Aus der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe
(Prof. Dr. med. G. Emons)
im Zentrum Frauenheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Wirkungsweise von Bisphosphonaten auf die Expression verschiedener Knochenmarker in mesenchymalen Stammzellen der menschlichen Plazenta

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Götz Kemper
aus Berlin
Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I.	**Berichterstatter:**	**Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker**
II.	**Berichterstatterin:**	**Prof. Dr. med. H. Siggelkow**
III.	**Berichterstatter:**	**Prof. Dr. med. M. Oppermann**

Tag der mündlichen Prüfung 26.10.2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 3
Abkürzungsverzeichnis 5
1 Einleitung 7
1.1 Humane mesenchymale Stammzellen 7
1.1.1 Mesenchymale Stammzellen der Plazenta 10
1.1.2 Aufbau und Struktur der Plazenta 11
1.1.3 Ursprung mesenchymaler Stammzellen der reifen humanen Plazenta 13
1.2 Osteoblastäre Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen 15
1.2.1 Funktion und Aufbau des Knochens 15
1.2.2 Osteogene Differenzierungsfaktoren 18
1.2.3 Osteoblastäre Marker 20
1.3 Bisphosphonate 24
1.4 Fragestellung 27
2 Material und Methoden 29
2.1 Material 29
2.1.1 Geräte 29
2.1.2 Verbrauchsmaterialien 30
2.1.3 Chemikalien 31
2.1.4 Lösungen und Puffer 31
2.1.5 Nährmedien 32
2.1.6 Kits 32
2.1.7 Enzyme 32
2.1.8 Oligonukleotide 33
2.1.9 Hormone und Stimulanzien 34
2.1.10 Zellmaterial 34
2.2 Methoden 36
2.2.1 Zellkultur 36
2.2.2 Molekularbiologische Methoden 38
2.2.3 Stimulationsversuche 44

3 Ergebnisse 47

3.1 Effekte auf die mRNA-Expression von OPG, COL-I und AP nach Behandlung mit den Bisphosphonaten PAM und ZOL 48

3.1.1 Osteoprotegerin- mRNA-Expression 48

3.1.2 Kollagen-I- mRNA-Expression 53

3.1.3 Alkalische-Phosphatase-mRNA-Expression 55

3.2 Effekte auf die mRNA-Expression von OPG, COL-I und AP nach Behandlung mit $VitD_3$ 57

3.3 Effekt auf die mRNA-Expression von OPG, COL-I und AP nach Behandlung mit $VitD_3$ und ZOL 59

3.4 Effekte auf die mRNA-Expression von OPG, COL-I und AP nach osteogener Stimulation 61

3.4.1 Osteoprotegerin-mRNA-Expression 61

3.4.2 Kollagen-I-mRNA Expression 63

3.4.3 Alkalische-Phosphatase-mRNA-Expression 65

4 Diskussion 67

4.1 Effekte von Bisphosphonaten auf die Expression unterschiedlicher osteoblastärer Marker 69

4.2 Eigenarten mesenchymaler Stammzellen der Plazenta 73

4.3 Fazit 78

5 Zusammenfassung 81

6 Literaturverzeichnis 83

Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
BMP	*bone morphogenetic protein*
Bp	Basenpaare
BSA	*Bovine serum albumine*
BSP	Bisphosphonat(e)
Cbfa1	*core binding factor alpha 1*
cDNA	*copy* Desoxyribonukleinsäure
CFU-F	*Colony-forming unit fibroblast*
COL-I	Kollagen-I
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
Ethanol	ETOH
FCS	*fetal calf serum*
hOB	Humane Osteoblasten
IGF	*Insulin like growth factor*
IL	Interleukin
M-CSF	*macrophage colony stimulating factor*
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stammzellen
− bMSC	Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks
− hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
− pMSC	Mesenchymale Stammzellen der Plazenta
OC	Osteocalcin

ON	Osteonectin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
PAM	Pamidronat
PBS	*phosphate-buffered sodium*
PCR	*polymerase chain reaction*
PGE	Prostaglandine
PS	Penicillin/Streptomycin
PTH	Parathormon
RANK	*receptor activator of NFkappaB*
RANKL	*receptor activator of NFkappaB ligand*
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SS	Schwangerschaft
TGF	*Transforming growth factor*
TNF	*tumor necrosis factor*
TNSALP	*tissue non specific alkaline Phosphatase*
Vit D_3	Vitamin D_3
ZOL	Zoledronat

1 Einleitung

Degenerative Erkrankungen, wie Osteoporose, verschiedene konsumierende Tumorerkrankungen oder posttraumatisch bedingte Veränderungen, also Erkrankungen, welche die Funktion von Zellen, Geweben oder Organen zerstören, betreffen Millionen von Menschen. Die regenerative Medizin verfolgt den Ansatz biologischen Ersatzes, z.B. durch gezüchtete Gewebe oder durch die Anregung körpereigener Regenerations- und Reparaturprozesse.

Im Wesentlichen basiert die regenerative Medizin auf drei Prinzipien: 1) der Stammzelltransplantation, die bereits seit mehr als 40 Jahren erfolgreich zur Behandlung von Leukämien und Lymphomen eingesetzt wird, 2) der Gentherapie, also der Reparatur oder dem Ersatz defekter Erbinformationen und 3) dem so genannten *Tissue Engineering*, dem Züchten von Gewebe- und Zellverbänden (Ringer et al. 2003). Eine interessante Zellquelle für Ansätze des *Tissue Engineering* bieten mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSC).

1.1 Humane mesenchymale Stammzellen

Die Analyse der Differenzierung von Geweben mesodermaler Herkunft hat zu der Identifikation von gemeinsamen Differenzierungswegen und Vorläuferstadien geführt, die von Caplan 1994 als *messenger progress* zusammengefasst wurden. Die frühesten Vorläuferzellen in diesem Prozess wurden phänotypisch eingegrenzt und als MSC bezeichnet. MSC wurden erstmals von Owen 1985 und Caplan 1991 vorhergesagt, deren Hypothesen auf Pionierarbeiten von Friedenstein vor 40 Jahren zum Differenzierungspotential von Knochenmark beruhen. Es handelt sich dabei um oberflächenadhärente, morphologisch den Fibroblasten ähnliche, nicht blutbildende Zellen aus dem Knochenmark. Sie zeichnen sich durch die Fähigkeiten der Selbstreplikation und Differenzierbarkeit in verschiedene mesenchymale Gewebszellen aus (Friedenstein et al. 1976; Owen 1985; Caplan 1991) (Abb. 1.1). Nach der Isolation der MSC werden diese *ex vivo*

expandiert und *in vitro* mit Hilfe geeigneter Differenzierungsfaktoren z.B. osteogen oder chondral induziert (Pittenger et al. 1999). Die erste Zellpopulation, welche über ein hohes Maß an Proliferationskapazität verfügt und gleichzeitig ihr osteogenes Potential über eine Vielzahl von Passagen aufrecht erhält, wurde im menschlichen Knochenmark bewiesen (Jaiswal et al. 1997; Reyes et al. 2001). In weiterführenden Arbeiten konnten diese Populationen von MSC mittlerweile in verschiedene Funktionsgewebe mesodermalen Ursprungs, wie Knochen, Knorpel, Muskel, Sehnen, Fett und in einige neuroektodermale Zelltypen differenziert werden.

MSC-spezifische Oberflächenmarker, einzeln oder in Kombination, fehlen derzeit noch. Jedoch werden sie durch die Kombination von An- oder Abwesenheit verschiedener Zelloberflächenproteine, Adhäsionsmoleküle, extrazellulärer Matrixmoleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren charakterisiert (Pittenger et al. 1999; Ringe et al. 2002; Barry und Murphy 2004; Otto und Rao 2004). MSC des Knochenmarks exprimieren keine Marker der hämatopoetischen oder endothelialen Differenzierung wie CD31, CD34, CD45, CD133 oder Tie2. Bei einer Mehrzahl der Zellen konnten jedoch der Rezeptor für den Stammzellfaktor c-kit (CD117), der Korezeptor für *transforming growth factor* (TGF-)β Endoglin (CD105) sowie die Ektonukleotidase CD73 und das β1-Integrin CD29 detektiert werden (Haynesworth et al. 1992; DiGirolamo et al. 1999; Wulf et al. 2004).

Die Häufigkeit von MSC in menschlichem Knochenmark ist relativ gering, so dass eine Expansion *in vitro* notwendig ist. Die *in-vitro*-Vermehrungskapazität hängt sowohl vom Alter und Zustand des Knochenmarkspenders als auch von der Art der Entnahme ab (Caplan 1994; DiGirolamo et al. 1999). So nehmen Vorkommen und Differenzierungspotential mit dem Alter deutlich ab (D'Ippolito et al. 1999). Damit ist die Gewinnung der MSC aus dem Knochenmark Einschränkungen unterworfen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in *in-vitro*- sowie *in-vivo*-Studien MSC aus weiteren fötalen und adulten Geweben isolieren. Dazu gehören Pankreas (Hu et al. 2003), Synovialgewebe (De Bari et al. 2001; Djouad et al. 2005), Fettgewebe (Zuk et al. 2001), trabekulärer Knochen (Noth et al. 2002) und Periost, Fruchtwasser (Tsai et al. 2004),

Nabelschnurblut (Bieback et al. 2004) und Plazenta (Zhang X et al. 2003; Wulf et al. 2004, Igura et al. 2004).

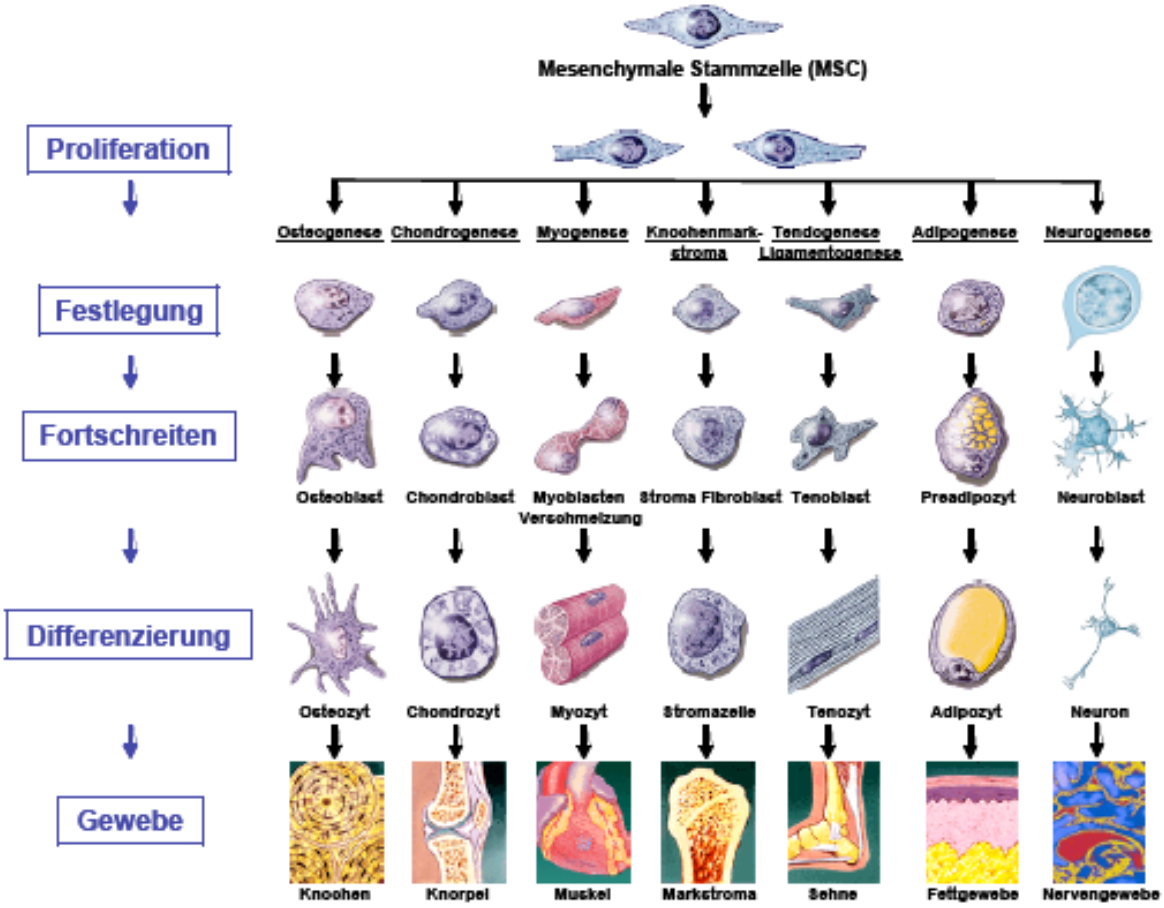


Abb.1.1: Modell zur Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSC), Mesengenese (nach Caplan, 1994, S. 432)

Vor dem theoretischen Hintergrund, dass MSC die Fähigkeit einer unbegrenzten Zellvermehrung besitzen, an die sich eine Differenzierungsphase zu spezialisierten Zellen anschließt, wie z.B. zu humanen Osteoblasten (hOB), sind MSC besonders für das *Tissue Engineering* von Knochen interessant (Bianco und Robey 2001). So ist beispielsweise der Bedarf eines funktionellen Knochenersatzes bei ca. 10-15% aller Wiederherstellungseingriffe am Bewegungsapparat gegeben, jedoch werden die Anforderungen an das

Knochenersatzmaterial aus verschiedenen Gründen bisher nicht zufrieden stellend erfüllt (von Garrel und Gotzen 1998; Rueger 1998).

1.1.1 Mesenchymale Stammzellen der Plazenta

Auf der Suche nach neuen Ressourcen zur Gewinnung von MSC ist das Interesse am Plazentagewebe als Quelle für die regenerative Medizin gewachsen, nachdem in verschiedenen Arbeitsgruppen aus unterschiedlichen Teilen der Plazenta, fetalen wie maternalen Ursprungs, phänotypisch und funktionell, den MSC des Knochenmarkes sehr ähnliche Zellpopulationen isoliert und charakterisiert werden konnten. Im Verlauf wurden diese als mesenchymale Stammzellen der Plazenta (pMSC) definiert (Zhang X et al. 2003; In't Anker et al. 2004; Fukuchi et al. 2004; Bailo et al. 2004; Yen et al. 2005).

In wissenschaftlichen Studien konnten typische Kriterien für die pMSC gezeigt werden. So sind diese mesenchymalen Zellen einerseits negativ für Oberflächenmarker der hämatopoetischen und endothelialen Zellreihe (CD31, CD34, CD45, CD133 und Tie2), weisen anderseits jedoch eine hohe Expression für mesenchymale Stammzell-Antigene wie z.B. CD29, CD44, CD73, CD105, CD90 und HLA Class I (Pittenger et al. 1999; Zuk et al. 2001, Zhang Y et al. 2004) auf .

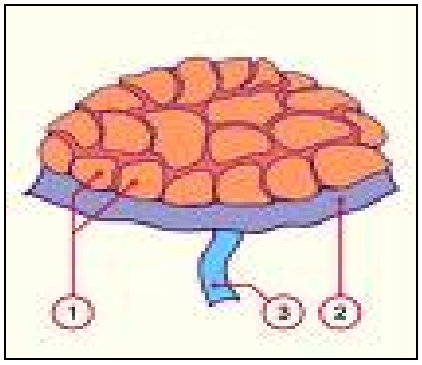
Mögliche qualitative Unterschiede von plazentarer zu adulten MSC des Knochenmarks könnten ihre kurze Wachstumsgeschichte sein, die eine herausragende Kapazität für die *in-vitro* -Kultivierung und -Vermehrung, also dem Expansionspotential (In't Anker et al. 2004) darstellt. Eine hohe Differenzierungskapazität (Plastizität), einschließlich ihres Vermögens zur mesenchymal-epithelialen Transition scheint einen weiteren Vorteil dieser Zellen auszumachen. So macht die hohe Plastizität, günstige immunologische Eigenschaften, eine geringe ethische Barriere bei einfacher Verfügbarkeit, d.h. ohne invasive Maßnahmen, die pMSC zum interessanten und viel versprechenden Kandidaten für die Forschung, ebenfalls mit dem Ziel von weiteren Therapiemöglichkeiten (Wulf et al. 2004).

1.1.2 Aufbau und Struktur der Plazenta

Die ausgereifte Plazenta hat zur Zeit der Geburt ein durchschnittliches Gewicht von ca. 500-700g, eine diskoide Form mit einem Durchmesser von 15-20cm und einer Dicke von 2-3cm.

Die Plazenta verbindet und trennt genetisch Mutter und Fetus und gewährleistet durch das uteroplazentäre Kreislaufsystem den Austausch von Gasen und Metaboliten durch Diffusion, den Transport von Energieträgern, Stoffwechselprodukten, Antikörpern, Hormonen und Elektrolyten und übernimmt Syntheseleistungen von Hormonen, Enzymen und Proteinen und ermöglicht die Toleranz des fetalen Allotransplantats. Hierbei stehen mütterliches und fetales Blut nie in direktem Kontakt.

Die Plazenta ist eine fetomaternale Einheit und besteht somit aus einem fetalen und einem maternalen Anteil (Abb.1.2).

A) 

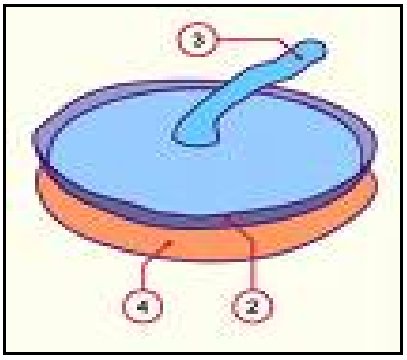
B) 

Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Plazenta

A) Sicht von der mütterlichen Seite aus und B) Sicht von der fetalen Seite aus. 1) Kotyledone, 2) Schnittrand des Amnions, 3) Nabelschnur, 4) Decidua mit der kompakten Schicht nach Loslösung der Plazenta.

Die Nabelschnur mit zwei Arteriae umbilicales, welche sich um die zentrale Vena umbilicalis winden, inseriert an der Chorionplatte, in der die Gefäße zum Plazentarand hin oder an die Unterseite der Chorionplatte in die Zotten (Chorion villi) verlaufen. Die Chorionplatte besteht aus dem Amnion,

extraembryonalen Mesenchym, Zytotrophoblasten und Synzytiotrophoblasten. Die Zotten bleiben entweder frei und ragen in den intervillösen Raum hinein (freie Zotten), oder sie verankern sich auf der Basalplatte (Haftzotten). Sie werden an ihrer Oberfläche von einer Lage aus Synzytiotrophoblasten umgeben und im intervillösen Raum von mütterlichem Blut umspült. Damit stellt der Synzytiotrophoblast die Abgrenzung zwischen maternalem und fetalem Kreislauf dar. Eine basale Begrenzung zum intervillösen Raum bildet die Basalplatte.

Die Basalplatte, die äußere Region der Plazenta auf der mütterlichen Seite, die mit der Uteruswand in Kontakt steht, ist aus zwei Geweben zusammengesetzt, der Zytotrophoblastenschale (embryonales Gewebe) und Decidua basalis (mütterliches Gewebe). Am Plazentarand verschmelzen Chorion- und Basalplatte zum Chorion laeve. Der maternale Plazentaanteil wird damit durch die Decidua basalis, die uterinen Gefäße und Drüsen gebildet.

Die Basalplatte bildet zusammen mit Fibrinanhäufungen interkodyledone Septen, die in den intervillösen Raum hineinragen und diesen unvollständig in so genannte Kotyledonen unterteilen (Abb. 2), die nicht mit der Chorionplatte verschmelzen. Das mütterliche Blut kann demnach frei von der einen Kotyledone zur anderen zirkulieren. Die Zottenstämme der Plazenta verlängern sich beachtlich bis zum Ende der Schwangerschaft und die Fibrinoidansammlungen häufen sich in der Plazenta an. Dies geschieht vor allem unter der Chorionplatte, wo sie die subchondrale Langhans-Schicht bilden, sowie auf Höhe der Basalplatte unterhalb der Stammzotten und der Zytotrophoblastenschale, wo die Fibrinablagerungen als Rohr-Schicht bezeichnet werden. Noch tiefer in der Decidua basalis bilden diese Ablagerungen die Nitabuch-Schicht. An dieser Stelle löst sich die Plazenta bei der Geburt vom Uterus ab. Die Abb. 1.3 zeigt den Aufbau einer reifen humanen Plazenta im Querschnitt.

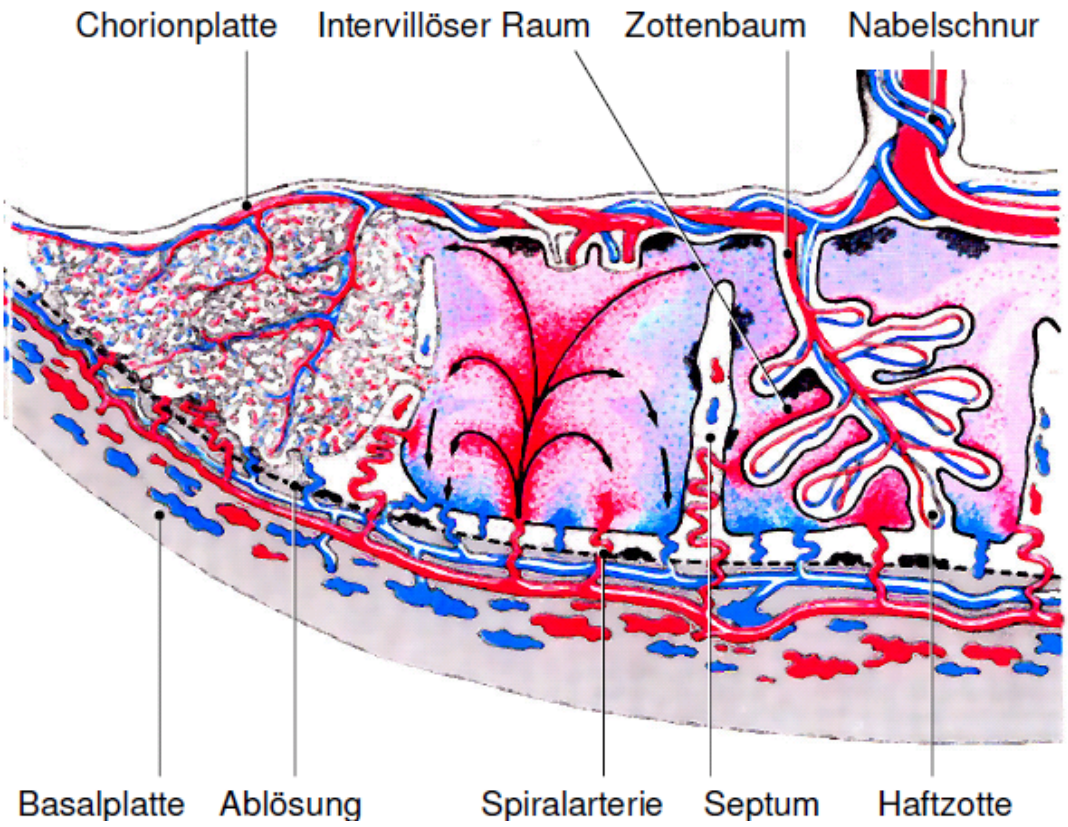


Abb.1. 3: Schematischer Aufbau einer reifen, humanen Plazenta

1.1.3 Ursprung mesenchymaler Stammzellen der reifen humanen Plazenta

Verschiedene Studien beschreiben die Präsenz von Zellen mit Eigenschaften von MSC in verschiedenen Anteilen der reifen Plazenta. Dabei richtet sich das Augenmerk bei einigen auf die Isolation von Zellen vor oder nach der Entfernung der fetalen Membrananteile (Chorionplatte) aus der maternalen und fetalen Seite der Plazenta, während andere die Zellen aus Amnion und Chorionplatte oder Chorionzotten/intervillösen Stroma unterscheiden.

pMSC, gewonnen aus Chorionzotten-Gewebe

Die Isolation und Charakterisierung von pMSC aus den Chorionzotten wurden u. a. in einem Protokoll der Arbeitsgruppe um Wulf et al. (2004), ähnlich wie dem von Igura et al. (2004), beschrieben. Danach wurde das Chorionzotten-

Gewebe aufgrund seiner hohen Plastizität sowie der reichhaltigen und einfachen Zugänglichkeit in reifem Plazentagewebe gewählt. Durch die Plastizität wird während der Schwangerschaft die Generierung von Chorionzotten gesichert. Arbeiten zu den Chorionzotten (Kaufmann et al.1979; Castellucci et al. 1990 und 2000) zeigten, dass die Basis für Wachstum und Differenzierung der Zottenbäume Mesenchymzotten sind. Diese werden kontinuierlich durch Vaskularisierung der Zottensprossen neu geformt, bestehend aus der Synzytiotrophoblasten-Schicht, den Zytotrophoblastenzellen und den zentralen mesenchymalen Zellen.

