

Aus der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Lokalisation, Proliferation und Differenzierung von STRO-1-positiven Zellen
aus dem Geweih von Damhirschen (Dama dama)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Natascha Seymour

aus
Paderborn

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K. G. Wiese

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Miosge

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2010

Inhaltsverzeichnis

I Abbildungsverzeichnis

II Tabellenverzeichnis

III Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung und Aufgabenstellung	3
2	Material und Methoden	4
2.1	Histologie und Elektronenmikroskopie	4
2.2	Zellkultur	4
2.2.1	Isolierung und Expansion der STRO-1 ⁺ -DHGZ.....	5
2.2.2	Kryokonservierung	6
2.2.3	Medien und Zusätze	6
2.2.4	Auftauen der STRO-1 ⁺ -DHGZ und Kultivierung	7
2.2.5	Trypsinierung und Probengewinnung	8
2.3	Zellkulturen	9
2.3.1	Dokumentation der Wachstumsstruktur	9
2.3.2	Fluoreszenzmikroskopie und Histomorphometrie der Calceineinlagerung	9
2.4	Proteinanalyse	10
2.4.1	Osteokalzin ELISA	10
2.4.2	Bestimmung der Alkalischen Phosphatase	11
2.5	RNA-Gewinnung und Analyse	11
2.5.1	RNA-Isolation.....	12
2.5.2	Durchführung der RT-PCR	12
2.6	Auswertung der Ergebnisse	15
3	Ergebnisse	17
3.1	Histologie	17
3.2	Isolation der STRO-1 ⁺ -DHGZ.....	17

3.3	Wachstumsverhalten der STRO-1 ⁺ -Zellen	20
3.4	Calceineinlagerung	24
3.5	Differenzierungsverhalten der STRO-1 ⁺ -Zellen.....	27
3.5.1	Genexpression im zeitlichen Verlauf.....	27
3.5.2	Expression von Cbfa1 und Kollagen 1α1	28
3.5.3	Alkalische Phosphatase.....	30
3.5.4	Osteokalzinexpression und -konzentration	31
4	Diskussion	33
4.1	Methodik	33
4.2	Ergebnisse	33
5	Zusammenfassung	44
6	Anhang: Tab. 2 bis 5	46
7	Literaturverzeichnis	51

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** STRO-1⁺-Zellen in der Wachstumsschicht des Perichondriums und der Knorpelzone eines Geweihs. 18
- Abb. 2** Diagramme der FACS-Analyse der Damhirschgeweihzellen (DHGZ) und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (REM) von Zellkulturen. 19
- Abb. 3** Fluoreszenzaufnahmen von STRO-1⁺-Damhirschgeweihzellen. 20
- Abb. 4** Zeitabhängige Proliferation der STRO-1⁺-Damhirschgeweihzellen in den verschiedenen Kulturmedien. 22
- Abb. 5** Darstellung der Zunahme des Zellwachstums pro Tag und Zeitreihenaufnahmen der STRO-1⁺-Zellen vor und nach konfluierendem Wachstum in den verschiedenen Medien. 23
- Abb. 6** Mehrkanalaufnahmen der Calceineinlagerungen der STRO-1⁺-Damhirschgeweihzellen in den verschiedenen Kulturmedien im zeitlichen Verlauf. 25
- Abb. 7** Calceinaufnahme und Intensität der Calceinfluoreszenz in DMEM, Osteoblasten- und Neuroblastenmedium. 26
- Abb. 8** Gesamtumsatz des Calceins über die Zeit von Tag 5 bis Tag 21 in den Zellen der jeweiligen Medien der Zellkulturen. 27

-
- Abb. 9** Zeitabhängige Expression von Kollagen 1 α 1, Osteokalzin (OCN) und Cbfa1 in den verschiedenen Medien. 28
- Abb. 10** Relative Intensität der Expression von Cbfa1 (a) und Kollagen 1 α 1 (b) bezogen auf Tag 0 im zeitlichen Verlauf. 29
- Abb. 11** Konzentration der Alkalischen Phosphatase in Abhängigkeit von der Dauer der Kultur der STRO-1⁺-Zellen. 30
- Abb. 12** Osteokalzinkonzentration und –expression der STRO-1⁺-Zellen in der Kultur. 32
- Abb. 13** Expressionsmuster von Kollagen (Coll), Alkalischer Phosphatase (AP) und Osteokalzin (OC), sowie die Ca²⁺-Ablagerung während der Osteoblastenentwicklung im zeitlichen Verlauf (modifiziert nach Stein et al. 1996, 596). 38

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Primersequenzen der verwendeten Marker für die PCR	13
Tab. 2	Medien und Zusätze	46
Tab. 3	Labormaterialien und -geräte	48
Tab. 4	Zuordnung der RNA-Proben des 1. Versuchs	50
Tab. 5	Zuordnung der RNA-Proben des 2. Versuchs	50

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
AP	Antlerogenic Periosteum
Aqua Dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Cbfa1	Core binding factor alpha 1
CCD	Cleidocraniale Dysplasie
cDNA	copy Desoxyribonucleinsäure
CFU-F	Colony Forming Unit-Fibroblasten
CO ₂	Kohlendioxid
Col.	Kollagen
DHGZ	Damhirschgeweihzellen
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fötales Bovines Serum
F _f	Fluoreszenzfläche
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
F _m	Messfläche
for.	forward
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase

HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O	Wasser
IGF	Insulin-like growth-factor
IgM-AK	Immunglobuline der Klasse M
I _m	durchschnittliche Intensität
I _t	totale Intensität
KM-Zellen	Knochenmarkszellen
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger RNA
MSCs	mesenchymal stem cells
NaCl	Natriumchlorid
NB	Neurobasal Medium
NGF	Nerve growth factor
OB	Osteoblasten Growth Medium
OCN	Osteokalzin
OSE2	osteoblast-spezifisch cis-actin element 2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
STRO-1	stromal cell surface marker-1
Tab.	Tabelle
TBE	Tri-Borate-EDTA
TMB	Tetramethylbenzidin

1 Einleitung

Die Geweihe der Cerviden sind das einzige Beispiel für Anhangsorgane bei Säugetieren, die die Fähigkeit besitzen, sich jährlich neu zu regenerieren. Geweihe sind komplexe Gebilde, die aus Haut, Nerven, Blutgefäßen, Bindegewebe, Knorpel und Knochen bestehen. Nach Abwurf des alten Geweihs entstehen sie neu auf der Grundlage von permanenten, knöchernen Höckern am Stirnknochen der Hirsche. Diese Höcker, sowie das erste Geweih, bilden sich in der Pubertät unter dem Einfluss von Testosteron aus einem spezialisierten Periost, das zuerst von Hartwig und Schrudde (1974) beschrieben wurde. Wird dieses von Goss als „antlerogenic periosteum“ (AP) bezeichnete Gewebe an heterotope Lokalisationen transplantiert, so kommt es dort zu einem ektopen Geweihwachstum (Goss und Powel 1985, Kierdorf U und Kierdorf H 1992, 2001). Zellen des AP haben vergleichbar mit embryonalen Zellen die Fähigkeit zur Selbstdifferenzierung. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Geweihwachstum der embryonalen Entwicklung von Gliedmaßen bei Säugetieren gleicht (Li und Suttie 2001).

Wachstum und Abwurf der Geweihstangen zeigen einen festgelegten, zyklischen Jahresverlauf, der stark an die Brunftzeit der Tiere und die damit verbundenen Konzentrationsschwankungen des Sexualhormonspiegels gekoppelt ist. Diese Schwankungen sind direkt abhängig von den jahreszeitspezifischen Tageslichtveränderungen, wie Studien zur Abhängigkeit von Photoperiodik und Hormonkonzentration zeigen konnten (Rolf und Fischer 1996). Mit fallendem Testosteronspiegel im Frühjahr werden die alten Geweihe abgeworfen. Der Zeitraum zwischen Abwurf des alten und der Regeneration eines neuen Geweihs variiert je nach Spezies. So kann die Regeneration mehrere Monate herausgezögert werden oder sich wie bei den Rothirschen direkt anschließen (Price und Allen 2004).

Das Längenwachstum ist sehr schnell und repräsentiert die höchste Rate an Knochenneubildung, die in der Welt der Säugetiere beschrieben wurde (Bubenik 2001). Der Mechanismus dieser enormen Knochenneubildung von bis zu 2 cm pro Tag ist zurzeit in weiten Teilen noch ungeklärt. Das Längenwachstum geht von einer distalen Wachstumszone aus. Diese teilt sich in eine Proliferationszone mesenchymaler Zellen, eine Knorpelvorläuferzone und eine Zone reifen Knorpels auf

(Sadighi et al. 2001, Kierdorf U et al. 2003). Das enchondrale Längenwachstum wird erst durch den steigenden Testosteronspiegel zu Beginn der Brunft im Herbst gestoppt. Das Geweih wird dann vollständig mineralisiert. Die umgebende Haut (der Bast) wird dünner und schließlich gefegt, so dass der blanke Geweihknochen zum Vorschein kommt (Price et al. 2005).

Da Hirschgeweihzellen eine hohe Wachstumsrate aufweisen, bieten sie eine gute Grundlage zur Erforschung der Osteogenese in vitro. Außerdem kann das Hirschgeweih als Modell zur Klärung der Frage dienen, warum hier die Fähigkeit zur Regeneration eines kompletten Organs erhalten blieb, wohingegen sie bei Menschen und anderen Säugern verloren ging. In den vergangenen Jahren wurden durch Zellkulturversuche einige Faktoren gefunden, die die Proliferation und Differenzierung der Hirschgeweihzellen beeinflussen. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass IGF-1 und IGF-2 in vitro die Proliferation von Zellen aus der so genannten mesenchymalen Wachstumszone in der Spitze des sich regenerierenden Geweihs stimulieren (Price et al. 1994; Sadighi et al. 1994). Von welchen Zellen die Regeneration ausgeht, ist jedoch bisher noch unklar. Dennoch wird vermutet, dass im Periost der zurückbleibenden Geweihstümpfe eine Population von Vorläuferzellen existieren muss, von der die Regeneration ausgeht (Kierdorf U und Kierdorf H 1992, 2000, 2001; Li et al. 2005). Cegielski et al. zeigten 2006, dass Zellen des AP während des Wachstums mit in die Spitze des Geweihs aufsteigen. Deletionsversuche haben belegt, dass das Periost des Rosenstocks, unabhängig vom Geweihknochen, die Fähigkeit besitzt, in Interaktion mit der Haut, Geweihe an ektopen Lokalisationen zu regenerieren (Li et al. 2007a). Dennoch konnte bis in jüngster Zeit nicht geklärt werden, ob die Geweihregeneration auf einer Dedifferenzierung von Zellen im Bereich der Abwurfwunde oder, wie bereits spekulativ angenommen, auf einer Aktivierung von Stammzellen beruht. Der Stammzellbezug wurde erst durch den Nachweis von STRO-1⁺-Damhirschgeweihzellen im Rosenstock und im regenerierenden Geweihknochen durch unsere Arbeitsgruppe erbracht (Napp et al. 2006, Rolf et al. 2006, 2008). Zusammenfassend stellt das regenerierende Geweih daher ein interessantes Modell für die Stammzellforschung dar. Da Geweihe röhrenknochenähnliche Strukturen aufweisen und enorme Wachstumsgeschwindigkeiten zeigen, ist die Entschlüsselung der Mechanismen dieses rapiden Wachstums und der zusammenspielenden Faktoren möglicherweise von

medizinisch-klinischer Bedeutung und für die Knochenforschung von hohem Interesse.

1.1 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war es daher, das Wachstums- und Differenzierungsverhalten von STRO-1⁺-Damhirschgeweizellen (DHGZ) in vitro unter dem Einfluss verschiedener Medien und Faktoren zu untersuchen. Humane Zellen, welche sich mit dem monoklonalen Marker STRO-1 (stromal cell surface marker-1) isolieren lassen, stellen mesenchymale Vorläuferzellen dar (Gronthos et al. 1994; Dennis et al. 2002). In unseren Versuchen sollte nun gezeigt werden, ob es sich bei STRO-1⁺-Damhirschgeweizellen ebenfalls um mesenchymale Vorläuferzellen handelt. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob es möglich ist, diese durch gezielten Einsatz bestimmter Medien in ihrem Wachstums- und Differenzierungsverhalten zu beeinflussen. Im Mittelpunkt des Interesses stand die Frage, ob durch Zugabe spezieller Medien die STRO-1⁺-Zellen in osteoblastäre oder neurogene Zelllinien differenzieren.

2 Material und Methoden

Der dieser Arbeit zu Grunde liegende Versuch wurde zur Bestätigung der gewonnenen Daten unter gleichen Bedingungen zweimal durchgeführt. Änderungen bezüglich der Expansionsdauer der STRO-1⁺-Zellen, der Versuchsdauer und der Probengewinnung, die im zweiten Durchgang vorgenommen wurden, werden im Weiteren genauer beschrieben. Die Daten beider Durchgänge flossen gleichwertig in die Endauswertung ein. Eine Liste der verwendeten Materialien und Zusätze findet sich in Tab. 2 und 3 im Anhang.

2.1 Histologie und Elektronenmikroskopie

Zur Gewinnung einer Histologie und zur Lokalisation möglicher STRO-1⁺Zellen in der Geweihwachstums- und Knorpelzone wurden Gewebeproben in Paraffin gebettet und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) eingefärbt. Anschließend wurde eine immunhistochemische Färbung mit monoklonalem STRO-1-Antikörper in Kombination mit einem Anti-mouse-IgM-Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-konjugierten Antikörper durchgeführt. Die Zellkerne wurden zur genaueren Darstellung mit Hoechst 33342 eingefärbt, so dass sie sich vom Soma der Zellen abheben. Negativ-Kontrollen wurden ausschließlich mit Hoechst 33342 und Anti-mouse-IgM FITC-konjugiertem Antikörper markiert. Zur Inkubation wurden die Proben 30 Sekunden bei 123°C in eine mikroprozessorgesteuerte Druckkammer eingebracht.

Sowohl von den aus Geweihstanzmaterial gewonnenen Mischkulturen als auch von isolierten STRO-1⁺Zellen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierzu wurden die Zellen in Glutaraldehyd fixiert und stufenweise mit Ethanol dehydriert. Danach erfolgte eine Kritischer-Punkt-Trocknung. Die Proben wurden mit Gold-Palladium bedampft und mit dem Zeiss DSM 960 Elektronenmikroskop dargestellt.

2.2 Zellkultur

Für die im Folgenden beschriebenen Differenzierungsversuche wurden STRO-1⁺-Damhirschgeweihzellen (DHGZ) verwendet. Die DHGZ stammten aus der

Mischkultur einer Geweihstanze, die von einem adulten Damhirsch ca. 1 cm unterhalb der Geweihspitze aus der Wachstumszone entnommen wurde.

2.2.1 Isolierung und Expansion der STRO-1⁺-DHGZ

Da als Grundlage der Versuche eine möglichst reine STRO-1-Population festgelegt wurde, musste zunächst eine Isolation der STRO-1⁺-Zellen aus der Mischkultur erfolgen. Hierzu wurde eine FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) durchgeführt. Dieses Verfahren erlaubt die Isolierung hochreiner Zellpopulationen. Hierzu wird eine Zellsuspension mit einem monoklonalen Antikörper und einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Mit Hilfe eines Lasers können anschließend die Eigenschaften der Zellen auf Grund der Lichtstreuung und der Fluoreszenzintensität analysiert und die Zellen entsprechend sortiert werden. In diesen Versuchen wurde monoklonaler anti-humaner STRO-1-Antikörper verwendet, der von Mäusen gewonnen wurde. Zunächst wurden die Zellen durch Trypsinierung aus dem Zellverband der Mischkulturen gelöst und abzentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 4 µl STRO-1-Antikörper, wurde die Suspension für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen und in 200 µl PBS resuspendiert wurden, erfolgte die Zugabe von 2 µl Anti-mouse-IgM-Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-konjugiertem Antikörper. Die Suspension wurde wiederum für 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach erneutem Waschen und Resuspension in 200 µl PBS erfolgte die FACS-Analyse der Zellen. Diese wurde in der Abteilung Hämatologie/Onkologie des Klinikums Göttingen (Prof. Dr. Trümper /Prof. Dr. Wulf) durchgeführt. Die Analyse und Sortierung erfolgte mit dem FACS Vantage™ SE der Firma Becton Dickinson. Die isolierten STRO-1⁺-DHGZ wurden zur Expansion der verfügbaren Zellmenge zunächst in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) in Kultur genommen und bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Die Anzucht erfolgte in 75 cm³ Kulturflaschen, wobei täglich ein Medien austausch durchgeführt wurde. Die im ersten Versuchsdurchlauf verwendeten Zellen wurden über 23 Tage, die Zellen des zweiten Durchgangs über 36 Tage expandiert, bis eine ausreichende Zellzahl erreicht war. Nach dieser Zeit wurden die Zellen durch Trypsinierung aus der Kultur gelöst und bis zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

2.2.2 Kryokonservierung

Die gewonnenen Zellen wurden in Kryoröhrchen aufgeteilt und mit 1 ml des Einfriermediums versetzt. Als Einfriermedium wurde DMEM mit Zusatz von 20% FBS (Fötale Bovines Serum) verwendet. Um Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle sowie partielle Dehydratation des Zytoplasmas zu vermeiden, wurde außerdem 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) zugegeben. Zum Schutz der Zellen wurde der NALGENE Cryo 1°C Freezing Container eingesetzt, der einen langsamen und stufenweise erfolgenden Abkühlvorgang ermöglicht. Durch den Einsatz von 100%igem Isopropylalkohol wird eine konstante kontrollierte Abkühlrate von -1°C/Minute erreicht. Nach dem 24-stündigen Einfriervorgang wurden die Proben zur dauerhaften Konservierung in einen Behälter mit Flüssigstickstoff mit einer Temperatur von -180°C überführt.

2.2.3 Medien und Zusätze

Es erfolgten parallel drei verschiedene Ansätze der Versuche mit unterschiedlichen Medien, um Unterschiede im Proliferations- und Differenzierungsverhalten zu provozieren:

1. STRO-1⁺-DHGZ in Standardkulturmedium (DMEM)
2. STRO-1⁺-DHGZ in Osteoblasten Growth Medium (OB)
3. STRO-1⁺-DHGZ in Neurobasal Medium (NB) mit Zusatz von 50ng/ml Nerve Growth Factor (NGF)

Zusammensetzung und Herkunft der verwendeten Medien und Zusätze sind der Tabelle 2 im Anhang zu entnehmen.

Der Medienansatz erfolgte nach folgendem Schema:

1. 500 ml DMEM + 10% FBS (50 ml) + 2%Gentamycin (10 ml)
2. 500 ml Osteoblasten Growth Medium + 10% Supplementmix (50 ml)
(beinhaltet 10% FKS) + 2% Gentamycin (10 ml)
3. 500 ml Neurobasal Medium + 1% L-Glutamin (5 ml) + 10% FBS (50 ml) + 2% Gentamycin (10 ml)

Für den Ansatz des NGF wurden zunächst 100 µl NGF in 1 ml Aqua Dest. mit 1% BSA (10 µl) aufgelöst. Diese 1 ml Stammlösung enthielten 100 µg NGF. Um eine feste Konzentration von 50 ng/ml zugeben zu können, wurde die Stammlösung in fünf sterile Eppendorf-Cups a 200 µl aufgeteilt. Eine dieser Portionen wurde wiederum in 10 Portionen a 20 µl aufgeteilt und mit den anderen eingefroren. Am jeweiligen Fütterungstag wurde ein 20 µl-Eppendorf-Cup mit 40 ml Neurobasal Medium verdünnt. So enthielt jeder Milliliter 50 ng NGF. Die erstmalige Zugabe des NGF wurde am Folgetag des Versuchsansatzes durchgeführt. Da an diesem Versuchstag kein Medienwechsel erfolgte, musste der NGF direkt zugegeben werden. Dafür wurde zu 20 µl der Stammlösung 980 µl Neurobasal Medium gegeben, so dass 25 µl dieser Gebrauchslösung im Anschluss 50 ng NGF enthielten.

