

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

**Untersuchung zum Wachstums- und Differenzierungsverhalten
von humanen mesenchymalen Beckenkammzellen unter dem Einfluss des
Überstandes von Damhirschgeweihzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Marie Christine Merten
aus
Göttingen

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. Heyo K. Kroemer

Referent/in: Prof. Dr. Dr. Karl Günter Wiese

Ko-Referent/in: Prof. Dr. Nicolai Miosge

Drittreferent/in: Prof. Dr. Martin Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 14.03.2017

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Ziel und Aufgabenstellung	3
2 Material und Methode	4
2.1 Gewinnung der Zellen und Zellkultur	4
2.1.1 Damhirschgeweihzellen (DHGZ).....	4
2.1.2 Humane mesenchymale Beckenkammzellen (HBKZ).....	4
2.1.3 Kryokonservierung.....	5
2.2 Kultivierung der Zellkulturen.....	5
2.3 Versuchsabläufe	7
2.3.1 Untersuchung der Proliferation.....	8
2.3.2 Versuchsablauf des Differenzierungsversuches	10
2.3.2.1 CASY®-Messprinzip	11
2.3.2.2 Osteokalzin ELISA	11
2.3.2.3 RNA-Gewinnung, Isolation und Analyse	12
2.4 Auswertung der Ergebnisse	15
3 Ergebnisse	16
3.1 Proliferationsverhalten der DHGZ- und HBKZ-Kontrollgruppen.....	16
3.2 Einfluss des fraktionierten Überstandes der DHGZ-Kultur auf das Proliferationsverhalten der HBKZ	17
3.3 Einfluss des gepoolten Überstandes der DHGZ-Kultur auf das Proliferationsverhalten der HBKZ	19
3.3.1 Zeitabhängige Genexpression der HBKZ.....	22
3.3.2 Osteokalzinbestimmung	25

4 Diskussion	30
4.1 Methodik.....	30
4.1.1 Zellzählung	30
4.1.2 ONE Step ELISA	31
4.2 Ergebnisse.....	31
4.2.1 Ergebnisse des Proliferationsversuches.....	32
4.2.2 Ergebnisse des Differenzierungsversuches.....	33
5 Zusammenfassung.....	41
6 Anhang.....	43
7 Literaturverzeichnis	47

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Ablauf der Überstandsgewinnung für den Differenzierungs- und Proliferationsversuch	7
Abb. 2	Schematische Darstellung des Proliferationsversuches	9
Abb. 3	Relative Proliferationsraten der Kontrollgruppen der Damhirschgeweizellen (DHGZ) und der Zellen aus dem humanen Beckenkamm (HBKZ)	18
Abb. 4	Relative Proliferationsraten der Zellen aus dem humanen Beckenkamm (HBKZ) nach Übertragung der fraktionierten Überstände der Damhirsch-Zellkultur (DHGZ)	20
Abb. 5	Absolute und relative Proliferation der Zellen aus dem humanen Beckenkamm (HBKZ) im Differenzierungsversuch	21
Abb. 6	Fotographien der Gelbanden nach elektrophoretischer Auftrennung der Nukleotide	23
Abb. 7	Relative Intensitäten der Expression für die Knochenmarker Kollagen Typ 1, Osteokalzin und <i>core binding factor alpha 1</i>	24
Abb. 8	Osteokalzinkonzentration im Kulturmedium	26

Abb. 9	Relative Osteokalzinexpressionen und korrigierte Osteokalzinkonzentrationen im Medium der Zellen aus dem humanen Beckenkamm (HBKZ)	27
Abb. 10	Korrelation der relativen Genexpression und der Proteinkonzentration von Osteokalzin	28

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Primersequenzen der verwendeten Marker für die PCR	13
Tab. 2	Medien und Zusätze	43
Tab. 3	Labormaterialien und –geräte	45

Abkürzungsverzeichnis

AP	<i>antlerogenic periosteum</i>
Aqua Dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
CASY	CASY® <i>cell counting technology</i>
Cbfa1	<i>core binding factor alpha 1</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CO₂	Kohlendioxid
Col.	Kollagen
DHGZ	Damhirschgeweihzellen
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FKS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
HBKZ	humane mesenchymale Zellen aus dem Beckenkamm
H₂O	Wasser
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
mRNA	messenger RNA
MTT	MTT-Tetrazoliumsals (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide)
MHz	Megahertz
NGF	<i>nerve growth factor</i>
OCN	Osteokalzin
OSE2	<i>osteoblast-specific cis-actin element</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonucleinsäure

RNase

Ribonuklease

RT

reverse Transkriptase

TBE

Tri-Borate-EDTA

1 Einleitung

Die Geweihe der Hirsche wirken nicht nur auf den ersten Blick imposant, sondern offenbaren ihre Besonderheiten vor allem erst bei genauerer Betrachtung. Histologisch und ultrastrukturell besteht eine Ähnlichkeit zu den Röhrenknochen anderer Säugetiere. So weisen sie eine Spongiosa und eine kompakte Kortikalis auf (Goss 1983). Im Gegensatz zu Röhrenknochen, die nach abgeschlossenem Wachstum lediglich eine Reparaturfunktion besitzen, ist das Hirschgeweih in der Lage, sich jedes Jahr in einem immer wiederkehrenden Zyklus vollständig neu zu regenerieren. Dieses als epimorphe Regeneration (Goss 1983; Li et al. 2005) bezeichnete Phänomen beginnt mit dem Abwurf der Geweihstangen im Frühjahr. Unmittelbar danach schließt sich die Wachstumsphase des neuen Geweihs an, in der maximale Wachstumsgeschwindigkeiten von bis zu 20 mm pro Tag (Price und Allen 2004) erreicht werden können. Das Geweih wächst dabei ausgehend von dem Pedikel, einem ossären permanenten Höcker am Stirnbein der Hirsche. Es zeigt an den distalen Enden ein longitudinales Wachstum, welches eine besondere Form der enchondralen Ossifikation darstellt (Li und Suttie 1994; Price und Allen 2004; Price et al. 2005). Wurde früher angenommen, dass sich das Wachstum ausgehend von der Abwurfwunde über eine Dedifferenzierung der Zellen ereignet, so konnten Rolf et al. (2008) den Nachweis von Stro-1⁺-mesenchymalen Stammzellen nicht nur in den Rosenstöcken, sondern auch im Bereich des *antlerogene periost* (AP) erbringen. Das lässt darauf schließen, dass die Erneuerung des Geweihs auf einer stammzellbasierten Aktivierung beruht. Während dieser Wachstumsphase wird das Geweih fortlaufend durchblutet. Die Blutversorgung erfolgt dabei über eine das wachsende Geweih umgebende Basthaut, die zahlreiche Blutgefäße und Nerven enthält. Auch nach Abschluss des Geweihwachstums handelt es sich beim Geweih nicht, wie früher angenommen, um totes avaskuläres Gewebe, sondern, wie Rolf und Enderle (1999) mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen nachweisen konnten, weiterhin um durchblutetes und damit lebendes Gewebe. Im Spätsommer schließlich beginnen die Hirsche mit dem „Fegen“ der Geweihe und rüsten sich damit für die anstehende Paarungssaison. Hierbei wird die Basthaut abgestreift und das ausgereifte Geweih kommt zum Vorschein.

Sowohl saisonale Faktoren wie die Schwankungen im jahreszeitlichen Tagesverlauf (Rolf und Fischer 1996) als auch exogene Umwelteinflüsse wie Ernährung und endogene Androgenkonzentrationen (Goss 1968) sind an diesen Entwicklungs- und Wachstumsprozessen beteiligt. Der Verlauf der Geweihregeneration ist eng mit dem reproduktiven Zyklus und den damit verbundenen Änderungen der Androgenkonzentrationen verknüpft. Im Hinblick auf die Wirkung des Testosterons wird davon ausgegangen, dass das initiale

Geweihwachstum mit einer niedrigen Testosteronkonzentration im Blutplasma korreliert (Bubenik et al. 1975; Suttie et al. 1984; Muir et al. 1988). Erst im Laufe des Regenerationsprozesses kommt es zu einem Anstieg der Androgenkonzentration und des *insulin-like growth factors 1* (IGF-1), was den Stopp des Längenwachstums und eine verstärkte Mineralisierung des Geweihs bewirkt. Das Abwerfen des Geweihs im Frühjahr erfolgt dann nach einem erneuten Absinken des Testosteronspiegels unter einen bestimmten Schwellenwert. Danach beginnt der Zyklus von neuem. Dem gegenüber stehen jedoch Untersuchungen, die zeigen, dass auch bei kastrierten Hirschen initial ein starkes Geweihwachstum stattfindet und damit Testosteron nicht als alleiniger Stimulationsfaktor für die Entwicklung und das Wachstum des Geweihs verantwortlich ist (Wislocki 1947; Kolle et al. 1993; Kierdorf et al. 1995). Dies lässt sich durch das Auftreten von sogenannten Tannenbaum-Geweihen bei kastrierten Hirschen belegen. Es liegt daher der Verdacht nahe, dass Testosteron im Zusammenwirken mit anderen Hormonen und Stimulationsfaktoren für ein koordiniertes und regelrechtes Geweihwachstum verantwortlich zu sein scheint. Aus diesem Grund wurden weitere Hormone und Regulationsmechanismen in zahlreichen *In-vitro*-Experimenten erforscht. Vor allem den Wachstumsfaktoren IGF-1 und IGF-2 wird in diesem Zusammenhang die Fähigkeit zugeschrieben, das Geweihwachstum zu stimulieren. Eine wesentliche Rolle scheinen dabei die zellulären Interaktionen in der mesenchymalen Wachstumszone an der Spitze der Geweihe (Sadighi et al. 1994; Elliott et al. 1992; Elliott et al. 1993) zu spielen. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass das *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) (Feng et al. 1997), *bone morphogenetic protein 4* (BMP-4) (Feng et al. 1995) sowie der *transforming growth factor* $\beta 1$ und der *transforming growth factor* $\beta 2$ und das Protoonkogen c-fos und c-myc (Francis und Suttie 1998) die Proliferation und Differenzierung der Hirschgeweihzellen beeinflussen. Diese zahlreichen Bemühungen, die komplexen Regulationsmechanismen zu lösen, die für die enorme Proliferations- und Differenzierungsbereitschaft der Geweihknochenzellen verantwortlich sind, sind ein wichtiges Indiz dafür, welche Bedeutung die Geweihknochenzellen für die osteologische Grundlagenforschung haben. Hätte doch eine Erweiterung der Kenntnisse über die Neubildung von Knochenstrukturen weitreichende positive Effekte für die Humanmedizin im Rahmen der Osteoporose-Therapie, des *tissue engineering* oder aber der Wiederherstellungschirurgie im Hinblick auf einen verbesserten ossären Wundheilungsverlauf. Bisher liegen nur wenige experimentelle *In-vitro*-Untersuchungen vor, die sich mit dem möglichen Einfluss der Wachstumsfaktoren der cerviden Zellen auf humane osteogene Zellen beschäftigen. In diesem Zusammenhang konnten Laky et al. (2009) nachweisen, dass ein Komplex aus verschiedenen Wachstumsfaktoren der Hirschgeweihzellen zwar die Proliferation humaner alveolärer Osteoblastenzellen konzentrationsabhängig

anregt, jedoch hierunter keine Steigerung der osteoblastären Marker Osteokalzin und alkalische Phosphatase auftrat. Während von Laky und Mitarbeitern (2009) bereits ausdifferenzierte osteogene Zellen, das heißt Osteoblasten verwendet wurden, ist im Rahmen der vorliegenden Untersuchung die Interaktion von Wachstumsfaktoren der Hirschgeweihzellen auf humane mesenchymale Stammzellen aus der Beckenkammschaukel gesunder adulter Probanden von Interesse.

1.1 Ziel und Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es daher, mit Hilfe eines Screening-Versuches im Rahmen einer *In-vitro*-Zellkulturstudie den möglichen Einfluss von Wachstumsfaktoren aus Zellkulturen des Periosts von Damhirschgeweihen (*Dama dama*) auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von humanen mesenchymalen Beckenkammzellen zu untersuchen.

2 Material und Methode

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden drei verschiedene Serien von Zellkulturen angelegt, die aus Damhirschgeweihzellen (DHGZ) und humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Beckenkamm (HBKZ) bestanden. Die DHGZ stammten vom Periost des Rosenstocks des Damhirsches (*Dama dama*). Die HBKZ wurden sowohl in einem DMEM-Medium als auch in einem Gemisch aus DMEM und dem Überstand der DHGZ-Zellkulturen inkubiert. In allen Kulturen wurden die Proliferation und die Osteoblastenmarker Osteokalzin, *core binding factor alpha 1* (Cbfa 1, synonym Runx2) und Kollagen Typ 1 bestimmt, um das Differenzierungspotenzial der HBKZ zu reifen Osteoblasten zu klären. Diese unveröffentlichten Daten lagen bereits vor und wurden zur Auswertung vom MKG-Forschungslabor zur Verfügung gestellt. Sowohl für die Versuchsreihen der Damhirschgeweihzellen (DHGZ) als auch für die Versuchsreihen der humanen mesenchymalen Beckenkammzellen (HBKZ) wurden Zellen der zweiten Passage verwendet. Die verwendeten Materialien und Zusätze sind in den Tabellen im Anhang zu finden.

2.1 Gewinnung der Zellen und Zellkultur

2.1.1 Damhirschgeweihzellen (DHGZ)

Für die Kultivierung einer Zellkultur der Damhirschgeweihzellen (DHGZ) wurde eine Geweihknochenentnahme 1 cm unterhalb der Wachstumszone der Geweihe durchgeführt. Bei den Spendertieren handelte es sich um adulte 6 bis 8 Jahre alte Damhirsche (*Dama dama*), die in Gattern gezüchtet wurden. Die Entnahme der Biopsien wurde 6 bis 7 Wochen nach Einsetzen des Geweihwachstums mit einer Knochenstanze nach dem Erlegen der Tiere durchgeführt. Die so erhaltenen Gewebematerialien wurden zerkleinert und in DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium) inkubiert. Dem DMEM wurden 10%iges fetales Kälberserum (FKS) und 2 % Gentamycin zugesetzt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Biopsien mehrfach mit DMEM gespült. Unter sterilen Bedingungen wurden dann die Fellhaare abgetrennt und das Periost isoliert. Anschließend wurde das Periost mit Hilfe eines Skalpells in 1-2 mm im Durchmesser große Stückchen zerkleinert. Die Gewebestückchen wurden in DMEM kultiviert. Das Wachstum wurde täglich unter einem Mikroskop (Zeiss HAL100) überprüft. Nachdem konfluentes Wachstum eingetreten war, wurden die Zellen passagiert und in 20 ml große Zellkulturflaschen überführt und dort weiter inkubiert.

2.1.2 Humane mesenchymale Beckenkammzellen (HBKZ)

Um die Zellkultur der humanen mesenchymalen Beckenkammzellen zu etablieren, wurden Zellen aus der Beckenkammspongiosa verwendet. Das Material stammte aus kleinen,

noch vorhandenen Resten von Spongiosatransplantationen. Das Votum der Ethikkommission und die Patienteneinwilligung liegen vor (Aktenzeichen: 604.42502/01-22.96 und Folgeantrag A2 15/10/01). Die Biopsien wurden postoperativ zunächst in 50-ml-Zentrifugenröhrchen in DMEM aufbewahrt. Nach dem Transport in das Forschungslabor fand hier eine Überführung des Zellmaterials in Petrischalen statt. Dabei wurden die Gewebeproben mehrfach mit DMEM gespült. Anschließend wurden sie zentrifugiert und in eine Zellkultur überführt. Nachdem konfluentes Wachstum erreicht wurde, wurden die Zellen passagiert. Für die Durchführung der Versuche wurden auch hier Zellen der zweiten Passage verwendet.

2.1.3 Kryokonservierung

Unter Kryokonservierung versteht man das Einfrieren von Zellen in flüssigem Stickstoff, wodurch die Vitalität der Zellen über einen sehr langen Zeitraum konserviert und damit erhalten bleiben kann. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde auf diese Weise immer ein Teil der Zellen aufbewahrt. Auch die Überstände, die im Versuchsablauf gewonnen wurden und später einer Osteokalzinmessung unterzogen wurden, wurden eingefroren. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst zusammen mit dem Einfriermedium, welches aus DMEM mit einem Zusatz von 20 % FKS bestand, in Kryoröhrchen gegeben. Darüber hinaus wurde 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugegeben, welches eine intra- und extrazelluläre Kristallisierung verhindert. Die Zellen wurden im NALGENE Cryo 1 °C *freezing container* innerhalb von 24 Stunden mit jeweils 1 °C/Minute schonend herabgekühlt und anschließend in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff bei -180 °C eingefroren.

2.2 Kultivierung der Zellkulturen

Für die Kultivierung der Versuchsreihen fand im Allgemeinen 3-mal wöchentlich ein Medienwechsel statt. Dieser zeitliche Abstand ergab sich aus den charakteristischen Wachstumsgeschwindigkeiten, aus dem Stoffwechselumsatz und der Vitalität der Zellen. Bei dem verwendeten Medium handelte es sich fortlaufend um das Standardkulturmedium DMEM. Die genaue Zusammensetzung sowie die Herstellerangaben sind in der Tabelle 3 im Anhang aufgelistet. Der Medienansatz bestand aus einer Zusammensetzung von jeweils 500 ml DMEM, 50 ml 10%igem FKS und 10 ml 2%igem Gentamycin. Das Medium wurde im Kühlschrank bei +4 °C aufbewahrt, jedoch vor Zugabe zu den Zellkulturen stets im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Der Medienwechsel erfolgte dabei immer, ohne den Zellrasen enzymatisch von der Unterlage abzutrennen. Beim Absaugen des Mediums musste darauf geachtet werden, den Zellrasen nicht zu zerstören. Das Einfüllen des fri-

schen Mediums erfolgte unter Vermeidung von Blasenbildung von der zellabgewandten Seite. Die Zellkulturen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt.

