

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

---

**Nachweis von Knochenwachstum in besiedelten Konstrukten**  
***in vivo* –**  
**Molekularbiologische Untersuchungen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
(Dr. med.)  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gábor Horváth  
aus Székesfehérvár

2008

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Peter Müller

Priv.-Doz. Dr. Stephan Ihrler

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. Matthias Schieker  
Dr. med. Sebastian Seitz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2008

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1. Knochenersatzmaterialien.....	6
1.2. Tissue Engineering von Knochen.....	8
1.2.1. Übersicht.....	8
1.2.2. Leitschienen und Zellen für das Tissue Engineering.....	10
1.2.3. Tissue Engineering am Tiermodell.....	11
1.3. Nachweis von artfremden Zellen in Geweben.....	13
1.4. Aufgabenstellung .....	19
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.1. Materialien und Geräte.....	21
2.1.1. Geräte .....	21
2.1.2. Chemikalien und Materialien für Molekularbiologie.....	22
2.2. Zellkultur.....	23
2.2.1. Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) .....	23
2.2.1.1. Herkunft .....	23
2.2.1.2. Auftauen von hMSC.....	23
2.2.1.3. Kultivierung der Zellen .....	24
2.2.2. Mausfibroblasten.....	25
2.2.2.1. Herkunft .....	25
2.2.2.2. Auftauen von Mausfibroblasten .....	25
2.2.2.3. Kultivierung der Zellen .....	25
2.2.3. Zellzählung.....	26
2.2.4. Isolierung einzelner Zellen (single-cell-picking).....	27
2.3. Tierversuche .....	29
2.3.1. Besiedlung von Leitschienen .....	29
2.3.1.1. Leitschienen.....	29
2.3.1.2. Besiedlung.....	30
2.3.2. Versuchstiere .....	30
2.3.3. Implantation .....	30
2.3.4. Explantation .....	31
2.4. Molekularbiologische Methoden.....	33
2.4.1. DNA – Isolierung.....	33

2.4.2. Qualitative Polymerase Chain Reaction (PCR).....	34
2.4.2.1. Ansatz und Reaktionsbedingungen .....	34
2.4.2.2. Agarosegel.....	36
2.4.3. Quantitative PCR .....	37
2.4.3.1. Ansatz und Reaktionsbedingungen .....	37
2.4.3.2. Berechnung der Zellzahlen.....	38
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.1. Etablierung der PCR .....	40
3.1.1. Optimierung der PCR Bedingungen.....	40
3.1.2. Zellgemische.....	42
3.1.3. Isolierung der DNA aus Geweben.....	44
3.2. Tierversuchsergebnisse .....	46
3.2.1. Besiedlungseffizienz .....	46
3.2.2. Versuchstiere .....	46
3.2.3. Qualitative PCR .....	47
3.2.3.1. Zwei Wochen.....	47
3.2.3.2. Vier Wochen .....	48
3.2.3.3. Acht Wochen .....	50
3.2.3.4. Zwölf Wochen.....	51
3.2.4. Semiquantitative Auswertung.....	52
3.2.5. Quantitative PCR .....	53
3.2.5.1. Etablierung der quantitativen PCR.....	54
3.2.5.2. Auswertung der Proben .....	55
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>59</b>
4.1. Leitschiene und Tierversuche .....	59
4.1.1. Leitschiene.....	59
4.1.2. Besiedlung .....	59
4.1.3. Tierversuche .....	60
4.2. Etablierung der Methode .....	61
4.2.1. Wahl des Nachweisverfahrens.....	61
4.2.2. Wahl der Primerpaare .....	63
4.2.3. Etablierungsergebnisse qualitative und quantitativer PCR.....	64
4.3. Ergebnisse .....	66

---

4.3.1. Ergebnisse der qualitativen Untersuchung.....	66
4.3.2. Ergebnisse der quantitativen Untersuchung .....	68
4.4. Anregungen und Ausblick .....	70
4.4.1. Anregungen .....	70
4.4.2. Ausblick.....	71
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>73</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
Anhang.....	88
Danksagung .....	91
Lebenslauf.....	92
Publikationen.....	94

# 1. Einleitung

## 1.1. Knochenersatzmaterialien

Die Behandlung ausgedehnter knöcherner Defekte des Skeletts, die durch Trauma, Tumore, Infektionen oder kongenitale Malformation bedingt sind, stellt bis zum heutigen Tage ein großes klinisches Problem in der rekonstruktiven Chirurgie dar. Die Auffüllung dieser Defekte ist eine große Herausforderung, wobei zahlreiche Therapieverfahren hierbei zur Auswahl stehen. Der derzeitige klinische Standard bei der Behandlung von Knochendefekten ist die autogene bzw. allogene Knochentransplantation (Rueger 1998, von Garrel et al. 1998). Bei der autogenen Transplantation wird die Defektstelle durch ein vitales Knochenstück aufgefüllt (sog. Spongiosaplastik). Nachteile sind die beschränkte Verfügbarkeit, zusätzliche operative Eingriffe zur Entnahme und die damit verbundenen Möglichkeiten lokaler Komplikationen, sowie postoperative Beschwerden (Joshi et al. 2004, Grob 1986). Bei der Verwendung von allogenen Knochenmaterial besteht, analog zu Bluttransfusionen oder der Transplantation von Organen, zusätzlich die Gefahr einer Infektionsübertragung und einer möglichen immunologischen Inkompatibilität mit einer Abstoßungsreaktion (Lee et al. 2001b).

Mögliche Alternativen zu Transplantationen von autologem oder allogenen Knochen bieten die Verwendung von synthetischen Knochenersatzmaterialien. Knochenersatzmittel sind dabei als Biomaterialien definiert und sollen nach Implantation vorhandene strukturelle Elemente und deren (Teil-)Funktionen vorübergehend ersetzen. Optimalerweise sollen die Knochenersatzmaterialien nicht nur als Defektfüller und dem einfachen Ersatz des Knochens dienen, sondern darüber hinaus die Knochenheilung positiv in Bezug auf Menge, Qualität und den pro Zeiteinheit gebildeten Knochen fördern (Rueger 1998).

Einige Materialien besitzen nur eine passive Leitstruktur, mit deren Hilfe das umgebende Knochengewebe gerichtet einwachsen kann. Man bezeichnet sie als osteokonduktiv (Burchardt 1983). Die porösen Strukturen simulieren mit ihren interkonnektierenden Poren ein spongiöses Knochenlager und ermöglichen aus dem umgebenden intakten Knochengewebe das Einwachsen von Blutgefäßen, Gewebe und das Einnisten von mesenchymalen Zellen. Am Ende steht abhängig von der verwendeten Leitschiene entweder eine Regeneration mit einem Durchbau ohne vorherige Re-

sorption der Leitschiene (z.B. bei Hydroxylapatit) oder ein vollständiges Remodelling, also ein Umbau unter dem gleichzeitigen Abbau der Leitschiene (z.B. bei Tricalciumphosphat, TCP)(Rueger 1998). Die Anforderungen an das Implantatlager für den Einsatz reiner osteokonduktiver Materialien sind sehr hoch und die Reparationsfähigkeit hängt stark von Patientenalter, Defektgröße, Knochenart, Vaskularisation und Stabilität des defekten Knochens ab (Bauer et al. 2000).

Zusätzlich spielen auch humorale Faktoren und Mediatoren in der Knochenregeneration eine entscheidende Rolle, indem sie eine Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten und deren Proliferation bewirken (Barnes et al. 1999, Kirker-Head et al. 1998). Dies gelingt bei der natürlichen Knochenheilung durch parakrine Sekretion lokaler Mediatoren der beteiligten Zellen (Bruder et al. 1999b). Des Weiteren sind humorale Faktoren, welche in der Knochenmatrix enthalten sind und erst bei der Knochenzerstörung aus dieser freigesetzt werden, für eine Knochenneubildung notwendig (Kraus et al. 2006). Folglich können Bestandteile einer Knochenmatrix Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung einer neuen knöchernen Struktur haben. Urist et al. konnten zeigen, dass eine demineralisierte Knochenmatrix (DBM) in einem heterotopen Lager eine *de novo* Knochensynthese ermöglicht (Urist 1965). In der Folge konnte eine ganze Gruppe von Proteinen ermittelt werden, die Einfluss auf die Proliferation und auf die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Osteoblasten besitzen (Cheng et al. 2003). Durch diese Eigenschaft im Knochenregenerationsprozess werden sie als osteoinduktiv bezeichnet. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise auch die sog. *bone morphogenetic proteins* (BMPs) und andere Wachstumsfaktoren wie z.B. *insulin like growth factor IGF* oder *platelet-derived growth factors PDGF* (Parikh 2002). Diese Gruppe erweitert sich regelmäßig durch neu entdeckte Faktoren (Lieberman et al. 2002, Bostrom et al. 1999).

Die Mehrzahl der bis heute in der Klinik am Patienten verwendeten Knochenersatzmaterialien zeigen bisher aber lediglich einen osteokonduktiven, jedoch keinen oder nur minimalen osteoinduktiven Effekt, weshalb sie bis dato rein als Defektfüller dienen (Kon et al. 2000, Hallfeldt et al. 1994). Ausnahmen bilden hierbei einige neuere Polymere und Keramiken, die in Tierversuchen unter spezifischen Bedingungen ein osteoinduktives Verhalten zeigen konnten (Kruyt et al. 2004). Eine Möglichkeit dieses Problem zu beheben ist die Verwendung von Kompositen. Dies kann beispielsweise eine Beimischung osteokonduktiver Leitschienen z.B. mit gentechnisch hergestelltem

rekombinanten humanen BMP (rhBMP) sein. In Tierversuchen konnten bei ausreichender Konzentration Knochendefekte überbrückt werden (Bostrom et al. 1996, Yasko et al. 1992), die Heilung einer Fraktur beschleunigt und ebenso eine schnellere Vaskularisierung nachgewiesen werden (Suwa et al. 1998). Auch in klinischen Studien konnten an Patienten bereits bei kleinen Defekten unter Verwendung von rhBMP 2 gute Ergebnisse erzielt werden (Boden et al. 2002). Jedoch zeigt sich, dass nicht jede Kombination einen synergetischen Effekt besitzt, sondern die Materialien aufeinander durchaus hemmend wirken können (Ozturk et al. 2006). Ebenso sind bis heute die optimal wirksamen Dosismengen der Faktoren unbekannt und eine Sicherstellung der Ortständigkeit der Faktoren nicht gewährleistet.

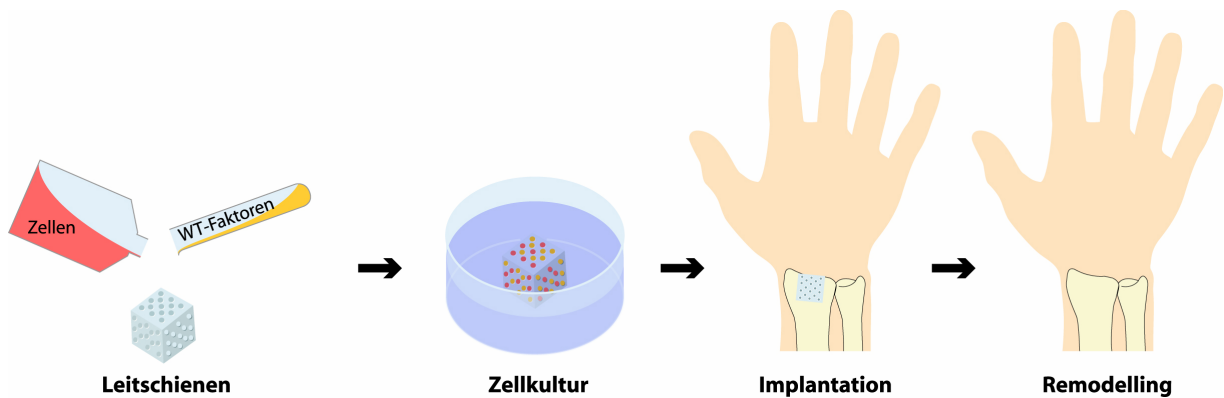
Insgesamt muss festgehalten werden, dass gerade aufgrund dieser Ergebnisse die Übertragbarkeit der beschriebenen Alternativen auf die Überbrückung großer Knochendefekte weiterhin ein Problem darstellt. Die Transplantation von autogenem Knochen stellt daher nach wie vor den „Goldstandard“ dar (Betz 2002, Bruder et al. 1999b). Wohl erweist es sich als vorteilhaft, dass hier neben spongiösen Knochenanteilen und osteoinduktiven Wachstumsfaktoren auch vitale, knochen-bildende Zellen verpflanzt werden. Diese müssen somit nicht erst im Rahmen der Heilung in das Implantat einwandern. Die schnelleren und besseren Ergebnisse zeigen, dass die Existenz osteogener Zellen im Implantat die Regeneration in erheblicher Weise fördert.

## 1.2. Tissue Engineering von Knochen

### 1.2.1. Übersicht

Eine viel versprechende Alternative zur Überbrückung großer Knochendefekte stellt das Tissue Engineering (TE) dar. TE beschreibt eine interdisziplinäre Wissenschaft, in der Wissenschaftler, Ärzte und Ingenieure in einem engem Zusammenspiel versuchen, zerstörte, fehlende oder fehlerhafte Gewebe zu ersetzen. Nach der initialen Probenentnahme aus Teilen des unzerstörten Gewebes erfolgt die Isolierung von gewebetypischen Zellen. Diese werden im Labor *in vitro* vermehrt und anschließend unter zu Hilfenahme von Wachstumsfaktoren in einer für die Gewebsentwicklung notwendigen spezifischen Matrixstruktur als Trägermaterial kultiviert (Vacanti et al. 2000).





**Abb. 1** Tissue Engineering von Knochen

Auch das Tissue Engineering von Knochen baut hierauf auf, wobei Leitschienen, wie unter 1.1.1. beschrieben, mit osteogen differenzierte Zellen besiedelt werden. (Vacanti et al. 2000, Vacanti et al. 1999). Die Zellen können zum Beispiel aus Knochenmarkaspirat der Patienten gewonnen und im Labor vermehrt werden (Bruder et al. 1998c). Nach Implantation der besiedelten Konstrukte in den Defektbereich, soll es parallel zur Resorption des Leitschienenmaterials zur Knochenneubildung kommen, die im optimalen Fall zur Restitutio ad integrum führt (Abb. 1). Als vorteilhaft erweisen sich die ausreichende Verfügbarkeit von Zellen und die niedrigere Morbidität des Patienten, da für die Gewinnung der Zellen lediglich ein minimaler chirurgischer Zugang benötigt wird.

In einem einmaligen klinischen Versuch zeigte die Arbeitsgruppe um Vacanti et al. die Möglichkeiten, jedoch zugleich auch die derzeitigen Grenzen des Tissue Engineering auf. Nach Beimpfung einer Hydroxylapatit – Leitschiene mit autologen Periostzellen gelang es ihnen ein amputiertes Daumenendglied zu rekonstruieren (Vacanti et al. 2001). Der zeitliche Aufwand und die Belastung für den Patienten war unverhältnismäßig hoch und stand letztlich in keinem Verhältnis zu dem funktionellen klinischen Ergebnis (Hentz et al. 2001). Auch anderen Arbeitsgruppen gelang eine Rekonstruktion von Fingerendgliedern unter Verwendung einer mit bovinem Periost ummantelten organischen Polymerleitschiene mit anschließender *in vitro* Kultivierung und subkutaner Implantation in ein Versuchstier (Sedrakyan et al. 2006, Isogai et al. 1999).

Ein Problem bei der Verwendung autologer Zellen aus dem Knochenmark oder aus dem Periost kann in der mangelnden Verfügbarkeit von kultivierbaren Stammzellen bestehen. Die Anzahl der MSC stellen im Knochenmark beispielsweise lediglich einen Anteil 0,001-0,01% dar (Pittenger et al. 1999). Darüber hinaus nimmt auch mit

zunehmendem Alter die Menge der Stammzellen im Knochenmark ab (Muschler et al. 2001) oder kann infolge Erkrankungen reduziert sein z.B. bei Osteomyelofibrose (Tsuchida et al. 2003). Als Alternative bietet sich die Verwendung von allogenen mesenchymalen Stammzellen an (siehe 1.2.2.). Hierbei kann man auf eine operative Zellentnahme verzichten und verwendet stattdessen Zellen aus einer Zellbank (Olivier et al. 2004). Diese werden dann analog den autologen Zellen kultiviert und nach Beimpfung eines Trägermaterials in den zu überbrückenden Knochendefekt eingesetzt. In Tiermodellen konnte durchaus gezeigt werden, dass größere Knochendefekte mit allogenen MSC mittels dieser Methode geheilt werden können (Arinzeh et al. 2003). Darüber hinausgehend zeigen die Zellen eine fehlende Immunogenität, werden somit vom Immunsystem nicht als fremd erkannt und haben zusätzlich noch immunmodulatorische Eigenschaften (z.B. Hemmung der Lymphozytenproliferation und der T-Zellaktivierung), was sie ideal für Transplantation auch unter HLA-verschiedenen Individuen macht (Le Blanc 2006, Uccelli et al. 2006).

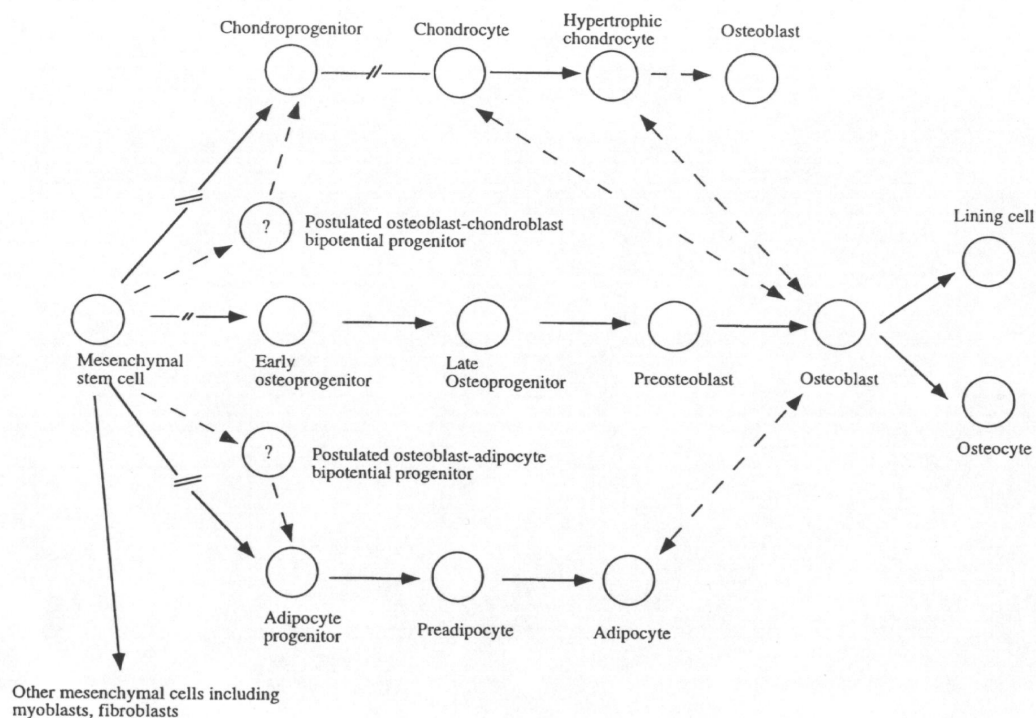
### 1.2.2. Leitschienen und Zellen für das Tissue Engineering

Tissue Engineering ist unter anderem abhängig von einem geeigneten Trägermaterial, welches als Leitschiene für die osteogenen Zellen und das einwachsende Gewebe dient. Als Leitschienen können verschiedene Knochenersatzmatrices dienen. So gibt es synthetische anorganische Materialien wie Kalziumphosphatkeramiken (z.B. Hydroxylapatit oder Tricalciumphosphat) oder auch synthetische organische Verbindungen wie organische Polymere und deren Kombinationen (z.B. Polyester oder Polyaminosäuren). Ebenso können zum Beispiel oben beschriebene Knochenmatrixextrakte oder Knochenmatrixfraktionen als Trägermaterial fungieren.

Leitschienen sind nach derzeitigem Wissensstand unverzichtbar, da ein gerichtetes Wachstum der Zellen ohne sie nicht möglich ist (Abukawa et al. 2003, Boyde et al. 1999). Darüber hinaus ermöglichen sie die Adhäsion der *in vitro* beimpften Zellen. Von Bedeutung ist der Grad der Interkonnektivität und die Makroporosität, da dies über das Ausmaß der Zellimmigration, der Versorgung mit Nährstoffmedium und der Vaskularisierung nach Implantation entscheidet (Stengele 2004).

Neben dem optimalen Einsatz von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, spielen die verwendeten Zellen eine Hauptrolle (Caplan et al. 1999, Bruder et al. 1999a). Dabei werden in Studien unterschiedliche Zellen wie Osteoblasten, Osteoprogenitorzellen oder auch „Bone Marrow Stroma Cells“ (BMSC) verwendet. Allen Zellen ist

jedoch gleich, dass sie bestimmte Stufen innerhalb der osteoblastären Differenzierungskaskade darstellen und in der Lage sind in ihrer differenzierten Form Knochen zu bilden. Ursprünglich stammen sie von mesenchymalen Stammzellen (MSC) ab. Sie bilden den Ausgangspunkt für die Differenzierung zu einer Vielzahl von mesenchymalen Geweben und wurden bisher in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen (Tuan et al. 2003). Als Stammzellen besitzen sie die Fähigkeit zur Selbstreplikation bei stabilem Phänotyp (Caplan 1991) und sind pluripotent (Czyz et al. 2003). Damit besitzen sie das Potential, sich unter entsprechenden Kulturbedingungen in unterschiedliche Zellen- und Gewebetypen wie Fett-, Knorpel- und Knochenzellen zu differenzieren (Pittenger et al. 1999) (Abb. 2). In der Folge konnten Studien zeigen, dass unter definierten *in vitro* Kulturbedingungen MSC Knochen bilden (Ohgushi et al. 2003).



