pro cm^2. Hierbei stellten sie fest, dass die Zelldichte keinen nennenswerten Einfluss auf die Zellcharakteristika hatte, wohl aber auf die Zellverdopplungszeit. Die kürzeste Verdoppelungszeit erreichte die mittlere Zelldichte mit 26,7 Stunden (ermittelt aus den Passagen 2 – 10). Bei einer Dichte von 20 Zellen pro cm^2 wurde eine Verdoppelungszeit von 35,3 Stunden (ermittelt aus den Passagen 2 – 5), bei 2.000 Zellen pro cm^2 von 40,7 Stunden (ermittelt aus den Passagen 2 – 10) ermittelt. Die Zellen wurden bei Erreichen von 50% Konfluenz (Durchschnittswerte der einzelnen Dichten bis zum Erreichen von 50% Konfluenz: 20 Zellen pro cm^2:

10,8 Tage; 200 Zellen pro cm^2: 5,5 Tage; 2.000 Zellen pro cm^2: 3,1 Tage) weiter passagiert. Kultiviert wurden die Zellen in 6-Well Platten. Die in der vorliegenden Arbeit ausgewählte Zelldichte von 35.000 Zellen pro Well (6-Well Platte mit einer Fläche von 9,6 cm^2) entspricht umgerechnet einer Zelldichte von 3.645,8 Zellen pro cm^2 und liegt damit deutlich über der höchsten Zelldichte, die Neubauer und Kollegen für ihre Untersuchungen nutzten. Der Einfluss der ausgesäten Zellzahl auf die Zellverdopplungsrate wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es bleibt daher offen, ob die Verdoppelungszeiten der Separationsfraktionen bei geringerer Zelldichte niedriger ausfallen würden. Da die MSCA-1^- Fraktionen den Einflüssen des Magnetfeldes, sowie den Scherkräften deutlich kürzer ausgesetzt waren und somit eher einer unbehandelten Zellfraktion entsprechen, wurden in erster Linie diese mit den in der Literatur gefundenen Ergebnissen verglichen. Die in den MSCA-1^+ Fraktionen erhöhten Verdoppelungszeiten für die Separationspassage lassen sich mit dem verhältnismäßig höheren Stress bedingt durch das Magnetfeld erklären.

Miranda et al. [70] untersuchten mesenchymale Knochenmarkszellen aus Ratten in 2D- und 3D-Kulturen indem sie die mitochondriale Aktivität mit einem Mikrokultur Tetrazolium (MTT) Assay ermittelten. Ihre Ergebnisse zeigten eine geringere MTT Reduktion der osteogen stimulierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen an jedem gemessenen Zeitpunkt.

Der zur Gewinnung der hier vorliegenden Daten benutzte Proliferationstest arbeitet auf der Basis eines MTT Tests. Der Vergleich der mitochondrialen Aktivität von MACS und EasySep separierten Fraktionen in den Passagen direkt nach der Separation (Abb. 13) verdeutlicht lediglich für die MACS Separationsmethode einen signifikanten Unterschied der mitochondrialen Aktivität zwischen osteogen induzierten Zellen im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollen. Sowohl die MSCA-1^-, als auch die MSCA-1^+ Fraktion zeigten diesen signifikanten Unterschied. Im Gegensatz dazu zeigten die osteogen induzierten Zellen der EasySep Separation für beide Fraktionen einen nahezu identischen Verlauf der mitochondrialen Aktivität wie die entsprechenden unbehandelten Kontrollen. Daraus lässt sich schließen, dass durch die MACS Separation das Differenzierungspotenzial der Zellen zwar verzögert (da die Mineralisation zu einem späteren Zeitpunkt eintritt als bei unseparierten Zellen – unpublizierte Daten) aber beibehalten wird. Im Gegensatz dazu, scheinen EasySep separierte Zellen diese Eigenschaft nicht zu behalten. Bezüglich der Einschränkung der mitochondrialen Aktivität in osteogen stimulierten Zellen wären Unterschiede zwischen

den MSCA-1$^-$ und MSCA-1$^+$ Zellfraktionen zu erwarten gewesen, auf Grund der Tatsache, dass die MSCA-1$^+$ Zellfraktion die stärkere osteogene Kapazität aufweist. Da aber keine Unterschiede nachweisbar waren, ist anzunehmen, dass beide Fraktionen osteogene Vorläufer enthalten. Diese Annahme wird durch die Alizarin-Rot Färbung bestätigt, die für die MSCA-1- Zellfraktion eine schwächere, für EasySep separierte Zellen sogar identische, aber keine negative Färbung zeigte (Abb. 6).

Vacanti und Kollegen [71] untersuchten die phänotypischen Änderungen von adulten mesenchymalen Stammzellen von Schweinen, die über mehrere Passagen kultiviert wurden. Sie unterteilten die Zellen in frühe Passagen (weniger als 5-mal passagiert) und späte Passagen (öfter als 15-mal passagiert). Um die Proliferationsfähigkeit der Passagen zu vergleichen, führten sie einen MTT basierten Test an jedem der ersten vier Tage nach der Aussaat durch. Beide Gruppen zeigten eine ähnliche Wachstumskinetik, allerdings zeigten die Zellen der späten Passagen eine niedrigere mitochondriale Aktivität als die der frühen Passagen.

In den Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit konnte unabhängig von der Separationsmethode und in beiden Fraktionen ebenfalls ab Passage 8 hin zu Passage 13 eine Abnahme der mitochondrialen Aktivität beobachtet werden (Abb. 14 – 17). Allerdings war von der Passage der Separation ausgehend zunächst eine Zunahme der mitochondrialen Aktivität der MACS Fraktionen zu beobachten, die vermutlich durch die Erholung vom Separationsstress herrührte. Die beiden MACS Fraktionen zeigten in Passage 8 (Abb. 13) bereits an Tag 10 signifikante Unterschiede der mitochondrialen Aktivität zwischen unbehandelten und osteogen stimulierten Zellen, ebenso waren die Unterschiede an Tag 20 signifikant, während die Fraktionen von EasySep auch hier nur sehr geringe Unterschiede der mitochondrialen Aktivität zeigten.

Neben den Untersuchungen der osteogenen Kapazität bezüglich der Kalziumphosphat-Präzipitatbildung, des Proliferationspotentials bzw. der Verdopplungsraten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Aktivität der alkalischen Phosphatase als wichtiger osteogener Faktor untersucht. Zahlreiche veröffentlichte Studien belegen die Bedeutung der alkalischen Phosphatase während der Osteogenese verschiedener Stammzellen [72 – 75]. Die osteogen stimulierten Zellen nach der MACS und EasySep Separation zeigten eine Zunahme der alkalischen Phosphatase Aktivität im Laufe der Osteogenese (Abb. 18). An Tag 30 allerdings zeigten z.T. die unbehandelten Zellen eine etwas intensivere Färbung als die OB stimulierten Zellen beider Fraktionen un-

abhängig von der Separationsmethode. Eine genaue Aussage diesbezüglich ist jedoch nicht möglich, da in der vorliegenden Arbeit keine Quantifizierung der alkalischen Phosphatase durchgeführt wurde. Allerdings ist auch denkbar, dass die separierten Fraktionen an Tag 30, an dem die Färbung durchgeführt wurde und somit an den anderen Zeitpunkten auch, unterschiedliche Ausschnitte des Mineralisationsprozesses darstellen, da die MSCA-1$^+$ Zellen durch die durchgeführte Separation in ihrer Proliferation verlangsamt sind.

Neben dem AP Nachweis auf Proteinebene wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch Untersuchungen auf Genebene durchgeführt. AP wird im Allgemeinen als ein früher Marker der Osteoblastendifferenzierung in der Literatur beschrieben. Park und Kollegen [76] untersuchten die Expression von AP in kultivierten Zellen aus menschlicher Kieferknochenhaut während der osteogenen Stimulation über 6 Wochen. Sie detektierten maximale Levels der relativen AP Expression bereits in der zweiten Woche der Osteogenese und hiervon ausgehend beobachteten sie eine abnehmende Expression über die folgenden Wochen. Xue und Kollegen untersuchten den Einfluss von endothelialen Zellen auf das osteogene Potenzial von Knochenmark-MSCs in Bezug auf die Expression von AP und Runx-2 [77]. Sie kultivierten humane MSCs im Verhältnis 5:1 mit humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene und detektierten eine höhere AP Expression in der Ko-Kultur als in den osteogen stimulierten MSCs. Pereira und Kollegen untersuchten humane MSCs, Stromazellen des Knochenmarks und Osteoblasten im Vergleich zu den entsprechenden Mäusezelltypen in 2D- und 3D-Kultur (Polylaktid-Glykolsäure beschichtete Gewebkulturplatten bzw. Polylaktid-Glykolsäure-Scaffolds) in Bezug auf die AP Expression an Tag 1, 4 und 7 der Osteogenese. Ihre Ergebnisse zeigten eine Zunahme der AP Expression um 220% in der 3D-Kultur mit den humanen Zellen aber eine Abnahme der AP Expression in den murinen Zellen [78].

In den hier diskutierten Versuchen zeigten die osteogen stimulierten MSCA-1$^+$ Fraktionen beider Methoden in der Separationspassage einen höheren AP Induktionsindex als die unstimulierten Kontrollzellen an Tag 10, an den beiden übrigen Zeitpunkten lag die Induktion unter der der zugehörigen MSCA-1$^-$ Fraktion (Abb. 21). Während in der MSCA-1$^+$ Fraktion von MACS eine ständige Abnahme des Induktionsindexes zu verzeichnen war, nahm dieser in der MSCA-1$^+$ Fraktion von EasySep zunächst zu und verblieb auf diesem Level. Betrachtet man die AP Expression im Laufe der in vitro Passagierung (Abb. 29), so weist die positive MACS Fraktion tendenziell

höhere AP-Levels auf als die negative, jedoch mit hohen Abweichungen. Eine Zunahme der relativen AP Expression in den Kontrollzellen führt bei angenommener durch osteogene Stimulation gleichbleibender AP Expression in den osteogen stimulierten Zellen zu einer Abnahme der Induktionsindices. An Tag 15 der 3D-Kultur konnte eine fast doppelt so hohe AP Induktion in osteogen stimulierten verglichen mit unstimulierten Zellen der MSCA-1^+ Fraktion im Vergleich zur MSCA-1^- Fraktion beobachtet werden. (Abb. 45). Auf Grund der hohen Abweichungen innerhalb der Messungen, lässt sich für die AP-Expression lediglich die Tendenz als früher osteogener Marker erkennen, um diese Tendenz zu bestätigen, müssten weitere Versuche erfolgen, um eine höhere n-Zahl und damit verlässlichere Ergebnisse zu erhalten.

Bereits 1995 beschrieben Dimri und Kollegen die Expression von β-Galaktosidase in seneszenten Zellen. In präseneszenten oder in ruhenden Fibroblasten und Keratinozyten sowie immortalisierten Zellen konnten sie keine ß-Galaktosidase Anfärbung detektieren, während sie eine Zunahme der ß-Galaktosidase Expression in Abhängigkeit vom Alter des Gewebespenders bei untersuchten Hautzellen fanden. Zahlreiche Publikationen berichten über die ß-Galaktosidase Expression in mesenchymalen Vorläuferzellen aus verschiedenen Quellen [71; 79 – 80]. Diese Arbeiten belegen die Zunahme der β-Galaktosidase Expression mit zunehmender Anzahl an Zellverdoppelungen bzw. im Laufe der *in vitro* Passagierung von Zellen und den Zusammenhang zwischen den molekularen Folgen des Alterns *in vivo* und der Seneszenz *in vitro*.

In der vorliegenden Studie zeigten die Zellen unabhängig von der Separationsmethode direkt nach der Separation in beiden Fraktionen eine stärkere Seneszenz als in den darauffolgenden Passagen. Dies liegt mit Sicherheit an der Beanspruchung der Zellen durch die Einwirkung des Magnetfeldes. Lässt man die Separationspassage außer Betracht, so fällt für die darauffolgenden Passagen eine Zunahme der Zellseneszenz mit zunehmender *in vitro* Passagierung ins Auge (Abb. 19). Ein deutlicher Unterschied bezüglich der ß-Galaktosidase Expression zwischen Kontrollzellen und osteogen stimulierten Zellen konnte jedoch nicht detektiert werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine der Behandlungsmethoden Seneszenz begünstigt.

Bei den meisten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, wird die Hypothese aufgestellt, dass auf Grund der geringeren Zellvitalität der Mineralisierungsprozess der MACS separierten Fraktionen verzögert ist und aus diesem Grund ist der Vergleich

beider Methoden etwas limitiert. Zudem erschwert die unvollständige Separation der EasySep-Methode mit einem größeren Anteil an MSCA-1^+ Zellen in der negativen Fraktion einen Vergleich der Fraktionen beider Methoden. Deshalb liegt der Fokus in der Diskussion der Gen- und Proteinexpression vornehmlich auf den Fraktionen der MACS-Methode.