Der Medienwechsel wurde unabhängig vom Erreichen der Konfluenz des Zellrasens durchgeführt. Wurde Konfluenz erreicht, fand das Passagieren der Zellen statt. Für beide Zellkulturen war dabei der Ablauf des Passagierens gleich und begann zunächst mit dem Absaugen des Mediengemisches mit Hilfe einer sterilen Glaspipette. Anschließend wurde mit einer Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (PBS) gespült, um abgestorbene Zellbestandteile und Reste des Mediums zu entfernen. Mit Hilfe von Trypsin-EDTA wurde eine Ablösung der Zellen vom Untergrund der Petrischale herbeigeführt. Dazu wurde das Trypsin-EDTA zunächst auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Dies ist notwendig, da das proteolytische Enzym Trypsin sein Wirkungsoptimum bei 37 °C entfaltet (Schmitz 2011). Anschließend wurden pro Petrischale beziehungsweise Kulturflasche 1,2 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben. Die Einwirkzeit im Inkubator betrug dafür 10-15 Minuten. Nach der Entnahme aus dem Inkubator wurde der Ablösungsprozess der Zellen mechanisch unterstützt, indem die Behälter geschwenkt beziehungsweise mit dem Handballen gegen den Boden geklopft wurde. Unter dem Mikroskop wurde dann überprüft, ob sich alle Zellen vom Boden lösen konnten. Falls dies nicht der Fall war, wurde die Prozedur für 10 Minuten im Inkubator wiederholt. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde die enzymatische Reaktion abgestoppt, um Schädigungen der Zellen zu vermeiden (Schmitz 2011). Das Zellgemisch wurde anschließend mit DMEM mehrmals gespült, um so noch haftende Zellen von der Unterlage zu lösen. Außerdem erfolgte, falls nötig, die Vereinzelung von zusammenhängenden Zellklumpen durch eine Resuspendierung mit Hilfe einer sterilen Pipette. Abschließend wurde eine Zentrifugation (Zentrifuge SIGMA 2K15C) des Zellkonzentrats durchgeführt. Hierfür wurde dieses in Zentrifugenröhrchen der Größe 1×50 ml abgefüllt und bei 1200 Umdrehungen/Minute (1116-g) 5 Minuten lang zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde mit einer sterilen Glaspipette entfernt und das Zellpellet mit frischem DMEM aufgenommen. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass sämtliche Schritte unter strikter Einhaltung der Regeln für steriles Arbeiten durchgeführt wurden. So wurden die einzelnen Arbeitsschritte unter der Sterilbank vorgenommen. Darüber hinaus wurden sämtliche für die Versuche benötigten Behälter und Gerätschaften mit 70%igem Ethylalkohol desinfiziert. Auch wurden die verwendeten Glaspipetten gemäß einer ausreichenden Sterilisation im Heißluftsterilisator 6 Stunden bei 180 °C erhitzt. Ansonsten kam es zum Einsatz von Einmalpipetten der Größe 5 ml und 10 ml, welche nach dem Gebrauch sofort entsorgt wurden und so ein steriles und keimfreies Arbeiten ermöglichten.

2.3 Versuchsabläufe

Zunächst sollte im Rahmen des Proliferationsversuches das Proliferationsverhalten der Damhirschgeweihzellen (DHGZ) und humanen Beckenkammzellen (HBKZ) dargestellt werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob eine direkte Wirkung des Überstandes der DHGZ-Kultur auf das Proliferationsverhalten der HBKZ nachzuweisen ist und wie sich diese zeitabhängig darstellt. Dazu wurde ein fraktionierter DHGZ-Überstand in vier Versuchsserien in den Verdünnungsreihen 1:1, 1:2, 1:3 und 1:5 mit neuem DMEM auf die HBKZ-Kulturen übertragen. Zu jeder Verdünnungsreihe wurden zwischen 3 bis 6 Versuchsserien von Zellkulturen gefahren. Im zweiten Teil der Untersuchung sollte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und mit ELISA-Tests das Differenzierungsverhalten der HBKZ nach der Übertragung eines über den gesamten Versuchszeitraum des Proliferationsversuches gesammelten Überstandes der DHGZ-Kultur beschrieben werden. Hierzu wurde in dem Differenzierungsversuch die relative Genexpression der Osteoblastenmarker Osteokalzin (OCN), Kollagen Typ 1 und *core binding factor alpha 1* (Cbfa1) sowie die Proteinkonzentration von Osteokalzin im Medium bestimmt.

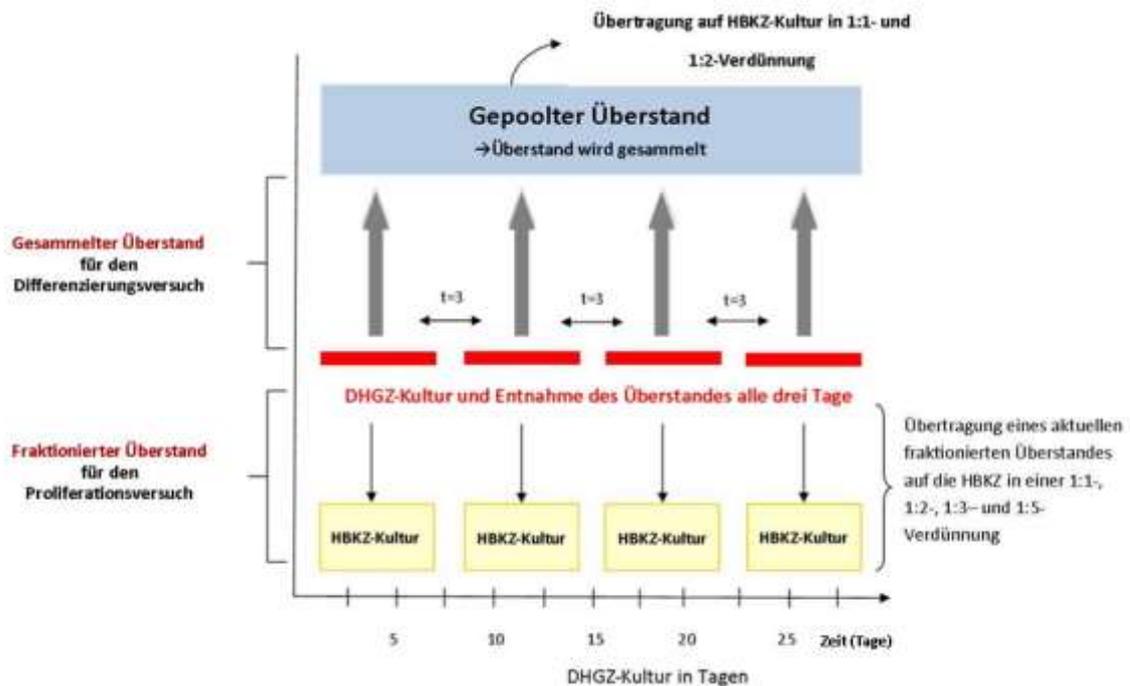


Abbildung 1: Ablauf der Überstandsgewinnung für den Proliferations- und Differenzierungsversuch. Für den Proliferationsversuch wurde ein fraktionierter Überstand der Damhirsch-Zellkultur (DHGZ) verwendet, der alle drei Tage entnommen und auf die Kultur der humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Beckenkamm (HBKZ) übertragen wurde. Für den Differenzierungsversuch wurde die HBKZ-Kultur mit einem gepoolten Überstand beimpft. Hierfür wurde der alle drei Tage entnommene Überstand über den Versuchszeitraum des Proliferationsversuches gesammelt.

2.3.1 Untersuchung der Proliferation

Der Versuch gliederte sich in zwei Versuchsserien (V1 und V2), in denen die humanen mesenchymalen Beckenkammzellen mit einem Gemisch aus DMEM und den DHGZ-Überständen in den Verdünnungen 1:1, 1:2, 1:3 und 1:5 kultiviert wurden. In der Versuchsreihe 1 liefen die Verdünnungsreihen 1:1 und 1:2. Die Versuchsreihe 2 führte die Verdünnungsreihen 1:3 und 1:5. Gleichzeitig wurde in jeder Serie eine Kontrollgruppe der DHGZ und HBKZ angesetzt. Insgesamt erstreckte sich der Versuchsablauf je Serie über einen Zeitraum von 24 Tagen. Am Starttag der Versuche wurden die Zellen der DHGZ und HBKZ in 6-Well-Platten ausgesät. In allen getesteten Gruppen betrug dabei die Ausgangszellzahl 12 250 Zellen/Well. Die DHGZ-Kultur, deren Überstand zur Übertragung genutzt wurde, wurde parallel dazu kultiviert und startete mit einer Zellzahl von 31 000 Zellen/Well. Die Zellen befanden sich jeweils in einem Milliliter Medium, wobei am Starttag bei allen Zellreihen nur DMEM als Medium verwendet wurde, da zu dem Zeitpunkt noch kein Überstand der DHGZ-Kultur vorhanden war. Des Weiteren wurde zum Startzeitpunkt jedes Versuchs parallel die Zellzahl der ausgesäten Zellen mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt. Mit Hilfe der hier gemessenen Werte konnte das Verhältnis zwischen Zellzahl und Extinktion ermittelt werden. Am 1. Messtag wurde erstmals der Überstand der DHGZ-Kultur entnommen. Dieser Tag wurde in den nachfolgend verwendeten Grafiken als Zeitpunkt t_0 der zeitabhängigen Darstellung der Proliferation beschrieben. Der Überstand wurde in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei 1200 Umdrehungen/Minute 5 Minuten lang zentrifugiert und anschließend filtriert. Dies geschah mit Hilfe eines proteingängigen Filters (20 μ m Sartorius AG Germany), durch dessen Poren die Flüssigkeit unter Druck hindurchgepresst wurde. Unter Zuhilfenahme einer sterilen 5 ml Glaspipette wurde der DHGZ-Überstand in den Verdünnungen 1:1, 1:2, 1:3 und 1:5 auf die HBKZ in die 6-Well-Platten übertragen. Das für die entsprechenden Verdünnungsverhältnisse hinzugegebene DMEM wurde vor Zugabe im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Bei einer Füllmenge von 2 ml/Well und einer Verdünnung von 1:1 ergab sich so beispielsweise die Zusammensetzung aus 1 ml frischem DMEM und 1 ml Überstand der Damhirschgeweiszellen. Auch die Kontrollgruppen der DHGZ und HBKZ wurden regelmäßig mit neuem Medium versorgt. Dafür wurden jeweils 2 ml DMEM in die einzelnen Wells einer Wellplatte eingebracht. Der Ablauf des Proliferationsversuches ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Der **MTT-Assay** wurde im Rahmen des Proliferationsversuches zur Bestimmung der Proliferation der DHGZ und HBKZ genutzt. Dieses photometrische Testverfahren wurde erstmals 1983 von Mosmann beschrieben und angewandt.

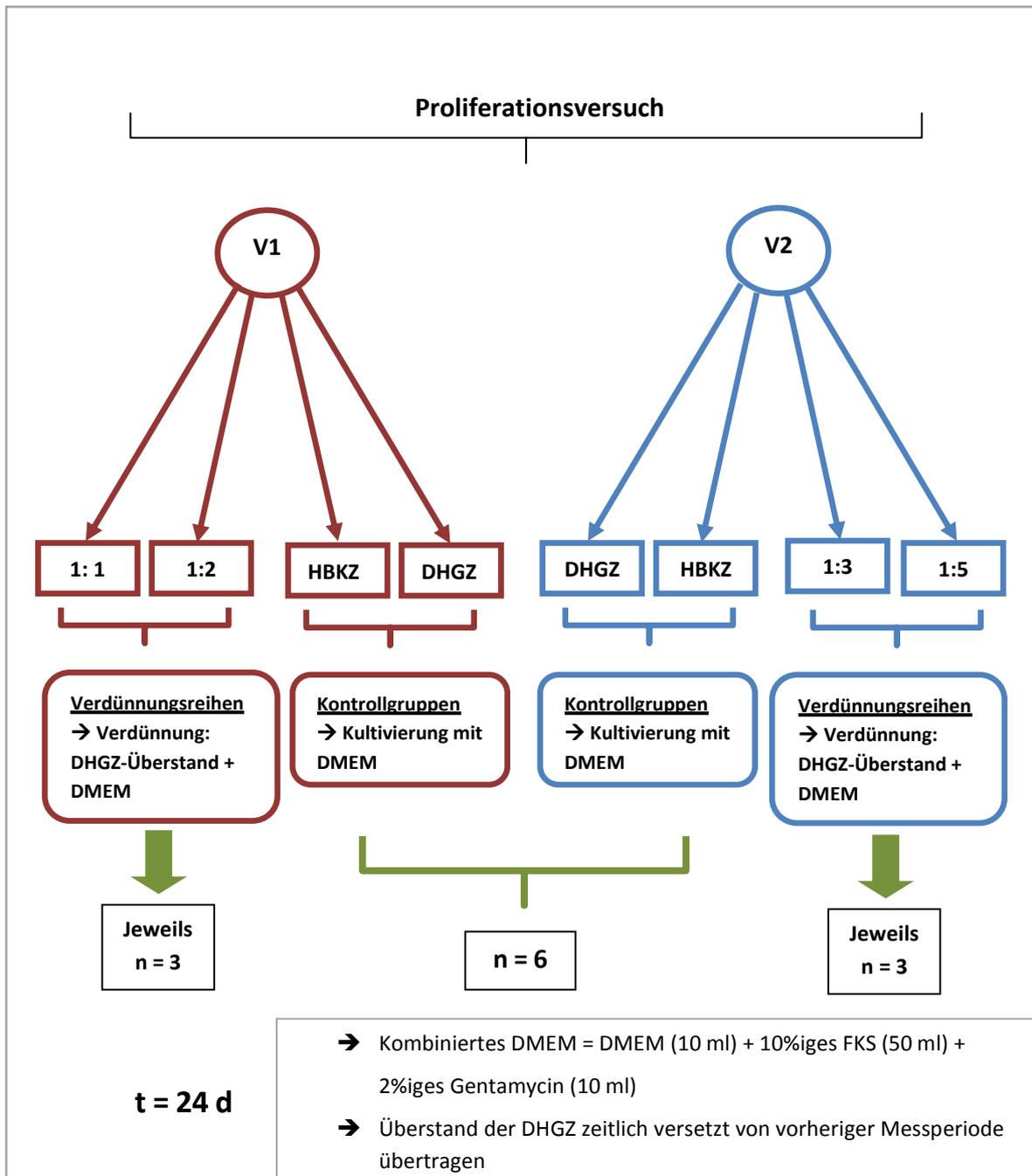


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Proliferationsversuches. Es liefen die Versuchsserie 1 (V1) mit den Verdünnungsreihen 1:1 ($n = 3$) und 1:2 ($n = 3$) sowie die Versuchsserie 2 (V2) mit den Verdünnungsreihen 1:3 ($n = 3$) und 1:5 ($n = 3$). Ferner bestand in beiden Versuchsserien eine Kontrollgruppe für die Damhirschgeweizellen (DHGZ) und die humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Beckenkamm (HBKZ). Die Kultivierung erfolgte für die Kontrollgruppen mit kombiniertem DMEM (10 ml DMEM + 50 ml 10%iges FKS + 10 ml 2%iges Gentamycin). Für die Verdünnungsreihen wurde die Kultivierung entsprechend der Verdünnung mit kombiniertem DMEM und dem Überstand der DHGZ-Kultur vorgenommen. Der Versuchszeitraum betrug 24 Tage.

Bei dem MTT-Test kommt das gelbliche MTT-Tetrazoliumsalz (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide*) zum Einsatz, welches in das blaue MTT-Formazan umgesetzt wird. Diese Umwandlung kann lediglich von lebenden Zellen katalysiert werden, weshalb der entstehende Farbumschlag ein Maß für die Anzahl der lebenden Zellen im Versuchsansatz darstellt. Dieser Vorgang beruht auf der Aktivität des in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Enzyms Succinatdehydrogenase (Slater et al. 1963). Bei dem Enzym handelt es sich um einen Bestandteil des Succinattetrazolium-Reduktase-Systems der Atmungskette der Mitochondrien, welches normalerweise als Katalysator für die Umwandlung von Succinat zu Fumarat im Citratzyklus verantwortlich ist. Entsprechend der Lokalisation der Succinatdehydrogenase und der Reduktionsäquivalente in den Mitochondrien der Zellen reichert sich der entstehende Farbstoff in den Mitochondrien an. Aus diesem Grund muss eine Freisetzung des entstandenen bläulichen Formazans aus den Mitochondrien herbeigeführt werden, damit eine Bestimmung der Intensität des Farbumschlags erfolgen kann. Der MTT-Test wurde im Rahmen der Versuche an den Tagen des Medienwechsels sowie am Starttag durchgeführt. Dazu wurden jeweils 250 µl MTT-Lösung pro Milliliter Medium in das zu messende Well pipettiert und die Wellplatte anschließend für 90 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Inkubator eingebracht. Nach Ablauf dieser Zeit waren die intakten und vitalen Zellen violett angefärbt, was unter dem Mikroskop überprüft werden konnte. Es folgte das Absaugen des Mediengemisches und die Zugabe von jeweils 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) in jedes Well. Dieses führt zu einer Zerstörung der Zellen, wodurch das ausgefällte bläulich-violette Formazan innerhalb von 30 Minuten Inkubationszeit sichtbar gemacht werden kann. Abschließend erfolgte die Bestimmung der Absorption der vitalen Zellen in einer Multititerplatte bei einer Wellenlänge von 540 nm sowie einer Referenzfiltermessung bei 620 nm im Plattenphotometer. Die Absorptionswerte stellen dann ein Maß für die Proliferation und Aktivität der Zellen dar. Als Kontrolle wurden stichprobenartig parallele Zellzahlbestimmungen in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

2.3.2 Versuchsablauf des Differenzierungsversuches

Der zweite Teil der Untersuchung diente zum einen der Bestimmung der relativen Expression der Knochenmarker Osteokalzin (OCN), Kollagen Typ 1 und Cbfa1 in den Verdünnungsreihen 1:1, 1:2 sowie in der Kontrollgruppe der HBKZ. Zum anderen wurde eine Bestimmung der Konzentration von Osteokalzin im Überstand mit ELISA-Tests durchgeführt. Der Überstand, der auf die HBKZ ähnlich wie bei dem Proliferationsversuch übertragen wurde, wurde dabei nach folgendem Ablauf gewonnen:

Der Überstand der DHGZ-Kultur wurde vier Wochen lang in einem Pool gesammelt. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde der Überstand mit einer sterilen 10-ml-Glaspipette entfernt und in sterilen 1-Liter-Glasflaschen aufbewahrt, welche bei -72°C eingefroren und somit zunächst konserviert wurden. Auf diese Weise konnte der Wachstumsverlauf der DHGZ von der ersten bis zur vierten Woche ermittelt werden. Nach der Übertragung der Überstände auf die humanen mesenchymalen Beckenkammzellen im Verdünnungsverhältnis 1:1 und 1:2 wurde die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Gleiches wurde auch für die Kontrollgruppe der HBKZ vorgenommen. Mit Hilfe der PCR und der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung wurde die Expression der Knochenmarker Osteokalzin, Kollagen Typ 1 und Cbfa1 bestimmt. Ebenso erfolgte nun die Konzentrationsbestimmung des Osteokalzins im Medium mit dem ONE Step ELISA.

2.3.2.1 CASY®-Messprinzip

Im Differenzierungsversuch wurde die Zellzahlbestimmung mit der CASY® *cell counting technology* vorgenommen. Dieses Gerät war für den Proliferationsversuch noch nicht vorhanden. Das CASY®-Messprinzip beruht auf einer elektrischen Pulsflächenanalyse mit einer integrierten Aggregationskorrektur (Coulter 1953), wodurch eine standardisierte und automatisierte Bestimmung der Zellzahl erfolgen kann. Dafür werden die Zellen in einer isotonen Elektrolytlösung verteilt. Diese Zellsuspension wird mit einer gleichmäßigen Strömungsgeschwindigkeit durch eine Präzisionsmesspore gesaugt. Während der Messung wird über zwei Platinelektroden ein 1 MHz getaktetes Niederspannungsfeld an die Kapillarstrecke angelegt. Die elektrolytgefüllte Messpore weist dadurch einen elektrischen Widerstand auf. Beim Durchtritt der Zellen durch diese Messpore wird ein bestimmtes, ihrem eigenen Zellvolumen entsprechendes Volumen der Elektrolytlösung, verdrängt. Über der Kapillarstrecke findet folglich eine Widerstandserhöhung statt, welche als Maß für die Zellvolumina genommen werden kann. Abschließend erfolgt eine automatisierte und standardisierte Auswertung der gemessenen Signalfächen, wodurch die Zellzahl bestimmt werden kann.