**Abb. 2** Übersicht über Differenzierungskaskade von mesenchymalen Stammzellen nach (Aubin 1998)

### 1.2.3. Tissue Engineering am Tiermodell

Im Rahmen des TE sind in den letzten Jahren eine Vielzahl von Studien durchgeführt worden. Aufgrund der Komplexität der Thematik gibt es bei der Übertragbarkeit und Bewertung von Ergebnissen durchaus Schwierigkeiten. Die meisten Studien variie-

ren erheblich in Bezug auf die verwendeten Versuchstiere, die verschiedenen anatomischen Implantationsorte, der verwendeten Zellen und deren Besiedlung und Kultivierung. Auch die chemische Zusammensetzung, die Form und Resorbierbarkeit der verwendeten Leitschienen sind mannigfaltig und spiegeln die Vielzahl der Studien wider. Alleine aufgrund der möglichen Unterschiede der verwendbaren Zellen (Differenzierungsgrad der Zellen, tierischen vs. humane, autologe vs. allogene Transplantation etc.) erscheinen Aussagen schwierig. Dennoch ist bei vielen dieser Modelle, sowohl bei kleineren als auch bei größeren Tieren eine Knochenneubildung unter Zuhilfenahme implantierter besiedelter Leitschienen gezeigt worden. In Versuchen am ektopen Modell konnten nach subkutaner Implantation in mit Knochenmarkszellen besiedelten Biokeramiken Knochenneubildung nachgewiesen werden (Kadiyala et al. 1997, Goshima et al. 1991).

Auch andere Studiengruppen, welche Leitschienen mit ausschließlich humanen Osteoblasten *in vitro* zunächst kultivierten, konnten eine Mineralisation als Zeichen einer Knochenneubildung im ektopen Implantat feststellen. Daneben zeigte sich auch eine Gefäßneubildung als Zeichen einer Implantatintegration (Ferrera et al. 2002, Boo et al. 2002, Schantz et al. 2002).

Auch bei orthotopen Tiermodellen konnten bei Implantationen von mit Zellen beladenen porösen Knochenersatzmaterialien Knochenbildung nachgewiesen und der Vorteil gegenüber unbeimpften Implantaten gezeigt werden. (Cancedda et al. 2003c, Petite et al. 2000, Kon et al. 2000, Bruder et al. 1998b). Aufgrund dieser Erfolge wurde versucht die tierexperimentell gewonnenen Ergebnisse und Erfahrungen auf die klinische Behandlung bei Patienten zu übertragen. Dabei konnte beispielsweise ein bis zu 7 cm großer Knochendefekt am distalen Humerusschaft mit autologen Osteoprogenitorzellen und einer Hydroxylapatit – Leitschiene erfolgreich überbrückt werden (Quarto et al. 2001b).

Allen Studien zeigen jedoch, dass die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Knochenbildung vitale Zellen sind, welche in der Folge Wachstumsfaktoren und Botenstoffe sezernieren und Knochenmatrix für den Heilungsprozess bilden. (Tsuchida et al. 2003, Cheng et al. 2001). Es bleibt jedoch teilweise unklar, ob und zu welchen Teilen die implantierten osteogenen Zellen per se für die Knochenneubildung verantwortlich sind, oder ob nicht durch deren Apoptose erst freiwerdende Botenstoffe und Wachstumsfaktoren eine Migration der körpereigener Stammzellen in den Defektort bewirken und in der Folge Knochenmatrix bilden.

Nach wie vor bleibt ebenso von umgekehrter Sichtweise her ungelöst, ob es zu einer Migration der implantierten Zellen in andere Organe kommt. Obwohl bei adulten Stammzellen bislang keine Tumorgenese bekannt ist (Grompe 2002a), konnte bei der Verwendung von embryonalen Stammzellen für therapeutische Zwecke *in vivo* nachweislich die Bildung von Teratomen nach Implantation gezeigt werden (Asano et al. 2003, Grompe 2002b, Odorico et al. 2001, Thomson et al. 1998).

Zudem konnte im Rahmen von tierexperimentellen Studien sowohl an immundefizienten oder bestrahlten Mäusen, als auch an Gorillas gezeigt werden, dass hMSC nach intravenöser Applikation sich nicht nur im Knochenmark absiedeln, sondern auch in andere Organe wie Lunge, Milz und Knorpel migrieren können (Devine et al. 2003, Cancedda et al. 2003a, Gao et al. 2001). Nach intraperitonealer Injektion von hMSC bei einem fetalen Schaf konnten die applizierten Zellen noch nach einem Zeitraum von 13 Monaten nachgewiesen werden (Mackenzie et al. 2001). In Versuchen zur Reparatur von Sehnen mit Hilfe von MSC - Leitschienenkonstrukten im Kaninchenmodell konnte gezeigt werden, dass es in mehr als einem Viertel der Fälle zu einer unerwünschten ektopen Knochenbildung in den Sehnen kam (Harris et al. 2004). Adulte Stammzellen scheinen in Bezug auf ihre Differenzierungs- und Dedifferenzierungsfähigkeit eine höhere Flexibilität zu besitzen als zunächst angenommen (Korbling et al. 2003, Azizi et al. 1998). Es bedarf daher einer Klärung, ob es nach ektoper bzw. orthotoper Implantation von besiedelten Leitschienen zu einer Migration der Stammzellen in den Organismus kommt und falls ja welche der Organe bevorzugt sind.

### **1.3. Nachweis von artfremden Zellen in Geweben**

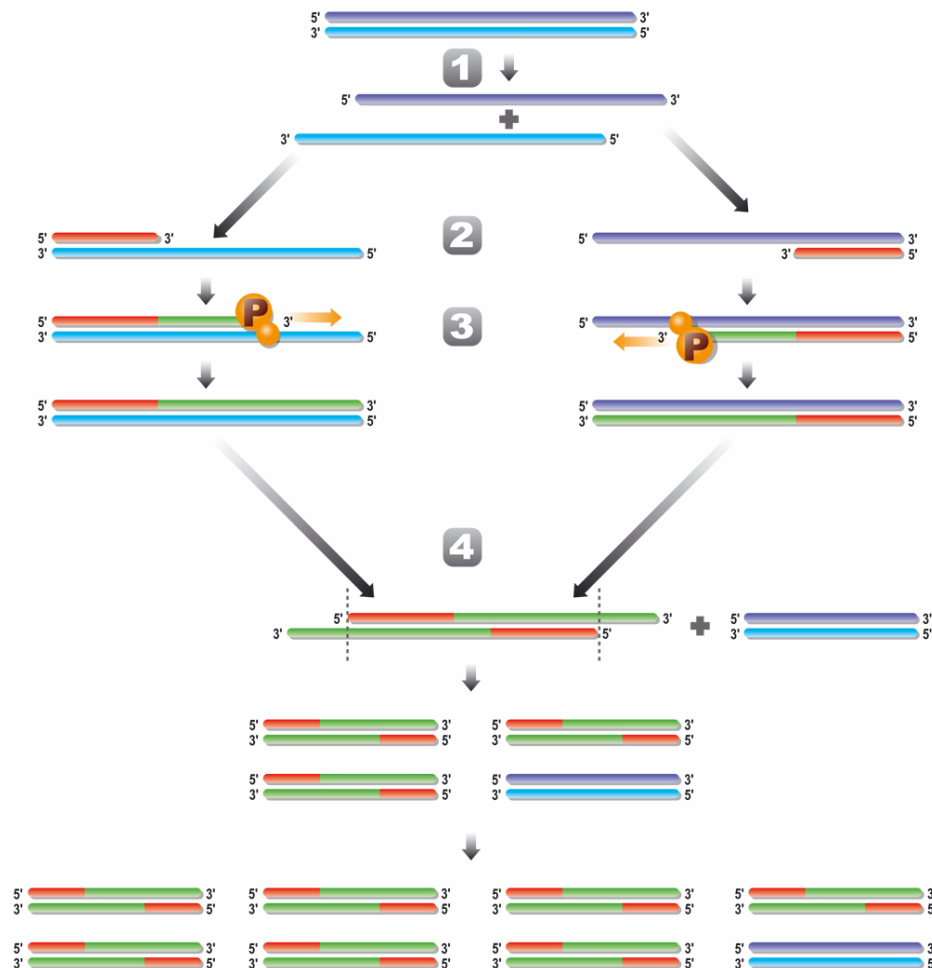
Für den Nachweis der Migration implantierter Stammzellen sind Techniken notwendig, welche sicher eine Abgrenzung der Stammzelle zum Empfängergewebe ermöglichen bzw. die Anwesenheit der „fremden“ Stammzelle im Gewebe beweisen. Je nach Zielsetzung stehen dafür heute bereits unterschiedliche Methoden zur Verfügung, die sich in ihrer Genauigkeit jedoch unterscheiden. Die Verwendung von artspezifischen Antikörpern, z.B. im Rahmen einer Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist weit verbreitet. (McBride et al. 2003). In jüngster Zeit nutzte man auch gentechnisch veränderte Zellen zur Implantation, dessen Genom durch Luciferase- oder GFP-Gene erweitert ist. Durch Expression dieser Gene kommt es zu einer Lumineszenz

oder Fluoreszenz der zu untersuchenden Zellen, welche somit vom Umgebungsge-  
webe abgegrenzt werden können (Wang et al. 2003a). Dadurch ist es möglich, Zel-  
len nicht nur in Gewebeschnitten oder Zelllösungen sondern auch in einem lebenden  
Organismus nachzuweisen (Jenkins et al. 2003). Trotz vieler zusätzlicher morpholo-  
gischer Informationen und der Möglichkeit einzelne Zellen einem bestimmten Ort zu-  
zuordnen, scheinen diese Methoden für eine systematische Quantifizierung unter-  
schiedlicher Gewebe nicht geeignet.

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction = PCR)  
steht eine andere Methode zur Verfügung, mit deren Hilfe indirekt die Bestimmung  
bestimmter Zellen möglich ist. In der Hämatologie wird die PCR routinemäßig für ei-  
nen sensitiven Zellenachweis bei Knochenmarkstransplantationen verwendet. Damit  
wird im Empfängerblut, neben der Unterscheidung zwischen Spender- und Empfän-  
gerzellen, Chimäre bestimmt mit deren der weitere Verlauf kontrolliert werden kann  
(Martinelli et al. 1997, Alard et al. 1995). Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, wel-  
ches eine ausgesuchte Nukleinsäuresequenz innerhalb kurzer Zeit amplifizieren und  
eine hohe Zahl identischer Kopien dieses DNA Abschnittes bilden kann. Diese Ko-  
pien stehen dann in ausreichender Menge für weitere Analysen zur Verfügung (Saiki  
et al. 1985). Als theoretische Vorlage dient der natürliche Replikationsprozess von  
doppelsträngiger DNA (dsDNA) mit Hilfe von Polymerasen. Während jedoch in der  
lebenden Zelle eine Vielzahl hochkomplexer Enzyme in einem besonderen Milieu  
beteiligt sind, überträgt man bei der PCR die Reaktion in eine künstliche Umgebung  
und verwendet nur grundlegende Komponenten. Dazu gehören die vier modifizierten  
Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Pufferlösungen, in denen die Reaktion ab-  
laufen kann, sequenzspezifische oligonukleotide Einzelstränge (Primer) und spezielle  
hitzestabile DNA – Polymerasen (Taq-Polymerase). Für die Synthese wird ein Pri-  
merpaar benötigt. Die Aufgabe dieser zwei sequenzspezifischen Primer (Sense –  
und Antisense) besteht darin an den DNA Einzelstrang zu binden und den zu repli-  
zierenden Bereich beiderseits einzugrenzen. Zusätzlich bietet der Primer einen  
Startbaustein für die Replikation. Die Replikation selber läuft in drei definierten Stufen  
ab: Initial kommt es zu einer Erhitzung bis auf 95°C, durch welche es zu einer Lö-  
sung der Wasserstoffbrückenbindungen der Basenbausteine und somit zum Ausei-  
nanderweichen der Doppelstränge kommt (Schmelzen oder Denaturierung).

Im zweiten Schritt, der sog. Annealing – Phase, bei Temperaturen zwischen 40°C  
und 72°C (initial oft 55°C) lagern sich die Primer an die DNA an. In der dritten Stufe

kommt es mit Hilfe der Taq - Polymerasen bei 72°C zu der Synthese des komplementären Stranges durch Anfügen der Nukleotide (Elongation). Diese drei Schritte (siehe Abb. 3) werden in einem Thermocycler automatisch bis zu 40 Male wiederholt.



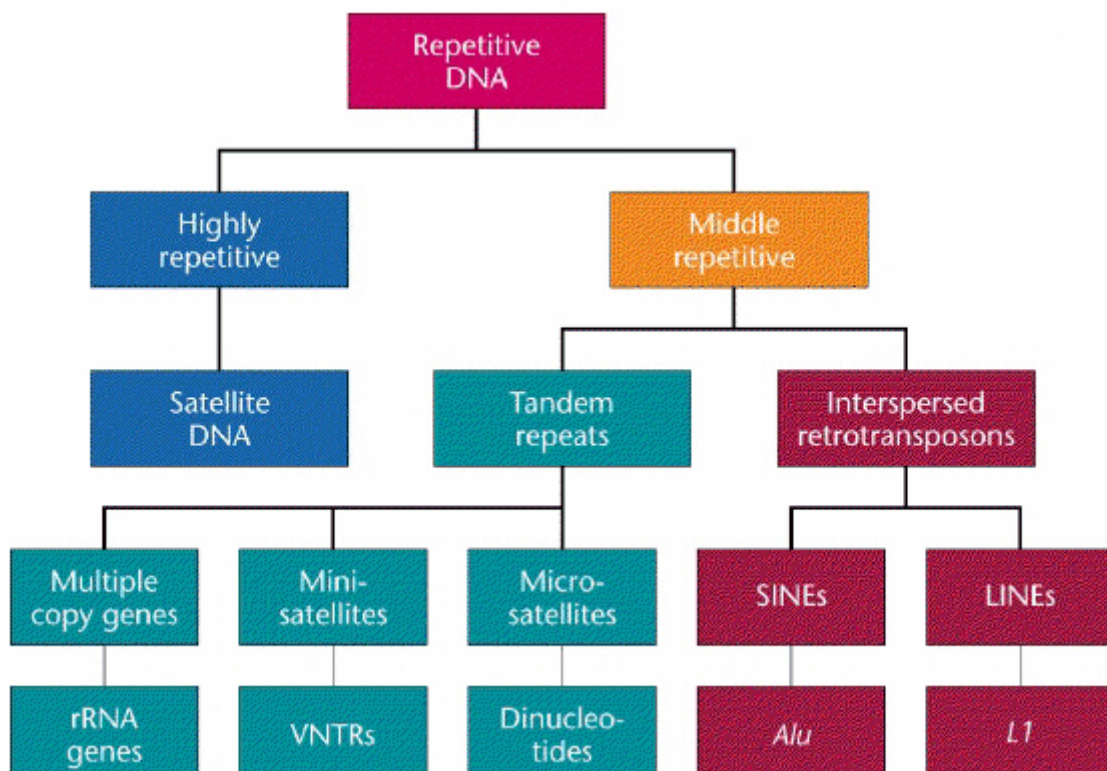
**Abb. 3** Reaktionszyklen PCR – Übersicht. 1. Denaturierung des DNA Doppelstranges. 2. Annealing mit Bindung der Primer an die DNA Einzelstränge. 3. Bindung der Taq-Polymerasen und Elongation des komplementären DNA-Stranges. 4. Wiederholung der Einzelschritte 1.-3.

Die Entscheidung welcher definierte Abschnitt auf dem Nukleinsäurestrang vervielfältigt wird, hängt vom eingesetzten Primerpaar ab. Implantierte Zellen können nachgewiesen werden, wenn ein Primer verwendet wird, der einen Bereich auf einem DNA Molekül eingrenzt, der ausschließlich auf dem Nukleinsäurestrang der gesuchten Zelle vorkommt. Somit ist mittels PCR möglich in einem heterogenen Nukleinsäuregemisch Rückschlüsse auf das gesuchte DNA Molekül durch den spezifisch vervielfältigten Abschnitt zu ziehen und die Existenz damit zu beweisen.

Zum Beispiel könne Primerpaare verwendet werden, die an geschlechtsbestimmende DNA Bereiche auf dem Y-Chromosom binden (Muramatsu et al. 2003). Somit

kann bei einem männlichen Spender und eines weiblichen Empfängerorganismus (sog. sex-mismatch Transplantation) der Fremdzellnachweis sicher gelingen, da der Empfänger kein Y-Chromosom in seinen Zellkernen besitzt.

Für den spezifischen Nachweis können auch Primerpaare verwendet werden die an Bezirke von repetitiven nicht-codierenden DNA-Abschnitten binden (Rieger et al. 2005, Thiede et al. 1999, O'Neill et al. 1996). Da nur ein Teil des Genoms Informationen für Genprodukte (wie z.B. Proteine) enthält, besteht der Rest aus repetitiven DNA Sequenzen. Einen Überblick bietet die Abb. 4.



**Abb. 4** Übersicht repetitiver Abschnitte des Genoms nach Klug und Cummings (2000)

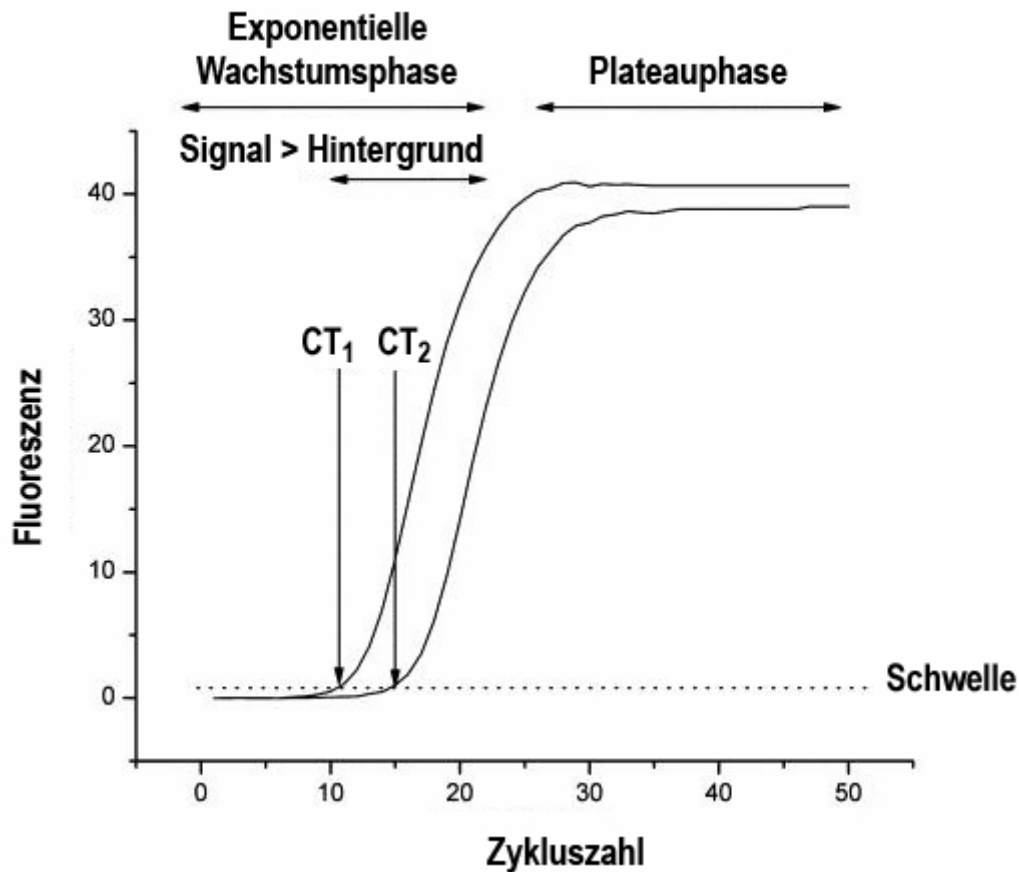
Zu diesen Sequenzen zählen beispielsweise Mikrosatelliten oder short tandem repeat (STR), aber auch die sich im Zentromerbereich befindenden Alpha-Satelliten-Regionen. Bei den STR handelt sich um eine Klasse von kurzen repetitiven DNA-Abschnitten mit einer Länge von 1-7 Bp, welche in hoher Anzahl auf allen Chromosomen vorkommen. Diese Bereiche werden bereits heute in der Forensik im Rahmen des sog. „Genetischen Fingerabdrucks“ verwendet. Sie stellen hochindividuelle, hochspezifische und teilweise auch artspezifische Abschnitte auf der DNA eines Organismus dar (van Oorschot et al. 1994). Auch Alpha-Satelliten besitzen repetitive Einheiten, jedoch mit einer deutlich längeren Bp-Abfolge (172-178Bp). Diese können



sowohl spezifisch für einzelne Chromosome des selben Individuums sein (Warburton et al. 1991), als auch für unterschiedliche Spezies individuell sein (Becker et al. 2002).

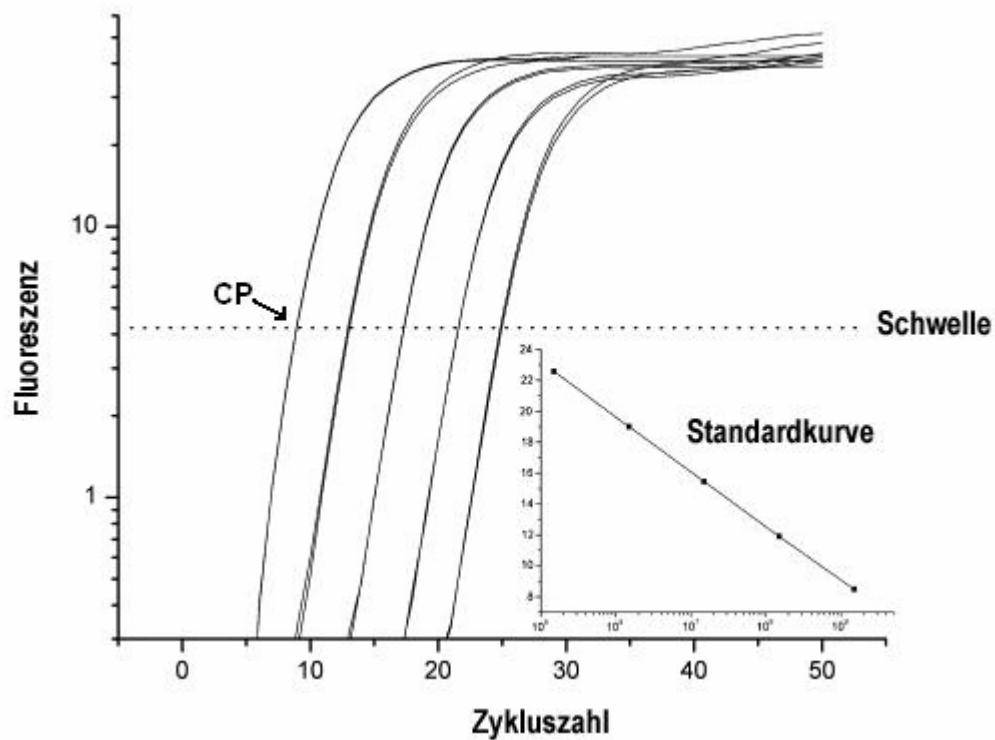
Der Vorteil besteht in der Wiederholung dieser DNA – Abschnitte innerhalb einer Zelle, die oftmals in bis zu tausendfacher Kopie vorliegen. So wird bei der Vervielfältigung im Rahmen der PCR nicht nur ein Abschnitt, der singular vorkommt, exponential vermehrt, sondern eine Vielzahl von identischen Abschnitten. Die Menge der gebildeten Nukleinsäuresequenzen ist viel höher und kann leichter im weiteren Nachweisprozess dargestellt werden. Im Umkehrschluss heißt dies, dass sehr kleine Mengen an Probenmaterial für einen Nachweis mit sehr hoher Sensitivität ausreichen. Die konventionelle PCR erlaubt lediglich qualitative bzw. semiquantitative Aussagen, ob eine gesuchte Nukleinsäuresequenz im Probenmaterial vorhanden ist oder nicht. Oftmals ist es auch von Bedeutung quantitative Aussagen zu treffen. In vielen Bereichen der Medizin wird hierbei eine spezielle Art der PCR, die sog. Real-Time PCR (RT-PCR) eingesetzt. Sie findet sowohl in der Quantifizierung von Mikroorganismen in Blut oder Gewebeproben, als auch z.B. in der Bestimmung der Chimärzellen nach allogener Knochenmarktransplantation Anwendung (McBride et al. 2003)

Es wird dabei während des Elongationsprozesses ein fluoreszierender Farbstoff in den sich verlängernden DNA Strang eingebaut, wodurch das emittierte Fluoreszenzsignal um ein vielfaches verstärkt wird. Das entstehende Signal wird in der Folge aufgezeichnet und spiegelt die Menge der gebildeten Produkte wider (Abb. 5). Mit zunehmender Produktmenge steigt es exponential an, bis eine Sättigungsphase erreicht wird (= Plateauphase). Nach einer bestimmten Anzahl an Zyklen wird ein Signal mit einer definierten Fluoreszenzstärke messbar (CT 1 - Wert). Bei einer geringeren Probenmenge werden mehr Zyklen benötigt, bis ausreichend Produkte für ein gleiches Fluoreszenzniveau entstehen (CT 2 - Wert).