In der Knochenbildung spielt der Wnt-Signalweg eine bedeutende Rolle [81]. Im menschlichen Genom und ebenso im Genom der Maus sind 19 Wnt-Gene bekannt. Bei den Wnt-Proteinen handelt es sich um eine Familie von cysteinreichen Glykoproteinen, denen wichtige Funktionen während der Embryogenese und bei der Zellproliferation und –differenzierung zukommen [82]. Der Wnt- Signalweg ist in der Entwicklung von Vertebraten u.a. für die Ausbildung der Kopf-Schwanz-Achse sowie für die Polarität der Extremitäten verantwortlich. Die Wnt-Liganden binden an Transmembran-Rezeptoren, die intrazelluläre Signalwege aktivieren. Die Signalübertragung erfolgt über den kanonischen und/oder den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg. Während die Signalübertragung im kanonischen Wnt-Signalweg über β-Katenin erfolgt, spielt dieses im nicht-kanonischen Signalweg keine Rolle. Der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg (siehe Abb. 54) reguliert die Differenzierung von mesenchymalen Vorläufern über Osteochondro-Vorläufer zu Knochenvorläufern [83 – 84]. Im kanonischen Wnt-Signalweg bindet der Wnt-Ligand an den Proteinkomplex, bestehend aus LRP 5 und 6 und gleichzeitig an das intramembranöse Protein Frizzled (Fzd). Nach dieser Aktivierung bzw. Strukturveränderung, kann Disheveld (Dsh) an Fzd binden, an Dsh wiederum bindet ein Komplex mit Glykogen Synthase Kinase 3β (GSK3β), Axin und Adenomatous Polyposis Colin (APC), der im ungebundenen Zustand den Abbau von β-Katenin beschleunigt. Wenn sich β-Katenin im Zytoplasma anreichert, erfolgt die Translokation in den Zellkern, wo es mit dem Transkriptionskomplex T-Zell Faktor/Lymphoid Enhancer Faktor (TCF/LEF) interagiert, was schlussendlich zur Aktivierung der Gentranskription führt (Abb. 54). Bindet Dsh nicht an Fzd, dann lagert sich der Komplex GSK3/Axin/APC an β-Katenin wodurch dieses phosphoryliert und abgebaut wird [nach 81 – 82]. Im nicht-kanonischen Wnt-Signalweg wird die Gentranskription ohne β-Katenin über ein Phosphokinasepathway erreicht [85]. Während der Knochenbildung spielt β-Katenin eine Rolle in der frühen Osteoblastenproliferation und Differenzierung, sowie bei der Unterdrückung von Osteoklasten [86]. So wird β-Katenin benötigt, um Osteoblastenvorläufer zu Osterix-exprimierenden Präosteoblasten zu differenzieren [87]. Die Ansammlung von

β-Katenin begünstigt die Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen zu osteochondrogenen Vorläufern. Bleibt das β-Katenin Signal nach der osteochondrogenen Vorläuferdifferenzierung aus, so entwickeln sich die Zellen zu Chondrozyten. Die komplette Abwesenheit von β-Katenin fördert die adipogene Entwicklung der mesenchymalen Stammzellen [88].

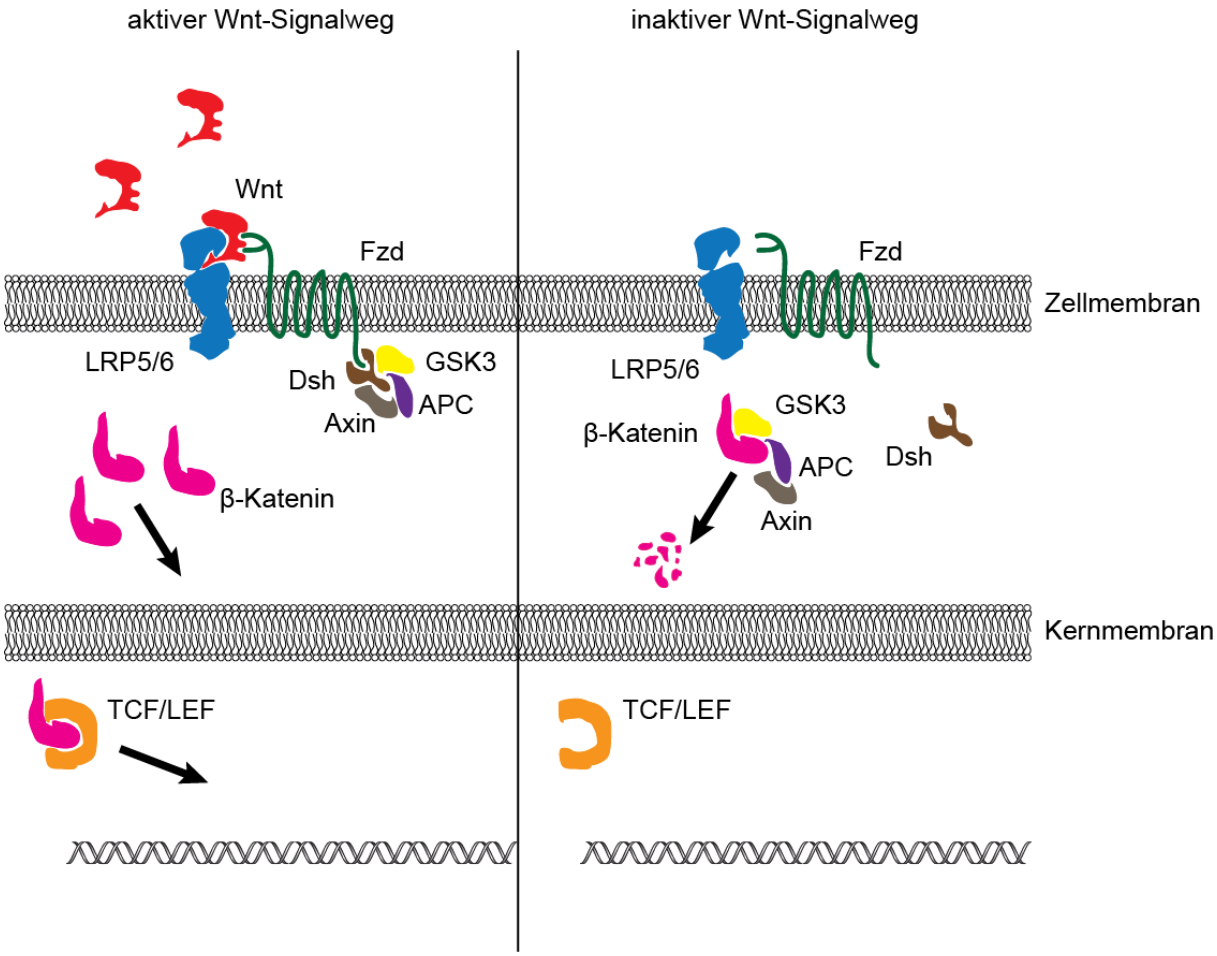


Abbildung 54: Aktiver und inaktiver Wnt-Signaltransduktionsweg und seine regulatorische Wirkung auf die Genexpression (nach 81 – 82; Beschreibung siehe Text)

Osterix (Osx) ist ein Zink-Finger enthaltendes Protein, das spezifisch in Osteoblasten als Transkriptionsfaktor fungiert. Osx ist erforderlich für die Differenzierung von Präin funktionsfähige Osteoblasten. Die Transfektion von embryonalen Stammzellen mit Osterix führte zur Entwicklung von osteoblastenartigen Zellen [89]. In Mäusen wird ohne Osx kein kortikaler Knochen gebildet. Multipotente mesenchymale Zellen differenzieren durch die Funktion von Runx-2/Cbfa1 zu Präosteoblasten und durch Osx zu funktionellen Osteoblasten, hierbei wirkt Osx downstream von Runx-2/Cbfa1. Die-

se Differenzierungsschritte werden durch den Wnt-Signaltransduktionsweg reguliert. Die Präosteoblasten sind noch bipotent und können osteogen oder chondrogen differenzieren [87; 90]. Osx wirkt nicht nur stimulierend auf die Differenzierung von Präosteoblasten zu reifen Osteoblasten, sondern inhibiert gleichzeitig die Differenzierung von Präosteoblasten zu Chondrozyten [91]. Eine vergleichende Studie bezüglich des osteogenen Differenzierungspotenzials von mesenchymalen Stammzellen aus verschiedenen Quellen erstellten Guillot und Kollegen [92]. Dafür untersuchten sie MSCs aus dem fötalen Blut, aus dem fötalen Knochenmark sowie aus der fötalen Leber und verglichen diese mit adulten MSCs aus dem Knochenmark. Mittels quantitativer PCR untersuchten sie 16 verschiedene Osteogenese-relevanter Gene an vier Zeitpunkten (3, 7, 14 und 21 Tage). Für Osx konnte eine ständige Zunahme der Expression über die gesamten 21 Tage in allen vier Gruppen verzeichnet werden. Aus den gewonnenen Ergebnissen schlossen Guillot et al., dass MSCs aus dem fötalen Blut und Knochenmark ein höheres osteogenes Differenzierungspotenzial besitzen, als diejenigen aus der fötalen Leber und aus dem adulten Knochenmark.

Die Expressionsanalysen der vorliegenden Arbeit im Laufe der osteogenen Stimulation der Separationspassage (Tag 5, 10 und 30) zeigten höhere Induktionsindices von Osx in den MSCA-1$^+$ Zellen im Vergleich zu den MSCA-1$^-$ Zellen der MACS Methode (Abb. 20 A). Betrachtet man die basale Expression von Osx in den osteogen stimulierten Zellfraktionen (Daten nicht gezeigt), so ist in den MACS Fraktionen zunächst eine leichte Abnahme bis Tag 10 zu beobachten, ab Tag 10 nimmt die Expression zu. Nimmt man wiederum an, dass die MACS-Zellen auf Grund des Separationsstresses etwas verzögert reagieren, so kann dies die anfängliche Abnahme der Expression erklären. Im Vergleich zur Basalexpression ist die Expression von Osx in den MSCA-1$^+$ Zellen stark erhöht, allerdings lässt sich eine ständige Zunahme [92] auf Grund der Abweichungen nicht ablesen. Bei der Analyse im Laufe der *in vitro* Passagierung (in jeder Passage wurden die Induktionsindices an Tag 10 betrachtet) zeigten die Induktionsindices der MACS-Methode für Osx der MSCA-1$^+$ Fraktion, mit Ausnahme einer Passage, höhere Werte als die entsprechende MSCA-1$^-$ Fraktion (Abb. 28 A). Diese Ergebnisse der MACS Fraktionen zeigen, dass in der MSCA-1$^+$ Fraktion in den osteogen stimulierten Zellen deutlich mehr Osx exprimiert wird, als in den Kontrollzellen, dieses Verhältnis fällt in der MSCA-1$^-$ Fraktion deutlich geringer aus. Nach der Analyse der 3D-kultivierten Zellen, konnte an Tag 15 nach der MACS Separation nur in der MSCA-1$^-$ Fraktion Osx nachgewiesen werden. Die Schlussfol-

gerung, die aus diesen Untersuchungen gezogen wird, ist jedoch sowohl durch die geringe Probenzahl als auch dadurch, dass es sich nur um eine Momentaufnahme (Tag 15) und nicht um einen Verlauf handelt, stark limitiert.

Ein weiterer Faktor, der während der Osteogenese eine wichtige Rolle spielt ist, wie bereits oben erwähnt, Runx-2/Cbfa-1. Gaur und Kollegen [93] konnten in Mäusen zeigen, dass Runx-2/Cbfa1 durch den kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg aktiviert wird. Wird der Wnt-Signalweg und somit auch die Runx-2 Expression inhibiert, so differenzieren die Zellen zu Chondrozyten. BMP-2 interagiert über die Expression von Dlx5 mit der Runx-2 Expression und stabilisiert dessen Expression [94]. Komori und Kollegen untersuchten die Regulation der Skelettentwicklung durch die Familie der Runx Transkriptionsfaktoren [91]. Hierbei stellten sie fest, dass Runx-2 essentiell für die Knochenentwicklung ist und die adipogene Differenzierung unterbinden kann. Runx-2 stellt ein Aktivator der Promotoren von Genen dar, die im Zusammenhang mit der Ausbildung der Knochenmatrix stehen. Pereira und Kollegen [78] detektierten neben der AP Expression auch eine erhöhte Runx-2 Expression nach 3D-Kultur gegenüber der 2D-Kultur bei humanen Stammzellen. Die murinen Zellen hingegen zeigten eine höhere Runx-2 Expression in der 2D-Kultur.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten die mit MACS separierten Fraktionen eine ähnliche Tendenz der Runx-2 Expression, es wurden etwa 3-fach höhere Induktionslevels in osteogen stimulierten Zellen detektiert, abgesehen von der Ausnahme der MSCA-1$^-$ Zellen, die an Tag 30 eine 5-fache Induktion zeigten, allerdings auch mit hoher Standardabweichung (Abb. 22 A). Beide MACS-Fraktionen zeigten eine nahezu identische Basalexpression. Im Laufe der *in vitro* Passagierung nahm die Runx-2 Induktion in MSCA-1$^+$ und MSCA-1$^-$ Zellen der MACS Methode ab (Abb. 30), auch hier wies die Grundexpression keine nennenswerten Unterschiede vor. 3D-kultivierte osteogen stimulierte Zellen der MACS Separation zeigten ähnliche, etwa 2-fach höhere Runx-2 Levels als die unstimulierten Zellen (Abb. 46), ohne Unterschiede zwischen den zwei Fraktionen aufzuweisen. Die Basalexpression in der 3D-Kultur zeigte für die MSCA-1$^-$ Fraktion der MACS-Methode eine doppelt so hohe Expression, wie die MSCA-1$^+$ Fraktion. Runx-2 wurde in allen osteogen stimulierten Fraktionen induziert. In allen osteogen stimulierten Zellen findet somit die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Präosteoblasten, sowie die Inhibition der Adipogenese statt.