2.3.2.2 Osteokalzin ELISA

Für den Nachweis von Osteokalzin wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchung der N-MID® Osteokalzin ELISA durchgeführt. Mit Hilfe dieses enzym-immunologischen Tests kann ein quantitativer Nachweis von Osteokalzin in humanen Seren und Plasmen erbracht werden. Es werden zwei monoklonale Antikörper eingesetzt, die in der Lage sind, zwei unterschiedliche Regionen des humanen Osteokalzins zu erkennen. Beide sind dabei hochspezifisch, wobei es sich beim ersten Antikörper um einen biotinylierten Fänger-Antikörper handelt. Dieser bindet an die Aminosäuresequenz 20-43 in der Mitte des

Osteokalzinmoleküls. Dieser Antikörper wird durch einen zweiten Antikörper nachgewiesen, der mit einem Enzym gekoppelt ist, in diesem Fall mit einer Peroxidase. Dieser peroxidase-konjugierte Antikörper erkennt das N-terminale Ende (Aminosäure 10-16) des Osteokalzins und löst eine chromogene, photometrisch messbare Farbreaktion aus. Die Durchführung des N-MID® Osteokalzin ELISA erfolgte nach den empfohlenen Richtlinien des Herstellers. Die Angaben zum Hersteller und den verwendeten Materialien finden sich in den Tabellen im Anhang. Zunächst wurden die konservierten Überstände aufgetaut. Dabei handelte es sich um jeweils 20 µl der Proben sowie der Kontrollgruppe und des Standards (synthetisches Osteokalzin), welche in eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte eingebracht wurden. In jedes Well wurden anschließend 150 µl Antikörpergemisch pipettiert, welches den biotinylierten und den peroxidase-konjugierten Antikörper in einer 1:1 Verdünnung enthielt. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden und verlief bei Raumtemperatur. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Wells 5-mal mit 300 µl eines verdünnten Waschpuffers (Waschpufferkonzentrat: aqua:dest 1:50) gewaschen. Es folgte ein Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Stückchen Saugpapier, um den Waschpuffer restlos zu entfernen. Erst dann wurden in jedes Well 100 µl chromogenes Substrat (Tetramethylbenzidin = TMB) pipettiert. Die Inkubationszeit nach diesem Schritt betrug 15 Minuten und fand in vollständiger Dunkelheit und bei Raumtemperatur statt. Die ablaufende Reaktion wurde mit 100 µl ELISA-Stopplösung angehalten. Abschließend wurde die Absorption der abgelaufenen Farbreaktion im Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm ermittelt.

2.3.2.3 RNA-Gewinnung, Isolation und Analyse

Die RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) dient dem Nachweis von RNA, was Aufschluss über die Genexpression von spezifischen Genen in Zellen bietet. Dazu wird zunächst die Ribonukleinsäure (RNA) mittels der RNA-abhängigen DNA-Polymerase Reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und die cDNA-Fragmente anschließend im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die Produkte der RT-PCR zeigen entsprechend ihres Molekulargewichtes und ihrer Zusammensetzung charakteristische Wanderungsstrecken in der Gelelektrophorese und können auf diese Weise aufgetrennt und semiquantitativ bestimmt werden. Die hier durchgeführte RT-PCR diente dem Nachweis von drei spezifischen Knochenmarkern. Dazu gehören Cbfa1, Kollagen Typ 1 und Osteokalzin (OCN), welche zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Osteoblastendifferenzierung und Osteogenese exprimiert werden. Des Weiteren wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (DAPDH) untersucht. Hierbei handelt es sich um ein Enzym der Glykolyse, welches die Umwand-

lung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert. Da die Glykolyse ständig in den Zellen abläuft, kann das Expressionsmuster dieses Enzyms als Referenzwert für die Bestimmung der Knochenmarker herangezogen werden.

Tabelle 1: Darstellung der Gensequenzen und Anzahl der Basenpaare (bp) der PCR-Produkte von Core binding factor alpha 1 (Cbfa1), Kollagen Typ 1, Osteokalzin und GAPDH (nach Seymour 2010, S. 13).

Marker	Primersequenz	PCR-Produkt (bp)
Cbfa1	for: 5`-GTG AGG GAT GAA ATG CTT GGG AAC-3`	548
	rev: 5`-CAT AAC CGT CAC AAA TCC TCC C-3`	548
Kollagen Typ I	for: 5`-GAC CTC CGG CTC CTG CTC CTC TTA G-3`	532
	rev: 5`-GGA CCC ATG GGG CCA GGC ACG GAA A-3`	532
Osteokalzin	for: 5`-GCC CTC ACA CTC CTC GCC CTA TTG G-3`	138
	rev: 5`-GTC TCT TCA CTA CCT CGC TGC CCT C-3`	138
GAPDH	for: 5`-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3`	451
	rev: 5`-TCC ACC ACC CTG TTG GTC TA-3`	451

Um die RT-PCR durchführen zu können, bedarf es zunächst der Isolation der RNA. Dies erfolgte aus den, an den unterschiedlichen Messtagen gewonnenen Proben, die bis zum Tag der RNA-Isolation und -analyse bei -20 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Die RNA-Isolation wurde, nachdem die Zellen aufgetaut und in QIAshredder spin Säulen zwei Minuten bei 10 000 Umdrehungen/Minute (9300 · g) zentrifugiert und damit homogenisiert wurden, mit dem RNeasy Protect Mini Kit der Firma QIAGEN durchgeführt. Dazu wurden, den Herstellerangaben entsprechend, 350 µl 70%iges Ethanol zugefügt und das Zellkonzentrat in den RNeasy-Mini-Säulen für 15 Sekunden bei 10 000 Umdrehungen/Minute (9300 · g) zentrifugiert. Bei diesem Verfahren bleibt die RNA in einer RNeasy-Silikagel-Membran hängen. Anschließend erfolgt eine Waschung mit 350 µl RW1-Puffer und eine erneute Zentrifugation. Dies führt dazu, dass noch vorhandene DNA abgespült wird und nur reine RNA zurückbleibt. Daraufhin kommt es zur Anwendung eines Inkubationsgemisches, das aus 10 µl DNase und 70 µl RDD-Puffer besteht. Nach einer Einwirkzeit von 15 Minuten auf der Membran findet eine Waschung mit RW1-Puffer statt. Es folgt ein zweimaliger Waschvorgang mit 500 µl RPE-Puffer, dem sich eine Zentrifugation und Trocknung anschließen. Für die schlussendliche Ablösung der RNA von der Silikagel-Membran werden 50 µl RNase-freies Wasser benötigt, welches auf die Membran aufgetragen wird und dem sich eine Zentrifugation für eine Minute bei 10 000 Umdrehun-

gen/Minute anschließt. Als Endprodukt verbleibt die reine RNA, die dann im Rahmen der RT-PCR weiter analysiert werden kann.

Die reverse Transkription stellt den ersten Schritt der RT-PCR dar. Die Transkription der mRNA in cDNA wurde mit dem IQ Mix von Bio-Rad vorgenommen. Das weitere Prozedere entsprach den Empfehlungen des Herstellers. Zu Beginn erfolgte eine Bestimmung der RNA-Konzentration in einem Spektrophotometer (Biophotometer, Eppendorf, siehe Anhang). Anschließend wurden von jeder Probe 100 ng RNA zusammen mit 15 µl Nuclease-freiem Wasser und 5 µl Mastermix (4 µl iScript™ Reaktionsmix + 1 µl iScript Reverse Transkriptase) zur Synthese der cDNA verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des cDNA SYNTH-Programms im Thermocycler, in dessen vollautomatischem Verlauf die verschiedenen temperaturabhängigen Reaktionen der RT-PCR ablaufen können. Das cDNA SYNTH-Programm startet bei 25 °C und steigt nach 5 Minuten (*annealing*) auf 42 °C an. Diese Temperatur wird für 30 Minuten aufrechterhalten und entspricht dem Wirkoptimum der Reversen Transkriptase. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgt ein weiterer Anstieg der Temperatur auf 85 °C, was zur Denaturierung der Reversen Transkriptase führt. Nach 5 Minuten sinkt die Temperatur dann auf 4 °C ab. Es schließt sich der Vorgang der Polymerase-Kettenreaktion an, die zu einer Vervielfältigung der entstandenen cDNA-Fragmente führt.

Für den PCR-Ansatz werden folgende Bestandteile benötigt:

- 4 µl cDNA
- 10 µl GoTaq® Green Mastermix
- 1 µl Primermix
- 5 µl H₂O₂

Der GoTaq® Green Mastermix beinhaltet die sogenannte Taq-Polymerase, die sich aufgrund ihrer Thermostabilität gut für die temperaturabhängigen Vorgänge während der PCR eignet. Der Primermix der Firma IBA setzt sich aus mehreren Oligo(dT)-Primern zusammen, deren Sequenzen jeweils passend für die verwendeten Marker sind und in der Tabelle 1 aufgelistet sind. Im Verlauf der PCR, die 35-mal wiederholt wird, werden erneut mehrere Temperaturphasen durchlaufen, in denen eine Amplifizierung der cDNA stattfindet. Die Startreaktion dauert 2 Minuten und führt bei 95 °C zur initialen Denaturierung. Es folgt bei 95 °C, eine sich 35-mal wiederholende und 45 Sekunden andauernde Phase, während der sich die Denaturierung des Doppelstrangs vollzieht. Anschließend kommt es zu einem Absinken auf 55 °C, wodurch in einem 45 Sekunden langen Schritt das Primerannealing ermöglicht wird. Es findet ein erneuter Temperaturanstieg auf 72 °C statt,

der 45 Sekunden lang optimale Bedingungen für die Elongation durch die Taq-Polymerase schafft. Es schließt sich eine 5-minütige Phase bei 72 °C an, bevor es zu einem Temperaturabfall auf 4 °C kommt, der auch gehalten wird. Die entstandenen, mehrfach vervielfältigten PCR-Produkte werden anschließend in der Gelelektrophorese bei einer Spannung von 90 Volt und 20 Minuten Laufzeit aufgetrennt. Dafür kommen 1%iges Agarose-Gel, welchem Ethidiumbromid zugefügt ist und Tri-Borate-EDTA (TBE-Puffer) als Laufsubstanz zum Einsatz.

Die entstandenen Produkte wandern unterschiedlich schnell in der Gelelektrophorese und das enthaltene Ethidiumbromid erlaubt es, die Wanderungstreifen der Nukleotide sichtbar werden zu lassen und entsprechend der Helligkeit der Banden semiquantitativ auszuwerten. Dies erfolgte mittels der Bio Doc-Analyse. Eine Negativ-Kontrolle ermöglicht die Analyse der Banden. Dafür wird ein Reaktionsansatz ohne cDNA und eine DNA-Leiter verwendet.

2.4 Auswertung der Ergebnisse

Der Ermittlung der Zellzahlen lagen zu den jeweiligen zeitabhängigen Messtagen 3 bis 6 Werte vor, aus denen die Mittelwerte berechnet wurden. Die Zellzahlen der MTT-Messung wurden anhand der optischen Dichte unter Zugrundelegung der am Starttag ermittelten Zellzahl nach der Formel $\frac{\text{Zellzahl}(t=0) \times OD(t=x)}{OD(t=0)} = \text{Zellzahl}(x)$ berechnet. Mit Hilfe der Zellzahl wurden die relativen Wachstumsraten bestimmt, indem der Ausgangswert der Zellzahl am Starttag der Zellkultur durch die Zellzahl zum Tag X geteilt wurde. Die Wachstumsrate stellt somit eine dimensionslose Zahl des Vielfachen der Ausgangszellzahl dar. Die Mittelwerte und die Grafiken wurden mit dem Programm SigmaPlot (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) errechnet und dargestellt.

3 Ergebnisse

Um die Wirkung des Überstandes der DHGZ-Kultur auf die Proliferation der humanen mesenchymalen Beckenkammzellen zu überprüfen, wurden zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Zum einen wurden die aktuell anfallenden Überstände – wie sie sich bei laufendem 3-täglichem Mediumwechsel ergaben – in das Medium der HBKZ übertragen. So wurden z. B. Anteile des Mediums der DHGZ-Kultur, die sich von Tag 0 bis Tag 3 in der Kultur befanden, an Tag 3 auf die HBKZ-Kultur verimpft und verblieben dort von Tag 3 bis Tag 6. Dadurch entstand ein zeitlicher Versatz der Wirkung. Zum anderen wurden die Überstände des Mediums der DHGZ-Kultur als Pool gesammelt und auf die HBKZ-Kultur überführt. Anhand dieses Versuches sollte nicht nur das Proliferationsverhalten, sondern auch die Differenzierung der Zellen untersucht werden.

Um zunächst grundsätzliche Differenzen im Proliferationsverhalten der beiden Zellarten zu klären, wurden die DHGZ- und HBKZ-Kontrollgruppen verglichen.

3.1 Proliferationsverhalten der DHGZ- und HBKZ-Kontrollgruppen

Um Aufschluss über das Proliferationsverhalten der DHGZ und HBKZ zu erhalten, wurden die beiden Zellarten in jeweils drei Serien ausgesät und ihre Zellzahl kulturzeitabhängig anhand der optischen Dichte des MTT-Tests bestimmt. Der Beobachtungszeitraum betrug 23 Tage. Um eine exaktere Vergleichbarkeit der Proliferation der beiden Zelltypen zu gewährleisten und abweichende Zellzahlen bei der Aussaat zu korrigieren, wurden die optischen Dichten, die sich bei jeder Serie zum Zeitpunkt der Aussaat ergaben, ins Verhältnis zu den am jeweiligen Tag gemessenen Werten gesetzt. Aus den pro Tag gemessenen Werten ($n = 6$) wurde dann für jede Zellart die Regression (mit insgesamt 56 Messpunkten) berechnet und gegen die Kulturzeit im Koordinatensystem aufgetragen. Aus der Steigung der Regression ergibt sich dann die tägliche Proliferationsrate der jeweiligen Zelltypen, die ein Vielfaches des Ausgangswertes darstellt.

In Abbildung 3 sind diese relativen Proliferationsraten mit ihren Regressionen der DHGZ und HBKZ graphisch dargestellt, die im weiteren Versuchsablauf als Kontrollgruppen dienten. Die Hirschzellen zeigen eine mehr als doppelt so hohe Proliferation wie die menschlichen Zellen aus dem Beckenkamm. Die 1. Ableitung $f'(x)$ der Regressionsgeraden ergibt als Steigung der beiden Wachstumskurven den täglichen Zuwachs der Proliferationsrate. Sie beträgt für die DHGZ und HBKZ:

$$\text{DHGZ: } f(x) = 1,17x + 3,57; f'(x) = 1,17$$

$$\text{HBKZ: } f(x) = 0,47x + 0,47; f'(x) = 0,47.$$

Nach der 1. Ableitung der Regressionsgeraden verzeichnen die DHGZ eine tägliche Zuwachsrate um das 1,17-Fache und die HBKZ um das 0,47-Fache ihres Ausgangswertes. Werden beispielsweise 10.000 Zellen ausgesät, so zeigen die DHGZ über die Versuchslänge einen täglichen Zuwachs von 11 700 Zellen und die HBKZ einen Zuwachs von 4 700 Zellen. Wie die Korrelationskoeffizienten r angeben, zeigen beide Zelltypen eine unterschiedliche Linearität in ihrem Proliferationsverhalten. Diese ist bei den DHGZ mit $r = 0,716$ etwas stärker ausgeprägt als bei den HBKZ mit $r = 0,544$. An den ersten beiden Versuchstagen erfolgt zunächst für beide Zellarten eine gleich geringe Proliferation, die dann am 3. Versuchstag bei den DHGZ ansteigt. Für die HBKZ-Kontrollgruppe ergibt sich eine wesentlich niedrigere Proliferationsrate. Bis zum 8. Messtag schwankt die Proliferationsrate um den Wert 1-2. Am 6. Versuchstag findet ein leichter Anstieg auf den Wert 6 statt. Der Maximalwert der Proliferationsrate der HBKZ-Kontrollgruppe von knapp 20 wird am 23. Versuchstag erreicht.

Vergleicht man die Proliferationsraten der Zellen pro Tag (1. Ableitung der Regression) wird deutlich, dass die Proliferationsrate der DHGZ mehr als doppelt so hoch liegt wie die der HBKZ.

3.2 Einfluss des fraktionierten Überstandes der DHGZ-Kultur auf das Proliferationsverhalten der HBKZ

Für die Durchführung des Proliferationsversuches wurden als Verdünnungsstufen die Verdünnungsreihen 1:1, 1:2, 1:3 und 1:5 gewählt. Die HBKZ wurden hier mit dem fraktionierten Überstand der Damhirsch-Kultur und DMEM entsprechend ihrer Verdünnungsverhältnisse versetzt. Es lief ferner eine Kontrollgruppe der HBKZ. Die so erhaltenen Proliferationskurven der HBKZ nach Beimpfung mit den DHGZ-Überständen sind in Abbildung 4 dargestellt. Die relativen Proliferationsraten, ermittelt durch N_{tx}/N_{t_0} , der Verdünnungsreihen 1:1, 1:2, 1:3 und 1:5 sind in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen aufgetragen. Weiterhin ist der Verlauf der Kontrollgruppe der HBKZ angegeben. Die Werte ergeben sich aus den Mittelwerten ($n = 3$). Der Zeitpunkt t_0 kennzeichnet den ersten Tag der Überstandsübertragung. In allen getesteten Gruppen betrug dabei die Ausgangszellzahl 12 250 Zellen/Well. Die DHGZ-Kultur, deren Überstand übertragen wurde, wurde parallel dazu kultiviert und startete mit einer Zellzahl von 31 000 Zellen/Well. Sowohl die Kontrollgruppe der HBKZ als auch die unterschiedlichen Verdünnungsreihen zeigen in den ersten drei Versuchstagen einen nahezu geradlinigen Verlauf der Proliferationskurve. Am 6. Versuchstag steigt in allen getesteten Gruppen die relative Proliferationsrate an und erreicht für die 1:2-Verdünnung einen Wert von 2,5.