**Abb. 5** Übersicht über quantitative PCR (nach Kubista 2006)

Wählt man nun exakt definierte Ausgangsmengen (z.B. eine Verdünnungsserie einer DNA), welche die zu amplifizierende Zielsequenz beinhalten, so erhält man für jede Menge eine eigene Zyklus-Fluoreszenz-Kurve. In Abhängigkeit von der jeweiligen Ausgangsmenge, wird jede dieser Kurven ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau bei einer anderen Zykluszahl aufweisen (Abb. 6). Der Crossing Point (CP) wird nun definiert als die jeweilige Zykluszahl, bei einer definierten Fluoreszenzstärke in der Phase des exponentiellen Kurvenwachstums. Am CP befindet sich somit in allen Reaktionsgefäßen zu unterschiedlichen Zykluszahlen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Man erhält somit eine Standardkurve, indem man die aus der Verdünnungsserie ermittelten CP Werte (=Zykluszahlen) nimmt und diese Werte gegen die dazugehörigen anfangs eingesetzte Template-Menge aufträgt (Kubista et al. 2006, Rutledge et al. 2003).



**Abb. 6** Übersicht über Ermittlung einer Standardkurve (modifiziert nach Kubista 2006)

Diese Standardkurve kann genutzt werden, um bei den zu analysierenden Proben die zu ermittelnden Ausgangsmengen zu quantifizieren.

#### 1.4. Aufgabenstellung

Die steigende Nachfrage nach Knochenersatzmitteln, auch in Hinblick auf die zunehmend alternde Gesellschaft westlicher Länder, erfordert neue Behandlungskonzepte bei Knochendefekten (Olivier et al. 2004). Dem Tissue Engineering und damit der Verwendung adulter Stammzellen wird in Zukunft zunehmend Bedeutung beigemessen.

Ziel war es zum einen, in einer Pilotstudie ein Mausmodell zu etablieren, in dem das lokale Wachstum von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) auf Leitschienen *in vivo* untersucht werden kann, um zukünftig unterschiedlichen Fragestellungen, wie z.B. Einfluss der *in vitro* Kultivierung oder osteogene Stimulation nachgehen zu können. Zum anderen sollte eine sensitive Auswertung auf Grundlage der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) etabliert werden, mit der man Zellen bis auf Einzelzellniveau nachweisen und sowohl die Zellmenge überlebender Zellen auf den Leitschie-

nen, als auch eine eventuelle Migration der Zellen in die Empfängerorgane qualitativ und quantitativ erfassen kann.

Hierzu sollten mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) besiedelte, aus boviner Spongiosa bestehende Knochenleitschienen, subkutan in Mäuse implantiert und nach 2, 4, 8 und 12 Wochen molekularbiologisch ausgewertet werden.

.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien und Geräte

#### 2.1.1. Geräte

Abzugtisch	Medite, Burgdorf
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
CO <sub>2</sub> -Zellkulturbrutschrank, Typ IG150	Jouan, Unterhaching
Digital pH-Meter	Bachhofer, Reutlingen
Elektrische Präzisionswaage	Kern&Sohn, Frommern
Eismaschine	Tritec, Hannover
Flachbett-Gelelektrophorese-Apparatur, Modell B <sub>1</sub>	PeqLab, Erlangen
Gefrierschrank (-80 °C)	GFL, Burgwedel
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Geldokumentationssystem, Image Master VDS	Pharmacia Biotech, USA
Heizblock, HLC, BT 130-2	Medax Nagel GmbH, Kiel
Hybridisierungsöfen, Hybridizer HB-100	UVP, Laboratory Pro, USA
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge, Typ BR4i	Jouan, Unterhaching
LightCycler	Roche, Mannheim
Megafuge	Heraeus Instruments, Hanau
Mikrowellengerät (900 Watt)	Siemens, Fürth
Neubauer-Zählkammer	Plazotta, München
PCR-Multicycler PT-200	Biozym, Oldendorf
Pipetus-akku	Hirschmann, Eberstadt
Routinemikroskop, Axiovert Typ S100	Zeiss, Jena
Schüttler, Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Sterilwerkbank	Biohit Antares, USA
Thermozykler, PCR-Sprint	Hybaid, Ashford, England
Tischzentrifuge Typ CT 4.22	Jouan, Unterhaching
Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer Typ RC 10.9	Jouan, Unterhaching
Varioklav Dampfsterilisator	H&P, Oberschleißheim
Varipipetten, Gilson, Pipetman	Abimed, Langenfeld

Vortex-Genie	Scientific Industries, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wasserbad mit Schüttelvorrichtung	Memmert, Schwabach

### 2.1.2. Chemikalien und Materialien für Molekularbiologie

Für die molekularbiologischen Ansätze wurde „Aqua ad injectabilia“ der Firma Braun, Melsungen verwendet.

0,5 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg
15 ml Falconröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
50 ml Falconröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Alpha – MEM Kulturmedium (mit Ribonucleotiden)	Gibco, Invitrogen Co., USA
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	R&D Systems, Wiesbaden
Deckgläser für Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
DNA-Längenstandard, 250 bp Leiter	Invitrogen, USA
DNA-Längenstandard, Nr. VIII	Roche, Mannheim
Dneasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Ethanol abs.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Kryokonservierungs-Röhrchen	Nalgene, USA
LC-Primer Set	Search-LC, Heidelberg
LC-SybrGreen Kit	Roche, Mannheim
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
MSC-Basalmedium	Cambrex, USA
MSC-Growth Supplement (MCGS)	Cambrex, USA
PBS (w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	Gibco, Invitrogen Co., USA
Penicillin/Streptomycin	Cambrex, USA
Petrischalen (Ø 92 mm)	Sarstedt, Nürnberg
Rnase A	Quiagen, Hilden
SeaKem LE Agarose	FMC BioProducts, USA
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
Trypsin/EDTA-Lösung	Cambrex, USA
UV-Küvetten	Eppendorf, Hamburg

Zellkulturflaschen, 75 cm <sup>2</sup> bzw. 25 cm <sup>2</sup>	Nunc, USA
Zellkulturplatten, 6-, 12- und 24-Kavitäten	Nunc, USA
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg

## 2.2. Zellkultur

### 2.2.1. Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

#### 2.2.1.1. Herkunft

Es wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) der Fa. Cambrex (USA) verwendet. Die Zellen stammen von gesunden weißen Spendern im Alter von 18 und 45 Jahren und wurden mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation aus Knochenaspirat, das aus dem hinteren Beckenkamm gewonnen wurde, isoliert. Die Firma garantiert den Stammzellcharakter der Zellen durch die Differenzierungsfähigkeit in die chondrogene, osteogene und adipogene Zelllinien und den Nachweis spezifischer Oberflächenantigene.

#### 2.2.1.2. Auftauen von hMSC

Die kryokonservierten Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und danach in 5 ml Stammzellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bei 24 °C Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (600 x g, 5 Minuten), der Überstand abgenommen und das Zellsediment mit einer 2ml Pipette in 3 ml Kulturmedium durch vorsichtiges auf- und abpipettieren resuspendiert. Die homogene Zelllösung wurde auf drei 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen gleichmäßig verteilt und mit Kulturmedium auf 10 ml aufgefüllt. Die Kultivierung erfolgte wie unter 2.2.1.3. beschrieben.

**Stammzellmedium gemäß MSCGM Bulletkit® (Fa. Cambrex):**

Mesenchymal stem cell basal medium	440 ml	
Fetales Kälberserum	50 ml	10% (v/v)
L-Glutaminlösung 200mM	10 ml	2mM
Penicillin/Streptomycin	0,5 ml	0,5U/ml / 0,05µg/ml

**2.2.1.3. Kultivierung der Zellen**

Die hMSC wurden adhärent als Monolayer in 75cm<sup>2</sup> - Zellkulturflaschen der bei 37°C im Brutschrank bei einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% und einer gleichmäßigen relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % inkubiert. Alle drei bis vier Tage wurde das Kulturmedium gewechselt und bei Erreichen einer Konfluenz von 70 – 90% die Zellen passagiert. Hierzu wurde zunächst das alte Kulturmedium entfernt und die Zellen mit Phosphate-Buffered Saline (w/o Ca<sup>2+</sup>, w/o Mg<sup>2+</sup>) (kurz: PBS) durch Schwenken der Kulturflaschen gewaschen, um eine Inaktivierung des hMSC - Trypsin/EDTA im folgenden Schritt zu vermeiden. Zum Ablösen der Zellen wurde das PBS entfernt, durch 2 ml hMSC - Trypsin/EDTA ersetzt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Der Trypsinierungsvorgang wurde regelmäßig mikroskopisch kontrolliert und das vollständige Ablösen der Zellen von der inneren Bodenfläche durch leichtes Beklopfen unterstützt. Bei unvollständiger Trypsinierung war eine weitere Inkubation bei 37°C im CO<sub>2</sub> - Brutschrank für 2 Minuten möglich, wobei insgesamt die Zeit von 15 Minuten jedoch nicht überschritten wurde. Durch Zugabe von 3 ml Kulturmedium wurde das Trypsin/EDTA inaktiviert und die Zelllösung in ein 15 ml Röhrchen überführt und zentrifugiert (600 x g, 5 Minuten, RT). Zur Weiterkultivierung wurde das trypsinfreie Zellsediment in 3 ml Kulturmedium resuspendiert und nach einer Zellzählung (siehe 2.2.3.) auf neue mit Kulturmedium vorgelegten Zellkulturflaschen in einer Zelldichte von 5.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät und bis zur erneuten Konfluenz kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Das PBS wurde auf RT, alle anderen Medien und Komponenten wurden auf 37°C vorgewärmt.



## 2.2.2. Mausfibroblasten

### 2.2.2.1. Herkunft

Für Zellen wurde die Zelllinie MC3T3-E1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ) verwendet. Hierbei handelt es sich um Mausfibroblasten, die aus der Schädeldecke von Mausembryonen der Gattung/Spezies C57BL/6 gewonnen werden und in der Lage sind, sich in Osteoblasten zu differenzieren und Kollagen zu bilden.

### 2.2.2.2. Auftauen von Mausfibroblasten

Das Auftauen und Weiterverarbeitung der Mausfibroblasten erfolgte analoge der humanen Zellen. Unterschiede waren Zentrifugationsstärke (200 x g) und das Resuspendierungsvolumen des Kulturmediums (6ml). Die homogene Zelllösung wurde auf drei 75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen gleichmäßig verteilt und mit Kulturmedium auf 10 ml aufgefüllt. Die Kultivierung erfolgte wie unter 2.2.2.3. beschrieben.

### **Kulturmedium für Mausfibroblasten:**

Alpha-MEM with Glutamax I ( + Ribonucleotide

+ Desoxyribonucleotide) 443 ml

Fetales Kälberserum (hitze-inaktiviert) 50 ml 10% (v/v)

L – Glutaminlösung 200 mM 10 ml 2 mM

Penicillin / Streptomycin 2 ml 20 U/ml / 20 µg/ml

### 2.2.2.3. Kultivierung der Zellen

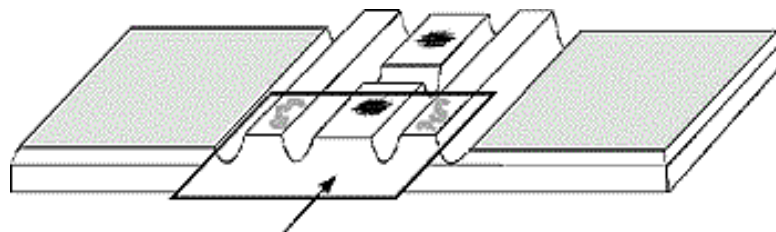
Die Mausfibroblasten wurden adhärent als Monolayer in 75cm<sup>2</sup> - Zellkulturflaschen bei 37°C im Brutschrank bei einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% und einer gleichmäßigen relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % inkubiert. Alle drei bis vier Tage wurde das alte Kulturmedium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70 – 90% wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde zunächst das alte Kulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS durch Schwenken der Kulturflaschen gewaschen, um eine Inaktivierung des Trypsin/EDTA im folgenden Schritt zu vermeiden und Mediumreste zu entfernen.

Zum Ablösen der Zellen wurde das PBS entfernt, durch 2 ml Trypsin (0,5%ig in 5,3mM EDTA – 4Na) ersetzt und 4 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Im folgenden Schritt wurde der Trypsinierungsvorgang 4 Minuten bei RT fortgeführt, regelmäßig mikroskopisch kontrolliert und das vollständige Ablösen der Zellen von der inneren Bodenfläche durch leichtes Klopfen unterstützt. Durch Zugabe von 3 ml Kulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert und die Zelllösung in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (200 x g, 5 Minuten, RT). Die Zellen konnten nun nach Abnahme des Überstandes für Folgeversuche verwendet werden. Beim Wunsch der Weiterkultivierung der Zellen wurde das trypsinfreie Zellsediment in 3 ml Kulturmedium resuspendiert und nach Zellzählung auf neue mit Kulturmedium vorgelegten Zellkulturflaschen in einer Konzentration von 200 Zellen pro  $\text{cm}^2$  eingesät und bis zur Konfluenz kultiviert.

Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Das PBS wurde auf Raumtemperatur, alle anderen Medien und Komponenten wurden auf 37°C vorgewärmt.

### 2.2.3. Zellzählung

Für die zahlenmäßige Erfassung der Zellen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Neubauer-Zählkammer verwendet. Hierzu wurden 10  $\mu\text{l}$  einer Zellsuspension mit 5  $\mu\text{l}$  Trypanblau versetzt und vorsichtig durchmischt. Das Trypanblau färbte abgestorbene Zellen dunkelblau an, wodurch sich bei der Zählung tote von lebendigen Zellen unterscheiden ließen. Die Außenstege der Zählkammer wurden mit destilliertem Wasser befeuchtet und das Deckglas in der Folge mit sanftem Druck von vorn auf die Zählkammer aufgeschoben.



**Abb. 7** Neubauer Zählkammer

Die Ausbildung von Interferenz-Linien (Newton'sche Ringe) zwischen Außenstegen und Deckglas zeigte, dass das Deckglas richtig aufgesetzt war. Von dem Zell-Farbstoff-Gemisch wurde vorsichtig mit einer Pipette ein Tropfen zwischen Deckglas und Zählkammeroberfläche gebracht. Durch die Kapillarwirkung füllte sich der Spalt zwischen Deckglas und Kammerboden.

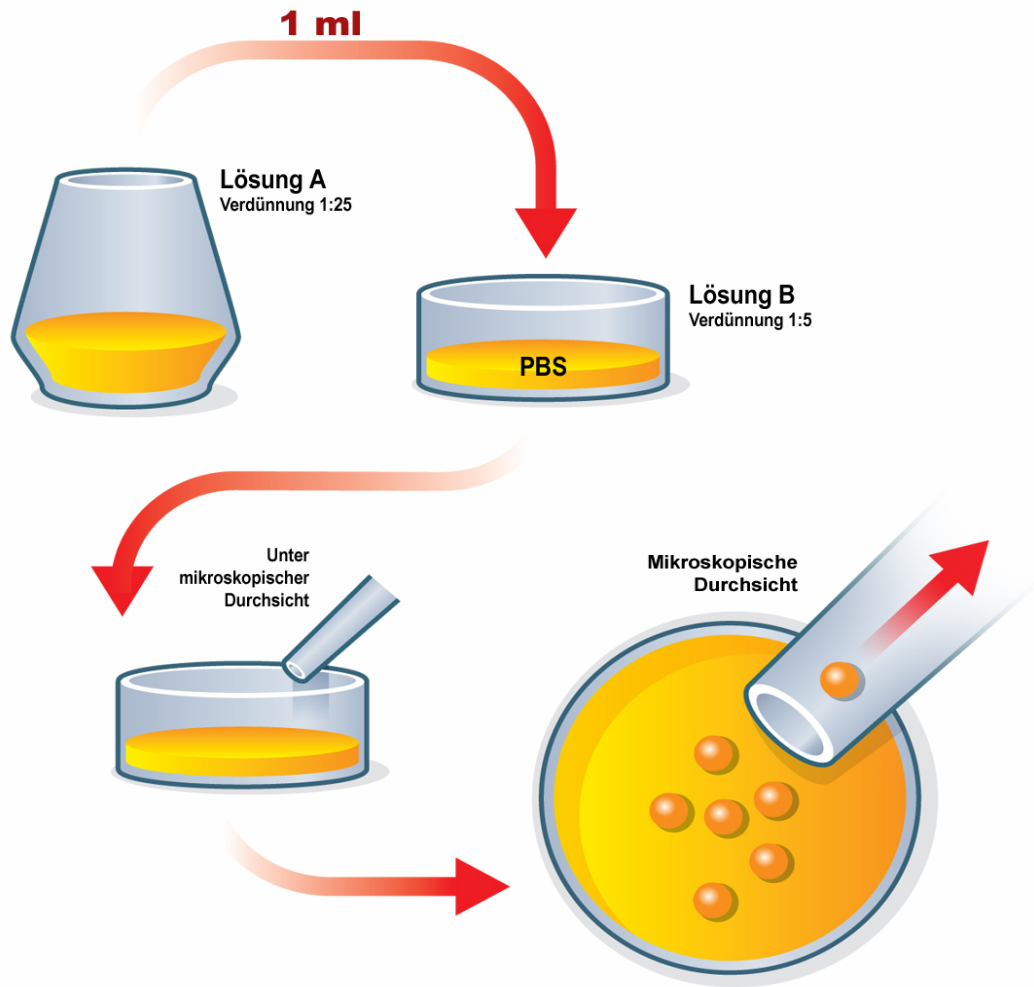
Unter einem Mikroskop wurden die genaue Anzahl der lebenden Zellen in vier Quadranten ausgezählt und die Konzentration pro 1 ml mit folgender Formel berechnet:

$$\left( \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{4} \right) \times \left( \frac{\text{Volumen Zellprobe } (\mu\text{l}) + \text{Volumen Trypanblau } (\mu\text{l})}{\text{Volumen Zellprobe } (\mu\text{l})} \right) \times 10.000$$

Durch Multiplikation mit dem gesamten Suspensionsvolumen (in ml) erhielt man die Gesamtzellzahl in der Lösung.

#### 2.2.4. Isolierung einzelner Zellen (single-cell-picking)

Zur Isolierung einzelner hMSC wurde eine Methode verwendet, die es ermöglichte mit Hilfe einer Pipette unter mikroskopischer Aufsicht Zellen aus einem gelösten Zellgemisch zu separieren. Kultivierte hMSC wurden trypsinisiert und mit PBS auf das Verhältnis 1 : 25 verdünnt (= Lösung A). In einer Petrischale ( $\emptyset$  10 cm) wurden im Weiteren zu 1 ml der Lösung A 4 ml PBS gegeben (Verdünnung 1 : 5). Mit einem Filzstift wurde zur Orientierung für den folgenden mikroskopischen Schritt ein Punkt auf der Unterseite der Petrischale markiert. Die Petrischale wurde unter das Objektiv platziert und im Sichtfeld auf den Markierungspunkt fokussiert. Eine 10  $\mu\text{l}$  Pipette wurde an den Punkt unter Aufsicht angenähert und oberhalb des Punktes platziert. Durch Schwenken der Petrischale wurden vereinzelte nicht-adhärenente Zellen in die Nähe des Markierungspunktes gelenkt und mit der Pipette langsam aufgesogen. Vor dem Aufziehen musste man sich durch sanftes Bewegen der Petrischale vergewissern, dass die Zelle auf dem Boden nicht bereits adhärenent ist, um eine Beschädigung der Zellmembran zu verhindern. Die isolierte Zelle wurde nun zügig in das vorhergesehene Gefäß gegeben (Abb. 8).



**Abb. 8** Single-cell-picking

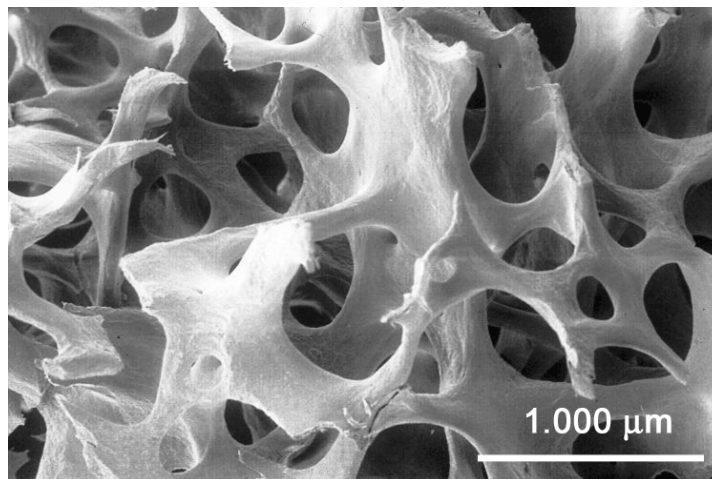
Für jede weitere Isolierung wurde eine neue Pipettenspitze verwendet und der Vorgang wiederholt. Da die Zellen innerhalb kurzer Zeit adhären wurden und durch das nicht optimale Medium einem Stress ausgesetzt waren, war ein rasches Arbeiten notwendig. Nach einer Zeit von 10 Minuten wurde von neuem mit der Herstellung der Lösung A aus dem Trypsinat begonnen, da der Anteil der nicht-adhären Zellen zu gering war.