Durch Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie, Immunhistologie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung konnte ein den pMSC sehr ähnliches, aber nicht ganz identisches Oberflächenmarkerprofil für pMSC nachgewiesen werden. So sind pMSC negativ für Marker der hämatopoetischen Reihe (CD14, CD45) und positiv für Marker der mesenchymalen Zellreihen CD29 und CD73. Unterschiede wurden u. a. für CD105 beschrieben. Neben CD105 wurden in ersten Studien die Zellen außerdem für die frühen Marker STRO-1, CD34, CD15 und AS02 als negativ getestet.

Für frisch isolierte Zellen, also Zellen der ersten Passage, war eine Populationsmischung von Zellen mit Markern der hämatopoetischen und mesenchymalen Reihe zu erkennen. Ab der dritten Passage waren die Zellen homogen negativ für Oberflächenmarker der hämatopoetischen Reihe. Nach Untersuchungen zum Ursprung der Zellen ließen sich ab der dritten Passage nur Zellen maternalen Ursprungs nachweisen. Diese Zellen legten unter geeigneten Kulturbedingungen wie pMSC ihr osteogenes, chondrogenes, adipogenes und myogenes Differenzierungspotential dar.

1.2 Osteoblastäre Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Über welche Zwischenschritte die osteoblastäre Differenzierung von hMSC zu hOB abläuft ist kaum bekannt. Man weiß, dass es sich bei der Osteogenese um einen komplexen, dynamischen Prozess handelt, bei dem *in vivo* der koordinierten Matrixbildung eine gezielte Resorption gegenübersteht. Dafür bedarf es eines abgestimmten Zusammenspiels verschiedener Zellarten, Matrixproteine sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Baylink et al. 1993; Filanti et al. 2000; Reddi 2000). Zusätzlich zur Differenzierung der Zellen findet auch eine Reifung der extrazellulären Matrix statt, welches in gegenseitiger Abhängigkeit geschieht (Mizuno et al. 2000).

1.2.1 Funktion und Aufbau des Knochens

Knochen ist ein dynamisches Gewebe, welches von ständigem Auf- und Abbau, dem so genannten „Knochenremodeling“ geprägt ist. Dies gewährleistet zum einen die biomechanische Anpassungsfähigkeit, die Erhaltung und Reparatur der Stütz- und Haltefunktion des Knochengewebes, zum anderen nimmt er eine Rolle in der Regulation im Kalzium-, Magnesium- und Phosphathaushalt ein.

In der Embryogenese wird Knochen in desmaler und chondraler Ossifikation zunächst als Faserknorpel angelegt und in Umbauprozessen zu Lamellenknochen differenziert. Das Knochengewebe setzt sich zusammen aus Mineralien, Kollagen, Wasser, nichtkollagenen Proteinen, Lipiden, Gefäßen und Zellen. Hauptzellen des Knochens sind die Osteoklasten und die Osteoblastenfamilie (Osteoblasten, Osteozyten, *lining cells*). Ein komplexes System im Zusammenspiel von endokrinen, parakrinen und autokrinen Faktoren sowie der direkten Interaktion von Osteoblasten und Osteoklasten gewährleistet eine physiologische Homöostase der Funktionen des Knochengewebes.

Osteoklasten, deren Hauptaufgabe in der Knochenresorption liegt, stammen aus der Granulozyten-Makrophagen-Linie, einer hämatopoetischen

Stammzelle. Sie entstehen aus einer synchronen Fusion von mononukleären Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu mehrkernigen Zellen in den Howship-Resorptionslakunen. Sie sind u. a. charakterisiert durch die Expression von Calcitoninrezeptoren, tatratresistenter saurer Phosphatase und Vitronectinrezeptoren (avß3).

Verantwortlich für die Knochenneubildung im Skelettsystem sind die Osteoblasten. Sie synthetisieren und regulieren die Bildung und Mineralisierung der extrazellulären Matrix des Knochens, dem Osteoid. Osteoblasten entstehen über eine Differenzierungskaskade aus MSC des Knochenmarks (Abb. 1.4), dabei scheint diese osteogene Kaskade keine einfache Abfolge verschiedener Reifungsstufen zu sein, sondern vielmehr ein sehr komplexes Zusammenspiel von Differenzierung und Dedifferenzierung mit Übergängen zu anderen Zelllinien (Aubin et al. 1995; Bruder et al. 1997; Aubin 1998; Pereira et al. 2001).

Ausgehend von multipotenten, potentiell hochproliferativen MSC entwickeln sich schrittweise über Osteoprogenitorzellen und Präosteoblasten, osteoidproduzierende Osteoblasten, die in die verkalkende Interzellularsubstanz eingeschlossen sind. Letzter Schritt in der Entwicklungskaskade ist der nicht mehr teilungsfähige Osteozyt und die *lining cells*. Progenitorzellen werden funktionell definiert als Zellen, die in eine oder mehrere Linien differenzierbar sind und eine eingeschränkte Selbstteilungskapazität aufweisen (Long 2001, Long et al. 1999). *In vitro* entsprechen diese Vorläuferzellen beispielsweise den *colony-forming unit fibroblasts* (CFU-F) (Friedenstein et al. 1966), einer fibroblastenartigen Zellpopulation mit deutlichem osteogenen Potential (Owen et al.1987). Die Zahl der humanen Osteoprogenitorzellen nimmt mit dem Alter und z.B. beim Vorliegen einer Osteoporose ab (D'Ippolito et al. 1999; Nishida et al. 1999).

Präosteoblasten repräsentieren das Übergangsstadium zwischen den stark proliferativen Osteoprogenitorzellen und den ausgereiften Osteozyten. Sie nehmen die angrenzende Lokalisation zum aktiven Osteoblasten ein und

werden hauptsächlich nach morphologischen Kriterien definiert (Dunlop und Hall 1995).

Reife Osteoblasten sind charakterisiert durch die Synthetisierung von Knochenmatrixproteinen. Sie mauern sich zum Großteil selbst ein, verlieren ihre Knochenbildungspotenz und werden zu Osteozyten differenziert. Diese im letzten Schritt der Entwicklungskaskade entstandenen Osteozyten sind nicht mehr teilungsfähig. Sie dienen der Regulation des Kalzium- und Phosphatspiegels und steuern die Aktivität der Knochen um- und abbauenden Osteoklasten. Spezifische Marker für diese Zellen wie Enzyme oder Matrixproteine sind nicht bekannt.

Die *bone lining cells* liegen den inaktiven, d.h. den nicht-remodelierenden Knochenoberflächen direkt auf. Ihre genaue Funktion ist nicht bekannt.

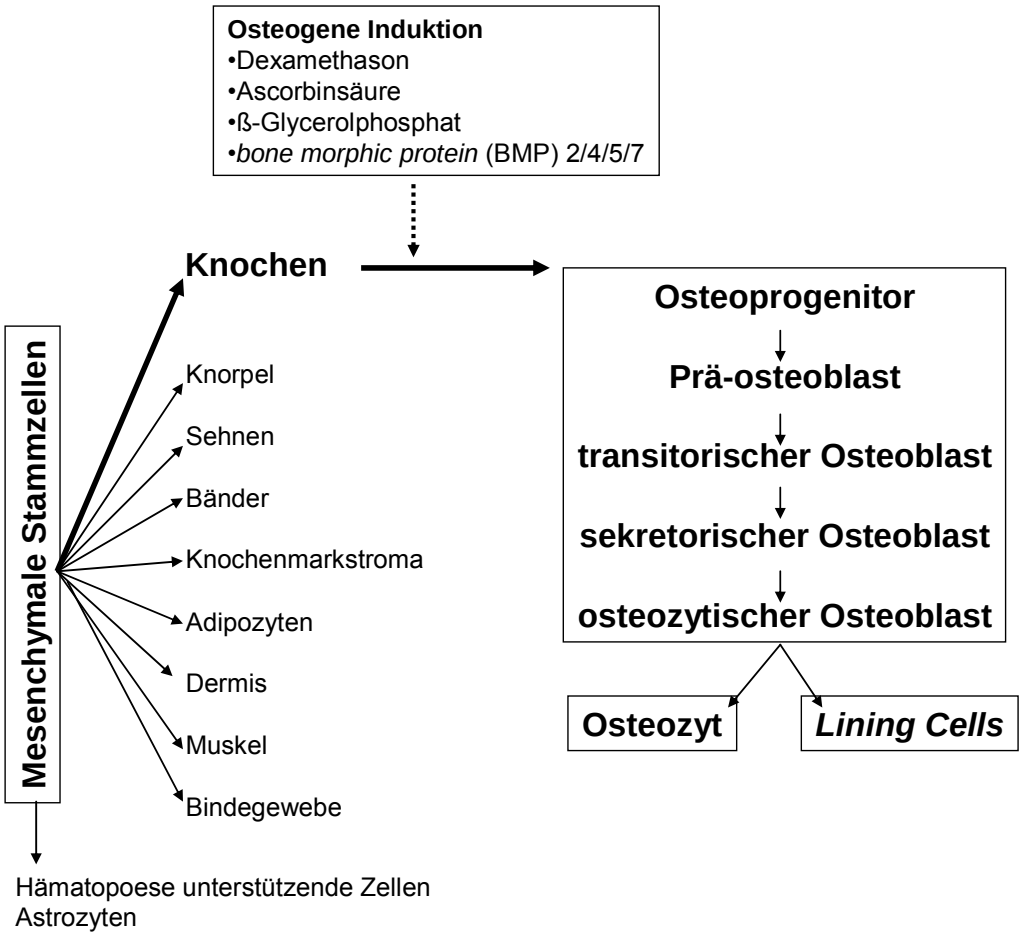


Abb. 1.4: Osteoblastäre Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen *in vitro;* modifiziert nach Caplan (1991), Grefchen (2000) und Bahamonde und Lyons (2001)

1.2.2 Osteogene Differenzierungsfaktoren

Die molekularen Mechanismen der Differenzierung und die Regulation durch Wachstumsfaktoren sind nach wie vor Objekt intensiver Forschung. Die osteogene Induktion ist hierbei *in vitro* am besten erforscht.

Die osteoblastäre Differenzierung von hMSC *in vitro* kann durch eine Vielzahl von Hormonen und Vitaminen beeinflusst werden, jedoch beginnt man erst allmählich die komplexen Wirkmechanismen und gegenseitigen Wechselwirkungen zu verstehen. Die Kultivierung mit fötalem Kälberserum (FBS) alleine bewirkt noch keine osteogene Stimulation. Erst nach Zugabe von β-Glycerolphosphat, Ascorbinsäure sowie Dexamethason konnte eine Bildung und Verkalkung von *bone nodules* beobachtet werden (Bellows et al. 1986; Bhargava et al. 1988). In Kultur mit optimalen Konzentrationen von Dexamethason, Ascorbinsäure und β-Glycerolphosphat, nehmen die MSC eine kuboide Morphe an. Sie zeigen eine erhöhte Enzymaktivität für alkalische Phosphatase (AP) und exponieren osteoblastische Oberflächenantigene. Als Antwort auf 1,25-(OH)2 D_3 und Dexamethason steigern sie die Synthese von Osteocalcin (OC) und lagern extrazellulär mineralisiertes Hydroxylapatit 9 ab. Dies stellt ein Charakteristikum von Osteoblasten und terminal differenzierten Osteozyten dar (Beresford et al. 1984; Cheng et al. 1994; Rickard et al. 1996; Jaiswal et al. 1997).

Dexamethason fördert nach Studien zufolge vor allem die Proliferation und unterstützt die Differenzierung (Bellows et al. 1986).

Ascorbinsäure ist u. a. für den Aktivitätsanstieg der AP verantwortlich und unterstützt damit die Produktion von OC, einem Protein der Knochenmatrix, das Hydroxylapatit 9 bindet (Liu et al. 1999).

Durch ß-Glycerolphosphat in Differenzierungsmedien wird freies Phosphat bereitgestellt, welchem eine Rolle bei der Mineralisation und Modulation der Osteoblastenaktivität und der Produktion des osteogenen Schlüsselgens *core binding factor alpha 1* (Cbfa1) zugeschrieben wird (Tenenbaum et al. 1992; Beck et al. 2000).

Die multipotenten, potentiell hochproliferativen MSC entwickeln sich unter diesen Bedingungen schrittweise über Osteoprogenitorzellen und Präosteoblasten zu osteoidproduzierenden Osteoblasten, die in die verkalkende Interzellularsubstanz eingeschlossen sind.

Zusätzlich kann die osteoblastäre Differenzierung *in vitro* durch eine Vielzahl weiterer Hormone, Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren beeinflusst werden. Dazu zählen z. B. *transforming growth factors* (TGF) (Liu et al. 1999; Kale et al. 2000), Vitamin D_3 (VitD_3) (Rickard et al. 1996; Liu et al. 1999), *fibroblast growth factors* (FGF) (Kasperk et al. 1995; Walsh et al. 2000; Frank et al. 2002), *insulin-like growth factors* (IGF) (Kasperk et al. 1995; Thomas et al. 1999) und *bone morphogenetic proteins* (BMP) (Fromigue et al. 1998; Reddi 2000). Die genaue Bedeutung dieser Faktoren ist für die humane Osteogenese aber noch nicht hinreichend aufgeklärt. Hinzu kommt, dass sie in Abhängigkeit von ihrer Konzentration bzw. in Kombination miteinander z.T. antagonistische, z.T. synergistische Effekte haben können (Rickard et al. 1996; Pereira et al. 2001). Auch sollen Oberflächen bzw. die extrazelluläre Matrix (Degasne et al. 1999), auf der die Zellen kultiviert werden, als auch die Zelldichte (Siggelkow et al. 1999) einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung und ihre Stimulierbarkeit haben.

Von *Vitamin D_3* (Vit D_3, 1,25 $(OH)_2D_3$ oder Cholecalciferol) ist bekannt, dass es an der Differenzierung von Präosteoblasten zum reifen Osteoblasten beteiligt ist und in den Osteoblasten die Bildung von OC und AP induziert. Die Osteoklastogenese wir durch Vit D_3 indirekt durch eine vermehrte Expression vom Rezeptor-Aktivator RANKL in den Osteoblasten stimuliert. Einen sicheren Nachweis, dass 1,25-OH oder einer der Metaboliten die Knochenmineralisation direkt stimuliert, gibt es nicht. Vit D_3 ist mit enthalten in der klassischen osteogenen Induktion *in vitro*.

1.2.3 Osteoblastäre Marker

Die osteoblasten-assoziierten Marker lassen sich je nach Funktion in verschiedene Gruppen einteilen:

Signalmolekül OPG im OPG/RANK/RANKL-System:

Die Identifizierung des OPG/RANK/RANKL-System führte zu einem grundlegend neuen Verständnis für die Osteoklastogenese, für Prozesse in der Knochenresorption und für lokale Knochenumbauvorgänge (Aubin und Bonnelye 2000). Im Weiteren führte sie zu molekular- und zellbiologischen Kozepten des Knochenstoffwechsels mit wichtigen Implikationen für die Pathogense und Therapieansätze von Erkrankungen mit erhöhtem Knochenumsatz.

RANKL (*receptor activator of NF-kappa B ligand*) wird löslich oder membrangebunden von Osteoblasten synthetisiert. Als membrangebundes Zytokin ist RANKL hauptsächlich auf der Oberfläche von osteoblastären Zellen und T-Lymphozyten zu finden. Durch Bindung von RANKL an den membrangebunden RANK-Rezeptor der Osteoklasten wird deren Differenzierung, Fusion und Aktivierung stimuliert, deren Überlebensdauer durch Hemmung der Apoptose verlängert und so das Reservoir aktiver Osteoklasten vergrößert. Folge ist eine vermehrte Knochenresorption.

OPG, Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptorenfamilie (TNF), wird als lösliches Zytokin von verschiedenen Geweben sezerniert. Im Knochen sind Osteoblasten Hauptproduktionsort für OPG. OPG wirkt als kompetiver Rezeptorantagonist für RANKL und ist damit in der Lage die löslichen und membrangebundenen RANKL-Formen zu neutralisieren und so die RANKL/RANK-Interaktion zu blockieren. Durch diese inhibierende Wirkung bleibt die Knochenmasse durch Verminderung der Knochenresorption erhalten (Simonet et al. 1997; Lacey et al. 1998).

Gori et al. konnten 2000 in einer Studie an osteoblastären Zellen nachweisen, dass die Expression von RANKL in undifferenzierten Stromazellen am höchsten

ist und mit zunehmender Differenzierung abnimmt. Ungekehrt steigt die OPG-Produktion mit steigender Differenzierung des Osteoblasten. Die inverse Beziehung der RANKL- und OPG-Expression wurde folglich als eine Funktion der Osteoblastendifferenzierung bewertet, sodass damit dem OPG/RANK/RANKL-System auch eine Rolle für die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten aus dem Knochenmark zugewiesen wird.

Das relative Verhältnis von OPG zu RANKL ist ausschlaggebend für die Regulation der Osteoklasten und damit für die Knochenresorption. Im Gegensatz zu anderen Signalmolekülen beeinflusst das Fehlen von OPG hauptsächlich den Knochenstoffwechsel, jedoch kaum die restliche Organentwicklung. Zwar bilden OPG-defiziente Mäuse ein Skelett aus, aber es entwickelt sich sehr früh eine schwere Form der Osteoporose (Mizuno et al. 1998). Die Expression von OPG ist in besonderem Maße abhängig von hormonellen Einflüssen, so dass sich die Serumspiegel von OPG bei Patienten verschiedenen Alters und Geschlechts deutlich unterscheiden. Die höchsten OPG-Serumwerte können bei postmenopausalen Frauen gefunden werden. Zusätzlich ist die OPG-Expression auch sehr stark parakrinen Effekten unterworfen (Hofbauer et al. 2000; Viereck et al. 2002a) (Abb.1.5).

Das Verhältnis beider Faktoren wird von verschiedenen Zytokinen und Hormonen sowie durch direkten Zellkontakt zwischen Osteoklasten und Osteoblasten reguliert.

Neuere Studien zeigen, dass auch therapeutisch eingesetzte Medikamente an diesem System ansetzten, wie z.B. Bisphosphonate (BSP). Diese steigern die *OPG*-mRNA-Expression und Proteinsekretion in Osteoblasten und könnten so das Verhältnis von OPG zu RANKL verschieben.

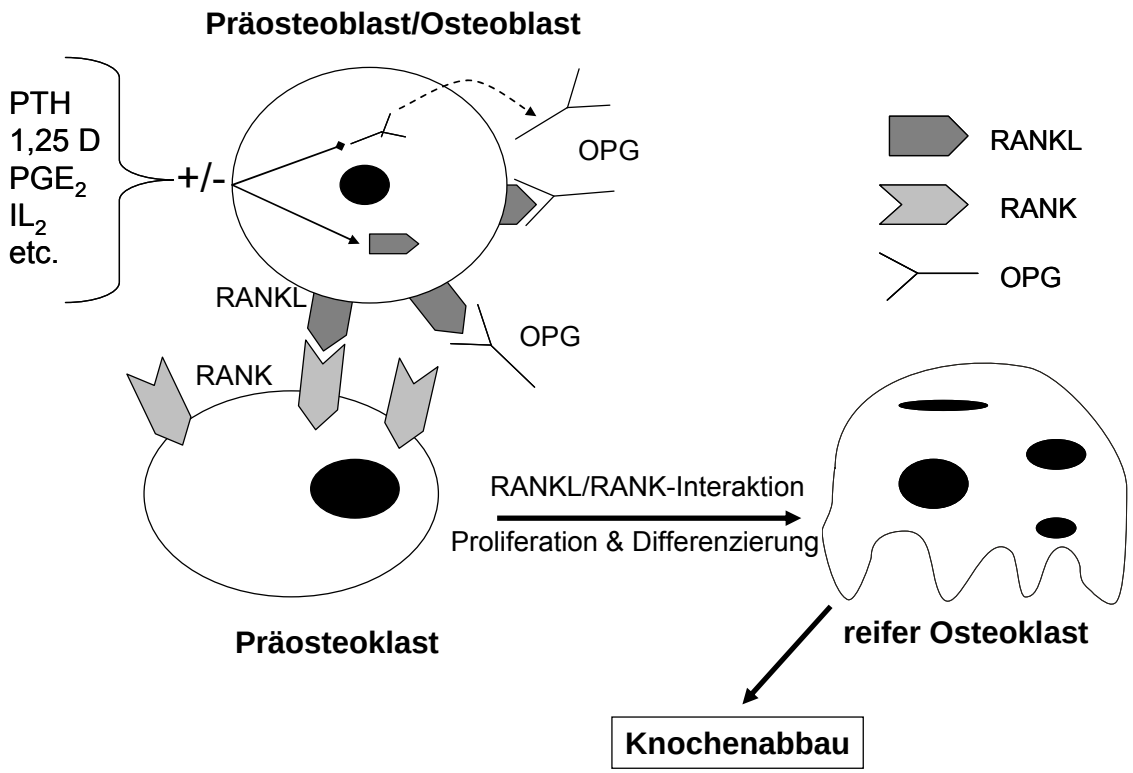


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Interaktion von RANK/RANKL und OPG in der Regulation der Osteoklastogenese

Kollagene /nicht-kollagene Strukturproteine:

Die kollagenen Strukturproteine dienen den Zellen als mechanisches Stützgerüst und als Leitschiene; außerdem stellen sie eine Matrix für Kalziumapatitkristalle dar, welche erst nach der Ausreifung des Osteoids eingelagert werden (Collin et al. 1992; McKee und Nanci 1996; Nefussi et al. 1997). Die kollagenen Bestandteile überwiegen mit ca. 90% und kleiden das Grundgerüst dieser Matrix aus. Neben Kollagen-I (COL-I), welches mit 97% den Hauptbestandteil ausmacht, wurden ebenfalls die Kollagentypen-III, -V, -VI und -X nachgewiesen (Collin et al. 1992; Chichester et al. 1993; Beresford et al. 1993; Aubin 1998).

Die nicht-kollagenen Komponenten machen ca. 10% des Osteoids aus. Am häufigsten sind Osteocalcin (OC) und Osteonectin (ON) mit jeweils 20%, gefolgt von *bone sialoprotein* mit 12%, Osteopontin (OPN) und Fibronectin (Anselme 2000) mit jeweils unter 8%. Ihnen werden besonders integrative Aufgaben

zugeschrieben, da sie Bindungsstellen für andere Makromoleküle, Zellen sowie Kalziumapatit aufweisen (Malaval et al. 1994; McKee und Nanci 1996).

OC gilt als spezifischster Marker für osteoblastäre Zellen, da dieser erst spät in der Differenzierungskaskade mit Einsetzen der Mineralisation der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden kann (Bronckers et al. 1985). Die genaue Funktion von OC ist nicht bekannt, denn obwohl es Kalziumbindungsstellen aufweist, ist es nicht notwendig für den Knochenaufbau bzw. die Matrixkalzifizierung, sondern scheint diese eher zu inhibieren (Boskey 1998). Entsprechend weisen OC-defiziente *knockout*-Mäuse eine unveränderte Knochenstruktur auf, bei der sogar eine vermehrte Knochenbildungsrate und eine größere Knochenmasse beobachtet werden konnte (Ducy et al. 1996).

Enzyme:

Enzyme katalysieren verschiedene Auf- und Abbauprozesse im Knochenstoffwechsel, wie z.B. die alkalische Phosphatase (AP), die den Prozess der Matrixkalzifizierung katalysiert. AP gilt als klassischer Marker der osteoblastären Kaskade (Robey und Termine 1985) bzw. als Marker der Knochenneubildung (Farley und Baylink 1986). Der Nachweis von AP wird häufig mit dem osteogenen Potential von Zellen gleichgesetzt (Pittenger et al. 1999; Halvorsen et al. 2001; Kuznetsov et al. 2001). Die AP besitzt vier Isoformen, von denen die *bone/liver/kidney* Isoform (auch TNSALP *tissue non specific alkaline phosphatase*) u.a. im Knochen exprimiert wird (Henthorn et al. 1992). Als Homotetramer ist AP in der Plasmamembran u. a. von Osteoblasten verankert, wo sie bei einem hohen pH-Optimum verschiedene Monophosphatester hydrolysiert.

Die Matrixmetalloproteinasen (MMP) gehören zur Klasse der Enzyme, welche die Degradation und Resorption des Knochens fördern, was für die Ausbildung eines funktionellen Knochens eine ähnlich wichtige Bedeutung hat wie die Matrixproduktion (Filanti et al. 2000). Im Rattenmodell scheinen während der Osteogenese besonders die MMP-2 und -9 von unterschiedlichen Reifungsstadien der Osteoblasten exprimiert zu werden, wobei MMP-9 später

als MMP-2 nachgewiesen werden kann (Bord et al. 1997; Filanti et al. 2000). Die Rolle bei der humanen Osteogenese ist allerdings noch nicht näher untersucht worden.

1.3 Bisphosphonate

Bisphosphonate (BSP) zählen zur klinisch etabliertesten und potentesten anti-resorptiven Substanzgruppe und werden bei einer Vielzahl benigner und maligner metabolischer Knochenerkrankungen mit gesteigerter Knochenresorption erfolgreich eingesetzt (Liberman et al. 1995; Diel et al. 1998; Saag et al. 1998; Orwoll et al. 2000).