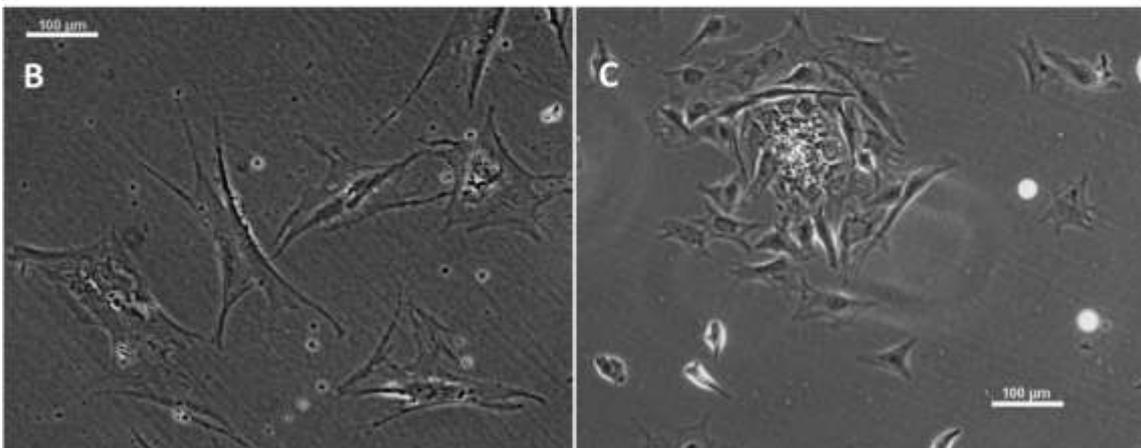
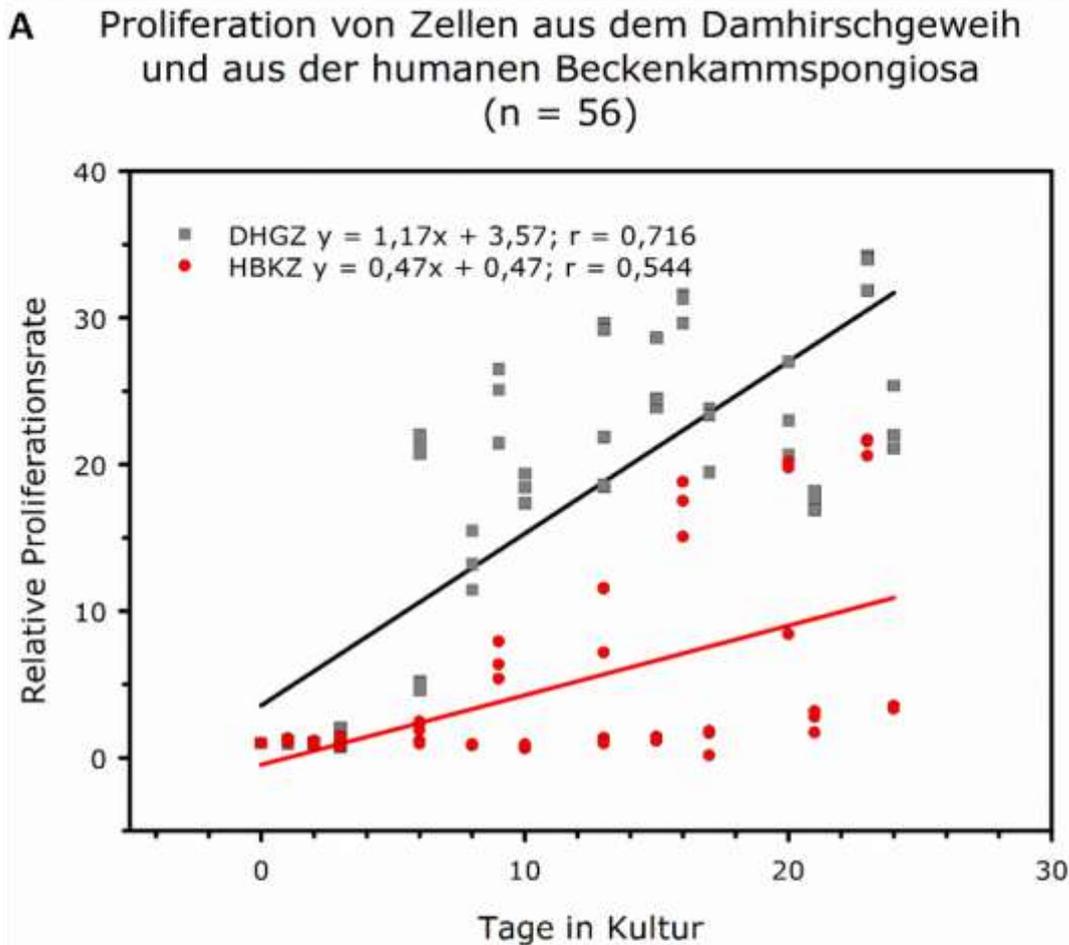


Abbildung 3: **A)** Relative Proliferationsraten der Kontrollgruppen der Damhirschgeweihzellen (DHGZ) und der Zellen aus dem humanen Beckenkamm (HBKZ) in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen. Dargestellt sind alle Messpunkte (n=56) während des Versuchszeitraums. Ferner sind die Regressionen sowie der Korrelationskoeffizient (r) angegeben. **B)** HBKZ der zweiten Passage zum Startzeitpunkt der Kultur (t = 0) nach dem Absetzen am Boden des Kulturgefäßes. **C)** DHGZ der zweiten Passage einen Tag nach Aussaat der Zellen im Kulturmedium. Die Zellen neigen zur Koloniebildung.

Im weiteren zeitlichen Verlauf wurden die Messungen für die 1:3- und 1:5-Verdünnung sowie für die Kontrollgruppe der HBKZ und die Messungen für die 1:1- und 1:2-Verdünnung an teilweise unterschiedlichen Messtagen vorgenommen. Es wird deutlich, dass die relative Proliferationsrate der 1:1- und 1:2-Verdünnung wesentlich höher liegt, als die der 1:3- und 1:5-Verdünnung. Die Werte für die 1:1- und 1:2-Verdünnungen sind annähernd gleich. Beide Gruppen erreichen am 20. Versuchstag ihre Maximalwerte. Dieser liegt für die 1:1-Verdünnung um 25. Der Maximalwert für die relative Proliferationsrate der 1:2-Verdünnung schwankt ebenfalls um diesen Wert. Anschließend kommt es in diesen beiden Messgruppen erstmals während der Versuchszeit zu einem Abfall der relativen Proliferationsrate am 23. Versuchstag. Die relative Proliferationsrate für die 1:3- und 1:5-Verdünnungen fällt wesentlich geringer aus, als die der 1:1- und 1:2-Verdünnungen. Beide Verdünnungsreihen zeigen bis zum 10. Versuchstag nahezu gleich bleibende Werte. Erst am 13. Versuchstag ist eine Steigung bei der 1:3-Verdünnung zu verzeichnen. Die relative Proliferationsrate der 1:5-Verdünnung liegt zu diesem Zeitpunkt auf dem Niveau der Kontrollgruppe der HBKZ. Erst am 15. Versuchstag findet auch hier eine Steigung statt. Im weiteren Versuchsablauf findet nur eine geringe Steigung statt, wobei am 21. Versuchstag Werte von 3 bis 5 erreicht werden. Die 1:3-Verdünnung zeigt eine stärkere Zunahme der relativen Proliferationsrate. Diese Verdünnungsreihe erreicht am 24. Versuchstag ihren Maximalwert von 15.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Überstände je nach Verdünnungsgrad einen proliferationsfördernden Effekt auf die HBKZ haben. Dabei führen höhere Konzentrationen des DHGZ-Überstandes zu höheren Proliferationsraten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe der HBKZ, die eine maximale Wachstumsrate von 3 zeigt, proliferieren die mit der 1:1- und 1:2-Verdünnung versehenen HBKZ um das 25-Fache.

3.3 Einfluss des gepoolten Überstandes der DHGZ-Kultur auf das Proliferationsverhalten der HBKZ

Im Rahmen des Differenzierungsversuches wurde zunächst die Zellzahl der HBKZ bestimmt. In Abbildung 5 sind die relativen Proliferationsraten sowie die Zellzahlen ($\times 10^3$) in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen für die 1:1- und 1:2-Verdünnung sowie für die Kontrollgruppe der HBKZ aufgetragen. Angegeben sind dabei die Mittelwerte ($n = 3$). Als Ausgangszellzahl wurden zum Zeitpunkt $t_0 = 20\ 000$ Zellen/ml ausgesät. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der *CASY® cell counting technology*. Hier erfolgte die Überstandsübertragung mit dem gepoolten, über den gesamten Zeitraum des Proliferationsversuches gesammelten DHGZ-Überstand.

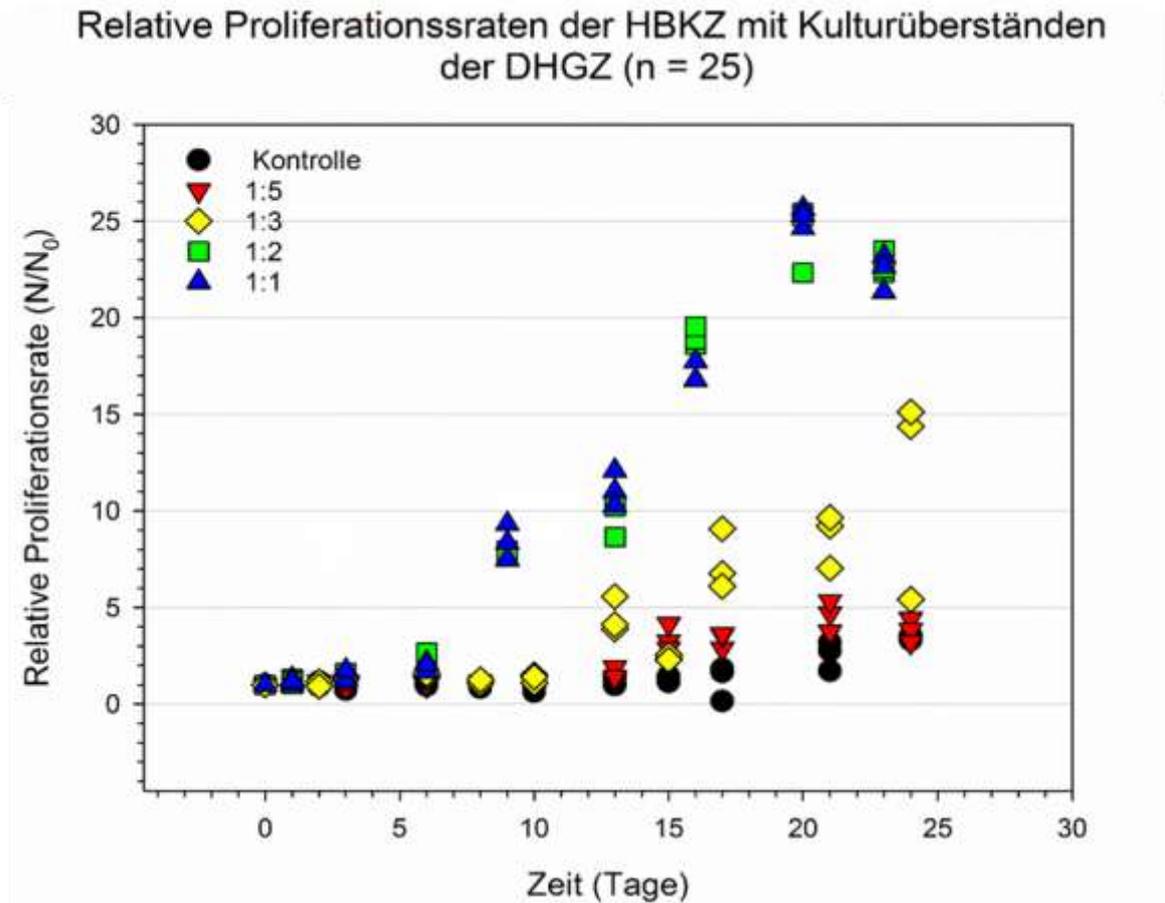


Abbildung 4: Relative Proliferation als Vielfaches der synchron ausgesäten Zellzahl (=12.250 Zellen/Well) zum Tag t_0 . Der Zeitpunkt t_0 kennzeichnet dabei den ersten Tag der Überstandsübertragung. Der Überstand der Damhirschgeweihzellen (DHGZ) wurde fraktioniert auf die Medien der Zellen aus dem humanen Beckenkamm (HBKZ) übertragen. Dargestellt sind die 1:1-, 1:2-, 1:3- und 1:5-Verdünnungsreihe der HBKZ sowie die Kontrollgruppe der HBKZ. Letztere wurde ausschließlich mit kommerziellem Medium und ohne DHGZ-Überstand kultiviert. Allen Serien liegen jeweils 25 Zellzählungen zugrunde. Die synchron kultivierten Damhirschgeweihzellen (in der Grafik nicht dargestellt) starteten mit einer Zellzahl von 31.000 Zellen pro Well. Die maximale 25-Fache Zellzahl des Ausgangswertes erreichten die HBKZ, deren Kulturmedien im Verhältnis 1:1 oder 1:2 mit dem Überstand der DHGZ kultiviert wurden.

Der Versuch mit gepooltem Überstand zeigt ein völlig anderes Ergebnis als der oben beschriebene Versuch. Im Gegensatz zu diesem liegt die Proliferationsrate hier bei den mit gepooltem Überstand behandelten Zellen lediglich bei circa 2, während die Kontrollgruppe der HBKZ mit einer relativen Proliferationsrate von größer 3 zum Vorversuch identische Werte zeigt.

Absolute und relative Proliferation der HBKZ im Differenzierungsversuch

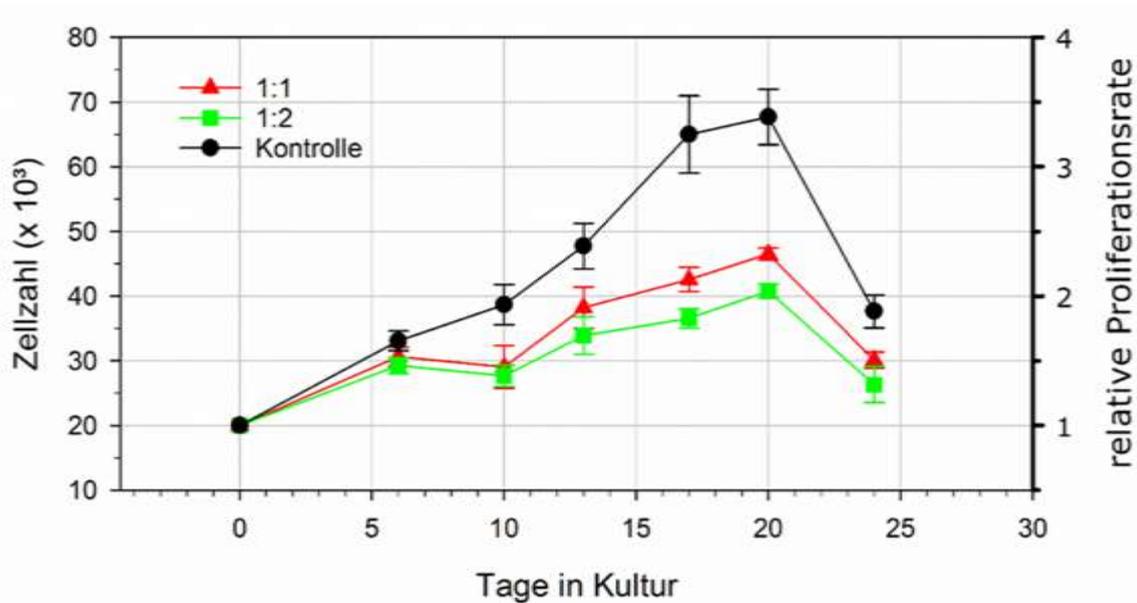


Abbildung 5: Absolute und relative Proliferation der Zellen aus dem humanen Beckenkamm (HBKZ) nach Übertragung mit gepooltem DHGZ-Überstand. Dargestellt sind die Zellzahlen ($\times 10^3$) und relativen Proliferationsraten für die Verdünnungsreihen 1:1 und 1:2 sowie für die Kontrollgruppe der HBKZ in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen. Angegeben sind die Mittelwerte ($n = 3$) mit den Standardabweichungen. Die Anfangszellzahl betrug in allen Gruppen zum Startzeitpunkt der Kultur $t_0 = 20\,000$ Zellen/ml.

Aus der Abbildung 5 geht hervor, dass bis zum zweiten Messtag ($t=6$) sowohl in den Verdünnungsreihen 1:1 und 1:2 als auch bei der Kontrollgruppe der HBKZ eine Zunahme der Zellzahl stattfindet. Dieser Anstieg der Zellzahl setzt sich in der Kontrollgruppe der HBKZ fort und erreicht am 20. Versuchstag ihren Maximalwert. Anschließend kommt es zu einem starken Abfall der Zellzahl, die am letzten Messtag ($t=24$) einen Wert von 48×10^3 Zellen/ml erreicht. Die Zellzahl der Verdünnungsreihen 1:1 und 1:2 fällt nach dem 2. Messtag ($t=6$) wieder leicht ab. Im weiteren Verlauf der Messungen kann jedoch wieder ein Anstieg der Zellzahl beobachtet werden, wobei die Zellzahl der 1:1 Verdünnung stärker anwächst, als die der 1:2-Verdünnung. Beide erreichen, ähnlich wie die HBKZ-Kontrollgruppe, am 20. Versuchstag ihren Maximalwert. Dieser liegt bei der 1:1-Verdünnung bei 46×10^3 Zellen/ml. Die Zellzahl der 1:2-Verdünnung beträgt zu diesem Zeitpunkt 41×10^3 Zellen/ml. Im weiteren Versuchsablauf folgen die Wachstumskurven der Verdünnungsreihen dem Verlauf der HBKZ-Kurve. Auch die Zellzahl in den Verdünnungs-

reihen fällt nach dem 20. Versuchstag stark ab und erreicht Werte von 30×10^3 Zellen/ml für die 1:1-Verdünnung und 26×10^3 Zellen/ml für die 1:2-Verdünnung.

3.3.1 Zeitabhängige Genexpression der HBKZ

Im Rahmen des Differenzierungsversuches wurde die Genexpression von Kollagen Typ 1, Osteokalzin (OCN) und Cbfa1 ermittelt. Anhand der Gelbanden wurde die relative Intensität in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen bestimmt, wobei der Quotient $\frac{t_x}{t_0}$ gebildet wurde, sodass alle Werte ein Vielfaches des Ausgangswertes darstellen. In Abbildung 6 ist die Expression der oben genannten Knochenmarker als Fotografie der nach elektrophoretischer Auftrennung sichtbaren Banden für die 1:1- und 1:2-Verdünnung und eine Kontrollgruppe der HBKZ abgebildet. Sowohl für die Kontrollgruppe der HBKZ als auch für die Verdünnungsreihen 1:1 und 1:2 ist hier die Laufzeit von Cbfa1, Osteokalzin, Kollagen Typ 1 und als Referenzwert GAPDH dargestellt. Darüber hinaus sind in Abbildung 7 die relativen Intensitäten der Expression für die 1:1- und 1:2-Verdünnung und die HBKZ-Kontrollgruppe dargestellt.

Die Gelbanden zeigen nach der elektrophoretischen Auftrennung der Nukleotide, dass der Referenzmarker GAPDH in allen drei Messgruppen mit gleicher Intensität exprimiert wurde. Für die verwendeten Knochenmarker lassen sich im zeitlichen Verlauf Intensitätsunterschiede erkennen. Kollagen Typ 1 wird in der 1:2-Verdünnung weitaus schwächer exprimiert als in den anderen beiden Proben und tritt erst später im Versuchszeitraum auf. Die Banden für OCN sind in den beiden Verdünnungsreihen schwächer ausgebildet, jedoch ist Osteokalzin über den gesamten Versuchszeitraum aktiv. Gleiches gilt für Cbfa1, welches in allen drei Proben von Beginn an aktiv ist und auch in etwa die gleiche Intensität aufweist. Die Ergebnisse für die elektrophoretische Analyse können als gültig angesehen werden, da die Negativ-Kontrolle für alle drei Marker keine Expression zeigt.

Die relative Intensität der Expression von Kollagen Typ 1 ist in Abbildung 7 A für die Verdünnung 1:1 und die Kontrollgruppe der HBKZ aufgetragen. Es wird deutlich, dass die Intensität für die Kontrollgruppe der HBKZ im Verlauf der Messzeit ansteigt, wobei die größte Steigung bis zum 10. Versuchstag auf einen Wert von 5 vorzufinden ist. Danach findet ein leichter Abfall auf den Wert 4 statt. Bis zum Ende der Messzeit steigt die relative Intensität von Kollagen Typ 1 dann wieder auf Werte um 5 an. Die Verdünnungsreihe 1:1 zeigt zunächst einen starken Anstieg auf 7,5 am 6. Versuchstag. Danach fällt die relative Intensität ab, bleibt aber von Tag 14 bis 17 bei Werten um 4,5 gleich. Bis zum Versuchsende am Tag 24 fällt die relative Intensität weiter ab und erreicht Werte unterhalb des Ausgangswertes von 1.