## 2.3. Tierversuche

### 2.3.1. Besiedlung von Leitschienen

#### 2.3.1.1. Leitschienen

Als Trägermaterial wurde bovine Spongiosa (*Tutobone*<sup>®</sup>) der Firma Tutogen Medical verwendet. Hierbei handelte es sich wie in Abb.9 zu sehen um eine hochfeste, reine Spongiosa, dessen natürlicher Mineral-Kollagen-Verbund mit unveränderter Bruchkraft und Elastizität aufgrund des patentierten Herstellungsverfahrens erhalten bleibt (Neutromedics AG – Cham / Schweiz).



**Abb. 9** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der verwendeten Leitschiene (*Tutobone*<sup>®</sup>, Fa. Tutogen Medical), Bildquelle: Fa. Tutogen Medical

Eine original verpackte *Tutobone*<sup>®</sup> Leitschiene mit den Abmessungen 25 x 15 x 3 mm wurde mit Hilfe eines sterilen Skalpell auf einem sterilen Eisenblock in der Mitte durchteilt. Aus den Hälften wurden mit Hilfe eines sterilen Locheisens jeweils zylindrische Platten (Ø 9 mm) gestanzt. Jeweils ein Paar dieser Zylinder aus der gleichen Platte wurde in dieselbe Maus implantiert, wobei der eine Zylinder mit Zellen besiedelt und der andere unbesiedelt als Kontrolle implantiert wurde. Die Plättchen wurden in ein 15 ml Röhrchen überführt.

### 2.3.1.2. Besiedlung

Zu den ausgestanzten *Tutobone*<sup>®</sup>-Zylindern wurde im Folgenden 5 ml FBS zugegeben, wenige Sekunden im Falcon-Röhrchen zentrifugiert (600 x g, RT) und im Anschluss im CO<sub>2</sub>-Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>) bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Durch die FBS - Behandlung wurden die Spongiosa-Leitschienen rehydriert und die Oberfläche mit Adhäsionsfaktoren benetzt, um eine Zellbesiedlung durch die hMSC zu verbessern.

Für die Versuche wurden hMSC der 5. Passage verwendet. Nach der Trypsinierung (2.2.1.3.) und Zellzählung wurden jeweils  $1 \times 10^6$  hMSC in 300 µl Kulturmedium resuspendiert ( $c = 3.333$  Zellen / µl). Von den Leitschienen wurde das FBS abgesaugt, diese nochmals kurz zentrifugiert, um restliches FBS zu entfernen. Die Leitschienen wurden mit steriler Pinzette jeweils separat in eine Vertiefung einer 48-Well-Platte überführt. Auf die zu besiedelnden Leitschienen wurden 300 µl einer Zellsuspension mit  $1 \times 10^6$  hMSC gegeben. 2 Stunden wurde die 48-Well Platte in einen CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Alle 20 Minuten wurden die Leitschienen unter Verwendung steriler Injektionsnadeln gewendet. Im Anschluss wurde bei den beimpften Leitschienen die Zellsuspension vom Boden der Vertiefung vorsichtig aufgesogen und von oben auf die Leitschienen pipettiert, um eine Verklumpung und Adhäsion der Zellen am Boden zu verhindern. Die Kontroll-Leitschiene wurde ausschließlich mit 300 µl Kulturmedium ebenfalls 2 h bei 37°C inkubiert.

### 2.3.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden athymе, nu/nu Nacktmäuse (4 – 6 Wochen) der Fa. Harlan-Winckelmann (Borchen, Germany) verwendet. Zur eindeutigen Identifizierung wurden die Tiere nach der Lieferung mit nummerierten Ohrmarken gekennzeichnet.

### 2.3.3. Implantation

Um die zu applizierende Medikamentenmenge zu bestimmen, wurden die Mäuse am Versuchstag gewogen. Von der vorbereiteten Narkoselösung wurden 2,5 ml/kg Körpergewicht (KG) intramuskulär (i.m.) in die Streckseite des linken Hinterbeines (M. semitendinosus / M. semimembranosus) appliziert. Nach Einsetzen einer ausreichenden Narkosewirkung (chirurgisches Narkosestadium III b), wurden die Mäuse

unter einer Clean Bench in Bauchlage mit Klebestreifen über den vier Extremitäten auf einer mit Zellstoff bezogenen Styroporplatte fixiert.

Nach dem Eröffnen der Rückenhaut mit einer sterilen Schere kranialwärts über den Processi spinosi über eine Länge von 2 cm, wurde die Haut zur linken und zur rechten Seite mit einer Schere mobilisiert und zwei subkutane Taschen geschaffen.

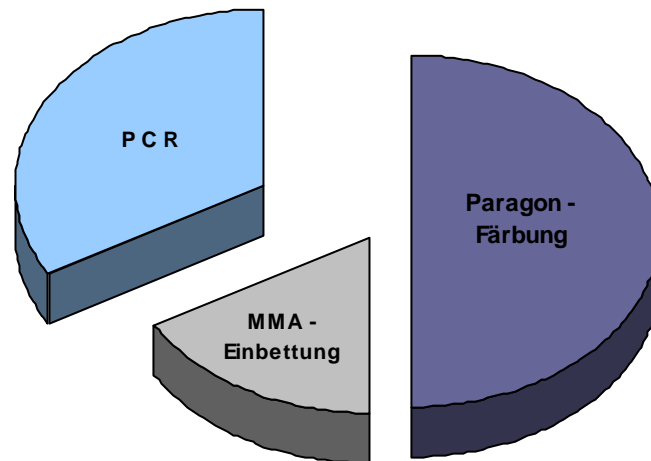
Die unbeimpfte Leitschiene wurde links paravertebral implantiert und die Tasche mit einer subkutanen Naht verschlossen, um eine Fehlplatzierung während der Beobachtungszeit zu verhindern. Direkt im Anschluss wurde die besiedelte Leitschiene in gleicher Weise rechts paravertebral implantiert. Nach Überprüfung der richtigen Platzierung, wurde die Rückenhaut in Einzelknopftechnik verschlossen. Als Nahtmaterial wurde Vicryl 3/0 SH bzw. Vicryl 4/0 (Delasco®) verwendet. Nach Beendigung der Operation wurde den Versuchstieren 0,05 ml Tramadol-HCl nuchal, subkutan als postoperative Analgesie verabreicht. Die Narkose wurde mit dem Antidot der unten beschriebenen Zusammensetzung antagonisiert. Das Antidot wurde mit einer Dosierung von 8,5 ml / kg KG je zur Hälfte i.m. in die Streckseite (M. semitendinosus / M. semimembranosus) des linken und rechten Hinterbeines injiziert. Alle verwendeten Operationsinstrumente wurden vor jedem Versuch sterilisiert.

<b>Narkosemittel:</b>	1 Teil Fentanyl 0,05 mg/ml
	1 Teil Midazolam (Dormicum®) 5 mg/ml
	0,5 Teile Medetomidin (Domitor®) 1 mg/ml
<b>Antidot:</b>	3 Teile Naloxon (Narcanti®) 0,4 mg/ml
	5 Teile Flumazenil (Anexate®) 0,1 mg/ml
	0,5 Teile Atipamezol (Antisedan®) 5mg/ml

#### 2.3.4. Explantation

Die Tiere wurden wie bei der Implantation zur Narkose vorbereitet und narkotisiert und unter der Clean Bench in Bauchlage mit Klebestreifen fixiert. Im Bereich der alten Naht wurde die Haut mit einer Pinzette angehoben und mit einer spitzen sterilen Schere kranialwärts über den Processi spinosi eröffnet. Nach Eröffnung der Subkutan-Naht links, wurden die Leitschiene vorsichtig dorsal mit Unterhautfettgewebe und ventral mit dem M. latissimus dorsi explantiert. Die Leitschiene wurde in einer Petri-

schale in drei Teile aufgeteilt (Abb. 10). Das für die molekularbiologische Auswertung vorhergesehene Stück (1/3 der Leitschiene) wurde mit einem Skalpell von dem anhaftenden Gewebe befreit und in einem Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff (- 196°C) gefroren. Das restliche *Tutobone*<sup>®</sup> wurde für die histologische und raster-elektronenmikroskopische Auswertung verwendet.



**Abb. 10** Aufteilung der Leitschiene

Nach der Explantation der Leitschienen wurde das Versuchstier auf den Rücken gelegt und an den Beinen mit Klebestreifen fixiert. Mit einer 1 ml Spritze, in der 50 µl EDTA vorgelegt waren, wurde der Maus mittels Herzpunktion 0,8 – 1,0 ml Vollblut entnommen, in ein Kryo-Röhrchen überführt und zugleich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss wurde das Versuchstier wieder auf den Bauch gelegt, der Nacken fixiert und mit einem Genickbruch geopfert. Nach Eröffnung der Bauchdecke und des Schädels wurden die Organe (Lunge, Milz, Leber Niere, Herz, Hoden und Gehirn) entnommen und in Kryo-Röhrchen schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Organe, das Blut und die Leitschienen (für molekularbiologische Auswertung) bei - 80°C gelagert.



## 2.4. Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1. DNA – Isolierung

Für die Isolierung der DNA aus den Geweben der Maus, der explantierten Leitschienen und der kultivierten Zellen wurde der *DNeasy Tissue Kit*<sup>®</sup> (Qiagen/Hilden) verwendet. Die hierfür verwendeten Pufferlösungen sind in ihrer chemischen Zusammensetzung vom Hersteller nicht näher bezeichnet.

Die Organe und Leitschienen wurden aus dem Gefrierfach (- 80°C) entnommen, aufgetaut und das Gewicht mittels einer Präzisionswaage bestimmt. Ausgehend von der jeweiligen Art, der Größe und dem Gewicht wurden die Organe entweder direkt in ihrem Originalgefäß weiterverarbeitet oder auf einer mit autoklavierter Alufolie bedecktem Arbeitsfeld gelegt, mit einem Skalpell zerkleinert und in einem neuen sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß nochmals gewogen. Die Leitschienen wurden stets in ihrem Originalgefäß belassen. Gemäß Tab. 1-3 (siehe Anhang) wurde die entsprechende Menge an Proteinase K (600 mAU/ml) und einer Pufferlösung (ATL) hinzugefügt und mit einem Vortexer vermischt, die Proben in der Folge in einen Hybridiser platziert und rotierend bei 55°C über Nacht bis zur vollständigen Lyse inkubiert.

Vom Organlysat wurden 230 µl entnommen, mit 4 µl RNase A versetzt und zwei Minuten bei Raumtemperatur mit 24°C (RT) inkubiert. Das gefrorene antikoagulierte Blut wurde langsam auf RT aufgetaut. Es wurden 100 µl entnommen, mit 20 µl Proteinase K versetzt und mit PBS auf 220 µl Endvolumen aufgefüllt. Nach Zugabe von 4 µl RNase A wurde die Blutprobe für zwei Minuten bei RT inkubiert. Kultivierte Zellen bis zu einer Menge von  $5 \times 10^6$  wurden nach Zählung und Trypsinierung in 200 µl PBS resuspendiert und nach Zugabe von 4 µl RNase A bei RT für zwei Minuten inkubiert. Danach wurden 20 µl Proteinase K hinzugefügt. Zu allen Proben wurde im weiteren Verlauf 200 µl der Pufferlösung AL gegeben und diese in einem Heizblock bei 70°C für 10 Minuten inkubiert und im Folgendem mit 200 µl Ethanol vermischt bis eine homogene Lösung entstand. Die *DNeasy*<sup>®</sup> Isolierungssäule wurde in ein Auffanggefäß platziert, die Lösung vollständig zentral auf die Membran in das obere Reservoir der Säule pipettiert und zentrifugiert (8.000 Umdrehungen/Minute, 1 Minute, RT). Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäß gestellt. Nach Zugabe von 500 µl einer Waschpufferlösung (AW 1) wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt und der Durchlauf abermals verworfen. Die Säule wurde in

ein neues Auffanggefäß platziert und auf die Membran 500 µl eine zweite Waschpufferlösung (AW 2) pipettiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (13.000 Umdrehungen/Minute, 3 Minuten, RT) bis die Membran sichtbar trocken war. Im letzten Schritt wurde die Membran mit 100 µl einer weiteren Pufferlösung (AE) versetzt und für 1 Minute inkubiert und die DNA durch Zentrifugation (8.000 Umdrehungen/Minute, 1 Minute, RT) von der Membran gelöst und aufgefangen. Nach Eichung des Photometers wurden die Reinheit der DNA und die Konzentrationen der einzelnen Proben photometrisch bei 260 nm bestimmt.

## 2.4.2. Qualitative Polymerase Chain Reaction (PCR)

### 2.4.2.1. Ansatz und Reaktionsbedingungen

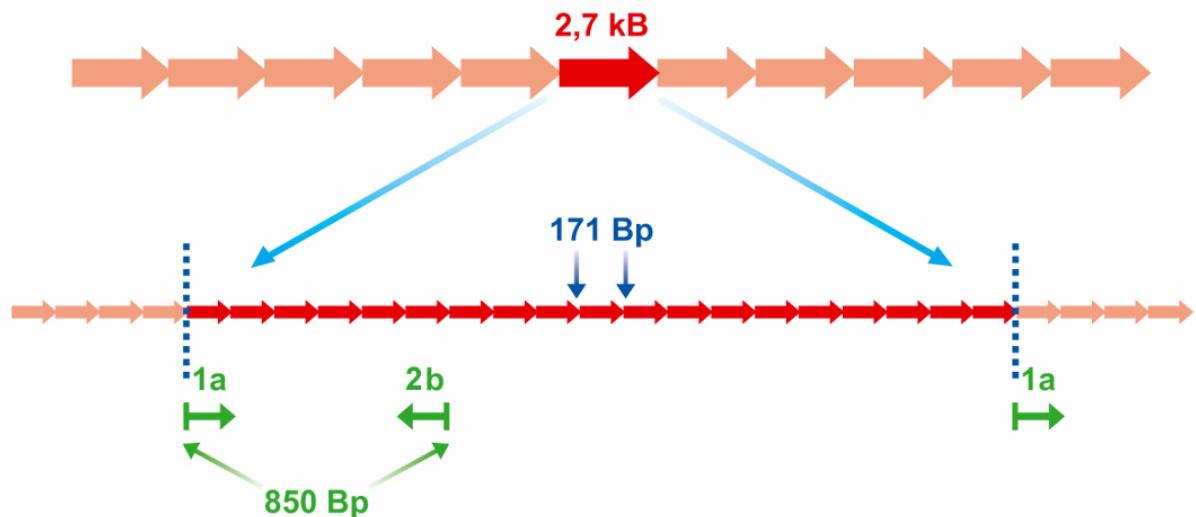
Für den Nachweis von humanspezifischer DNA in den Organen der Versuchstiere wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction = PCR) verwendet. In Anlehnung an die Publikation der Arbeitsgruppe M. Becker et al. wurde für die in dieser Arbeit verwendeten PCR das Primerpaar Cr17\_1a / Cr17\_2b mit folgenden Sequenzen verwendet:

Name	Sequenz 5' 3'
Cr17_1a	GGG ATA ATT TCA GCT GAC TAA ACA G
Cr17_2b	TTC CGT TTA GTT AGG TGC AGT TAT C

**Tab. 1** Primersequenzen

Das zu amplifizierende Segment stammt aus dem Zentromerbereich des humanen Chromosoms 17. Es ist humanspezifisch und hat eine Fragmentlänge von 850 Bp. In Zentromerbereichen der hDNA befinden sich hoch repetitive Einheiten, die zur Alpha-Satelliten Klasse gehören. Alpha-Satelliten-Monomere haben eine Länge von ca. 171 Bp und wiederholen sich ständig, sind jedoch in sich nicht ganz identisch. Die 171 Bp langen Repeats wiederum sind in einer ganz bestimmten Sequenz aneinandergereiht und bilden höher geordnete ebenfalls sich wiederholende Einheiten mit einer Länge von ca. 2,7 kB.

## Alpha Satelliten Region



**Abb. 11** Übersicht über das amplifizierte Segment

Das Segment liegt in mehrerer 1.000-facher Kopienzahl vor, welches gleichzeitig parallel in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden kann. Dadurch ist sichergestellt, dass am Ende eine ausreichende Produktmenge zur Analyse gebildet wird.

Für die PCR wurde PCR-Puffer, Q-Solution und Taq DNA Polymerase (Qiagen/Hilden) verwendet. Ein PCR-Ansatz mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl enthielt 250 ng an humaner genomischer DNA, 200 µM von jedem Nukleotid (dGTP, dATP, dTTP und dCTP), jeweils 0,25 µM von dem oben benannten Sense- und Antisense-Primer, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 units Taq Polymerase und einfach verdünnte Q-Solution. In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden 5 µl Qiagen Pufferlösung (10 x), 10 µl Q-Solution (5 x), 1 µl dNTP Mix (10 mM vom jedem), je 1,25 µl Primer und 0,25 µl Taq-Polymerase gegeben. Ausgehend von der Konzentration der isolierten DNA der einzelnen Gewebeproben, wurde das Volumen, das einer Menge von 250 ng DNA entsprach, hinzugefügt und die Gesamtlösung mit Aqua dest. auf 50 µl aufgefüllt. Mit Hilfe einer Pipette wurde die Lösung durch auf- und abpipettieren gut durchmischt. Alle PCR Reaktionen der Proben wurden in einem Thermozykler unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Nach einer Initialdenaturierung bei 94°C von 3 Min, folgten weitere 40 Zyklen beginnend mit Denaturierung bei 94°C von 30 Sek., gefolgt von einer Annealing-Phase bei 58°C von 1 Min., und einer Polymerasereaktion bei

72°C von 1 Min. Nach Ablauf der 40 Zyklen folgte bei 72 °C für 10 Min. eine Endpolymerisierung und als letztes bei Abkühlung auf 4°C ein Reaktionsabbruch bis zur weiteren Verarbeitung. Als Positivkontrolle wurde aus hMSC isolierte hDNA verwendet. Als Negativkontrolle wurden bei jedem PCR Lauf zum einen aus Mausfibroblasten isolierte DNA und zum anderen Aqua dest. anstelle einer DNA Matrize eingesetzt.

#### 2.4.2.2. Agarosegel

In einem Agarosegel ist man mit Hilfe einer Elektrophorese in der Lage DNA Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen und sichtbar zu machen. Agarosegele bilden dreidimensionale Polysaccharidnetze aus, durch welche die DNA Fragmente nach Anlegen einer Spannung in Richtung der Anode wandern. Große Fragmente haben dabei eine langsamere und kleine eine schnellere Wanderungsgeschwindigkeit durch das Maschennetz. Durch ein parallel mitlaufendes Gemisch definierter Fragmentlängen, Marker oder Längenstandard genannt, kann die Länge der Proben DNA verglichen und eingeschätzt werden. Zur Herstellung eines 1% (w/v) Agarosegels wurden 1 g Agarosepulver mit 100 ml 1 x TAE-Puffer gemischt und bis zur vollständigen Lösung aufgekocht. Nach einer kurzen Abkühlungsphase wurde Ethidiumbromid (EtBr) in das zunächst noch flüssige Gel gegeben (EtBr-Endkonzentration im fertigen Agarosegel 500ng/ml). Das EtBr interkaliert nun mit den DNA Fragmenten und bildet Komplexe, welche später im UV-Licht (302 nm) als leuchtende Bande sichtbar gemacht werden können. Je nach Probenanzahl wurden Agarosegele mit einem Volumen von 50 ml bis 120 ml hergestellt. Die zu untersuchenden amplifizierten DNA PCR - Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit dem Ladepuffer Bromphenol-Blau vermischt, um die DNA Proben zu beschweren und ein Absinken in die Taschen im Agarosegel bis zum Anlegen der Spannung zu gewährleisten. Die elektrophoretische Auftrennung der Nukleotide erfolgte in 1xTAE Laufpuffer bei einer Feldstärke von 5-7 V/ cm über eine Dauer von 1-3 Stunden. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht betrachtet und photographisch bzw. digital dokumentiert.

<b>TAE - Puffer :</b>	40 mM Tris 20 mM Natrium-Acetat 2 mM EDTA mit Eisessig auf pH 8,3 eingestellt
<b>Puffer - Bromphenolblau10x:</b>	30 % (v/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF 0,25 % (w/v) Orange G

### 2.4.3. Quantitative PCR

Für eine genaue mengenmäßige Erfassung von humaner DNA (hDNA) in den Proben wurde im Anschluss eine quantitative PCR durchgeführt. Für die quantitative Bestimmung wurde in der vorliegenden Arbeit das *LightCycler*<sup>®</sup> System (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) verwendet, als fluoreszierender Farbstoff SYBR Green I. Für die Standardkurve wurden Proben mit definierten hDNA Mengen in absteigender Konzentration in einer Verdünnungsreihe als Matrize eingesetzt.

#### 2.4.3.1. Ansatz und Reaktionsbedingungen

Als Primer wurde ein humanspezifischer Primer der Fa. Search-LC (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Das Primerpaar erkennt kein richtiges Motiv, sondern multiple Sequenzen unterschiedlicher Länge auf dem humanen Genom und liefert pro humane Zelle 4080 Transkripte.