Igf-1 und Igf-2 sind mitogene Differenzierungsfaktoren, die in der Knochenmatrix gelagert werden und das Knochenwachstum stimulieren. Sie werden von Osteoblasten gebildet und werden beim Abbau des Knochens wieder aus der Matrix freigesetzt [95 – 96]. Integrin alpha 5 (ITGA5) ist ein Schlüsselmediator für die Expression von Igf-2 und IGFBP-2, die die Osteoblastendifferenzierung in humanen MSCs fördern [97]. Die zitierte Studie berichtet über eine gleichzeitige Igf-2, IGFBP-2 und ITGA5 Induktion an drei frühen Zeitpunkten der Osteogenese (Tag 1, 3, 7). In Neutralisierungsversuchen zeichnete sich nach der Inhibition von ITGA5 eine signifikante Abnahme der Induktionsindices von Igf-2 und IGFBP-2 in osteogen stimulierten versus Kontrollzellen ab, was darauf hinweist, dass die Igf-2 und IGFBP-2 Expression über ITGA5 vermittelt wird. Kang und Kollegen demonstrierten an parthenogenetischen embryonalen Stammzellen (PESCs) von Mäusen die knochenfördernde Wirkung von Igf-2 [98]. Sie fanden in Igf-2 behandelten Zellen eine signifikant höhere AP und Runx-2 Expression als in PESCs ohne Igf-2-Behandlung. Weiterführend untersuchten sie den Effekt der Zugabe von Igf-2 bei der Knochenbildung *in vivo*. Sie setzten Mäusen einen Defekt von 4 mm in das Schädeldach. Anschließend verschlossen sie den Defekt mit einer PLLA (Poly-L-Lactid-Säure) Trägermatrix mit und ohne PESCs, die jeweils mit und ohne Igf-2 vorbehandelt wurden. Nach 10 Wochen zeigten die mit Igf-2 vorbehandelten PESCs doppelt so viel Knochenneubildung als die unbehandelten PESCs.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit fielen insgesamt höhere Igf-2 und IGFBP-2 Expressionslevels in den MACS separierten Fraktionen sowohl in der Separationspassage als auch im Verlauf der *in vitro* Passagierung auf (Abb. 23, Abb. 31), ohne dass sich markante Unterschiede zwischen beiden Fraktionen abzeichneten. Möglicherweise deuten diese Expressionen auf eine stärkere Knochenbildung in den MACS separierten Fraktionen hin. Die Analysen der 3D-kultivierten Zellen zeigten jedoch keinen Unterschied bezüglich der Separationsmethode (Abb. 39). Igf-2 war in beiden osteogen stimulierten Fraktionen stark induziert, wobei sich tendenziell höhere Induktiondlevels in der positiven Fraktion abzeichneten.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Expression von CD271 (LNGFR- low affinity nerve growth factor receptor) als bekanntem Stammzellmarker untersucht [18; 26], CD271 markiert adulte mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark mit hoher Spezifität und Reinheit [99]. In einer früheren Arbeit konnten wir zeigen, dass LNGFR während der ersten 5 Tage der Osteogenese stärker in mineralisierenden als

in nicht mineralisierenden Kieferperiostzellen induziert wird [100]. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass LNGFR als früher Oberflächenmarker der osteogenen Kapazität von Kieferperiostzellen angesehen werden kann.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigte die MACS separierte MSCA-1$^+$ Fraktion der Separationspassage höhere LNGFR Induktionslevels als die negative Fraktion (Abb. 40). In der darauffolgenden Passage lagen die Induktionslevels beider Fraktionen nahe beieinander und in der neunten Passage zeigte die negative Fraktion tendenziell höhere Induktionslevels als die MSCA-1$^+$ Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der größere Anteil an osteogenen Vorläuferzellen in der MACS separierten MSCA-1$^+$ Fraktion vorliegt. Die LNGFR Induktion in 3D-kultivierten Zellen lagen in der MSCA-1$^-$ Fraktion von MACS etwa 30% höher als in der MSCA-1$^+$ Fraktion, bei jedoch starken Abweichungen. Um eine eindeutige Tendenz der LNGFR Induktion, besonders in den MACS Fraktionen, zu belegen sollten weitere Experimente durchgeführt werden, so dass über eine höhere n-Zahl verlässlichere Aussagen getroffen werden können. Mit den hier vorgestellten Daten lassen sich zunächst nur mögliche Tendenzen erkennen.

Um herausfinden zu können, ob die magnetische Separation einen Einfluss auf die Expression von Entzündungsmediatoren ausübt, wurde im Rahmen dieser Arbeit weiterhin die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen untersucht. IL-1 spielt eine Rolle in der chronischen Entzündung, es veranlasst die Freisetzung von pro-entzündlichen Mediatoren und abbauenden Enzymen [101 – 103]. IL-1α und IL-1β sind fähige Promotoren des Knochenabbaus, die bereits in geringen Konzentrationen ihre Wirkung entfalten können [104]. Lee und Kollegen untersuchten im Tiermodell die Rolle von IL-1 im physiologischen Knochenmetabolismus [105]. Hierzu nutzten sie knock-out Mäuse (IL-1α KO, IL-1β KO und IL-1α/β KO). In allen 3 knock-out Mauslinien zeigte sich eine Zunahme der Knochenmasse begleitet von einer Abnahme der Osteoklasten. Aus ihren Ergebnissen schlossen sie, dass IL-1 nicht nur RANKL (Rezeptor Aktivator des nukleären κB Liganden) in Osteoblasten induziert, sondern auch direkt die Osteoklastendifferenzierung aus Vorläuferzellen fördert. Eine kurzzeitige Inkubation von Schädelknochenzellen von Ratten mit IL-1α bewirkte eine Stimulierung der Zellproliferation und der AP-Aktivität. Eine dauerhafte Inkubation mit IL-1α hingegen, bewirkte eine Inhibition der Knochenbildung und der AP-Aktivität [106]. Tanabe und Kollegen untersuchten den Langzeiteffekt von IL-1α (14 Tage) auf die Osteogenese an Rattenosteoblasten [107]. Die AP Aktivität wie auch der Kalzi-

umgehalt war bei einer Konzentration von 10 und 100 U/ml IL-1α im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an allen gemessenen Zeitpunkten signifikant niedriger. Aus ihren Ergebnissen schlossen sie, dass IL-1α die Osteogenese über eine Absenkung der AP-Aktivität in den Osteoblasten unterdrückt, was aber sicherlich nicht der einzige Effekt auf die Zellen sein dürfte.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich unabhängig von der Methode reprimierte IL-1α Levels in allen Fraktionen in der Separationspassage (Abb. 24), sowie in den darauffolgenden Passagen (Abb. 33). Die basale IL-1α Expression über die *in vitro* Passagierung wies in den MACS Fraktionen sehr geringe Werte auf. 3D-kultivierte Zellen aus allen Fraktionen zeigten eine reprimierte IL-1α Expression. Für MACS separierte Zellen wurden in der 3D-Kultur zwar auch schwach induzierte Levels detektiert, die sich allerdings auf Grund der hohen Abweichung nicht signifikant von unbehandelten Kontrollen unterschieden (Abb. 49).

Lacey et al. zeigten an osteogen induzierten MSCs aus Mäusen, die sie mit und ohne IL-1β und TNFα kultivierten, dass beide Zytokine die osteogene Differenzierung durch die Herunterregulation der AP, Runx-2 und Osx Expression hemmen [108]. Für IL-1β konnten sie im Gegensatz zu TNFα keine inhibierende Wirkung der Expression später osteogener Marker (Osteonectin und Osteopontin) nachweisen. Wie bereits für IL-1α beobachtet, konnten wir reprimierte IL-1β Levels während der Osteogenese in der Separationspassage unabhängig von der Separationsmethode und in allen Fraktionen (Abb. 25) feststellen. In der MACS separierten MSCA-1^+ Fraktion wurde eine IL-1β Induktion erst in Passage 9 ermittelt, während für die MSCA-1^- Fraktion in allen Passagen eine IL-1β Induktion in osteogen stimulierten Zellen beobachtet wurde. Alle 3D-kultivierten Zellen zeigten reprimierte IL-1β Expressionslevels unabhängig von der Separationsmethode oder Fraktion (Abb. 50). Die IL-1α und IL-1β Induktion in der MACS separierten MSCA-1^+ Fraktion in Passage 9 deckt sich mit der in dieser Passage detektierten niedrigsten Mineralisationskapazität dieser Zellen. Eine Inhibition der Osteogenese durch IL-1α oder -ß kann in der Separationspassage und in der 8. Passage ausgeschlossen werden.

1993 beschrieben Birch und Kollegen, die Expression von IL-1β und IL-6 sowie IL-8 in Osteoblasten-ähnlichen Zellen, die sie aus Knochen-Explants isolierten [109]. Neben einer regulatorischen Funktion auf Osteoblasten und Osteoklasten in der Knochenbildung führen Zytokine der IL-6 Familie auch zu Knochenverlust bei osteolytischen Krankheiten [110]. MSCs, die mit Osteogenese stimulierendem Medium kulti-

viert wurden, zeigten im Verlaufe von 14 Tagen eine Abnahme in der Expression von IL-6 [111]. Mäuse, die IL-6 in der vorpubertären Phase überexprimieren zeigen u.a. ein gehemmtes Wachstum, geschädigte Wachstumsplatten, verspätete Entwicklung der Verknöcherungszentren, die Abkopplung von Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität und gestörte Verknöcherung. Aus klinischen Studien ist eine Korrelation zwischen den IL-6 Levels im Serum mit einem abnehmendem Mineralgehalt im Knochen und zunehmender Knochenresorption bei Patienten mit zystischer Fibrose bekannt [112].

Die IL-6 Expression zeigte reprimierte Levels in den Zellen der MACS Fraktionen der Separationspassage (Abb. 26). Die Analyse im Laufe der *in vitro* Passagierung zeigte für beide MACS Fraktionen einen relativ gleichen Verlauf – nur in Passage 8 konnte eine leichte Induktion der IL-6 Levels detektiert werden (mit hohen Abweichungen), die jedoch in Passage 9 wieder rückläufig war (Abb. 35). In der 3D-Kultur konnte eine einheitliche und eindeutige Repression der IL-6 Levels nachgewiesen werden (Abb. 51). Unterschiede in der Mineralisation der Fraktionen kann nicht durch eine erhöhte IL-6-Aktivität erklärt werden.

Interleukin-8 (CXCL8/IL8) fungiert einerseits als pro-inflammatorisches Zytokin und andererseits als potenter Promotor der Angiogenese [113 – 114]. Untersuchungen an humanen kultivierten Knochenhautsheets von Kawase und Kollegen ergaben eine IL-8 Induktion während der osteogenen Differenzierung [115]. Eine zunehmende Neoangiogenese führte zu einem Anstieg an Osteoblastenvorläuferzellen im Knochengewebe und demzufolge zu einer stärkeren Knochenbildung [116]. Pereira und Kollegen untersuchten humane und murine Zellen im 2D- und 3D-Versuch bezüglich verschiedener Angiogenese-Faktoren. Sie detektierten eine Zunahme der IL-8 Expression in 3D- verglichen mit 2D-kultivierten Zellen [78].

In Untersuchungen der vorliegenden Arbeit führte die osteogene Stimulation zu einem starken Anstieg der IL-8 Expression auf Genebene in Zellen der Separationspassage (Abb. 27). Die Ergebnisse der quantitativen PCR spiegelten sich auch in den Proteinuntersuchungen wieder (Abb. 43). Auch im Laufe der *in vitro* Passagierung blieben die IL-8 Induktionslevels relativ hoch, wobei sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen Fraktionen oder Separationsmethoden abzeichneten. Tendenziell wurden hier etwas höhere Levels in den MACS separierten Fraktionen detektiert (Abb. 36). Die Expression von IL-8 zeigte nach der 3D-Kultur für die jeweiligen Fraktionen sehr ähnliche, allerdings niedrigere Levels als in der 2D-Kultur (Abb. 52) im

Gegensatz zu den von Pereira et al. publizierten Daten. Über die pro-inflammatorische (unerwünscht) und/oder Angiogenese-stimulierende (erwünscht) Wirkung von IL-8 kann nur spekuliert werden. Um herauszufinden, welche Wirkung von den Kieferperiostzellen hauptsächlich ausgeht, müssten Ko-Kultur Versuche mit immunrelevanten Blutzellen bzw. mit Endothelzellen durchgeführt werden.

Die Familie der CDKs gehört zu den Hauptregulatoren des eukaryotischen Zellzyklus [117 – 118]. Shen und Kollegen zeigten in murinen Zellen, dass Cyclin D1 über CDK4 den Abbau von Runx-2 induziert und wiesen dadurch einen eng regulierten Mechanismus zwischen Knochenzellwachstum und Differenzierung nach [119]. CDK4 verzögert gemeinsam mit CDK6 die Seneszenz in humanen diploiden Fibroblasten [120].