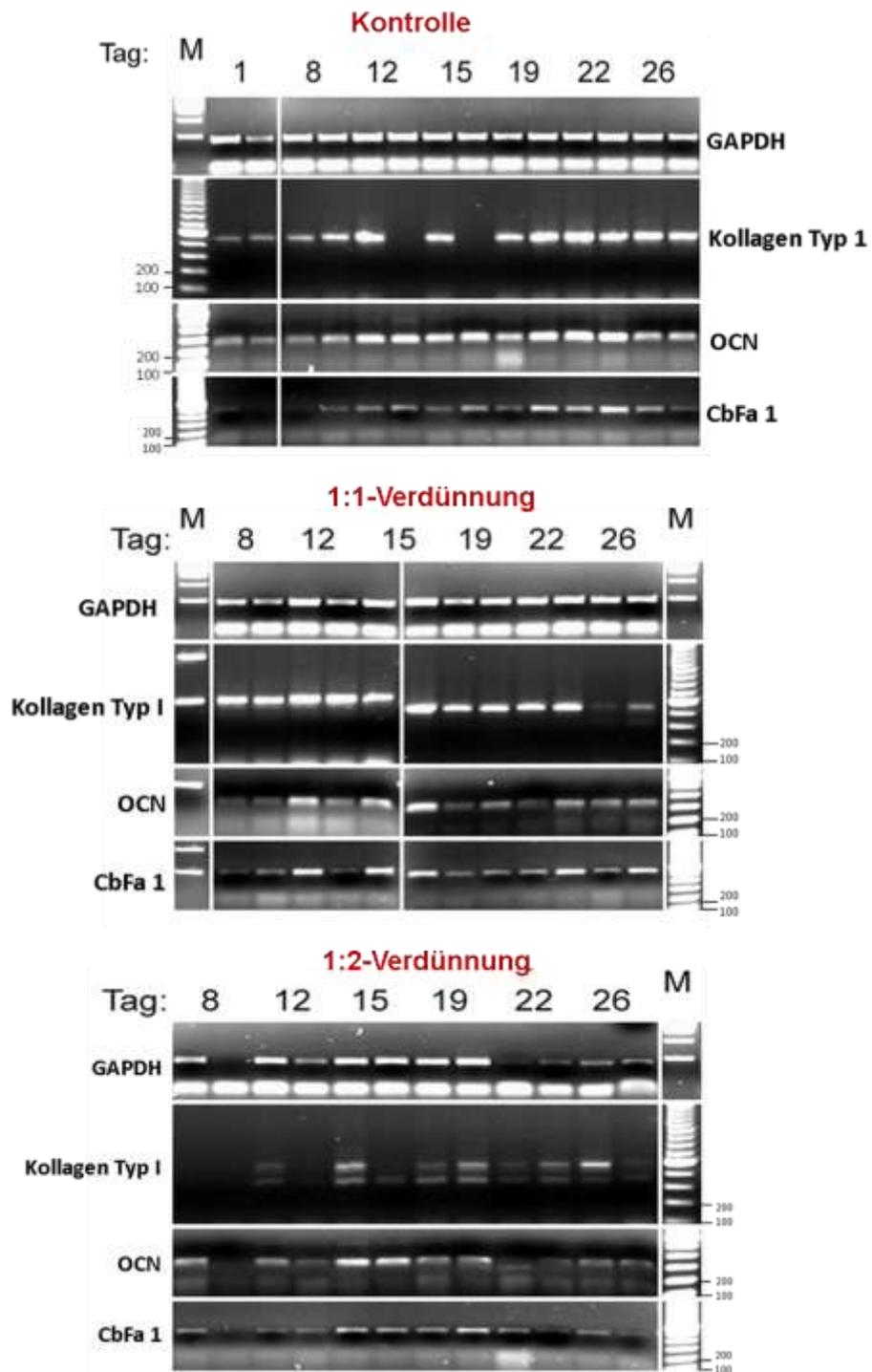


Abbildung 6: Fotografien der Gelbanden nach elektrophoretischer Auftrennung. Untersucht wurden die Knochenmarker Kollagen Typ 1 ($bp = 532$), Osteokalzin (OCN; $bp = 138$) und der core binding factor alpha 1 (Cbfa1; $bp = 548$) für die 1:1- und 1:2-Verdünnung sowie für eine Kontrollgruppe der humanen mesenchymalen Beckenkammzellen (HBKZ). Weiterhin ist als Referenzmarker GAPDH ($bp = 451$) dargestellt.

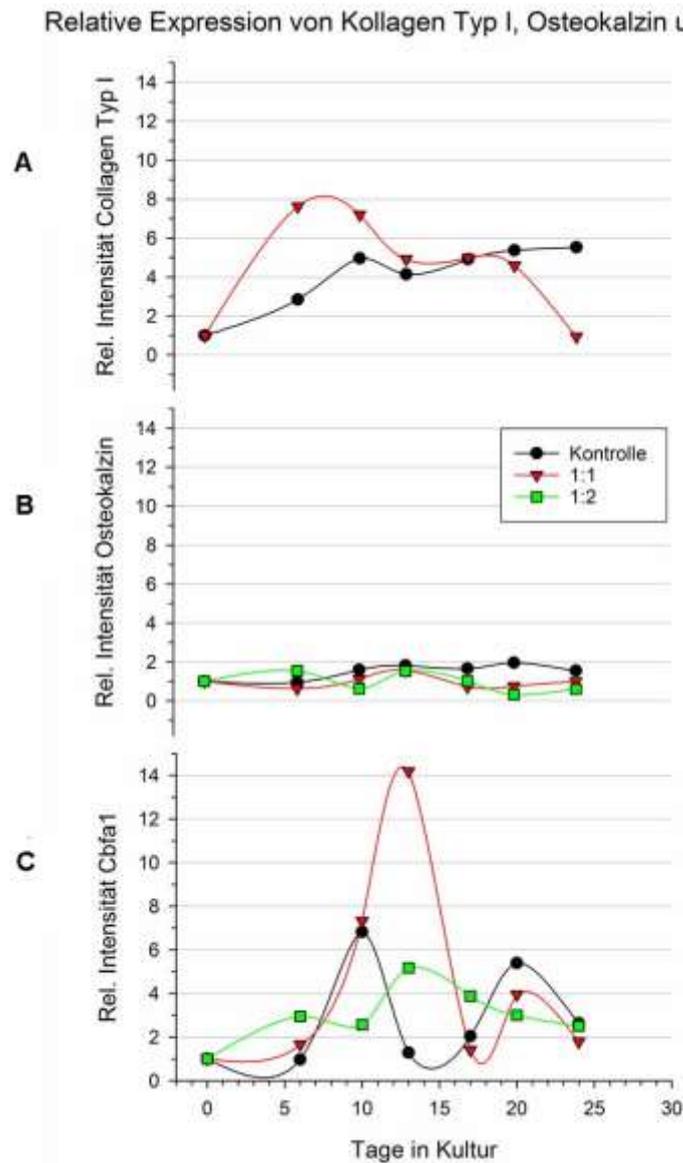


Abbildung 7: Relative Intensitäten der Expression für die Knochenmarker Kollagen Typ 1 (A), Osteokalzin (B) und core binding factor alpha 1 (C) für die 1:1- und 1:2-Verdünnung sowie für eine Kontrollgruppe der humanen mesenchymalen Beckenkammzellen (HBKZ) in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen.

Die Ergebnisse der relativen Intensität der Expression für Osteokalzin sind in Abbildung 7 B für die Kontrollgruppe der HBKZ und die Verdünnung 1:1 und 1:2 dargestellt. Alle drei Versuchsgruppen zeigen zu keinem Zeitpunkt der Versuchszeit einen starken Anstieg der relativen Intensität. Stattdessen schwanken alle drei Proben um den Wert 0 bis 2. Lediglich die Kontrollgruppe der HBKZ zeigt überhaupt eine kontinuierliche Steigung der relativen Intensität, die ihren Maximalwert am Tag 20 mit 2 erreicht. Die beiden Verdünnungs-

reihen hingegen erreichen während der Versuchszeit Werte unterhalb des Ausgangswertes von 1.

In Abbildung 7 C sind die Kurvenverläufe der relativen Intensität der Expression von Cbfa1 für die Kontrollgruppe der HBKZ sowie für die Verdünnungsreihen 1:1 und 1:2 zu sehen. Die größte Zunahme der relativen Intensität ist hier bei der 1:1-Verdünnung zu beobachten, die am 13. Versuchstag einen Maximalwert von 14 erreicht. Danach ist jedoch ein starker Abfall auf den Wert 1 am 17. Versuchstag festzustellen. Bis zum Versuchsende am 24. Tag findet nur noch ein leichter Anstieg auf 2 statt. Die Kontrollgruppe der HBKZ zeigt einen ähnlichen Verlauf wie den der Verdünnungsreihe 1:1, wobei die Phasen von Anstieg und Abfall zeitversetzt stattfinden und weitaus geringer ausfallen. Der Maximalwert wird am Tag 10. mit 7 erreicht, der Minimalwert am Tag 6 mit einem Wert um 1,5. Ab dem 15. Tag findet bis zum Versuchsende wieder eine Steigung statt, der Maximalwert kann hier aber nicht mehr erreicht werden. Die Kurve der Verdünnungsreihe 1:2 zeigt einen wesentlich schwächer ausgeprägten wellenförmigen Verlauf. Der Maximalwert wird hier am 13. Versuchstag erreicht und beträgt 5.

3.3.2 Osteokalzinbestimmung

Im Rahmen des Differenzierungsversuches wurde zunächst die Genexpression und anschließend die Konzentration von Osteokalzin im Medium der Verdünnungsreihen 1:1 und 1:2 sowie der Kontrollgruppe der HBKZ bestimmt. Wie aus der Abbildung 8 hervorgeht, konnte jedoch bereits in der DHGZ-Kultur Osteokalzin gemessen werden. So demonstriert die Grafik, dass ab dem 10. Kulturtag eine erhebliche Osteokalzinproduktion in der Kultur der Damhirschgeweihzellen stattgefunden hat. Die dadurch bedingte Übertragung von Osteokalzin im Überstand auf die HBKZ-Kulturen erforderte aus diesem Grund eine Korrektur um die Osteoblastenproduktion dieser Zellart genauer bestimmen zu können. Deshalb wurden die erhaltenen Werte der Osteokalzinkonzentration für die 1:1- und 1:2-Verdünnungsreihen um den Betrag der ursprünglich im Medium bereits vorhandenen OCN-Konzentration korrigiert.

Die relative Intensität von Osteokalzin wurde mit Hilfe der PCR ermittelt. Die Osteokalzinkonzentration (ng/ml) wurde mittels des ONE Step ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 A und Abbildung 9 B in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen ($t = 0$ bis $t = 24$) graphisch aufgetragen. Sowohl für die relative Intensität als auch für die Osteokalzinkonzentration sind die Mittelwerte (relative Intensität: $n = 3$; Konzentration: $n = 6$), die dazugehörigen Regressionsgeraden und der Korrelationskoeffizient r für die HBKZ-Kontrolle, 1:1- und 1:2-Verdünnung angegeben.

Osteokalzinkonzentration im Kulturmedium

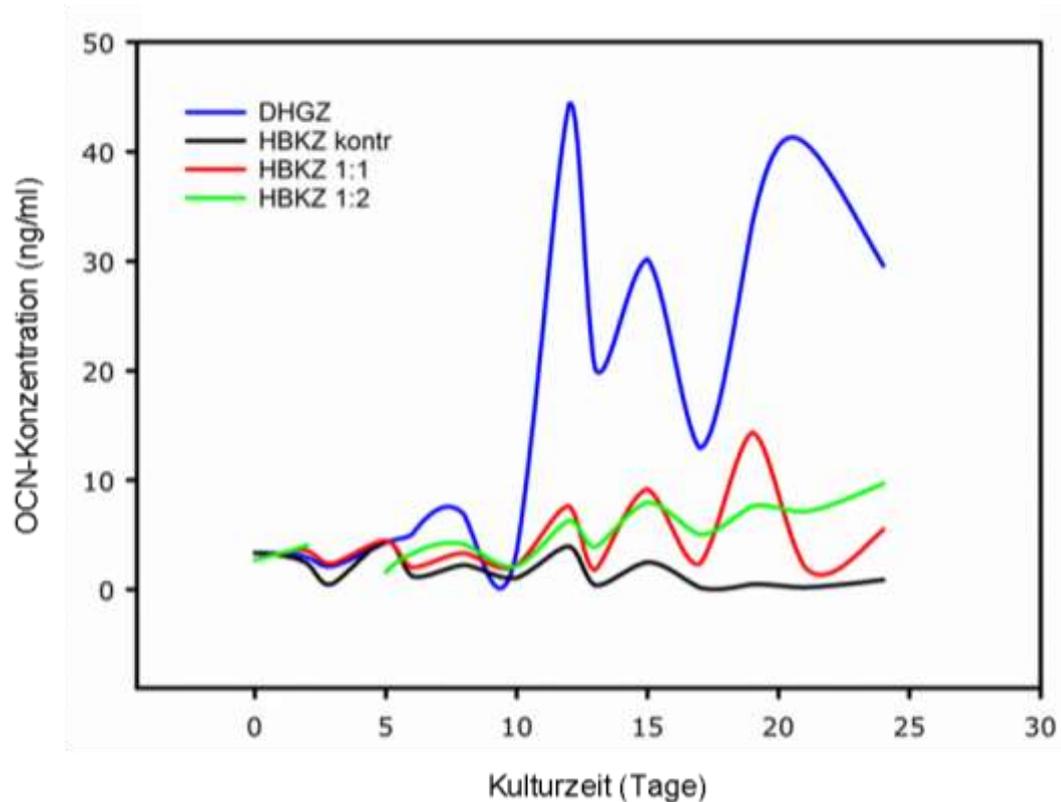


Abbildung 8: Osteokalzinkonzentrationen im Überstand der Kultur der Damhirschgeweihzellen und der Kontrollgruppe der humanen Beckenkammzellen (HBKZ) sowie der 1:1- und 1:2-Verdünnung. Die Osteokalzinkonzentration (ng/ml) ist als Mittelwert ($n = 6$) in Abhängigkeit von der Zeit (14 Messstage) aufgetragen und wurde bei jedem Mediumwechsel bestimmt. Aus Gründen der besseren Übersicht wurden die Messpunkte mit ihren Standardabweichungen nicht aufgetragen.

Aus Abbildung 9 A geht hervor, dass die relative Intensität als Ausdruck für die Expression von Osteokalzin im Verlauf der Versuchszeit für die Kontrollgruppe der HBKZ am höchsten liegt. Bis auf einen Abfall auf den Ausgangswert von 1 am 7. Versuchstag und einen Abfall am letzten Versuchstag ($t = 25$) ist eine kontinuierliche Steigung festzustellen, die am 21. Versuchstag den Maximalwert von 2 erreicht. Es schließt sich ein Abfall der relativen Intensität des OCN am Tag 24 auf den Wert 1,5 an. Die relative Intensität des Osteokalzins für die 1:1-Verdünnung unterliegt während des Versuchsablaufes leichten Schwankungen, wobei sich die Werte um 1 bewegen. Zum Zeitpunkt $t = 7, 11, 18$ und 21 liegt die relative Intensität der 1:1-Verdünnung unterhalb des Ausgangswertes von 1. Für die 1:2-Verdünnung ergeben sich ebenfalls Werte, die unter dem Ausgangswert von 1 liegen. Diese wurden zum Zeitpunkt $t = 7, 21$ und 25 gemessen. Lediglich an Tag 7 und 14 sind Werte über dem Ausgangswert von 1 festzustellen.

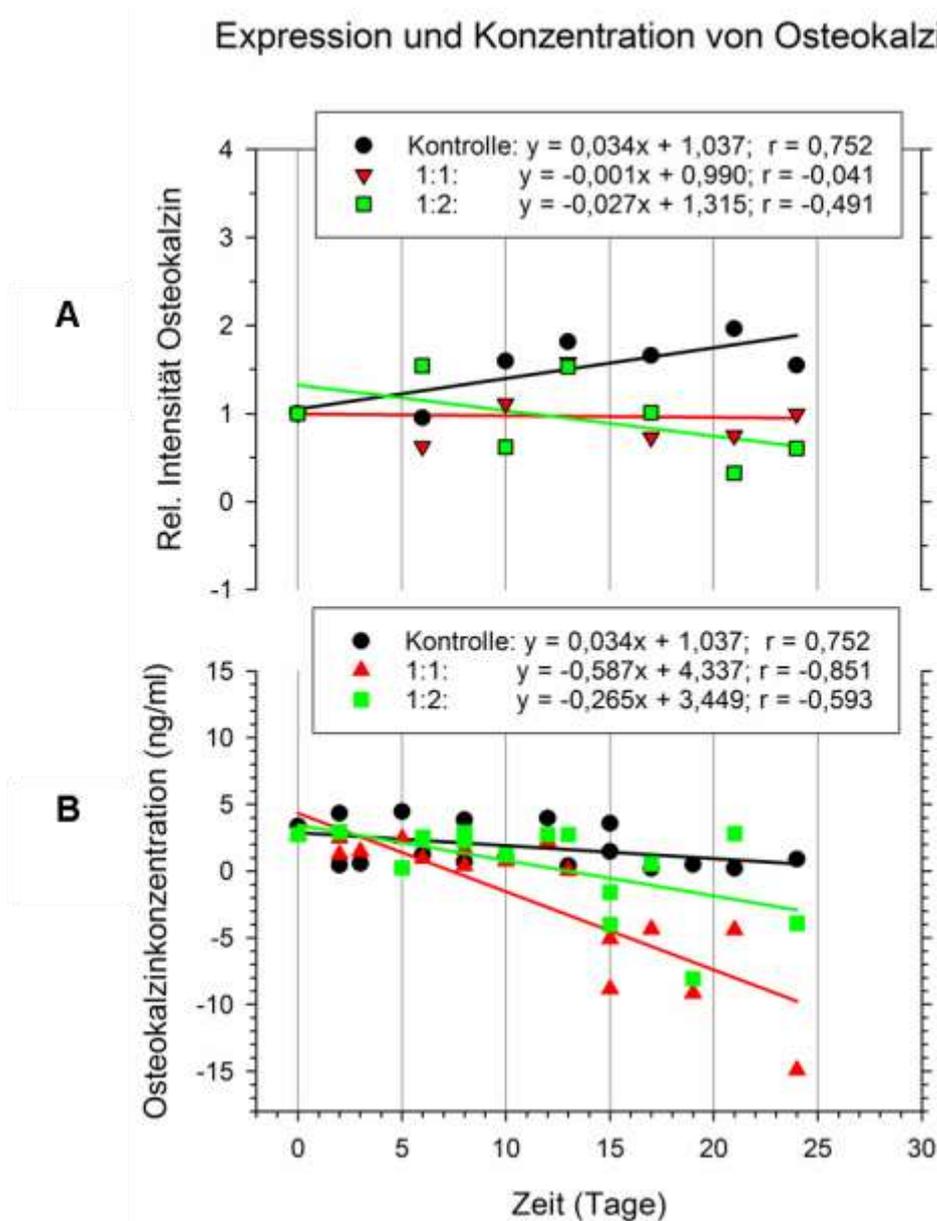


Abbildung 9: Relative Osteokalzinexpressionen (A) und korrigierte Osteokalzinkonzentrationen in ng/ml (B) im Medium der Zellen aus dem humanen Beckenkamm (HBKZ) in Abhängigkeit von der Zeit in Tagen. Angegeben sind die Messdaten (Expression: $n=3$; Konzentration: $n=6$) und ihre Regressionen sowie der Korrelationskoeffizient r für die HBKZ-Kontrollgruppe und die 1:1- und 1:2-Verdünnungsreihe.