2.2.4 Auftauen der STRO-1⁺-DHGZ und Kultivierung

Am Starttag der Versuche wurde ein Kryoröhrchen mit STRO-1⁺-DHGZ aus dem Stickstoff genommen und im Wasserbad bei 37°C langsam aufgetaut. Als Kulturgefäße wurden 24-Well-Platten verwendet. Entsprechend der Vorgabe, dass jedes Well 1 ml Kulturmedium und eine Ausgangszellzahl von 20000 Zellen/Well enthalten sollte, wurde die Zellsuspension aufgeteilt und mit dem jeweiligen Medium verdünnt. Die Zellzählung erfolgte mit dem CASY-Cell-Counter- und Analyse-System, welches über elektronische Pulsflächenanalyse mit integrierter Aggregationskorrektur die Zellzahl ermittelt. Zusätzlich wurden zur Beobachtung und zum Fotografieren der Zellen auf einer 6-Well-Platte zwei Wells mit 3 ml des jeweiligen Mediums und einer Ausgangszellzahl von 60000 Zellen/Well beimpft. Jeweils einem dieser Wells wurde 1% Calcein zugesetzt. Über den gesamten Zeitraum des Versuches hinweg wurden die Platten im Brutschrank bei 37°C und 10% CO₂ aufbewahrt. Zur Bestimmung der Osteokalzinausgangswerte wurde von jedem Medium eine Probe gewonnen und bei -20°C eingefroren. Zusätzlich wurden aus dem Teil der Zellsuspension der STRO-1⁺-DHGZ, der mit DMEM verdünnt wurde, Zellen zur ALP- (Alkalische Phosphatase) und RNA-Ausgangswertebestimmung gewonnen. Hierzu wurde jeweils 1 ml (entspricht 20000 Zellen) der Zellsuspension in Eppendorf-Cups überführt. Diese wurden zunächst 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert, anschließend der Überstand vorsichtig bis zum Zellpellet abgenommen, mit PBS gespült und erneut 5 Minuten bei

500 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde erneut abgenommen und verworfen. Zu dem Zellpellet zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (ALP) wurde 110 µl Fluitest ALP hinzugefügt. Zu den Zellpellets zur RNA-Gewinnung wurden jeweils 350 µl RLT-Lysepuffer gegeben. Alle so gefüllten Eppendorf-Cups wurden bei -20°C eingefroren.

2.2.5 Trypsinierung und Probengewinnung

Der erste Durchgang des Versuchs wurde für eine Dauer von 22 Tagen angesetzt. Für den zweiten Durchgang wurde die Laufzeit auf 32 Tage verlängert. Die Zählung der Zellen und der Medienwechsel erfolgten jeweils montags, mittwochs und freitags. An den Zähltagen wurden von jeweils drei Wells die Überstände gewonnen. Diese wurden in Eppendorf-Cups abgefüllt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren. Nach Abnahme der Überstände wurden die adhärennten Zellen durch Trypsinierung gelöst. Hierzu wurden die Wells zunächst gut mit PBS gespült, da geringe Restmengen an Medium die Trypsinwirkung beeinflussen können. Anschließend wurden 700 µl Trypsin zugegeben und die Platten zur Inkubation für 5 Minuten zurück in den Brutschrank gegeben. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion durch die Zugabe von 700 µl DMEM gestoppt. Die gelösten Zellen wurden nun samt dem Medium in Eppendorf Cups überführt.

Zur Zellzählung mit dem CASY-Cell-Counter wurden aus jedem Eppendorf Cup 100 µl der Zellsuspension abgenommen. Da das CASY-Cell-Counter System die Zellzahl als Konzentration in Zellzahl/ml ermittelt, für die Auswertung dieser Versuche aber die absolute Zellzahl eines Wells von Interesse war, mussten die gewonnenen Werte aufgrund der Suspensionsmenge mit 1,4 multipliziert werden. Im zweiten Durchgang des Versuchs wurden nur jeweils 500 µl Trypsin und entsprechend 500 µl Stopplösung eingesetzt. Somit entsprach die angegebene Konzentration der absoluten Zellzahl.

Aus der übrigen Suspension wurden, wie oben beschrieben, die Zellen isoliert. Die Zellen aus jeweils zwei Wells wurden zur RNA-Analyse und die Zellen aus einem anderen Well zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase verwendet. Aus Mangel an Wells mit gut gewachsenen Zellen wurden im ersten Durchgang am 4., 5., 6. und 7. Zähltag nur zwei Wells mit DMEM und am 9. Zähltag nur zwei Wells mit Osteoblasten Growth Medium trypsinisiert, gezählt und weiterbehandelt. Damit stand

nur jeweils ein Well zur RNA-Gewinnung zur Verfügung. Im zweiten Versuchsdurchlauf wurden jeweils vier Wells pro Medium und Zähltag abgenommen, wobei aus zwei Wells die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase und des Osteokalzins erfolgte, und die anderen beiden Wells zur RNA-Gewinnung und zur Bestimmung der Zellzahl verwendet wurden.

Von den am jeweiligen Zähltag nicht verwendeten Wells der 24-Well-Platten wurden die Überstände abgenommen, verworfen und durch jeweils 1 ml des frischen Mediums ersetzt.

2.3 Zellkulturen

2.3.1 Dokumentation der Wachstumsstruktur

Zur Dokumentation der Wachstumsstruktur dienten die Zellen in der 6-Well-Platte. Vor dem Mikroskopieren wurden von den Wells ohne Calceinzugabe die Überstände abgenommen und durch 3 ml des jeweiligen frischen Mediums ersetzt. Anschließend wurden die Wells unter dem Mikroskop in verschiedenen Vergrößerungsstufen analysiert, um das Wachstumsverhalten und die möglichen Unterschiede in der Morphologie der Zellen zu beobachten. Von besonders repräsentativen Stellen wurden mit Hilfe des Zeiss-Axiovision-Programms Fotos angefertigt. Zur Verdeutlichung bestimmter Struktur- und Wachstumseigenschaften wurden zusätzlich Bilder im Varelkontrast angefertigt. Dieser ermöglicht es, eine bestehende Dreidimensionalität besser darzustellen.

2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie und Histomorphometrie der Calceineinlagerung

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden aus den Wells mit 1% Calceinzusatz zunächst die Überstände abgenommen und verworfen. Die Wells wurden anschließend mit PBS gespült, um das überschüssige, nicht eingelagerte Calcein zu entfernen. Zum Mikroskopieren und Fotografieren wurde PBS hinzugegeben, welches anschließend wieder durch das jeweilige Medium mit Zusatz von 1% Calcein ersetzt wurde. Im weiteren Verlauf des Versuches wurde beobachtet, dass sich Zellen unter dem Einfluss von PBS aus ihrem Zellverband lösten und abkugelten. Um dieses zu verhindern, wurde dazu übergegangen, zunächst neues Medium

zuzugeben, welches nach dem Mikroskopieren mit 1% Calcein versetzt wurde. Von den in den Medien DMEM, OB und NB gewachsenen lebenden Zellen wurden nach 5, 7, 9, 12 und 21 Tagen 2-Kanal-Aufnahmen angefertigt, wobei Aufnahme 1 die Zellen und Aufnahme 2 die reine Fluoreszenz wiedergeben. Der Mix beider Aufnahmen zeigt dann sowohl die Zellen als auch die Calceinfluoreszenz in den Zellen. Die Aufnahmen wurden mit dem Zeiss Mikroskopsystem Axiovert und Axiovision 4.6 angefertigt.

2.4 Proteinanalyse

2.4.1 Osteokalzin ELISA

Zur Bestimmung der Osteokalzinmenge in den an den verschiedenen Tagen gewonnenen Überständen, wurde der N-MID Osteokalzin ELISA verwendet. Dieser enzymimmunologische Test zur quantitativen Bestimmung von Osteokalzin arbeitet mit zwei hochspezifischen monoklonalen Antikörpern gegen humanes Osteokalzin. Als Fänger-Antikörper wird ein Antikörper verwendet, der die mittlere Region (AS 20-43) erkennt. Zum Nachweis wird ein zweiter Peroxidase-konjugierter Antikörper angewandt, der an die N-terminale Region (AS 10-16) bindet. Außer dem intakten Osteokalzin (AS 1-49) wird mit diesem Test auch das N-terminale Midfragment (AS 1-43) bestimmt. Die eingefrorenen Überstände wurden zunächst aufgetaut und je 20 µl der Proben in ein Well der mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten pipettiert. Die Testdurchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zunächst wurden 150 µl des Antikörpergemisches (Biotinylierter AK + Peroxidase-konjugierter AK) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurden die Wells fünfmal gewaschen und anschließend 100 µl des chromogenen Substrats (TMB= Tetramethylbenzidin) hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert und die Farbreaktion anschließend mit 100 µl Schwefelsäure (0,18 mol/l) gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm mit 650 nm als Referenz gemessen. Die Auswertung der Proben erfolgte mit Hilfe des Magellan-Programms von Tecan. Das Programm erstellt mit Hilfe der mitgelieferten Standards A-F eine Standardkurve und ermittelt die Probenkonzentration durch Interpolation. Die Nachweisgrenze dieses Tests liegt bei 0,5 ng/ml bis 100 ng/ml.

2.4.2 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase

Zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase wurde Fluitest ALP verwendet. Bei diesem Test spaltet die in den Proben vorhandene Alkalische Phosphatase p-Nitrophenylphosphat in Anwesenheit von H₂O und Mg²⁺. Hierbei entstehen Phosphat und p-Nitrophenol. Letzteres kann photometrisch bei 400-420 nm gemessen werden. Da die Konzentration des entstandenen p-Nitrophenols proportional zur Konzentration der Alkalischen Phosphatase ist, kann mit Hilfe der Absorptionswerte die Konzentration der Alkalischen Phosphatase in der Probe errechnet werden. Zu den am jeweiligen Abnahmetag gewonnenen Zellen wurden zunächst 110 µl ALP-Puffer (R1, enthält 1 mol/l Diethanolamin-Puffer, pH 9,8, 0,6 mmol/l Magnesiumsulfat, >0,1% Reiniger und Stabilisatoren) pipettiert, bevor die Proben bis zur weiteren Behandlung bei -20°C eingefroren wurden. Am Messtag wurden die Zellproben wieder aufgetaut. Um die Zellen aufzubrechen und die membrangebundene Alkalische Phosphatase freizusetzen, wurden die Proben auf Eis gestellt und 10 Sekunden bei 45% mit einer Ultraschallsonde beschallt. Danach wurden die Proben 15 Minuten bei 13000 g zentrifugiert, um den Detritus aus dem Überstand zu entfernen. Zum vollständigen Aufbrechen der Zellen wurde der Überstand nochmals eingefroren, wieder aufgetaut und erneut zentrifugiert. Der nun verbliebene Überstand wurde dem Test zugeführt. Hierzu wurden die behandelten Proben in 1 cm Cuvetten überführt und 20 µl R2 (enthält 2 mmol/l p-Nitrophenylphosphat) hinzugegeben. Die Absorptionsänderung pro Minute wurde bei 405 nm im Photometer ermittelt.

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde mit der folgenden Formel in U/l berechnet:

$$\text{Aktivität (U/l)} = \Delta E / \text{min} \times 3298$$

Die untere Nachweisgrenze dieses Tests liegt bei 5 U/l.

2.5 RNA-Gewinnung und Analyse

Um Unterschiede im Expressionsmuster knochenzellspezifischer Gene zu zeigen, wurde aus den gewonnenen Proben RNA isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben, die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und

semiquantitativ analysiert. Es wurden drei knochenspezifische Marker, die in unterschiedlichen Stadien der Knochenzellentwicklung exprimiert werden, untersucht. Als Referenzmarker wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) verwendet, welcher in allen Stadien der Zelldifferenzierung gleich stark exprimiert wird und somit ein so genanntes Housekeeping Gen darstellt.

2.5.1 RNA-Isolation

Zunächst wurde die RNA aus den an den verschiedenen Messtagen gewonnenen Zellproben isoliert. Hierzu wurde das RNeasy Protect Mini Kit von QIAGEN verwendet. Die am jeweiligen Abnahmetag bereits mit RLT-Puffer lysierten und bei -20° eingefrorenen Zellen wurden aufgetaut und zur Homogenisierung in QIAshredder spin Säulen für zwei Minuten bei ≥ 2500 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Lysat, nach Zusatz von $350 \mu\text{l}$ 70%igem Ethanol, in RNeasy-mini-Säulen überführt und 15 Sekunden bei ≥ 2500 g zentrifugiert. Durch die Zugabe von Ethanol bilden sich Wasserstoffbrücken zwischen RNA Molekülen und den OH-Silikat-Atomen der Silikagel-Membran, so dass die RNA in der Membran hängen bleibt. Um sicher zu gehen, dass der Reversen Transkription nur reine RNA zugeführt wird, wurde ein Schritt zum DNA-Verdau eingefügt. Hierzu wurde die in der RNeasy-Silikagel-Membran hängen gebliebene RNA durch Zugabe von $350 \mu\text{l}$ RW1-Puffer, durch Zentrifugieren für 15 Sekunden bei ≥ 2500 g und Verwerfen des Durchflusses gewaschen. Anschließend wurde ein Inkubationsmix aus $10 \mu\text{l}$ DNase und $70 \mu\text{l}$ RDD-Puffer auf die Membran aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde die Membran, wie oben beschrieben, erneut mit RW1-Puffer gewaschen. Hierauf folgten zwei weitere Waschschrte mit $500 \mu\text{l}$ RPE-Puffer nach demselben Schema, um die Membranen von Salzen, Proteinen und anderen zellulären Bestandteilen zu befreien. Zum Trocknen der Membranen wurde anschließend erneut zentrifugiert. Um die RNA aus der Silikagel-Membran zu eluieren, wurde auf die Membranen $50 \mu\text{l}$ RNase-freies Wasser gegeben und für eine Minute bei ≥ 2500 g zentrifugiert. Die RNA befand sich nun in den Auffanggefäßen.

2.5.2 Durchführung der RT-PCR

Die Methode der RT-PCR (Reverse Transkriptasen-Polymerase Kettenreaktion) beruht auf der Umschreibung von mRNA in cDNA durch eine Reverse Transkriptase,

gefolgt von einer Vervielfältigung der cDNA in einer PCR. Auf diese Weise können kleinste Transkriptmengen in Proben detektiert werden. Für die Reverse Transkription wurde der IQ Mix von BIORAD verwendet. Zunächst wurde die RNA-Konzentration in den einzelnen Proben mit Hilfe des BioPhotometers von Eppendorf, welches unter Zuhilfenahme der optischen Dichte bei 260 nm die RNA-Konzentration errechnet, bestimmt. 100 ng der jeweiligen RNA wurden entnommen, bis auf 15 µl mit nuclease-freiem Wasser verdünnt und mit 5 µl Mastermix (enthält 4 µl iScript Reaktions-Mix und 1 µl iScript Reverse Transkriptase) versetzt.

Der Vorgang der Reversen Transkription beinhaltet folgende Schritte:

- 5min bei 25°C (Annealing)
- 30min bei 42°C (Reverse Transkription)
- 5min 85°C (Denaturierung der RT)
- Hold 4°C.

Jeweils 2 µl der so gewonnenen cDNA wurden der PCR zugeführt.

Für die PCR wurde der GoTaq® Green Mastermix verwendet. Bei der Taq Polymerase handelt es sich um die am häufigsten verwendete thermostabile Polymerase, die in der Amplifikation von cDNA eingesetzt wird. Als Primer wurden Oligo(dT)-Primer verwendet, die nach bekannter Primersequenz für humane DNA von IBA hergestellt wurden. Die Primersequenzen sind Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1 Primersequenzen der verwendeten Marker für die PCR

Marker	Primersequenz	PCR-Produkt (bp)
Human GAPDH for.	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	451
Human GAPDH rev.	TCC ACC ACC CTG TTG GTC TA	451
Osteokalzin for.	GCC CTC ACA CTC CTC GCC CTA TTG G	138
Osteokalzin rev.	GTC TCT TCA CTA CCT CGC TGC CCT C	138
Kollagen 1a1 for.	GAC CTC CGG CTC CTG CTC CTC TTA G	532
Kollagen 1a1 rev.	GGA CCC ATG GGG CCA GGC ACG GAA A	532
Cbfa1 for.	GTG AGG GAT GAA ATG CTT GGG AAC	548
Cbfa1 rev.	CAT AAC CGT CTT CAC AAA TCC TCC C	548

Das Reaktionsgemisch für die PCR wurde wie folgt angesetzt:

- 2 µl cDNA
- 7 µl H₂O
- 10 µl GoTaq® Green Mastermix (enthält GoTaq® DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und Reaktionspuffer)
- 1 µl Primer Mix (enthält 10 pmol/µl Forward-Primer und 10 pmol/µl Reverse-Primer).

Das PCR-Reaktionsprotokoll wurde folgendermaßen eingestellt:

- 2min 95°C (Initiale Denaturierung)
- 35x45sec 95°C (Denaturierung des Doppelstrangs)
- 45sec 53°C (Primerannealing)
- 45sec 72°C (Elongation durch die Taq-Polymerase)
- 5min 72°C
- Hold bei 4°C.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte wurde ein 1%iges Agarose-Gel mit Zusatz von 6 µl/100 ml Ethidiumbromid verwendet. Als Laufsubstanz wurde fünffach-konzentrierter TBE-Puffer (Tri-Borate-EDTA) eingesetzt.

Die Taschen des Gels wurden mit 10 µl der jeweiligen Probe geladen und eine Spannung von 90 Volt über eine Zeit von 20 Minuten angelegt. Zusätzlich zu den Proben wurde eine 100-bp-DNA-Leiter zur Zuordnung der entstandenen Banden und eine Negativ-Kontrolle, die aus dem Reaktionsgemisch ohne Zusatz von cDNA bestand, geladen. Die Zuordnungen der Probennummern zu den einzelnen Zähltagen und Medien sind den Tabellen 2.3a) und 2.3b) im Anhang zu entnehmen. Die Gele wurden mit Bio Doc Analyse fotografiert und die Helligkeit der Banden semiquantitativ ausgewertet.

2.6 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe eines entsprechenden Software-Programms (Sigmaplot and TableCurve 2D, Fa. SYSTAT Inc., Richmond, CA, USA). Die Daten der beiden Versuchsdurchgänge wurden hierfür zusammengefasst und gemeinsam analysiert. Zunächst wurden der Mittelwert der Zellzahl und die zugehörigen Standardabweichungen für die verschiedenen Versuchstage berechnet. Hierzu standen 6 bis 25 Werte pro Versuchstag zur Verfügung, da 2 bis 5 Wells gewonnen wurden, welche jeweils drei- bis fünfmal ausgezählt wurden. Die Mittelwerte der Zellzahlen wurden dann im Koordinatensystem für jedes Medium getrennt gegen die Versuchszeit aufgetragen. Durch Kurvenanpassung wurde anschließend die Regression der gewonnenen Werte ermittelt. Diese diente dann der Errechnung des Zellzuwachses pro Kulturtag ($\Delta y / \Delta x = 1$. Ableitung der Regression).

Analog zur oben genannten Berechnung der Zellzahl wurden die mittleren Konzentrationen von Osteokalzin und der Alkalischen Phosphatase aus den gemessenen Werten errechnet. Hierzu standen je nach Versuchstag bei der Osteokalzinbestimmung 3 bis 12 Werte und bei der Bestimmung der Alkalischen Phosphatase 1 bis 4 Werte zur Verfügung. Die gewonnenen Werte wurden zunächst gegen die Versuchsdauer im Koordinatensystem aufgetragen. Zusätzlich dazu wurden sie mit der Zellzahl korreliert und die Konzentration pro 10^3 Zellen im zeitlichen Verlauf dargestellt.