Die Entwicklung der BSP basierte auf Erkenntnissen aus den 1970er Jahren (Fleisch et al. 1970) zum Mechanismus von Verkalkungen. BSP sind synthetisch hergestellte stabile Strukturanaloga des anorganischen Pyrophosphats. Die Phosphor-Sauerstoff-Bindungen des Pyrophosphats ist leicht enzymatisch und metabolisch/hydrolytisch spaltbar und so für therapeutische Anwendungen nicht geeignet. Durch den Ersatz des Sauerstoffatomes der instabilen P-O-P Bindung des Pyrophosphats durch ein Kohlenstoffatom (P-C-P) im BSP gelang eine stabile Substanz mit ähnlichen Eigenschaften.

Durch Variationen der zwei Reste (R1- und R2) in der Molekularstruktur von BSP mit Kohlenstoff-, Sauerstoff-, Halogen-, Sulfur-, Stickstoffatome oder Ketten oder Ringen entstehen BSP mit individuellen physikochemischen und biologischen Charakteristika und Wirkungspotential.

Aus der pharmakologischen Weiterentwicklung zu BSP mit stärkerer anti-resorptiver Potenz, ohne die Mineralisation zu hemmen, entstanden drei chemische Gruppen bzw. Generationen. Jede Gruppe/Generation ist charakterisiert durch ihre aliphatischen Seitenketten.

Mit steigender Generation steigt die relative anti-resorptive Potenz (x-fach):

1. BSP ohne Stickstoffsubstitution

Etidronat (1-fach), Colodronta

2. Aminophosphate

Pamidronat (100-fach), Alendronat (1000-fach), Nerindronat

3. Am Stickstoff substituierte BSP (tertiäre Amine, stickstoffhaltige Heterozyklen)

Ibandronat (10.000-fach), Risedronat (5.000-fach), *Zoledronat (20.000-fach, Imidazol-BSP)*

Die Wirkungsmechanismen der BSP sind zellulär und betreffen hauptsächlich Osteoklasten und die Mineralisation der Knochenmatrix. Die an den Hydroxyapatitkristallen der Matrixoberfläche gebundenen BSP werden von den Osteoklasten zusammen mit der Matrix phagozytiert. Dabei unterliegt der Osteoklast bestimmten Morphologie- und Funktionsänderungen. Das Zytoskelett ändert sich und die Anzahl der Faltensäume (die sog. „*ruffled borders*“) wird reduziert. Eine verminderte Produktion von Laktatsäure, Protonen und Protonen-ATPase unter den Faltensäumen wird beobachtet. Diese Änderungen reduzieren zum einen die Knochenabbaufähigkeit durch Verminderung der Anzahl von Resorptionslakunen der Osteoklasten und zum anderen konnte die apoptotische Wirkung der stickstoffhaltigen Bisphosphonate durch ihren inhibitorischen Einfluß auf den Stoffwechselweg der Mevalonsäure erklären werden (Roger et al. 2000).

Aufgrund der potenten anti-resorptiven Wirkung des plausiblen osteoklastären Wirkmechanismus und bereits definierter osteoklastärer Zielgene und intrazellulärer Signalwege (Reszka et al. 1999) wurde die Hypothese aufgestellt, dass BSP ihre positiven skeletalen Effekte auch über Osteoblasten vermitteln könnten.

Erste Arbeiten zur direkten Wirkung von Bisphosphonaten auf Osteoblastenfunktionen gaben Hinweise zu Einflüssen auf, deren Proliferation und Differenzierung, die Expression von extrazellulären Matrixproteinen, der Modulation von Wachstumsfaktoren und Zytokinen und Hemmung der Apoptose (Tokuda et al. 1998; Giuliani et al. 1998a, b; Klein et al. 1998; Plotkin et al. 1999; Reinholz et al. 2000; Rogers et al. 2000). Es wurde vermutet, dass Osteoblasten notwenig sind und dass ein löslich anti-resorptives Protein unter Bisphosphonateinfluss produziert wird, das die Rekrutierung von Osteoklasten hemmt. Ein experimenteller Nachweis oder gar ein möglicher parakriner Mechanismus für diese Hypothese blieb jedoch aus (Sahni et al. 1993; Vitte et al. 1996).

Viereck et al. wies 2002b einen direkt steigernden Effekt der BSP Pamidronat (PAM) und Zoledronat (ZOL) auf die mRNA-Expression und Proteinsekretion von OPG in hOB–Zellkulturen nach. Dieser Effekt könnte zum einen Einfluss von BSP auf die Osteoblastendifferenzierung bestätigen und zum anderen einen hemmenden parakrinen Mechanismus der BSP durch Senkung des RANKL/OPG- Quotienten auf den Knochenabbau erklären.

1.4 Fragestellung

Die Daten von Viereck et al. (2002b) belegen anhand primärer hOB, dass BSP wie PAM und ZOL imstande sind, die Genexpression und Proteinsekretion des Zytokinrezeptors OPG zu steigern, was einen möglichen parakrinen Mechanismus ihrer antiresorptiven Wirkung darstellen könnte. Für diese Untersuchungen wurden die klinisch etablierten BSP PAM, ein Aminobisphosphonat, sowie ZOL, ein Imidazol-Bisphosphonat verwendet. Die Stimulation von OPG durch PAM und ZOL erfolgte auf mRNA- und Proteinebene und war zeit- und dosisabhängig um das bis zu siebenfache erhöht.

RANKL war in diesem Zellmodell nicht messbar, was auf die fortgeschrittene Osteoblastendifferenzierung zurückgeführt wurde. Diesen Zusammenhang konnte Gori et al. (2000) an einem osteoblastären Zellmodell mit immortalisierten Knochenstromazellen zeigen, bei denen mit zunehmender Zelldifferenzierung die Expression von *RANKL* abnahm, sodass danach die Senkung des osteoblastären RANKL/OPG-Quotienten auf die Steigerung der OPG-Produktion zurückgeführt wurde. D.h. der primäre Effekt der BSP in differenzierten Osteoblasten auf den RANKL/OPG-Quotienten erfolgt durch die Steigerung der OPG-Produktion (Viereck et al. 2002b).

Da BSP die Differenzierung von Osteoblasten, gemessen an der Produktion extrazellulärer Matrixkomponenten (COL-I) und der Expression osteoblasten-spezifischer Enzyme (AP) steigern, könnten die Effekte der BSP auf das RANKL/OPG-System, z. T. über eine gesteigerte Osteoblastendifferenzierung vermittelt werden (Reinholz et al. 2000, Viereck et al. 2002a,b).

Bisher ist noch nicht eindeutig geklärt, wie BSP die Differenzierung und die Produktion des RANKL/OPG-Systems in MSC modulieren. Da MSC des Knochenmarkes Einschränkungen unterworfen sind, wie einer limitierten Zellzahl, schwaches Expansions- und Proliferationspotential sowie notwendige

invasive Zellgewinnung, bietet nach ersten Erkenntnissen die Plazenta eine interessante Quelle für MSC (pMSC).

In dieser Arbeit zielten die Untersuchungen auf Effekte von BSP auf die Expression von OPG und den Knochenmarkern *COL-I*, A*P* und *OC* in pMSC ab.

Die Fragen nach

- der Übertragbarkeit bisheriger Erkenntnisse aus dem hOB-Modell zur mRNA- Expression von *OPG*, *COL-I, AP* und *OC* unter BSP-Einfluss auf ein pMSC-Modell und damit nach möglichen Rückschlüssen auf eine Steigerung und/oder Beschleunigung der osteoblastären Differenzierung,
- neuen Aspekten in der Verwendbarkeit von pMSC und Alternativen zu bMSC und hOB Zellen in der Erforschung osteogener Differenzierung sowie
- Aspekten zu zukünftigen Therapieansätzen

sollten hierbei untersucht und diskutiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav, 2540 EL	Tuttnauer
Analysenwaage	Sartorius
Biofuge pico, Labofuge 400R	Heraeus Holding
Brutschrank, Model 3121 S/N 28439532	Forma Scientific
Elektrophoresekammer, DNA	OWL Separation Systems
Elektrophoresekammer, Protein	Biorad
Gene Amp PCR-System 2400 und 9700	Amersham Bioscience
Neubauer-Zählkammer	Nunc
Polaroid Land-Kamera, MP 4	Polaroid
Polaroid-Film Typ 665 (50 ASA)	Polaroid
Spektralphotometer (Biophotometer)	Eppendorf
Sterilwerkbank, LaminAir® HA 2448 GS	Heraeus Holding
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultrazentrifuge (UZ6)	Sorvall
UV-Transilluminator	Biometra
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein
Waage, Kern 440-47	Kern
Wasserbad	Memmert
Autoklav, 2540 EL	Tuttnauer
Analysenwaage	Sartorius
Biofuge pico, Labofuge 400R	Heraeus Holding

Brutschrank, Model 3121 S/N 28439532	Forma Scientific
Elektrophoresekammer, DNA	OWL Separation Systems
Elektrophoresekammer, Protein	Biorad
Gene Amp PCR-System 2400 und 9700	Amersham Bioscience
Magnetrührer MR3000	Heidolph
Phasenkontrastmikroskop, axiovert 25	Zeiss
pH-Meter	Hanna
Polaroid Land-Kamera, MP 4	Polaroid
Polaroid-Film Typ 665 (50 ASA)	Polaroid
Power Supply, EC 250-90, EC Apparatus Corporation Standard Power Pack p25	Biometra
Spektralphotometer (Biophotometer)	Eppendorf
Sterilwerkbank, LaminAir® HA 2448 GS	Heraeus Holding
Thermomixer compact	Eppendorf
Ultrazentrifuge (UZ^6)	Sorvall
UV-Transilluminator	Biometra
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein
Waage, Kern 440-47	Kern
Wasserbad	Memmert

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Biozym, Brand, Eppendorf, Greiner bio-one, Merck, Nunc, Becton Dickinson und Sarstedt bezogen, sofern es in der Arbeit nicht anders angegeben wurde.

2.1.3 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den folgenden Firmen bezogen: Invitrogen, Merck, Roth, Serva und Sigma. Alle Chemikalien entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad, soweit nicht anders vermerkt.

2.1.4 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit autoklaviertem Aqua bidest. hergestellt und der pH-Wert, wenn notwendig, angepasst.

Bicoll/Trennlösung:	Biochrom Seromed 1.077g/ml
Citratpuffer:	0.01M Citratacetat, 0.01M Zitronensäure, pH 6.0
Elektrophoresepuffer (10x):	25mM Tris/HCl, 192mM Glycin, 0.1% SDS
Ethidiumbromidbad:	0.007% Ethidiumbromid, 100% Aqua bidest.
Extraktionspuffer:	15mM KH_2PO_4, 10mM NaN_3, 15mM EDTA, 11.5% Glycerin, pH 7.5
RLT-Puffer:	5x 15mM $MgCl_2$, 375mM KCl, 250mM Tris-HCl (ph 8,3)
TBE (10x):	0.1M Tris/HCl, 5.5% Borsäure, 0.5M EDTA, pH 8.0
TBST:	0.15M NaCl, 0.01M Tris/HCl, 0.001M NaN_3, 0.05% Tween®20, pH 7.4
Trypsin/EDTA:	0.05% Trypsin, 5mM EDTA, 100% PBS/BSA
PCR-Puffer:	100mM Tris-HCl, 15mM $MgCl_2$, 500mM KCl, pH 8,3
PBS:	137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.0mM Na_2HPO_4, 1.5mM KH_2HPO_4, pH 7.4

2.1.5 Nährmedien

Tab. 2.1: Medien zur Kultivierung der Zelllinien

Nährmedium	Herstellung	Referenz
Chang-Medium BMC and MF	1%P/S, 10% FCS	Irivine Scientific
RPMI 1640	1%P/S, 10% FCS	PAA Labortatories GmbH
RPMI 1640	1%P/S, 0,1% BSA	PAA Labortatories GmbH

2.1.6 Kits

Tab. 2.2: Verwendete Kits

Kits	Referenz
RNAeasy® Mini Kit	QIAGEN
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN

2.1.7 Enzyme

Tab. 2.3: Eingesetzte Enzyme

Enzym	Methode	Referenz
DNase I, RNase-free	cDNA-Synthese	Roche
Dispase	Zellpräparation	Roche
Recombinant RNasin,	cDNA-Synthese	Promega
Ribonuklease Inhibitor	cDNA-Synthese	Promega
SuperScript™	cDNA-Synthese	Invitrogen
RNase H Reverse Transkriptase	cDNA-Synthese	Invitrogen
TaqDNA Polymerase	PCR	Roche

2.1.8 Oligonukleotide

Tab. 2.4: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5`-3`)	Referenz
AP-sense	ACG TGG CTA AGA ATG TCA TC	MWG Biotech
AP-antisense	CTG GTA GGC GAT GTC CTT A	MWG Biotech
Desoxynukleotide	dATP, cCTP, dGTP, dTTP	Roche
DNA-Fragmentlängen-Standards	100bp ladder	MBI Fermentas
COL-I-sense	TGA CGA GAC CAA GAA CTG	MWG Biotech
COL-I-anisense	CCA TCC AAA CCA CTA CTG AAA CC	MWG Biotech
L7-sense	AGA TGT ACA GAA CTG AAA TTC	MWG Biotech
L7-antisense	ATT TAC CAA GAG ATC GAG CAA	MWG Biotech
OC-sense	CAT GAG AGC CCT CAC A	MWG Biotech
OC-antisense	AGA GCG ACA CCC TAG AC	MWG Biotech
OPG-sense	GAA CCC CAG AGC GAA ATA CA	MWG Biotech
OPG-antisense	CGC TGT TTT CAC AGA GGT CA	MWG Biotech

2.1.9 Hormone und Stimulanzien

Tab.2.5 : Verwendete Hormone und Stimulanzien

Hormon/Stimulanz	Referenz
Betaglycerolphosphat	Norvatis Pharma AG Basel
Dexamethason	Norvatis Pharma AG Basel
1,25 Dihydroxyvitamin D_3 (Calcitriol)	Norvatis Pharma AG Basel
Pamidronat (1-hydroxy-3-aminopropylidene-1, 1-bisphosphonic acid, disodium salt, pentahydrate)	Norvatis Pharma AG Basel
Zoledronat (2-(imidazol-yl)-hydroxy-ethylidene-1, 1-bisphonic acid, disodium salt, monohydrate)	Norvatis Pharma AG Basel

2.1.10 Zellmaterial

Das verwendete Zellmaterial wurde uns freundlicher Weise von Herrn Prof. Dr. med. G. Emons der Frauenklinik der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt. Die Plazenten wurden hierbei direkt nach der Geburt vom Pflegepersonal in einen entsprechenden Behälter überführt, mit dem Geburtsdatum und der -zeit, sowie mit dem Geschlecht gekennzeichnet. Danach wurden diese bei 4°C im Kühlschrank gelagert und innerhalb von sieben Stunden präpariert (siehe 2.2.1.1).

Die Isolation und Kultivierung der pMSC erfolgte nach dem Protokoll von Wulf et al. (2004). Es wurden insgesamt 41 Plazenten beiderlei Geschlechts, sowohl aus Spontangeburten als auch aus Kaiserschnitten verarbeitet. Hierbei handelte es sich um Plazenten von 16 weiblichen und 25 männlichen Neugeborenen, nach Schwangerschaften, die ohne bekannte Risiken verlaufen waren.

Aus 14 Plazenten (sieben männlich, sieben weiblich) ließ sich ausreichendes Zellmaterial generieren und bis in die dritte Passage kultivieren. Mit diesen

Zellen war es dann möglich vergleichbare Versuchsansätze in 6 Well-Platten zu erreichen, um die Versuchsreihen durchzuführen zu können.

Frühe und späte Kontamination (z.B. Pilzbefall) der pMSC, mangelnde Zellgewinnung, Zellablösungen oder Vakuolenbildung in den Zellen waren Gründe für den frühzeitigen Verwurf bzw. Ausschluss der weiteren Verarbeitung des Zellmaterials.

Tab. 2.6 : Verwendetes Zellmaterial

Plazenta Nr.	Gewicht	Sectio caesarea	Geschlecht
01	571,1g	Nein	M
02	418,9g	Nein	M
03	687,5g	Ja	W
04	485,6g	Ja	W
05	432,7g	Ja	M
06	462,3g	Nein	M
07	419,0g	Ja	M
08	443,6g	Nein	W
09	510,3g	Ja	W
10	377,9g	Ja	M
11	398,2g	Nein	W
12	414,5g	Ja	W
13	443,3g	Nein	M
14	414,6g	Nein	W

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten mesenchymalen Stammzellen der humanen Plazenta (pMSC) wurden bei 37°C im Brutschrank (5% CO_2, 95% Luftfeuchtigkeit) in Kultur gehalten. Als Kulturmedium wurde Chang Medium (10% FCS, 1% PS) in der Primärkultur und RPMI 1640 Medium (10% FCS, 1% PS) in der ersten bis dritten Passage verwendet, welches alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde.

2.2.1.1 Gewinnung mesenchymaler Stammzellen aus der humanen Plazenta

Für die Präparation von mesenchymalen Stammzellen (pMSC) wurden komplette Plazenten beiderlei Geschlechts innerhalb der ersten sieben Stunden nach der Geburt mit Einverständnis der Eltern und Erlaubnis der Ethikkomission der Universität Göttingen verwendet. Bis zur Verarbeitung wurden die Plazenten bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Das Gewicht wurde unter sterilen Bedingungen bestimmt und danach mit einem ebenfalls sterilen Skalpell paraumbilacal die amniotische Membran eröffnet und aus dem darunter liegendem villösen Stroma ein etwa 10g schweres Stück exzisiert. Das Zellmaterial wurde zunächst manuell mit Schere und Skalpell zerkleinert, in eine sterile 500ml Flasche überführt und mit einem Digestionsansatz aus 20ml 10x Trypsin, 20ml Dispase und 0,5ml DNase I auf 200ml mit RPMI 1640 Medium aufgefüllt und für 30min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte eine Filtration der Zellsuspension durch einen *Cell Strainer* (Vorsteckfilter Minisart 0,20µm), der Überstand wurde verworfen. Die sich im Pellet befindlichen mononukleären Zellen wurden bei 1600rpm 10min zentrifugiert. Im nächsten Schritt ist der Überstand abgesogen und die Zellpellets mit jeweils 10ml RPMI 1640 Medium resuspendiert worden. Die Suspension wurde auf eine Bicoll-Trennlösung gegeben. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 2000rpm für 20min wurde die mittlere Phase aus der Dreischichtung vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen, in ein 20ml Gefäß überführt, 1:1 mit RPMI 1640 Medium gewaschen und bei 1600rpm 10min

zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde nach Absaugen des Überstandes in 10ml Chang Medium aufgenommen, welches vorher mit fötalem Kälberserum (FCS) und Penicillin-Streptomycin versetzt wurde, resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.2 Kultivierung und Passagierung adhärenter Zellen

Nach 72 Stunden wurde die Primärkultur in die erste Passage und nach weiteren sechs bis acht Tagen die erste Passage in die zweite bzw. die zweite in die dritte Passage überführt.

Der Zellmonolayer wurde, nachdem der Überstand abgezogen und der Zellrasen mit 5ml DPBS gewaschen wurde, mit 1ml Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom) 5-10min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde dabei regelmäßig im Phasenkontrastmikroskop (Zeiss) kontrolliert. Danach wurde die Zellsuspension mit 20ml RPMI 1640 Medium versetzt und in ein 50ml Tube überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1200rpm für 5min. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet wiederum in RPMI 1640 Medium resuspendiert.

Nach zwei bis drei Tagen erfolgte die optische Kontrolle, ob ein Anwachsen der pMSC auf dem Zellkulturflaschenboden stattgefunden hat. Konnte das Anwachsen bestätigt werden, erfolgte ein Mediumwechsel. Je Nach Zellpelletgröße wurde die Suspension auf mehrere Zellkulturflaschen (75cm^2) aufgeteilt. Überschüssige Zellen konnten für die Langzeitkonservierung tiefgefroren werden oder wurden verworfen.

2.2.1.3 Kryokonservierung

Für die Langzeitkonservierung wurden die pMSC entweder in einer Kühleinheit bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff bei -196°C tiefgefroren. Hierzu wurde der Zellrasen zunächst mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, mit dem gleichen Volumenanteil Kulturmedium versetzt und in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation für 10min bei 1200rpm wurde der Überstand

verworfen. Das Zellpellet wurde in 1,5ml Wachstumsmedium mit 10% DMSO resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Danach erfolgte das langsame Einfrieren, erst bei -20°C und dann bei -80°C. Bei Bedarf wurden die Zellen aufgetaut, in eine Zellkulturflasche (75cm^2) mit 10ml Medium überführt und im Brutschrank bei 37°C angezüchtet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung der mRNA

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) isoliert. Das Prinzip der Isolation beruht auf der Bindung von negativ geladenen Nukleinsäuren in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen an Glasfaseroberflächen von Silicagel-Säulen (Vogelstein und Gillespie 1979). Die Bindungsbedingungen für RNA sind optimiert. Es wurde gemäß des Protokolls nach Angaben des Herstellers behandelt

Nach der Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5ml PBS-Puffer gespült. Zur Lyse der Zellen wurden 600µl RLT-Gebrauchspuffers mit ß-Mecaptophenol hinzugefügt. Es folgte die Zugabe von 350µl 70%igem Ethanol und Mischen mit einer Pipette. Anschließend wurde das Lysat auf ein RNeasy *spin column* gegeben, für 15sec bei 13000xg zentrifugiert und nach Zugabe von 700µl RW1 Puffer erneut für 15sec zentrifugiert. Es folgte die Zugabe von 500µl RPE Puffer mit 100%igem Ethanol und eine erneute Zentrifugation für 15sec. Danach wurde der Überstand auf das RNeasy *spin column* überführt und wiederum für 2min zentrifugiert. Zuletzt erfolgte ein Waschen der gebundenen RNA mit 20µl RNase-freiem H_2O aus dem Kit von der Silicagel-Membran eluiert

Es folgte die photometrische Bestimmung der mRNA-Konzentration (siehe 2.2.2.2) und die anschließende Lagerung der Proben bei -80°C.

2.2.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren haben im ultravioletten Licht bei einer Wellenlänge von 260nm ihr Absorptionsmaximum. Dies wird durch die Absorption der aromatischen Heterozyklen, der Purin- und Pyrimidinbasen hervorgerufen. Die Breite des Maximums ist ein Indikator für die Reinheit der DNA bzw. RNA und wird durch den Quotient der Extinktionen bei 260nm und 280nm (OD_{260nm}/OD_{280nm}) bestimmt (Glasel 1995). Proteinverunreinigungen machen sich durch eine Amplitude in der Absorptionskurve bei 280nm bemerkbar.

Die Absorption der Proben wurde in einem Gesamtvolumen von 70µl in 1cm Quarzküvetten (Quarzglas Suprasil, Hellma) gegen Ampuva (steriles H_2O, Fresenius Kabi) im Spektralphotometer (Biophotometer, Eppendorf) bestimmt.

2.2.2.3 Reverse Transkription

Bei der Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) wird mit Hilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymerase Reverse Transkriptase die Gesamt-RNA der zu untersuchenden Zellen, in *copy* DNA (cDNA) umgeschrieben (Verses et al. 1987).

Zum *Priming* wurden Oligo-(dT)-Primer verwendet. Die cDNA-Synthese sowie der DNase I Verdau wurden mit dem SuperScript™ Preamplifikations Kit (Invitrogen) durchgeführt. Um ausschließen zu können, dass die isolierte Gesamt-RNA verunreinigt ist, fand vor der cDNA-Synthese eine Inkubation mit den Enzymen Rnasin (40U/µl, Promega) und DNase I (10U/µl, Roche) statt. Zu 1µg RNA wurden jeweils 1µl der Enzyme hinzugefügt und der Ansatz mit 14µl RNase-freiem H_2O aufgefüllt. Der Verdau erfolgte im Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems) bei 37°C für 30min, mit einer anschließenden Denaturierung bei 70°C für 10min. Danach wurden die Proben bei 4°C gekühlt.

Bei der cDNA-Synthese wurden Oligo-$(dT)_{15}$ Primer (Roche) eingesetzt, die spezifisch an die Poly(A)-Sequenz der mRNA binden. Durch die Zugabe der

Reversen Transkriptase (SuperScript, Invitrogen) wurden die RNA-Moleküle in die entsprechenden DNA-Moleküle umgeschrieben.

Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

Oligo-$(dT)_{15}$ Primer	8,0µl
dNTPs (10mM)	4,0µl
5xRT-Puffer	8,0µl
0,1 M DTT	4,0µl
SuperScript (200U/µl)	2,0µl

Die einzelnen Reagenzien wurden in einem Master-Mix angesetzt und 26µl davon in die Probe gegeben. Anschließend erfolgte im Thermocycler eine Inkubation für 60min bei 37°C und eine Denaturierung für 10min bei 72°C. Die cDNA Proben konnten nun bei -20°C gelagert werden.

2.2.2.4 Semiquantitative PCR

Zur Quantifizierung der Expression spezifischer Transkripte wird die semiquantitative PCR angewendet. Diese basiert auf dem Prinzip der „kompetitiven PCR“. Dabei konkurriert eine Target-Sequenz (cDNA) mit einem internen Standard (Mimic) um dasselbe Primerpaar. Durch das Verhältnis von Mimic zu Target nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel kann eine Aussage über die Expressionsstärke des untersuchten Gens getroffen werden. D.h., je stärker das Target dem Mimic gegenüber amplifiziert ist, desto höher ist die Expression des Gens, also desto intensiver ist die Bande im Gel.