In Abbildung 9 B ist die Konzentration der Proteinmenge des Osteokalzins im Medium (ng/ml) für die einzelnen Messgruppen dargestellt. Auch für die Osteokalzinkonzentration wurden die Regressionsgleichungen eingezeichnet. Die Kontrollgruppe der HBKZ zeigt im Hinblick auf die Osteokalzinkonzentration im Medium die geringste Abnahme. An den drei Messpunkten $t = 2, 12$ und 15 liegt die Konzentration unterhalb des Ausgangswertes von $3,5$ ng/ml. Hier schwanken die Konzentrationen zwischen 0 bis 1 ng /ml. Bei der 1:1-

Verdünnung ist die größte Abnahme der Osteokalzinkonzentration im Medium vorzufinden. So werden am Tag 24 sogar Konzentrationen von -16 ng/ml errechnet. Eine Steigerung über den Ausgangswert von 3,5 ng/ml ist zu keinem Messzeitpunkt festzustellen. Die 1:2-Verdünnung zeigt ebenfalls über den Versuchszeitraum eine Abnahme der Osteokalzinkonzentration im Medium. Diese liegt zwischen der 1:1-Verdünnung und der Kontrollgruppe der HBKZ. In dieser Verdünnungsreihe werden Konzentrationen von -8 ng/ml am 19. Versuchstag errechnet. Eine Zunahme der Osteokalzinkonzentration über den Ausgangswert von 3,5 ng/ml ist auch in dieser Verdünnungsreihe nicht vorzufinden. Die erste Ableitung der angegebenen Regressionsgleichungen erlaubt einen Vergleich der Änderung der Proteinkonzentration in allen drei Messgruppen. Die erste Ableitung der Regression ergibt für alle drei Messgruppen eine Gerade zur x-Achse. Die Abnahme der Proteinmenge ist in der 1:1-Verdünnung rund doppelt so hoch wie in der 1:2-Verdünnung. Insgesamt können in den Verdünnungsreihen überwiegend negative Werte errechnet werden, die auf einen Osteokalzinverbrauch der Zelle hinweisen können. Lediglich in der Kontrollgruppe ist eine leichte Steigung und damit Zunahme der Proteinkonzentration im Medium vorzufinden.

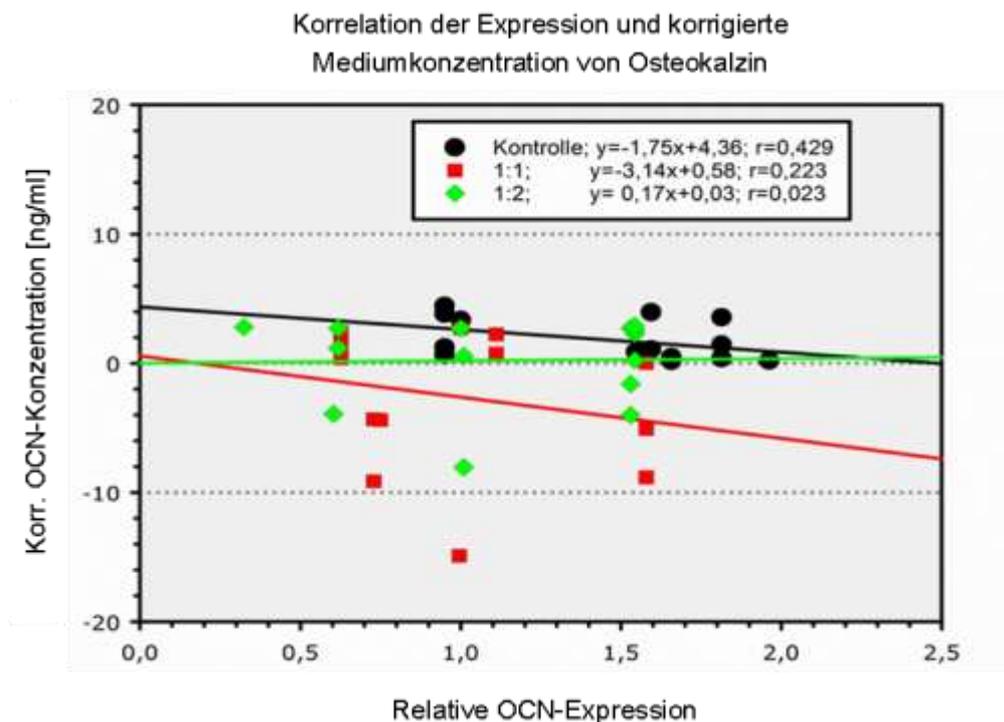


Abbildung 10: Korrelation der relativen Osteokalzinexpression und der Osteokalzinkonzentration (ng/ml) im Medium für die Verdünnungsreihen 1:1 und 1:2 und die Kontrollgruppe der Zellen aus dem humanen Beckenkamm (HBKZ). Es besteht keine strenge Korrelation ($n = 14$) zwischen der relativen Genexpression und der Proteinkonzentration für die drei getesteten Gruppen. Die Regressionen wurden zur besseren Veranschaulichung über die Datengrenzen hinaus dargestellt.

Um die Korrelation zwischen der Genexpression und Proteinkonzentration von Osteokalz zu überprüfen, wurden r , p und n für die Kontrollgruppe der HBKZ und die Verdünnungsreihen 1:1 und 1:2 bestimmt. Es zeigt sich, dass zwischen der relativen Osteokalzexpression und der OCN-Konzentration aufgrund der vorliegenden Daten dieser Untersuchung keine strenge Korrelation ($P > 0,05$; $n=14$) vorliegt. In Abbildung 10 ist jedoch sowohl bei der Kontroll- als auch bei der 1:1-Verdünnungsreihe der Trend festzustellen, dass mit abnehmender Konzentration die Expression steigt. Wie zuvor bereits beschrieben, demonstrieren die negativen Konzentrationswerte dabei einen Osteokalzverbrauch im Medium.

4 Diskussion

4.1 Methodik

Die Versuche im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden nach allgemein anerkannten Methoden durchgeführt. Die Anzucht der Zellkulturen erfolgte unter standardisierten Bedingungen und wurde unter strikter Einhaltung der Hygiene zum Schutz der heranwachsenden Zellen vorgenommen. Um die Zellzahl und die Zellaktivität zu bestimmen, wurden die CASY® *cell counting technology* sowie der MTT-Assay verwendet. Für die Bestimmung der Osteokalzinkonzentration wurde sowohl für die DHGZ-Kultur als auch für die HBKZ-Kultur der ONE Step ELISA genutzt, da zurzeit keine spezifischen Tests für die cerviden Proteine erhältlich sind. Wie jedoch Stéger et al. (2010) in ihrer Untersuchung herausstellen, besteht eine große Übereinstimmung der Gene, wie zum Beispiel Runx2 (Cbfa1) und Kollagen Typ 1 A1 (93%) bei den Säugetieren, in diesem speziellen Fall zwischen Mensch und Cerviden.

4.1.1 Zellzählung

Der **MTT-Assay** wurde erstmals 1983 von Mosmann beschrieben, um das Zellüberleben sowie die Proliferation von Säugetierzellen zu beschreiben (Mosmann 1983). Es basiert auf der Umwandlung von gelbem Tetrazolium-Salz (MTT) in das blau-violette Formazan. Die Reaktion wird von dem mitochondrialen Enzym Succinatdehydrogenase (Slater et al. 1963) in intakten metabolisch aktiven Zellen katalysiert. Das ausgefällte Formazan kann mit Hilfe der Spektralanalyse photometrisch bestimmt werden. Die Menge des produzierten Formazans ist dabei proportional zur Anzahl der lebenden Zellen (Denizot und Lang 1986; Ciapetti et al. 1993). Der Test wurde zur Messung der Proliferation der HBKZ nach DHGZ-Überstandsübertragung sowie zur Bestimmung des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens von DHGZ und HBKZ genutzt. Die CASY® *cell counting technology* war zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar. Denizot und Lang (1986) weisen darauf hin, dass der MTT-Test in der von Mosmann beschriebenen Form, eine geringe Sensitivität aufweist. Dies sei mit der schlechten Löslichkeit des entstandenen Formazan-Produktes, sowie einer damit verbundenen schlechteren Absorptionsmessung zu begründen. Die Autoren postulieren Modifikationen für die Durchführung des MTT-Assays und nennen dabei die Notwendigkeit, Medium im Serum zu vermeiden. Auch Scudiero et al. (1988) kritisieren die schlechte Löslichkeit des Formazans und führen als Alternative das *microculture tetrazolium assay* (MTA) an. Dabei entsteht ein wasserlösliches Formazan-Produkt, welches schneller in Lösung geht und eine sofortige Absorptionsmessung zulässt. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass der MTT-Test ausschließlich die vitalen Zellen

erfasst, da die Testreaktion nur von lebenden Zellen durchgeführt werden kann. In Ruhe- oder Differenzierungsphasen ist daher mit einer geringeren Sensitivität des Assays zu rechnen. Im Hinblick auf die Ergebnisse der MTT-Messungen ist nur eine geringe Fehlerquote festzustellen. Leichte Abweichungen können trotz Einhalten der Mengenangabe und der Inkubationszeiten durch Fehler in der Anwendung zustande gekommen sein. So kann eine fehlende Elimination von Medium im Serum (Denizot und Lang 1986) ein Grund für die geringen Unterschiede in den Proliferationsmessungen sein.

Im Differenzierungsversuch wurde zur Bestimmung der Zellzahl die **CASY® cell counting technology** verwendet, die auf dem Prinzip der Impedanzmessung (Coulter 1953) beruht. Diese weist im Hinblick auf die Bestimmung der Zellzahl eine hohe Sensitivität auf, weshalb in dem Differenzierungsversuch von einer geringen Fehlerquote ausgegangen werden kann. Weiterhin ermöglicht dieses Verfahren eine hohe Objektivierbarkeit der Ergebnisse und damit eine sichere Anwendung (Killemann und Schneider 2004).

4.1.2 ONE Step ELISA

Bei dem N-MID® ONE Step ELISA handelt es sich um einen immunologischen Test zur quantitativen Bestimmung von Osteokalzin. Dieses Verfahren diente der Bestimmung des Osteokalzins im Überstand. Wie Rosenquist et al. (1995) beschreiben, handelt sich dabei um eine sichere Methode, um sowohl die NH₂-terminale Sequenz (aa 17-19) als auch die mittlere Molekül-Sequenz (aa 20-43) nachweisen zu können. Dies ist, wie die Forschergruppe herausstellt, von Bedeutung, da Osteokalzin ein sehr instabiles Molekül ist. So liegen neben dem intakten Osteokalzin-Molekül im Serum unterschiedliche Osteokalzin-Fragmente vor (Lee 2000). Diese Instabilität ist mit dem Vorhandensein einer labilen Sechs-Aminosäure (COOH)-terminalen Sequenz zu begründen, die bei Raumtemperatur leicht gespalten wird. Allgemein kann der Osteokalzin-Nachweis durch eine Reihe von Immunassays erfolgen (Bouillon et al. 1992; Gundberg et al. 1985; Taylor et al. 1988; Monaghan et al. 1993). Heutzutage werden aber überwiegend *two-site-immunoassays* wie der One Step ELISA verwendet, um Probleme, die mit der Osteokalzinfragment-Bildung im Serum zusammenhängen, zu vermeiden (Swaminathan 2001). In dieser Untersuchung musste, da bisher kein ELISA-Testverfahren für das Osteokalzin der Hirschgeweihzellen verfügbar ist, im Rahmen der Konzentrationsmessung im DHGZ-Medium auf den humanen ELISA-Test zurückgegriffen werden.

4.2 Ergebnisse

Das Hirschgeweih besitzt die Fähigkeit, sich in einem immer wiederkehrenden Rhythmus neu zu regenerieren und weist dabei enorme Wachstumsgeschwindigkeiten von bis zu

20 mm pro Tag auf (Price und Allen 2004). Dieses starke Proliferations- und Differenzierungsvermögen der Hirschgeweihzellen konnte mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Überstand der Damhirsch-Zellkultur einen proliferations- und differenzierungsfördernden Effekt auf undifferenzierte humane mesenchymale Stammzellen ausübt.

4.2.1 Ergebnisse des Proliferationsversuches

Im Rahmen des Proliferationsversuches wurde zunächst das Wachstumsverhalten der Kontrollgruppen der DHGZ und HBKZ gegenübergestellt. Anschließend sollte der proliferationsfördernde Effekt des fraktionierten DHGZ-Überstandes auf die humanen mesenchymalen Beckenkammzellen untersucht werden (Abb. 1).

Die Gegenüberstellung des Wachstumsverhaltens von HBKZ und DHGZ zeigt eine mehr als doppelt so große Zunahme der Proliferationsrate der Hirschgeweihzellen pro Tag. So stieg die Ausgangszellzahl der DHGZ ($t_0 = 12000$ Zellen/Well) auf das 30-Fache an, während sich die Zellzahl der HBKZ ($t_0 = 3250$ Zellen/Well) um das 17-Fache vergrößerte. Dies veranschaulicht deutlich die herausragende Proliferationsstendenz der DHGZ. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der vorhandenen Literatur, in der die Wachstumsgeschwindigkeit der Hirschgeweihe als die „schnellste Organogenese“ im Tierreich beschrieben wird (Price et al. 2005).

Weiterhin sollte durch die Übertragung des fraktionierten DHGZ-Überstandes das Wachstumsverhalten der HBKZ positiv beeinflusst werden. Es wurde die Vermutung erhoben, dass die DHGZ-Zellkultur Faktoren synthetisiert und in das Medium abgeben würde, die ihrerseits eine proliferationsfördernde Wirkung auf die HBKZ ausüben würden. Bei der Geweihknochenzellkultur handelte es sich dabei um Mischkulturen, die sich aus fibroblastären Zellen, Chondrozyten, Osteoklasten, Osteoblasten und deren Vorläuferzellen zusammensetzte. Der postulierte proliferationsfördernde Effekt auf die HBKZ durch die direkte Überstandsübertragung konnte im Rahmen dieser Untersuchung bestätigt werden. So ließ der Einfluss des fraktionierten DHGZ-Überstandes auf die Zellkultur der HBKZ eine deutliche Beeinflussung auf das Proliferationsverhalten der DHGZ erkennen. In allen vier getesteten Verdünnungsreihen lag die Wachstumsrate der HBKZ höher als in der Kontrollgruppe. Der größte wachstumssteigernde Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe ließ sich bei den Verdünnungen 1:1 und 1:2 feststellen. Diese beiden Verdünnungsreihen wurden in einer parallel angeordneten Versuchsreihe durchgeführt. Eine spätere Versuchsreihe mit einer 1:3- und 1:5-Verdünnung zeigte, dass auch hier die höhere Konzentration von 1:3 im Gegensatz zur 1:5-Verdünnung einen stärkeren Effekt aufwies. Einen

ähnlich wachstumsfördernden Effekt durch die Übertragung eines direkten Überstandes konnten Laky et al. (2009) herausarbeiten. Die Forschergruppe stellte in *In-vitro*-Experimenten eine dosisabhängige Steigerung der Wachstumsrate von humanen alveolären Osteoblasten durch eine Überstandsübertragung einer Damhirsch-Zellkultur dar. Der durch die Überstandsübertragung herbeigeführte wachstumsfördernde Einfluss könnte, wie vermutet, durch Wachstumsfaktoren und Hormone des DHGZ-Überstandes hervorgerufen worden sein. Hier werden verschiedene Regulationsmechanismen in der Literatur beschrieben und diskutiert. Eine entscheidende Rolle im Zyklus aus Formation des Pedikels über die erste Umwandlung zum Geweih mit anschließendem Wachstum, bis hin zur Kalzifikation des Geweihs und dem Abstreifen der Geweihhaut kommt laut Li et al. (2003) dem Testosteron zu. Weiterhin weisen Faucheux et al. (2004) auf den Einfluss des Parathormons auf die Chondroblasten und Osteoklasten im Verlauf der Geweihentwicklung hin. Das endgültige Zusammenspiel der Regulationsmechanismen, welches für die hohe Wachstumsrate der Geweihzellen verantwortlich ist, ist noch nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. So werden die Wachstumsfaktoren IGF-1 (Elliott et al. 1992) und IGF-2 (Elliott et al. 1993) sowie die Zytokine *bone morphogenetic protein 2* (Feng et al. 1997) und *bone morphogenetic protein 4* (Feng et al. 1995) diskutiert. Auch die *transforming growth-β1* und *β2*-Faktoren und die Protokonkogene *c-fos* und *c-myc* konnten mittels RT-PCR von der Forschergruppe um Francis et al. (1998) in den vier Zonen der Geweihentwicklung zu jedem Zeitpunkt des Wachstums nachgewiesen werden. Insgesamt gilt es zu erwähnen, dass diese Faktoren wohlmöglich nicht spezies-spezifisch sind, sondern auch stimulierend auf die Zellen anderer Gattungen wirken könnten. In diesem Zusammenhang lassen sich mehrere Untersuchungen über die Übereinstimmung von Gensequenzen unterschiedlicher Wachstumsfaktoren zwischen mehreren Spezies finden. Im Rahmen ihrer Untersuchung über den Einfluss des *nerve growth factors* beim Prozess der Hirschgeweihregeneration und Ausbreitung der Axone von Neuronen in den Geweihspitzen prüften Li et al. (2007) die Übereinstimmung der Gensequenzen des *nerve growth factors*. Mit Hilfe der RT-PCR wurde für den *nerve growth factor* für Rinder, Menschen, Hirsche und Mäuse eine in allen drei Fällen größer 80%ige Übereinstimmung gefunden. Auch Stéger et al. (2010) kamen zu dem Ergebnis, dass durch die evolutionäre Konservierung strukturelle Ähnlichkeiten zwischen cerviden und humanen Genen bestehen.

4.2.2 Ergebnisse des Differenzierungsversuches

Der Differenzierungsversuch, der neben dem Proliferationsversuch den zweiten Teil dieser Untersuchung darstellte, beinhaltete zunächst eine Bestimmung der HBKZ-Zellzahl sowie anschließend eine Analyse verschiedener Knochenmarker.