Die Auswertung der Calceineinlagerung wurde interaktiv anhand der ungemixten Fluoreszenzaufnahmen mit dem Analysesystem SigmaScan Pro 5.0 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath) vorgenommen. Dazu wurden die digitalen Aufnahmen vom Zeiss-Format in TIF-Bilder umgewandelt und anschließend die Intensität und die Fläche der Calceinfluoreszenz gemessen. Zur Berücksichtigung der Zellproliferation wurde die Fluoreszenzfläche (F_f) zur Messfläche (F_m) des Bildes ins Verhältnis gesetzt, um so die höhere Dichte des einschichtigen Zellrasens zu dokumentieren. Der Quotient F_f / F_m aus beiden Flächen ist eine dimensionslose Zahl, die angibt, welcher Anteil der Messfläche mit der Fluoreszenz der Zellen bedeckt ist. Wird der Quotient F_f / F_m mit der durchschnittlichen Intensität (I_m) multipliziert, so ergibt sich die totale Intensität (I_t). Der zelluläre Gesamtumsatz des Calceins während der

Versuchszeit wird durch die Fläche unter der Kurve der totalen Intensität bestimmt, die das Integral der totalen Intensität über die Zeit t (in Tagen) darstellt.

Die Auswertung der RNA-Expression erfolgte mit Hilfe des Bio Doc Analyse Systems, welches die Fluoreszenzintensität der einzelnen Elektrophoresebanden semiquantitativ auswertet. Die gewonnenen Werte für die verschiedenen Gene wurden zur GAPDH-Fluoreszenz ins Verhältnis gesetzt. Auf diese Weise wird die relative Intensität der Expression gewonnen. Teilweise wurden die erhaltenen Werte zusätzlich zum Tag 0 ins Verhältnis gesetzt, um die Veränderungen zu den Ausgangswerten zu verdeutlichen. In die Ergebnisse der RNA- Auswertung gingen ausschließlich die Werte des zweiten Versuchs ein.

3 Ergebnisse

3.1 Histologie

Die Schichten des noch nicht mineralisierten Geweihs bestehen in der frühen Phase des Wachstums aus einer Knorpelzone und dem darüber liegenden Bast, einer der Haut ähnlichen Gewebeschicht. Diese Gewebeanteile lassen sich auch anhand der im Frühjahr genommenen Knochenstanzen nach histologischer Aufarbeitung darstellen (Abb. 1a), wobei die Geweihhaut sich ebenfalls in eine Epidermis und Dermis unterteilt, wie von gewöhnlicher Haut bzw. dem Tierfell bekannt. Die Knorpelanteile sind durch eine äußere, subperichondral gelegene Wachstumszone gekennzeichnet (Abb. 1a), in der sich hohe Anteile STRO-1⁺-Zellen nachweisen lassen. Diese Zellen bedecken rund 58 % der Gewebefläche in den Arealen, wo sie vorkommen (Abb. 1b). Ihre Dichte beträgt rund 5000 Zellen/mm². Auch die Schicht des reifen Knorpels zeigt einen hohen Anteil STRO-1⁺-Zellen (Abb. 1 d-f).

3.2 Isolation der STRO-1⁺-DHGZ

Die FACS-Analyse einer Mischkultur nach Anzucht aus Geweihstanzmaterial ergibt eine große Bandbreite an Zellgröße und Granularität (Abb.1). Die Menge R1 entspricht hierbei der Summe der Zellen nach Aussonderung von Zelldetritus, welcher sich außerhalb der Menge darstellt. Die Verteilung der Zellen innerhalb von R1 ist nicht gleichmäßig, sondern zeigt eine Häufung im unteren Größen- und Granularitätsbereich. Eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer gemischten Zellpopulation von DHGZ demonstriert auch auf morphologischer Ebene eine große Variabilität an Zellgröße und -form (Abb. 2c). Sowohl die FACS-Analyse als auch die REM-Aufnahme deuten somit auf eine große Anzahl morphologisch unterschiedlicher Zelltypen in der Mischkultur hin.

In diesen Kulturen ließen sich mit Hilfe der FACS-Analyse 4-6% STRO-1⁺-Zellen nachweisen (Abb. 2b unterer rechter Abschnitt). Nach Anzucht dieser Zellpopulation zeigte sich in der REM-Aufnahme ein Bild von lang gezogenen Zellen gleicher Größe und Morphologie.

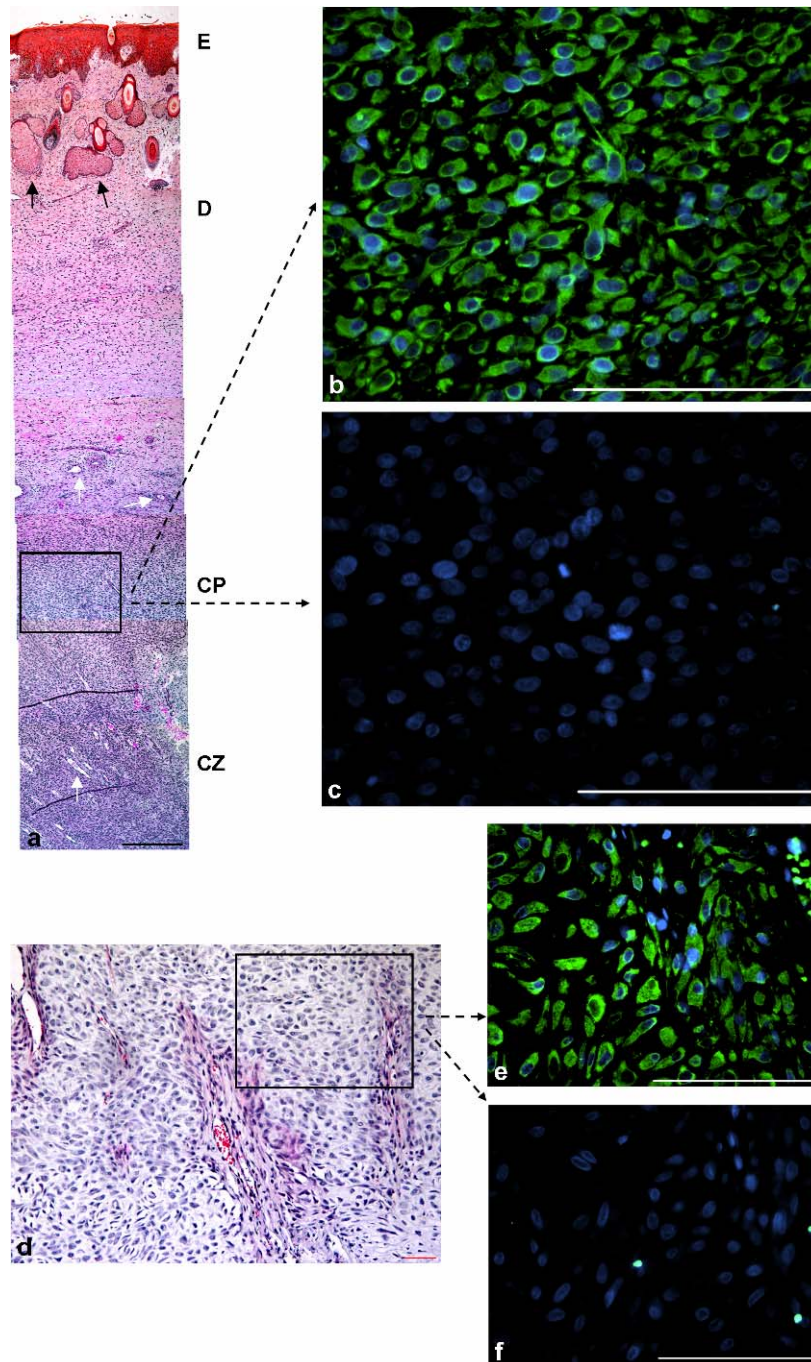


Abb. 1 STRO-1⁺-Zellen in der Wachstumsschicht des Perichondriums und der Knorpelzone eines Geweihs. In Paraffin eingebettete Biopsieproben des Bastgeweihs eines 4 Jahre alten Damhirsches (*Dama dama*); die Biopsien wurden 46 Tage nach Beginn der Regeneration gewonnen. **a)** Übersicht über einen Querschnitt eines Geweihastes 1cm unter der Spitze; (E) Epidermis, (D) Dermis (CP) Wachstumszone des Perichondriums, (CZ) Knorpelzone; Weiße Pfeile=Gefäße, Schwarze Pfeile=Talgdrüsen; HE-Färbung; Messbalken 500µm. **b)** STRO-1⁺-Zellen in der Wachstumszone des Perichondriums [STRO-1-AK kombiniert mit einem sekundären FITC-konjugierten Anti-Maus-IgM-Antikörper, Zellkerne mit Hoechst 33342 gegen gefärbt]; Messbalken 100µm. **c)** Negativ Kontrolle, wie b) ohne STRO-1-AK; Messbalken 100µm. Expositionsdauer in b) und c) identisch. **d)** Querschnitt durch einen Hauptast, Knorpelzone, HE-Färbung, Messbalken 100µm. **e)** STRO-1⁺-Zellen innerhalb der Knorpelzone [Färbung siehe b)], Messbalken 100µm. **f)** Negativ-Kontrolle ohne STRO-1-AK, Messbalken 100µm, Expositionsdauer in e) und f) identisch.

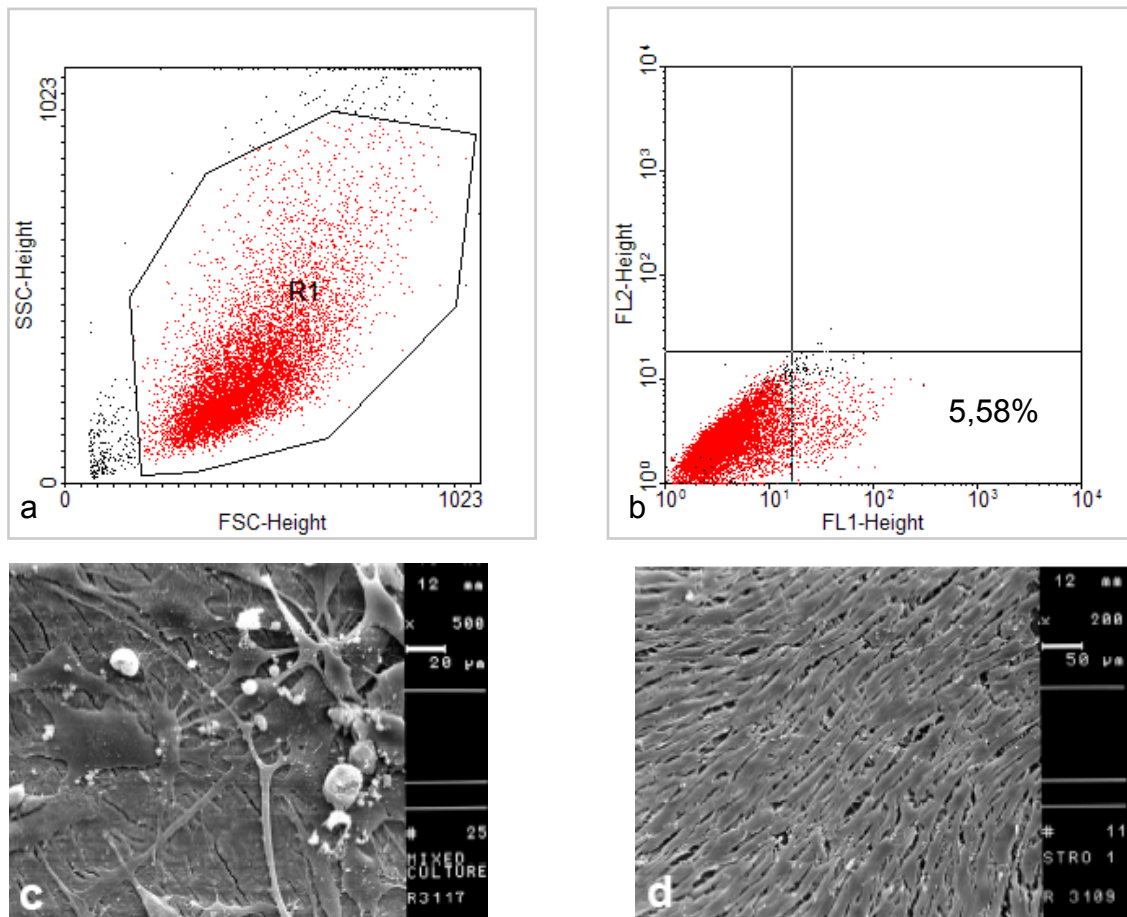


Abb. 2 Diagramme der FACS-Analyse der Damhirschgeweihzellen (DHGZ) und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (REM) von Zellkulturen, **a**) Gesamte Zellpopulation, wie sie beim Anzüchten mit Hilfe des Stanzmaterials entsteht. R1 entspricht der Summe aller Zellen nach Aussondern von Zelldetritus (x-Achse: Analyse der Zellgröße, Intensität des Vorwärtsstreulichtes FSC = forward scatter) und der Zellgranularität (y-Achse: Intensität des Seitwärtsstreulichtes SSC = side scatter). **b**) Auftrennung der Zellen nach ihrer Rot- und Grünfluoreszenz (grün: x-Achse, STRO-1⁺ FITC; rot: y-Achse, kein Antikörper). Durchschnittlich 5,58 % Zellen der Gesamtpopulation waren für das STRO-1-Antigen positiv. **c**) REM-Aufnahme einer gemischten Zellpopulation von DHGZ mit unterschiedlicher Zellgröße und Zellmorphologie, 500x. **d**) REM-Aufnahme einer STRO-1⁺-Zellpopulation mit gleicher Zellgröße und Zellmorphologie mit typischem „Kopfsteinpflaster-Muster“ mesenchymaler Stammzellen (200x).

Die STRO-1⁺-Zellen bilden einen dichten Zellrasen im Sinne eines für mesenchymale Stammzellen typischen „Kopfsteinpflaster-Musters“ (cobblestone area). Exemplarisch für die Population sind in Abbildung 3 mit STRO-1-Antikörper markierte Zellen im Phasenkontrast dargestellt. Zunächst ist eine typische lang gezogene Zelle zu sehen, wie sie in „Kopfsteinpflaster“-bildenden Zellverbänden zu finden ist (Abb. 3a). Neben Zellen mit dieser typischen Morphologie konnten vereinzelt dreiecksförmige und mehrkernige STRO-1⁺-Zellen isoliert und dargestellt werden (Abb. 3b+c).

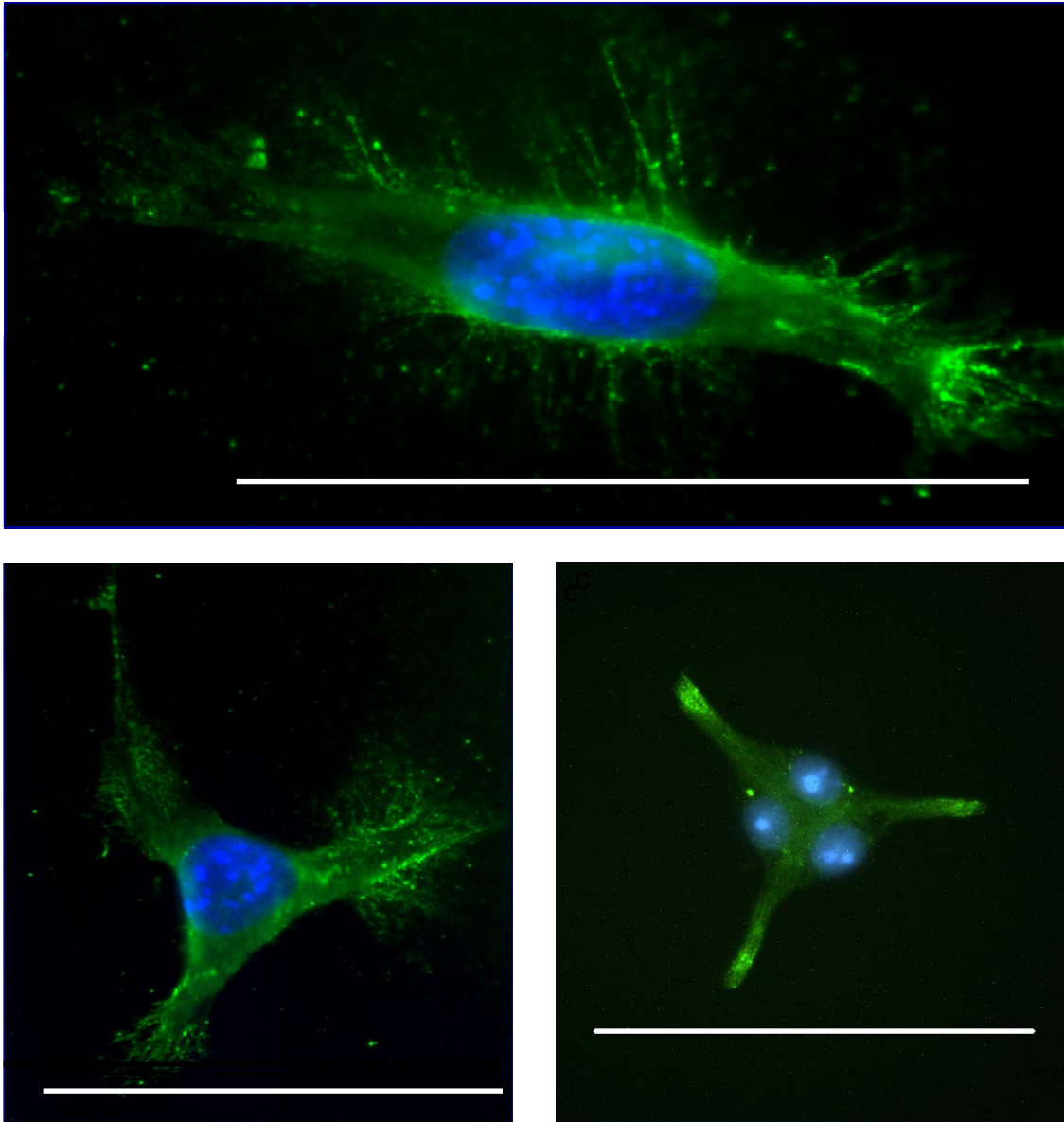


Abb. 3 Fluoreszenzaufnahmen von STRO-1⁺-Damhirschgeweizellen, **a)** normale in der Kultur Kopfsteinpflaster bildende Zelle, **b)** dreiecksförmige Zelle kurz vor und **c)** nach der asymmetrischen Teilung (Messbalken jeweils 100 μm , Fluorochrome: Dapi und FITC).

3.3 Wachstumsverhalten der STRO-1⁺-Zellen

Das Proliferationsverhalten der STRO-1⁺-Zellen unter dem Einfluss der eingesetzten Medien wird in Abb. 4 graphisch dargestellt. Gezeigt werden die gemessenen Zellzahlen mit Standardabweichungen im zeitlichen Verlauf und deren Regression. Daraus geht in den ersten Versuchstagen ein zunächst langsamer Anstieg der Zellzahl in allen drei Medien hervor. Es schließt sich ein exponentielles Wachstum an, bis ein bestimmtes Plateau erreicht wird, das dem konfluenten Wachstum in der Kultur entspricht. Der Zeitpunkt, zu dem dieses Plateau erreicht wird, sowie seine

Höhe unterscheiden sich in den verwendeten Medien. Die STRO-1⁺-Zellen, welche in OB-Medium angezüchtet wurden, erreichen nach ca. 11 Tagen als erste konfluentes Wachstum. Darauf folgen die Zellen in NB-Medium nach ca. 13 Tagen und zuletzt die Zellen in DMEM-Medium nach ca. 14 Tagen. Die Höhe des Plateaus steht für die maximal erreichte Zellzahl in den unterschiedlichen Medien. Diese liegt im DMEM am höchsten und schwankt um einen Wert von ca. 70×10^4 Zellen. Im OB-Medium zeigt sich ein Wert von ca. 60×10^4 Zellen. Am niedrigsten liegt die maximale Zellzahl im NB-Medium mit einer Plateauhöhe von ca. 50×10^4 Zellen.