Tendenziell konnte in den vorliegenden Untersuchungen über die *in vitro* Passagierung ein Abfall der CDK4 Induktion in osteogen stimulierten Zellen mit der Ausnahme der MACS separierten MSCA-1$^-$ Fraktion beobachtet werden (Abb. 37). Die beschriebene CDK4 Repression könnte mit einer zunehmenden Seneszenz im Laufe der *in vitro* Passagierung zusammenhängen. CDKN2A gehört zu den CDK-Inhibitoren und inhibiert CDK4 [121]. In seneszenten Fibroblasten wird CDKN2A hochreguliert und somit die CDK4 Aktivität herunterreguliert [122 – 123]. Die MACS Fraktionen zeigten eine gegensätzlich verlaufende CDKN2A Expression (Abb. 38) wie bereits für die CDK4 Expression gezeigt werden konnte. In der MSCA-1$^+$ Fraktion nahm die Expression im Laufe der Passagen stetig ab, in der MSCA-1$^-$ Fraktion hingegen zu.

Die basale Expression von CDK4 in den Kontrollzellen der MACS Fraktionen zeigte eine Abnahme in der MSCA-1$^-$ Fraktion und eine Zunahme in der MSCA-1$^+$ Fraktion, was in den osteogen stimulierten Zellen einen Anstieg der Expression in der MSCA-1$^-$ Fraktion sowie eine gleichbleibende Expression in der MSCA-1$^+$ Fraktion bedeutet. Wohingegen die Grundexpression von CDKN2A in beiden Fraktionen auf einem einheitlichen Level blieb, mit einer Zunahme in Passage 9 der MSCA-1$^+$ Fraktion. Somit zeigte die Expression in der osteogen stimulierten MSCA-1$^-$ Fraktion einen Anstieg, in der MSCA-1$^+$ Fraktion eine Expression mit geringstem Level in Passage 8.

Unter Berücksichtigung der basalen Expression konnte keine gegenläufige Expression für CDK4 und CDKN2A festgestellt werden. Möglicherweise spielen hier das Alter des Patienten oder mögliche Erkrankungen eine Rolle, so dass mit den hier unter-

suchten Proben keine eindeutige Bestätigung der Literaturwerte zu erzielen war. Allerdings handelt es sich bei den gemessenen Werten lediglich um eine Momentaufnahme von Tag 10 jeder Passage.

IGFBPs wirken als autokrine oder parakrine Regulatoren der Igf-Aktivität, können allerdings auch unabhängig von den Igfs als Wachstumsmodulatoren wirken [123]. Mit zunehmendem Alter konnte ein Anstieg der IGFBP-2 Serumlevels in Menschen [125] nachgewiesen werden, ebenso tragen Mangelernährung oder verschiedene Krebsarten zu einer Steigerung des IGFBP-2 Serumlevels bei [126]. Aber auch bei der Knochenentwicklung spielt IGFBP-2 eine Rolle. In humanen MSCs induziert Dexamethason die Expression von Igf-2 und IGFBP-2 gemeinsam über Integrin alpha 5 (ITGA5) [97].

Während der Osteogenese konnten wir ebenfalls eine Hochregulation von ITGA5 detektieren (Daten nicht gezeigt). Igf-2 und IGFBP-2 erhöhen ihrerseits bereits in geringen Dosen die Expression von Osteogenese-relevanten Genen [97]. Eine fördernde Rolle von IGFBP-2 auf die Knochenentwicklung ist aus Tiermodellen an Mäusen [127] und Ratten [128] bekannt. Igf-2 fördert die Bindung von IGFBP-2 an die extrazelluläre Matrix (EZM) von Osteoblasten und diese Bindung stimuliert die Osteoblastenproliferation [129 – 130]. Zudem verstärkt IGFBP-2 die Igf-2 abhängige Stimulation der AP-Aktivität während frühen Stadien der osteogenen Differenzierung in Osteoblasten der Tibia von Ratten [131]. Amin und Kollegen (2004) zeigten allerdings, dass das Igf/IGFBP System, eine entscheidende Rolle in der Regulation des Knochenabbaus mit zunehmendem Alter beim Menschen spielt, wobei höhere IGFBP-2 Levels mit geringerer Knochendichte einhergingen [125]. Diese und andere Untersuchungen (IGFBP-2 als negativer Regulator des Knochenwachstums [132]) legen den Schluss nahe, dass die Wirkung von IGFBP-2 auf die Osteogenese vom Verhältnis Igf2 zu IGFBP-2 abhängig ist.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben in osteogen stimulierten Zellen hohe Induktionswerte für IGFBP-2 mit Maximalwerten in Passage 8 (Abb. 39). In der Tendenz scheinen die Induktionsindices von Igf-2 und IGFBP-2 der MACS Fraktionen ähnlich zu verlaufen, was ein Zusammenwirken bzw. eine gemeinsame Regulation während der Osteogenese zu untermauern scheint.

IGFBP-3 kann u.a. an den Retinoid X Rezeptor α binden und das TGFβ Signaling über die Interaktion mit Smad-Proteinen aktivieren. Über diese Interaktionen kann IGFBP-3 einen Einfluss auf den Zellzyklus und die Apoptose nehmen und wird saher

als potenter Tumorsuppressor beschrieben [133 – 134]. Untersuchungen zum IGFBP-3 Gehalt in gesundem und Osteosarkom-befallenem Knochengewebe ergaben in einer Studie von Ressler und Kollegen eine hohe IGFBP-3 Expression, die im gesunden Gewebe hauptsächlich nukleär lokalisiert war [135]. Nur 50% der Osteosarkom-befallenen Gewebeproben zeigten eine IGFBP-3 Expression und diese war hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert. Die Patienten mit niedrigen IGFBP-3 Serumlevels zeigten tendenziell eine kürzere Überlebenszeit als die Patienten mit hohen IGFBP-3 Serumlevels. IGFBP-3 wirkt auch als Antagonist von Igf-2, und somit auch als Antagonist auf die BMP-9 induzierte Knochenbildung in MSCs, welche durch Igf-2 vermittelt wird [136]. Igf-1 und IGFBP-3 sind für die qualitative und quantitative Erhaltung der Knochenmasse wichtig. Mit zunehmendem Alter steigen die IGFBP-2 Serumlevels und diese korrelieren negativ zu den Igf-1 und IGFBP-3 Serumkonzentrationen [137 – 138]. In Stromazellen, die aus Fettgewebe gewonnen wurden (human adipose-derived stromal cells; hASC) konnten Lee und Kollegen eine Hochregulierung von IGFBP-3 in den ersten 7 Tagen der Osteogenese beschreiben [105]. Zudem kommt IGFBP-3 eine Funktion in antiproliferativen und proapoptotischen Vorgängen zu [133 – 134].

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden relativ gleichbleibende Induktionslevels von IGFBP-3 (etwa 3-fach) in allen Fraktionen über die *in vitro* Passagierung ermittelt (Abb. 40). Die konstitutive IGFBP-3 Expression andererseits zeigte hohe Ratios, auf Grund dessen, dass die ermittelten Kopienzahlen über denen des Housekeeping Gens lagen. Da die ermittelten mittleren Fehler der Mittelwerte sehr hoch waren, ist eine Aussage über eine mögliche Tendenz der IGFBP-3 Expression im Laufe der Passagierung erschwert. Die Basallevels der Kontrollen sank über die Passagen, während die Induktionsindices annähernd konstant blieben, somit sank auch die IGFBP-3 Expression in den MSCA-1$^+$ osteogen stimulierten Zellen, was durch die hohen Abweichungen relativiert wird.

IGFBP-7 bindet mit geringer Affinität an Igf-1 oder -2 und mit höherer Affinität an Insulin. Eine regulierende Wirkung auf die Zellproliferation (inhibierend), Zellseneszenz (induzierend), Zelladhäsion (stimulierend) und Angiogenese (inhibierend) konnte in verschiedenen Krebszelllinien nachgewiesen werden. IGFBP-7 wird daher als Tumorsuppressor angesehen [139 – 146]. Bei einer Studie an zwei Glioblastom Zelllinien beschrieben Pen und Kollegen (2011), dass IGFBP-7 die Zellseneszenz und die damit verbundende β-Galaktosidase Aktivität stimuliert [147].

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verliefen die IGFBP-7 Basallevels der MACS separierten Zellen tendenziell ansteigend, dabei zeigte die MSCA-1$^-$ Fraktion höhere Werte, als die MSCA-1$^+$ Fraktion. Osteogen stimulierte MSCA-1$^+$ Zellen der MACS Methode zeigten eine eher abfallende Expressionstendenz von der Separationspassage ausgehend, während die MSCA-1$^-$ Fraktion in der Separationspassage eine schwache IGFBP-7 Induktion zeigte um dann ein zur positiven Fraktion parallel verlaufendes Expressionsmuster zu zeigen (Abb. 41). Bei gleichbleibender Expression in den osteogen stimulierten Zellen und zunehmender Basalexpression kommt es zur beschriebenen Abnahme der Induktion, so dass davon ausgegangen werden muss, dass in den Kontroll-Zellen die durch IGFBP-7 vermittelte Seneszenz ansteigt, während sich diese in den osteogen stimulierten Zellen auf gleichem Niveau bleibt. Eine Zunahme der Zellseneszenz konnte bereits über die β-Galaktosidase Aktivität gezeigt werden (Abb. 19).

Yamaguchi et al. beschrieben die direkte *in vitro* Stimulation der Osteoklastenbildung in der Zellkultur aus Mausknochenmark durch den Einfluss von Regucalcin [148]. Sie konnten in der gleichen Studie zeigen, dass RGN die Knochenresorption in Oberschenkelknochengewebe von Ratten stimuliert. RGN wird ebenfalls eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben. In Ratten-Hepatom Zellen, die RGN überexprimieren, wurden Tumor-assoziierte Gene unterdrückt und das Tumorsuppressorgen p53 verstärkt exprimiert [149]. Ebenfalls in Ratten konnte gezeigt werden, dass die RGN Ausschüttung in der Leber altersbedingt und geschlechtsunabhängig bis zu 70% gegenüber derjenigen in jungen adulten Ratten abnimmt [150].

Die basalen RGN Expressionen in den Zellen der vorliegenden Arbeit beider MACS Fraktionen zeigte ein relativ gleiches, niedriges Niveau, wobei die MSCA-1$^+$ Zellen eine noch niedrigere Expression zeigten als die der MSCA-1$^-$ Fraktion. In MACS separierte Zellen wurde tendenziell eher eine Abnahme der RGN Expression detektiert (Abb. 42). Die schwache, in osteogen stimulierten Zellen detektierte RGN Induktion kann auch auf den Einfluss von Dexamathason zurückzuführen sein, da bekannt ist, dass Hormone zu einer Stimulation der RGN Expression führen können [151 – 153].

Weiterhin wurden die Überstände der separierten Fraktionen auf die Proteinexpression verschiedener löslicher Rezeptoren bzw. verwandter Proteine untersucht. Im Folgenden wird die Funktion dieser Rezeptoren und Proteinen für die Knochenbildung kurz aufgeführt. LRP-6 dient als ein Ko-Rezeptor für den Wnt-Signaltransduktionsweg [154], wie bereits oben in der Diskussion erwähnt. 1996 be-

schrieben Olsen et al. das Säuger-Stanniocalcin als einen Regulator der Mineralhomeostase [155]. Yoshiko und Kollegen konnten höhere Stanniocalcin-1 (STC-1) Expressionslevels in an der Osteogenese beteiligten Zellen in Mausembryonen nachweisen und schlussfolgerten, dass STC-1 eine Rolle bei der endochondralen und intramembranösen Knochenbildung spielt [156]. Die TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) stellen Schlüsselinhibitoren von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) dar und spielen hierbei eine Rolle bei der Umformung der extrazellulären Matrix [157]. TIMP-4 hemmt hauptsächlich MMP-2 und -7 und weniger stark auch MMP-1, -3 und -9 [158]. Aktuelle Ergebnisse von Alexander et al. legen eine Beteiligung von TIMP-4 an der EZM Umformung während der Kieferperiostzell-Osteogenese nahe [159]. Battula et al. detektierten die CD166 Expression auf humanen MSCA-$1^{+}CD56^{+/-}$ mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark [26]. Choi und Kollegen isolierten durchflusszytometrisch Vorläuferzellen aus der Knochenhaut mittels der Oberflächenmarker CD9, CD90, CD105 und CD166 [160]. Dennis et al. konnten eine Korrelation zwischen der CD166, CD105 und CD90 Expression auf humanen Knochenmarkzellen und der *in vivo* gebildeten Knochenmenge nach der Implantation von zellbesiedelten Keramikkonstrukten in SCID Mäusen nachweisen [161]. OPN bindet an Integrinrezeptoren der Zelle und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Mineralisation [162]. Chen et al. verglichen humane Knochenhautzellen mit Stammzellen des gleichen Spenders, die aus dem Knochenmark stammten [163]. Nach der *in vitro* Osteogenese detektierten sie eine stabilere Mineralisation sowie höhere mRNA Levels von BMP2, Osteopontin (OPN) und Osteocalcin in den Knochenhautzellen. Liu und Kollegen fanden moderate bis hohe Expressionslevel von OPN in frühen Osteovorläufern und Präosteoblasten [164]. RECK (reversion-inducing cystein-rich protein with Kazal motifs) ist ein membranständiges Glykoprotein, das als negativer Regulator von MMP-9 agiert. Es inhibiert ebenso MT1-MMP (MMP-14) und MMP-2 und ist dementsprechend, wie TIMP-4 auch, an der Umformung der EZM während der Osteogenese involviert [159; 165]. Oh und Kollegen zeigten, dass starke RECK- und niedrige MMP-Aktivität in Gebieten vorkommen, in denen Angiogenese unterdrückt wird, wohingegen eine niedrige RECK- und eine höhere MMP-Aktivität in Gebieten vorherrschend sind, in denen Angiogenese gewöhnlich vorkommt [165].