Die Primersequenzen sind in folgender Tabelle zu sehen:

Name	Sequenz 5'3'
Sense-Primer	AACATGGTCAAACCCCGTCTC
Anti-Sense -Primer	TGCAGTGGCGGATCTTG

**Tab. 2** Primersequenzen quantitative PCR

Von den zu untersuchenden Proben wurden ausgehend von der individuellen DNA Konzentration stets jeweils 5 ng an genomischer DNA in 10 µl Aqua dest. eingesetzt. Für die Standardreihe wurden in 10 µl Aqua dest. jeweils 60 ng, 6 ng, 0,6 ng, 0,06 ng, 0,006 ng, 0,0006 ng genomische DNA als Matrize eingesetzt. Die 10 µl des Templates wurden in eine *LightCycler*<sup>®</sup>-Kapillare pipettiert und mit 10 µl eines PCR Mix auf 20 µl ergänzt und mit einem Plastikpfropfen verschlossen. Der PCR Mix setzte sich aus 6 µl Aqua dest., 2 µl des Primerpaares und 2 µl des *LightCycler*<sup>®</sup>-FastStart DNA Master SYBR Green I (Fa. Roche, Mannheim, Deutschland) zusammen, das neben dem Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I, die DNA-Polymerase, den PCR-Puffer und die dNTPs enthielt. Die Endkonzentration an MgCl<sub>2</sub> war mit 1mM in jedem Ansatz konstant. Die Kapillaren wurden im Anschluss 4 Minuten zentrifugiert (4°C, 660 U/Min) und danach in ein spezielles Karussell eingelassen und in den *LightCycler*<sup>®</sup> gestellt.

In jedem *LightCycler*<sup>®</sup>-Lauf wurden zusätzlich Kontrollen mitgeführt, wobei humane hDNA als Positivkontrolle, aus Mausfibroblasten isolierte DNA und Aqua. dest. als Negativkontrollen dienten. Nach einer Anfangsdenaturierung von 95°C bei 10 Minuten folgten weitere 45 Zyklen beginnend mit Denaturierung bei 95°C von 10 sek., gefolgt von einer Annealing-Phase bei 68°C von 10 sek., und einer Polymerasereaktion bei 72°C von 16 sek. Im Anschluss an die eigentliche Polymerase-Ketten-Reaktion folgte noch zum Abschluss ein Schmelzprogramm, bei dem die Proben von 58 °C auf 95°C kontinuierlich erhitzt wurden. Dabei denaturieren die Doppelstränge zu Einzelsträngen und geben den Fluoreszenzfarbstoff ab, wodurch es zu einem steilen Fluoreszenzabbruch kommt. Unspezifische Produkte und Primerdimere schmelzen unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur des Produktes und können auf diese Weise detektiert werden.

#### 2.4.3.2. Berechnung der Zellzahlen

Die quantitative Erfassung der überlebten implantierten hMSC erfolgte mittels einer Hochrechnung ausgehend von den *LightCycler*-Ergebnissen beim Einsatz von 5ng der genomischen DNA aus den Gewebeproben. Die ermittelten Zellzahlen wurden auf die gesamte extrahierte DNA Menge einer Probe umgerechnet. Da für diese Auswertung nur 1/3 der ursprünglichen *Tutobone*<sup>®</sup>-Leitschiene zur Verfügung stand,

wurden die ermittelten Zellzahlen mit dem Faktor 3 multipliziert, um somit die Gesamtzellzahl der überlebenden hMSC in der Leitschiene zu ermitteln.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Etablierung der PCR

##### 3.1.1. Optimierung der PCR Bedingungen

Um humane DNA in den eigentlichen Gewebeproben zu detektieren, wurde die Sensitivität des Primerpaares untersucht. Zu diesem Zwecke wurde isolierte hDNA in Aqua dest. in Zehnerschritten verdünnt und in dieser absteigenden Reihe jeweils als Matrize eingesetzt. Ausgehend von einer DNA – Menge von ca.  $6 \times 10^{-12}$  g pro humane Zelle, ergeben sich folgende in Tab. 3 aufgeführte Zelläquivalente.

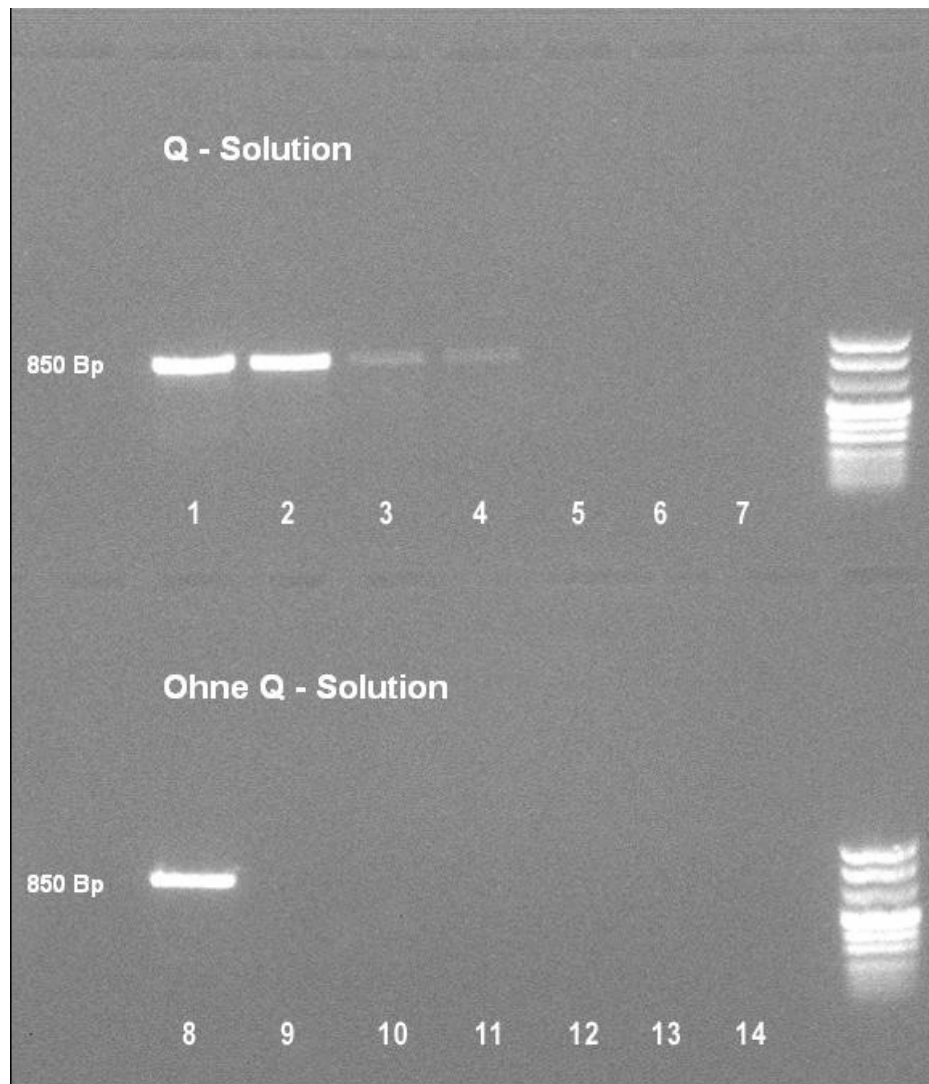
DNA – Menge in ng	Zelläquivalente
0,006	1
10	1.667
1	167
0,1	16,7
0,01	1,67
0,001	0,167
0,0001	0,016

**Tab. 3** Übersicht über DNA – Menge und Zellanzahl

Es konnten mit dem initialen PCR Ansatz hDNA Mengen von 10 ng detektiert werden. In Abb. 12 ist im unteren Bildabschnitt eine positive Spur mit den amplifizierten Produkten (850 Bp) bei eingesetzter Template-Menge von 10ng sichtbar (Spur Nr.8). DNA - Mengen von 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 0,001 ng und 0,0001 ng konnten nicht nachgewiesen werden (Spur Nr. 9 – 13). Das bedeutete einen Nachweis, rechnet man die hDNA Menge auf Zellzahlen zurück, von ca. 1.670 Zellen.

Auch der Versuch mit dem Einsatz der doppelten Menge an amplifizierten PCR Produkten bei der Gelelektrophorese eine sichtbare Spur darzustellen, erbrachte das gleiche Ergebnis.

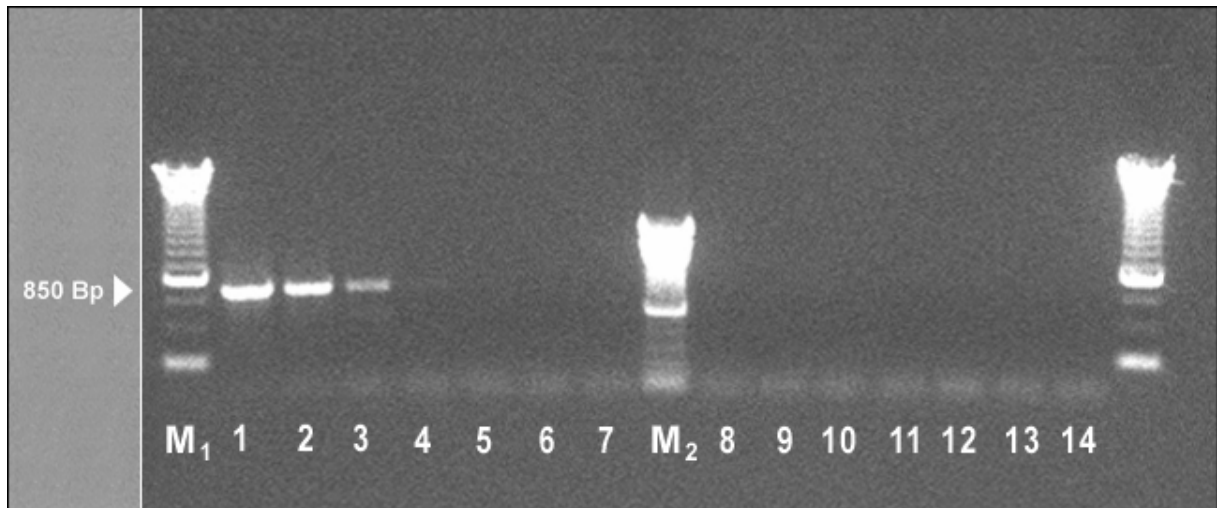




**Abb. 12** PCR – Produkte bei Verwendung mit Q-Solution (Nr. 1 – 7) und ohne Q – Solution (Nr. 8 – 14). Nr. 1 + 8 (10 ng hDNA), Nr. 2 + 9 (1ng hDNA), Nr. 3 + 10 (0,1 ng hDNA), Nr. 4 + 11 (0,01 ng hDNA), Nr. 5 + 12 (0,001 ng hDNA), Nr. 6 + 13 (0,0001 ng hDNA), Nr. 7 + 14 (H<sub>2</sub>O – Kontrolle), Marker 100 Bp rechts

Durch Hinzunahme der Q-Solution zeigten sich bei ansonsten gleich bleibenden Versuchsbedingungen zusätzliche Spuren bei Einsatz von geringeren hDNA Template-Mengen. Wie in Abb. 12 zu sehen ist, zeigten sich nach der Gelelektrophorese bei der Verwendung der Q-Solution im Gegensatz zur einfachen PCR zusätzlich positive Signale mit einer einheitlichen Fragmentlänge von 850 Bp bei hDNA Mengen von 10 ng, 1 ng, 0,1 ng und 0,01 ng an eingesetzter hDNA (Spur Nr. 1 - 4). Kein Nachweis von PCR Fragmenten bei 0,001ng und 0,0001ng hDNA (Spur Nr. 5 und 6)

Zum Ausschluss detektierbarer muriner DNA oder PCR Nebenprodukte wurden aus Mausfibroblasten isolierte DNA in gleicher Weise mit Aqua dest. in Zehnerschritten verdünnt und als Matrize in abnehmender Folge eingesetzt. Die eingesetzte Template-Menge war gleich.



**Abb. 13** PCR-Produkte bei Einsatz von hDNA in abnehmender Konzentration Nr. 1 – 6 und beim Einsatz von mDNA in abnehmender Konzentration Nr. 8 –13. Nr. 7 und Nr. 14 jeweils Negativ-Kontrollen mit Aqua. Dest anstatt DNA. M1=Marker 250Bp, M2=100Bp

Wie Abb.13 zeigt waren positive PCR Fragmente mit der erwarteten Länge von 850 Bp nur bei Einsatz humaner DNA (Spur Nr. 1 - 6) und auch dort nur bis zu einer eingesetzten Matrizenmenge von 10 ng bis 0,01 ng hDNA (Spur Nr. 1 - 4) bei der Gelelektrophorese sichtbar. Kein Nachweis bei hDNA Mengen von 0,001ng und 0,0001ng (Spur Nr. 5 und 6). Die Spur Nr. 8 - 13 zeigte keine amplifizierten DNA Fragmente beim gleichen Primerpaar und muriner DNA als Matrize bis zu einer Menge von 0,001ng. Auch eine höhere Template-Menge von 100 ng mDNA (Spur Nr. 8) zeigte negative Ergebnisse.

### 3.1.2. Zellgemische

Die Untersuchung der DNA aus Gewebeproben stellte jedoch zusätzliche Anforderungen an das System. Im Gegensatz zu den o.b. Versuchen, bei denen jeweils speziesspezifische DNA separat in kleinsten Mengen nachzuweisen war, war es notwendig zu untersuchen in wie fern sich die Detektionsfähigkeit verändert, wenn als Matrize gemischte DNA bestehend aus hDNA und mDNA zum Einsatz kommt. Zu diesem Zwecke wurden Zellgemische aus hMSC und Mausfibroblasten hergestellt. Die Zellmenge der Mausfibroblasten blieb dabei mit  $1 \times 10^6$  Zellen konstant. Variiert wurde in logarithmischen Verdünnungsschritten die Menge der hinzugefügten hMSC. Bis zu der hinzugefügten Zellmenge von 100 hMSC, wurde die Menge durch Verdünnung einer Zellsuspension gewonnen. Für die letzten zwei Zellgemische der Ver-

dünnungsreihe wurden die Zellen mit Hilfe des single-cell-picking (siehe 2.2.4) gewonnen.

Wie in Tab. 4 aufgelistet, wurden diese Zellgemische in jeweils dreifacher Ausführung hergestellt und deren DNA isoliert.

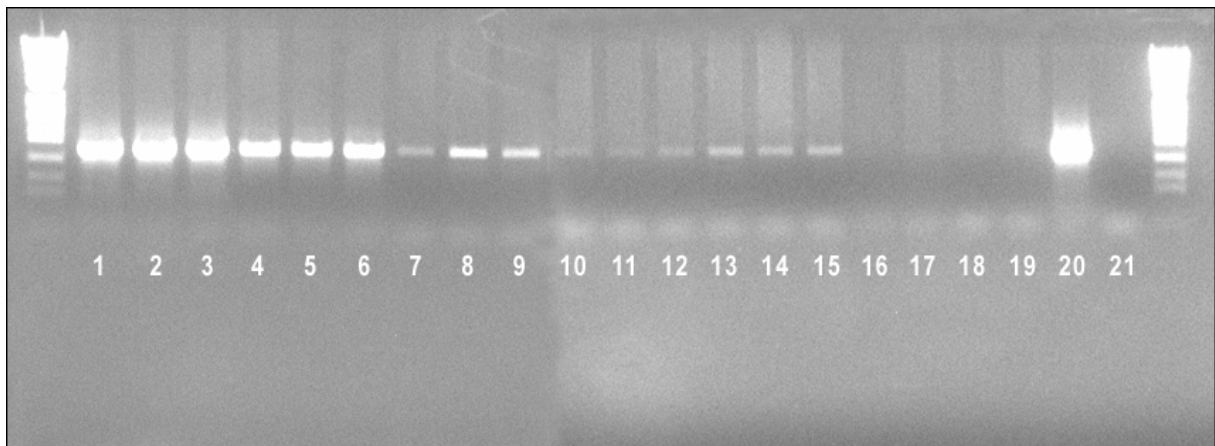
Laufende Nummer	Mausfibroblasten - Zellzahl	hMSC - Zellzahl
1 - 3	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$
4 - 6	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^4$
7 - 9	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^3$
10 - 12	$1 \times 10^6$	100
13 - 15	$1 \times 10^6$	10
17 - 18	$1 \times 10^6$	1
19 (Negativkontrolle)	$1 \times 10^6$	keine
20 (Positivkontrolle)	keine	$1 \times 10^6$
21 (Wasserkontrolle)	keine	keine

**Tab. 4** Übersicht über Zellgemische von Mausfibroblasten und hMSC. Laufende Nummer mit Nummerierung von Abb. 14 identisch

Die zuerst gewählte PCR Methode mit 35 Zyklen, zeigte sichtbare Signale doch waren insbesondere in höheren Verdünnungsstufen schwache Bande schwerer zu erkennen. Aus diesem Grunde wurde eine Zyklenzahl von 40 gewählt und alle weiteren Ergebnisse mit dieser Zyklenzahl erzielt.

Auf der Abb. 14 sind Banden, alle mit einer Fragmentlänge von 850 Bp (Spur Nr. 1 - 18) in abnehmender Intensität zu sehen. Deutliche Banden waren bei Spur Nr. 1 - 15 zu erkennen. Die positiven Signale (Spur Nr. 17 - 18) sind aufgrund der Photographietechnik schlechter zu sehen, waren unter initialem UV-Licht jedoch deutlich sichtbar. Die zu erkennende Signalabschwächung repräsentierte die gemäß Tab. 4 aus unterschiedlichen Zellzahlen gewonnene und eingesetzte Menge an DNA-Matrize. Bei der eingesetzten reinen mDNA aus Mausfibroblasten erschien kein positives Signal (Spur Nr. 19). Die Banden bei Nr. 17 und 18 zeigten mit ihrem schwachem positiven Signal, dass die hDNA Menge, welche einer Zelle entspricht, auch bei gleichzeitigem Überschuss an Fremd - DNA mit Hilfe der PCR detektiert werden

konnte. Das starke Signal der als Positivkontrolle eingesetzter hDNA aus hMSC (Spur Nr.20) und die Zuordnung zu dem Fragmentlängenmarker beidseits zeigten, dass es sich bei dem PCR Produkt um das durch das Primerpaar Cr17\_1a und Cr17\_2b eingegrenzte Segment von 850 Bp handelte. Die Detektion einer humanen Zelle in  $1 \times 10^6$  Mausfibroblasten war somit möglich.



**Abb. 14** PCR – Produkte auf Agarosegel aus Zellgemischversuch (Nummerierung Tab. 4)

### 3.1.3. Isolierung der DNA aus Geweben

Bei der DNA – Isolierung aus den Geweben wurde das gesamte vorhandene Organ- gewebe verwendet und lysiert. Aus dem Lysat wurden jeweils zwei Proben zu jeweils 230  $\mu$ l entnommen, aus denen die DNA isoliert wurde. Die zwei Proben entsprachen jeweils Gewebeproben von ca. 25 mg. Die Organe Herz und Leber und die eingewachsenen Leitschienen (besiedelt und unbesiedelt) konnten als Ganzes ohne ein Zerteilen in den Pufferlösungen über Nacht lysiert werden. Die Lösungen waren homogen und gut durchmischbar. Das Gleiche galt für Blut. Bei den Leitschienen kam es zur vollständigen Lyse des eingewachsenen Gewebes, das Leitschienenengerüst blieb von dem Vorgang unberührt, so dass die Trabekelstruktur nach Lyse noch gut zu erkennen war. Die Organe Milz, Lunge, Gehirn und Hoden zeigten nach dem Lysevorgang über Nacht zunächst eine leicht gelatinöse Lösung. Durch das Zerteilen der Organe im noch gefrorenen Zustand vor der Zugabe der Proteinase K und der Pufferlösung konnte die Löslichkeit jedoch verbessert werden. Vor der Weiterverarbeitung musste die Lösung vorsichtig mehrmals auf- und abpipettiert werden, um eine bessere Homogenisierung zu erreichen.

Die Leitschienen zeigten bereits nach der Explantation und Zerteilung makroskopische Unterschiede zwischen beimpften und unbeimpften *Tutobone*<sup>®</sup>-Zylindern. Die besiedelten Leitschienen zeigten einen dichteren Durchbau mit Gewebe und die interkonnektierenden Poren erschienen besser verwachsen.

Tab. 5 zeigt exemplarisch eine Übersicht über die Organgewichte zweier Versuchstiere nach 2 und nach 12 Wochen und der dazugehörigen DNA - Ausbeute:

	Organ	Gewicht in mg	DNA Konzentration in ng/μl	DNA Ausbeute in μg
2 Wochen				
	Leber	385	151,5	30,3
	Milz	135	184,5	36,9
	Niere	255	73,6	14,7
	Lunge	81	19,0	3,8
	Herz	128	8,3	1,6
	Blut (Volumen)	220 μl	15,0	1,5
12 Wochen				
	Leber	435	76,2	15,2
	Milz	127	129,7	25,9
	Niere	275	53,6	10,7
	Lunge	220	23,0	4,6
	Herz	240	16,0	3,2
	Gehirn	446	13,0	2,6
	Hoden	122	20,1	4,0
	Blut (Volumen)	220 μl	12,4	1,2

**Tab. 5** Ausgewählte Organgewichte und Ausbeute nach DNA – Isolierung

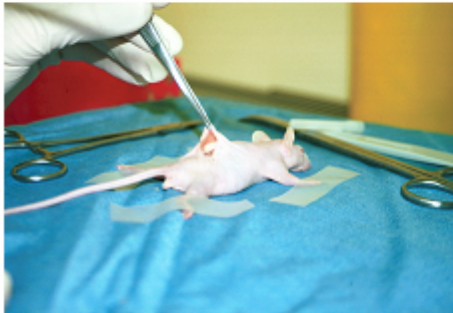
## 3.2. Tierversuchsergebnisse

### 3.2.1. Besiedlungseffizienz

Nach Beimpfung der Leitschienen wurde die Zahl der nicht-adhärenenten Zellen aus den restlichen Zell-Medium-Suspension mittels Zellzählung bestimmt. Es wurde eine Besiedlungseffizienz von 40-60 % erreicht.

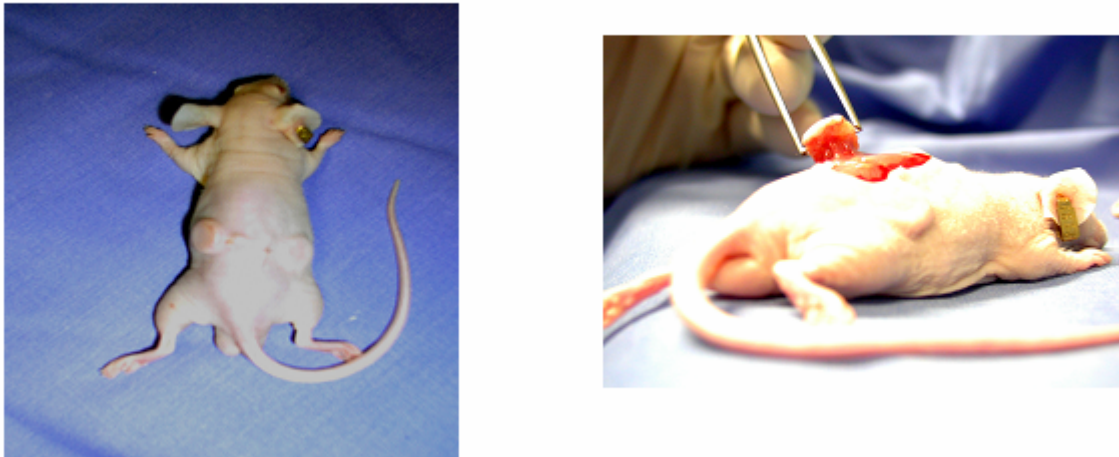
### 3.2.2. Versuchstiere

Insgesamt wurden bei 14 Versuchstieren Leitschienen implantiert. Es folgte ein Beobachtungszeitraum von zwei Wochen (sechs Tiere), vier Wochen (vier Tiere), acht Wochen (zwei Tiere) und zwölf Wochen (zwei Tiere). Die Operationswunden aller operierten Versuchstiere waren stets reizlos und nach zwei Wochen gut verheilt.