Neben den Wachstumskurven sind lichtmikroskopische Bilder der jeweiligen Zellkulturen im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die ersten beiden Bilder sind jeweils Nativaufnahmen, die Bilder der Tage 7 und 21 zeigen Aufnahmen im Varell-Kontrast. Dieser ermöglicht eine genauere Darstellung dreidimensionaler Strukturen. Die Morphologie in den drei Medien unterscheidet sich anfänglich nicht. Es kommen kleine stäbchenförmige Zellen zur Darstellung, die zunächst vereinzelt und später verdichtend wachsen. Erst mit zunehmender Kultivierungszeit zeigt sich im DMEM und OB-Medium ein verstärkt mehrschichtiges Wachstum der Zellen. Darüber hinaus kommt es in diesen Medien zu einer verstärkten Bildung von Gewebeknötchen. Die Morphologie der einzelnen Zellen weist keine großen Veränderungen auf. Im Gegensatz dazu kommen im NB-Medium stark lang gezogene, spindelförmige Zellen mit weiten Ausläufern zur Darstellung. Diese Zellen wachsen weniger dicht und eher einschichtig.

Vergleicht man die Wachstumsrate der Zellen pro Tag (1. Ableitung der Regression) mit dem Proliferationsverhalten in Kultur (Abb.5), wird deutlich, dass die Gipfelpunkte der Wachstumskurven mit dem Erreichen des konfluierenden Wachstums zusammenfallen. Zunächst kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Zuwachsraten pro Tag. Nach Erreichen der Konfluenz fallen diese ab, bis sich keine Zunahme der absoluten Zellzahl mehr zeigt. Lichtmikroskopisch beginnt das konfluierende Wachstum zuerst im OB-Medium zwischen Tag 2 und Tag 5. Der Gipfel der Wachstumskurve wird nach 3,5 Tagen erreicht. Hier konnten auch absolut gesehen die höchsten Zuwachsraten von bis zu 120×10^3 Zellen/Tag gemessen werden. Im DMEM und NB-Medium liegen die Wachstumsraten pro Tag insgesamt niedriger, so ergab sich im DMEM eine maximale Zuwachsrate von $77,5 \times 10^3$ Zellen/Tag und im NB-Medium von 70×10^3 Zellen/Tag. Diese Gipfel werden nach 6,7

Tagen (DMEM) bzw. nach 7,2 Tagen (NB-Medium) erreicht. Lichtmikroskopisch zeigt sich äquivalent hierzu der Übergang zu konfluierendem Wachstum zwischen dem 5. und 7. Tag (DMEM) bzw. zwischen dem 7. und 9. Tag (NB-Medium).

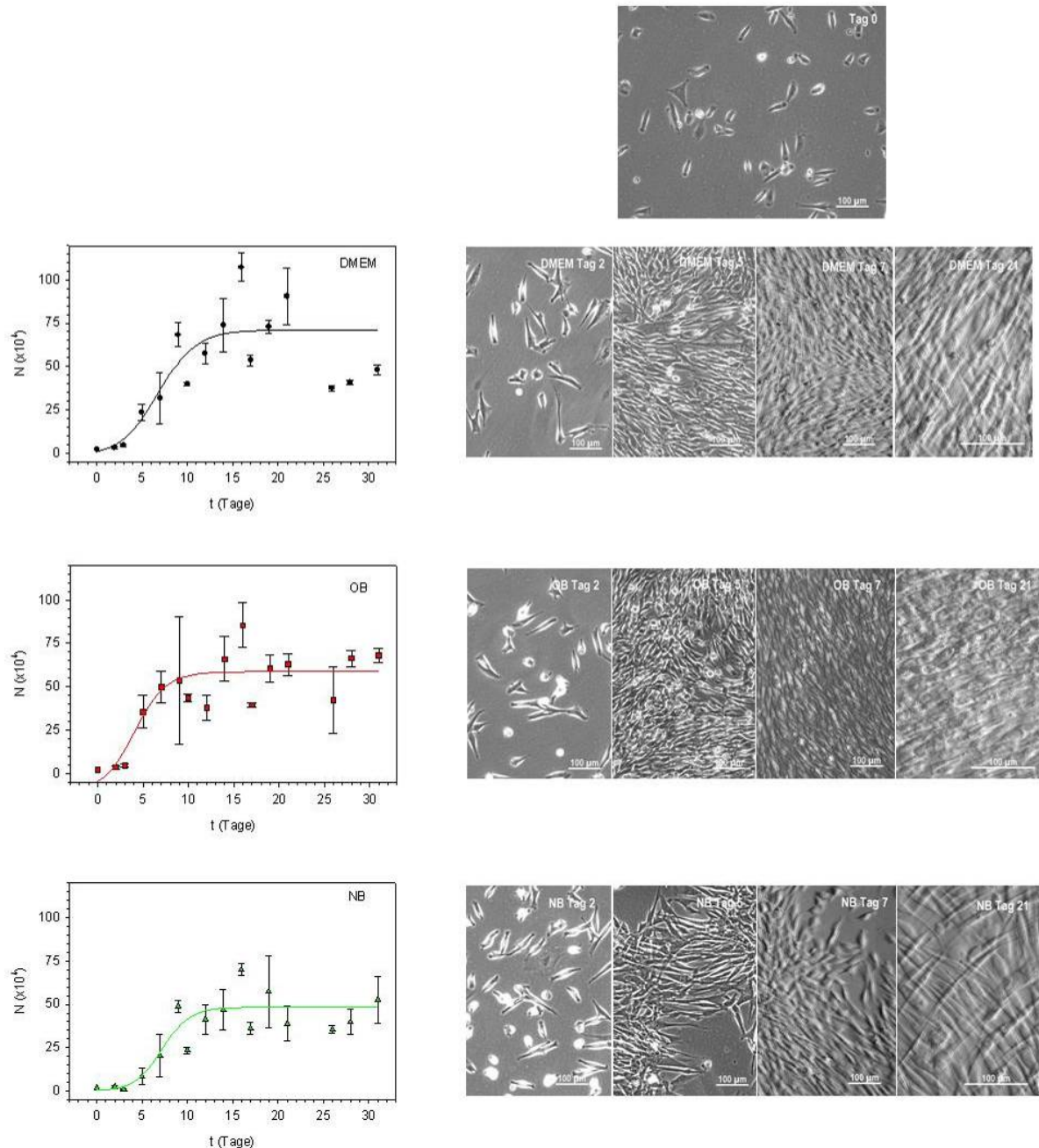


Abb. 4 Zeitabhängige Proliferation der STRO-1⁺-Damhirschgeweizellen in den verschiedenen Kulturmedien. In den Graphen sind Mittelwerte ($8 \leq n \leq 22$) und Standardabweichungen der an den einzelnen Tagen gemessenen Zellzahlen N sowie deren s-förmige Regressionen gegen die Kultivierungszeit t aufgetragen. Die Zeitreihenaufnahmen der jeweiligen Zellkulturen zeigen den Verlauf der Proliferation und lassen die Veränderungen in der Zellform erkennen. Das obere Bild zeigt die Zellen direkt nach der Aussaat (Aufnahmen: nativ und Varell-Kontrast, Messbalken 100 μm).

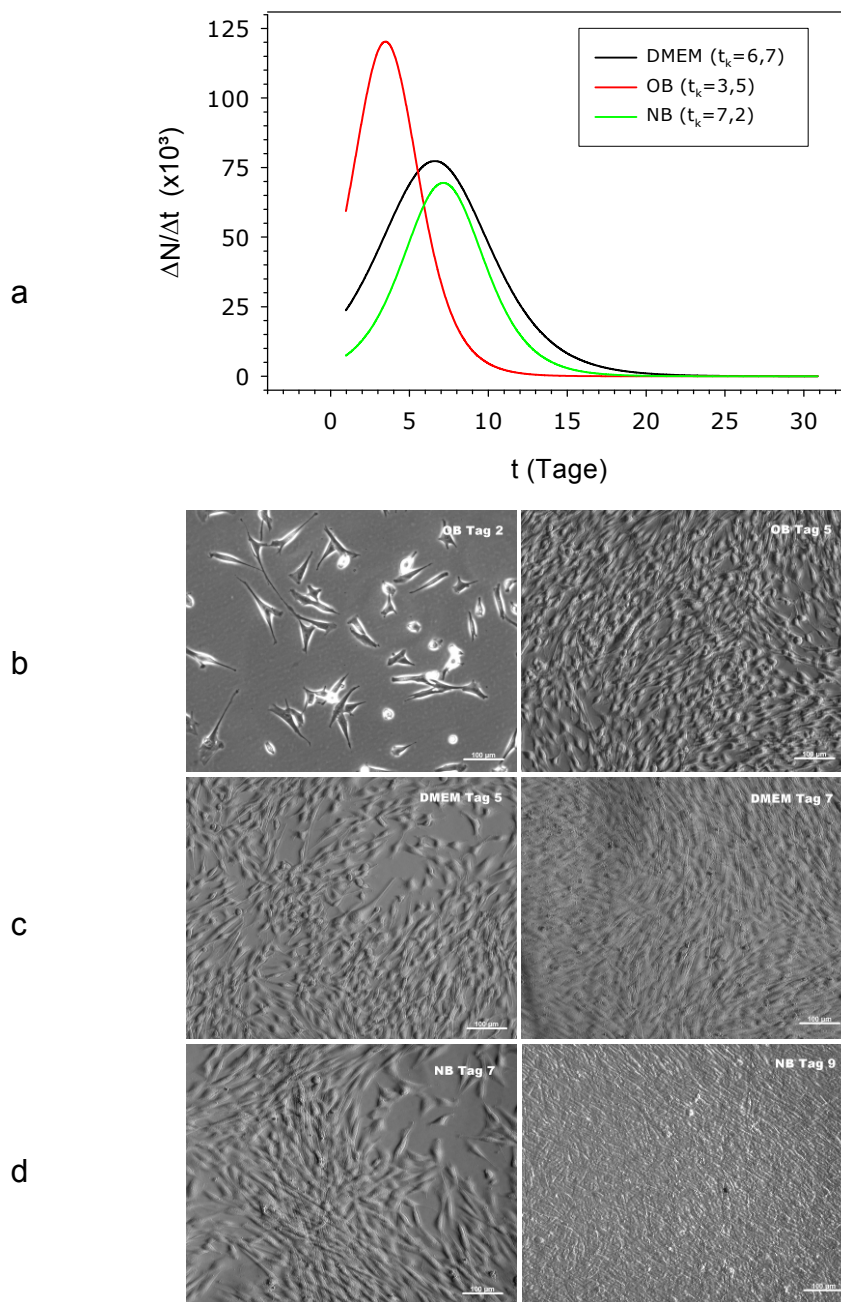


Abb. 5 Darstellung der Zunahme des Zellwachstums pro Tag und Zeitreihenaufnahmen der STRO-1⁺-Zellen vor und nach konfluierendem Wachstum in den verschiedenen Medien, **a**) Errechneter Zellzuwachs pro Tag, wie er sich als 1. Ableitung ($\Delta N/\Delta t$) der Regressionen aus Abbildung 2 ergibt. Konfluierendes Wachstum (t_k) wird im OB-Medium nach durchschnittlich 3,5 Tagen, im DMEM-Medium nach 6,7 und im NB-Medium nach 7,2 Tagen erreicht und durch den Gipfelpunkt der Kurven dargestellt. **b-d**) zeigen die Zellkulturen unmittelbar vor und nach dem konfluierenden Wachstum (Nativaufnahmen, Messbalken 100 μm).

3.4 Calceineinlagerung

Zur Bestimmung der Intensität und der Fläche der Calceinfluoreszenz in den Zellkulturen wurden pro Kulturmedium und Tag zwischen 3450 und 8324 Zellen vermessen. In allen Kulturmedien lagerte ein unterschiedlicher Anteil der Zellen Calcein ein (Abb. 6). Einige Zellen nahmen kein Calcein auf. Eine gleichmäßige Verteilung der calceinhaltigen Zellen im Zellrasen kam nur im NB-Medium zur Darstellung. Die fluoreszierenden Zellen in den anderen beiden Medien wiesen eine kolonieartige Gruppierung auf. Im Laufe der Kulturzeit bedeckten die calceinhaltigen, fluoreszierenden Zellareale zwischen 9 und 68 % der Fläche der Kulturschale. Die Zellen der verschiedenen Medien zeigten am 5. Tag alle eine fast identische Fluoreszenzfläche von 9 bis 10 % (Abb. 7e). Die höchste Fluoreszenzfläche fand sich am Tag 21 zum Ende des Versuches bei den Zellen, die im DMEM kultiviert wurden. Während die Flächenverteilung der Fluoreszenz anfänglich ziemlich gleich war, unterschieden sich die durchschnittlichen Intensitätsverteilungen in den jeweiligen Medien erheblich (Mittelwerte: DMEM = 30,75; OB = 18,04; NB = 22,95). Die zelluläre Calceinaufnahme verlief zeitabhängig aber mit unterschiedlicher Höhe in den jeweiligen Medien. Während die mittlere Intensität als Ausdruck der zellulären, regionalen Calceinkonzentration mit zunehmender Zeit der Zellen in der Kultur abnimmt, steigt die relative Fläche der Calceinfluoreszenz an (Abb. 7d und e). Die mittlere Intensität der zellulären Calceinaufnahme ist an Tag 5 bei den Zellen im DMEM am höchsten und sinkt am neunten Tag unter das Niveau der Zellen im OB- und NB-Medium (Abb. 7d). Von Tag 9 bis Tag 21 zeigen die Zellen im Osteoblastenmedium die höchste Intensität und die größte Fläche (Abb. 7e) der Calceinfluoreszenz. Die größte fluoreszierende Fläche überhaupt wird jedoch an Tag 21 im DMEM gemessen. Die totale Intensität ist am Tag 12 der Zellkultur von allen Medien im NB-Medium am höchsten. Der Mittelwert des Gesamtumsatzes der Zellen aller Kulturen beträgt zwischen dem 5. und 21. Versuchstag $95,4 \pm 34,7$ (MW \pm Standardabweichung). Die Zellen im DMEM (MW = 67,61) und im NB-Medium (MW = 84,39) lagen unterhalb und die Zellen im OB-Medium (MW = 134,33) oberhalb dieses Mittelwertes (Abb. 8). Somit zeigen die Zellen im OB-Medium den höchsten Calceinumsatz.

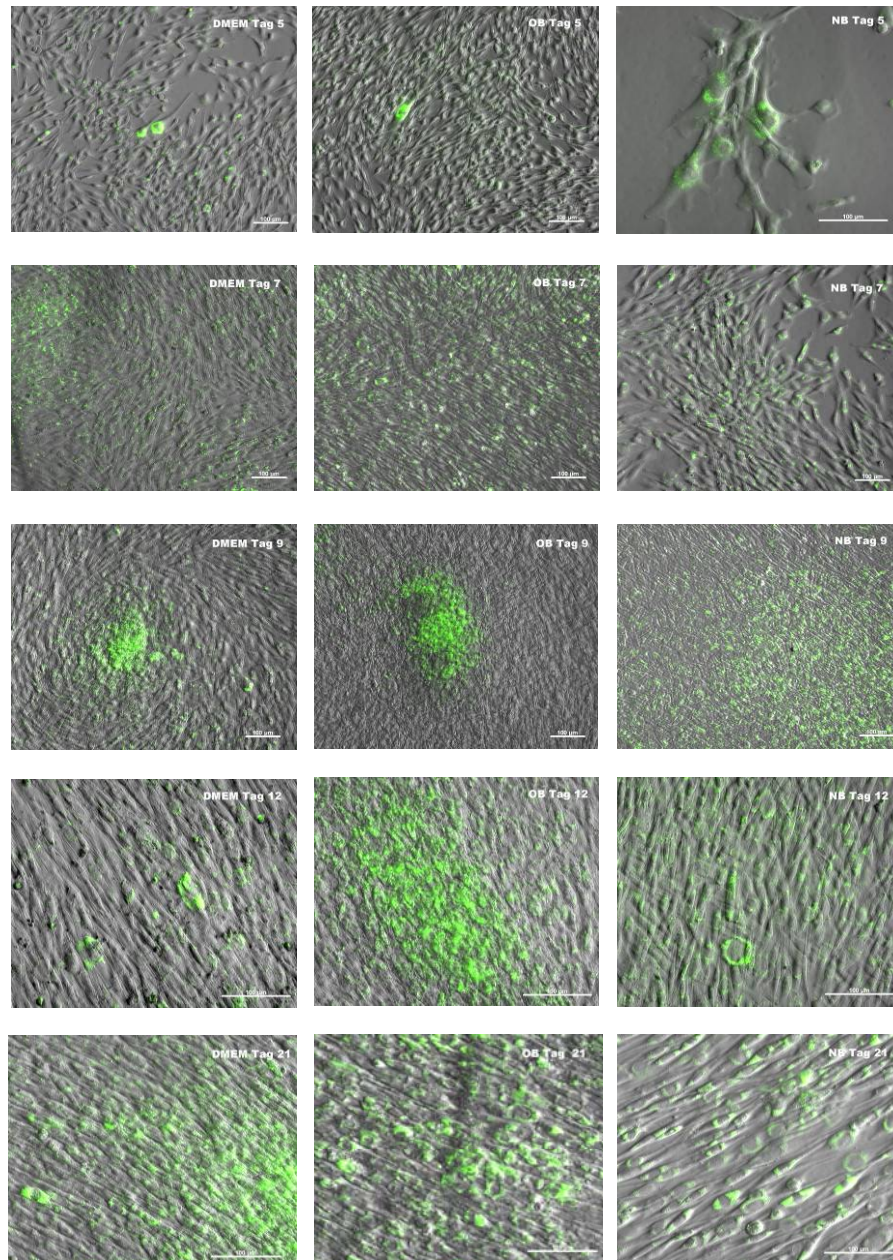


Abb. 6 Mehrkanalaufnahmen der Calceineinlagerungen der STRO-1⁺-Damhirschgeweizellen in den verschiedenen Kulturmedien im zeitlichen Verlauf. (Aufnahmen: nativ und Varel-Kontrast, Messbalken 100 µm).

Calceinaufnahme Stro1⁺-Zellen in unterschiedlichen Kulturmedien

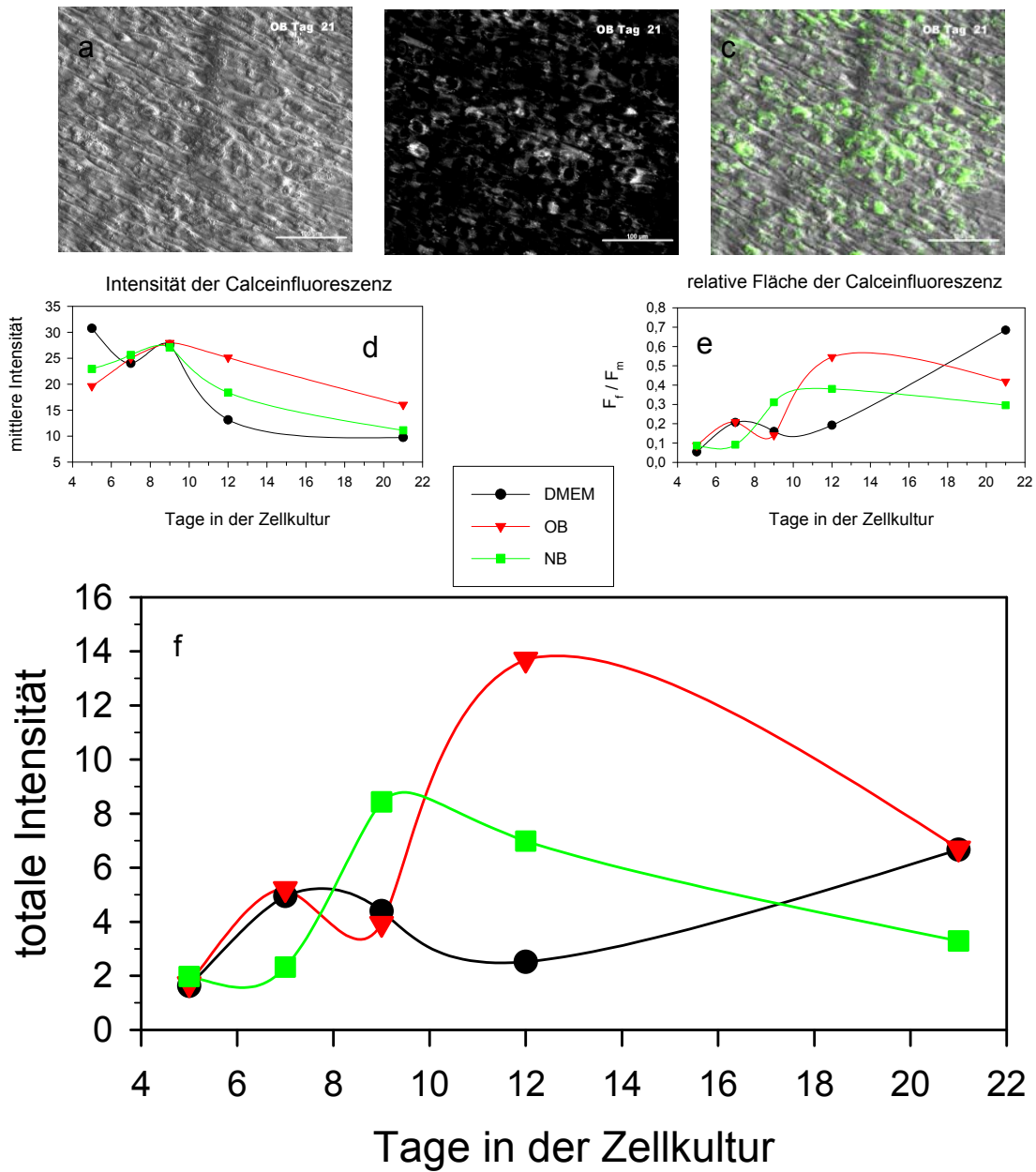


Abb. 7 Calceinaufnahme und Intensität der Calceinfluoreszenz in DMEM, Osteoblasten- und Neuroblastenmedium. **a-c)** Zellkultur im OB-Medium am Tag 21 wie sie sich als 2-Kanal-Fluoreszenzaufnahmen darstellt, wobei b die reine Fluoreszenz als Graustufenaufnahme und c die Überlagerung von a und b mit der entsprechenden Farbzuordnung darstellt. **d)** Verlauf der mittleren Intensität der Fluoreszenz in den Zellen. **e)** Verlauf des Verhältnisses der fluoreszierenden Fläche zur Messfläche. Wird die mittlere Intensität (d) mit dem Quotienten des Flächenverhältnisses (e) multipliziert, so ergibt sich die in **f)** dargestellte totale Intensität als Maß für die Calceinaufnahme.