Bei einer Ratio von ~1 (Target/Mimic) handelt es sich um eine äquimolare Menge des Amplifikationsproduktes (cDNA-Target=Mimic).

Die optimale Mimickonzentration wird ermittelt durch die Amplifikation von unterschiedlichen Konzentrationen des Mimic, bis cDNA und Mimic übereinstimmen. Jede Probe wurde dreimal mittels PCR untersucht.

2.2.2.5 PCR-Amplifikation

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird anhand von Oligonukleotiden (Primer), die zu amplifizierende Region beider DNA-Stränge flankiert (Mullis et al. 1986). In sich wiederholenden Zyklen von Denaturierung der Doppelstrang-DNA, Anlagerung der Primer (Annealing) und Verlängerung (Elongation) durch das hitzestabile Enzym *Taq*-Polymerase (Saiki et al. 1988), wird die Zielsequenz exponentiell vermehrt.

House Keeping-L7-PCR

Für den Nachweis, dass die gewonnenen cDNA-Proben intakt sind, wurde eine RT-PCR für das *House Keeping* Gen *L7* durchgeführt. *L7* kodiert ein ribosomales Protein im physiologischen Stoffwechsel. Es unterliegt keinen signifikanten Schwankungen in der Transkription, so dass dessen Amplifikation als Kontrolle dient. Die *L7*-Primer (MWG Biotech) flankieren ein 378bp Fragment.

Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

Steriles-H_2O	10,5µl
L7-s (20pM)	0,3µl
L7-as (20pM)	0,3µl
10xPCR-Puffer	1,5µl
dNTPs (10mM)	1,2µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,075µl
cDNA	0,6µl
Mimic	0,6µl

Für jede Probe wurden jeweils 14,4µl des Mastermixes in einem 0,5ml Reaktionsgefäß angesetzt. Nach der Zugabe von 0,6µl cDNA fand die

Amplifikation des Genfragments bei folgenden Parametern im Thermocycler statt: Denaturierung bei 94°C für 30sec, Annealing bei 55°C für 60sec und Extension bei 72°C für 120sec. Es wurden jeweils 24 Zyklen durchgeführt.

Analog zum Ansatz für L7 erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expression von *OPG*, *AP*, *COL-I* und *OC* mittels semiquantitativer RT-PCR.

Der Reaktionsansatz setzt sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

steriles-H_2O	10,5µl
sence (20pM)	0,3µl
Antisence (20pM)	0,3µl
10xPCR-Puffer	1,5µl
dNTPs (10mM)	1,2µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,075µl
cDNA	0,6µl
Mimic	0,6µl

Es wurden ebenfalls 14,4µl Mastermix für jede Probe angesetzt und jeweils 0,6µl cDNA hinzugefügt. Die Reaktion fand im Thermocycler bei folgenden Modalitäten statt (Tab. 2.7):

Tab.: 2.7: PCR-Modalitäten

Primer	Target bp	Mimic bp	Zyklen	Denaturierung	1 Zyklus			Ende der Amplifizierung	
L7	378	548	24	94°C 2min	94°C 30sec	55°C 60sec	72°C 120sec	72°C 10min	4°C Xmin
OPG	441	595	28	94°C 2min	94°C 30sec	55°C 60sec	72°C 90sec		
AP	475	569	35	94°C 2min	94°C 30sec	55°C 45sec	72°C 90sec		
COL-I	599	400	30	94°C 2min	94°C 30sec	55°C 120sec	72°C 120sec		
OC	310	436	35	94°C 2min	94°C 30sec	55°C 45sec	72°C 90sec		

2.2.2.6 Gelelektrophoretische Auftrennung

Die Auftrennung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld erfolgte mittels Agarose- Gelelektrophorese. Dies ist eine einfache und effektive Methode DNA-Fragmente verschiedener Größe zu separieren und zu identifizieren, da größere DNA-Moleküle langsamer durch die Gelporen wandern als die Kleineren (McDonell et al. 1977).

Für die Auftrennung wurde bei einer vorhandenen Fragmentgröße von ca. 300-500bp eines 1,5%igen Agarose Gel (GIBCO) verwendet. Hierzu wurde die Agarose in TBE-Puffer gelöst, aufgekocht und nach kurzem Abkühlen in die entsprechende Gelkammer gegossen. Nach der Auspolimerisation des Gels konnte dieses mit den PCR-Produkten beladen werden. Hierzu wurden jeweils 10µl des Probenvolumens mit 2µl Probenpuffer versetzt. Der Probenpuffer fungiert als Farbstoffmarker, um die zurückgelegte Probenstrecke charakterisieren zu können, da Bromphenolblau etwa wie ein lineares doppelsträngiges 300bp DNA-Fragment wandert. Als Referenz diente ein DNA-Fragmentlängen-Standard (100bp ladder, MBI Fermentas), von dem 5µl

verwendet wurden. Anschließend wurden 10µl eines jeden Ansatzes vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Die elektrische Auftrennung erfolgte konstant bei 100V für 1h. Um die DNA-Fragmente im Gel sichtbar zu machen, wurde dieses für ca. 30min in einem Ethidiumbromidbad inkubiert. Nach kurzem Überspülen mit Aqua bidest. wurden die Banden auf einem UV-Transilluminator (Biometra) bei 312nm sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wird das Ergebnis mit einer Polaroidkamera festgehalten.

2.2.3 Stimulationsversuche

Zur Untersuchung der Wirkung von unterschiedlichen Stimulanzien auf die mRNA-Expression von *Osteoprotegerin (OPG*), *Kollagen-I (COL-I)* und der *alkalischen Phosphatase (AP),* wurden sowohl dosis- als auch zeitabhängige Versuche durchgeführt.

Alle Stimulationsversuche der plazentaren mesenchymalen Stammzellen (pMSC) erfolgten in der dritten Passage des exponentiellen Wachstums. Von jeder Zelllinie wurden hierzu 40.000 Zellen/Well auf Kunststoff-6-Well-Platten ausgesät, während die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer erfolgte. Nach 12 Tagen, nach Erreichen der Präkonfluenz, wurde das Kulturmedium ME2 (10% FCS) durch das serumfreie Stimulationsmedium ME3 (0,1% BSA) ersetzt (2ml/Well) und am nächsten Tag mit der Behandlung begonnen.

Das Wachstum der Zellen wurde täglich mit dem Doppelkontrastphasen-Lichtmikroskop kontrolliert. Jeder Versuch wurde mit drei unterschiedlichen Zellkulturen (Plazenten) durchgeführt.

2.2.3.1 Behandlung mit den Biphosphonaten Pamidronat und Zoledronat

Um eine optimierte Stimulation der Zellen zu gewährleisten, wurden von den Bisphosphonaten (BSP) Pamidronat (PAM) und Zoledronat (ZOL) jeweils eine 10^{-2}M in 0,9%ige NaCl-Stammlösung angesetzt und der pH-Wert mit NaOH auf

7,4 eingestellt. Die Stammlösungen wurden steril filtriert und mit serumfreiem Medium weiter verdünnt.

Medium für unbehandelte Kontrollen: 0,1% BSA, *Medium für PAM:* 0,1% BSA + 10^{-4}M bis 10^{-12}M, *Medium für ZOL:* 0,1% BSA + 10^{-4}M bis 10^{-12}M.

Die Untersuchung der Dosiswirkung erfolgte über 72h, wobei die Zellen jeweils mit folgenden Konzentrationen stimuliert wurden: 10^{-4}M, 10^{-6}M, 10^{-8}M, 10^{-10}M und 10^{-12}M. Als Kontrolle wurde eine NaCl Lösung verwendet.

Zur Untersuchung der Zeitkinetik wurde für 0h (als Kontrolle), 6h, 12h, 48h und 72h mit Konzentrationen von PAM 10^{-6}M und ZOL 10^{-6}M sowie 10^{-8}M stimuliert (Viereck et al. 2002b).

2.2.3.2 Behandlung mit VitaminD_3

Für die Untersuchung der Wirkung von VitaminD_3 (VitD_3) auf die Genexpression von *OPG*, *COL-I*, *AP* und *OC* wurden die pMSC mit einer VitD_3-Konzentration von 10^{-8}M für 0h (als Kontrolle), 6h, 12h, 24h, 48h und 72h stimuliert.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Stammzellen mit VitD_3 10^{-8}M sowie ZOL in den Konzentrationen 10^{-4}M, 10^{-6}M, 10^{-8}M, 10^{-10}M und 10^{-12}M für jeweils 72h stimuliert. Als Kontrolle wurde eine Stimulationsreihe mit ETOH 10^{-4}M, 10^{-6}M, 10^{-8} M, 10^{-10}M und 10^{-12}M durchgeführt.

2.2.3.3 Osteogene Stimulierung mit und ohne Zoledronat

Für die osteogene Stimulation wurde, angelehnt an die Differenzierungsassays von Pittenger et al. (1999), ein Stimulationsmedium aus 0,05mM Vitamin C, 1µM Vitamin D_3/2% FCS, 0,1µM Dexamethason und 10mM ß-Glycerolphosphat in RPMI-1640 Medium (L-Glutaminfrei) (ODM1) angesetzt. In einem zweiten Versuchsansatz wurde das Stimulationsmedium mit ZOL 10^{-8}M versetzt (ODM2). Die Stimulierung der pMSC erfolgte jeweils über 0d, 2d, 7d, 14d, 21d und 28d. Als Negativkontrolle wurde das serumfreie Stimulationsmedium ME3, versetzt mit ETOH 10^{-8}M, verwendet.

2.2.4 Statistische Auswertung der Gen-Expressionen

Insgesamt sind Zellkulturen von 14 Plazenten beiderlei Geschlechts für die Stimulationsversuche (siehe 2.2.3) verwendet worden, wobei jede dieser Zellkulturen separat bearbeitet wurde. Alle Stimulationsversuche wurden in der dritten Passage durchgeführt und jedes Experiment dreifach bestimmt.

Die quantitative Auswertung der einzelnen Banden erfolgte mit der Kodak Digital Science 1D Image Analyse Software (Version 2.0.3, Kodak). Danach wurden die Intensitäten, die proportional zur Expression des untersuchten Gens stehen, bestimmt. In die Berechnung sind alle Messergebnisse aufgenommen worden. Die Expression der Gene wurde durch die Ratio, Target/Mimic, quantifiziert und auf *L7* normalisiert. Die Ratio wurde berechnet aus dem Mittelwert (AVG) und dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) für die einzelnen Zellkulturen. Als statistische Tests wurden der one-way ANOVA- ,der Newman-Keuls- sowie der t-Test angewendet. Als statistisch signifikant gelten p-Werte kleiner 0,05.

Für die Erstellung von Diagrammen sowie zur statistischen Auswertung wurde die Software GraphPad Prism 4.0 (San Diego, CA, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

Um in dieser Arbeit Effekte von verschiedenen Bisphosphonaten (BSP) auf die mRNA-Expression osteogener Differenzierungsmarker in den mesenchymalen Stammzellen der Plazenta (pMSC) zu beobachten, wurde zunächst das Behandlungsprotokoll aus Versuchen von Viereck et al. (2002b) zu Grunde gelegt. Für diese Untersuchungen wurden sowohl Dosiswirkungen (10^{-4}M, 10^{-6}M, 10^{-8}M, 10^{-10}M und 10^{-12}M über 72h), als auch zeitkinetische Versuche (0-72h mit 10^{-6}M und 10^{-8}M) mit den BSP Pamidronat (PAM) und Zoledronat (ZOL) durchgeführt.

Erweitert wurde das Versuchsfeld zum einen durch die osteogene Stimulation. Es ist bewiesen, dass die Kultivierung der pMSC mit fötalem Rinderserum (FCS) alleine keine osteogene Stimulation bewirkt, sondern dass hierzu weitere Faktoren benötigt werden. Erst nach der Zugabe von ß-Glycerolphosphat, Ascorbinsäure sowie Dexamethason, kann eine Bildung und Verkalkung von *bone nodules* beobachtet werden (Bellows et al. 1986; Bhargava et al. 1988).

Zur Detektion der mRNA-Expression von *OPG*, *AP* und *COL-I* unter optimalen Bedingungen, wurde für diese Studie ein Differenzierungsmedium aus Vitamin C, Vitamin D_3 ($VitD_3$), Dexamethason und ß-Glycerolphosphat (ODM1) angesetzt (siehe 2.2.3.3) (Pittenger et al. 1999). Um die Wirkung von BSP in diesem Medium auf pMSC zu beobachten, wurde in einem zweiten Versuchsansatz ZOL 10^{-8}M dazugegeben (ODM2) und ebenfalls die Effekte auf die *OPG*-, *AP*- und *COL-I*- mRNA-Expression untersucht. Die Stimulation der pMSC erfolgte jeweils über 0d, 2d, 7d, 14d, 21d und 28d mit dem ODM1 sowie dem ODM2.

In einem weiteren Ansatz wurden die Zellkulturen mit $VitD_3$ allein und mit einer Kombination aus $VitD_3$ und ZOL behandelt. Diese Kombination wird u. a. auch in der Osteoporose Therapie verwendet.

3.1 Effekte auf die mRNA-Expression von *OPG, COL-I* und *AP* nach Behandlung mit den Bisphosphonaten PAM und ZOL

3.1.1 Osteoprotegerin- mRNA-Expression

Osteoprotegerin (OPG) ist als löslicher, kompetitiver *receptor activator of nuclear factor-B ligand* (RANKL)-Antagonist in der Lage, die löslichen und gebundenen RANKL-Formen zu neutralisieren und somit die RANKL/RANK-Interaktion zu blockieren (Simonet et al. 1997; Lacey et al. 1998). Das relative Verhältnis von OPG und RANKL ist somit der ausschlaggebende Faktor in der Regulation der Osteoklasten, also der Knochenresorption. OPG lässt sich den osteoblastären Markern zuordnen, so dass die *OPG*-mRNA-Expression einen Hinweis auf die Proliferation darstellt.

Es wurde der dosisabhängige Verlauf der Genexpression mit unterschiedlichen PAM-und ZOL-Konzentrationen verfolgt, um anschließend mit der jeweils effektivsten Konzentration eine Zeitkinetik über 0-72h für beide BSP zu erstellen.

Dosis-Wirkungs-Kurven

Zur Untersuchung der Effekte der BSP PAM und ZOL auf die *OPG*-mRNA-Expression in pMSC, wurden die Zellen mit absteigenden Konzenrationen von 10^{-4}M, 10^{-6}M, 10^{-8}M, 10^{-10}M und 10^{-12}M über 72h jeweils mit einem der BSP behandlet (Abb. 3.1). Im Vergleich beider Diagramme wird deutlich, dass die *OPG*-mRNA-Expression zunächst in beiden Stimulationsversuchen zunimmt, während für PAM ein Maximum bei 10^{-6}M erreicht wird (A) und für ZOL die Expression bei 10^{-8}M am höchsten ist (B). Im weiteren Verlauf ist wiederum für beide BSP eine absteigende Expression der *OPG*-mRNA zu erkennen.

Die statistische Auswertung mittels one-way ANOVA und Newman-Keuls-Test ergab für die *OPG*-mRNA Expression nach der Inkubation mit PAM 10^{-6}M und 10^{-8}M eine hohe statistische Signifikanz ($p < 0{,}001$) (A). Nach der Behandlung

mit ZOL konnte ebenfalls eine hohe statistische Signifikanz für die Konzentrationen 10^{-6}M sowie 10^{-8}M ($p < 0{,}001$), beim Vergleich zur Kontrolle, beobachtet werden. Auch die Konzentration von ZOL 10^{-10}M konnte eine signifikant erhöhte Genexpression zur Kontrolle hervorrufen ($p < 0{,}01$) (B).

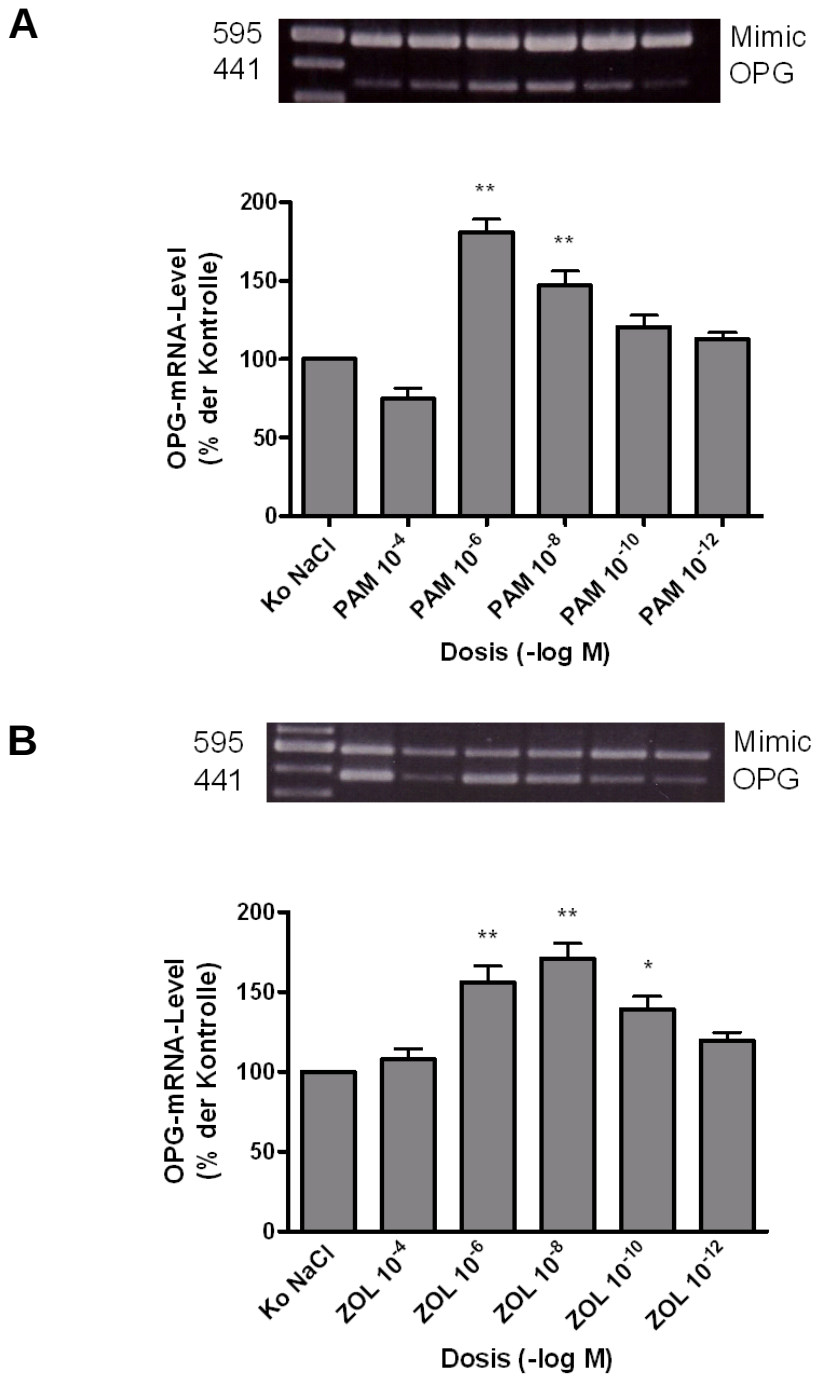


Abb. 3.1: Effekte der Bisphosphonate PAM **(A)** und ZOL **(B)** auf die *OPG*-mRNA-Expression in pMSC. Die Behandlung fand jeweils mit absteigenden Konzentrationen von 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10} und 10^{-12}M über 72h statt.

Die statistische Auswertung ergab für **(A)** mit one-way ANOVA P< 0,0001; Newman-Keuls-Analyse: **p< 0,001 und für **(B)** P< 0,0001 mit ANOVA; Newman-Keuls-Analyse: *p< 0,01; **p< 0,001.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte SEM dargestellt und leiten sich von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei unterschiedlichen Plazenten ab. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrolle (KoNaCl=100%) relativiert.

Zeitkinetik

Da mit den Konzentrationen 10^{-6}M für PAM und 10^{-8}M für ZOL die Expression der *OPG*-mRNA am effektivsten hochreguliert werden konnte, wurden diese Konzentrationen verwendet, um die Expression im zeitlichen Verlauf zu beobachten. Die Inkubation mit diesen BSP erfolgte über 0h, 6h, 12h, 24h, 48h und 72h. Als Kontrolle dienten NaCl behandelte Stammzellen derselben Kultur (Abb. 3.2).

Sowohl unter PAM- als auch ZOL-Behandlung, war ein zeitabhängiger Anstieg der *OPG*-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Während PAM allerdings die Expression bis zu dem Zeitpunk von 72h stetig ansteigen ließ und darüber hinaus ein weiteres Wachstum zu erkennen war (A), zeigte sich, dass es bei ZOL nach 12stündiger Inkubation annähernd zu einer Verdreifachung des *OPG*-mRNA-Levels kam. Dies fiel danach allerdings wieder rasch und nach 72h war nur noch eine Verdopplung des Expressionslevels zu beobachten (B).

Bei der Betrachtung der statistischen Auswertung mit dem one-way ANOVA und dem Newman-Keuls-Test zeigte sich für die PAM-Zeitkinetik eine deutliche statistische Signifikanz bei 24h, 48h und 72h ($p < 0{,}001$) im Vergleich zur Kontrolle. Ein geringer Anstieg der *OPG*-mRNA-Expression, aber dennoch signifikant, erfolgte bis 12h ($p < 0{,}05$) (A). Im zeitlichen Verlauf der ZOL-Stimulation konnte zu jedem Zeitpunkt eine statistisch hohe Signifikanz errechnet werden (12h, 24h, 48h und 72h $p < 0{,}001$; 6h $p < 0{,}01$) (B). Beim Vergleich der Stundenwerte der unstimulierten (KoNaCl) zu den stimulierten Zellen mit PAM 10^{-6}M, nach Anwendung des t-Tests, zeigte sich für die Zeitpunkte 12h, 24h und 48h eine Signifikanz von $p < 0{,}01$ und für 72h von $p < 0{,}0001$ (A). Die t-Test-Analyse für die mit ZOL10^{-8}M behandelten Zellen ergab für 6h, 12h, 24h und 72h eine statistisch hohe Signifikanz von $p < 0{,}0001$ und für den Zeitpunkt von 48h lag der p-Wert bei $< 0{,}0002$ (B).

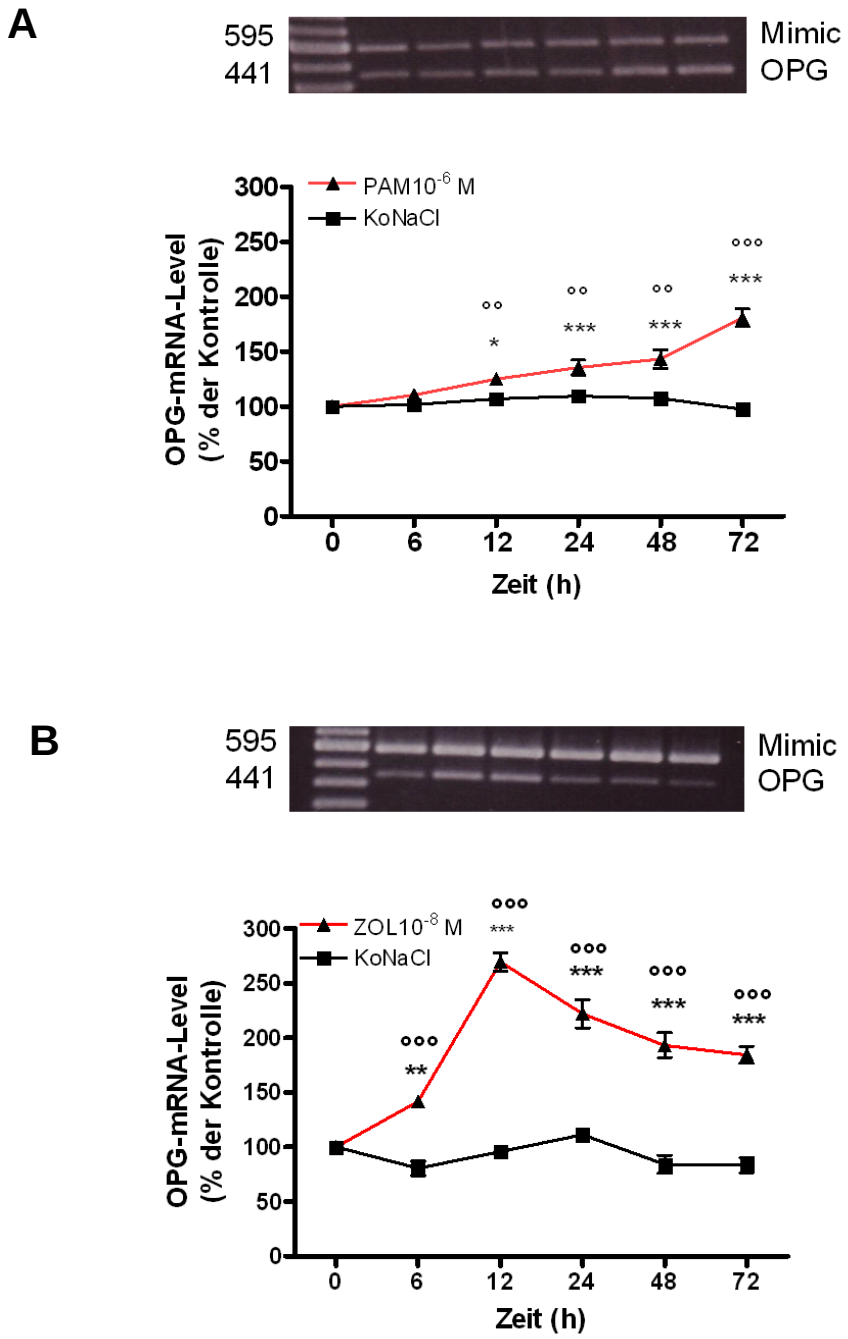


Abb. 3.2: Zeitabhängige *OPG*-mRNA-Expression in pMSC nach Behandlung mit **(A)** PAM 10^{-6}M und **(B)** ZOL 10^{-8}M über jeweils 0h, 6h, 12h, 24h, 48h und 72h.