Bei Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der Proteinexpression in der 2D-Kultur, fiel hauptsächlich auf, dass die Proteinlevels von STC-1,

TIMP-4, CD166, IL-8 und RECK während der Osteogenese der separierten MACS Fraktionen induziert werden (Abb. 43). Dabei wurden relevante Unterschiede zwischen beiden Fraktionen nur bezüglich der STC-1 und TIMP-4 Expression an Tag 10 und der RECK Expression an Tag 25 detektiert, bei denen höhere Levels in der MSCA-1$^+$ Fraktion nachgewiesen werden konnten. Beim Vergleich dieser Proteinergebnisse mit denen aus der 3D-Kultur, zeigte sich in der 3D-Kultur eine stärkere STC-1 Regulation sowie eine fehlende IL-8 Induktion (mit der Ausnahme der MSCA-1$^-$ MACS Fraktion an Tag 15) während der Osteogenese der induzierten Fraktionen unabhängig von der Separationsmethode (Abb. 53). Die fehlende IL-8 Induktion in der 3D-Kultur steht nicht im Einklang mit den Ergebnissen der Echtzeit PCR, die eine IL-8 Induktion in allen Fraktionen unabhängig der Separationsmethode quantifizierten (Abb. 27). Dies könnte darauf hinweisen, dass in der 3D-Kultur eine IL-8 Regulation auf Translationsebene stattfindet. Weiterhin wurden höhere OPN Levels in den MACS separierten Fraktionen detektiert. Bezüglich der OPN und RECK-Expression wurden in der 3D-Kultur deutlich gesteigerte Levels in der MSCA-1$^+$ Fraktion an Tag 10 detektiert. Des Weiteren wurden die höchsten RECK-Proteinlevels an Tag 25 in den MSCA-1$^+$ Fraktionen beider Separationsmethoden detektiert. Vermutlich wird zu diesem Zeitpunkt die Angiogenese und die MMP-Aktivität unterdrückt, um die EZM Bildung zu ermöglichen. Diese Daten weisen darauf hin, dass das dreidimensionale Milieu das Zellexpressionsmuster im Vergleich zur 2D-Kultur verändert ist und vermutlich eine osteoinduktive Wirkung von Seiten des Biomaterials ausgeht.

Magnetische Zellseparationen gehören zu den Standardtechniken zur Zellaufreinigung und Isolation. Die MACS-Methode zählt hierbei zum Goldstandard der magnetischen Separation, wohingegen EasySep eine weniger verbreitete Methode darstellt. Auf Grund der hohen Mortalitätsraten bei der Isolation von osteogenen Vorläuferzellen aus dem Kieferperiost durch MACS, wurden in der vorliegenden Arbeit die genannten Methoden verglichen und die gewonnenen Zellfraktionen auf ihre Charakteristika hin verglichen. Zum aktuellen Zeitpunkt (Stand Juli 2012) ist in PubMed lediglich eine Veröffentlichung gelistet, die ebenfalls diese beiden Methoden vergleicht [57]. Diese Arbeit vergleicht die beiden Separationsmethoden im Blick auf die Fähigkeit CD14$^+$ Monozyten aus dem Blut zu isolieren, um *in vitro* dendritische Zellen für funktionelle Analysen zu generieren. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal ein detaillierter Vergleich der beiden Separationsmethoden in Bezug auf die Fähigkeit eine möglichst reine MSC-haltige Subpopulation aus der heterogenen Zellkul-

tur des Periosts zu isolieren, herangezogen. Hierbei zeigte EasySep trotz geringerer Mortalitätsraten eine geringere Zellreinheit und sogar einen höheren Anteil MSCA-1$^+$ Zellen in der negativen Zellfraktion. Diese ungenügende Auftrennung beeinträchtigte die weitere Charakterisierung der EasySep-Zellfraktionen, so dass eine Eignung dieser Methode zur Isolation von MSCs aus der Periostzellkultur nicht gegeben ist. Die MACS-Methode stellt einen brauchbaren Ansatz zur MSC-Isolation aus dem heterogenen Kieferperiost durch eine vergleichsweise hohe Reinheit der isolierten Fraktionen dar, wenn auch mit höheren Mortalitätsraten verbunden.

5. Zusammenfassung

Tissue Engineering Anwendungen im Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie bieten eine geeignete Alternativtherapie zu der Standardtherapie der autologen Knochentransplantation für die Regeneration von Knochendefekten. Hierzu ist neben geeigneten Trägermaterialien sowie Differenzierungsfaktoren eine mesenchymale Stammzellquelle für die Besiedelung der Konstrukte nötig. Mesenchymale Stammzellen (MSCs) finden sich im menschlichen adulten Körper in nahezu allen Gewebearten. Als eine der gängigsten Quellen hat sich das Knochenmark etabliert. Ebenso befinden sich osteogene Vorläuferzellen in der Knochenhaut (Periost), die *in vivo* den Aufbau von neuem Knochen verantwortet. Durch die leichtere Zugänglichkeit sowie die Funktionalität bietet das Kieferperiost im Vergleich zum Knochenmark eine geeignetere Quelle für MSCs im Anwendungs-bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie an. Da sich die unterschiedlichen Zellschichten der humanen Knochenhaut nur sehr schwer trennen lassen, ist es eine Herausforderung, für die osteogenen Vorläuferzellen aus der Kambiumschicht geeignete Marker zu identifizieren, um nur diese aus dem Gesamtverband zuverlässig isolieren zu können.

Verschiedene spezifische Oberflächenmarker für MSCs wurden bereits beschrieben, darunter CD90, CD73, CD105, CD271, Stro-1 und MSCA-1. Letzterer definiert eine Subpopulation aus der Kieferknochenhaut mit höherem osteogenen Potenzial. Da die gängige und gut etablierte Standardmethode der magnetischen Zellseparation (MACS) sowie die durchflusszytometrische Zellsortierung meist recht hohe Mortalitätsraten mit sich ziehen, besteht der Bedarf einer schonenderen Alternativmethode für die Zellseparation. Dafür muss jedoch der genaue, detaillierte Vergleich verschiedener Separationsmethoden gezogen werden. Mit Hilfe von magnetisch markierten MSCA-1 Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit zwei magnetische Separationsmethoden verglichen und daraufhin untersucht eine möglichst reine MSC-haltige Subpopulation aus der heterogenen Periostzellkultur zu isolieren. Neben der etablierten MACS-Methode, die auf einem Säulenprinzip beruht wurde eine weitere magnetische Zellseparationsmethode (EasySep) untersucht, bei der weniger Scherkräfte entstehen. Diese beiden Separationsmethoden wurden in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal vergleichend auf ihre Zellausbeuten, Mortalitätsraten, Zellreinheit und das Beibehalten der Differenzierbarkeit untersucht.

Beide untersuchten Methoden unterschieden sich signifikant bezüglich der resultierenden Überlebensraten: dabei zeigte die EasySep Methode signifikant niedrigere Mortalitätsraten (20,32%; MACS: 41,98%). Mithilfe von durchflusszytometrischen Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass die MACS separierten Fraktionen die höhere Reinheit aufwiesen: während der Anteil an MSCA-1^+ Zellen in der Positivfraktion bei etwa 45% lag, betrug der Anteil MSCA-1^+ Zellen in der entsprechenden EasySep separierten Fraktion nur 19%. Überraschenderweise zeigte die EasySep separierte Negativfraktion einen höheren Anteil an MSCA-1^+ Zellen. Weiterhin konnte nur für die MACS Methode eine höhere Mineralisationskapazität der MSCA-1^+ Fraktion im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden, wohingegen die Fraktionen von EasySep keine Unterschiede in Bezug auf das osteogene Differenzierungspotential zeigten. Die Untersuchung der mitochondrialen Aktivität ergab signifikante Unterschiede nur in den MACS separierten Fraktionen nach osteogener Stimulation.

Im Laufe der *in vitro* Passagierung zeigten die Zellfraktionen beider Methoden eine Abnahme der Mineralisations- und Proliferationskapazität sowie eine ansteigende Seneszenz.

Betrachtet man diese Ergebnisse und bringt sie in Verbindung mit den untersuchten Genen und Proteinen, so kommt man zu dem Schluss, dass die MACS Methode eine für Tissue Engineering Anwendungen besser geeignete MSCA-1^+ Subpopulation aus der heterogenen Periostzellkultur isoliert. Die für die Zellen schonendere, aber weniger effiziente EasySep Methode brachte keine überzeugenden Resultate ein.

6. Summary

Tissue engineering applications in the field of oral and maxillofacial surgery provide a suitable alternative to the standard therapy of autologous bone transplantation for the regeneration of bone defects. Besides the need of suitable scaffolds and differentiation factors an adequate source of mesenchymal stem cells is required for seeding of the developed constructs. In the human body mesenchymal stem cells (MSCs) are found throughout almost all kinds of tissue. Bone marrow is up to date the best-established source of MSCs. Osteogenic progenitors are also found within the periosteum being responsible for the *in vivo* new bone formation. Due to the better accessibility and the high functionality, periosteum tissue represents a suitable source of MSCs for bone regeneration issues in the oral and maxillofacial surgery compared to bone marrow. Due to the fact that the different layers of jaw periosteum are hardly to separate, the identification of suitable markers for the reliable isolation of osteoprogenitors from the whole tissue poses a challenge.

Different surface markers of MSCs have already been described, such as CD90, CD73, CD105, CD271, Stro-1 and MSCA-1. The latter one defines a subpopulation of the jaw periosteum eliciting a higher osteogenic potential. The well-established standard method for magnetic cell separation (MACS) shows high mortality rates. Therefore the establishment of a gentler alternative for cell separation and a detailed and exact comparison of different methods are required. In the present work two magnetic separation methods using specific MSCA-1 antibodies were compared regarding the isolation of a pure MSC-containing subpopulation from the heterogeneous population of the jaw periosteum. Besides the use of the well-established MACS separation method based on a column set-up, a second magnetic cell separation method (EasySep) providing a set-up with lower shear-forces was performed. Both separation methods have been compared regarding cell yields, mortality rates, cell purities and the ability to differentiate into osteogenic tissue.

The analyzed methods showed significant differences regarding the cell viability: the EasySep approach showed significant lower mortality rates (20.32% in comparison to 41.98% by MACS). Using flow cytometric analysis we provided evidence that MACS isolated cell fractions showed the higher purities: in the MACS separated MSCA-$1^{positive}$ cell fraction we detected 45% MSCA-1^{+} cells, whereas the EasySep fraction contained only 19% MSCA-1^{+} cells. Surprisingly, the negative fraction of EasySep

showed the higher amount of MSCA-1$^+$ cells. The MACS separated MSCA-1$^+$ fraction revealed a significant higher mineralization capacity compared to the negative fraction, whereas the EasySep separated fractions showed no differences regarding the osteogenic potential. We detected significant differences considering the mitochondrial activity designating the proliferative capacities of cells only in MACS separated fractions after osteogenic stimulation.

During *in vitro* passaging of the isolated cell fractions a decrease of the mineralization and proliferation capacities of cells and an increase in cell senescence was observed independent from the separation method.

Considering these results and those analyzed by gene and protein expression, we can conclude that the MACS method provides the more suitable approach to isolate a pure MSCA-1$^+$ subpopulation from the heterogeneous jaw periosteum for tissue engineering applications in the oral and maxillofacial surgery. The gentler but less efficient EasySep method yielded no convincing results.

7. Literaturverzeichnis

1. Grollemund, B., Guedeney, A., Vazquez, M. P., Picard, A., Soupre, V., Pellerin, P., Simon, E., Velten, M., Dissaux, C., Kauffmann, I., Bruant-Rodier, C., and Danion-Grilliat, A. Relational development in children with cleft lip and palate: influence of the waiting period prior to the first surgical intervention and parental psychological perceptions of the abnormality *BMC.Pediatr.* **2012**; 12: 65 -

2. Saman, D. M. A review of the epidemiology of oral and pharyngeal carcinoma: update *Head Neck Oncol.* **2012**; 4: 1 -

3. Rose, F. R. and Oreffo, R. O. Bone tissue engineering: hope vs hype *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **2002**; 292: 1 - 7.

4. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts *Science* **1998**; 282: 1145 - 1147.

5. Mercier, F. E., Ragu, C., and Scadden, D. T. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity *Nat.Rev.Immunol.* **2012**; 12: 49 - 60.

6. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells *Science* **1999**; 284: 143 - 147.

7. Fink, T. and Zachar, V. Adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells *Methods Mol.Biol.* **2011**; 698: 243 - 251.

8. Takahashi, K. and Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors *Cell* **2006**; 126: 663 - 676.

9. Park, I. H., Lerou, P. H., Zhao, R., Huo, H., and Daley, G. Q. Generation of human-induced pluripotent stem cells *Nat.Protoc.* **2008**; 3: 1180 - 1186.

10. Ebben, J. D., Zorniak, M., Clark, P. A., and Kuo, J. S. Introduction to induced pluripotent stem cells: advancing the potential for personalized medicine *World Neurosurg.* **2011**; 76: 270 - 275.

11. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, Dj, and Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement *Cytotherapy.* **2006**; 8: 315 - 317.

12. Jones, E. A., Kinsey, S. E., English, A., Jones, R. A., Straszynski, L., Meredith, D. M., Markham, A. F., Jack, A., Emery, P., and McGonagle, D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells *Arthritis Rheum.* **2002**; 46: 3349 - 3360.

13. De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., and Luyten, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane *Arthritis Rheum.* **2001**; 44: 1928 - 1942.

14. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., and Hedrick, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies *Tissue Eng* **2001**; 7: 211 - 228.

15. Seong, J. M., Kim, B. C., Park, J. H., Kwon, I. K., Mantalaris, A., and Hwang, Y. S. Stem cells in bone tissue engineering *Biomed.Mater.* **2010**; 5: 062001 -

16. De Bari, C., Dell'Accio, F., and Luyten, F. P. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age *Arthritis Rheum.* **2001**; 44: 85 - 95.

17. De Bari, C., Dell'Accio, F., Vanlauwe, J., Eyckmans, J., Khan, I. M., Archer, C. W., Jones, E. A., McGonagle, D., Mitsiadis, T. A., Pitzalis, C., and Luyten, F. P. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis *Arthritis Rheum.* **2006**; 54: 1209 - 1221.

18. Buhring, H. J., Battula, V. L., Treml, S., Schewe, B., Kanz, L., and Vogel, W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **2007**; 1106: 262 - 271.

19. Gronthos, S., Graves, S. E., Ohta, S., and Simmons, P. J. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors *Blood* **1994**; 84: 4164 - 4173.

20. Tare, R. S., Mitchell, P. D., Kanczler, J., and Oreffo, R. O. Isolation, differentiation, and characterisation of skeletal stem cells from human bone marrow in vitro and in vivo *Methods Mol.Biol.* **2012**; 816: 83 - 99.

21. Alexander, D., Schafer, F., Olbrich, M., Friedrich, B., Buhring, H. J., Hoffmann, J., and Reinert, S. MSCA-1/TNAP selection of human jaw periosteal cells improves their mineralization capacity *Cell Physiol Biochem.* **2010**; 26: 1073 - 1080.

22. Boxall, S. A. and Jones, E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells *Stem Cells Int.* **2012**; 2012: 975871 -

23. Vogel, W., Grunebach, F., Messam, C. A., Kanz, L., Brugger, W., and Buhring, H. J. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells *Haematologica* **2003**; 88: 126 - 133.

24. Battula, V. L., Bareiss, P. M., Treml, S., Conrad, S., Albert, I., Hojak, S., Abele, H., Schewe, B., Just, L., Skutella, T., and Buhring, H. J. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation *Differentiation* **2007**; 75: 279 - 291.

25. Sobiesiak, M., Sivasubramaniyan, K., Hermann, C., Tan, C., Orgel, M., Treml, S., Cerabona, F., de Zwart, P., Ochs, U., Muller, C. A., Gargett, C. E., Kalbacher, H., and Buhring, H. J. The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is

identical to tissue non-specific alkaline phosphatase *Stem Cells Dev.* **2010**; 19: 669 - 677.

26. Battula, V. L., Treml, S., Bareiss, P. M., Gieseke, F., Roelofs, H., de Zwart, P., Muller, I., Schewe, B., Skutella, T., Fibbe, W. E., Kanz, L., and Buhring, H. J. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1 *Haematologica* **2009**; 94: 173 - 184.

27. Squier, C. A., Ghoneim, S., and Kremenak, C. R. Ultrastructure of the periosteum from membrane bone *J.Anat.* **1990**; 171: 233 - 239.

28. Hutmacher, D. W. and Sittinger, M. Periosteal cells in bone tissue engineering *Tissue Eng* **2003**; 9 Suppl 1: S45 - S64.

29. Agata, H., Asahina, I., Yamazaki, Y., Uchida, M., Shinohara, Y., Honda, M. J., Kagami, H., and Ueda, M. Effective bone engineering with periosteum-derived cells *J.Dent.Res.* **2007**; 86: 79 - 83.

30. Jaquiery, C., Schaeren, S., Farhadi, J., Mainil-Varlet, P., Kunz, C., Zeilhofer, H. F., Heberer, M., and Martin, I. In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone-forming capacity of human isogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells *Ann.Surg.* **2005**; 242: 859 - 67, discussion.

31. Jorgensen, C., Gordeladze, J., and Noel, D. Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells *Curr.Opin.Biotechnol.* **2004**; 15: 406 - 410.

32. Kale, S. and Long, M. W. Osteopoiesis: the early development of bone cells *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* **2000**; 10: 259 - 271.

33. Aubin, J. E. Regulation of osteoblast formation and function *Rev.Endocr.Metab Disord.* **2001**; 2: 81 - 94.

34. Barry, F. P. and Murphy, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **2004**; 36: 568 - 584.

35. Otto, W. R. and Rao, J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage *Cell Prolif.* **2004**; 37: 97 - 110.

36. Hoemann, C. D., El Gabalawy, H., and McKee, M. D. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization *Pathol.Biol.(Paris)* **2009**; 57: 318 - 323.

37. Van Hoof, V. O. and De Broe, M. E. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns *Crit Rev.Clin.Lab Sci.* **1994**; 31: 197 - 293.

38. Orimo, H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease *J.Nihon Med.Sch* **2010**; 77: 4 - 12.

39. Rodan, G. A. and Noda, M. Gene expression in osteoblastic cells *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* **1991**; 1: 85 - 98.

40. Qin, C., Baba, O., and Butler, W. T. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis *Crit Rev.Oral Biol.Med.* **2004**; 15: 126 - 136.

41. Ducy, P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology *Dev.Dyn.* **2000**; 219: 461 - 471.

42. Pagani, F., Francucci, C. M., and Moro, L. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives *J.Endocrinol.Invest* **2005**; 28: 8 - 13.

43. Deng, Z. L., Sharff, K. A., Tang, N., Song, W. X., Luo, J., Luo, X., Chen, J., Bennett, E., Reid, R., Manning, D., Xue, A., Montag, A. G., Luu, H. H., Haydon, R. C., and He, T. C. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development *Front Biosci.* **2008**; 13: 2001 - 2021.

44. Langer, R. and Vacanti, J. P. Tissue engineering *Science* **1993**; 260: 920 - 926.

45. Haverich, A., Mertsching, H., and Martin, U. [Differentiation potential of human stem cells--approaches to tissue engineering and to cell transplantation] *Z.Arztl.Fortbild.Qualitatssich.* **2002**; 96: 440 - 448.

46. Badylak, S. F., Weiss, D. J., Caplan, A., and Macchiarini, P. Engineered whole organs and complex tissues *Lancet* **2012**; 379: 943 - 952.

47. Soler-Botija, C., Bago, J. R., and Bayes-Genis, A. A bird's-eye view of cell therapy and tissue engineering for cardiac regeneration *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **2012**; 1254: 57 - 65.

48. Ptaszek, L. M., Mansour, M., Ruskin, J. N., and Chien, K. R. Towards regenerative therapy for cardiac disease *Lancet* **2012**; 379: 933 - 942.

49. Torroni, A. Engineered bone grafts and bone flaps for maxillofacial defects: state of the art *J.Oral Maxillofac.Surg.* **2009**; 67: 1121 - 1127.

50. Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage *Biomaterials* **2000**; 21: 2529 - 2543.

51. Alexander, D., Hoffmann, J., Munz, A., Friedrich, B., Geis-Gerstorfer, J., and Reinert, S. Analysis of OPLA scaffolds for bone engineering constructs using human jaw periosteal cells *J.Mater.Sci.Mater.Med.* **2008**; 19: 965 - 974.

52. Dainiak, M. B., Kumar, A., Galaev, I. Y., and Mattiasson, B. Methods in cell separations *Adv.Biochem.Eng Biotechnol.* **2007**; 106: 1 - 18.

53. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences *Biotechnology (N.Y.)* **1992**; 10: 413 - 417.

54. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., and Zoric, N. The real-time polymerase chain reaction *Mol.Aspects Med.* **2006**; 27: 95 - 125.

55. Apostolakos, M. J., Schuermann, W. H., Frampton, M. W., Utell, M. J., and Willey, J. C. Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction *Anal.Biochem.* **1993**; 213: 277 - 284.

56. Alipoor, F. J., Gilani, M. A., Eftekhari-Yazdi, P., Hampa, A. D., Hosseinifar, H., Alipour, H., and Panah, M. L. Achieving high survival rate following cryopreservation after isolation of prepubertal mouse spermatogonial cells *J.Assist.Reprod.Genet.* **2009**; 26: 143 - 149.

57. Mucci, I., Legitimo, A., Compagnino, M., Consolini, R., Migliaccio, P., Metelli, M. R., and Scatena, F. The methodological approach for the generation of human dendritic cells from monocytes affects the maturation state of the resultant dendritic cells *Biologicals* **2009**; 37: 288 - 296.

58. Kim, Y., Hong, S., Lee, S. H., Lee, K., Yun, S., Kang, Y., Paek, K. K., Ju, B. K., and Kim, B. Novel platform for minimizing cell loss on separation process: Droplet-based magnetically activated cell separator *Rev.Sci.Instrum.* **2007**; 78: 074301 -

59. Pafumi, C., Bosco, P., Cavallaro, A., Farina, M., Leonardi, I., Pernicone, G., Bandiera, S., Russo, A., Giardina, P., Chiarenza, M., and Calogero, A. E. Two CD34+ stem cells from umbilical cord blood enrichment methods *Pediatr.Hematol.Oncol.* **2002**; 19: 239 - 245.

60. Handgretinger, R., Gordon, P. R., Leimig, T., Chen, X., Buhring, H. J., Niethammer, D., and Kuci, S. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **2003**; 996: 141 - 151.

61. Yang, Z., Schmitt, J. F., and Lee, E. H. Immunohistochemical analysis of human mesenchymal stem cells differentiating into chondrogenic, osteogenic, and adipogenic lineages *Methods Mol.Biol.* **2011**; 698: 353 - 366.

62. Krause, U., Seckinger, A., and Gregory, C. A. Assays of osteogenic differentiation by cultured human mesenchymal stem cells *Methods Mol.Biol.* **2011**; 698: 215 - 230.

63. Kitamura, S., Ohgushi, H., Hirose, M., Funaoka, H., Takakura, Y., and Ito, H. Osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on alumina ceramics *Artif.Organs* **2004**; 28: 72 - 82.

64. Tataria, M., Quarto, N., Longaker, M. T., and Sylvester, K. G. Absence of the p53 tumor suppressor gene promotes osteogenesis in mesenchymal stem cells *J.Pediatr.Surg.* **2006**; 41: 624 - 632.

65. Lai, Y., Sun, Y., Skinner, C. M., Son, E. L., Lu, Z., Tuan, R. S., Jilka, R. L., Ling, J., and Chen, X. D. Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix ex vivo: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells *Stem Cells Dev.* **2010**; 19: 1095 - 1107.

66. Soncini, M., Vertua, E., Gibelli, L., Zorzi, F., Denegri, M., Albertini, A., Wengler, G. S., and Parolini, O. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes *J.Tissue Eng Regen.Med.* **2007**; 1: 296 - 305.

67. Dmitrieva, R. I., Minullina, I. R., Bilibina, A. A., Tarasova, O. V., Anisimov, S. V., and Zaritskey, A. Y. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities *Cell Cycle* **2012**; 11: 377 - 383.

68. Zhang, Z. Y., Teoh, S. H., Chong, M. S., Schantz, J. T., Fisk, N. M., Choolani, M. A., and Chan, J. Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells *Stem Cells* **2009**; 27: 126 - 137.

69. Neuhuber, B., Swanger, S. A., Howard, L., Mackay, A., and Fischer, I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics *Exp.Hematol.* **2008**; 36: 1176 - 1185.

70. Miranda, S. C., Silva, G. A., Hell, R. C., Martins, M. D., Alves, J. B., and Goes, A. M. Three-dimensional culture of rat BMMSCs in a porous chitosan-gelatin scaffold: A promising association for bone tissue engineering in oral reconstruction *Arch.Oral Biol.* **2011**; 56: 1 - 15.

71. Vacanti, V., Kong, E., Suzuki, G., Sato, K., Canty, J. M., and Lee, T. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture *J.Cell Physiol* **2005**; 205: 194 - 201.