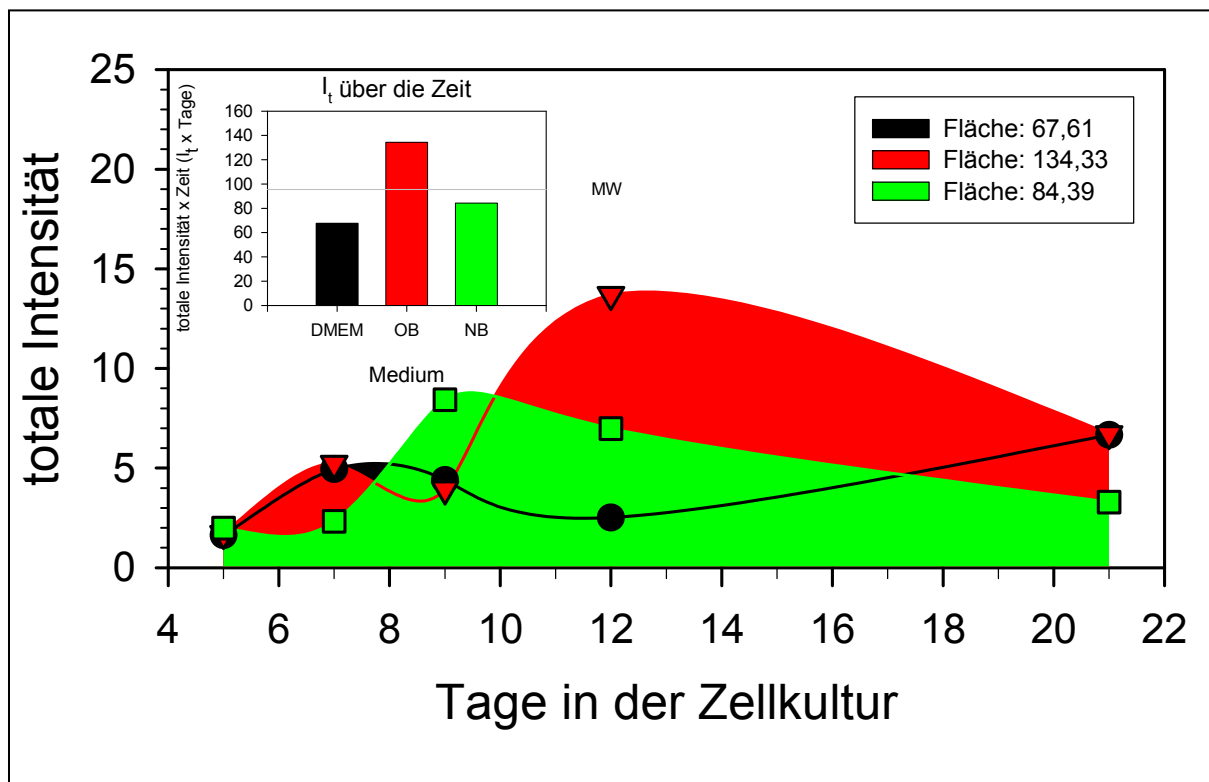


Abb. 8 Gesamtumsatz des Calceins über die Zeit von Tag 5 bis Tag 21 in den Zellen der jeweiligen Medien der Zellkulturen. Der zeitbezogene Gesamtumsatz von Calcein wird durch die Fläche unter den jeweiligen Kurven der totalen Intensität der Calceinfloureszenz repräsentiert. Die eingefügte Balkengrafik zeigt diese Werte in der Übersicht, die als Zahlenwerte im rechten Kästchen der Grafik angegeben sind. Der Mittelwert des Gesamtumsatzes der Zellen aller Kulturen beträgt $95,4 \pm 34,7$ (MW \pm Standardabweichung).

3.5 Differenzierungsverhalten der STRO-1⁺-Zellen

3.5.1 Genexpression im zeitlichen Verlauf

Die Expression verschiedener Knochenmarker ist in Abbildung 9 als Fotografie der nach elektrophoretischer Aufteilung entstandenen Banden dargestellt. Die Negativkontrolle zur Überprüfung des Tests zeigt für alle verwendeten Marker keine Expression. Die Ergebnisse können also als gültig gewertet werden. Der Referenzmarker GAPDH wird in allen Proben mit etwa gleicher Intensität exprimiert. Das zeigt, dass die verwendeten humanen Primer an die RNA der Hirschgeweihzellen binden. Das gleiche trifft auch für die Knochenmarker Kollagen 1 α 1, Osteokalzin und Cbfa1 zu. Im zeitlichen Verlauf lassen sich kaum Unterschiede in der Expression feststellen. Sowohl das Gen für Kollagen 1 α 1 als auch die Gene für Osteokalzin und Cbfa1 sind bereits am Tag 0 aktiv. Nur vereinzelt kommen leichte

Intensitätsunterschiede zur Darstellung, in denen sich keine Regelmäßigkeit erkennen lässt. Um eventuelle feine Unterschiede zum Vorschein zu bringen, wurde die Helligkeit der Banden semiquantitativ ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Auswertung werden in den folgenden Abschnitten dargelegt.

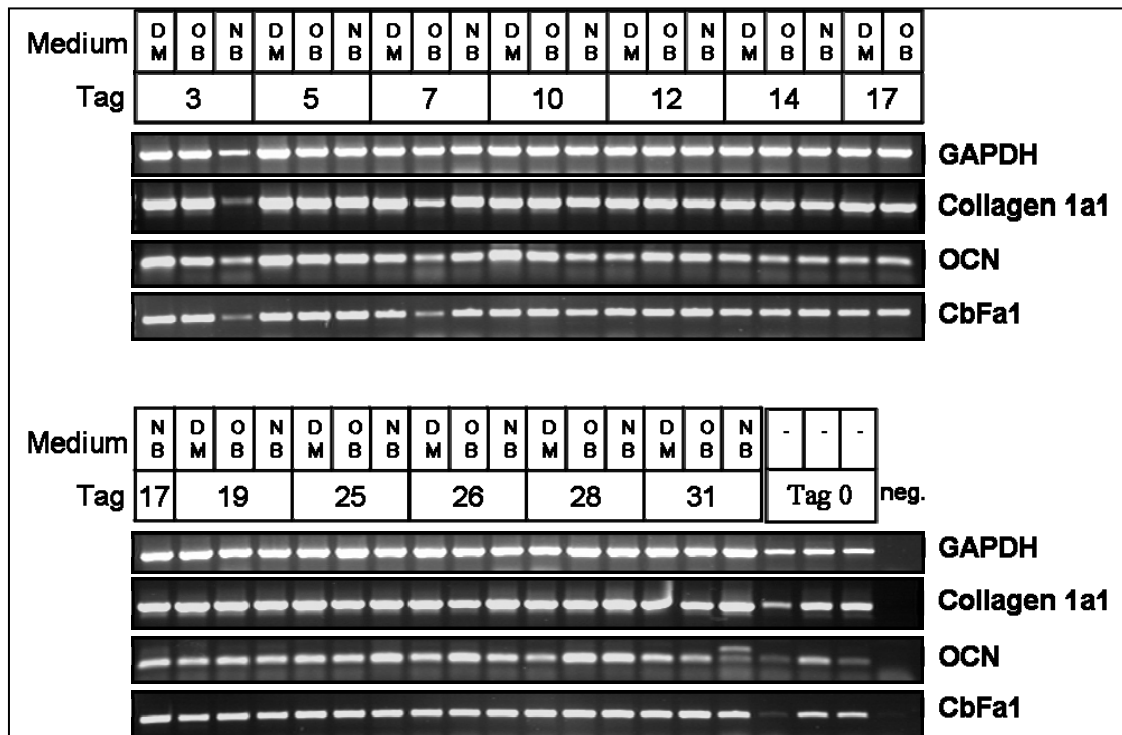


Abb. 9 Zeitabhängige Expression von Kollagen 1 α 1, Osteokalzin (OCN) und Cbfa1 in den verschiedenen Medien.

3.5.2 Expression von Cbfa1 und Kollagen 1 α 1

Die relative Intensität der Expression von Cbfa1 und Kollagen 1 α 1 bezogen auf Tag 0 zeigt sowohl für Cbfa1 als auch für Kollagen 1 α 1 einen vergleichbaren Verlauf. Die pro Versuchstag gewonnenen Werte werden für jedes Well getrennt dargestellt, so dass sich für jedes Medium zwei Kurven abbilden (Abb.10). Betrachtet man die Expressionskurven des DMEM für Kollagen 1 α 1 und Cbfa1, zeigt sich zunächst im Verhältnis zu Tag 0 eine Zunahme der relativen Intensität. Ab Tag 5 wird ein ungefähr gleich hohes Niveau der Expression gehalten. Die Zellen des OB- und NB-Mediums zeigen in den ersten Versuchstagen eine Abnahme der relativen Intensität im Bezug auf Tag 0. Die Kurve des NB-Mediums zeigt einen deutlichen Tiefpunkt am 4. Versuchstag. Auch in diesen beiden Medien wird nach Tag 5 ein konstantes

Niveau der Expression gehalten. Die relative Intensität von Cbfa1 zeigt weder im OB- noch im NB-Medium eine signifikante Veränderung zu Tag 0.

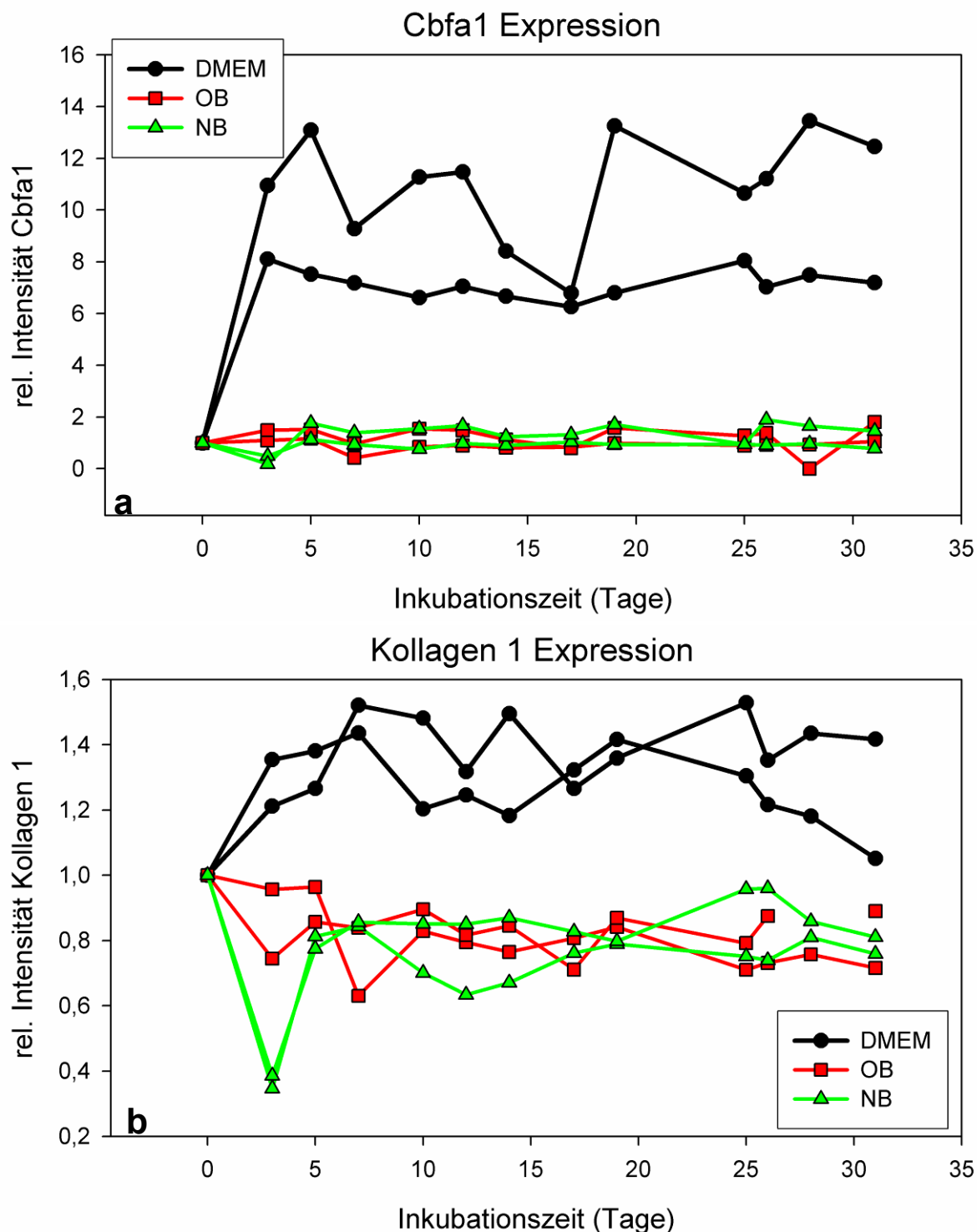


Abb. 10 Relative Intensität der Expression von Cbfa1 (a) und Kollagen 1 α 1 (b) bezogen auf Tag 0 im zeitlichen Verlauf. Getrennte Darstellung der RNA-Expression, der je Kulturtag untersuchten Wells.

Diese Form der Darstellung stellt ausschließlich die Veränderungen im Bezug auf Tag 0 dar. Die absoluten Werte der relativen Intensität für Cbfa1 und Kollagen 1 α 1 sind nach Tag 5 in allen Medien etwa gleich hoch.

3.5.3 Alkalische Phosphatase

Betrachtet man die Konzentration der Alkalischen Phosphatase, ergibt sich ein Kurvenverlauf, wie in Abb. 11 dargestellt. Es zeigt sich in den ersten Tagen zunächst ein Abfall der Konzentration in allen drei Medien. Nach einem Tiefpunkt um Tag 2 kommt es zu einem steilen Anstieg der Kurven. Die Konzentration im NB-Medium liegt hier deutlich über den Konzentrationen im DMEM und OB-Medium. Der Gipfelpunkt wird im DMEM und OB-Medium am 3.Tag (DMEM 4,5 U/10³ Zellen, OB 5U/10³ Zellen), im NB-Medium hingegen erst am 5.Tag erreicht (17,5 U/10³ Zellen). Danach kommt es in allen Medien zu einem erneuten Abfall der Konzentration.

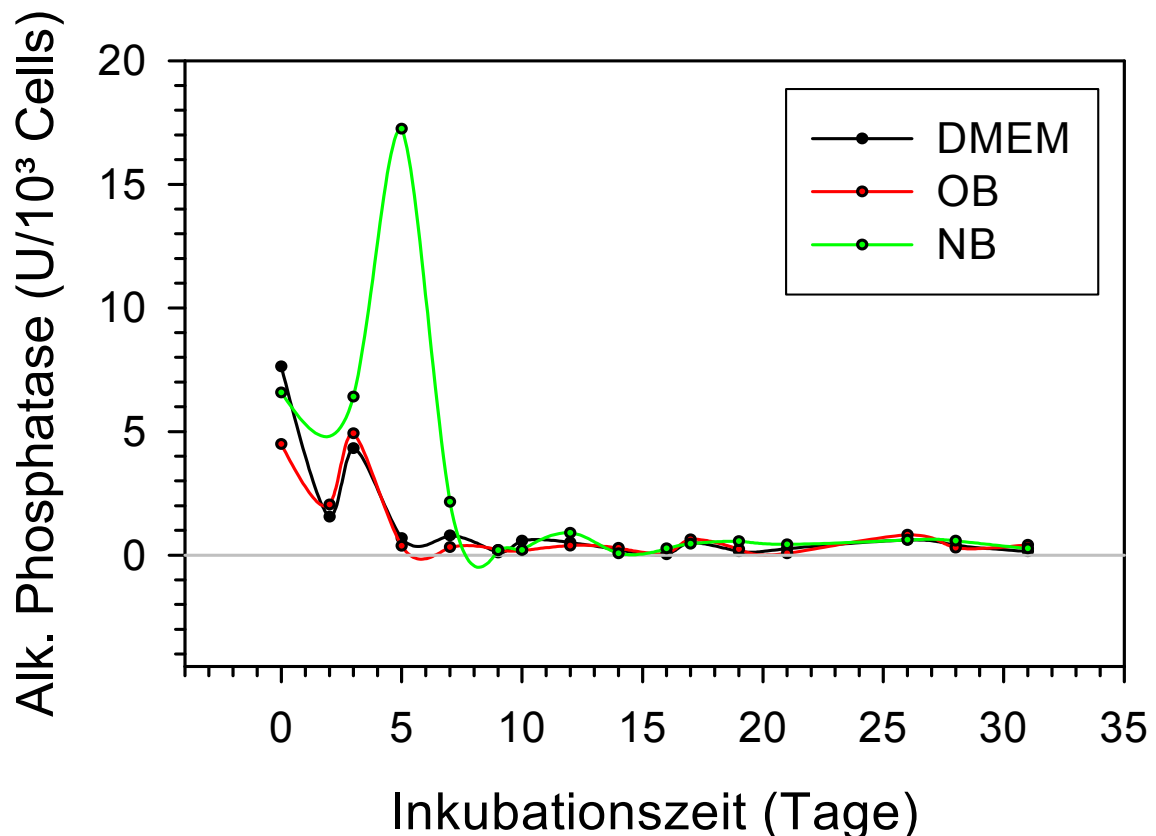


Abb. 11 Konzentration der Alkalischen Phosphatase in Abhängigkeit von der Dauer der Kultur der STRO-1⁺-Zellen. Mit ELISA gemessene ALP-Konzentration im Medium, die um die im Medium vorhandene Konzentration bereinigt und auf 10³ Zellen umgerechnet wurde. Negative Werte zeigen einen Verlust im Medium an.

Nach dem 8.Tag liegen die Konzentrationen für die Alkalische Phosphatase bis zum Ende des Versuchs in allen drei Ansätzen auf dem gleichen Niveau. Die Konzentration zeigt sich über die restliche Versuchsdauer hinweg sehr gering bis nicht messbar.