Zu Beginn des Differenzierungsversuches wurde eine Messung der Zellzahl durchgeführt. Anders als im Proliferationsversuch erfolgte hier die Übertragung des gepoolten DHGZ-Überstandes, der im Zeitraum des Proliferationsversuches gesammelt wurde (Abb. 1). Überraschenderweise zeigte die Proliferation ein völlig anderes Ergebnis als im vorangegangenen Versuch. So fiel die Proliferation für die 1:1- und 1:2-Verdünnung geringer aus als für die Kontrollgruppe der HBKZ. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass eine stärkere Differenzierung der humanen mesenchymalen Stammzellen aus den Verdünnungsreihen zu Osteoblasten stattgefunden haben könnte. In Phasen der Differenzierung zeigen Zellen, wie Baksh et al. (2004) herausstellten, ein geringeres Wachstumsverhalten. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die möglichen „Differenzierungsfaktoren“ im Überstand eine größere Wirkung als die „Proliferationsfaktoren“ auf die HBKZ ausüben.

Um zu überprüfen, ob tatsächlich eine Differenzierung der humanen mesenchymalen Beckenkammzellen hin zu reifen Osteoblasten stattgefunden haben könnte, kamen verschiedene Knochenmarker zum Einsatz. Bei den humanen mesenchymalen Beckenkammzellen handelt es sich um pluripotente Stammzellen aus dem Knochenmarksstroma. Sie weisen ein hohes Differenzierungspotenzial auf. Aus ihnen gehen die Osteoblasten, Chondrozyten, Myozyten und die Stützgewebszellen des hämatopoetischen Systems hervor (Jerosch et al. 2002). Bei den Osteoblasten handelt es sich um die knochenbildenden Zellen, wohingegen die Osteoklasten den Knochenabbau bewirken. Die Osteoklasten entwickeln sich im Unterschied zu den Osteoblasten aus hämatopoetischen Stammzellen (Schwenzer und Ehrenfeld 2001). Sowohl Osteoblasten- als auch Osteoklastendifferenzierung werden durch diverse Regulationsmechanismen gesteuert. Die Osteoblastendifferenzierung wird dabei durch lokale Faktoren wie *bone morphogenetic proteins* (BMPs) reguliert. Diese sind Mitglied der Proteinsuperfamilie des transformierenden Wachstumsfaktors β (TGF β) und sind neben der Knochenbildung an der Nieren-, Darm-, Lungen- und Zahnentwicklung beteiligt (Schwenzer und Ehrenfeld 2011). Des Weiteren spielen Wachstumsfaktoren der Hedgehog-Familie wie Sonic- (Shh) und Indian-Hedgehog (Ihh) bei der Osteoblastendifferenzierung eine wichtige Rolle (Yamaguchi et al. 2000). Auf Ebene der Transkription wird die Osteoblastendifferenzierung maßgeblich vom Transkriptionsfaktor *core binding factor alpha 1* (Cbfa1) reguliert. Dieser bindet an das OSE2 (*osteoblast specific cis acting element*) und gehört als Protein zu der Runt-Familie. Cbfa1 stellt als Transkriptionsfaktor eine wichtige Schaltstelle zwischen Osteoblasten- und Chondrozyten-Entwicklung dar (Ducy et al. 2000). Weiterhin wirken verschiedene Homebox-Proteine bei der Transkription mit (Ducy 2000).

Die ausdifferenzierten Osteoblasten sind für die Bildung der nicht-mineralisierten Interzellularsubstanz verantwortlich, die sich überwiegend aus Typ-1-Kollagenen zusammensetzt. Diese wird im weiteren Verlauf zunehmend organisiert und schließlich mineralisiert (Stein et al. 1993). Die Osteoblastenfunktion und Aktivität wird dabei über zahlreiche parakrine und autokrine Faktoren wie BMP, Parathormon (PTH), Östrogene und andere Steroidhormone mittels Rezeptor reguliert (Jerosch et al. 2002). Außerdem ist *Cbfa1* auch an der Osteoblastenfunktion beteiligt, indem es die Expression von Osteokalzin beeinflusst (Ducy 2000).

Der Knochenstoffwechsel unterliegt fortwährend dem Einfluss von Osteoblasten und Osteoklasten, wodurch ein ständiger Wechsel von Knochenresorption und Knochenneubildung stattfindet. Dieser als *remodelling* (Ducy et al. 2000) bezeichnete Knochenumbau ermöglicht es dem Knochen, sich fortwährend auf veränderte Belastungs- und Stoffwechselsituationen einzustellen und darauf zu reagieren. Sowohl der Knochenaufbau als auch der Knochenabbau lassen sich mit Hilfe unterschiedlicher Knochenmarker beschreiben. Im Rahmen dieser Untersuchung liegt das Augenmerk auf der Knochenneubildung, die durch direkte oder indirekte Produkte von aktiven Osteoblasten markiert werden kann. Die Marker sind dabei zu unterschiedlichen Phasen der Osteoblastenentwicklung nachweisbar und geben Hinweise auf das Entwicklungsstadium der knochenbildenden Zellen (Seibel 2000). Stein und Mitarbeiter (1996) beschreiben vier Entwicklungsstadien, in denen ein unterschiedliches Expressionsmuster von Genen vorzufinden ist. Das erste Stadium stellt die Proliferation der Zellen dar, dem sich die Reifung, Organisation und schließlich Mineralisation der extrazellulären Matrix (ECM) anschließen. Es folgt das Stadium des reifen Knochens, welches in eine Apoptose übergehen kann (Seymour 2010). Madras et al. 2002 weisen jedoch darauf hin, dass eine solche Stadieneinteilung nicht vorgenommen werden kann. Dafür untersuchten sie 99 Osteoprogenitor/Osteoblasten-Kolonien auf das Vorhandensein von neun für die Knochenentwicklung charakteristischen Genen. Bei den Markern der Knochenneubildung handelt es sich zum einen um Nebenprodukte der Kollagen-Synthese, hier vor allem der Propeptide des Typ-1-Kollagens. Zum anderen dienen osteoblastenspezifische Proteine wie das Osteokalzin (OCN) und die Alkalische Phosphatase (AP) nicht nur dem Nachweis der Knochenneubildung, sondern sind auch Marker für die Gegenwart reifer Osteoblasten.

Um das Differenzierungsverhalten der HBKZ analysieren zu können, wurde mit Hilfe der PCR und Gelelektrophorese die Expression der Knochenmarker **Osteokalzin**, **Kollagen Typ 1** und **Cbfa1** im zeitlichen Verlauf bestimmt. In der vorliegenden Untersuchung verweisen wir auf die Einteilung der unterschiedlichen Entwicklungsstadien nach Stein. Dies

ermöglicht es, einen zeitlichen Zusammenhang zum Differenzierungsverhalten der Zellen herzustellen. Nachdem im ersten Teil der Untersuchung bereits ein proliferationsfördernder Effekt durch eine direkte DHGZ-Überstandsübertragung auf die HBKZ-Zellkultur bewiesen werden konnte, galt es im Differenzierungsversuch zu untersuchen, welchen Differenzierungsweg die humanen mesenchymalen Beckenkammzellen einschlagen würden.

Der Transkriptionsfaktor (**Cbfa1**, synonym: **Runx2**) ist ein Mitglied der Runt-Protein-Familie. Durch die Bindung an das osteoblastenspezifische *cis-acting element* (OSE) veranlasst Cbfa1 die Expression von Osteokalzin (Ducy et al. 1997, 2000). Daneben findet sich das OSE2-Element auch in den Genen für Kollagen Typ 1, *bone sialoprotein* (BSP) und Osteopontin (Yamaguchi et al. 2000; Ducy et al. 1997, 2000). Die Expression von Cbfa1 findet ausschließlich in skelettalen Strukturen und den Odontoblasten, den zahnbildenden Zellen, statt. In Weichgeweben wird es hingegen nicht gefunden (Ducy et al. 1997, 2000). Cbfa1 kommt bereits in mesenchymalen Stammzellen und frühen Knochenvorläuferzellen vor und kann deswegen als frühester Marker der Osteoblastendifferenzierung angesehen werden (Aubin und Triffitt 2002). Sein Vorhandensein in der entdifferenzierten Zelle verdeutlicht darüber hinaus aber auch seine Bedeutung für die Funktion der Osteoblasten. Es ist maßgeblich dafür verantwortlich die Schnittstelle zwischen Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung zu regulieren. So konnten Yamaguchi und Mitarbeiter (2000) nachweisen, dass Cbfa1 sowohl an der Reifung der Chondrozyten als auch an der Bildung von Osteoklasten beteiligt ist. In zahlreichen *In-vivo*- und *In-vitro*-Experimenten wurde die Bedeutung von Cbfa1 herausgestellt. Ducy und Mitarbeiter (1997) konnten in *In-vitro*-Experimenten zeigen, dass Cbfa1 in nicht-osteoblastären Zellen die Expression von osteoblastenspezifischen Genen induzieren kann. *In-vitro*-Experimente an Mäusen mit einem Cbfa1-Mangel konnten die Bedeutung von Cbfa1 für die Osteoblastendifferenzierung und Funktion unterstreichen. Die Mäuse zeigten in der Untersuchung ein rein knorpeliges Skelett und exprimierten keine Marker reifer Osteoblasten. Auch war die Konzentration von Osteopontin und Kollagen Typ 1 sehr niedrig. Die Tatsache, dass bei Fehlen von Cbfa1 eine Ossifikation unterbleibt, zeigt, dass Cbfa1 eine wichtige Schlüsselfunktion in der Osteoblastenentwicklung einnimmt und nicht durch einen anderen Signalweg überbrückt werden kann (Ducy 2000; Yamaguchi et al. 2000).

Cbfa1 wird, wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, sowohl in der Kontrollgruppe der HBKZ als auch in den Verdünnungsreihen 1:1 und 1:2 exprimiert. Wie in der Literatur beschrieben, wird Cbfa1 sowohl in den Osteoprogenitorzellen als auch von reifen Osteoblasten gebildet. Dies zeigt sich auch anhand der Ergebnisse, die eine Expression über den gesamten Versuchszeitraum beschreiben. Damit kann angenommen werden, dass in al-

len drei Versuchsgruppen eine Osteoblastendifferenzierung stattgefunden hat. Außerdem kann das Vorhandensein bereits entdifferenzierter Osteoblasten vermutet werden. Es lassen sich jedoch in den drei Versuchsgruppen unterschiedliche Intensitäten im Expressionsmuster erkennen, wobei die Expression der 1:1-Verdünnung am höchsten liegt und ein Maximum von 14 bis zum 13. Tag der Kultur zeigt.

Kollagen-Typ 1 gehört zu den Hauptbestandteilen der extrazellulären Knochenmatrix (ECM). Weiterhin kommt es in anderen Strukturen wie der Haut, dem Dentin, der Kornea, Gefäßen, Faserknorpel und den Sehnen vor (Seibel 2005). Es wird in Form von Propeptiden von den Osteoblasten synthetisiert. Diese Prekursor-Moleküle weisen zwei kurze terminale Propeptide auf. Dazu gehört das Amino (N-) terminale Propeptid (PINP) und das Carboxy (C-) terminale Propeptid (PICP) (Burgeson 1988; Seibel 2005). Nach der Sekretion in den extrazellulären Raum erfolgt eine enzymatische Spaltung durch Endoproteasen. Anschließend können die Propeptide in die freie Zirkulation abgegeben und nachfolgend in die ECM eingebaut werden (Swaminathan 2001). Sowohl das C-terminale als auch das N-terminale Propeptid des Typ-1-Kollagens können durch Immunassays im Serum nachgewiesen werden. Insgesamt fungieren sie als potente Marker für die Osteoblasten- und Fibroblasten-Proliferation. Sie sind jedoch nicht rein knochenspezifisch, was im Rahmen dieser Untersuchung berücksichtigt werden muss (Biegemayer et al. 2006). Im Zusammenhang der zeitlichen Einteilung des Differenzierungsvorganges stellen die Propeptide einen Marker für die proliferative Phase und das Stadium der Matrixablagerung dar. Es findet zwar bereits in den Knochenvorläuferzellen eine Expression statt, diese wird aber erst im weiteren Entwicklungsverlauf hochreguliert. Das Maximum der Expression von Kollagen Typ 1 findet sich, wie zur Nieden et al. (2003) zeigen, erst gegen Ende der Osteoblastendifferenzierung.

Kollagen Typ 1 wird in der vorliegenden Untersuchung in allen drei Versuchsgruppen über den getesteten Versuchszeitraum exprimiert. Diese Ergebnisse decken sich mit der Literatur. Es lässt sich jedoch, anders als in der Literatur beschrieben, kein Expressionsmaximum feststellen. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Seymour (2010). Die Expression von Kollagen Typ 1 lässt jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse auf das Vorhandensein von osteoblastären Vorläuferzellen und reifen Osteoblasten zu. Kollagen Typ 1 wird auch von anderen Zelltypen produziert. Während die Expression der 1:1-Verdünnung höher als die der Kontrollgruppe liegt, zeigt die 1:2-Verdünnung nur eine sehr geringe Expression von Kollagen Typ 1.

Die Synthese von **Osteokalzin**, welches auch als Bone-Gla-Protein bezeichnet (BPG) wird und ein aus 49 Aminosäuren zusammengesetztes Protein darstellt, ist auf Osteoblasten, Odontoblasten und hypertrophe Chondrozyten beschränkt (Hauschka et al. 1989; Calvo et al. 1996). Damit ist es knochenspezifisch und kann als Marker für die Knochenformation herangezogen werden. Mit einem Anteil von 1-20% an den nicht kollagenen Proteinen ist es am Aufbau der Knochenmatrix beteiligt (Hauschka et al. 1989). Hauptmerkmal des Osteokalzin-Moleküls sind drei Gamma-Carboxyglutamic-Säure (Gla)-Reste, welche Vitamin K-abhängig synthetisiert werden und für die hohe Ca^{2+} -Bindungsfähigkeit verantwortlich sind (Seibel 2005; Price 1988). Weiterhin ist die hohe Affinität für Hydroxylapatit charakteristisch. Der größte Teil des Osteokalzins ist daher in die extrazelluläre Matrix eingebaut und nur ein kleiner Anteil ist frei in der Zirkulation vorhanden. Dieses freie Serum-Osteokalzin unterliegt einer schnellen glomerulären Filtration, weshalb die Halbwertszeit nur wenige Minuten beträgt (Swaminathan 2001). Die Funktionen des Osteokalzins sind noch nicht abschließend geklärt, es scheint aber vor allem in der Phase des *remodelling* eine wichtige Rolle zu spielen (Seibel 2005). Ducy et al. (1996) veranschaulichen dies im Zusammenhang mit Untersuchungen an Mäusen mit einem Osteokalzin-Mangel. Diese weisen eine hohe Knochenmasse bei gleichzeitig verminderter funktioneller Qualität auf. Damit verweisen Ducy et al. (1996) auf die Rolle des Osteokalzins als determinierender Faktor für die regelhafte Knochenformation. Als Marker dient Osteokalzin dem Nachweis ausdifferenzierter Osteoblasten, da die Expression ausschließlich postproliferativ erfolgt und mit der Mineralisation der extrazellulären Matrix einhergeht (Ducy 2000). So besteht nach Brown (1984) eine enge Korrelation zwischen der Serum-Osteokalzinkonzentration mit der Knochenformation und Mineralisation.

Osteokalzin wird in der vorliegenden Untersuchung in allen drei Versuchsgruppen über den gesamten Zeitraum exprimiert. Auch wenn Osteokalzin in der Literatur als Marker für reife Osteoblasten angesehen wird, ist hier bereits zu Beginn des Versuchsablaufes eine Expression erkennbar. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass in allen drei Ansätzen schon einige reife Osteoblasten vorhanden sind. Die Ergebnisse der relativen Intensität der Expression der 1:1- und 1:2-Verdünnung unterscheiden sich nicht signifikant von den Werten der Kontrollgruppe. Die Steigung der Regressionen (Abbildung 9 A) der relativen Expression der drei Gruppen unterscheidet sich in ihrem Verhalten leicht voneinander. Die Kontrolle zeigt eine leichte positive, während die 1:2-Verdünnung eine geringe negative Steigung aufweist und sich die 1:1-Verdünnung mit parallelem Verlauf zur Zeitachse gar nicht ändert. Im Gegensatz dazu zeigen die Regressionen der Osteokalzinkonzentrationen im Überstand ein anderes Verhalten. Die Osteokalzinkonzentration im

Medium der Kontrollgruppe fällt leicht ab, zeitweise auf Werten unterhalb des Ausgangswertes von 3,5 ng/ml. Bei den Kulturen, die mit der 1:1- und 1:2-Verdünnung beimpft wurden, ist hingegen eine ausgeprägte Abnahme der Osteokalzinkonzentration zu beobachten. Hier wurden überwiegend sogar negative Werte errechnet (Abbildung 9 B). Diese Abnahme der Konzentration kann auf der einen Seite damit erklärt werden, dass nur ein geringer Anteil von Osteokalzin in der Peripherie frei vorhanden ist. Der weitaus größere Teil liegt stets an Hydroxylapatit gebunden in der ECM vor (Swaminathan 2001). Es ist daher denkbar, dass nur ein geringer Anteil von Osteokalzin in das Medium abgegeben wurde. Wie bereits Seymour (2010) herausstellte, handelt es sich hierbei jedoch eher um einen Verbrauch von Osteokalzin, da in der Kürze der Versuchszeit keine Bildung einer mineralisierten extrazellulären Matrix stattgefunden haben dürfte. Für den Verbrauch von Osteokalzin spricht auch die Tatsache, dass nach neueren Erkenntnissen Osteokalzin im Rahmen des Runx2-Osteokalzin-Insulin-Signalweges eine hormonähnliche Funktion auf den Energiestoffwechsel ausübt. So wirkt es sich positiv auf die Bildung von Insulin aus den β -Zellen und Adiponektin in den Adipozyten aus (Lee et al. 2007; Stéger et al. 2010).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass sowohl in der Kontrollgruppe der HBKZ als auch in den Verdünnungsreihen 1:1 und 1:2 reife Osteoblasten vorzufinden sind. Dies ist auf die Expression der entsprechenden Markergene zurückzuführen, wobei in den Verdünnungsreihen eine stärkere Expression, vor allem von Cbfa1 nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass durch die Übertragung eines Überstandes der DHGZ-Kultur die Differenzierung zu reifen Osteoblasten positiv beeinflusst werden konnte. Hinsichtlich der Osteokalzinkonzentration konnte überraschenderweise festgestellt werden, dass trotz Übertragung von Osteokalzin aus dem Medium der DHGZ eine Abnahme der Konzentration und damit ein möglicher Verbrauch durch die HBKZ stattgefunden hat. Diese Tatsache sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, da Osteokalzin weitaus komplexere Wirkungen zu haben scheint, als bisher angenommen.

Wie aus der Korrelation der relativen Osteokalzinexpression und der gemessenen Proteinkonzentration von Osteokalzin hervorgeht (Abbildung 10), zeigen beide Parameter keine eindeutige Abhängigkeit voneinander. Tendenziell kann aber auf Grund der Regressionen eine umgekehrte Proportionalität beider Parameter vermutet werden. Vor allem in der 1:1-Verdünnungsreihe und der Kontrollgruppe der humanen Beckenkammzellen zeigt sich bei Abnahme der Konzentration eine Steigerung der Expression.