72. Lu, H., Kawazoe, N., Tateishi, T., Chen, G., Jin, X., and Chang, J. In vitro proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured with hardystonite (Ca2ZnSi 2O7) and {beta}-TCP ceramics *J.Biomater.Appl.* **2010**; 25: 39 - 56.

73. Akahane, M., Nakamura, A., Ohgushi, H., Shigematsu, H., Dohi, Y., and Takakura, Y. Osteogenic matrix sheet-cell transplantation using osteoblastic cell sheet resulted in bone formation without scaffold at an ectopic site *J.Tissue Eng Regen.Med.* **2008**; 2: 196 - 201.

74. Clausen, C., Hermund, N. U., Donatsky, O., and Nielsen, H. Characterization of human bone cells derived from the maxillary alveolar ridge *Clin.Oral Implants.Res.* **2006**; 17: 533 - 540.

75. Derfoul, A., Carlberg, A. L., Tuan, R. S., and Hall, D. J. Differential regulation of osteogenic marker gene expression by Wnt-3a in embryonic mesenchymal multipotential progenitor cells *Differentiation* **2004**; 72: 209 - 223.

76. Park, B. W., Hah, Y. S., Kim, D. R., Kim, J. R., and Byun, J. H. Osteogenic phenotypes and mineralization of cultured human periosteal-derived cells *Arch.Oral Biol.* **2007**; 52: 983 - 989.

77 Xue, Y., Xing, Z., Hellem, S., Arvidson, K., and Mustafa, K. Endothelial cells influence the osteogenic potential of bone marrow stromal cells *Biomed.Eng Online.* **2009**; 8: 34 -

78. Pereira, C. T., Huang, W., Jarrahy, R., Rudkin, G., Yamaguchi, D. T., and Miller, T. A. Human and mouse osteoprogenitor cells exhibit distinct patterns of osteogenesis in three-dimensional tissue engineering scaffolds *Plast.Reconstr.Surg.* **2009**; 124: 1869 - 1879.

79. Karystinou, A., Dell'Accio, F., Kurth, T. B., Wackerhage, H., Khan, I. M., Archer, C. W., Jones, E. A., Mitsiadis, T. A., and De Bari, C. Distinct mesenchymal progenitor cell subsets in the adult human synovium *Rheumatology.(Oxford)* **2009**; 48: 1057 - 1064.

80. Wagner, J., Kean, T., Young, R., Dennis, J. E., and Caplan, A. I. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics *Curr.Opin.Biotechnol.* **2009**; 20: 531 - 536.

81. Agholme, F. and Aspenberg, P. Wnt signaling and orthopedics, an overview *Acta Orthop.* **2011**; 82: 125 - 130.

82. Logan, C. Y. and Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **2004**; 20: 781 - 810.

83. Day, T. F., Guo, X., Garrett-Beal, L., and Yang, Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis *Dev.Cell* **2005**; 8: 739 - 750.

84. Glass, D. A. and Karsenty, G. In vivo analysis of Wnt signaling in bone *Endocrinology* **2007**; 148: 2630 - 2634.

85. Fazzi, R., Pacini, S., Carnicelli, V., Trombi, L., Montali, M., Lazzarini, E., and Petrini, M. Mesodermal progenitor cells (MPCs) differentiate into mesenchymal stromal cells (MSCs) by activation of Wnt5/calmodulin signalling pathway *PLoS.One.* **2011**; 6: e25600 -

86. Galli, C., Passeri, G., and Macaluso, G. M. Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation *J.Dent.Res.* **2010**; 89: 331 - 343.

87. Rodda, S. J. and McMahon, A. P. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors *Development* **2006**; 133: 3231 - 3244.

88. Case, N. and Rubin, J. Beta-catenin--a supporting role in the skeleton *J.Cell Biochem.* **2010**; 110: 545 - 553.

89. Tai, G., Polak, J. M., Bishop, A. E., Christodoulou, I., and Buttery, L. D. Differentiation of osteoblasts from murine embryonic stem cells by overexpression of the transcriptional factor osterix *Tissue Eng* **2004**; 10: 1456 - 1466.

90. Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., and de Crombrugghe, B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation *Cell* **2002**; 108: 17 - 29.

91. Komori, T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors *J.Cell Biochem.* **2005**; 95: 445 - 453.

92. Guillot, P. V., De Bari, C., Dell'Accio, F., Kurata, H., Polak, J., and Fisk, N. M. Comparative osteogenic transcription profiling of various fetal and adult mesenchymal stem cell sources *Differentiation* **2008**; 76: 946 - 957.

93. Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyan, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V., Komm, B. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S., and Lian, J. B. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression *J.Biol.Chem.* **2005**; 280: 33132 - 33140.

94. Lee, M. H., Kim, Y. J., Kim, H. J., Park, H. D., Kang, A. R., Kyung, H. M., Sung, J. H., Wozney, J. M., Kim, H. J., and Ryoo, H. M. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression *J.Biol.Chem.* **2003**; 278: 34387 - 34394.

95. Mohan, S. and Baylink, D. J. Bone growth factors *Clin.Orthop.Relat Res.* **1991**;30 - 48.

96. McCarthy, T. L., Centrella, M., and Canalis, E. Insulin-like growth factor (IGF) and bone *Connect.Tissue Res.* **1989**; 20: 277 - 282.

97. Hamidouche, Z., Fromigue, O., Ringe, J., Haupl, T., and Marie, P. J. Crosstalks between integrin alpha 5 and IGF2/IGFBP2 signalling trigger human bone marrow-derived mesenchymal stromal osteogenic differentiation *BMC.Cell Biol.* **2010**; 11: 44 -

98. Kang, H., Sung, J., Jung, H. M., Woo, K. M., Hong, S. D., and Roh, S. Insulin-like growth factor 2 promotes osteogenic cell differentiation in the parthenogenetic murine embryonic stem cells *Tissue Eng Part A* **2012**; 18: 331 - 341.

99. Quirici, N., Soligo, D., Bossolasco, P., Servida, F., Lumini, C., and Deliliers, G. L. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies *Exp.Hematol.* **2002**; 30: 783 - 791.

100. Alexander, D., Schafer, F., Munz, A., Friedrich, B., Klein, C., Hoffmann, J., Buhring, H. J., and Reinert, S. LNGFR induction during osteogenesis of human jaw periosteum-derived cells *Cell Physiol Biochem.* **2009**; 24: 283 - 290.

101. Dinarello, C. A. Interleukin-1 and its biologically related cytokines *Adv.Immunol.* **1989**; 44: 153 - 205.

102. Dinarello, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease *Blood* **1996**; 87: 2095 - 2147.

103. Dinarello, C. A. Interleukin-1 *Cytokine Growth Factor Rev.* **1997**; 8: 253 - 265.

104. Dewhirst, F. E., Ago, J. M., Peros, W. J., and Stashenko, P. Synergism between parathyroid hormone and interleukin 1 in stimulating bone resorption in organ culture *J.Bone Miner.Res.* **1987**; 2: 127 - 134.

105. Lee, J., Gupta, D., Panetta, N. J., Levi, B., James, A. W., Wan, D., Commons, G. W., and Longaker, M. T. Elucidating mechanisms of osteogenesis in human adipose-derived stromal cells via microarray analysis *J.Craniofac.Surg.* **2010**; 21: 1136 - 1141.

106. Ellies, L. G. and Aubin, J. E. Temporal sequence of interleukin 1 alpha-mediated stimulation and inhibition of bone formation by isolated fetal rat calvaria cells in vitro *Cytokine* **1990**; 2: 430 - 437.

107. Tanabe, N., Ito-Kato, E., Suzuki, N., Nakayama, A., Ogiso, B., Maeno, M., and Ito, K. IL-1alpha affects mineralized nodule formation by rat osteoblasts *Life Sci.* **2004**; 75: 2317 - 2327.

108. Lacey, D. C., Simmons, P. J., Graves, S. E., and Hamilton, J. A. Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation *Osteoarthritis.Cartilage.* **2009**; 17: 735 - 742.

109. Birch, M. A., Ginty, A. F., Walsh, C. A., Fraser, W. D., Gallagher, J. A., and Bilbe, G. PCR detection of cytokines in normal human and pagetic osteoblast-like cells *J.Bone Miner.Res.* **1993**; 8: 1155 - 1162.

110. Blanchard, F., Duplomb, L., Baud'huin, M., and Brounais, B. The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors *Cytokine Growth Factor Rev.* **2009**; 20: 19 - 28.

111. Majumdar, M. K., Thiede, M. A., Haynesworth, S. E., Bruder, S. P., and Gerson, S. L. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages *J.Hematother.Stem Cell Res.* **2000**; 9: 841 - 848.

112. De Benedetti, F. The impact of chronic inflammation on the growing skeleton: lessons from interleukin-6 transgenic mice *Horm.Res.* **2009**; 72 Suppl 1: 26 - 29.

113. Belperio, J. A., Keane, M. P., Arenberg, D. A., Addison, C. L., Ehlert, J. E., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. CXC chemokines in angiogenesis *J.Leukoc.Biol.* **2000**; 68: 1 - 8.

114. Rosenkilde, M. M. and Schwartz, T. W. The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease *APMIS* **2004**; 112: 481 - 495.

115. Kawase, T., Okuda, K., Kogami, H., Nakayama, H., Nagata, M., Nakata, K., and Yoshie, H. Characterization of human cultured periosteal sheets expressing bone-forming potential: in vitro and in vivo animal studies *J.Tissue Eng Regen.Med.* **2009**; 3: 218 - 229.

116. Schipani, E., Maes, C., Carmeliet, G., and Semenza, G. L. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF *J.Bone Miner.Res.* **2009**; 24: 1347 - 1353.

117. Hartwell, L. H. and Kastan, M. B. Cell cycle control and cancer *Science* **1994**; 266: 1821 - 1828.

118. Hunter, T. and Pines, J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age *Cell* **1994**; 79: 573 - 582.

119. Shen, R., Wang, X., Drissi, H., Liu, F., O'Keefe, R. J., and Chen, D. Cyclin D1-cdk4 induce runx2 ubiquitination and degradation *J.Biol.Chem.* **2006**; 281: 16347 - 16353.

120. Ruas, M., Gregory, F., Jones, R., Poolman, R., Starborg, M., Rowe, J., Brookes, S., and Peters, G. CDK4 and CDK6 delay senescence by kinase-dependent and p16INK4a-independent mechanisms *Mol.Cell Biol.* **2007**; 27: 4273 - 4282.

121. Fahham, N., Sardari, S., Ostad, S. N., Vaziri, B., and Ghahremani, M. H. C-terminal domain of p16(INK4a) is adequate in inducing cell cycle arrest, growth inhibition and CDK4/6 interaction similar to the full length protein in HT-1080 fibrosarcoma cells *J.Cell Biochem.* **2010**; 111: 1598 - 1606.

122. Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J. C. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **1996**; 93: 13742 - 13747.

123. Weebadda, W. K., Jackson, T. J., and Lin, A. W. Expression of p16INK4A variants in senescent human fibroblasts independent of protein phosphorylation *J.Cell Biochem.* **2005**; 94: 1135 - 1147.

124. Mohan, S. and Baylink, D. J. IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms *J.Endocrinol.* **2002**; 175: 19 - 31.

125. Amin, S., Riggs, B. L., Atkinson, E. J., Oberg, A. L., Melton, L. J., III, and Khosla, S. A potentially deleterious role of IGFBP-2 on bone density in aging men and women *J.Bone Miner.Res.* **2004**; 19: 1075 - 1083.

126. Baxter, R. C. Changes in the IGF-IGFBP axis in critical illness *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* **2001**; 15: 421 - 434.

127. DeMambro, V. E., Clemmons, D. R., Horton, L. G., Bouxsein, M. L., Wood, T. L., Beamer, W. G., Canalis, E., and Rosen, C. J. Gender-specific changes in bone turnover and skeletal architecture in igfbp-2-null mice *Endocrinology* **2008**; 149: 2051 - 2061.

128. Conover, C. A. and Khosla, S. Role of extracellular matrix in insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 regulation of IGF-II action in normal human osteoblasts *Growth Horm.IGF.Res.* **2003**; 13: 328 - 335.

129. Conover, C. A., Johnstone, E. W., Turner, R. T., Evans, G. L., John Ballard, F. J., Doran, P. M., and Khosla, S. Subcutaneous administration of insulin-like growth factor (IGF)-II/IGF binding protein-2 complex stimulates bone formation and prevents loss of bone mineral density in a rat model of disuse osteoporosis *Growth Horm.IGF.Res.* **2002**; 12: 178 - 183.

130. Conover, C. A. Insulin-like growth factor-binding proteins and bone metabolism *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **2008**; 294: E10 - E14.

131. Palermo, C., Manduca, P., Gazzerro, E., Foppiani, L., Segat, D., and Barreca, A. Potentiating role of IGFBP-2 on IGF-II-stimulated alkaline phosphatase activity in differentiating osteoblasts *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **2004**; 286: E648 - E657.

132. Eckstein, F., Pavicic, T., Nedbal, S., Schmidt, C., Wehr, U., Rambeck, W., Wolf, E., and Hoeflich, A. Insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) overexpression negatively regulates bone size and mass, but not density, in the absence and presence of growth hormone/IGF-I excess in transgenic mice *Anat.Embryol.(Berl)* **2002**; 206: 139 - 148.