Die statistische Auswertung ergab für **(A)** P< 0,0001 mit one-way ANOVA; Newman-Keuls-Analyse: *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001; t-Test-Analyse: °p< 0,05; °°p< 0,01; °°°p< 0,001 und für **(B)** P< 0,0001 mit one-way ANOVA; Newman-Keuls-Analyse: **p< 0,01; ***p< 0,001; t-Test-Analyse: °p< 0,05; °°p< 0,01; °°°p< 0,001

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte SEM dargestellt und leiten sich von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei unterschiedlichen Plazenten ab. Die Werte wurden jeweils auf die 0h Kontrolle (KoNaCl=100%) relativiert.

3.1.2 Kollagen-I- mRNA-Expression

Während der Osteogenese können im Knochen mehrere Kollagentypen (-I, -III, -V, VI und X) nachgewiesen werden, wobei das COL-I mit 97% den Hauptbestandteil ausmacht (Collin et al. 1992; Chichester et al. 1993; Aubin 1998). Aus diesem Grund fungiert dieses Strukturprotein ebenfalls als osteoblastärer Marker, so dass der Nachweis der *COL-I*-mRNA einen direkten Rückschluss auf das Knochenwachstum gibt.

Zeitkinetik

Um die *COL-I*-mRNA-Expression im zeitlichen Verlauf zu beobachten, erfolgte die Inkubation der pMSC mit den BSP PAM 10^{-6}M und ZOL 10^{-8}M über 0h, 6h, 12h, 24h, 48h und 72h. Als Kontrolle dienten NaCl behandelte Stammzellen derselben Kultur (Abb. 3.3).

Im zeitlichen Verlauf war ein deutlicher Anstieg der *COL-I*-mRNA-Expression bis zu dem Zeitpunkt von 12h bei beiden BSP zu erkennen. Allerdings zeigte die Behandlung mit ZOL 10^{-8}M einen weitaus größeren Effekt auf die Expression, so dass sich nach 12h das Genprodukt mehr als verdoppelt hatte (B). Die Behandlung mit PAM 10^{-6}M konnte nur einen mäßigen Anstieg der Expression bewirken (A). Nach 12stündiger Inkubation nahm die mRNA-Expression in beiden Versuchsreihen wieder stetig ab.

Bei der Betrachtung der statistischen Auswertung mit dem one-way ANOVA und dem Newman-Keuls-Test zeigte sich für die PAM-, als auch für die ZOL-Zeitkinetik eine deutliche statistische Signifikanz bei 12h, 24h und 48h ($p< 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle (A, B). Nach Anwendung der t-Test-Analyse zeigte sich für die mit PAM 10^{-6}M behandelten Zellen eine hohe Signifikanz von $p< 0,001$ nach 6h und 24h und von $p< 0,01$ nach 12h. Nach 48h ergab sich nur noch ein p-Wert von 0,05 (A). Nach der Inkubation mit ZOL 10^{-8}M konnte zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine hohe statistische Signifikanz errechnet werden. Der p-Wert nach 12h und 48h liegt bei 0,001 und nach 6h, 24h und 72h bei 0,01 (B).

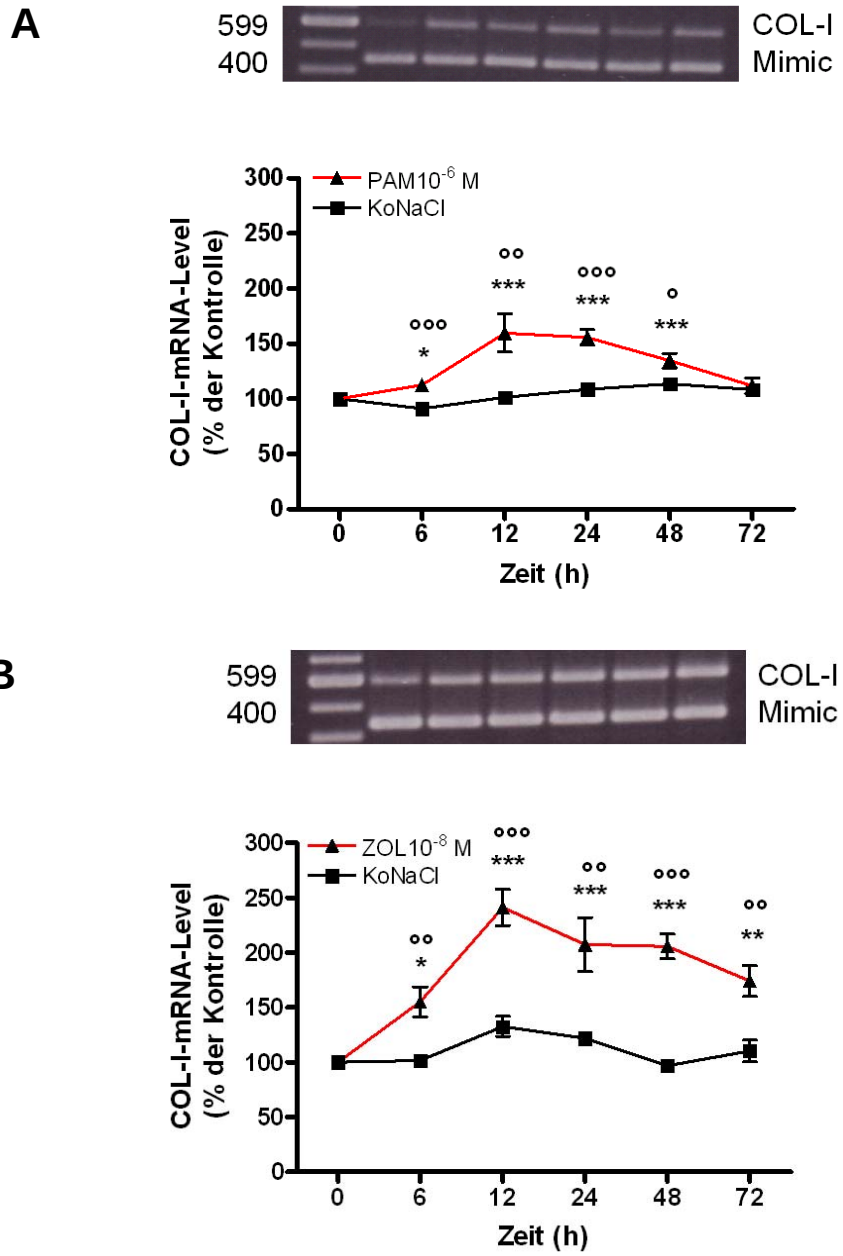


Abb. 3.3: Zeitabhängige *COL-I*-mRNA-Expression in pMSC nach Behandlung mit **(A)** PAM 10^{-6}M und **(B)** ZOL 10^{-8}M über jeweils 0h, 6h, 12h, 24h, 48h und 72h.

Die statistische Auswertung ergab für **(A)** P< 0,0001 mit one-way ANOVA; Newman-Keuls-Analyse: *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001, t-Test-Analyse: °p< 0,05; °°p< 0,01;°°°p< 0,001 und für **(B)** P< 0,0001 mit one-way ANOVA; Newman-Keuls-Analyse: *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001, t-Test-Analyse: °p< 0,05; °°p< 0,01; °°°p< 0,001

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte SEM dargestellt und leiten sich von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei unterschiedlichen Plazenten ab. Die Werte wurden jeweils auf die 0h Kontrolle (KoNaCl=100%) relativiert.

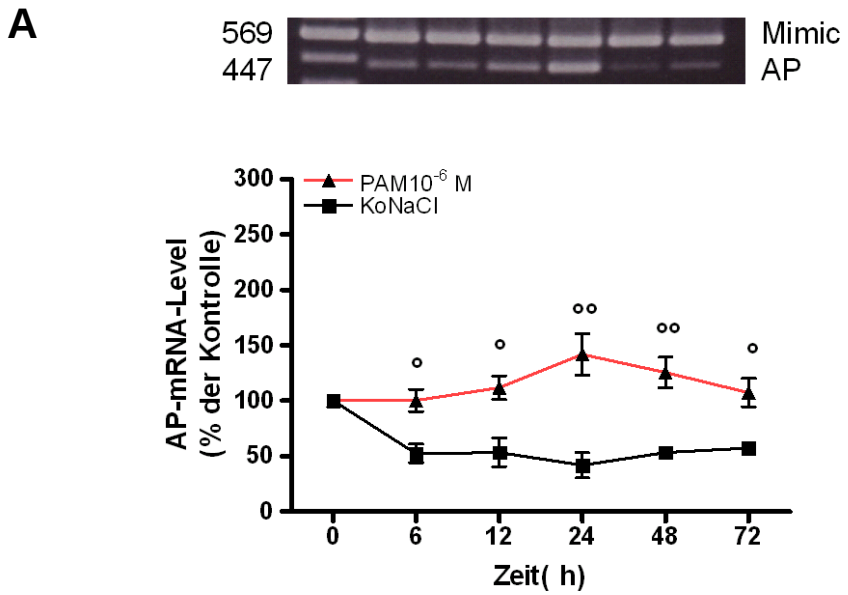
3.1.3 Alkalische-Phosphatase-mRNA-Expression

Da AP den Prozess der Matrixkalzifizierung katalysiert, gilt dieses Enzym als klassischer Marker der osteoblastären Kaskade (Robey und Termine 1985). Es wird häufig mit dem osteogenen Potential von Zellen gleichgesetzt (Pittenger et al. 1999; Halvorsen et al. 2001), so dass durch den Nachweis der *AP*-mRNA-Expression auf die Knochenneubildung geschlossen werden kann.

Zeitkinetik

Um die *AP*-mRNA-Expression im zeitlichen Verlauf zu beobachten, erfolgte die Inkubation der pMSC mit den BSP PAM 10^{-6}M und ZOL 10^{-8}M über 0h, 6h, 12h, 24h, 48h und 72h. Als Kontrolle dienten NaCl behandelte Stammzellen derselben Kultur (Abb. 3.4).

Die Behandlung der pMSC mit PAM 10^{-6}M zeigte keine wesentlichen Effekte auf die Expression der *AP*-mRNA. Nach der statistischen Auswertung wurde mit dem one-way ANOVA und dem Newman-Keuls-Test keine Signifikanz errechnet. Mit dem t-Test ergab sich nach 24h und 48h ein p-Wert von 0,01, also eine hohe Signifikanz. Ein p-Wert von 0,05 wurde nach 6h, 12h und 72h erreicht (A). Eine Behandlung der Stammzellen mit ZOL 10^{-8}M ließ eine rasante Zunahme der *AP*-mRNA-Expression erkennen, so dass diese um das 2,5 fache anstieg. Nach der statistischen Auswertung konnte sowohl mit dem Newman-Keuls-Test nach der one-way ANOVA Analyse, als auch mit dem t-Test eine hohe statistische Signifikanz detektiert werden, $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$ nach 48h und $p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$ nach 72h (B).



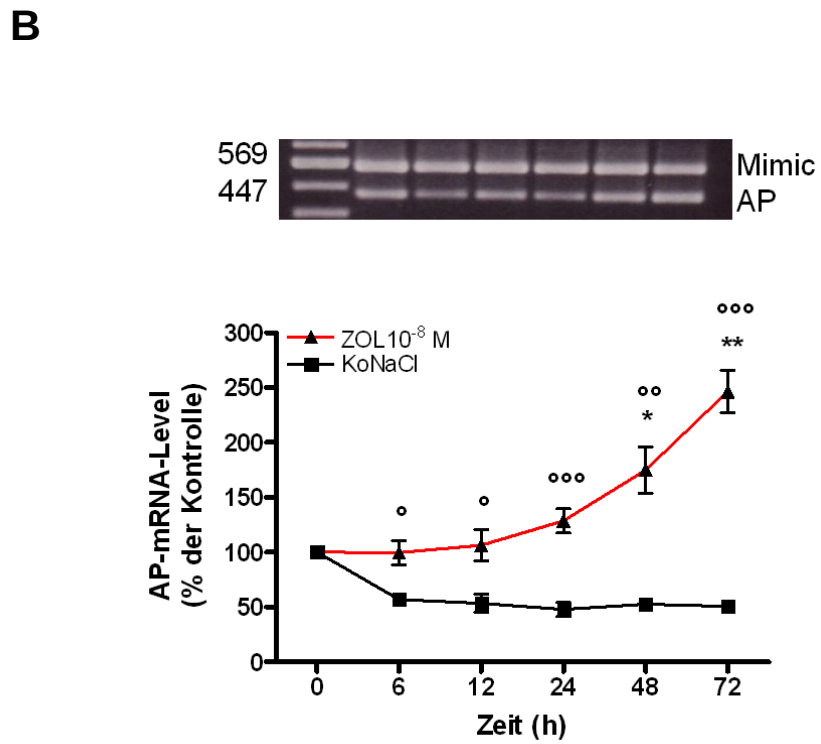


Abb. 3.4: Zeitabhängige *AP*-mRNA-Expression in pMSC nach Behandlung mit **(A)** PAM 10^{-6}M und **(B)** ZOL 10^{-8}M über jeweils 0h, 6h, 12h, 24h, 48h und 72h.

Die statistische Auswertung ergab für **(A)** mit one-way ANOVA und der Newman-Keuls-Analyse keine Signifikanz, t-Test-Analyse:°p< 0,05; °°p< 0,01 und für **(B)** P< 0,0001 mit one-way ANOVA; Newman-Keuls-Analyse: *p< 0,01; **p< 0,001, t-Test-Analyse: °p< 0,05; °°p< 0,01; °°°p< 0,001

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte SEM dargestellt und leiten sich von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei unterschiedlichen Plazenten ab. Die Werte wurden jeweils auf die 0h Kontrolle (KoNaCl=100%) relativiert.

3.2 Effekte auf die mRNA-Expression von *OPG, COL-I* und *AP* nach Behandlung mit $VitD_3$

Um festzustellen, ob $VitD_3$ ebenfalls eine stimulatorische Wirkung auf die mRNA-Produktion von *OPG* und den osteogenen Differenzierungsfaktoren *COL-I* und *AP* hat, wurden die pMSC in einem weiteren Versuch mit einer $VitD_3$ -Konzentration von 10^{-8}M für 0h (als Kontrolle), 6h, 12h, 24h, 48h und 72h behandelt und die Genexpression der osteogenen Marker ermittelt. Als Kontrolle dienten ETOH 10^{-8}M behandelte Stammzellen derselben Kultur (Abb. 3.7).

Zeitkinetik

Beim Vergleich der Graphen zueinander, kann man in allen drei Versuchen eine Steigerung der mRNA-Expression der untersuchten Marker erkennen.

Betrachtet man die Kurve der *OPG*-mRNA-Expression, läßt sich bis zum Zeitpunkt von 24h noch keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Erst nach 48h machte sich eine Erhöhung erkennbar, die nach 72h das Maximum erreicht hatte. Die statistische Signifikanz, nach Anwendung des t-Testes, lagt für 48h bei $p< 0,05$ und für 72h bei $p< 0,001$ (A).

Die Untersuchung der *COL-I*-mRNA-Expression ergab einen mäßigen Anstieg der Genexpression, vor allem bis zu dem Zeitpunkt von 12h. Nach 24h wurde das erste Maximum mit einem p-Wert von 0,01 erreicht (nach t-Test-Analyse), welches dann nach 48h leicht abfiel und sich dann nach 72h auf ein zweites Maximum mit einem p-Wert von 0,05 erhöhte (nach t-Test-Analyse) (B).

Das *AP*-mRNA-Level ließ sich bis zum Zeitpunkt von 24h keine Steigerung erkennen. An dem Messpunkt 48h hatte sich die Expression des Gens dann leicht erhöht und erreichte nach 72h dann sein Maximum, welches nach der t-Test Analyse allerdings keine statistische Signifikanz erkennen ließ (C).

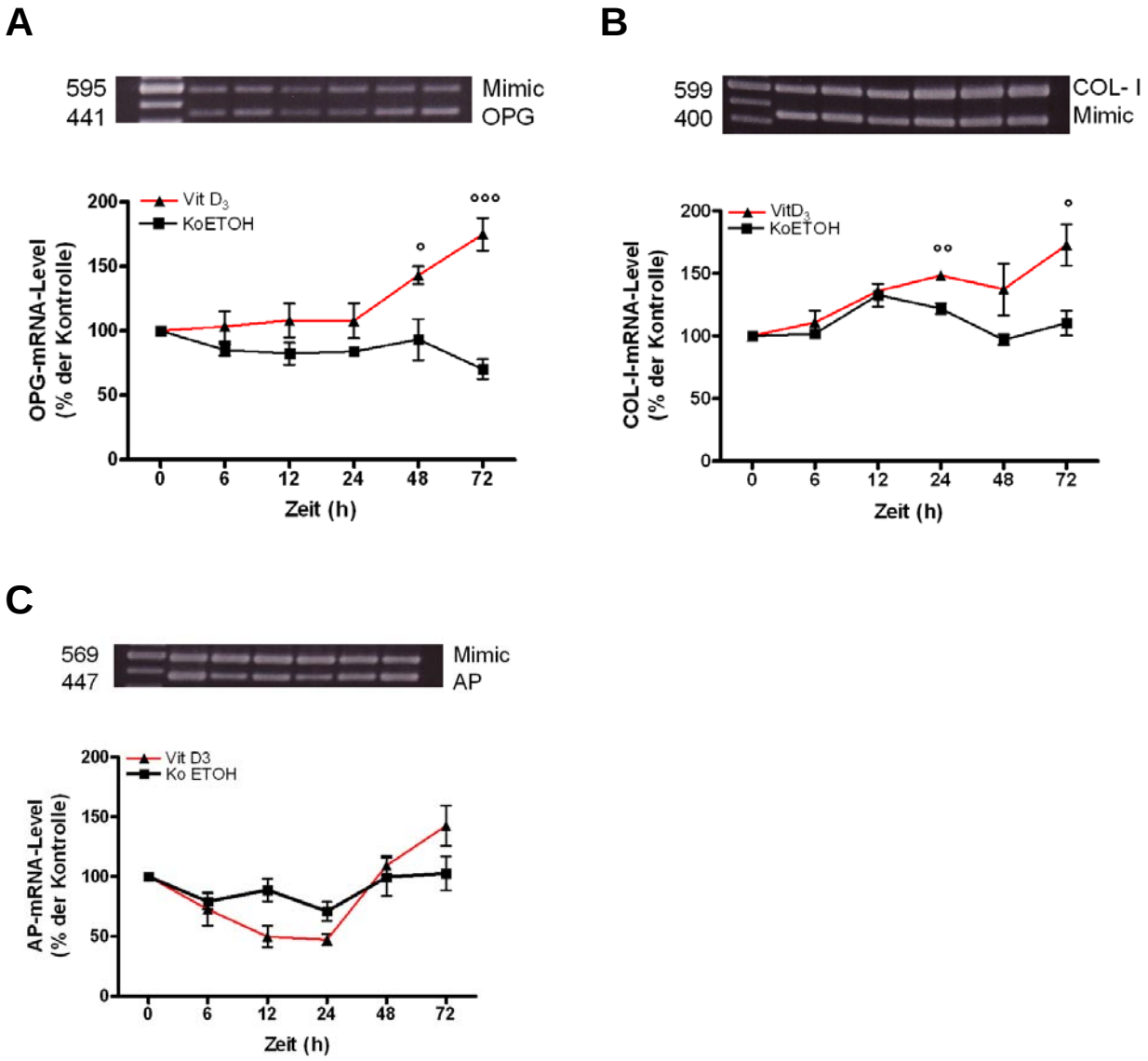


Abb. 3.7: Zeitabhängige Expression der mRNA von **(A)** *OPG*, **(B)** *COL-I* und **(C)** *AP* in pMSC nach der Behandlung mit einer $VitD_3$-Konzentration von 10^{-8}M für 0h (als Kontrolle), 6h, 12h, 24h, 48h und 72h.

Die statistische Auswertung ergab für **(A)** t-Test-Analyse: ° $p < 0{,}05$; °°° $p < 0{,}001$, **(B)** t-Test-Analyse: ° $p < 0{,}05$; °° $p < 0{,}01$ und **C)** t-Test-Analyse: keine statistische Relevanz..

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte SEM dargestellt und leiten sich von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei unterschiedlichen Plazenten ab. Die Werte wurden jeweils auf die 0h Kontrolle (KoETOH=100%) relativiert.

3.3 Effekt auf die mRNA-Expression von *OPG, COL-I* und *AP* nach Behandlung mit $VitD_3$ und ZOL

In diesem Versuch sollte nachgewiesen werden, ob das BSP ZOL, neben dem $VitD_3$ eine zusätzliche Wirkung auf die mRNA-Expression von *OPG* und *COL-I* und *AP* hat. Hierzu wurden die pMSC, nach der Behandlung mit $VitD_3$ 10^{-8}M, mit ZOL in den Konzentrationen 10^{-4}M, 10^{-6}M, 10^{-8}M, 10^{-10}M und 10^{-12}M für jeweils 72h inkubiert und weiterhin die Expression mittels RT-PCR bestimmt. Als Kontrolle dienten ETOH 10^{-8}M behandelte Stammzellen derselben Kultur (Abb. 3.8).

Dosis-Wirkungs-Kurve

Der Dosisversuch mit ZOL 10^{-4}M bis 10^{-12}M für 72h erbrachte einen Anstieg des *OPG*-mRNA-Levels um die 200% bei einer Konzentration von ZOL 10^{-8}M. Mit der Konzentrationsabnahme von ZOL war auch eine stetige Reduktion der Genexpression erkennbar.

Die statistische Auswertung mittels one-way ANOVA und Newman-Keuls-Test ergab für die *OPG*-mRNA-Expression eine statistische Signifikanz von $p< 0,05$ nur nach der Inkubation mit ZOL 10^{-8}M (A).

Bei der Betrachtung des *COL-I*-mRNA-Expressionsverlaufs, konnte ebenfalls für die ZOL-Konzentration 10^{-8}M das Maximum beobachtet werden, während die anderen eingesetzten Konzentrationen kaum eine Zunahme des Expressionslevels bewirken konnten. Nach der statistischen Auswertung mit dem one-way ANOVA und dem Newman-Keuls-Test ergab sich eine Signifikanz von $p< 0,01$ (B).

Das mRNA-Level von *AP* zeigte bei den Konzentrationen von ZOL 10^{-6}M und 10^{-8}M eine Zunahme der Expression von annährend 100%. Andere untersuchte Dosen konnten keine Effekte erzielen. Auch hier konnte mittels one-way ANOVA und Newman-Keuls-Test eine statistische Signifikanz von $p< 0,01$ errechnet werden, nach der Behandlung mit ZOL 10^{-6}M sowie mit 10^{-8}M (C).