**Abb. 15** Implantation der Leitschienen (links), Situs postoperativ (rechts)

Zu vier unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten (2, 4, 8 und 12 Wochen) nach Implantation wurden die Organe und Leitschienen explantiert. Die Leitschienen waren bei jedem Tier zu jedem Explantationszeitpunkt mit dem umgebenden Gewebe verwachsen und miteinander nicht in Berührung gekommen.



**Abb. 16** Reizlose Narbe (4. Woche), Explantation der Leitschiene nach 4 Wochen

### 3.2.3. Qualitative PCR

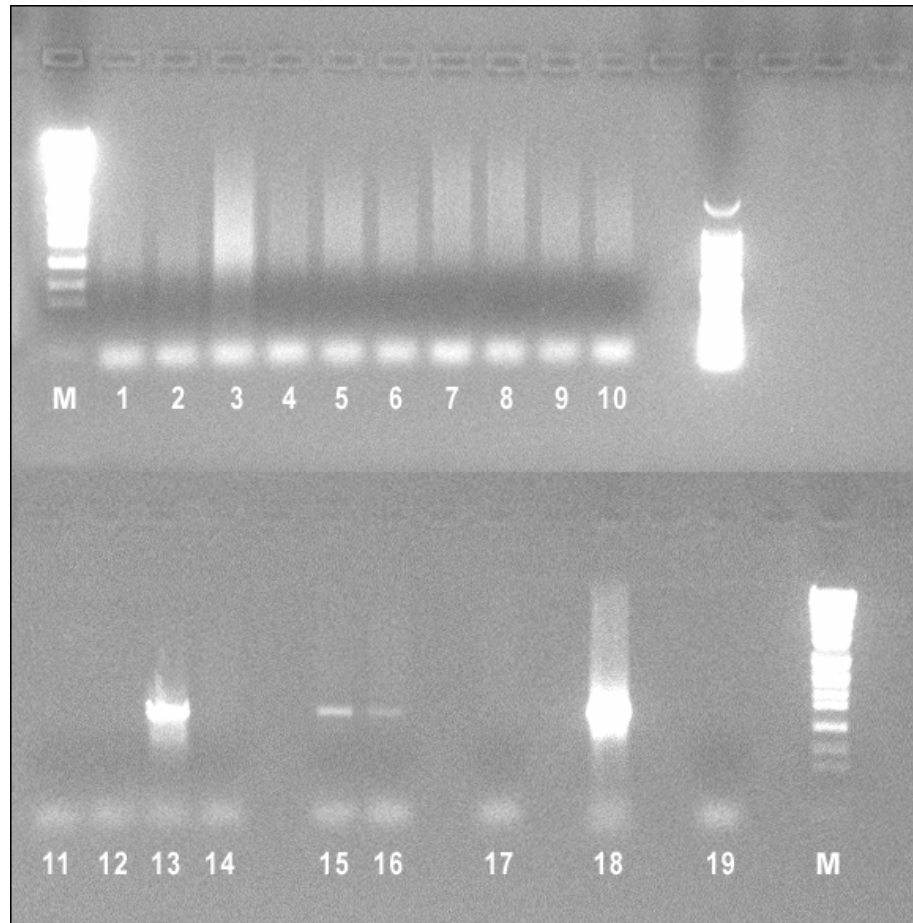
Um eine ausreichende Sensitivität bei jedem Versuchstier zu gewährleisten, wurde bei jedem PCR - Lauf eines Versuchstiers zusätzlich jeweils eine interne Kontrolle bestehend aus den DNA Proben eines Zellgemisches von Mausfibroblasten und hMSC ( $1 \times 10^6$  Mausfibroblasten + 10 hMSC und  $1 \times 10^6$  Mausfibroblasten + 1 hMSC) mit untersucht (wie unter 3.1.2. beschrieben). Exemplarisch werden Abbildungen jeweils eines Tieres zu je einem Endzeitpunkt von 2, 4, 8 und 12 Wochen gezeigt.

#### 3.2.3.1. Zwei Wochen

Positive PCR Banden für den Nachweis humaner DNA (850 Bp) waren in der besiedelten Leitschiene (Spur Nr. 13), den internen Kontrollen für den Nachweis von 10 humanen Zellen (Spur Nr. 15) und 1 humanen Zelle (Spur Nr. 16), sowie bei der Positivkontrolle ( $1 \times 10^6$  hMSC, Spur Nr. 18) zu erkennen. Keine Signale zeigen die Spuren Nr. 1 – 10, bei denen DNA aus den Organen Leber (1+2), Milz (3+4), Niere (5+6), Lunge (7+8), Herz (9+10) verwendet wurde. Auch in den Blutproben (Spur Nr. 11 und 12) konnte keine humane DNA nachgewiesen werden. Bei den unbesiedelten Leitschienen (Spur Nr.14), der Negativkontrolle mit reiner mDNA (Spur Nr. 17) und der Wasserkontrolle (Spur Nr. 19) waren keine amplifizierten DNA Fragmente nachweisbar.

Das beschriebene Resultat spiegelt die Ergebnisse der fünf anderen Versuchstiere zum gleichen Endpunkt wider.

Abb. 17 zeigt exemplarisch die Auswertung eines Tieres nach 2 Wochen.



**Abb. 17** PCR – Ergebnisse nach 2 Wochen Implantation: Nr. 1 + 2 (Leber), Nr. 3 + 4 (Milz), Nr. 5 + 6 (Niere), Nr. 7 + 8 (Lunge), Nr. 9 + 10 (Herz), Nr. 11 + 12 (Blut), Nr. 13 (besiedelte Leitschiene), Nr. 14 (unbesiedelte Leitschiene), Nr. 15 (interne Kontrolle für 10 humane Zellen), Nr. 16 (interne Kontrolle für 1 humane Zelle), Nr. 17 (Negativkontrolle Maus), Nr. 18 (Positivkontrolle hMSC), Nr. 19 (Negativkontrolle Wasser), M=Marker 250 Bp

### 3.2.3.2. Vier Wochen

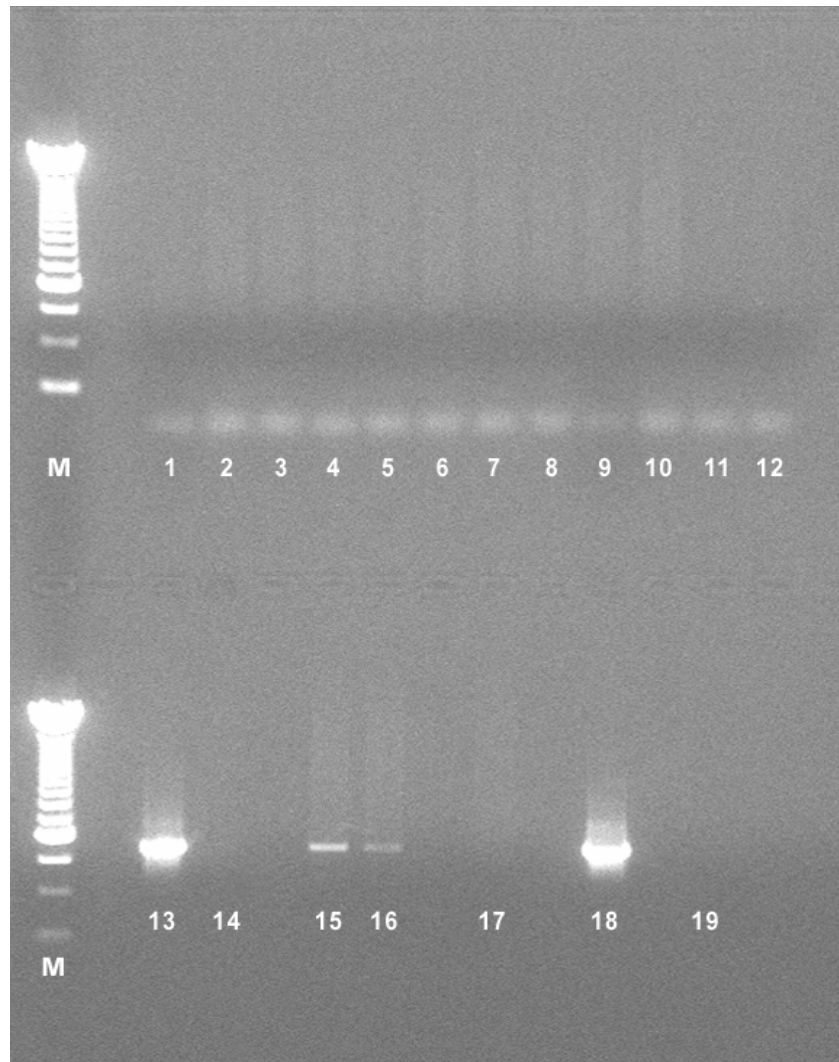
Nach einer Implantatverweildauer von vier Wochen wurden weitere vier Tiere geopfert, die Organe aufbereitet und die DNA untersucht (Abb. 18).

Die Auswertung der PCR ergab positive Banden für humane DNA (Fragmentlänge 850 Bp) bei der besiedelten Leitschiene (Spur Nr. 13), bei den internen Kontrollen für 10 humane Zellen (Spur Nr. 15) und 1 humane Zelle (Spur Nr. 16) und bei der Positivkontrolle mit hMSC ( $1 \times 10^6$  hMSC, Spur Nr. 18).



Negativ war das Ergebnis bei der Organuntersuchung (Spur Nr. 1 – 10) von Leber (1+2), Milz (3+4), Niere (5+6), Lunge (7+8), Herz (9+10). Ebenso konnte kein Nachweis für humane DNA im zirkulierenden Blut (Nr. 11 + 12) gezeigt werden.

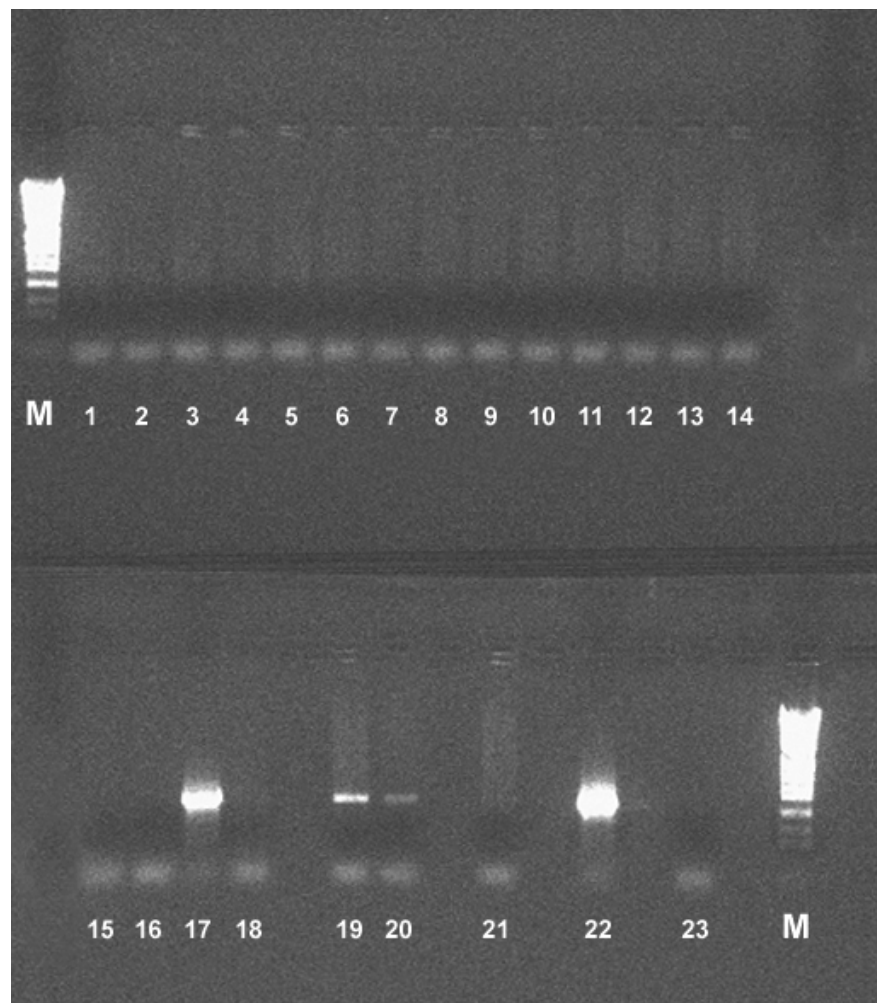
Bei der unbesiedelten Leitschiene (Spur Nr. 14), Negativkontrolle mit reiner mDNA (Spur Nr. 17) und Wasserkontrolle (Spur Nr. 19) zeigte sich ebenso keine Bande. Das Ergebnis war identisch für alle vier Versuchstiere.



**Abb. 18** PCR – Ergebnisse nach 4 Wochen Implantation: Nr. 1 + 2 (Leber), Nr. 3 + 4 (Milz), Nr. 5 + 6 (Niere), Nr. 7 + 8 (Lunge), Nr. 9 + 10 (Herz), Nr. 11 + 12 (Blut), Nr. 13 (besiedelte Leitschiene), Nr. 14 (unbesiedelte Leitschiene), Nr. 15 (interne Kontrolle für 10 humane Zellen), Nr. 16 (interne Kontrolle für 1 humane Zelle), Nr. 17 (Negativkontrolle Maus), Nr. 18 (Positivkontrolle hMSC), Nr. 19 (Negativkontrolle Wasser), M=Marker 250 Bp

### 3.2.3.3. Acht Wochen

Nach einer Zeitspanne von acht Wochen wurden zwei weitere Mäuse geopfert. Im Gegensatz zu den Zeitpunkten nach zwei und vier Wochen, wurde zusätzlich Hoden und Gehirn mit untersucht. Abgebildet in Abb. 19 die Auswertung eines Versuchstieres. Das Ergebnis war jedoch für beide Tiere identisch.



**Abb. 19** PCR – Ergebnisse nach 8 Wochen Implantation: Nr. 1 + 2 (Leber), Nr. 3 + 4 (Milz), Nr. 5 + 6 (Niere), Nr. 7 + 8 (Lunge), Nr. 9 + 10 (Herz), Nr. 11 + 12 (Gehirn), Nr. 13 + 14 (Hoden), Nr. 15 + 16 (Blut) Nr. 17 (besiedelte Leitschiene), Nr. 18 (unbesiedelte Leitschiene), Nr. 19 (interne Kontrolle für 10 humane Zellen), Nr. 20 (interne Kontrolle für 1 humane Zelle), Nr. 21 (Negativkontrolle Maus), Nr. 22 (Positivkontrolle hMSC), Nr. 23 (Negativkontrolle Wasser), M=Marker 250 Bp

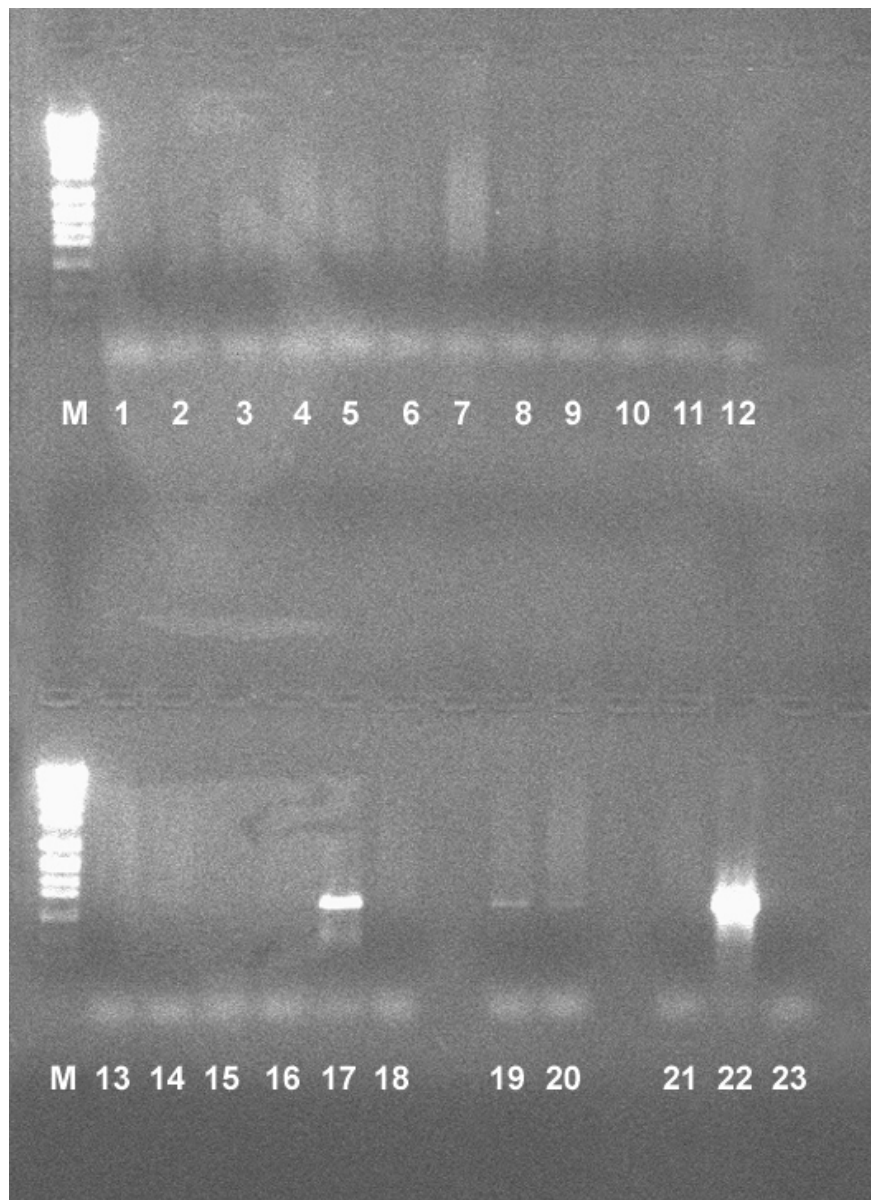
Positive Signale zeigten sich bei der besiedelten Leitschiene (Spur Nr. 17), den internen Kontrollen 10 humane Zellen (Spur Nr. 19) und 1 humane Zelle (Spur Nr. 20) und der Positivkontrolle ( $1 \times 10^6$  hMSC, Spur Nr. 22). Die PCR der untersuchten Organe, Leber (Spur Nr. 1+2), Milz (Nr. 3+4), Niere (Spur Nr. 5+6), Lunge (Spur Nr.

7+8), Herz (Spur Nr. 9+10), Gehirn (Spur Nr. 11+12), Hoden (Spur Nr. 13+14) erbrachte negative Ergebnisse für die Existenz von hDNA. Ebenso zeigten die Blutproben (Spur Nr. 15+16) keine Bande. Kein Signal zeigte sich bei der unbesiedelten Leitschiene (Spur Nr. 18), der Negativkontrolle mit mDNA (Spur Nr. 21) und der Wasserkontrolle (Spur Nr. 23).

#### 3.2.3.4. Zwölf Wochen

Das Ergebnis der Auswertung eines Tieres nach einem Beobachtungszeitraum von 12 Wochen wird in Abb. 20 dargestellt. Es zeigte sich ein Nachweis humaner DNA bei der besiedelten Leitschiene (Spur Nr. 17), den internen Kontrollen für 10 humane Zellen (Spur Nr. 19) und 1 humane Zelle (Spur Nr. 20) und bei der Positivkontrolle ( $1 \times 10^6$  hMSC, Spur Nr. 22).

Bei den untersuchten Organen Leber (Spur Nr. 1+2), Milz (Spur Nr. 3+4), Niere (Spur Nr. 5+6), Lunge (Spur Nr. 7+8), Herz (Spur Nr. 9+10), Gehirn (Spur Nr. 11+12), Hoden (Spur Nr. 13+14) wurden keine amplifzierten hDNA Fragmente detektiert. Auch die Untersuchung des Blutes (Spur Nr. 15+16) war negativ. Das PCR Ergebnis war gleichfalls negativ für hDNA bei der unbesiedelten Leitschiene (Spur Nr. 18), der Negativkontrolle aus mDNA (Spur Nr. 21) und der Wasserkontrolle (Spur Nr. 23).