5 Zusammenfassung

Im Gegensatz zu den Cerviden, die in einem jährlich wiederkehrenden Rhythmus ihre Geweihe erneuern können, haben alle Säugetiere die Fähigkeit zur vollständigen Organregeneration verloren. Damit rückte das Hirschgeweih seit Jahren in den Fokus der Wissenschaft. So stellt es aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum menschlichen Knochen ein einzigartiges Modell für die osteogene Forschung dar. Die Entschlüsselung seines schnellen Wachstums und seiner Regeneration könnten deshalb im Rahmen der Geweberegeneration (*tissue engineering*) in der Medizin genutzt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem Screening-Test den Effekt des Zellkulturüberstandes von Damhirschgeweihzellen (DHGZ) auf die Proliferation von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Beckenkamm (HBKZ) und deren mögliche Differenzierung zu reifen Osteoblasten zu untersuchen. Mit dem Test sollte überprüft werden, ob in dem DHGZ-Überstand Wachstumsfaktoren beziehungsweise Zytokine enthalten sind, die die Proliferation und Differenzierung speziesunabhängig von Zellen anregen können.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass durch die Übertragung eines Überstandes der DHGZ-Kultur die Proliferation der HBKZ positiv beeinflusst werden konnte. So fiel die relative Proliferationsrate in den Verdünnungsreihen, die mit einem Gemisch aus kommerziellem Medium und dem Überstand der Damhirsch-Zellkultur beimpft wurden, höher aus als in der Kontrollgruppe der humanen Beckenkammzellen. Diese erhielt ausschließlich kommerzielles Medium (DMEM). Der proliferationsfördernde Effekt war umso größer, je höher der Anteil des Überstandes am Medium war. Während die Kontrollgruppe der HBKZ eine Proliferationsrate von 3 zeigte, konnte in den Verdünnungsreihen 1:1 und 1:2 eine Steigerung der Proliferationsrate um jeweils das 25-Fache nachgewiesen werden.

Um das Differenzierungsverhalten der humanen Beckenkammzellen zu beschreiben, wurde die relative Expression der Knochenmarker Cbfa1, Osteokalzin und Kollagen Typ 1 und die Osteokalzinkonzentration im Medium bestimmt. Auch hier konnte ein Effekt durch die Übertragung des DHGZ-Überstandes festgestellt werden. So lag die Expression von Cbfa 1 - als potenter und frühester Marker der Osteoblastendifferenzierung - vor allem in der 1:1-Verdünnung fast doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe der humanen Beckenkammzellen. Trotz des Vorliegens von reifen Osteoblasten in den Verdünnungsreihen und Übertragung von Osteokalzin durch das DHGZ-Medium zeigte sich eine Abnahme der Osteokalzinkonzentration im Medium der humanen Beckenkammzellen. Dieses überraschende Ergebnis lässt vermuten, dass wahrscheinlich ein Verbrauch von Osteokalzin

durch die humanen Beckenkammzellen stattgefunden hat. Dies stimmt mit neueren Erkenntnissen überein, wonach Osteokalzin nicht nur beim Mineralisationsprozess der extrazellulären Matrix (ECM), sondern auch im Rahmen des Energiestoffwechsels eine Rolle spielt.

Weitere Untersuchungen müssen klären, welche Wachstumsfaktoren oder Botenstoffe für die Proliferationssteigerung und die Veränderung des Differenzierungsverhaltens der humanen Beckenkammzellen ursächlich verantwortlich sind.

6 Anhang

Tab. 2 Medien und Zusätze

Medium/Zusätze	Bestellnummer	Hersteller
DMEM 3,7 g/NaHCO ³ 1g/l D Cat. No.-Glucose 1,028 g/l stable Glutamin		ICN Biomedicals
Gentamycin (2%)	A 2712	Biochrom AG, Berlin www.biochrom.de
Fetales Kälberserum FBS (10%)	S 0115	Biochrom AG, Berlin www.biochrom.de
Trypsin-EDTA (0,05% Trypsin mit EDTA 4Na), flüssig		GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com
D-PBS (Phosphate Buffered Saline)	14190-094 No calcium, no magnesium?	GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com
DMSO (Dimethylsulfoxid)	500 ml → 317275-500ML 100 ml → 317275-100ML	Merck www.merckmillipore.com
Certified Molecular Biology Agarose	161-3101	Bio-Rad Laboratories GmbH, München www.bio-rad.com
UltraPure 10mg/ml Ethidium Bromid	15585-011	GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com
Tris-Borate-EDTA (TBE) Puffer, dry blend, 5xkonzentriert	93309	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim am Albuch www.sigmaldrich.com
N-MID[®] Osteocalzin One Step ELISA		Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev, Dänemark www.nbdiagnostics.com Osteometer Biotech A/S
Rneasy Protect Mini Kit (250)	74126	QIAGEN GmbH, Hilden www.qiagen.com
Rnase-Free Dnase Set (50)	79254	QIAGEN GmbH, Hilden www.qiagen.com
iScript[™] cDNA Synthesis Kit 100	170-8891	Bio-Rad Laboratories GmbH, München www.bio-rad.com

Primer Mix (GADPH, Kollagen Typ 1, Osteokalzin, Cbfa 1)		IBA GmbH, Göttingen www.iba-go.com
Go Taq Green Master Mix	M7112	Promega GmbH, Mannheim www.promega.com
Nuclease free Water	P1193	Promega GmbH, Mannheim www.promega.com
100 bp DNA-Leiter	15628-050	GIBCO Invitrogen Corporation, Karlsruhe www.invitrogen.com
70%iges Ethanol		Merck www.merckmillipore.com
Agarose-Gel		Bio-Rad Laboratories GmbH, München www.bio-rad.com
MTT-Test-Lösung	M5655	SIGMA Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim am Al- buch www.sigmaaldrich.com

Tab. 3 Labormaterialien und –geräte

Material	Bestellnummer	Hersteller
6- Well-Platte		Nunc™ www.thermoscientific.com
Petrischale		Nunc™ www.thermoscientific.com
75 cm ² Kulturflaschen		
Sterile E-Cups		Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de
Reagenzröhrchen		
Küvette		Nunc™ www.thermoscientific.com
Präzisionspipetten 10-1000 µl Research		Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de
Glaspipetten		Brand GmbH & Co KG www.brand.de
Zellschaber (24 cm)	Artikel-Nr.: 99002- TTP	TPP www.tpp.ch
Zentrifugenröhrchen (1× 50 ml)		SIGMA www.sigma-zentrifugen.de
Zentrifuge	Modell 2K 15C	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz www.sigma-zentrifugen.de
Casy-Cell-Counter Modell TT		Schärfe System GmbH, Reutlingen www.casy-technologie.com
Brutschrank, CO ₂ -Inkubator		Sanyo Biomedical, Ewald Inno- vationstechnik GmbH www.sanyo-biomedical.de
Wasserbad		Memmert GmbH & Co.KG Schwabach www.memmert.de
Mikroskop		Zeiss HAL 100
Plattenphotometer	Fa. ICN Titertek Multiskan MCC/340	ELISA Reader
Gelelektrophoresekammer	Modell: Elite 300 Plus	Harnischmacher Labortechnik, Kassel www.harnischmacher.net
Kyroröhrchen, steril	363401	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark www.nuncbrand.de
NALGENE Cryo 1°C	5100-0001	Nalge Europe Ltd. Neerijse,

Freezing Container		Belgien www.nalgenunc.com
Stickstofftank		Air Liquide-Division Matériel Cryogénique, Frankreich www.dmc.airliquide.com
Zellschaber (24 cm)	(Art. Nr. 9902)	TPP www.tpp.ch
QIAshredder 250	79656	QIAGEN GmbH, Hilden www.qiagen.de
Bio Doc Analyse Biometra Ti 5		Biometra GmbH i.L., Göttingen www.biometra.com
Proteingängiger Sterilfilter (Porendurchmesser 20 µm)		Sartorius AG, Göttingen www.sartorius.de
Master Cycler gradient /RT-PCR Mastercycler ep		Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de
PCR soft strips 0,2 ml, gemischte Farben	710988	Biozym Scientific GmbH, Hesisch Oldendorf www.biozym.com
Spektrophotometer/BioPhotometer		Eppendorf AG, Hamburg www.eppendorf.de
Plattenphotometer		ELISA Reader, Fa. ICN Titertek Multiskan MCC/340
Sterilbank		Biohazard
Neubauer-Zählkammer 0,0025 mm²		Optik Labor www.lo-laboroptik.de

7 Literaturverzeichnis

Aubin JE, Triffitt JT: Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation (Chapter 4). In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (Hrsg.): Principles of Bone Biology Volume 1. 2. Auflage; Academic Press; San Diego 2002, 59-83

Baksh D, Song L, Tuan RS (2004): Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8(3), 301–316

Bieglmayer C, Clodi M, Kudlacek S (2006): Biomarker in der Osteologie: Aktueller Stand. *J Miner Stoffwechs* 13 (3), 82–87

Bouillon R, Vanderschueren D, Van Herck E, Nielsen HK, Bex M, Heyns W, Van Baelen H (1992): Homologous Radioimmunoassay of Human Osteocalcin. *Clin Chem* 38 (10), 2055–2060

Brown JP, Delmas PD, Malaval L, Edouard C, Chapuy MC, Meunier PJ (1984): Serum Bone Gla-Protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 323 (8386), 091–1093

Bubenik GA, Bubenik AB, Brown GM, Wilson DA (1975): The Role of Sex Hormones in the Growth of Antler Bone Tissue. *Endocrine and Metabolic Effects of Antiandrogen Therapy. J Exp Zool* 194, 349–358

Burgeson RE (1988): New Collagens, New Concepts. *Ann Rev Cell Biol* 4, 551–577

Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM (1996): Molecular Basis and Clinical Application of Biological Markers of Bone Turnover. *Endocr Rev* 17 (4), 333–368

Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A (1993): In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* 14 (5), 359–364

Coulter WH (1953): Means for counting particles suspended in a fluid. Veröffentlichungsnr: DE964810C. Prioritätsdaten: 27.08.1949

Denizot F, Lang R (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J Immunol Methods* 89 (2), 271–277

Ducy P (2000): Cbfa1: A Molecular Switch in Osteoblast Biology. *Dev Dyn* 219, 461–471

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

- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997):** *Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation.* *Cell* 89, 747–754
- Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000):** The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *Science* 289 (5484), 1501–1504
- Elliott JL, Oldham JM, Ambler GR, Bass JJ, Spencer GSG, Hodgkinson SC, Breier BH, Gluckman PD, Suttie JM (1992):** Presence of Insulin-Like Growth Factor-I Receptors and Absence of Growth Hormone Receptors in the Antler Tip. *Endocrinology* 130 (5), 2513–2520
- Elliott JL, Oldham JM, Ambler GR, Molan PC, Spencer GSG, Hodgkinson SC, Breier BH, Gluckman PD, Suttie JM, Bass JJ (1993):** Receptors for insulin-like growth factor-II in the growing tip of the deer antler. *J Endocrinol* 138, 233
- Faucheux C, Nicholls BM, Allen S, Danks JA, Horton MA, Price JS (2004):** Recapitulation of the Parathyroid Hormone-Related Peptide-Indian Hedgehog Pathway in the Regenerating Deer Antler. *Dev Dyn* 231 (1), 88–97
- Feng JQ, Chen D, Esparza J, Harris MA, Mundy GR, Harris SE (1995):** Deer antler tissue contains two types of bone morphogenetic protein 4 mRNA transcripts. *Biochim Biophys Acta* 1263 (2), 163–168
- Feng JQ, Chen D, Ghosh-Choudhury N, Esparza J, Mundy GR, Harris SE (1997):** Bone morphogenetic protein 2 transcripts in rapidly developing deer antler tissue contain an extended 5' non-coding region arising from a distal promoter. *Biochim Biophys Acta* 1350 (1), 47–52
- Francis SM, Suttie JM (1998):** Detection of Growth Factors and Proto-Oncogene mRNA in the Growing Tip of Red Deer (*Cervus elaphus*) Antler Using Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *J Exp Zool* 281, 36–42
- Goss RJ (1968):** Inhibition of Growth and Shedding of Antlers by Sex Hormones. *Nature* 220, 83–85
- Goss RJ:** *Deer Antlers: Regeneration, Function and Evolution.* Academic Press, New York 1983
- Gundberg CM, Wilson PS, Gallop PM, Parfitt AM (1985):** Determination of Osteocalcin in Human Serum: Results with Two Kits Compared with Those by a Well-Characterized Assay. *Clin Chem* 31 (10), 1720–1723
- Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gundberg CM (1989):** Osteocalcin and Matrix Gla Protein: Vitamin K-Dependent Proteins in Bone. *Physiol Rev* 69 (3), 990–1047

- Jerosch J, Bader A, Uhr G:** Knochen. Curasan Taschenatlas spezial. 1. Auflage; Thieme, Stuttgart 2002
- Kierdorf U, Kierdorf H, Knuth S (1995):** Effects of Castration on Antler Growth in Fallow Deer (*Dama dama* L.). *J Exp Zool* 273, 33–43
- Killemann U, Schneider E. (2004):** Vergleich verschiedenster Methoden zur Bestimmung von Zellzahlen und Zellvitalitäten bei der Optimierung der Formulierung von Kulturmedien mit Hybridoma-Zellen. *BIOspektrum* 10, 1–3
- Kolle R, Kierdorf U, Fischer K (1993):** Effects of an Antiandrogen Treatment on Morphological Characters and Physiological Functions of Male Fallow Deer (*Dama dama* L.). *J Exp Zool* 267, 288–298
- Laky M, Qu Z, Ho E, Ulm C, Matejka M, Rausch-Fan X (2009):** The effect of deer antler growth factor on the viability and proliferation of primary human alveolar osteoblast cells in vitro. *J Stomat Occ Med* 2(4), 175–178
- Lee AJ, Hodges S, Eastell R (2000):** Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 37, 432–446
- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G (2007):** Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. *Cell* 130, 456–469
- Li C, Suttie JM (1994):** Light Microscopic Studies of Pedicle and Early First Antler Development in Red Deer (*Cervus elaphus*). *Anat Rec* 239, 198–215
- Li C, Littlejohn RP, Corson ID, Suttie JM (2003):** Effects of testosterone on pedicle formation and its transformation to antler in castrated male, freemartin and normal female red deer (*Cervus elaphus*). *Gen Comp Endocrinol* 131 (1), 21–31
- Li C, Stanton JAL, Robertson TM, Suttie JM, Sheard PW, Harris AJ, Clark DE (2007):** Nerve Growth Factor mRNA Expression in the Regenerating Antler Tip of Red Deer (*Cervus elaphus*). *PloS one* 2(1), 148
- Li C, Suttie JM, Clark DE (2005):** Histological Examination of Antler Regeneration in Red Deer (*Cervus elaphus*). *Anat Rec Part A* 282A, 163–174
- Madras N, Gibbs AL, Zhou Y, Zandstra PW, Aubin JE (2002):** Modeling Stem Cell Development by Retrospective Analysis of Gene Expression Profiles in Single Progenitor-Derived Colonies. *Stem Cells* 20, 230–240

- Monaghan DA, Power MJ, Fottrell PF (1993):** Sandwich Enzyme Immunoassay of Osteocalcin in Serum with Use of an Antibody against Human Osteocalcin. *Clin Chem* 39 (6), 942–947
- Mosmann T (1983):** Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods* 65 (1-2), 55–63
- Muir PD, Sykes AR, Barrell GK (1988):** Changes in blood content and histology during growth of antlers in red deer (*Cervus elaphus*) and their relationship to plasma testosterone levels. *J Anat* 158, 31–42
- Price J, Allen S (2004):** Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359 (1445), 809–822
- Price JS, Allen S, Faucheux C, Althnaian T, Mount JG (2005):** Deer antlers: a zoological curiosity or the key to understanding organ regeneration in mammals? *J Anat* 207, 603–618
- Price PA (1988):** Role of Vitamin-K-Dependent Proteins in Bone Metabolism. *Annu Rev Nutr* 8, 565–583
- Rolf HJ, Fischer K (1996):** Serum Testosterone, 5- α -Dihydrotestosterone and Different Sex Characteristics in Male Fallow Deer (*Cervus dama*): A Long-term Experiment with Accelerated Photoperiods. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 115 (3), 207–221
- Rolf HJ, Enderle A (1999):** Hard Fallow Deer Antler: A Living Bone Till Antler Casting? *Anat Rec* 255, 69–77
- Rolf HJ, Kierdorf U, Kierdorf H, Schulz J, Seymour N, Schliephake H, Napp J, Niebert S, Wölfel H, Wiese KG (2008):** Localization and Characterization of STRO-1⁺ Cells in the Deer Pedicle and Regenerating Antler. *PloS one* 3 (4), 2064
- Rosenquist C, Qvist P, Bjarnason N, Christiansen C (1995):** Measurement of a More Stable Region of Osteocalcin in Serum by ELISA with Two Monoclonal Antibodies. *Clin Chem* 41 (10), 1439–1445
- Sadighi M, Haines SR, Skottner A, Harris AJ, Suttie JM (1994):** Effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II on the growth of antler cells in vitro. *J Endocrinol* 143, 461–469
- Schmitz S:** *Der Experimentator*. 3. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2011

Schwenzer N, Ehrenfeld M: Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie. 4. Auflage; Thieme, Stuttgart 2010

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR (1988): Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res* 48, 4827–4833

Seibel MJ (2000): Molecular Markers of Bone Turnover: Biochemical, Technical and Analytical Aspects. *Osteoporos Int* 6, 18–29

Seibel MJ (2005): Biochemical Markers of Bone Turnover. Part I: Biochemistry and Variability. *Clin Biochem Rev* 26, 97–122

Seymour N: Lokalisation, Proliferation und Differenzierung von STRO-1⁺-positiven Zellen aus dem Geweih von Damhirschen (*Dama dama*). Med. Diss. Göttingen 2010

Slater TF, Sawyer B, Sträuli U (1963): Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. *Biochim Biophys Acta* 77, 383–393

Stéger V, Molnár A, Borsy A, Gyurján I, Szabolcsi Z, Dacs G, Molnár j, Papp P, Nagy J, Puskás L, Barta E, Zomborszky Z, Horn P, Podani J, Semsey S, Lakatos P, Orosz L (2010): Antler development and coupled osteoporosis in the skeleton of red deer *Cervus elaphus*: expression dynamics for regulatory and eVector genes. *Mol Genet Genomics* 284, 273–287

Stein GS, Lian JB (1993): Molecular Mechanisms Mediating Proliferation/ Differentiation Interrelationships During Progressive Development of the Osteoblast Phenotype. *Endocr Rev* 14 (4), 424–442

Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M (1996): Transcriptional Control of Osteoblast Growth and Differentiation. *Physiol Rev* 76 (2), 593–629

Suttie JM, Lincoln GA, Kay RNB (1984): Endocrine control of antler growth in red deer stags. *J Reprod Fert* 71, 7–15

Swaminathan R (2001): Biochemical markers of bone turnover. *Clinica Chimica Acta*, 313 (1-2), 95–105

Taylor AK, Linkhart SG, Mohan S, Baylink DJ (1988): Development of a New Radioimmunoassay for Human Osteocalcin: Evidence for a Midmolecule Epitope. *Metabolism* 37 (9), 872–877

Wislocki GB, Aub JC, Waldo CM (1947): The effects of gonadectomy and the administration of testosterone propionate on the growth of antlers in male and female deer. *Endocrinology* 40, 202–224

Yamaguchi A, Komori T, Suda T (2000): Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 21 (4), 393–411

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

Danksagung

Allen voran möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. K.G. Wiese für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation und die gute Betreuung bedanken. Er stand mir mit Herrn Dipl.-Biol. Dr. rer. nat. Hans Rolf stets mit Rat und Tat zur Seite.

Des Weiteren möchte ich meinen Dank dem gesamten Laborteam der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie für die Umsetzung der Versuche aussprechen.