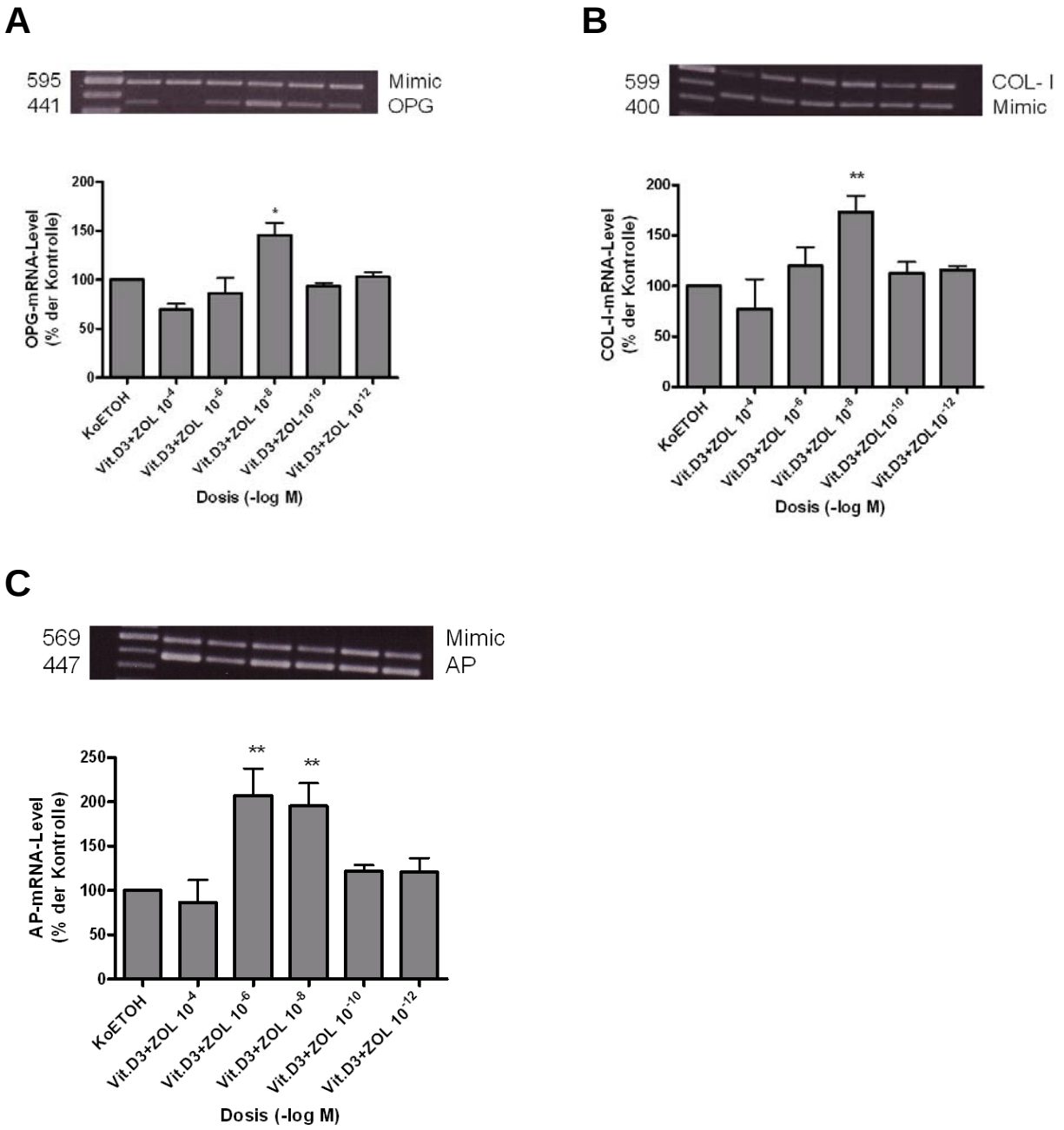


Abb. 3.8: Expression der mRNA von **(A)** *OPG*, **(B)** *COL-I* und **(C)** *AP* in pMSC nach der Behandlung mit $VitD_3$ 10^{-8}M und ZOL in den Konzentrationen 10^{-4}M, 10^{-6}M, 10^{-8}M, 10^{-10}M und 10^{-12}M für jeweils 72h.

Die statistische Auswertung ergab für **(A)** P< 0,01 mit one-way ANOVA; Newman-Keuls-Analyse: *p< 0,05 für **(B)** P< 0,001 mit one-way ANOVA; Newman-Keuls-Analyse: **p< 0,01 und für **(C)** P< 0,0001 mit one-way ANOVA; Newman-Keuls-Analyse: **p< 0,01

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte SEM dargestellt und leiten sich von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei unterschiedlichen Plazenten ab. Die Werte wurden jeweils auf die Kontrolle (KoETOH=100%) relativiert.

3.4 Effekte auf die mRNA-Expression von *OPG, COL-I* und *AP* nach osteogener Stimulation

Es ist bekannt, dass bestimmte Stoffe eine osteogene Differenzierung initiieren und eine Kalzifizierung hervorrufen (Pittenger et al. 1999). Hierzu zählen Dexamethason, ß-Glycerolphosphat sowie $VitD_3$, so dass angelehnt an die Differenzierungsassays der Arbeitsgruppe um Pittgenger ein Medium mit diesen Zusätzen hergestellt wurde. In diesem wurden die pMSC kultiviert und im zeitlichen Verlauf die Effekte auf die mRNA-Expession der osteogenen Differenzierungsmarker *OPG*, *COL-I* und *AP* bestimmt.

Die pMSC wurden mit und ohne dem BSP ZOL 10^{-8}M im Differenzierungsmedium kultiviert. Die Behandlung erfolgte jeweils nach 0d, 2d, 7d, 14d, 21d und 28d. Als Kontrolle dienten ETOH 10^{-8}M behandelte Stammzellen derselben Kultur (Abb. 3.5-3.7).

3.4.1 Osteoprotegerin-mRNA-Expression

Zeitkinetik

Bei Betrachtung des *OPG*-mRNA-Levels ohne der Behandlung der Stammzellen mit ZOL 10^{-8}M, konnte zu keinem Zeitpunkt eine Erhöhung der Expression festgestellt werden (A). Nach der Behandlung mit ZOL 10^{-8}M war eine leichte Zunahme des *OPG*-mRNA-Spiegels zu erkennen. Mit Hilfe der t-Test-Analyse wurde nach sieben Tagen der p-Wert von 0,05 und nach 21 Tagen von 0,01 ermittelt und somit eine statistische Signifikanz bestätigt (B).

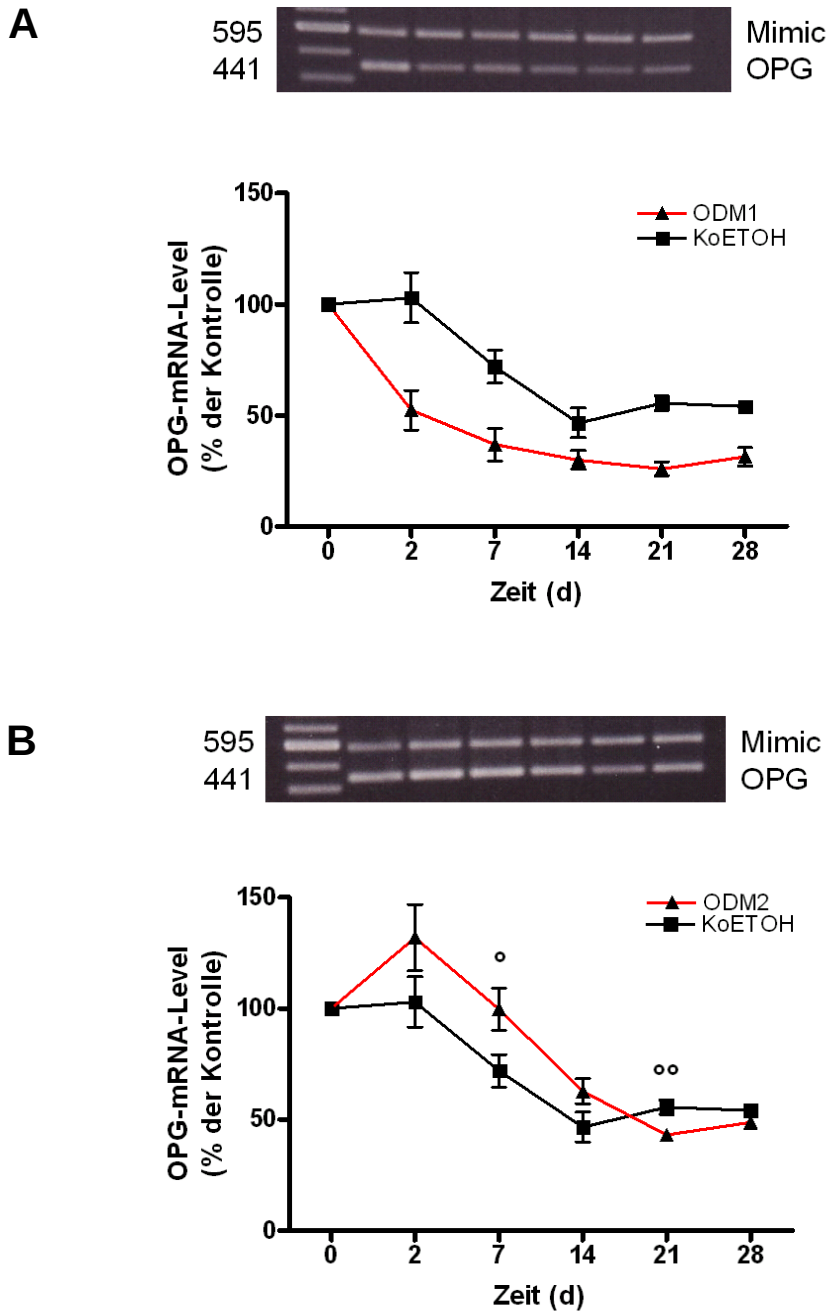


Abb. 3.5: Zeitabhängige *OPG*-mRNA-Expression in pMSC **(A)** nach der Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium* (ODM1) und **(B)** zusätzlicher Behandlung mit ZOL 10^{-8}M (ODM2) über jeweils 0d, 2d, 7d, 14d, 21d und 28d.

Die statistische Auswertung ergab für **(A)** keine statistische Auswertung möglich und für **(B)** t-Test-Analyse:°p< 0,05; °°p< 0,01

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte SEM dargestellt und leiten sich von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei unterschiedlichen Plazenten ab. Die Werte wurden jeweils auf die 0h Kontrolle (KoETOH=100%) relativiert.

*0,05mM Vitamin C, 1µM Vitamin D_3/2% FCS, 0,1µM Dexamethason und 10mM ß-Glycerolphosphat in RPMI-1640

3.4.2 Kollagen-I-mRNA Expression

Zeitkinetik

Nach der Kultivierung der pMSC im ODM1 konnte im zeitlichen Verlauf bis zum siebten Tag ein leichter Anstieg der *COL-I*-mRNA-Expression beobachtet werden. Danach fiel die Kurve ab, bis schließlich ab Tag 14 keine Expressionserhöhung mehr erkennbar war. Nach Anwendung des t-Tests konnte nur für Tag sieben eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,01 bestimmt werden (A).

Nach der zusätzlichen Behandlung der Stammzellen mit ZOL 10^{-8}M war ein weitaus deutlicherer Effekt auf die Genexpression zu erkennen. Bereits nach dem zweiten Tag ergab sich eine Zunahme bis hin zum Maximum, an dem das *COL-I*-mRNA-Level mehr als verdoppelt war. Mit Hilfe des t-Tests konnte bis zum Tag 21 eine sehr hohe statistische Signifikanz errechnet werden ($p< 0,001$), welche nach 28 Tagen immer noch bei $p< 0,01$ lag (B).

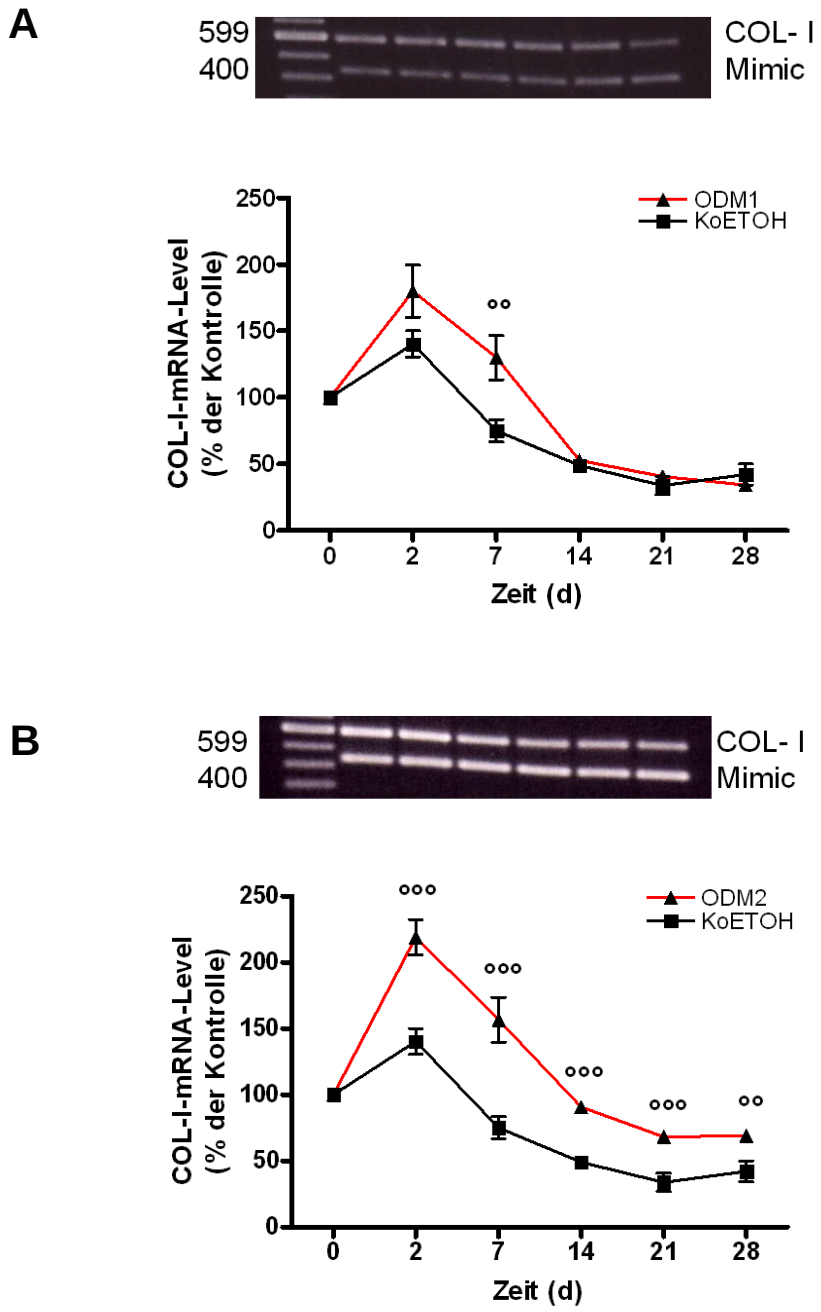


Abb. 3.6: Zeitabhängige *COL-I*-mRNA-Expression in pMSC **(A)** nach der Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium* (ODM1) und **(B)** zusätzlicher Stimulation mit ZOL 10^{-8}M (ODM2) über jeweils 0d, 2d, 7d, 14d, 21d und 28d.

Die statistische Auswertung ergab für **(A)** t-Test-Analyse: °°p< 0,01 und für **(B)** t-Test-Analyse: °°p< 0,01; °°°p< 0,001

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte SEM dargestellt und leiten sich von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei unterschiedlichen Plazenten ab. Die Werte wurden jeweils auf die 0h Kontrolle (KoETOH=100%) relativiert.

*0,05mM Vitamin C, 1µM Vitamin D_3/2% FCS, 0,1µM Dexamethason und 10mM ß-Glycerolphosphat in RPMI-1640

3.4.3 Alkalische-Phosphatase-mRNA-Expression

Zeitkinetik

Die Reaktion der *AP*-mRNA-Expression auf die osteogene Stimulation der pMSC mit ODM1 zeigte einen sehr positiven Verlauf. Es konnte ein Anstieg der Genexpression beobachtet werden, welcher am zweiten Tag schon um das zweifache erhöht war, um dann bis zum Tag 21 wieder auf das Niveau der Kontrolle abzufallen. Die t-Test-Analyse zeigte am Tag 2, 7 und 14 eine statistische Signifikanz von $p < 0{,}01$ (A).

Die Kurve der Zellen, die zusätzlich mit ZOL 10^{-8}M behandlet wurden, zeigte ebenfalls einen Anstieg der *AP*-mRNA. Bis zum zweiten Tag war das mRNA-Level bereits um das 2,4fache erhöht und hatte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls sein Maximum erreicht. Danach fiel die Kurve stetig ab. Nach Anwendung der t-Test-Analyse ergab sich für die Tage 2 und 14 ein p-Wert von 0,001, während sich für die Tage 7 und 28 eine Signifikanz von 0,05 errechnete (B).

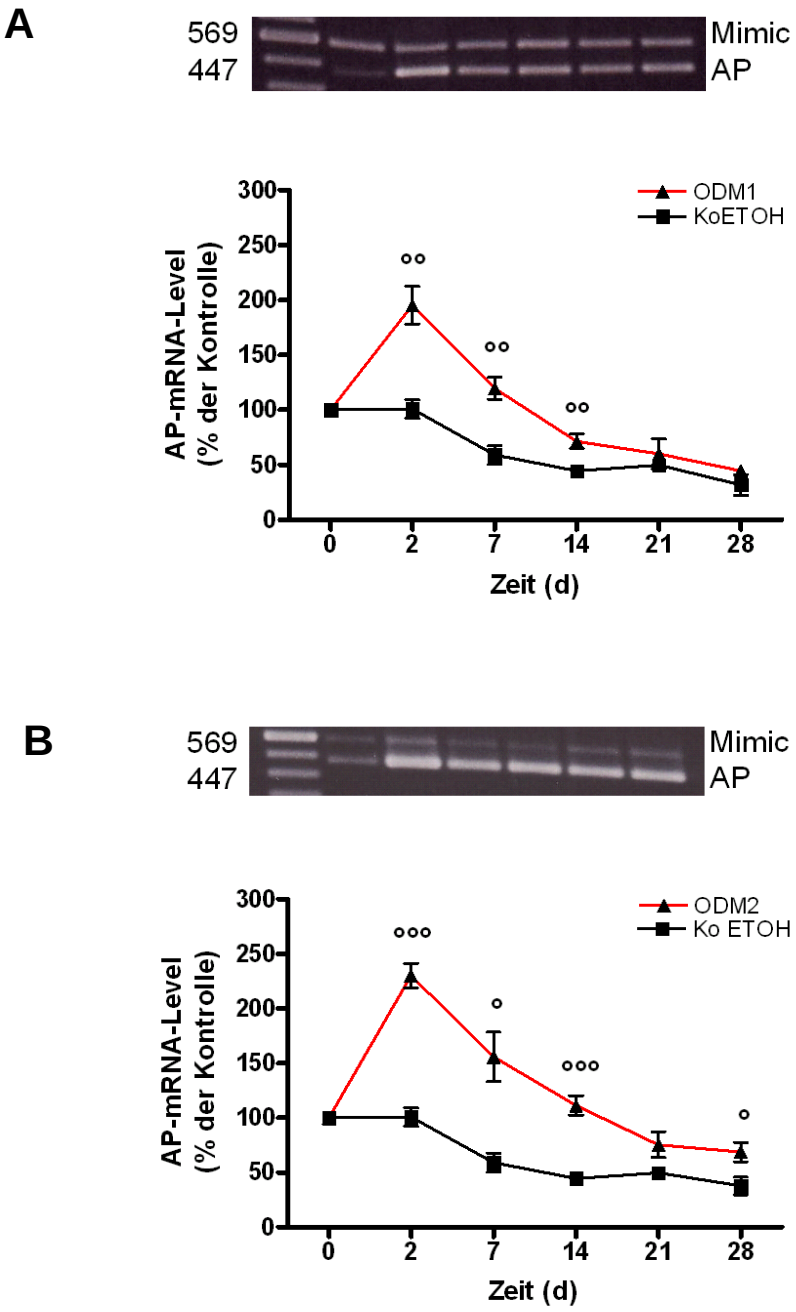


Abb. 3.6: Zeitabhängige *AP*-mRNA-Expression in pMSC **(A)** nach der Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium* (ODM1) und **(B)** zusätzlicher Behandlung mit ZOL 10^{-8}M (ODM2) über jeweils 0d, 2d, 7d, 14d, 21d und 28d.

Die statistische Auswertung ergab für **(A)** t-Test-Analyse:°°p< 0,01 und für **(B)** t-Test-Analyse: °p< 0,05; °°°p< 0,001

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte SEM dargestellt und leiten sich von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei unterschiedlichen Plazenten ab. Die Werte wurden jeweils auf die 0h Kontrolle (KoETOH=100%) relativiert.

*0,05mM Vitamin C, 1µM Vitamin D_3/2% FCS, 0,1µM Dexamethason und 10mM ß-Glycerolphosphat in RPMI-1640

4 Diskussion

Die molekularen Mechanismen der osteogenen Differenzierung und die Regulation durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sind nach wie vor Objekt intensiver Forschung u. a. auch zur Weiterentwicklung regenerativer Therapieansätze. Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind als Vorläuferzellen Ausgangspunkt der osteoblastären Differenzierungskaskade. Ihr Differenzierungspotential, ihre relativ einfache Isolation und Expansion *in vitro* machen sie zu Hoffnungsträgern für Therapieansätze in der Geweberegeneration sowie dem Gewebeersatz.

Als Quelle zur Gewinnung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC) gilt als bisheriger Standard das Knochenmark. Die notwendige invasive Gewinnung, die geringe Häufigkeit von MSC im menschlichen Knochenmark selbst, die z. T. erschwerte Expansion *in vitro*, z.B. durch abnehmende Vermehrungskapazität in Abhängigkeit vom Spenderzustand und zunehmendem Spenderalter (Caplan et al. 1994; DiGirolamo et al. 1999), lenkte die Wissenschaft auf das Finden und Erforschen neuer Ressourcen für die Gewinnung hMSC.

Eine viel versprechende Quelle stellt seit Kurzem in diesem Zusammenhang die menschliche Plazenta dar. Die mesenchymalen Stammzellen der Plazenta (pMSC) zeigten verglichen mit mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarkes (bMSC) in ersten Untersuchungen phänotypisch und funktionell sehr ähnliche Eigenschaften, verbunden mit einer hohen Plastizität, günstiger immunologischer Vorraussetzungen mit geringer ethischer Barrieren bei einfacher und nicht-invasiver Verfügbarkeit (Wulf et al. 2004). Als Quelle für pMSC in dieser Arbeit diente das Chorionzottengewebe humaner reifer Plazenten, die nach einem Isolations- und Kultivierungsprotokoll von Wulf et al. (2004) gewonnen wurden.

Eine Vielzahl von Differenzierungsfaktoren und therapeutisch eingesetzten Substanzen, die Einfluss auf die osteoblastäre Differenzierungskaskade haben, sind bekannt und in zahlreichen Studien wie z.B. an humanen Osteoblasten (hOB) untersucht worden.

Eine Substanzgruppe, die seit Jahren zu den etablierten und potentesten anti-resorptiven zählt und die in der Therapie einer Vielzahl benigner und maligner metabolischer Knochenerkrankungen mit gesteigerter Knochenresorption erfolgreich eingesetzt wird, ist die der Bisphosphonate (BSP) (Liberman et al. 1995; Diel et al. 1998; Saag et al. 1998; Orwoll et al. 2000). BSP werden von Osteoklasten aufgenommen, hemmen deren Funktion und steigern die Apoptoserate, dadurch wird die Knochenresorption und der Knochenverlust reduziert (Rogers et al. 2000). Andere Arbeiten liefern Hinweise, dass diese Substanzen auch wichtige Osteoblastenfunktionen kontrollieren, wie deren Proliferation und Differenzierung, die Expression von extrazellulären Matrixproteinen und Wachstumsfaktoren, Zytokine regulieren und die Apoptose hemmen (Giuliani et al. 1998a,b; Klein et al. 1998; Tokuda et al. 1998; Plotkin et al. 1999; Reinholz et al. 2000; Rogers et al. 2000).

In der Arbeit von Viereck et al. 2002b wurde nach Behandlung von hOB-Zellkulturen mit BSP Pamidronat (PAM) und Zoledronat (ZOL) eine Steigerung der mRNA-Expression und Proteinproduktion des Signalmoleküls Osteoprotegerin (OPG) nachgewiesen. Damit einher ging auch die Hochregulierung der mRNA-Expression und Proteinproduktion von extrazelluläreren Matrixkomponenten (Kollagen I, COL-I) und Osteoblasten-spezifischer Enzyme (alkalische Phosphatase, AP), die klassische Marker der Osteoblastendifferenzierung sind. In Kombination der jeweiligen Steigerung von OPG und den klassischen Markern COL-I und AP, wurde OPG als zusätzlicher Marker einer gesteigerten Osteoblastendifferenzierung gewertet.

Ziel der Arbeit war es u. a. zu klären, ob die steigernden Effekte der BSP PAM und ZOL auf die mRNA-Expression von OPG und die klassischen osteoblastären Differenzierungsmarkern (*COL-I, AP* und *OC*) aus der Arbeit von Viereck et al. (2000b) in hOB-Zellen auch in pMSC reproduzierbar sind. Eigene Beobachtungen sowie Daten aus der Literatur zur pMSC, könnten auch weitere Hinweise auf Eignung bzw. Übertragbarkeit bekannter menschlicher Zellmodelle (wie z.B. hOB-Zellen) auf pMSC liefern und mögliche Ansätze im *Tissue Engineering* erbringen.