133. Firth, S. M. and Baxter, R. C. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins *Endocr.Rev.* **2002**; 23: 824 - 854.

134. Cohen, P. Insulin-like growth factor binding protein-3: insulin-like growth factor independence comes of age *Endocrinology* **2006**; 147: 2109 - 2111.

135. Ressler, S., Radhi, J., Aigner, T., Loo, C., Zwerschke, W., and Sergi, C. Insulin-like growth factor-binding protein-3 in osteosarcomas and normal bone tissues *Anticancer Res.* **2009**; 29: 2579 - 2587.

136. Chen, L., Jiang, W., Huang, J., He, B. C., Zuo, G. W., Zhang, W., Luo, Q., Shi, Q., Zhang, B. Q., Wagner, E. R., Luo, J., Tang, M., Wietholt, C., Luo, X., Bi, Y., Su, Y., Liu, B., Kim, S. H., He, C. J., Hu, Y., Shen, J., Rastegar, F., Huang, E., Gao, Y., Gao, J. L., Zhou, J. Z., Reid, R. R., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., and Deng, Z. L. Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) potentiates BMP-9-induced osteogenic differentiation and bone formation *J.Bone Miner.Res.* **2010**; 25: 2447 - 2459.

137. Sugimoto, T., Nishiyama, K., Kuribayashi, F., and Chihara, K. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) I, IGF-binding protein (IGFBP)-2, and IGFBP-3 in osteoporotic patients with and without spinal fractures *J.Bone Miner.Res.* **1997**; 12: 1272 - 1279.

138. Pye, S. R., Almusalam, B., Boonen, S., Vanderschueren, D., Borghs, H., Gielen, E., Adams, J. E., Ward, K. A., Bartfai, G., Casanueva, F. F., Finn, J. D., Forti, G., Giwercman, A., Han, T. S., Huhtaniemi, I. T., Kula, K., Labrie, F., Lean, M. E., Pendleton, N., Punab, M., Silman, A. J., Wu, F. C., and O'Neill, T. W. Influence of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1 and IGFBP-3 on bone health: results from the European Male Ageing Study *Calcif.Tissue Int.* **2011**; 88: 503 - 510.

139. Wilson, H. M., Birnbaum, R. S., Poot, M., Quinn, L. S., and Swisshelm, K. Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 inhibits proliferation of MCF-7 breast cancer cells via a senescence-like mechanism *Cell Growth Differ.* **2002**; 13: 205 - 213.

140. Burger, A. M., Leyland-Jones, B., Banerjee, K., Spyropoulos, D. D., and Seth, A. K. Essential roles of IGFBP-3 and IGFBP-rP1 in breast cancer *Eur.J.Cancer* **2005**; 41: 1515 - 1527.

141. Ruan, W., Xu, E., Xu, F., Ma, Y., Deng, H., Huang, Q., Lv, B., Hu, H., Lin, J., Cui, J., Di, M., Dong, J., and Lai, M. IGFBP7 plays a potential tumor suppressor role in colorectal carcinogenesis *Cancer Biol.Ther.* **2007**; 6: 354 - 359.

142. Sato, Y., Chen, Z., and Miyazaki, K. Strong suppression of tumor growth by insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1/tumor-derived cell adhesion factor/mac25 *Cancer Sci.* **2007**; 98: 1055 - 1063.

143. Wajapeyee, N., Serra, R. W., Zhu, X., Mahalingam, M., and Green, M. R. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7 *Cell* **2008**; 132: 363 - 374.

144. Chen, D., Yoo, B. K., Santhekadur, P. K., Gredler, R., Bhutia, S. K., Das, S. K., Fuller, C., Su, Z. Z., Fisher, P. B., and Sarkar, D. Insulin-like growth factor-binding protein-7 functions as a potential tumor suppressor in hepatocellular carcinoma *Clin.Cancer Res.* **2011**; 17: 6693 - 6701.

145. Kato, M. V. A secreted tumor-suppressor, mac25, with activin-binding activity *Mol.Med.* **2000**; 6: 126 - 135.

146. Tamura, K., Hashimoto, K., Suzuki, K., Yoshie, M., Kutsukake, M., and Sakurai, T. Insulin-like growth factor binding protein-7 (IGFBP7) blocks vascular endothelial cell growth factor (VEGF)-induced angiogenesis in human vascular endothelial cells *Eur.J.Pharmacol.* **2009**; 610: 61 - 67.

147. Pen, A., Durocher, Y., Slinn, J., Rukhlova, M., Charlebois, C., Stanimirovic, D. B., and Moreno, M. J. Insulin-like growth factor binding protein 7 exhibits tumor suppressive and vessel stabilization properties in U87MG and T98G glioblastoma cell lines *Cancer Biol.Ther.* **2011**; 12: 634 - 646.

148. Yamaguchi, M. and Uchiyama, S. Regucalcin stimulates osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures *J.Cell Biochem.* **2005**; 94: 794 - 803.

149. Tsurusaki, Y. and Yamaguchi, M. Overexpression of regucalcin modulates tumor-related gene expression in cloned rat hepatoma H4-II-E cells *J.Cell Biochem.* **2003**; 90: 619 - 626.

150. Fujita, T. Senescence marker protein-30 (SMP30): structure and biological function *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **1999**; 254: 1 - 4.

151. Nakagawa, T. and Yamaguchi, M. Hormonal regulation on regucalcin mRNA expression in cloned normal rat kidney proximal tubular epithelial NRK52E cells *J.Cell Biochem.* **2005**; 95: 589 - 597.

152. Kurota, H. and Yamaguchi, M. Steroid hormonal regulation of calcium-binding protein regucalcin mRNA expression in the kidney cortex of rats *Mol.Cell Biochem.* **1996**; 155: 105 - 111.

153. Yamaguchi, M. The transcriptional regulation of regucalcin gene expression *Mol.Cell Biochem.* **2011**; 346: 147 - 171.

154. Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J. P., and He, X. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction *Nature* **2000**; 407: 530 - 535.

155. Olsen, H. S., Cepeda, M. A., Zhang, Q. Q., Rosen, C. A., and Vozzolo, B. L. Human stanniocalcin: a possible hormonal regulator of mineral metabolism *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **1996**; 93: 1792 - 1796.

156. Yoshiko, Y., Aubin, J. E., and Maeda, N. Stanniocalcin 1 (STC1) protein and mRNA are developmentally regulated during embryonic mouse osteogenesis: the potential of stc1 as an autocrine/paracrine factor for osteoblast development and bone formation *J.Histochem.Cytochem.* **2002**; 50: 483 - 492.

157. Page-McCaw, A., Ewald, A. J., and Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2007**; 8: 221 - 233.

158. Melendez-Zajgla, J., Del Pozo, L., Ceballos, G., and Maldonado, V. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4. The road less traveled *Mol.Cancer* **2008**; 7: 85 -

159. Alexander, D., Ardjomandi, N., Munz, A., Friedrich, B., and Reinert, S. ECM remodelling components regulated during jaw periosteal cell osteogenesis *Cell Biol.Int.* **2011**; 35: 973 - 980.

160. Choi, Y. S., Noh, S. E., Lim, S. M., Lee, C. W., Kim, C. S., Im, M. W., Lee, M. H., and Kim, D. I. Multipotency and growth characteristic of periosteum-derived progenitor cells for chondrogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation *Biotechnol.Lett.* **2008**; 30: 593 - 601.

161. Dennis, J. E., Esterly, K., Awadallah, A., Parrish, C. R., Poynter, G. M., and Goltry, K. L. Clinical-scale expansion of a mixed population of bone-marrow-derived stem and progenitor cells for potential use in bone-tissue regeneration *Stem Cells* **2007**; 25: 2575 - 2582.

162. Marom, R., Shur, I., Solomon, R., and Benayahu, D. Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells *J.Cell Physiol* **2005**; 202: 41 - 48.

163. Chen, D., Shen, H., Shao, J., Jiang, Y., Lu, J., He, Y., and Huang, C. Superior mineralization and neovascularization capacity of adult human metaphyseal periosteum-derived cells for skeletal tissue engineering applications *Int.J.Mol.Med.* **2011**; 27: 707 - 713.

164. Liu, F., Malaval, L., and Aubin, J. E. Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation *J.Cell Sci.* **2003**; 116: 1787 - 1796.

165. Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R. M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D. B., Ide, C., Horan, T. P., Arakawa, T., Yoshida, H., Nishikawa, S., Itoh, Y., Seiki, M., Itohara, S., Takahashi, C., and Noda, M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis *Cell* **2001**; 107: 789 - 800.

8. Danksagungen

- Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Reinert für das spannende Thema, das ich im Labor der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie bearbeiten durfte sowie für die Bereitschaft das Zweitgutachten meiner Dissertation zu übernehmen. Zudem danke ich ihm für die Finanzierung und die Begleitung meiner Arbeit, sowie das rege Interesse an meinem Projekt.

- Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Stevanović danke ich herzlich für die Betreuung meiner Arbeit und die Übernahme des Erstgutachtens.

- Frau Dr. Dorothea Alexander-Friedrich gilt mein besonderer Dank für die Betreuung und Anleitung im Labor, für die Unterstützung in allen Fragen bezüglich meiner Arbeit, die hilfreichen Impulse zur Versuchsdurchführung und die fachliche Anleitung.

- Meiner Kollegin und Mitdoktorandin Nina Ardjomandi danke ich sehr für die Einführung in die Zellkultur und die Unterstützung im Laboralltag, sowie den fruchtbaren gedanklichen Austausch während meiner Zeit im Labor.

- Mein Dank gilt weiterhin Heidi Munz für die Hilfestellung bei Fragen zur Immunhistochemie und den kleinen Kniffen des Laboralltags.

- Besonderes danke ich auch meiner Kollegin Melanie Rieger für die Unterstützung im Labor, für die Urlaubsbetreuung meiner Zellen und die unterhaltsame und kurzweilige Zusammenarbeit.

- Mein herzlicher Dank gilt Dr. Dr. Martin Grimm für die Schnelleinführung in die Statistik und die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

- Weiterhin danke ich Herrn Dr. Axmann für Erläuterungen zu statistischen Fragen.

- Mein Dank gilt Jan Niederländer aus der AG Wendel für die Unterstützung bei den FACS-Messungen und die Hilfe im Umgang mit dem FACS-Gerät.

- Ich danke meinen Eltern, die mich in meinem beruflichen Werdegang immer unterstützt haben, meine Tätigkeit nie in Frage stellten und mir das Studium und somit in letzter Konsequenz die Doktorarbeit ermöglichten.

- Meiner Schwester danke ich für die Aufmunterung in zähen Zeiten, sowie den fruchtbaren Austausch sowie das Mitfühlen und Mitleiden.

- Ganz besonders danke ich meiner Frau Andrea für ihre Unterstützung während den Höhen und Tiefen meiner Doktorandenzeit und die unermüdlichen Motivationshilfen besonders während der Phase des Schreibens, die mir regelmäßig neuen Aufwind gegeben haben, sowie den ständigen Rückhalt und die Kraft, die ich von ihr bekomme.

9. Lebenslauf

Name	Marcus Olbrich
Geburtstags	17.05.1982
Geburtsort	Sindelfingen

Schulbildung

06/2002	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Eduard-Spranger-Gymnasium in Filderstadt

Hochschulbildung

September 2003 - September 2008	Studium der **Biologie** an der Universität Hohenheim Vertiefung: Zoologie, Tierökologie, Parasitologie, Pflanzenphysiologie, BWL für Biologen, Metalle in biologischen Systemen

Promotion

April 2009 - März 2012	Doktorarbeit zum Dr. rer. nat. am Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Thema: Funktionelle Charakterisierung von Zellsubpopulationen aus dem Periost anhand magnetischer Zellseparationen

Wissenschaftliche Tätigkeit

Seit April 2012	wissenschaftlicher Angestellter Universitätsklinikum Tübingen Innere Medizin III, Kardiologie (Immunokardiologie)

Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

MSCA-1/TNAP selection of human jaw periosteal cells improves their mineralization capacity.
Alexander D, Schäfer F, Olbrich M, Friedrich B, Bühring HJ, Hoffmann J, Reinert S.
Cell Physiol Biochem. 2010; 26 (6):1073-80. Epub 2011 Jan 4.

Isolation of osteoprogenitors from human jaw periosteal cells: a comparison of two magnetic separation methods
Olbrich M, Rieger M, Reinert S, Alexander D.
PLoS One. 2012; 7 (10):e47176. Epub 2012 Oct 19.

Kongressbeiträge

Mündliche Präsentationen:

WCRM (World Conference on Regenerative Medicine), Leipzig, 2011:
Proliferation potential of the MSCA-1^+ subpopulation isolated from jaw-periosteum

WCPRM (5^{th} World Congress on Preventive and Regenerative Medicine), Hannover, 2010:
Separation and characterization of osteoprogenitors from the entire periosteum-derived tissue.

Posterbeiträge:

61. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie; Bamberg, 2011:
Untersuchungen zur Proliferationsfähiglkeit der osteogenen MSCA-1 (mesenchymal stem cell antigen-1) Subpopulation aus dem Kieferperiost.
Olbrich M, Ardjomandi N, Alexander D, Reinert S.