**Abb. 20** PCR – Ergebnisse nach 12 Wochen Implantation: Nr. 1 + 2 (Leber), Nr. 3 + 4 (Milz), Nr. 5 + 6 (Niere), Nr. 7 + 8 (Lunge), Nr. 9 + 10 (Herz), Nr. 11 + 12 (Gehirn), Nr. 13 + 14 (Hoden), Nr. 15 + 16 (Blut) Nr. 17 (besiedelte Leitschiene), Nr. 18 (unbesiedelte Leitschiene), Nr. 19 (interne Kontrolle für 10 humane Zellen), Nr. 20 (interne Kontrolle für 1 humane Zelle), Nr. 21 (Negativkontrolle Maus), Nr. 22 (Positivkontrolle hMSC), Nr. 23 (Negativkontrolle Wasser), M=Marker 250Bp

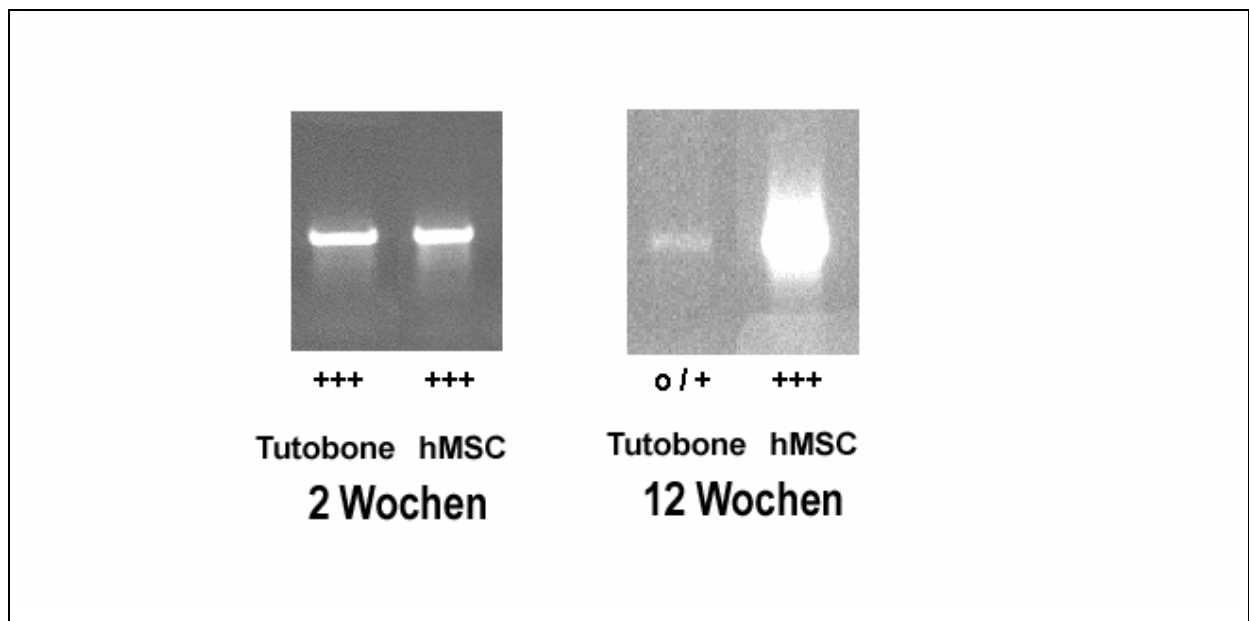
#### 3.2.4. Semiquantitative Auswertung

Aus den Ergebnissen der qualitativen Untersuchung ließ sich festhalten, dass humane Zellen zu allen Explantationszeitpunkten in den Leitschienen überlebten. Auffällig war, dass die Bandenintensitäten der Proben zu den unterschiedlichen Versuchszeitpunkten im Rahmen der qualitativen PCR-Auswertung jedoch im Verlauf deutlich abnahmen. Exemplarisch wurde in Abb. 21 ein Vergleich zwischen den Spurintensitäten

täten der Leitschienenbewertung von Versuchstieren nach zwei und nach zwölf Wochen gegenübergestellt.

Die hMSC Spur (= Positivkontrolle) entsprach jeweils einer initialen Template-Menge von 250 ng reiner humaner DNA aus hMSC und zeigte eine maximal mögliche Signalintensität in der Gelelektrophorese („+++“). Nach dem ersten Versuchsabschnitt (zwei Wochen) zeigte sich eine ähnlich starke Intensität der Spur der besiedelten Leitschienen-Probe („+++“). Dagegen stellte sich nach zwölf Wochen zwar durchaus eine positive Spur („o/+“) dar, sie war jedoch erheblich schwächer im Vergleich zu der Positivkontrolle.

Die Spurlintensitäten korrelierten mit den amplifizierten DNA Kopien und diese wiederum mit der Ausgangsmenge an humaner DNA in den Leitschienen zum Explantationszeitpunkt. Schließt man von der eingesetzten humanen DNA Menge auf die Anzahl hMSC, so war eine deutliche Abnahme der Zellzahl zu beobachten.



**Abb. 21** Abnehmende Spur-Signalintensität der beimpften Leitschienen zu zwei unterschiedlichen Explantationszeitpunkten (zwei Wochen und zwölf Wochen). Linke Spur (Tutobone<sup>®</sup>) repräsentiert jeweils Leitschiene, rechte Spur (hMSC) repräsentiert jeweils Positivkontrolle mit maximaler initialer Template-Menge (250ng hDNA). (Notwendige Überbelichtung führt bei Positivkontrolle von 12 Wochen phototechnisch zu überhöhtem Signal).

### 3.2.5. Quantitative PCR

Da in den Organen und in den nicht besiedelten Leitschienen keine humane DNA nachgewiesen werden konnte, erfolgte die quantitative Erfassung der hDNA und somit der Anzahl der überlebten hMSC nur in den besiedelten Leitschienen.

### 3.2.5.1. Etablierung der quantitativen PCR

Zunächst wurde das eingesetzte Primerpaar auf die Fähigkeit getestet, als Matrize auch in gemischter genomischer DNA hDNA Sequenzen zu amplifizieren. Dazu wurde die extrahierte genomische DNA aus den Zellgemischen als Template eingesetzt. Dabei zeigte sich zum einen, dass es zur Amplifikation von Transkripten kam und somit die multiplen Sequenzen auf dem humanen Genom auch in einem Überschuss an humanfremder DNA erkannt werden. Zum anderen nahm die Menge der amplifizierten Kopien bei den Proben aus den DNA - Gemischen mit abnehmender humaner Zellzahl gleichfalls kontinuierlich ab. Quantitative Aussagen konnten aufgrund eines fehlenden Vergleichsstandards nicht getroffen werden.

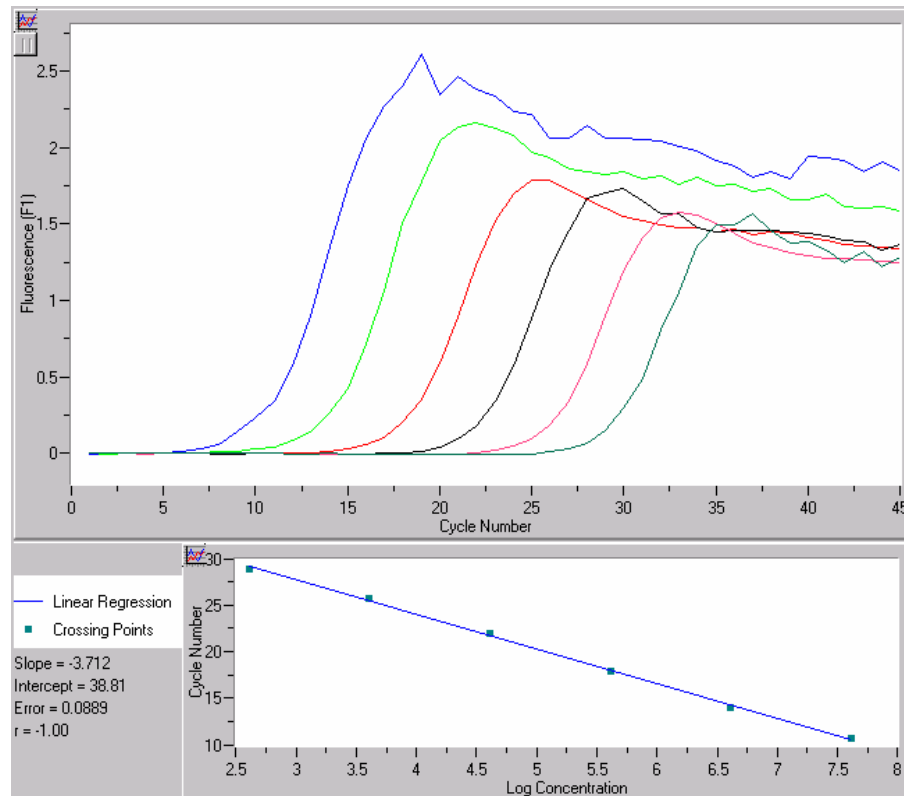
Dieser Standard wurde in der Folge durch die Standardkurve in der Abb. 22 generiert.

Hierfür wurde reine genomische hDNA in Aqua dest. verdünnt und in absteigender Konzentration (60.000 pg, 6.000 pg, 600 pg, 60, pg, 6 pg und 0,6 pg) als Matrize für die PCR im *LightCycler*<sup>®</sup> eingesetzt. Die eingesetzte Menge konnte wie in Tab. 6 einer Kurvenfarbe zugeordnet werden.

Kurvenfarbe	Menge hDNA in pg	hMSC Zellzahl	Transkripte
Blau	60.000	10.000	40.800.000
Grün	6.000	1.000	4.080.000
Rot	600	100	408.000
Braun	60	10	40.800
Rosa	6	1	4.080
Dunkelgrün	0,6	0,1	408

**Tab. 6** Übersicht eingesetzter hDNA Mengen für RT-PCR und Zuordnung zu Abb. 22

Die Kurven der Fluoreszenzsignale der einzelnen Proben stellten sich in gleichmäßigem Abstand dar und stiegen gleichmäßig mit zunehmender Produktmenge bis zur Plateauphase hin an.



**Abb. 22** Standardkurve. Oberer Teil der Abbildung: Fluoreszenzsignalkurven zu hDNA Verdünnungsproben. Unterer Teil der Abbildung: Crossing Points (ausgewählter Schwellenwert, CT-Wert) übertragen auf logarithmische Template Konzentration

Die daraus generierte Standardkurve zeigte eine Gerade (unterer Teil Abb. 22), die alle „Crossing Points“ einschloss und als Basis für die weiteren Untersuchungen verwendet wurde.

### 3.2.5.2. Auswertung der Proben

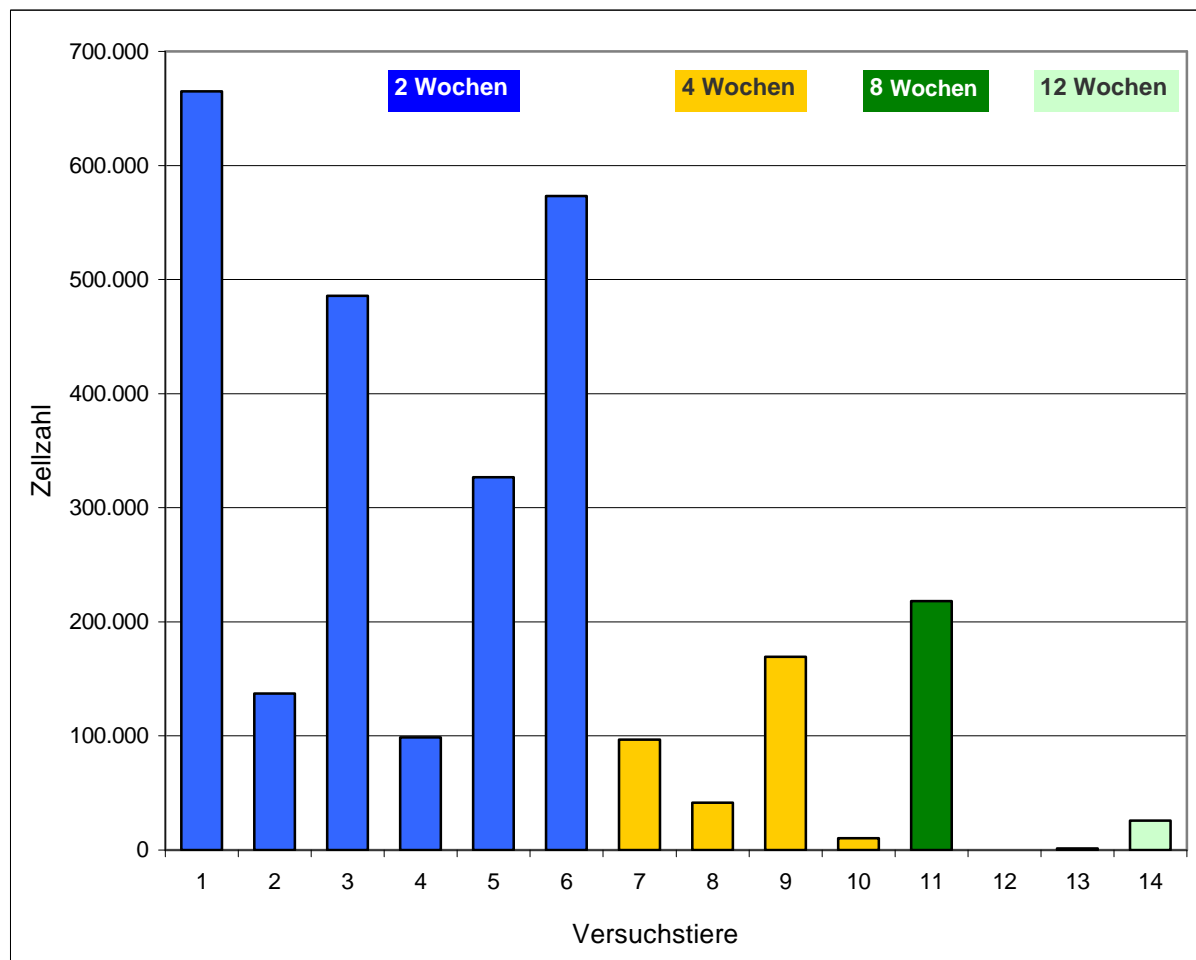
Die bei der Auswertung ermittelten Zellzahlen beziehen sich auf einen Einsatz von 5 ng genomischer DNA als Template. Die Gesamtzellzahl wurde wie in 2.4.3.2. berechnet.

Einen Überblick der Auswertung der besiedelten Leitschienen zeigt Abb. 23 und Tab. 7.

Implantationsdauer	Lfd. Nr.	DNA Ausbeute aus hDNA u. mDNA in ng	Anzahl humaner Zellen laut Light-Cycler Ergebnis in 5ng	Gesamtzellzahl an hMSC in 1/3 Tutobone	Gesamtzellzahl im gesamten Tutobone
2 Wochen	1	6.840,00	162,00	221.616,00	664.848,00
	2	4.080,00	56,00	45.696,00	137.088,00
	3	4.680,00	173,00	161.928,00	485.784,00
	4	14.960,00	11,00	32.912,00	98.763,00
	5	7.780,00	70,00	108.920,00	326.760,00
	6	6.680,00	143,00	191.048,00	573.144,00
4 Wochen	7	2.340,00	69,00	32.292,00	96.876,00
	8	4.320,00	16,00	13.824,00	41.472,00
	9	4.280,00	66,00	56.496,00	169.488,00
	10	5.680,00	3,00	3.408,00	10.244,00
8 Wochen	11	6.860,00	53,00	72.716,00	218.148,00
	12	3.860,00	0,02	15,00	45,00
12 Wochen	13	6.020,00	0,40	481,00	1.443,00
	14	2.160,00	20,00	8.640,00	25.920,00

**Tab. 7** Auflistung der Anzahl der überlebenden hMSC zu den einzelnen Explantationszeitpunkten





**Abb. 23** Übersicht zur Anzahl der überlebenden hMSC in den Leitschienen zu unterschiedlichen Explantationszeitpunkten

### Zwei Wochen

Nach zwei Wochen variierte die Anzahl der überlebten Zellen in den Leitschienen zwischen 665.000 und 99.000. Bei drei von sechs Tieren hatten nach 2 Wochen noch mehr als 480.000 Zellen überlebt. In einem Implantat konnten um die 325.000 Zellen nachgewiesen werden und bei zwei Versuchstieren waren nur noch 137.000 bzw. 99.000 Zellen am Leben (Abb. 23, blaue Säulen, 1-6). Der Mittelwert betrug 381.065 Zellen (+/- 212.352 Standardabweichung).

### Vier Wochen

Nach einer Implantationsdauer von vier Wochen variierten in den untersuchten Leitschienen die Zellzahlen von 10.000 bis 170.000. Der Mittelwert lag bei 69.863 Zellen (+/- 60.502 Standardabweichung) und betrug damit 1/5 der initial implantierten Zellen (Abb. 23, gelbe Säulen 7-10).

### Acht Wochen

Nach acht Wochen Implantationsdauer konnten in den Leitschienen noch 45 bzw. 218.000 Zellen detektiert werden (Abb. 23, grüne Säulen 11-12).

### Zwölf Wochen

Bei der letzten Versuchsgruppe nach 12 Wochen konnte beim ersten Tier 1.450 überlebende hMSC berechnet werden. Bei dem zweiten Tier zeigte sich die Anzahl von ca. 25.000 Zellen (Abb. 23, hellgrüne Säulen 13-14).

Insgesamt war eine stark abnehmende Tendenz bei den überlebenden Zellen mit zunehmender Implantationsdauer beobachtbar.

## 4. Diskussion

### 4.1. Leitschiene und Tierversuche

#### 4.1.1. Leitschiene

Der Einsatz von Knochenersatzmaterialien benötigt bei Knochendefekten bestimmte Voraussetzungen bezüglich der Frakturstabilität. Als besonders geeignet zeigen sich behandelte spongiöse Knochenmaterialien allogener oder xenogener Herkunft, da sie aufgrund ihrer geometrischen Feinstruktur den physiologischen Verhältnissen *in vivo* am nächsten kommen (Kneser et al. 2006a). Aufgrund der bereits bestehenden klinischen Zulassung, fiel die Wahl in dieser Arbeit auf eine lösungsmittelkonservierte und  $\gamma$ -Strahlen-sterilisierte bovine Spongiosa (*Tutobone*<sup>®</sup>, Fa. Tutogen Medical, Neunkirchen, D). Diese Knochenmatrix bot durch ihre innere Trabekelstruktur und Porengröße eine ausreichend große innere Fläche für die Anhaftung von Zellen bei einer Besiedlung und gewährleistete auch eine gewisse mechanische Primärstabilität. Matrices auf Basis von boviner Spongiosa sind im klinischen Alltag bereits erfolgreich etabliert (Werber et al. 2000) und vergleichbare Materialien wurden im Rahmen des Tissue Engineering aus diesem Grunde auch in anderen Arbeitsgruppen bereits verwendet (Liu et al. 2003, Yang et al. 2000), da sie osteokonduktiv wirken und die Defektheilung positiv beeinflussen können (Baer et al. 2002). Die klinische Zulassung und die bisherigen Erfahrungen auf dem Gebiet des TE machen *Tutobone*<sup>®</sup> zu einer guten Option, um damit erzielte Ergebnisse in Zukunft eventuell in den klinischen Alltag zu übertragen.

#### 4.1.2. Besiedlung

Die optimale *in vitro* Besiedlung einer Matrix mit kultivierten Zellen stellt einen wichtigen Schritt dar. Ihre Effektivität kann jedoch in Abhängigkeit von Matrix und Besiedlungszeit voneinander abweichen. Analog zu bisherigen in der Literatur beschriebenen Studien wurden bei den vorliegenden Experimenten eine Besiedlungszeit von 2h gewählt (Wiedmann-Al-Ahmad et al. 2002).

Die Dichte der auf einer Leitschiene aufgebrachten Zellen stellt einen wichtigen Faktor hinsichtlich der Ausbildung einer Zellmatrix dar (Holy et al. 2000). Die Dichte be-

schreibt hierbei die aufgebrachte bzw. anhaftende Zellzahl bezogen auf die Leitschienenoberfläche. Oftmals ist eben diese Fläche bei den verwendeten Materialien jedoch nicht genau bekannt oder es wird ihr keine Beachtung geschenkt, weshalb in der Literatur oftmals nur die initial aufgetragenen Zellmengen angegeben werden. Ebenso fehlen oftmals Angaben über die Menge der nicht adhärenen Zellen, auf dessen Grundlage man auf eine Besiedlungseffizienz schließen könnte. Damit könnte der Eindruck entstehen, dass alle eingesetzten Zellen auf den Leitschienen auch zur Implantation gelangen. Somit ist ein Vergleich ähnlich aufgebauter Studien aufgrund dieser fehlenden Transparenz schwierig.

Bei der Analyse der restlichen Zellsuspensions-Proben nach erfolgter Besiedlung konnte eine Besiedlungseffizienz von 40 – 60% festgestellt werden. Dies zeigt, dass eine Steigerung der Besiedlungseffizienz notwendig ist, will man ein ausreichend gute Matrix bilden. Die eingesetzte Zellmenge lag pro Leitschiene bei  $1 \times 10^6$  hMSC. Dies ist zum Teil niedriger als bei anderen Gruppen (van den et al. 2002, Bareille et al. 2000). Bleibt man bei zukünftigen Versuchen bei der gleichen Leitschiene, könnte eine höhere initiale Zellzahl und/oder eine längere Besiedlungsdauer eine höhere Besiedlungsdichte auf der Matrix zum Implantationszeitpunkt bringen.

Eine weitere Option besteht in der Zuhilfenahme von Vakuum, mit dessen Hilfe höhere Zelldichten bei der Besiedlung erreicht werden können, was jedoch einen zusätzlichen Geräteaufwand und nicht zuletzt auch einen zusätzlichen Stress für die Zellen darstellt (Bruder et al. 1998a).

#### 4.1.3. Tierversuche

Tiermodelle stellen beim Tissue Engineering einen ersten Schritt zur klinischen Übertragbarkeit der Ergebnisse dar. Die Verwendung von Defektmodellen mit orthotoper Implantation von mit Zellen beladenen Matrices ist bei Fragen nach Heilungsvorgang und Zeit eine gängigere Herangehensweise (Cancedda et al. 2003b, Shang et al. 2001). Dem gegenüber steht die Implantation in vom Ursprungsgewebe entfernten Orten (sog. ektoper Implantation). Obwohl eine Übertragung von ektopen Modellen auf einen späteren orthotopischen Einsatz nicht ohne weiteres möglich ist (Kruyt et al. 2004), wählten wir diese Implantationsform. Für die Knochenheilung wichtigen biomechanischen Einflüsse fallen hierunter zwar weg, die Implantationsform ermöglicht jedoch das Verhalten der eingesetzten Zellen besser und unabhängiger zu studieren. Zudem unterliegen die Konstrukte nicht dem Einfluss parakriner Faktoren des

Wirtlagers, einer Wechselwirkung mit ortständigen Osteoblasten oder Entzündungszellen im Defekt (Caplan et al. 2001). Auch kann der Einfluss einer periostalen Knochenneubildung verhindert werden (Kruyt et al. 2003). Zusammenfassend entfällt eine Osteoinduktion, welche eine Knochenbildung normalerweise beeinflusst oder hemmt (van den et al. 2002, Barnes et al. 1999).

Auf den ersten Blick erscheint die orthotope Implantation das problemorientierte Verfahren zu sein, da Abläufe der Heilung besser studiert werden können und die mechanischen Einflüsse im Defektbereich, die eine wichtige Rolle in der Knochenheilung spielen (Carter et al. 1998), nicht außer Acht gelassen werden. Dennoch zeigten Versuche, dass eine Besiedlung der Leitschiene im orthotopen Lager nach 12 Wochen keinen Vorteil gegenüber unbeimpften Konstrukten brachte. Bei ektopter Implantation dagegen konnte ein Knochenwachstum ausschließlich in einem mit Zellen besiedelten Konstrukt aufgezeigt werden (Kruyt et al. 2004).

Somit liegt der entscheidende Vorteil in einem ektopten Modell darin, dass der Prozess der Knochenbildung aus den implantierten Zellen besser untersuchbar ist, sowohl hinsichtlich der Effekte der Leitschiene auf Zelldifferenzierung und Proliferation als auch der gebildeten extrazellulären Matrix (Ferrera et al. 2002).