4.1 Effekte von Bisphosphonaten auf die Expression unterschiedlicher osteoblastärer Marker

Als Interpretationsgrundlage für osteoblastäre Differenzierung dient das sequentielle Differenzierungsmodell von Owen et al. (1990). Es ist das Ergebnis aus der Erforschung der Expression von Wachstums- und Differenzierungsparametern zur Osteoblastogenese an Rattenkalavarienzellen. Danach ist die sequentielle osteoblastäre Differenzierung charakterisiert durch drei aufeinander folgende Phasen: einer schnellen Proliferation, einer Matrixmaturation und der Mineralisation. Die Proliferationsphase ist durch Expression bestimmter Proliferationsgene, wie z.B. c-myc und c-fos, DNA-bindender Histone und *COL-I*, charakterisiert. Die Matrixreifungsphase ist gekennzeichnet durch eine maximale Genexpression der *AP* und gefolgt von einem starken Anstieg der Genexpression von *OC* und bis zur maximalen Expression von *OC*, Osteopontin und Knochensialopontin während der Mineralisationsphase. Wurde dieses Zellmodel zunächst nur an weiteren tierischen Zellen nachgewiesen, konnte Siggelkow et al. (1999, 2004) den prinzipiellen Ablauf vom Owen-Modell an primäre hOB reproduzieren. Für Abweichungen, wie z.B., dass durch eine verzögerte Matrixmaturation eine Mineralisation nicht erreicht wurde, wurden Einflüsse durch die Art der Kultivierung oder Speziesunterschiede vermutet. Trotzdem gilt dieses hOB-System als geeignetes humanes Modell für Untersuchungen von Differenzierungsmechanismen.

Nach Behandlung der pMSC im basalen Kulturmedium mit den beiden BSP PAM und ZOL, kam es, wie im hOB-Modell von Viereck et al. (2002b), zu einer dosis- und zeitabhängigen Hochregulation des mRNA-Level von *OPG*. Dazu wurde, den Versuchen von Viereck et al. (2002b) angelehnt, auch in dieser Arbeit zunächst die jeweils optimale Dosis zur Stimulation von OPG gesucht. Die optimale Konzentration entsprach denen der hOB-Zellen: PAM 10^{-6} und ZOL 10^{-8}. Der aus der Pharmakologie bekannten anti-resorptiven Potenz

folgend wurde der stärkste Effekt auf die jeweilige mRNA-Expression mit ZOL erreicht. Hier konnte unter basalen Bedingungen nicht nur ein steigender sondern auch beschleunigender Effekt für *OPG*-, *COL-I*- und *AP*- mRNA-Expression beobachtet werden.

Im hOB-Zellmodell von Viereck et al. konnte RANKL als Gegenspieler von OPG nicht konsistent nachgewiesen werden, was am ehesten auf die fortgeschrittene Osteoblastendifferenzierung zurückgeführt wurde. Diesen Zusammenhang konnte Gori et al. (2002) an einem osteoblastären Zellmodell mit immortalisierten Knochenstromazellen zeigen, bei denen mit zunehmender Zelldifferenzierung die Expression von *RANKL* abnahm. Die Senkung des osteoblastären RANKL/OPG-Quotienten wurde daher auf die Steigerung der OPG-Produktion zurückgeführt. Das Verhältnis von RANKL zu OPG bestimmt und beeinflusst zudem Differenzierung und Aktivierung von Osteoblasten (Hofbauer und Heufelder 2001). D.h. ein primäre Effekt der BSP in differenzierten Osteoblasten auf den RANKL/OPG-Quotienten erfolgt über die Steigerung der OPG-Produktion.

Zusammen mit der Beobachtung zu den Markern COL-I, AP und OC wurde in Anlehnung an das System nach Owen OPG als möglicher zusätzlicher Marker einer osteoblastären Differenzierung gewertet.

In dieser Arbeit konnte durch Behandlung der pMSC-Zellkulturen mit den BSP PAM und ZOL eine Steigerung der *OPG*-mRNA-Expression ähnlich der von hOB-Zellen gemessen werden. Aussagen zur tatsächlichen Proteinsekretion von OPG oder dem Verhalten von RANKL in pMSC können dadurch nicht getroffen werden.

Unter osteogenen Induktionsbedingungen wurde die *OPG*-mRNA-Expression runterreguliert. Dies korreliert mit Ergebnissen immunhistochemischer Färbungen von bMSC unter osteogener Stimulation, die für OPG negativ waren (Pautke 2004).

Eine entscheidende Rolle spielte dabei das Dexamethason. Bei *in-vitro*-Versuchen simuliert ein Dexamethasonzusatz die hormonellen Einflüssen von Glucokortikoiden *in-vivo*, denen OPG bekanntermaßen unterworfen ist

(Hofmann et al. 2000). Die Zugabe des BSP ZOL 10^{-8}M ließ die *OPG*-mRNA-Expression wieder ansteigen und bestätigt auch in pMSC, dass ein BSP die inhibierende Wirkung von Dexamethason aufhebt (Viereck et al. 2002b).

Die Zeitkinetiken unter basalen Untersuchungsdingungen mit BSP-Zusatz für *COL-I* und *AP*-mRNA-Expression über 72h lassen das bekannte Muster der sequentiellen osteoblastären Differenzierung wieder erkennen. D.h. COL-I erreicht als Marker für die Proliferationsphase sein Maximum vor AP, welches wiederum mit seinem Maximum die Matrixmaturation charakterisiert. Eine mRNA-Expression von *OC* als Marker der Mineralisation war in diesem Zeitintervall nicht messbar und auch nicht zu erwarten.

Im Unterschied dazu wurde in den pMSC- Langzeitkulturen über 28 Tage in dieser Arbeit während der osteogenen Induktion ein nahezu paralleler mRNA-Expression-Verlauf von *COL-I* und *AP* beobachtet. Beide Gene erreichen ihr jeweiliges Expressionsmaximum bereits zwischen dem zweiten und siebten Tag. V.a. das mRNA-Expressionsmuster im zeitlichen Verlauf von *AP* unterscheidet sich im pMSC-Zellmodell zum bekannten Muster von Rattenkalavarienzellen und auch hOB-Zellen. Nach den beiden letztgenannten Zellmodellen gilt AP als Marker der Matrixmaturation und erreicht sein Maximum, wenn *COL-I* bereits wieder fällt.

Ein signifikanter Anstieg der *AP*-mRNA-Expression ist dann als Zeichen vorschreitender osteoblastäre Differenzierung zu werten. AP katalysiert offensichtlich den Prozess der Matrixkalzifizierung Robey und Termine (1985) und wurde schon 1986 von Farley und Baylink als Marker der Knochenneubildung beschrieben wurde. Die Gleichsetzung des Nachweises von AP mit osteogenem Potential wurde mit Arbeiten von Pittenger et al. (1999). Halvorsen et al. (2001) und Kuznetsov et al. (2001) etabliert.

Ein Einfluss der Zelldicht auf die AP-Enzymaktivität ist bekannt, korreliert jedoch nicht mit der Expression des Proteins (Goldstein 2001). Für die mRNA-Expression von AP wurde aber ein direkter Einfluss der Zelldichte (Siggelkow et

al. 1998b; Frank et al. 2002) ausgeschlossen. Andere Arbeiten zeigten für den AP-Nachweis eine starke Abhängikeit von der Stimulation mit ß-Glycerolphosphat, Ascorbinsäure und Dexamethason, dass eine Aktivitätssteigerung des Proteins hervorrufen kann (Lecanda et al. 1997; Siggelkow et al. 1999). Als besonderer Induktor für die verstärkte *AP*-mRNA-Expression gilt das Dexamethason (Beloti und Rosa 2005). Der für die *AP*-Expression ebenfalls bekannte positive Effekt durch VitD3 war in den verwendeten pMSC weniger effektiv als erwartet. Ein geeignetes Mikromilieu, z.B. mit anderen Zelltypen (Rickard et al. 1995; Kasperk et al. 1997; Aubin und Bonnelye 2000; Gerstenfeld et al. 2002) sowie eine bestimmte extrazelluläre Matrix (Mizuno et al. 1997) scheinen ebenso Voraussetzung und Einflussfaktoren für eine *AP*-mRNA-Expression *in vitro* zu sein. Hinweise auf Patienten/Spender und damit auf spezifische Zellkultur abhängige Unterschiede, werden durch Vergleichsarbeiten mit humanen Osteosarkomzellen (HOS) und hOB-Zellen gestützt, die für hOB-Zellkulturen spenderabhängige Unterschiede für AP aufzeigten (Siggelkow 1998a).

Unabhängig vom Zeitpunkt der maximalen *AP*-mRNA-Expression im Zellmodell dieser Arbeit und möglichen Einfußfaktoren dafür, konnte zwar eine <u>*OC*-mRNA Expression</u> in keinem Versuch konsequent detektiert werden, aber in den Langzeitbehandlungen im Rahmen der osteogenen Induktionen waren geringe Mengen in einzelnen Proben nachweisbar. Damit findet sich wieder eine Annäherung an das Owen-Modell, wonach die *OC*-mRNA Expression bzw -Sekretion mit dem Abfall von AP-mRNA-Expression assoziiert ist.

OC gilt zusammen mit dem Transkriptionsfaktor cbfa1 als hochspezifischer, charakteristischer Marker der osteoblastären Differenzierung (Ducy et al. 1996). OC ist dabei ein später Marker innerhalb der osteoblastären Differenzierungskaskade, welcher nur von reifen Osteoblasten und Osteozyten exprimiert wird (Kasai et al. 1994; Gronthos et al. 1999). Extrazellulär kann OC erst mit Beginn der Mineralisation nachgewiesen werden, unmineralisiertes Osteoid ist dagegen negativ für OC (Bronckers et al. 1985). Die Expression dieses Markers scheint zum einen von einer Stimulation mit Vitaminen, wie $VitD_3$ (Beresford et al. 1984) und Vitamin K (Koshihara und Hoshi 1997), zum

anderen aber auch von der Zelldichte abhängig zu sein. So konnten Siggelkow et al. 1999 mittels Northern Blot Analyse zeigen, dass die Expression von OC in Abhängigkeit von der Zelldichte hoch reguliert wird. Diese Ergebnisse konnten mittels Immunzytochemie auf Proteinebene bestätigt werden. hOB zeigten lediglich in Zellkonfluenz positive Färbungen für OC, während sie in Subkonfluenz innerhalb der Proliferationsphase negativ sind. Unter osteogener Induktion konnte in hMSC ein OC-Nachweis besonders in den Bereichen erbracht werden, in denen die Zellen zu mehrschichtigen Zellhaufen gruppiert waren. Diese Beobachtungen lassen auch den Rückschluss zu, dass die OC-Expression besonders auch von interzellulärer Kommunikation beeinflusst wird und eine Reifung bzw. Differenzierung von hOB anzeigt. OC stellt somit einen sehr spezifischen immunzytochemischen Marker der späten Phase der osteoblastären Kaskade dar, der eine Unterscheidung von hMSC und hOB, darüber hinaus aber auch von proliferierenden und differenzierten hOB erlaubt.

Zusammenfassend lässt sich für die Beurteilung der osteoblastären Differenzierung im pMSC-Zellmodell dieser Arbeit eine Annährung an die sequentielle Differenzierungskaskade nach Owen et al. (1990) annehmen. Durch Behandlung mit den BSP konnten wie an hOB Zellen ein steigender Effekt auf die mRNA-Expression von *OPG*, *COL-I* und *AP* erzielt werden.

Aus den Ergebnissen zum mRNA-Expressionsverhalten unter den Kultivierungs- und Behandlungsbedingungen und der anschließenden Versuche der Interpretation und Diskussion mit Hinweisen und Vergleichen aus der Literatur, ergeben sich immer wieder Fragen zu möglichen Eigenarten und Besonderheiten der Zellen bzw. Zellpopulation aus pMSC an sich.

4.2 Eigenarten mesenchymaler Stammzellen der Plazenta

Zur Gewinnung der pMSC aus Chorionzotten wurden Plazenten aus natürlichen Spontangeburten wie via Kaiserschnitten beiderlei Geschlechts verwendet, nach Schwangerschaften ohne offensichtliche Risiken. Präpariert wurden diese

innerhalb von 6h, wobei die Plazenten bis dahin gekühlt wurden. Die Isolation und Kultivierung erfolgte nach dem Protokoll nach Wulf et al. (2004).

Bei der Isolation und Kultivierung der verwendeten Zellen war festzustellen, dass bezüglich der zu generierenden Zellzahl und des initialen Wachstumsverhaltens in Kultur zwischen den Plazenten, mitunter deutliche Schwankungen (interindividuelle Variabilität) zu beobachten waren. Des Weiteren spielten Pilzkontaminationen eine Rolle, bei sonst standarisiertem Isolations- und Kultivierungsprotokoll. So wurden 40 Plazenten bearbeitet, wobei aus nur 14 Plazenten die ausreichende Zellmenge gewonnen werden konnte, um vergleichbare Versuchsreihen in der dritten Passage durchführen zu können.

Könnte es eine plazentaspezifische Variabilität geben?

Für MSC aus dem Knochenmark sind spenderabhängige Unterschiede hinsichtlich der Qualität und Quantität der generierbaren Zellen bekannt und untersucht. Insbesondere Abhängigkeiten vom Alter des Spenders und der Entnahmetechnik wurden dabei herausgefunden. So wäre es durchaus vorstellbar, dass z.B. der Zustand der Plazenta einen Einfluß auf die Qualität und Quantität der Generierbarkeit von MSC haben könnte. Die Zellen der Plazenten sind während einer normalen Geburt anderen Stressfaktoren ausgesetzt als bei einem Kaiserschnitt. Beide wurden in dieser Studie gleichermaßen und zufällig verwendet. Das beinhaltet Unterschiede in den direkten Deformationen sowie in den Verletzungen durch äußere Manipulation unter der Geburt gegenüber iatrogenen Einwirkungen während eines Kaiserschnittes. Damit kommt es zu Schwankungen z.B. in der Sauerstoffversorgung und daraus möglichen resultierenden Zellabbauprodukten und -schädigungen. Der Umgang mit Plazenten im Kreißsaal, unterschiedliche Lagerungszeiten, ungleichmäßige Kühlung, bedingt durch unterschiedliche Größen und Gewicht, bis zur Weiterbearbeitung, könnten ebenfalls Faktoren sein, die die Zellqualität und/oder Zellquantität, aber auch die Kontaminationsrisiken mit beeinflussen. Indirekte und nicht ausgeschlossene Langzeiteinflüsse wie z.B. Nicotinabusus der Mutter während der

Schwangerschaft könnten theoretisch ebenso Auswirkungen auf die Plazentaentwicklung und damit der MSC haben. Nähere Untersuchungen in der Literatur und eigene Datendokumentationen geben dazu leider der Zeit noch keine wegweisenden Ergebnisse.

Eine weitere Beobachtung betrifft das Expressionsverhalten der verwendeten Zellen in der Langzeitkultivierung über 21 Tage unter osteogenen Differenzierungsbedingungen. Unabhängig vom Zusatz eines BSP, wurde ein Maximum der jeweiligen mRNA-Expression (*OPG*, *COL-I*, *AP*) zwischen 24h und 72h erreicht. Es folgte im Anschluss ein steiler Abfall bis nahe der Nachweisgrenze. Ein Erklärungsansatz bezieht sich auf bekannte Kenntnisse, wonach die osteogene Differenzierungskaskade keine einfache Abfolge verschiedener Reifungsstufen ist, sondern vielmehr ein komplexes Zusammenspiel von Differenzierung und Dedifferenzierung mit z. T. Übergängen zu anderen Zelllinien (Aubin et al. 1995; Bruder et al. 1997; Aubin 1998; Pereira et al. 2001). D. h. auch, dass die Zellpopulation innerhalb einer Differenzierungsreihe aus unterschiedlichen Reifungszuständen besteht. Andere Autoren gehen in diesem Zusammenhang sogar davon aus, dass hMSC, sobald sie auf einer Oberfläche adhärieren, bereits keine Stammzellen sondern schon Vorläuferzellen sind (Zohar et al. 1997). Danach wären schon in den in dieser Arbeit verwendeten basalen Zellkulturen heterogene Zellpopulationen denkbar.

Die von uns angewendete Methode, die RT-PCR, beinhaltet eine Homogenisierung der Zellpopulation und betrachtet diese damit als Ganzes. Die Identifikation einer einzelnen Zelle, die die zu untersuchende mRNA exprimiert oder Rückschlüsse auf die tatsächliche Menge der entsprechenden Proteinsekretion gibt, können mit dieser Methode nicht ermittelt werden.

Andere Methoden, die Zellen auf Einzelniveau zu charakterisieren, sind die Morphometrie und hier insbesondere immunhistochemische Färbetechniken, mit denen Zellen in heterogenen Gemischen identifiziert werden können.

Vergleiche mit Daten und Ergebnissen zum zellspezifischen Expressionsverhalten der Sekretion von Proteinen aus der Literatur sind schwierig und erscheinen z. T. unmöglich.

Eine spezifische biomolekulare bzw. immunhistochemische Phänotypisierung von hMSC im Allgemeinen, unabhängig vom Ursprungsgewebe, ist bisher nicht vollständig gelungen. U. a. aufgrund der oben schon angedeuteten intrinsischen Komplexität der MSC-Modelle und der substantiellen Heterogenität dieser Zelltyppopulationen, MSC, multipotente Zellen, Vorläuferzellen, etc. (Phinney 2007). D.h., nach wie vor werden MSC durch An- oder Abwesenheit von Kombinationen verschiedener Oberflächenmarker charakterisiert.

Die Vielzahl der erforschten Kombinationen und verwendeten Marker erleichtert Literatur- und damit Zellvergleiche nicht. Z. B. vergleicht Brooke et al. (2008) bMSC und pMSC hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker, die in dieser Arbeit äquivalent sind in der Intensität für CD29, CD44 und CD166, wobei pMSC CD49b höher exprimieren und CD54 schwächer im Vergleich zur bMSC. In einem *Letter to Editor* von Mariotti et al. (2008) zum Vergleich von bMSC und pMSC an Oberflächenmarkern werden andere Studien angeführt, in denen bMSC für CD56 sowohl auf mRNA-Ebene als auch mittels Durchflusszytometrie nicht nachgewiesen werden können oder pMSC negativ sind für CD24.

Aus dieser Problematik heraus hat die Arbeitsgruppe um Dominic 2006 minimal Kriterien zusammengestellt, die MSC erfüllen sollten, diese sind:

- Oberflächenadhärenz
- Kapazität zur klonalen Proliferation (*fibroblast colony-formiing units*)
- Multilinäres Differenzierungspotential (adipogen, chondrogen, osteogen, myogen)
- Expression spezifischer Oberflächenmarker

Tab. 4.1: Expression spezifischer Oberflächenmarker in der 2-4 Passage für MSC (nach Parolini 2008)

Positiv >95%	**Negativ >95%**
CD 90	CD 45
CD 75	CD 34
CD 150	CD 14
	HLAS-DR

Im Rahmen des „Ersten Internationalen Workshops für Stammzellen aus der Plazenta“ (2006) wurden die Kriterien für pMSC erweitert um den Zusatz des fetalen Ursprunges. Denn neben unterschiedlichen Kultivierung- und Stimulationsstrategien, die ebenfalls eine Vergleichbarkeit von Studien erschweren, kommt für pMSC hinzu, dass in verschiedenen Arbeiten bei der Zellisolation unterschiedliche Anteile der Plazenta als Quelle dienten.

Unterschieden werden fetale und maternale Plazentaanteile. Zu den fetalen gehören Amnionepithel, Amnionmesenchym, Chorionmesenchym und Chorionthrophoblasten (Abb. 4.1). Zu den maternalen Anteilen werden die Deciduae gezählt. Verschiedene Gruppen verwendeten unterschiedliche Präparations- und Isolationsmethoden, um aus einzelnen Anteilen oder Kombinationen MSC zu isolieren. Allen ist gemein, dass die aus ihnen gewonnenen MSC den minimal Kriterien nach Dominic et al. (2006) entsprechen. Zhao et al. (2005) konnte hingegen eine Kardiomyozyten-Differenzierung nur aus MSC aus Amnionmesenchym, nicht aber aus Amnionepithel erreichen.

In zahlreichen Studien wurden Zellkulturen verwendet, wie auch in dieser Arbeit, mit MSC aus den fetalen Chorionzotten (Fukuchi et al. 2004; Igura et al. 2004; Wulf et al. 2004; Yen et al. 2005; Zhang X et al. 2006, Soncini et al. 2007). Die Kontamination bzw. der zunehmende Überschuss bis zur Homogenisierung von maternalen Zellen in den Populationen ist in der Literatur unterschiedlich ausgeprägt beschrieben. In der Arbeit von Wulf et al. (2004)

sind nach dem Isolationsprotokoll, welches auch dieser Arbeit zugrunde liegt, ab der dritten Passage ausschließlich maternale MSC in Kultur nachweisbar. Eine Antwort auf die Frage, woher die maternalen Zellen im fetalen Gewebe kommen ist noch nicht eindeutig geklärt.

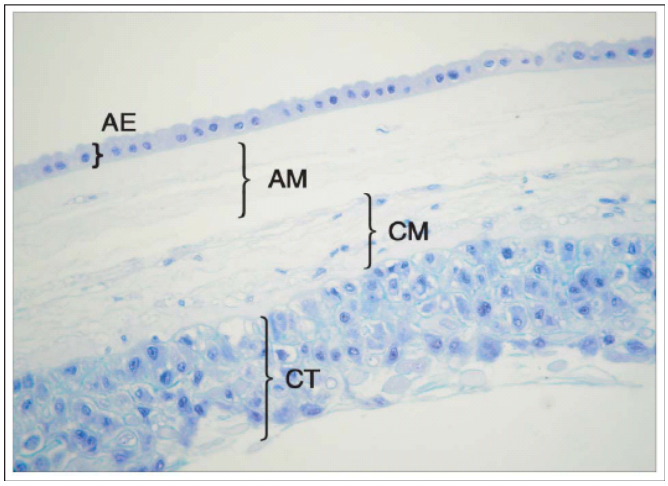


Abb. 4.1: Morphologie der Chorionplatte einer reifen humanen Plazenta (Giemsa Färbung)
AE = *amniotic epithelium*,
AM = *amniotic mesenchymal*,
CM = *chorionic mesenchymal*,
CT = *chorionic trophoblastic*
(Parolini und Soncini 2006)

Zwar sind bisherige Unterschiede maternaler und fetaler Zellen der Plazenta im Hinblick auf ihre charakterisierenden Oberflächenmarker, ihrem Wachstumsverhalten oder ihrem spezifischen Expressionsmuster nicht beschrieben, aber auch nicht eindeutig widerlegt. Insbesondere nicht, was das osteogene Differenzierungsverhalten in geeigneten Kulturbedingungen betrifft.

Daher ist wohl das Kriterium des fetalen Ursprungs bisher nur als eine Hilfe zur besseren Vergleichbarkeit und Standardisierung von Isolations- und Kultivierungsstrategien zu bewerten. Was dagegen relevante Unterschiede in Bezug auf z. B. immunologische Eigenschaften bei potentiellen therapeutischen Verwendungsansätzen, wie z.B. Zellbanken zur Gewebegewinnung/-regeneration aus pMSC betrifft, stehen noch Studien aus.

4.3 Fazit

Nach der Behandlung von pMSC, gewonnen aus dem Choriongewebe reifer menschlicher Plazenten, mit den BSP PAM und ZOL konnten Effekte auf die mRNA-Expression von *OPG* und den klassischen osteoblastären Differenzierungsmarkern *COL-I* und *AP* mittels PCR nachgwiesen werden. *OC*

war zwar als später Marker der osteoblastären Differenzierungskaskade nicht konsistent detektierbar und damit statistisch nicht verwertbar, konnte aber in einzelnen Langzeitzellkulturen nachgewiesen werden. Behandelt wurden die pMSC mit BSP unter basalen Kulturbedingungen, in Kombination mit $VitD_3$ und als Zugabe zum osteogenen Differenzierungsassay. Auch wenn z. T. nur schwache Expressionsveränderungen gemessen wurden, so lässt sich doch bei allen gemessenen Markern eine Tendenz der mRNA-Expressions-Steigerung nach einer Behandlung mit BSP erkennen. Nach vergleichbaren Daten der Literatur wurde die Steigerung der *OPG*-mRNA-Expression mit gleichzeitiger Stimulierung der mRNA-Expression von *COL-I* und *AP* in Anlehnung an das Differenzierungsmodell nach Owen et al. 1990 als Hinweise auf eine gesteigerte osteoblastäre Differenzierung gewertet. Mit den Vorliegenden PCR-Daten aus dieser Arbeit kann jedoch keine Aussage über die tatsächliche Sekretion der Proteine in den Zellen oder systemische Effekte auf das Zusammenspiel vom OPG/RANKL/RANK in pMSC-Zellpopulationen getroffen werden kann.