3.5.4 Osteokalzinexpression und -konzentration

Die relative Intensität der Osteokalzinexpression in Bezug zur GAPDH-Expression wird in Abbildung 12b gezeigt. In dieser Darstellung wird deutlich, dass Osteokalzin in allen drei Medien vom ersten Kultivierungstag an exprimiert wird. Die Intensität weist Schwankungen auf, es werden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wachstumsmedien deutlich.

Werden die mittels ELISA aus dem Überstand gewonnenen Osteokalzinkonzentrationen betrachtet, ergibt sich eine Kurve wie in Abbildung 12a dargestellt. Die absolut gemessenen Werte wurden um die im Medium bereits enthaltene Konzentration bereinigt und auf 10^3 Zellen umgerechnet. Auf diese Weise wird eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Medien gewährleistet. Die Konzentrationskurven in allen drei Medien zeigen einen vergleichbaren Verlauf. Die maximale Osteokalzinkonzentration/ 10^3 Zellen wird zwischen Tag 2 und 3 erreicht. Danach kommt es zu einem starken Abfall.

Schließlich bewegt sich die bereinigte Konzentration ab dem 5.Tag um Null. Negative Werte kommen zustande, sobald der absolut gemessene Wert unter den Ausgangswert im Medium fällt. Sie zeigen somit einen Verlust im Medium an. Zu sehen ist dies z.B. am 6.Tag sowohl im DMEM als auch im OB-Medium. Die insgesamt höchste Osteokalzinkonzentration konnte im Überstand der in NB-Medium angezüchteten Kulturen gemessen werden. Am niedrigsten lag die messbare Osteokalzinkonzentration im OB-Medium.

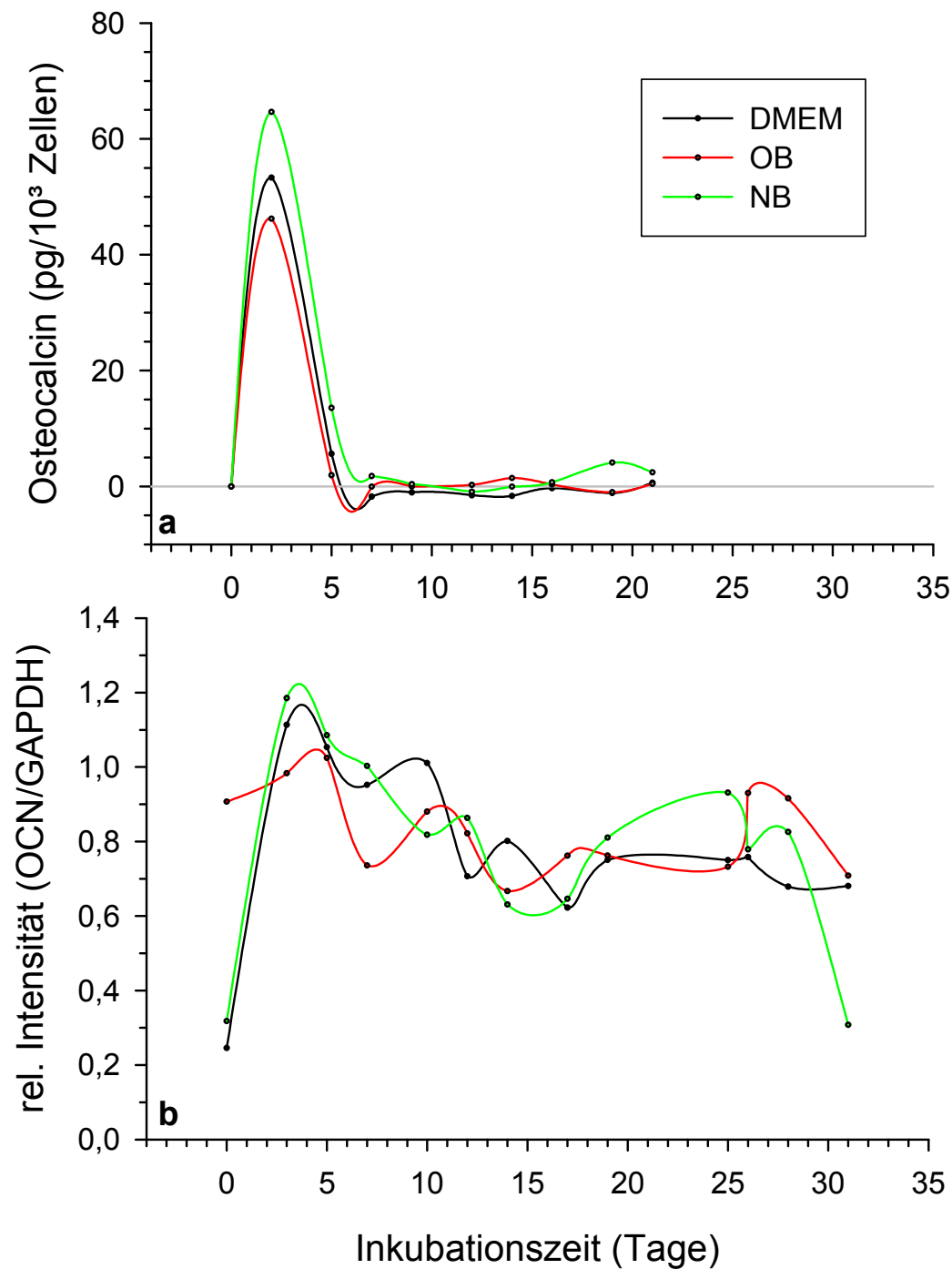


Abb. 12 Osteokalzinkonzentration und -expression der STRO-1⁺-Zellen in der Kultur. **a)** Mit ELISA gemessene Osteokalzinkonzentration im Medium, die um die im Medium vorhandene Konzentration bereinigt und auf 10³ Zellen umgerechnet wurde. Negative Werte zeigen einen Verlust im Medium an. **b)** Dieser Graph zeigt die relative OCN-Expression in Abhängigkeit von der Dauer der Kultur der Zellen.

4 Diskussion

4.1 Methodik

Zur Anzucht der Zellkulturen und zur Analyse der Proteinexpressionsmuster wurden weithin anerkannte Methoden angewendet. Aufgrund des Mangels an frei verfügbaren Primern zur PCR-Analyse der Geweih-DNA verwendeten wir Primer auf der Grundlage humaner RNA-Strukturen. Zunächst gab es hier Unsicherheiten, ob diese Primer auch die Geweih-RNA markieren würden. In Vorversuchen ließ sich die Geweih-RNA durch die auch in den hier vorliegenden Versuchsreihen verwendeten Primer markieren. Eine große strukturelle Ähnlichkeit zwischen der humanen und der RNA der Cerviden lässt sich demnach für die verwendeten Markergene annehmen. Ein ähnlicher Unsicherheitsfaktor besteht in Bezug auf die etablierten Tests zur Proteinanalyse. Inwieweit die Proteine der Geweihe strukturell mit den humanen übereinstimmen, ist in der vorliegenden Literatur noch nicht beschrieben. Jedoch auch in anderen hier teilweise zitierten Versuchsreihen mit Hirschgeweihzellen ist die Verwendung von Analyse-Kits für humane Proteine anerkannt. Zur Darstellung der Osteoblastenaktivität und einer voranschreitenden Mineralisation wählten wir das Verfahren der Calceineinlagerung, welches zuerst zu diesem Zweck von Hale et al. 2000 beschrieben wurde. Auf einzelne Besonderheiten der verwendeten Methoden wird in der weiteren Diskussion der Ergebnisse näher eingegangen.

4.2 Ergebnisse

Die jährliche Regeneration des Geweihs der Hirsche (z.B. Rehe: *Cariolus capriolus*, Rothirsche: *Cervus elaphus*, Damhirsche: *Dama dama*) stellt unter den Säugetieren ein einmaliges Phänomen dar. Es wurde vermutet, dass dieser Regeneration ein stammzell-basierter Prozess zugrunde liegt. Frühere Versuche mit Geweihzellen der Wachstumszone haben gezeigt, dass diese nicht weit differenziert sind und eine hohe Lebensspanne *in vitro* besitzen (Price und Fauchaux 2001). Kulturversuche mit Zellen des Knorpels der Wachstumszone zeigten, dass diese Typ-1- und Typ-2-Kollagen, sowie im weiteren Verlauf ALP exprimierten. Osteokalzin konnte im Gegensatz dazu nur in Zellen des reifen Geweihknochens nachgewiesen werden (Fauchaux et al. 2001).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Zellen des Rosenstockperiosts zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenzieren. Außerdem wird vermutet, dass diese Zellen von der Neuralleiste abstammen und somit auch neuronal differenzieren können (Kierdorf U et al. 2007).

In diesem Zusammenhang ist es uns gelungen, aus einer primären Gewehezellkultur mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) Zellen zu isolieren, die sich mit dem monoklonalen Stammzellmarker STRO-1 markieren ließen. STRO-1 wurde 1991 durch Simmons und Torok-Storb mit Hilfe einer Lymphozytenhybridfusion entwickelt. Es handelt sich um einen murinen monoklonalen IgM-Ak, welcher in einer Langzeitkultur von Knochenmarkszellen (KM-Zellen) über ein trypsinresistentes Antigen an humane fibroblastenartige und andere nichthämatopoetische Zellen bindet (Simmons und Torok-Storb 1991). Außerdem ist es möglich, mit Hilfe dieses Markers in Knochenmarkskulturen alle Colony Forming Units für Fibroblasten (CFU-F's) zu isolieren (Simmons und Torok-Storb 1991; Gronthos und Simmons 1995). Versuche mit STRO-1⁺-Zellen aus humanem Knochenmark haben gezeigt, dass diese Zellen die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene mesenchymale Zelltypen wie Stromazellen, Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten besitzen (Gronthos et al. 1994; Dennis et al. 2002). In Anbetracht dieser Ergebnisse ist zu vermuten, dass es sich bei den von uns isolierten STRO-1⁺-Zellen um multipotente Vorläuferzellen handeln könnte, welche die Basis der Geweihregeneration bilden. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der STRO-1⁺-Damhirschgeweihzellen (DHGZ) untersucht. Nach Isolierung durch eine FACS-Analyse zeigte sich in der Elektronenmikroskopie eine homogene Zellpopulation, was darauf schließen lässt, dass den folgenden Versuchen eine reine Kultur zugrunde lag. Diese wurde im Hinblick auf osteogene und neurogene Differenzierung untersucht. Zur Verifizierung der Multipotenz wurden weitere Versuche zur adipogenen und chondrogenen Differenzierung durchgeführt, die jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit sind.

Zur Anzucht der Damhirschgeweihzellen wurden drei verschiedene Medien eingesetzt. Zum einen wurden die Zellen in Standardkulturmedium kultiviert, um zu zeigen, wie sie sich ohne Zusatz von Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren verhalten. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob sie spontan differenzieren, also in eine Richtung vorgeprägt sind. Außerdem wurde ein osteoblastenförderndes

Medium eingesetzt. Durch die Anzüchtung in nervenzellförderndem Medium und den Zusatz von Nervenwachstumsfaktor sollte die Frage geklärt werden, ob es möglich ist, die STRO-1⁺-DHGZ soweit zu beeinflussen, dass sie sich in nicht mesenchymaler Zelllinie differenzieren. Es konnte gezeigt werden, dass die NGF-Sequenz der Hirsche bis zu 97% mit boviner, humaner und der NGF-Sequenz von Mäusen übereinstimmt. Außerdem konnte in den glatten Muskelzellen von Arterien und Arteriolen der wachsenden Geweihspitzen die Expression von NGF nachgewiesen werden. Die Axone folgten hier den Wegen der großen Blutgefäße und es wurde vermutet, dass NGF in Bezug darauf als Botenstoff dient (Li et al. 2007b). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass neuronale Stammzellen unter Einfluss von Proteinen des Basts in Kultur zur Differenzierung angeregt werden. Zu diesen Proteinen zählten u. a. NGF und IGF (Lu et al. 2005). Auf Grundlage dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die Zugabe von murinem NGF aufgrund der großen Sequenzübereinstimmungen einen Einfluss auf die Zellen in Kultur gehabt haben könnte.

Da in der bis jetzt vorhandenen Literatur über Geweihforschung wenig über die Differenzierung von Stammzellen und die Knochenentwicklung zu finden ist, wird in der folgenden Diskussion der Vergleich mit der humanen Stammzellforschung herangezogen.

Betrachtet man das Proliferationsverhalten der Zellen unter den verschiedenen Kulturbedingungen, so zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Die Zuwachsraten pro Tag steigen im OB-Medium deutlich schneller an und erreichen auch insgesamt die höheren Werte. Die Zellen zeigen hier ein früher beginnendes konfluentes Wachstum, woraufhin die Proliferation abnimmt. In anderen Zellversuchen konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung durch zunehmende Zelldichte getriggert wird (Caplan et al. 1983), und dass eine funktionelle und reziproke Beziehung zwischen Proliferation und Differenzierung besteht (Stein et al. 1996). Unter der Annahme, dass mit dem frühen Abfall der Proliferationsrate der Differenzierungsprozess voranschreitet, lässt sich vermuten, dass das OB-Medium sowohl eine proliferationsfördernde als auch eine differenzierungsfördernde Wirkung auf die STRO-1⁺-DHGZ hat. Im DMEM und im NB-Medium liegt die maximale Zuwachsrate pro Tag weit unter der des OB-Mediums, dennoch wird im DMEM die höchste Zellzahl innerhalb der Versuchsdauer erreicht. Sie zeigen also eine

geringere, aber länger andauernde proliferationsfördernde Wirkung. Auch in diesen Medien kommt es nach Erreichen der Konfluenz zu einem Abfall der Zuwachsrates pro Tag, welcher auf das Voranschreiten der Differenzierung hindeuten könnte. Da in diesem Medium bei Konfluenz aber die höchste Zellzahl erreicht wird, kann daraus geschlossen werden, dass in diesem Medium die durchschnittliche Zellgröße wesentlich kleiner ist als in den anderen beiden Medien.

MSCs zeigen in Kultur primär eine homologe, fibroblastenähnlich spindelförmige Population (Majumdar et al. 1998, Bruder et al. 1997). Bezüglich der morphologischen Veränderung gehen die Angaben auseinander. Jaiswal et al. (1997) und Bruder et al. (1997) beschreiben einen morphologischen Wandel von spindelförmigen zu kuboidalen Zellen unter dem Einfluss osteogenesefördernden Mediums. Ducy (2000) hingegen beschreibt, dass Osteoblasten in Kultur, im Gegensatz zu anderen Zelllinien, keinen morphologischen Wandel durchlaufen, sondern fibroblastenähnlich bleiben. In unseren Kulturen zeigte sich ein gemischtes Bild. Nach Aussaat der Zellen, stellten sich diese zunächst vergleichbar mit den MSCs spindelförmig dar. Mit zunehmender Kultivierungszeit kommt es in OB- und DMEM-Medium zu einem stark verdichtenden und mehrschichtigen Wachstum mit der Bildung von Kolonien. Die Zellen ändern nur sehr vereinzelt ihre Form und bleiben über die gesamte Kulturdauer spindelförmig. Nodule-Bildung und mehrschichtiges, verdichtendes Wachstum könnten hier auf eine Strukturformung im Sinne einer Knochenbildung hinweisen. Im Gegensatz dazu zeigt sich im NB-Medium ein weniger dichtes, eher einschichtiges Wachstum. Auch hier behalten die Zellen ihr spindelförmiges Aussehen. Im Laufe des Versuchs erscheinen sie jedoch mehr lang gezogen und bilden weit reichende Fortsätze, die an dendritische Zellen erinnern. Dieser Unterschied in der Morphologie könnte auf eine andere oder weniger fortgeschrittene Differenzierung hindeuten.

Die Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Calceinablagerung erlaubt eine qualitative und quantitative Bestimmung von mineralisierter Matrix in einschichtigen Kulturen (Monolayer). Die Kultur muss hierfür nicht fixiert werden, und die Zellschicht bleibt für weitere Untersuchungen erhalten. Auf diese Weise ist es möglich, die Entwicklung der Matrix im zeitlichen Verlauf darzustellen (Hale et al. 2000; Uchimura et al. 2003). Calcein wurde als fluorochromer Kationenindikator etabliert, um u. a. gebundene Ca-Ionen am sarkoplasmatischen Retikulum darzustellen (Chui und

Haynes 1977). Während der Bildung von extrazellulärer Knochenmatrix bindet Calcein an Ca-Ionen, welche in die Hydroxyapatitkristalle eingebaut werden. Es wurde gezeigt, dass hierbei eine lineare Beziehung zwischen dem Ca-Gehalt und der Fluoreszenzaktivität besteht (Uchimura et al. 2003). Zunächst kam es in den Kulturversuchen in allen Medien zu einer Erhöhung der intrazellulären Calceinaktivität. Die stärkste Fluoreszenz zeigte sich hier um den Zellkern, was auf eine Bindung an Calcium des sarkoplasmatischen Retikulums hindeuten könnte. Im weiteren Verlauf kam es jedoch zu einer flächigen Ausbreitung der Fluoreszenz und einer extrazellulären Ablagerung im DMEM und OB-Medium. Darüber hinaus kam es in diesen Medien zu einer verstärkten Fluoreszenz im Bereich der Nodule-Bildung. Diese Ergebnisse können darauf hindeuten, dass es in DMEM und OB-Medium zu einer Mineralisation der Matrix gekommen ist. Den höchsten Calceinumsatz zeigten die Zellen des OB-Mediums, was erneut einen Hinweis auf die differenzierungsfördernde Wirkung des Mediums sein könnte. Im NB-Medium blieb die Calceinanreicherung im zeitlichen Verlauf gleichmäßig über den Zellrasen verteilt und eher intrazellulär. Die fehlende extrazelluläre Ablagerung könnte hier auf einen ausbleibenden Mineralisationsprozess hindeuten.

Zur genaueren Analyse der Differenzierung wurde die Expression verschiedener Knochenmarker im zeitlichen Verlauf bestimmt. Interessant war hierbei, ob diese Gene von DHGZ exprimiert werden, und ob sie dabei, vergleichbar mit Osteoprogenitoren anderer Spezies, einer bestimmten Sequenz folgen. Außerdem sollte gezeigt werden, ob sich unter Einfluss des NB-Mediums mit Zusatz von NGF ein anderes Expressionsmuster präsentiert, welches auf eine Differenzierung in nicht osteogener Linie hinweist. Abb.13 zeigt die Expressionsfrequenz einiger verwendeter Knochenmarker und den Ca^{2+} -Gehalt einer Osteoprogenitorkultur im zeitlichen Verlauf. Ausgehend von diesem Expressionsmuster beschreiben Stein et al. (1996) vier verschiedene Entwicklungsstadien. Dem ersten Stadium der Proliferation folgt ein Stadium der Matrixreifung und -organisation. Darauf folgt die Phase der Mineralisierung der extrazellulären Matrix (ECM), welche in die letzte Phase des reifen Knochens mit Apoptose übergeht. Auch wenn andere Autoren beschreiben, dass es Hinweise darauf gibt, dass Knochenzellen in ihrer Entwicklung keinem bestimmten Expressionsmuster folgen (Madras et al. 2002), wird diese

Stadieneinteilung mit den dazugehörigen Markern der folgenden Diskussion der Ergebnisse zugrunde gelegt.