Nach der aktuellen Literatur sind Vergleiche, Interpretationen und Bewertungen von Ergebnissen mit bMSC- und pMSC-Zellkulturen noch schwierig. PMSC und bMSC erfüllen gleichsam die Kriterien für MSC Oberflächenadhärenz, Kapazität zur klonalen Proliferation (*fibroblast colony-forming units*) und multilinäres Differenzierungspotential (adipogen, chondrogen, osteogen, myogen). Auch phänotypisch zeigen sie große Ähnlichkeiten. Nach wie vor fehlen spezifische Oberflächenmarker für MSC an sich und für MSC unterschiedlicher Quellen, sowohl unterschiedlicher Gewebe wie auch ggf. Gewebeanteile z.B. bei der Plazenta, machen eine eindeutige Identifikation und Unterscheidung derzeit nicht möglich. Bereits detektierte Unterschiede bei der Expression einiger Oberflächenmarker lassen anderseits noch keine Rückschlüsse auf Unterschiede in molekularen Zellmechanismen zu. Eigene Beobachtungen und die anderer Arbeiten zu Unterschieden im Expressionsverhalten einiger Marker und Erkenntnisse zur osteogenen Differenzierungskaskade geben zu dem Hinweise, dass es sich in den klassischen Zellmodellen um Mischpopulationen von Zellen unterschiedlicher Reifungszustände handeln könnte.

Im Expansionsverhalten *in vitro*, in der Regenerierbarkeit und Verfügbarkeit sind pMSC den bMSC deutlich überlegen. In Bezug auf das Zellmodell zur Untersuchung der osteogenen Differenzierbarkeit und Beeinflussbarkeit durch synthetische Substanzen/Therapeutika bieten Zellkulturen mit pMSC eine nutzbare Alternative zu denen mit bMSC.

Um die multipotente Ressource von MSC, vor allem der Plazenta, in therapeutisch relevante Konzepte einbringen zu können, steht eine Vielzahl von weiterführenden Untersuchungen noch aus. Dafür sind Bestrebungen nach Standardisierungen nicht nur in der Zellisolation und Kultivierung, sondern auch in der Stimulation in Differenzierungskaskaden und deren Marker ebenso notwendig, wie die weitere Erforschung molekularer Mechanismen in den Stammzellen und deren Nachfolgern.

5 Zusammenfassung

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) sind u. a. Ausgangspunkt für die Differenzierung zu Osteoblasten. *In vitro* sind sie eine wichtige Basis für die Grundlagenforschung der osteoblastären Differenzierungskaskade, deren Beeinflussung bzw. Beeinflussbarkeit durch verschiedene physiologische und pharmakologische Faktoren nach wie vor intensiv untersucht wird. Daneben bieten sie Ansatzpunkte für die Weiterentwicklung von Gewebeersatzverfahren im Rahmen der regenerativen Medizin (*Tissue Engineering*). Als alternative Ressource zum Knochenmark für die Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen (bMSC) wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen die menschliche Plazenta beschrieben. Die isolierten und charakterisierten Zellpopulationen sind funktionell und phänotypisch denen des Knochenmarks ähnlich (pMSC). In dieser Arbeit wurden pMSC isoliert, kultiviert und für die Untersuchungen verwendet. Sie reagierten unter basalen Kulturbedingungen nach Behandlung mit den Bisphosphonaten (BSP) Pamidronat (PAM) und Zoledronat (ZOL) mit einer dosis- und zeitabhängigen Hochregulierung der mRNA-Expression von *OPG* und den klassischen osteoblastären Markern *COL-I* und *AP*. Die Kombination von Vitamin D_3 ($VitD_3$) und ZOL, wie sie auch in der osteoporotischen Therapie eingesetzt wird, zeigte bei einer Dosis von ZOL 10^{-8}M keine zusätzliche Steigerung der zu detektierenden mRNA-Expressionen. Durch die Zugabe von ZOL konnte unter Kulturbedingungen der osteogenen Induktion eine Steigerung der *OPG*-mRNA-Expression sowie der klassischen osteoblastären Marker *COL-I* und *AP* erreicht werden. Dies könnte daraufhin hinweise, dass BSP auch einen stimulierenden Effekt auf die Differenzierung von pMSC in Richtung der osteoblastären Reihe haben könnten. In der Literatur sind ähnliche Effekte an humanen Osteoblasten (hOB) beschrieben worden, für hMSC liegen vergleichbare Studien derzeit allerdings noch nicht vor. Um die multipontente Ressource von MSC, vor allem der Plazenta, in therapeutisch relevante Konzepte einbringen zu können, steht eine Vielzahl von weiterführenden Untersuchungen aus. Dafür sind Bestrebungen nach Standardisierungen nicht nur in der Zellisolation und Kultivierung, sondern auch

in der Stimulation in Differenzierungskaskaden ebenso notwendig, wie die weitere Erforschung molekularer Mechanismen.

6 Literaturverzeichnis

Anselme K (2000): Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials 21, 667-681

Aubin JE (1998): Bone stem cells. J Cell Biochem Suppl 30-31, 73-82

Aubin JE, Bonnelye E (2000): Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. Osteoporosis Int 11, 905-913

Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK (1995): Osteoblast and chondroblast differentiation. Bone 17, 77-83

Bahamonde EM, Lyons KM (2001): BMP3: To be or not to be a BMP. J Bone Joint Surg 83, 1-62

Bailo M, Soncini M, Vertua E, Signoroni PB, Sanzone S, Lombardi G, Arienti D, Calamani F, Zatti D, Paul P, Albertini A, Zorzi F, Cavagnini A, Candotti F, Wengler GS, Parolini O. (2004): Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. Transplantation 78, 1439–48

Barry FP, Murphy JM (2004): Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol 36, 568-584

Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S (1993): Growth factors to stimulate bone formation. J Bone Miner Res 8 Suppl 2, 565-72

Beck GR, Zerler B, Moran E (2000): Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. Proc Natl Acad Sci USA 97, 8352 – 8357

Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME (1986): Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif Tissue Int 38, 143-154

Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE (1990): Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. Dev Biol 140(1), 132 – 138

Beresford JN, Gallagher JA, Poser JW, Russell RG (1984): Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)2D3, 24,25(OH)2D3, parathyroid hormone, and glucocorticoids. Metab Bone Dis Relat Res 5, 229-234

Beresford JN, Graves SE, Smoothy CA (1993): Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation? Am J Med Genet 45, 163 -178

Bhargava U, Bar-Lev M, Bellows CG, Aubin JE (1988): Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvaria cells. Bone 9, 155-163

Bianco P, Robey PG (2001): Stem cells in tissue engineering. Nature 414, 118-121

Bieback K, Kern S, Kluter H, et al. (2004): Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cells 22, 625–34

Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE (1997): Distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitor, TIMP-1, in developing human osteophytic bone. J Anat 191, 39-48

Boskey AL (1998): Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. J Cell Biochem Suppl 30-31, 83-91

Bronckers AL, Gay S, Dimuzio MT, Butler WT (1985): Immunolocalization of gamma-carboxyglutamic acid containing proteins in developing rat bones. Coll Relat Res 5, 273-281

Brooke G, Tong H, Levesque JP, an Aktinson K (2008): Molekular trafficking mechanisms of multipontent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. Stem Cells Dev 17, 929

Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, and Haynesworth SE (1997): Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. Bone 21, 225-235

Caplan AI (1991): Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 9, 641-650

Caplan AI (1994): The mesengenic process. Clin Plast Surg 21, 429-435

Castellucci M, Scheper M, Scheffen I, Celona A, and Kaufmann P (1990): The development of the human placental villous tree. Anat Embryol (Berl) 181; 117

Castellucci M, Kosanke G, Verdenelli F, Huppertz B, and Kaufmann P (2000): Villous sprouting: Fundamental mechanisms of human placental development. Hum Reprod Update 6, 485

Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV (1994): Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethason. Endocrinology 134, 277-286

Chichester CO, Fernandez M, Minguell JJ (1993): Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. Cell Adhes Commun 1, 93-99

Collin P, Nefussi JR, Wetterwald A, Nicolas V, Boy-Lefevre ML, Fleisch H, Forest N (1992): Expression of collagen, osteocalcin, and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture Calcif Tissue Int 50, 175 -183

De Bari C, Dell´Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP (2001): Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum 44, 1928 – 1942

Degasne I, Basle MF, Demais V, Hure G, Lesourd M, Grolleau B, Mercier L, Chappard D (1999): Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces. Calcif Tissue Int 64, 499-507

Demir R, Kosanke G, Kohnen G, Kertschanska S, and Kaufmann P(1997): Classification of human placental stem villi: Review of structural and functional aspects. Microsc Res Tech 38, 29

Diel IJ, Solomayer EF, Costa SD, Gollan C, Goerner R, Wallwiener D, Kaufmann M and Bastert G (1998): Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. N Engl J Med 339, 357–363

DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D, et al. (1999): Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol 107, 275–281.

D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C (1999): Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. J Bone Miner Res 14, 1115–1122

Djouad F, Bony C, Haupl T (2005): Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. Arthritis Res Ther 7, 1304-1315

Dominic M, Le Blanc K, Mueller I et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotnet mesenchymal stromal cells.The international Society for cellular Therappy position statemaent. Cytotherapy 8, 315.317

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G (1996): Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. Nature 382, 448-452

Dunlop LL, Hall BK (1995): Relationship between cellular condensation, preosteoblast formation and epithelial-mesenchymal interactions in initiation of osteogenensis. Int J Dev Biol 39(2), 357-371

Farley JR, Baylink DJ (1986): Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro. Metabolism 35, 563-571

Filanti C, Dickson GR, Di Martino D, Ulivi V, Sanguineti C, Romano P, Palermo C, Manduca P (2000): The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14. J Bone Miner Res 15, 2154-2168

Fleisch H, Russel R, Bisaz S et al. (1970): The inhibitory effect pf phophonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro an d on aortic and kidney calcification in vivo. Eur J Clin Invest. 1, 12-18

Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schafer D, Bendik I, Dick W, Heberer M, Martin I (2002): Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. J Cell Biochem 85, 737-746

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hamatopoetic organs. Exp Hematol 4, 267-274

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV (1966): Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol 16, 381 – 390.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968): Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoetic tissues. Transplantation 6, 230-247

Fromigue O, Marie PJ, Lomri A (1998): Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. J Cell Biochem 68, 411-426

Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T and Tsuji K (2004): Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. Stem Cells 22, 649-658

Gerstenfeld LC, Cruceta J, Shea CM, Sampath K, Barnes GL, Einhorn TA (2002): Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. J Bone Miner Res 17, 221-230

Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M and Girasole G (1998a): Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures *in vitro* and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. Bone 22, 455–461

Giuliani N, Pedrazzoni M, Passeri G and Girasole G (1998b): Bisphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast like cells. Scand. J Rheumatol 27, 38–41

Glasel JA (1995): Validity of nucleic acid putities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. Biotechniques 18, 62-63

Goldstein AS (2001): Effect of seeding osteoprogenitor cells as dense clusters on cell growth and differentiation. Tissue Eng 7, 817-827

Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs L (2000): The Expression of Osteoprotegerin an RANK Ligand and the Support of Osteoclast Formation by Stromal-Osteoblast Lineage Cells is Developmentally Regulated. Endocrinology 141, 4768-4776

Grefchen V (2000): Can old cells learn new tricks? Science 287, 1481-1491

Gronthos S, Zannettino ACV, 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 14, 47-56

Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimble JM (2001): Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue derived stromal cells. Tissue Eng 7, 729-741

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1992): Cell-surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. Bone 13, 69–80.

Henthorn PS, Raducha M, Fedde KN, Lafferty MA, Whyte MP (1992): Different missense mutations at the tissue-non-specific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 9924-9928

Hofbauer LC, Heufelder AE (2001): Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. J Mol Med 79, 243-53

Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL (2000): The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone Miner Res 15, 2-12

Hu Y, Winn SR, Krajbich I, Hollinger JO (2003): Porous polymer scaffolds surface-modified with arginine-glycine-aspartic acid enhance bone cell attechment and differentiation in vitro. J Biomed Mater Res 64, 583 – 590.

Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takahashi TA (2004): Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. Cytotherapy 6, 543–553.

In 't Anker PS, Sicco A, Scherjon, Carin Kleijburg-van der Keur, Godelieve MJS de Groot-Swings, Frans HJ Claas, Willem E, Fibbe H (2004): Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. Stem Cells 22, 1335-1338

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

Kale S, Biermann S, Edwards C, Tarnowski C, Morris M, Long MW (2000): Three-dimensional cellular development is essential for ex vivo formation of human bone. Nat Biotechnol 18, 954-958

Kasai R, Bianco P, Robey PG, Kahn AJ (1994): Production and characterization of an antibody against the human bone GLA protein (BGP/osteocalcin) propeptide and its use in immunocytochemistry of bone cells. Bone Miner 25,167-182

Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H, Ziegler R, Baylink DJ (1995): Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. J Clin Endocrinol Metab 80, 2511-2517

Kaufmann P, Sen DK, and Schweikhart G (1979): Classification of human placental villi. I. Histology. Cell Tissue Res. 200, 409

Klein BY, Ben-Bassat H, Breuer E, Solomon V and Golomb G (1998): Structurally different bisphosphonates exert opposing effects on alkaline phosphatase and mineralization in marrow osteoprogenitors. J Cell Biochem 68, 186–194

Koshihara Y, Hoshi K (1997): Vitamin K2 enhances Osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro. J Bone Miner Res 12,431-438

Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG (2001): Circulating skeletal stem cells. J Cell Biol 153, 1133-1140

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliot R, Colombeo A, Elliot G, Scully S (1998): Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 93, 165-175

Lecanda F, Avioli LV, Cheng SL (1997): Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2. J Cell Biochem 67, 386-396

Liberman UA, Weiss SR., Broll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, Rodriguez-Portales J, Downs RW, Dequeker J and Favus M (1995): Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. N Engl J Med 333, 1437–1443

Liu P, Oyajobi BO, Russell RG, Scutt A (1999): Regulation of osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells: interaction between transforming growth factor-beta and 1,25(OH)(2) vitamin D(3) In vitro. Calcif Tissue Int 65, 173-180

Long MW (2001)**:** Osteogenesis and bone-marrow-derived-cells. Blood Cells Mol Dis 27, 677 – 690

Long MW, Ashcraft EK, Normalle D, Mann KG (1999): Age-related phenotypic alterations in populations of purified human bone precursor cells. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 54, 54-62

Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE (1994): Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. J Cell Physiol 158, 555-572

Mariotti E, Mirabelli P, Abate G, Schiatterella M, Martinelli P, Fortunato G, DiNoto R, And Vechhio L (2008): Comparative Characeteristics of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Placenta: CD 10, CD 49d, and CD56 Make a Difference. Stem Cells Dev 17, 1039–1042

McDonell MW, Simon MN, Studier FW (1977): Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J Mol Biol 110, 119-146

McKee MD, Nanci A (1996): Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. Microsc Res Tech 33, 141-164

Mizuno M, Shindo M, Kobayashi D, Tsuruga E, Amemiya A, Kuboki Y (1997): Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels in vivo. Bone 20, 101-107

Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H (1998): Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. Biochem Biophys Res Commun 247, 610-615

Mizuno M, Imai T, Fujisawa R, Tani H, Kuboki Y (2000) Bone sialoprotein (BSP) is a crucial factor for the expression of osteoblastic phenotypes of bone marrow cells cultured on type I collagen matrix. Calcif Tissue Int 66,388-396

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 51 Pt 1, 263-273

Nefussi JR, Brami G, Modrowski D, Oboeuf M, Forest N (1997): Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. J Histochem Cytochem 45, 493-503

Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T, Takahashi HE (1999): Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. J Bone Miner Res Metab 17, 171 – 177

Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS (2002): Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone derived cells. J Orthop Res 20, 1060 – 1069

Orwoll E, Ettinger M, Weiss S, Miller P, Kendler D, Graham J, Adami S, Weber K, Lorenc R, Pietschmann P, Vandormael K and Lombardi A (2000): Alendronate for the treatment of osteoporosis in men. N Engl J Med 343, 604–610

Otto WR, Rao J (2004): Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. Cell Prolif 37, 97-110

Owen ME: Lineage of osteogenic cells and their relationship to rhe stomal system. In: Bone and Mineral Research, WA Peck, ed Elsevier NY (1985), 1-25

Owen ME, Cave J, Joyner CJ (1987): Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-f. J Cell Sci 87, 731 – 738

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990): Progressive development of rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol 143, 420-430

Pautke C: Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade. Med Diss München 2004

Parolini O, and Soncini M (2006): Human Placenta: a Source of Progenitor/Stem Cells? J Repro Endok 3(2), 117-126

Parolini O, Alviano F, Bangnara GP, Bilic G, Brühing HJ et al. (2008): Concise Review: Isolation and charakterization of cells from human term placenta: Outcome of the First International Workshop on placenta derived Stem Cells. Stem Cells 26, 300-311

Pereira RM, Delany AM, Canlis E (2001): Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. Bone 28(5), 484-490

Phinney DG (2007): Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell population: clues to their therapeutic efficacy. Cell Cycle 6; 2884-2889

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284, 143-147

Plotkin LI., Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC and Bellido T (1999): Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. J Clin Invest 104, 1363–1374

Reddi AH (2000): Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. Tissue Eng 6, 351-359

Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam, M, Ingle JN and Spelsberg TC (2000): Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. Cancer Res 60, 6001– 6007

Reszka AA, Halasy-Nagy JM, Masarachia PJ and Rodan GA (1999): Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase. J Biol Chem 274, 34967–34973

Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie C. M. (2001): Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. Blood 98, 2615–2625

Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I (1995): Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. Dev Biol 161, 218-228

Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL (1996): Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. J Bone Miner Res 11, 312-324

Ringe J, Kaps C, Burmester G, Sittinger M (2002): Stem cells for regenerative medicine: advances in he engineering of tissues and organs. Naturwissenschaften 89, 338-351

Ringer J, Haupl T, Sittinger M: Functional characterization of human mesenchymal stem cells: studies on chondrogenic differentiation, chemotaxis and recruitment. In: 2nd Meeting of the European Tissue Engineering Society, Genua 2003, 784

Robey PG, Termine JD (1985): Human bone cells in vitro. Calcif Tissue Int 37, 453-460

Rogers MJ, Gordon S, Benford H L, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, and Frith JC. (2000): Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. Cancer 88 (12 Suppl.), 2961–2978

Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN (2003): Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cellsfrom umbilical cord. Stem Cells 21, 105–110

Rueger JM (1998): Bone substitution materials. Current status and prospects. Orthopaede 27, 72-79

Saag KG, Emkey R, Schnitzer TJ, Brown J P, Hawkins F, Goemaere S, Thamsborg G, Liberman UA, Delmas PD, Malice MP, Czachur M and Daifotis AG (1998): Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Intervention Study Group. N Engl J Med 339, 292–299

Sahni M, Guenther H L, Fleisch H, Collin P and Martin TJ (1993): Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. J Clin Invest 91, 2004–2011

Saiki RK (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491

Siggelkow H, Hilmes D, Rebenstorff K, Kurre W, Engel I and Hüfner M (1998a)**:** Analysis of human primary bone cells by fluorescence activated cell scanning: methodological problems and preliminary results Analysis of human primary bone cells by fluorescence activated cell scanning: methodological problems and preliminary results. Clinica Chimica Acta 272, 111-125

Siggelkow H, Benzler K, Atkinson MJ, Hüfner M (1998): The use of confluence stages does not decrease the overall variability in primary human osteoblasts but can give additional information on differentiation in vitro. Exp Clin Endocrinol Diabetes 106, 217-225

Siggelkow H, Rebenstroff K, Kurre W, Niedhart C, Engel I, Schulz H, Atkinson MJ, Hüfner M (1999): Development of the Osteoblast Phenotype in Primary

Human Osteoblasts Culture: Compairson With Rat Calvarial Cells in Osteoblast Differentation. J Cell Biochem 75, 1-14

Siggelkow H, Schmidt E, Hennies B, Hufner M (2004): Evidence of downregulation of matrix extracellular phosphoglycoprotein during terminal differentiation in human osteoblasts. Bone 35, 570-576

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T (1997): Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell 89, 309-319

Soncini M, Vertua E, Gibella L et al. (2007): Isolation an characterization of mesenchymal stem cells from human fetal membranes. Placenta 1, 296-305

Tenenbaum HC, Limeback H, McCulloch CA, Mamujee H, Sukhu B, Torontali M (1992): Osteogenic phase-specific co-regulation of collagen synthesis and mineralization by betaglycerophosphate in chick periosteal cultures. Bone 13, 129 – 138

Thomas T, Gori F, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL, Conover CA (1999): Response of bipotential human marrow stromal cells to insulin-like growth factors: effect on binding protein production, proliferation, and commitment to osteoblasts and adipocytes. Endocrinology 140, 5036-5044

Tokuda H, Kozawa O, Harada A and Uematsu T (1998): Tiludronate inhibits interleukin-6 synthesis in osteoblasts: Inhibition of phospholipase D activation in MC3T3-E1 cells. J Cell Biochem. 69, 252–259

Tsai MS, Lee JL, Chang Y, Hwang S M (2004): Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Hum Reprod 19, 1450-1456

Verses G, Gibbs RA, Scherer SE, Caskey CT (1987): The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. Science 237, 415-417

Viereck V, Gründker C, Blaschke S, Siggelkow H, Emons G, Hofbauer LC (2002a): Phytoestrogen Genistein Stimulates the Production of Oesteoprotegerin by Human Trabekular Osteoblasts. J Cell Biochem 84, 725-735

Viereck V, Emons G, Lauk V, Frosch K-H, Blaschke S, Gründker C, Hofbauer LC (2002b): Bisphosphonates Pamidronate and Zoledronic Acid Stimulate Osteoprotegerin Production by Primary Human Osteoblasts. Biochem Biophy Res Commun 291, 680-686

Vitte C, Fleischer H and Guenther HL (1996): Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclastmediated resorption. Endo 137, 2324-2333

Vogelstein B, Gillespie D (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc Natl Acad Sci USA 76, 615-619

von Garrel T, Gotzen L (1998): Allogenic bone transplantation and bone banking. Unfallchirurg 101, 713-727

Walsh S, Jefferiss C, Stewart K, Jordan GR, Screen J, Beresford JN (2000): Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1-4. Bone 27, 185-195

Wulf GG, Viereck V, Hemmerlein B, Haase D, Vehmeyer K, Pukrop T, Glass B, Emons G, Trumper L (2004): Mesengenic Progenitor Cells Derived from Human Placenta. Tissue Eng 20(7-8), 1136-47

Yen B L, Huang HI, Chien CC (2005): Isolation of multipotent cells from human term placenta. Stem Cells 23, 3-9

Yumi F, Hideaki N, Daisuke S, Imiko H, Toshio K, Kohichiro T (2004): Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. Stem Cells 22, 649-658

Zhang X, Nakaoka T, Nishishita T et al. (2003): Efficient adenoassociated virus-mediated gene expression in human placenta-derived mesenchymal cells. Microbiol Immunol 47, 109–116.

Zhang X, Mitsuru A, Igura K et al. (2006): Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. Biochem Biophys Res Commun 340, 944-952

Zhang Y, Li CD, Jiang XX, Li HL, Tang PH, Mao N (2004): Comparison of Mesenchymal Stem Cells from Human Placenta and Bone Marrow. Clin Med (Engl) 117(6), 882-887

Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T (2005): Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. Transpla 79, 528–535

Zohar R, Sodek J, and McCulloch CAG (1997): Charakterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry .Blood Journal 90, 3271-3281

Zuk, PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001): Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 7(2), 211 – 228

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die mich in dieser Arbeit unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. med. Emons als Leiter der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe im Zentrum der Frauenheilkunde des Universitätsklinikums Göttingen danke ich für die Unterstützung im Zustandekommen meiner Arbeit. Insbesondere für die Schaffung der notwendigen Rahmenbedingungen und für die Verfügbarkeit der Plazenten.

Herrn PD Dr. med. V. Viereck danke ich für die Vorgaben des Themas und Einführung in diese Arbeit.

Besonderer Dank geht an Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker als Leiter der Arbeitsgruppe Molekulare Gynäkologie, Doktorvater und Betreuer meiner Dissertation, für sein unterstützendes und motivierendes Lenken sowie seine kritischen und konstruktiven Diskussionen und Anmerkungen.

Weiterer Dank richtet sich an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, hier besonders Hiltrud Schulz und Frau Dr. rer. nat. Nicola Eicke für die Einarbeitung in das Labor, Ihre unermüdliche Geduld und Hilfestellungen in Umgang, Durchführung und Problembehebung während des experimentellen Teils.

Lebenslauf

Am 29.08.1978 wurde ich als erstes von drei Kindern der Lebensmittelchemikerin Dr. rer. nat. K. Kemper und des Facharztes für Urologie Dr. med J. Kemper in Berlin geboren.

Im Mai 1998 endete meine Schulzeit mit der allgemeinen Hochschulreife auf dem Heese-Gymnasium in Berlin-Steglitz.

Nach dreizehnmonatigem Zivildienst beim WWF-Deutschland, Naturschutzstelle-Ost (Potsdam) begann ich im WS 99/00 mit dem Studium der Humanmedizin an der Georg-August -Universität Göttingen.

Nach Physikum im April 2002, 1. Staatsexamen im September 2003, 2. Staatsexamen im März 2005 , PJ am Universitätsklinikum Göttingen in der Abteilung Unfallchirurgie und Wiederherstellungschirurgie sowie der Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie und im Department of Orthopaedics - Tribuvan University Teaching Hospital Kathmandu, Nepal erhielt ich am 17.07.2006 die Approbation zum Arzt.

Seit dem 01.09.2006 bin ich angestellt als Assistenzarzt in der II. Chirurgischen Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie und Orthopädische Chirurgie, Chefarzt Prof. Dr. med. M. Schulte des Diakoniekrankenhauses Rotenburg (Wümme) gGmbH.