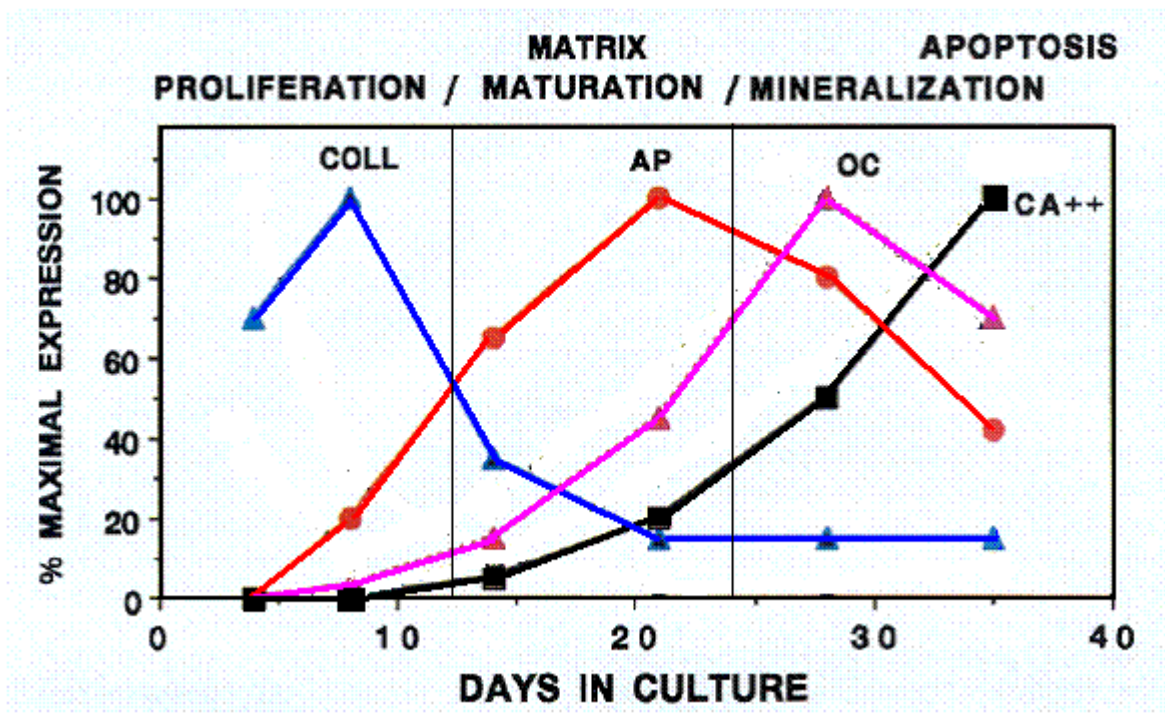


Abb. 13 Expressionsmuster von Kollagen (Coll), Alkalischer Phosphatase (AP) und Osteokalzin (OC), sowie die Ca²⁺-Ablagerung während der Osteoblastenentwicklung im zeitlichen Verlauf (modifiziert nach Stein et al. 1996, 596).

Der Transkriptionsfaktor Cbfa1/ Runx2 (core binding protein) ist ein Mitglied der Runt-Familie und stellt den frühesten Marker der Osteoblastendifferenzierung dar. Er wird bereits von MSCs (Mesenchymal Stem Cells) und frühen Knochenvorläuferzellen exprimiert (Aubin und Triffitt 2002). Cbfa1 bindet an das OSE2-Element, welches in den Promotorregionen der Gene von Osteokalzin, Kollagen 1 α 1, BSP und Osteopontin zu finden ist. Über diese Bindung reguliert Cbfa1 die Knochenformation durch Osteoblasten. Es befindet sich an der Spitze einer genetischen Kaskade, in der es positiv seine eigene Expression und die wichtiger osteoblastenspezifischer Gene kontrolliert (Ducy et al. 1999). Seine Expression ist streng auf skeletale Strukturen beschränkt und kann nicht in Weichgeweben gefunden werden (Ducy et al. 1997, Ducy 2000). In vitro konnte gezeigt werden, dass Cbfa1 in nicht-osteoblastären Zellen die Expression von osteoblastenspezifischen Genen induzieren kann (Ducy et al. 1997). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Cbfa1 essentiell für die embryonale Knochenentwicklung ist. Cbfa1-negative Mäuse exprimieren keine Marker reifer Osteoblasten. Folglich konnte

in ihrem Skelett keine Ossifikation nachgewiesen werden. Heterozygote Mäuse zeigten ein Krankheitsbild ähnlich der Cleidocranialen Dysplasie (CCD) (Otto et al. 1997, Ducy 2000, Yamaguchi et al. 2000). Cbfa1 unterstützt also nicht nur die Osteoblastendifferenzierung sondern auch deren Funktion. Außerdem gibt es Hinweise, dass Cbfa1 darüber hinaus eine Rolle in der Chondrozytenreifung und der Bildung von Osteoklasten spielt (Yamaguchi et al. 2000). Trotz seines starken Einflusses auf die Osteoblastendifferenzierung stellt Cbfa1 kein Mastergen dar. Es wird zwar für diese benötigt, ist jedoch alleine nicht ausreichend (Aubin und Triffitt 2002). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen in allen Versuchsansätzen eine Expression von Cbfa1, wobei keine signifikanten Unterschiede in der Intensität ausgemacht werden können. Dies legt nahe, dass in allen drei Medien eine Osteoblastendifferenzierung stattfindet oder bereits reife Osteoblasten vorhanden sind. Anhand der Cbfa1 Expression kann keine genaue Stadieneinteilung festgemacht werden, da es von frühen Vorläufern genauso wie von reifen Osteoblasten exprimiert wird (Lian und Stein 1999).

Ebenfalls schon im Stadium der Knochenvorläuferzellen wird Kollagen 1 exprimiert und in der voranschreitenden Differenzierung und Entwicklung der Knochenzellen hochreguliert (Aubin und Triffitt 2002). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden 20 Kollagene identifiziert, die sich je nach Struktur und Funktion in 7-8 Untergruppen aufteilen lassen. Die Kollagene 1, 2, 3, 5 und 11 bilden die Gruppe der fibrillenformenden Kollagene (von der Mark 1999, Rossert und De Crombrughe 2002). Kollagen 1 stellt das am häufigsten vorkommende Protein der Vertebraten dar. Es bildet einen Hauptbestandteil in Knochen, Sehnen, Bändern und Haut. Im Knochen bildet Kollagen 1 90 % der organischen Masse der ECM. Nicht nur Fibroblasten, Osteoblasten und Odontoblasten synthetisieren Kollagen 1, sondern auch fast jede andere Körperzelle in einem geringen Ausmaß. Die retikulären Fasern in hyalinem Knorpel und im Gehirn weisen jedoch kein Kollagen 1 auf. Typ 1 Kollagen wird aus zwei $\alpha 1$ und einer $\alpha 2$ Kette gebildet, die sich zu einer Triplehelix zusammen lagern. Es wird als Propeptid sezerniert und bildet, nach Abspaltung des N- und C- Polypeptits, als reifes Kollagen Fibrillen mit anderen Kollagenen (von der Mark 1999, Rossert und De Crombrughe 2002, Ebeling 2001). In Zellversuchen zeigte sich ein Maximum der Expression von Kollagen 1 gegen Ende der proliferativen Phase und während der Matrixablagerung (Stein et al. 1996, zur

Nieden et al 2003). Betrachtet man in unseren Versuchsreihen die relative Intensität der Expression in den drei Medien, lässt sich feststellen, dass es zunächst im Verhältnis zu Tag 0 zu einer Hochregulation im DMEM kommt. Im OB- und im NB-Medium nimmt die Expression zunächst ab, wobei es im NB-Medium in den ersten Tagen zu einem stärkeren Einbruch kommt. Das absolute Niveau der relativen Expression zeigt sich jedoch in allen drei Medien gleich. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es in allen Ansätzen zu einer Bildung von Kollagen 1 kommt. Ein Zeitpunkt der maximalen Expression lässt sich nicht ausmachen, daher ist es nicht möglich, eine Entwicklungsphase festzulegen. Da dieses Protein auch in anderen Geweben gebildet wird, kann eine eventuelle Expression durch in eine andere Richtung differenzierte Zellen nicht ausgeschlossen werden.

Die Alkalische Phosphatase (ALP) ist ein universelles Enzym, welches in fast allen Geweben zu finden ist. Es gibt zahlreiche Isoformen. Meist handelt es sich um Ektoenzyme, die von 4 Genen kodiert werden. Die knochenspezifische Alkalische Phosphatase gehört zusammen mit der ALP der Leber und der ALP der Niere zu der Gruppe der unspezifischen Alkalischen Phosphatasen. Die Isoformen entstehen durch posttranslationale Modifikation, wie Sialisation und Glykosylierung. Die knochenspezifische ALP wird als Tetramär von Osteoblasten gebildet und über einen Glycanester mit Inositol der Zellmembran verbunden (Glykophosphatidylinositol). Obwohl ihre genaue Funktion noch nicht bekannt ist, wurde gezeigt, dass sie die Hydrolyse von Phosphatesteren auf der Oberfläche der Osteoblasten katalysiert und so eine ausreichende Phosphatkonzentration für den Mineralisationsprozess sicherstellt (Henthorn et al. 1999, Demers 2001).

In Differenzierungsversuchen mit Osteoblasten und MSCs wurde die ALP besonders in der Phase der Matrixreifung exprimiert. Ein Abfall der Expression korrelierte mit dem Beginn der Mineralisation. Es konnte gezeigt werden, dass es ohne Einsetzen des Mineralisationsprozesses nicht zu einem Abfall der ALP kommt und die Expression von Osteokalzin nicht ansteigt (Stein und Lian 1993, Stein et al. 1996, Jaiswal et al. 1997). Darüber hinaus kann ALP aber auch in hypertrophen Chondrozyten während der enchondralen Ossifikation nachgewiesen werden (Church et al. 2002).

Der Verlauf der ALP-Konzentration in den von uns durchgeführten Versuchen zeigt nach einem steilen Anstieg nach 5 – 7 Tagen einen Abfall auf kaum messbare

Werte. Dieser Abfall in der ALP-Konzentration könnte auf einen einsetzenden Mineralisationsprozess hindeuten. Um einen genaueren Verlauf durch die einzelnen Entwicklungsstadien zu zeigen, wäre es interessant, den Verlauf der Expression von ALP in der Kombination mit der STRO-1-Expression darzustellen. Gronthos et al. (1999) konnten einen reziproken Verlauf der Expression von STRO-1 zu ALP im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung nachweisen. Dieser stellte sich wie folgt dar:

- Osteoprogenitor → STRO-1⁺/ALP⁻
- Pre-Osteoblast → STRO-1⁺/ALP⁺
- Osteoblast → STRO-1⁻/ALP⁺
- Osteozyt → STRO-1⁻/ALP⁻

(Gronthos et al. 1999, Aubin und Triffitt 2002).

Osteokalzin, auch Bone-Gla-Protein (BGP) genannt, stellt ein Ca²⁺ bindendes Protein dar, welches 1-20 % der nicht-kollagenen Proteine des Knochengewebes ausmacht, abhängig von Spezies, Alter und Körperregion. Je nach Spezies setzt es sich aus 46-50 Aminosäuren zusammen, mit einem durchschnittlichen Gewicht von 5,8 kDa. Seine große Affinität gegenüber Hydroxyapatit und Kalzium erhält es durch drei γ -Carboxyglutaminsäure Gruppen (Hauschka et al. 1989, Seibel 2005). Osteokalzin wird von reifen Osteoblasten, Odontoblasten und hypertrophen Chondrozyten gebildet und primär in die extrazelluläre Matrix (ECM) eingebaut. Nur ein geringer Teil gelangt ins Blut. Die Expression von Osteokalzin konnte auch in anderen Geweben, wie Megakaryozyten des Knochenmarks, peripheren Blutplättchen, Leber, Lunge und Gehirn, nachgewiesen werden. Hier zeigte sich jedoch keine Translation zum Protein (Gundberg und Nishimoto 1999). Die Expression erfolgt ausschließlich postproliferativ mit Mineralisation der extrazellulären Matrix, weshalb Osteokalzin als Marker für reife Osteoblasten gilt. Studien lassen vermuten, dass es eine Rolle in der Regulation zwischen Knochenformation und -Resorption spielt. In vivo fördert es die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung (Stein und Lian 1993). Die durch die hier zitierten früheren Arbeiten zum Ausdruck gebrachte Rolle des Osteokalzins als Mineralisationsstarter wird neuerdings angezweifelt. Da Osteokalzin die Insulinausschüttung erhöhen und Fettzellen zur Adiponektinfreisetzung stimulieren kann, greift es in den Energiestoffwechsel ein und wird daher eher als Hormon angesehen (Wolf 2008; Kanazawa et al. 2009). Lee et al. (2007) konnten

nachweisen, dass in Osteokalzin^{-/-} knockout Mäusen die Insulinsekretion und –sensitivität, die Glukosetoleranz und der Energiegrundumsatz erniedrigt waren.

Die Versuchsergebnisse geben eine Expression von Osteokalzin in allen drei Medien ab Tag 0 wieder. In den ersten 5 Tagen ergab sich ein hohe Konzentration des Proteins im Überstand der Kulturen. Ab Tag 5 kam es parallel in allen drei Ansätzen zu einem Abfall der messbaren Konzentration. Im OB- und DMEM Medium zeigten sich negative Werte. Über die gesamte Versuchsdauer hinweg lagen die Osteokalzinwerte im NB-Medium über denen der anderen Medien. Nach unserer Ansicht weisen hohe Osteokalzinkonzentrationen im Überstand nicht zwangsläufig auf eine höhere Produktion hin. Wie oben beschrieben, wird Osteokalzin nach älteren Vorstellungen primär in die ECM eingebaut und nur zu einem geringen Anteil in die Peripherie abgegeben. Da nur die Konzentration im Überstand bestimmt wurde, ohne eine eventuell entstandene ECM vorher aufzuspalten, kann über die absolute Proteinbildung wenig ausgesagt werden. Es wäre durchaus denkbar, dass im OB-Medium größere Mengen an die Matrix gebunden werden und daher nur ein geringer Teil des produzierten Osteokalzins in den Überstand abgegeben wurde. Da in den Zellkulturen in der relativ kurzen Versuchszeit aber keine nennenswerte Mineralisation stattfindet, ist eher an ein „Verbrauch“ des OCs zu denken. Da Osteokalzin ein Marker für reife Osteoblasten ist, zeigen diese Ergebnisse, dass in allen drei Ansätzen Osteoblasten vorhanden sind. Falls sich der Hormoncharakter von OC bewahrheiten sollte, könnte es auch einfach verbraucht worden sein.

Unter Berücksichtigung der Expressionssequenz der getesteten Marker lässt sich schließen, dass ab Tag 0 Osteoblasten in allen Kulturen vorhanden waren. Dies würde bedeuten, dass die isolierten STRO-1⁺-DHGZ bereits während der Expansionsphase einen Differenzierungsweg eingeschlagen haben. Es konnte gezeigt werden, dass STRO-1⁺-DHGZ zunächst keine osteogenen Marker exprimieren und nach 4 Wochen in Kultur zu 90% STRO-1⁺ bleiben (Rolf et al. 2008). Die Expansionszeit lag in den durchgeführten Versuchen bei 23 bzw. 36 Tagen. Auch wenn in dieser Zeit nur ein geringer Teil der Zellen einen osteogenen Differenzierungsweg eingeschlagen hat, können deren Expressionsmuster diejenigen von eventuell noch undifferenzierten Zellen überdecken. Eine Differenzierung entgegen der osteogenen Richtung im NB-Medium würde demnach nicht sichtbar werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde ein vergleichbarer Versuch mit frisch isolierten STRO-1⁺-DHGZ durchgeführt. Hier zeigte sich erst nach 21 Tagen im OB-Medium eine signifikante Expression von Osteokalzin (Rolf et al. 2008).

5 Zusammenfassung

Verglichen mit niederen Wirbeltieren, wie Amphibien, haben Säugetiere nur eine geringe oder keine Kapazität, Organe oder Extremitäten zu regenerieren. Eine interessante Ausnahme bilden unter den Säugetieren die Cerviden mit ihrer jährlich periodischen Geweihregeneration. Aufgrund des rapiden Wachstums und seiner röhrenknochenähnlichen Struktur, stellt das Geweih ein interessantes Modell für die Knochenforschung dar. Als Ausgangsort dieser Regeneration konnte das Periost der knöchernen Stirnfortsätze (antlerogenic periosteum) der Hirsche identifiziert werden. Der Mechanismus der Regeneration ist aber weiterhin ungeklärt und soll nach hypothetischer Vorstellung auf eine Dedifferenzierung periostaler Zellen zurückzuführen sein.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Versuch unternommen werden, entsprechende Zellen nachzuweisen und, wenn möglich, sie anzuzüchten und ihr Verhalten bezüglich Proliferation und Differenzierung zu beschreiben.

Als wesentliches Ergebnis konnte der immunhistochemische Nachweis von STRO-1⁺-Zellen im Perichondrium des wachsenden Geweihs erbracht werden. Aus den Geweihstanzen ließen sich problemlos Zellen anzüchten. Die aus den Kulturen isolierten und angezüchteten STRO-1⁺-Zellen zeigen in den verwendeten Kulturmedien unterschiedliche Proliferationsraten. Die Proliferationsrate pro Zeiteinheit dieser Zellen war im Osteoblasten-Medium im Vergleich zu DMEM und Neuroblasten-Medium erheblich höher, während die Gesamtzahl der Zellen bis zum Versuchsende im DMEM am höchsten war. Konfluentes Wachstum in Kulturschalen gleicher Größe wurde im OB-Medium nach 3,5 Tagen, im NB-Medium nach 6,7 und im DMEM nach 7,2 Tagen erreicht.

Ausgehend von einer homologen Morphologie unmittelbar nach Aussaat der Zellen ließ sich mit zunehmender Kulturzeit die Entwicklung verschiedener Morphologien feststellen. Die Zellen im DMEM oder OB-Medium blieben über die Kulturzeit spindelförmig, neigten jedoch zu mehrschichtigem Wachstum und Kolonie-Bildung, wie sie bei der Kultur mesenchymaler Stammzellen beschrieben ist. Die Zellen im NB-Medium hingegen bildeten lange Zellfortsätze und zeigten ein weniger dichtes einschichtiges Wachstum, wie bei dendritischen Zellen üblich ist. Weitere Hinweise auf eine mögliche unterschiedliche Differenzierung gibt auch die Einlagerung von

Calcein. Im Gegensatz zu den Kulturen im NB-Medium, ließ sich im DMEM und OB-Medium eine starke intra- und extrazelluläre Anreicherung nachweisen. Dies deutet auf eine Osteoblastenaktivität und einen zum Versuchsschluss beginnenden Mineralisationsprozess in diesen beiden Medien hin. Die Zellen im OB-Medium zeigen hierbei den höchsten Calceinumsatz, was erneut auf die differenzierungsfördernde Wirkung des Mediums hinweist. Zur genaueren Analyse der Differenzierungsrichtung sowie des Differenzierungsstadiums wurde die Expression knochenspezifischer Marker getestet. Hier konnte gezeigt werden, dass die DHGZ in den verschiedenen Medien die Knochenzellmarker CBFa1, alkalische Phosphatase und Osteokalzin in unterschiedlicher Stärke exprimieren. Jedoch ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Expressionsmuster nachweisen, so dass eine Stadieneinteilung im zeitlichen Verlauf nicht möglich ist. Auch im NB-Medium ließ sich die Expression knochenzellspezifischer Marker nachweisen. Diese Feststellungen und das Vorhandensein von Osteokalzin und alkalischer Phosphatase ab dem ersten Kulturtag in allen Medien zeigen, dass bereits in der Expansionsphase ohne Einfluss von Wachstumsfaktoren eine Differenzierung in osteogener Zelllinie stattgefunden hat. Dies könnte auf eine Vorprägung der STRO-1⁺-DHGZ hindeuten. Es scheint jedoch die Möglichkeit zu bestehen, STRO-1⁺-DHGZ durch Anzucht in verschiedenen Medien und Zugabe von Wachstumsfaktoren in ihrem Wachstums- und Differenzierungsverhalten zu beeinflussen. Das Differenzierungsverhalten im zeitlichen Verlauf und die mögliche Differenzierung in andere Zelllinien sollte durch Modifizierung der in dieser Arbeit gegenständlichen Versuche weiter untersucht werden.

Aufgrund der vorliegenden Arbeit scheint die periodische Erneuerung des Geweihs der Hirsche eher auf einer Aktivierung von Stammzellnischen STRO-1⁺ mesenchymaler Stammzellen als auf Dedifferenzierung entsprechender Zellen der Geweihbasis zu beruhen. Als primärer Ort dieser Nischen ist das so genannte „Antlerogene Periost“ (AP) anzusehen, welches die Rosenstöcke bedeckt. Hier wurde in früheren Arbeiten auch der Ort der Dedifferenzierung vermutet. Auf welche Art die Aktivierung der Nischen erfolgt und welche Faktoren die Stammzellendifferenzierung beeinflussen, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6 Anhang: Tab. 2 bis 5

Tab. 2 Medien und Zusätze

Medium/Zusätze	Bestellnummer	Hersteller
monoklonaler Anti-humaner STRO-1 Antikörper	Mab 1038	R&D Systems www.RnDSystems.com
Fluoreszein Isothiocyanat (FITC)-konjugierter anti-mouse-IgM Antikörper		BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg www.bdeurope.com
DMEM 3,7g/INaHCO ³ 1g/l D-Glucose 1,028g/l stable Glutamin	FG0415	Biochrom AG, Berlin www.biochrom.de
Osteoblasten Growth Medium +Supplement Mix, beinhaltet 10% FKS	C-27001 C-39615	Promo Cell GmbH, Heidelberg www.promocell.com/de
Neurobasal Medium	21103-049	GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com
FBS	S 0115	Biochrom AG, Berlin www.biochrom.de
Gentamycin	A 2712	Biochrom AG, Berlin www.biochrom.de
L-Glutamin solution, liquid, 200mM, sterile- filtered, cell culture tested	G 7513	Sigma-Aldrich, Seelze www.sigmaaldrich.com
Nerve Growth Factor 7S, Murine, Natural lyophilized	13290-010	GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com
D-PBS, flüssig	14190-094	GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com
Trypsin-EDTA (0,05% Trypsin mit EDTA 4Na), flüssig	25300-054	GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com

Medium/Zusätze	Bestellnummer	Hersteller
Calcein Indikator	1.02315.0005	MERCK KGaA, Darmstadt www.merck.de
Rneasy Protect Mini Kit (250)	74126	QIAGEN GmbH, Hilden www1.qiagen.com
Rnase-Free Dnase Set (50)	79254	QIAGEN GmbH, Hilden www1.qiagen.com
iScript cDNA Synthesis Kit 100	170-8891	Bio-Rad Laboratories GmbH, München www.bio-rad.com
<i>Primer Mix</i> → GADPH, Collagen 1, Osteocalcin, cbfa 1		IBA GMBH, Göttingen www.iba-go.com
Go Taq Green Master Mix	M7112	Promega GmbH, Mannheim www.promega.com
Nuclease free Water	P1193	Promega GmbH, Mannheim www.promega.com
100bp DNA Leiter	15628-050	GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com
Certified Molecular Biology Agarose	161-3101	Bio-Rad Laboratories GmbH, München www.bio-rad.com
UltraPure 10mg/ml Ethidium Bromid	15585-011	GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com
Tris-Borate-EDTA (TBE) Puffer, dry blend, 5x konzentriert	93309	Sigma-Aldrich, Seelze www.sigmaaldrich.com
N-MID Osteocalzin ELISA	3OSC4000	Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev, Dänemark www.nbdiagnostics.com
Fluitest ALP, alkalische Phosphatase, optimierte (DGKC) Methode	1622	Biocon Diagnosemittel GmbH & Co., Vöhl/Marienhagen www.biocon.de

Tab. 3 Labormaterialien und -geräte

Material	Bestellnummer	Hersteller
24-Well Platten		Sarstedt AG&Co., Nümbrecht www.sarstedt.com
6-Well Platte		Sarstedt AG&Co., Nümbrecht www.sarstedt.com
75 cm ² Kulturflaschen		Sarstedt AG&Co., Nümbrecht www.sarstedt.com
Sterile Ecups		Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de
Reagensröhrchen		Sarstedt AG&Co., Nümbrecht www.sarstedt.com
Brutschrank		Sanyo Biomedical, Ewald Innovationstechnik GmbH www.sanyo-biomedical.de
Wasserbad		Memmert GmbH+Co.KG, Schwabach www.memmert.de
Zentrifuge		SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz www.sigma-zentrifugen.de
Casy-Cell-Counter Modell TT		Schärfe System GmbH, Reutlingen www.casy-technologie.com
Mikroskop Axiovert 200M		Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena www.zeiss.de
Homogenisator Sonoplus HD 2070		Bandelin, Berlin www.bandelin.com
NALGENE Cryo 1°C Freezing Container	5100-0001	Nalge Europe Ltd, Neerijse, Belgien www.nalgenunc.com
Kryoröhrchen	363401	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark www.nuncbrand.de
Stickstofftank		Air Liquide-Division Matériel Cryogénique, Frankreich www.dmc.airliquide.com

Material	Bestellnummer	Hersteller
RNeasy Protect Mini Kit 250	74126	QIAGEN GmbH, Hilden www1.qiagen.com
QIAshedder 250	79656	QIAGEN GmbH, Hilden www1.qiagen.com
Zentrifuge Cenrifuge 5417C		Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de
Photometer BioPhotometer		Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de
PCR soft strips 0,2ml, gem. Farben	710988	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf www.biozym.com
Master Cycler gradient		Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de
Präzisionspipetten 10-1000µl Research		Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de
Elite 300 Plus Elektrophoresekammer		Harnischmacher Labortechnik, Kassel www.harnischmacher.net
Bio Doc Analyse Biometra Ti 5		Biometra GmbH i.L., Göttingen www.biometra.com

Tab. 4 Zuordnung der RNA-Proben des 1. Versuchs

Datum	Tag	OB Proben-Nr.	DMEM Proben-Nr.	NB Proben-Nr.
16.02.05	0		1	
18.02.05	2	2	3	4
23.02.05	7	5	6	7
28.02.05	12	8	9	10
04.03.05	16	11	12	13
09.03.05	21	14	15	16
21.02.05	5	17	18	19
25.02.05	9	20	21	22
02.03.05	14	23	24	25
07.03.05	19	26	27	28

Tab. 5 Zuordnung der RNA-Proben des 2. Versuchs

Datum	Tag	OB Proben-Nr.	DMEM Proben-Nr.	NB Proben-Nr.
09.09.05	0	01	02	03
12.09.05	3	1	2	3
14.09.05	5	7	8	9
16.09.05	7	13	14	15
19.09.05	10	19	20	21
21.09.05	12	25	26	27
23.09.05	14	31	32	33
26.09.05	17	37	38	39
28.09.05	19	43	44	45
04.10.05	25	49	50	51
05.10.05	26	55	56	57
07.10.05	28	61	62	63
10.10.05	31	67	68	69

7 Literaturverzeichnis

Aubin JE, Triffitt JT: Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation; in: Principles of Bone Biology, Second Edition, Volume 1, hrsg. v. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA; Academic Press, San Diego, Calif. u.a. **2002**, 59-81

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997): Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J Cell Biochem, Vol. 64, 278-294

Bubenik GA: Deer Antlers- A wonder of nature: Structure and Funktion of Antlers, regulation of their development and their potential in medicine; in: Antler Science and Product Technology, hrsg. v. Sim JS, Sunwoo HH, Hudson RJ, Jeon BT; Antler Science and Product Technology Research Centre, Edmonton **2001**, 3-13

Caplan AI, Syftestad G, Osdoby P (1983): The development of embryonic bone and cartilage in tissue culture. Clin Orthop, Vol. 174, 243-263

Ceglielski M, Calkosiński I, Dzięgiel P, Gębarowski T, Podhorska-Okolów M, Skalik R, Zabel M (2006): Search for stem cells in the growing antler stag (*Cervus elaphus*). Bull Vet Inst Pulawy, Vol. 50, 247-251

Chiu VCK, Haynes DH (1977): High and low affinity Ca^{2+} binding to the sacroplasmatic reticulum. Biophys J, Vol. 18, 3-22

Church V, Nohno T, Linker C, Marcelle C, Francis-West P (2002): Wnt regulation of chondrocyte differentiation. J Cell Sci, Vol. 115, 4809-4818

Demers LM: Bone-spezifische alkaline Phosphatase; in: "Bone Markers"—Biochemical and Clinical Perspectives, hrsg. v. Eastell R, Baumann M, Hoyle NR, Wiczorek L; Martin Dunitz, London **2001**, 57-64

Dennis JE, Carbillet J-P, Caplan AI, Charbord P (2002): The STRO-1+ Marrow Cell Population Is Multipotential. *Cells Tissues Organs*, Vol. 170, 73-82

Ducy P (2000): Cbfa1: A molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn*, Vol. 219, 461-471

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997): Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, Vol. 89, 747-754

Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G (1999): A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev*, Vol. 13, 1025-1036

Ebeling PR: Potential candidates for bone turnover markers-N-telopeptide cross-links of type I collagen (NTX); in: "Bone Markers" – Biochemical and Clinical Perspectives, hrsg. v. Eastell R, Baumann M, Hoyle NR, Wiczorek L; Martin Dunitz, London **2001**, 27-38

Faucheux C, Nesbitt SA, Horton MA, Price JS (2001): Cells in regenerating deer antler cartilage provide a microenvironment that supports osteoclast differentiation. *J Exp Biol*, Vol. 204, 443-455

Goss RJ, Powel RS (1985): Induction of deer antlers by transplanted periosteum. I. Graft and shape. *J Exp Zool*, Vol. 235, 359-373

Gronthos S, Simmons PJ (1995): The Growth Factor Requirements of STRO-1-Positive Human Bone Marrow Stromal Precursors Under Serum-Derived Conditions In Vitro. *Blood*, Vol. 85, No 4, 929-940

Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ (1994): The STRO-1⁺ Fraction of Adult Human Bone Marrow Contains the Osteogenic Precursors. *Blood*, Vol. 84, No12, 4164-4173

Gronthos S, Zannettino ACW, Graves SE, Ohta S, Hay SJ, Simmons PJ (1999): Differential cell surface expression of the STRO-1 and Alkaline Phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res*, Vol. 14, 47-56

Gundberg CM, Nishimoto SK: Vitamin K- Dependent Proteins of Bone and Cartilage; in: *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*, hrsg. v. Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP; Academic Press, San Diego, Calif. u.a. **1999**, 43-58

Hale LV, Ma YF, Santerre RF (2000): Semi-Quantitativ Fluorescence Analysis of Calcein Binding as a Measurement of In Vitro Mineralisation. *Calcif Tissue Int*, Vol. 67, 80-84

Hartwig H, Schrudde J (1974): Experimentelle Untersuchungen zur Bildung der primären Stirnauswüchse beim Reh (*Capreolus capreolus* L.). *Z Jagdwiss* , Vol. 20, 1-13

Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gundberg CM (1989): Osteocalcin and Matrix Gla Protein: Vitamin K-Dependent Proteins in Bone. *Physiol Rev*, Vol. 69, No. 3, 990-1047

Henthorn PS, Millán JL, Leboy P: Acid and Alkaline Phosphatases; in: *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*, hrsg. v. Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP; Academic Press, San Diego, Calif. u.a. **1999**, 127-136

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997): osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, Vol. 64, 295-312

Kanazawa I, Yamaguchi T, Sugimoto T (2009): Baseline serum total adiponectin level is positively associated with changes in bone mineral density after 1-year treatment of type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, (Epub ahead of print)

Kierdorf U, Kierdorf H: State of determination of the antlerogenic tissues with special reference to double-head formation; in: *The Biologie of Deer*, hrsg. v. Brown RD; Springer Verlag, New York **1992**, 525-531

Kierdorf U, Kierdorf H (2000): Delayed ectopic antler growth and formation of a double-head antler in metacarpal region of a fallow buck (*Dama dama* L.) following transplantation of antlerogenic periosteum. *Anat Anz*, Vol. 182, 365-370

Kierdorf U, Kierdorf H: The role of antlerogenic periosteum for pedicle and antler formation in deer; in: *Antler Science and Product Technology*, hrsg. v. Sim JS, Sunwoo HH, Hudson RJ, Jeon BT; Antler Science and Product Technology Research Centre, Edmonton **2001**, 33-52

Kierdorf U, Stoffels E, Stoffels D, Kierdorf H, Suwart T, Clemen G (2003): Histological Studies of Bone Formation During Pedicle Restoration and Early Antler Regeneration in Roe Deer and Fallow Deer. *Anat Rec A Discov Moll Cell Evol Biol*, Vol. 273A:741–751

Kierdorf U, Kierdorf H, Suwart T (2007): Deer antler regeneration: Cells, concepts, and controversies. *J Morphol*, Vol. 268, 726-738

Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G (2007): Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, Vol. 130 (3), 456-69

Li C, Suttie JM (2001): Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue. *Anat Embryol*, Vol. 204, 375-388

Li C, Suttie JM, Clark DE (2005): Histological Examination of Antler Regeneration in Red Deer (*Cervus elaphus*) *Anat Rec A Discov Moll Cell Evol Biol*, Vol. 282A, 163-174

Li C, Mackintosh CG, Martin SK, Clark DE (2007a): Identification of key tissue for antler regeneration through pedicle periosteum deletion. *Cell Tissue Res*, Vol. 328, 65-75

Li C, Stanton JL, Robertson TM, Suttie JM, Sheard PW, Harris AJ, Clark DE (2007b): Nerve Growth Factor mRNA expression in the regenerating antler tip of red deer (*Cervus elaphus*). *PLoS ONE*, Vol. 2 (1), e148

Lian JB, Stein GS: The cells of bone; in: *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*, hrsg. v. Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP; Academic Press, San Diego, Calif. u.a. **1999**, 165-186

Lu L, Chen L, Meng X, Yang F, Zhang Z, Chen D (2005): Biological effect of velvet antler polypeptides on neural stem cells from embryonic rat brain. *Chin Med J*, Vol. 118 (1), 38-42

Madras N, Gibbs AL, Zhou Y, Zandstra PW, Aubin JE (2002): Modeling stem cell development by retrospective analysis of gene expression profiles in single progenitor-derived colonies. *Stem Cells*, Vol. 20, 230-240

Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson ST (1998): Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*, Vol. 176, 57-66

Napp J, Wiese KG, Kierdorf U, Kierdorf H, Seymour N, Schliephake H, Rolf HJ: Stem cells isolated from regenerating antler express key markers of the osteogenic lineage; in: *Advances in Deer Biology: Deer in a changing world*, hrsg. v. Bartos L, Dusek A, Kotrba R, Bartosová-Vichová J; Research Institute of Animal Production, Prag **2006**, 162

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GWH, Beddington RSP, Mundlos S, Olsen BR et al. (1997): *Cbfa1*, a candidate

gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, Vol. 89, 765-771

Price JS, Faucheux C: Exploring the molecular mechanisms of antler regeneration; in: *Antler Science and Product Technology*, hrsg. v. Sim JS, Sunwoo HH, Hudson RJ, Jeon BT; Antler Science and Product Technology Research Centre, Edmonton **2001**, 53-67

Price JS, Allen S (2004): Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, Vol. 359, 809-822

Price JS, Oyajobi BO, Oreffo RO, Russel RG (1994): Cells cultured from the growing tip of red deer antler express alkaline phosphatase and proliferate in response to insuline-like growth factor-1. *J Endocrinol*, Vol. 143, R9-R16

Price JS, Allen S, Faucheux C, Althnaian T und Mount JG (2005): Deer antlers: A zoological curiosity or key to understanding organ regeneration in mammals? *J Anat*, Vol. 207, 603-618

Rolf HJ, Fischer K (1996): Serum Testosterone, k+Dihydrotestosterone and Different Sex Characteristics in Male Fallow Deer (*Cervus danta*): A Long-term Experiment with Accelerated Photoperiods. *Comp Biochem Physiol*, Vol. 115A, No. 3, 207-221

Rolf HJ, Kierdorf U, Kierdorf H, Seymour N, Napp J, Schliephake H, Wiese KG: Visualization and characterization of stem cells from regenerating deer antler; in: *Advances in Deer Biology: Deer in a changing world*, hrsg. v. Bartos L, Dusek A, Kotrba R, Bartosová-Vichová J; Research Institute of Animal Production, Prag **2006**, 160

Rolf HJ, Kierdorf U, Kierdorf H, Schulz J, Seymour N, Schliephake H, Napp J, Niebert S, Wölfel H, Wiese KG (2008): Localisation and Charakterisation of STRO-1⁺ Cells in the Deer Pedicle and Regenerating Antler. *PLoS ONE*, Vol. 3(4), e2064

Rossert J, De Crombrughe B: Type 1 Collagen; Structure, Synthesis, and Regulation; in: Principles of Bone Biology, Second Edition, Volume 1, hrsg. v. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA; Academic Press, San Diego, Calif. u.a. **2002**, 189-210

Sadighi M, Haines SR, Skottner A, Harris AJ, Suttie JM (1994): Effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II on the growth of antler cells in vitro. J Endocrinol, Vol. 143, 461-469

Sadighi M, Li C, Littlejohn RP, Suttie JM (2001): Effects of testosterone either alone or with OGF-1 on growth of cells derived from the proliferation zone of regenerating antlers in vitro. Growth Horm IGF Res, Vol. 11, 240-246

Seibel M.J. (2005): Biochemical Markers of Bone Turnover Part 1: Biochemistry and Variability. Clin Biochem Rev, Vol. 26 (4), 97-122

Simmons PJ, Torok-Storb B (1991): Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood, Vol. 78, No. 1, 55-62

Stein GS, Lian JB (1993): Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. Endocr Rev, Vol. 14, No. 4, 424-442

Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Montecino M (1996): Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. Physiol Rev, Vol. 76, No. 2, 593-629

Uchimura E, Machida H, Kotobuki N, Kihara T, Kitamura S, Ikeuchi M, Hirose M, Miyake J, Ohgushi H (2003): In-Situ Visualization and Quantification of Mineralization of Cultured Osteogenic Cells. Calcif Tissue Int, Vol. 73, 575-583

von der Mark K: Structure, biosynthesis, and gene regulation of collagens in cartilage and bone; in: Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism, hrsg. v. Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP; Academic Press, San Diego, Calif. u.a. **1999**, 3-30

Wolf G (2008): Energy regulation by the skeleton. Nutr Rev, Vol. 66 (4), 229–233

Yamaguchi A, Komori T, Suda T (2000): Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs and Cbfa1. Endocr Rev, Vol. 21 (4), 393-411

zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ (2003): In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. Differentiation, Vol. 71, 18-27

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K. G. Wiese für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation und stete Diskussionsbereitschaft.

Darüber hinaus gilt Ihm und Herrn Dipl.-Biol. Dr. rer. nat. Hans Rolf mein ganz besonderer Dank für die hervorragende Betreuung, die vielen Anregungen und Hilfestellungen.

Dem gesamten Laborteam der Abteilung Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Danken möchte ich auch Frau Jutta Schulz für die Hilfe bei der Ausführung der Zellversuche und Proteinanalysen, sowie Frau Dr. Joanna Napp für Ihre Unterstützung bei den RNA-Analysen.

Außerdem gilt mein Dank der Abteilung Hämatologie und Onkologie des Klinikums Göttingen (Prof. Trümper/Prof. Dr. Wulf) für die Unterstützung bei der Durchführung der FACS-Analysen.

Lebenslauf

Ich, Natascha Seymour, wurde am 02.01.1982 in Paderborn (Nordrhein-Westfalen) als zweites Kind meiner Eltern Marie-Luise Seymour, geb. Disse (27.04.1952) und Stephen Raymond Seymour (29.08.1952) geboren.

Ich wurde im August 1988 in der Josefschule Schloß Neuhaus eingeschult. Von da aus wechselte ich im August 1992 in die Sekundarstufe 1 des Goerdeler-Gymnasiums Paderborn. Dort erhielt ich am 18.06.2001 meine Allgemeine Hochschulreife.

Im Oktober 2001 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Meine ärztliche Vorprüfung absolvierte ich dort im Sommersemester 2003.

Zu meinem Praktischen Jahr trat ich im Februar 2007 an. Meine Tertiale absolvierte ich in der Abteilung für Innere Medizin im Albert-Schweitzer-Krankenhaus Northeim und in den Abteilungen für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Unfallchirurgie, sowie in der Abteilung für Pädiatrie des St. Vincenz-Krankenhauses Paderborn.

Den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich am 28. Mai 2008 an der Georg-August-Universität Göttingen.

Im Januar 2009 begann ich im Klinikum Oldenburg meine Ausbildung zur Fachärztin für Allgemein- und Viszeralchirurgie. Diese werde ich ab Juni 2010 im St-Josefs-Hospital Cloppenburg fortsetzen.