## 4.2. Etablierung der Methode

### 4.2.1. Wahl des Nachweisverfahrens

Bei der Suche nach einem Nachweisverfahren musste man in Betracht ziehen, dass ganze Organe der Versuchstiere, von murinem Gewebe durchwachsene spongiöse Leitschienen und Blut als Ausgangsmaterial zur Verfügung standen. Die Proben waren sowohl vom Material, der Konsistenz und dem Probenumfang somit sehr unterschiedlich.

Die Technik der *in situ* Hybridisierung (ISH) als eine Möglichkeit erlaubt an Gewebeschnitten bei der Auswahl der passenden Sonden den Nachweis eingebetteter humaner Zellen in Mausgewebe. Die nachgewiesenen humanen Nukleinsäuren werden hierbei sichtbar gemacht und können mikroskopisch untersucht werden. Für die qualitative Auswertung könnte diese Methode verwendet werden (Speel 1999). Es bietet auch den Vorteil, dass das Signal in Bezug zur Morphologie der Gewebeprobe gesehen werden kann. Bei großen Gewebeproben sind jedoch nicht nur die Anzahl der

Gewebeschnitte ein limitierender Faktor, sondern auch die Auswahl des richtigen Gewebeabschnitts und die Schichtdicke. Als weiterer Nachteil erweist sich, dass es eine aufwendige und kostenintensive Methode ist und besonderes Equipment und erfahrenes Personal benötigt.

Für eine quantitative Erfassung ist ein ISH ungeeignet. Die sichtbaren Zellen müssen mikroskopisch ausgezählt werden. Es handelt sich hierbei lediglich um zufällig ausgewählte Blickfelder, welche von repräsentativen Gewebeschnitten stammen. Die Zellanzahl ist somit nur eine Schätzung. Diese Methode unterliegt somit einer hohen Fehlerquote, welche durch eine subjektiv falsche Auswahl des auszuwertenden Gewebeabschnitts auch zu deutlichen Abweichungen bei ähnlichem Versuchsdesign führen kann (McBride et al. 2003, Mezey et al. 2000). Dennoch wird die ISH im Rahmen der Auswertungen zum qualitativen Zelnachweis im Rahmen des Tissue Engineering durchaus verwendet (Niemeyer et al. 2006, De Bari et al. 2004, Bareille et al. 2000), stellte jedoch für diese Arbeit keine passende Auswertemethode dar.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) als alternative molekularbiologische Methode erschien als passende Option. Bei Verlaufsuntersuchungen an Patienten mit Knochenmarkstransplantation wurde die PCR wegen ihrer hohen Sensitivität und Überlegenheit gegenüber anderen Verfahren (z.B. Southern Blot) bei Fragen nach einem Rezidiv in der klinischen Diagnostik früh angewandt (Martinelli et al. 1997). Die Sensitivität der PCR nutzten auch andere Gruppen zur Untersuchung des Verbleibes der Zellen im Spender nach isogener Knochenstransplantation (Muramatsu et al. 2003).

Im Gegensatz zur ISH bietet die PCR darüber hinaus eine bessere Untersuchung der Gewebeproben, da das gesamte explantierte Material verwendet wird, d.h. die gesamte DNA der Gewebeprobe steht für eine Auswertung zur Verfügung. Im Vorfeld kann man nicht wissen, in welchem Bereich des jeweiligen Empfängerorgans sich die implantierten hMSC im Falle einer Migration absiedeln. Dabei ist die Entscheidung zwei zufällige DNA Proben des explantierten Gewebes als Matrize zu verwenden weniger fehlerbehaftet als eine Untersuchung zufälliger Gewebeschnitte mittels ISH.

Auch können die gewonnenen DNA – Proben sowohl für die qualitative als auch quantitative Auswertung verwendet werden. Der Nachteil des fehlenden morphologischen Bezugs innerhalb eines Organs bei einem positiven Nachweis migrierter Zellen trat aufgrund der Fragestellung von vornherein in den Hintergrund. Somit bietet die PCR die passende Methodik für diese Aufgabenstellung.

#### 4.2.2. Wahl der Primerpaare

Die Sensitivität der PCR ist maßgeblich von der Wahl des richtigen Primerpaares abhängig. Bei der qualitativen PCR wird eine amplifizierte DNA-Endmenge im Agarsegel sichtbar gemacht. Deswegen ist die Wahl eines DNA Abschnittes notwendig, welcher eine hohe Kopienzahl liefert. Bereiche die öfter als einmal auf der DNA vorkommen erscheinen günstiger, da sie bei exponentieller Amplifikation folgerichtig ein Vielfaches mehr an Kopien liefern als die Vervielfältigung einer einzelnen Sequenz. Die humane DNA bietet dabei von ihrem Aufbau her die Möglichkeit, solche sich wiederholende Bereiche auszuwählen. Nur ein kleiner Teil des humanen Genoms kodiert tatsächlich für Gene, aber mehr als 50% stellen in sich wiederholende Abschnitte, sog. repetitive DNA dar.

Zu der hochrepetitiven Satelliten DNA gehört auch die Alpha-Satelliten-Klasse. Diese bilden die DNA-Hauptklasse in der Zentromerregion des humanen Chromosom und zeichnet sich zum einen durch die bereits erwähnte hohe Wiederholungszahl einzelner Sequenzen und zum anderen auch durch ihre Speziespezifität aus (Warburton et al. 1991).

Die Arbeitsgruppe um Becker beschreibt dazu ein Primerpaar, welches an einen Abschnitt in der Alpha-Satelliten Region im Zentromerbereich des humanen Chromosoms 17 bindet (Becker et al. 2002). Ihre in Unterabschnitten identischen Sequenzen (vgl. Abb. 11) können sich bis zu 1.000-mal wiederholen und ermöglichen es auch bei geringsten DNA Mengen unter optimalen PCR Bedingungen eine hohe Kopienzahl zu liefern. Dies macht sie ideal auch zum Nachweis kleinster DNA-Mengen. Gleichzeitig zeigte sich bei einem Abgleich mit der MouseBLAST Genomdatenbank (MGI, The Jackson Laboratory) keine Übereinstimmung mit einer Maus DNA Sequenz und ist damit sicher humanspezifisch. Damit erfüllt die gewählte Sequenz beide Voraussetzungen für einen hochsensitiven Nachweis humaner Zellen zur Untersuchung von Xenotransplantaten oder wie im vorliegenden Fall mit hMSC beimpften Matrices.

Einige Studien verwenden Primerpaare, welche Y-Chromosom spezifische DNA Abschnitte erkennen (Koldehoff et al. 2006). Dies macht sie bei vorher festgelegtem Spender- und Empfängergeschlecht auch zu einer Option. Auch hier ist es möglich, in Anlehnung an die Forensik, bei der erweiterten Auswahl einer hochrepetitiven Sequenz (z.B. Tandem-Repeat) auf dem Y-Chromosom eine ausreichende Sensitivität bei Humanspezifität zu erlangen (Butler 2006). Der Nachteil liegt jedoch eindeutig in

der Einschränkung auf das Geschlecht von Spender und Empfänger. Diese Limitierung war hier nicht erwünscht. Darüber hinaus wurden bei der Anwendung solch eines geschlechtsspezifischen Primerpaares für Untersuchung von Zellmigrationen nach Allogtransplantationen lediglich Sensitivitäten von  $1:10^4$  erreicht (Muramatsu et al. 2005).

Das Primerpaar für die quantitative PCR, war nicht identisch mit jenem der qualitativen PCR. Der Versuch die gleichen Sequenzen auch für die Quantifizierung zu verwenden misslang. Die Anforderung an den Primer blieben aber dieselben. Der neue designte Primer lieferte 4.080 Transkripte von der DNA einer humanen Zelle. Im Gegensatz zu den Primerpaaren zum qualitativen PCR Nachweis, finden sich die amplifizierten Segmente nicht an einem definierten Ort, wie der Zentromerregion, sondern sind über das gesamte humane Genom auf mehreren Chromosomen verteilt (LC-Search, 2002). In Kontroll-Experimenten wurde eine Bindung an murine DNA ausgeschlossen. Beide Voraussetzungen für eine sensitive Auswertung wurden damit erfüllt.

#### 4.2.3. Etablierungsergebnisse qualitative und quantitativer PCR

Zunächst konnte gezeigt werden, dass geringe Mengen reiner humaner DNA in Lösungen mit logarithmisch abnehmender Konzentration sicher nachgewiesen werden konnten. Die Menge, bei der ein letzter Nachweis noch möglich war, entsprach dabei einer Menge von 0,01 ng hDNA. Nimmt man als Grundlage das Gewicht von  $6 \times 10^{-12}$  g DNA in einer humanen Zelle, erlaubt das den Nachweis einer einzelnen Zelle (0,01ng = 1,66 Zellen). Ebenso konnte durch den Einsatz einer logarithmischen Verdünnungsreihe von muriner DNA die Humanspezifität der Sequenz nochmals verifiziert werden.

Die Fragestellung erforderte jedoch die Detektion von humanen Zellen in Mausgewebe und damit einen Nachweis auch bei einer Überzahl muriner Zellen und muriner DNA. Während frühere Ergebnisse lediglich einen Nachweis von maximal 2 murinen Zellen auf 100 humane Zellen (Nitsche et al. 2001) zeigten, gelang Becker et al. der Nachweis einer Zelle einer Adenokarzinomzelllinie unter  $10^6$  Mauszellen (Becker et al. 2002).

Diese Sensitivität spiegelt sich auch in unseren Ergebnissen wider. Dabei hielten wir die Anzahl der Mausfibroblasten mit  $1 \times 10^6$  konstant und variierten lediglich die Anzahl der untergemischten hMSC. Die Banden nehmen dabei erwartungsgemäß



sichtbar parallel mit der abnehmenden hMSC Zahl (entsprechend abnehmender DNA Menge) an Intensität ab. Zwar ist eine Semiquantifizierung mittels der Bandenintensität stets kritisch zu bewerten und liefert nicht immer verlässliche Ergebnisse (Becker et al. 2002). Dennoch waren Rückschlüsse im Vergleich aller Banden möglich. Die Ergebnisse zeigten interessanterweise bei der 10 und  $10^2$  Verdünnungsstufe umgekehrt abweichende Signalintensitäten. So hätte man bei dem Einsatz von 100 hMSC eine stärkere Bandenintensität erwarten können als bei 10 hMSC. Dies ist aber genau umgekehrt der Fall. Da die 100 hMSC nicht mittels single-cell-picking gewonnen wurden, sondern mittels vieler Verdünnungsserien, ist als eine mögliche Erklärung anzunehmen, dass weit weniger als die berechneten 100 humanen Zellen hinzugefügt wurden. Möglich erscheint dies durch eine unvollständige Zellseparation während des Trypsinierungsvorganges und daraus folgend eine ungleiche Zellverteilung bei der Verdünnung. Diese Hypothese wird durch die schwache Bande in der  $10^3$  Verdünnung (Spur Nr. 7; Abb. 14) bestätigt. Somit aber waren in der Stufe  $10^2$  (Spur Nr. 10, 11, 12, Abb. 14) weniger als 10 hMSC vorhanden. Mit der angefertigten logarithmischen Verdünnungsserie gelang es, eine einzelne hMSC unter  $10^6$  Mausfibroblasten aufzuspüren und nachzuweisen.

Bei der quantitativen PCR ist für die Auswertung der Ergebnisse eine Standardkurve notwendig (Kubista et al. 2006). Als Grundlage für die Generierung der Standardkurve wurde die Menge von 6 pg humaner DNA für eine Zelle angenommen und für die Zuordnung die 4080 gebildeten Transkripte pro Zelle. Die logarithmisch verdünnten als Template eingesetzten hDNA Proben zeigen einen gleichmäßigen Abstand innerhalb der Fluoreszenz-Zyklus-Kurven. Die mit Hilfe der Crossing Points gebildete Standardkurve zeigt eine lineare Korrelation zwischen der hDNA Menge, also den Zellzahlen, und den Zykluszahlen über den gesamten Nachweisbereich von 10.000 bis 0,1 hMSC. Eine Quantifizierung gelang somit bis auf einen Bereich von weniger als 1 hMSC.

## 4.3. Ergebnisse

### 4.3.1. Ergebnisse der qualitativen Untersuchung

#### Organe und Blut

In Migrationuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei intravenöser Injektion von hMSC, Zellen sich nicht nur in das Knochenmark, sondern auch in anderen Organen wie die Lunge und Milz absiedeln (Devine et al. 2003, Gao et al. 2001).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Organen konnte zu keinem der vier Explantationszeitpunkte humane DNA nachgewiesen werden. Nachdem die Auswertungen aus den Organen der untersuchten Versuchstiere nach einer Implantationsdauer von 2 und 4 Wochen keinen positiven Nachweis humaner DNA brachten, wurden zusätzlich noch die Organe Hoden und Gehirn bei den folgenden Auswertungszeitpunkten nach 8 und 12 Wochen hinzugenommen. Doch auch hierbei zeigte sich kein Nachweis humaner DNA. Um eine weitere Sensitivitätssteigerung zu erreichen, erhöhten wir in der Folge die Zykluszahlen der PCR von 35 auf 40. Das geht im Allgemeinen zu Lasten der Differenzierungsfähigkeit der Bandenintensitäten bei hohen DNA – Ausgangskonzentrationen, die aber bei den Organen nicht erwarten waren. Man erhält jedoch bei niedriger DNA Ausgangsmenge ein stärkeres Signal und erhöht die Detektionswahrscheinlichkeit. Auch dadurch konnte keine humane DNA in den explantierten Organen nachgewiesen werden. Somit waren in den entnommen Organproben zu keinem Zeitpunkt hMSC nachweisbar und eine Migration in die Organe konnte in diesen Versuchen ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Migration kann durchaus die geringe Vaskularisierung der Leitschiene sein. Es konnte gezeigt werden, dass es bei einem Knochen-Gefäß-Transplantat, folglich einer bestmöglichen Vaskularisierung eines Implantates, zu einer Migration von Zellen in andere Organe wie Milz oder Thymus kommt (Muramatsu et al. 2003). Die histologische Auswertung zeigte erst nach einem Implantationszeitraum von 8 Wochen vereinzelt einsprossende Gefäße. Damit wird den Zellen erst ein später, mangelhafter und damit erschwerter Zugang zum Gefäßsystem und Blutkreislauf ermöglicht. Dies wurde zusätzlich durch das Ergebnis untermauert, dass zu keinem Zeitpunkt in den untersuchten Blutproben ein Nachweis humaner Zellen gelang. Abschließend lässt sich jedoch nicht klären, ob überhaupt ein Übertritt von Zellen in das

Gefäßsystem stattfand oder die wenigen, denen es gelang, nicht überlebten. Die Wahl des Implantationsortes spielt folglich durchaus wegen der unterschiedlichen Gefäßversorgung eine Rolle. Deshalb lässt das Ergebnis keinen Rückschluss auf die Migration z.B. nach orthotoper Implantation, also in einen Knochendefekt mit einer deutlich besseren Vaskularisierung, zu.

Interessant erscheint die Frage, wie sich das direkt an das Lager anschließende und im Kontakt damit befindliche Gewebe, wie die Muskelfaszie und das Unterhautgewebe, sich hinsichtlich einer Zellmigration verhält, da in diesem Fall eine Zellwanderung nicht auf das Transportmedium Blut angewiesen ist.

### Leitschiene

Bei der Explantation der Leitschienen konnte man besonderes bei dem Explantationszeitpunkt von 2 Wochen bereits makroskopisch einen viel dichteren Durchbau der Matrix und eine Füllung der Poren bei den vorher beimpften Leitschienen beobachten. Zu den späteren Zeitpunkten waren die Unterschiede nicht mehr so deutlich, was auf ein Einwandern des umgebenden Mausegewebes in beide Leitschienen zurückzuführen war. Die Auswertung der unbesiedelten Kontroll-Leitschienen ergab zu keinem Explantationszeitpunkt einen positiven humanen DNA Nachweis. Somit kam es trotz räumlicher Nähe weder zu einer Wanderung zwischen beiden Leitschienen, noch durch die Blutbahn zu einer Einwanderung von eventuell zirkulierenden hMSC. Das war sicherlich auch auf die mangelnde Vaskularisierung zurückzuführen (Bareille et al. 2000).

In besiedelten Leitschienen konnte nach jedem der vier Versuchsendpunkten, also 2, 4, 8 und 12 Wochen, die Existenz humaner DNA nachgewiesen werden. Andere Studien konnten dagegen einen Nachweis von hMSC mittels molekularbiologischen Methoden nach einer Zeitspanne von 4 Wochen nicht mehr erbringen. Bareille et al. konnten mittels in-situ Hybridisierung lediglich 2 Wochen nach ektooper Implantation humane Zellen nachweisen, nach 6 Wochen jedoch keine humane DNA mehr. De Bari et al. konnte in vitro kultivierte hMSC nach deren intramuskulärer Injektion nach 6 Wochen nicht mehr nachweisen (De Bari et al. 2004, Bareille et al. 2000). Dies zeigt eine um bis zu dreifach längere Überlebenszeit gegenüber anderen Studien.

Betrachtet man die Bandenintensitäten im Rahmen der semiquantitativen PCR – Auswertung, so erkennt man nach dem Versuchszeitraum von 12 Wochen nur noch ein schwaches Signal im Vergleich zu den zwei Wochen. Die initial vorhandene DNA

war also deutlich weniger und somit auch die Zellzahl der zum Explantationszeitraum noch lebender hMSC. Während es teilweise bei orthotoper Implantation auch auf Grund einer Migration zu abnehmenden Zellzahlen vor Ort kommt (Quintavalla et al. 2002), ist in unserem Fall ausschließlich von einem Zelltod der implantierten hMSC auszugehen. Der Zelltod ist wohl am ehesten auf die mangelnde Ernährung der Zellen zurückzuführen, da aufgrund der fehlenden Vaskularisierung nach Implantation eine Nährstoffversorgung der hMSC lediglich über Diffusion stattfinden konnte. Das fehlende Knochenwachstum (histozytologisch untersucht durch cand. med. Martin Nentwich) untermauerte dies, da die Vaskularisierung eine wichtige Voraussetzung für das Überleben der Zellen und zur Knochenbildung zu sein scheint (Lee et al. 2001a). Folglich können diese Ergebnisse auf eine unzureichende Blutversorgung bzw. mangelnde Nährstoffversorgung zurückzuführen sein und decken sich mit denen anderen Studien (Kruyt et al. 2004, De Bari et al. 2004). Es muss davon ausgegangen werden, dass die Leitschiene ( $\varnothing$  9 mm x 3 mm) zu groß war für eine ektoper Implantation in das relativ gefäßarme, subkutane Gewebe der Versuchstiere, obwohl die kritische Diffusionsstrecke von 3,5 mm (Kruyt et al. 2004) nicht überschritten wurde.

#### 4.3.2. Ergebnisse der quantitativen Untersuchung

Die quantitative Auswertung bestätigte das Ergebnis der qualitativen und semiquantitativen Untersuchungen. Mit zunehmendem Implantationszeitraum kommt es zu einer Abnahme der Anzahl der überlebenden hMSC. Die Anzahl der überlebenden Zellen variiert jedoch teilweise innerhalb einer Versuchsgruppe sehr stark.

Zieht man beispielsweise in Betracht, dass lediglich eine Besiedlungseffizienz von 50 – 60 % vorlag, so sieht man, dass bei drei Versuchstieren nach 2 Wochen die hMSC fast vollständig im fremden Milieu überlebt haben. Dagegen sind bei einem anderen Versuchstier nach zwei Wochen bei gleicher Besiedlungseffizienz weniger als 1/5 der Zellen in der Matrix am Leben.

Noch schwieriger erscheint die Bewertung der Ergebnisse der anderen Gruppen, wie die nach 12 Wochen, da die Unterschiede hier sehr groß sind (25.920 Zellen zu 1.443 Zellen) und die Fallzahlen (n=2) sehr niedrig. Auch das hohe Ergebnis bei einem Tier (218.000 Zellen nach 8 Wochen) ist schwer einzuordnen, zumal dieser Wert jeden anderen bei dem Endzeitpunkt von 4 Wochen übersteigt.

Die Vermutung ist, dass Zellen einiger Leitschienen gleicher Implantationsdauer eine bessere Nährstoffversorgung erhalten mussten als andere. Dies ließe sich dadurch erklären, dass die Zellverteilung innerhalb dieser Konstrukte anfangs eine höhere Zelldichte am Rand aufweisen musste. Bekanntermaßen sorgt die Nähe zum umliegenden Empfängergewebe für eine bessere und zum Überleben ausreichende Nährstoffdiffusion, wohingegen Zellen im Zentrum einer Leitschiene bei unzureichender Vaskularisierung innerhalb kurzer Zeit absterben (Kneser et al. 2006b, Quarto et al. 2001a).

Ist eine gleichmäßige Zellverteilung (unabhängig von Zentrum oder Peripherie) im Konstrukt nicht gegeben, und das ist bei der gewählten Besiedlungsmethode durchaus möglich, so könnte man die Abweichung auf die Tatsache zurückführen, dass das für die PCR zur Verfügung stehende Stück zellärmer war im Vergleich zu den anderen Teilen der gleichen Schiene. Eine Klärung post hoc ist nicht mehr möglich. In Zukunft jedoch könnte eine reine PCR Untersuchung der gesamten Leitschiene Klärung bringen. Problematisch erweist sich die Interpretation auch vor dem Hintergrund, dass eine genau Besiedlungseffizienz der Leitschienen zu den späteren Zeitpunkten (vier, acht und zwölf Wochen) nicht vorliegt, sondern die Ergebnisse der Besiedlungszellmenge des ersten Abschnittes (zwei Wochen) auf die anderen Leitschienen übertragen wurden.

Schwierigkeiten ergaben sich bei der Quantifizierung im niedrigen Zellzahlbereich, so dass die Ergebnisse im niedrigen Bereich kritisch hinterfragt werden müssen. Insbesondere die Zellzahl von 45 nach 8 Wochen Implantationsdauer stellte hier ein Problem dar. Der Einsatz von lediglich 5ng genomischer DNA als Template, macht es theoretisch nur möglich 0,006 µg hDNA, das entspricht in etwa 1.000 humanen Zellen, in einem theoretischen Gemisch mit  $1 \times 10^6$  Mauszellen mittels *LightCycler*<sup>®</sup> quantitativ zu erfassen. Bei niedrigeren humanen Zellmengen (<1.000) beinhalten die 5ng Template aus einem murin dominiertem DNA Gemisch, kaum Spuren von hDNA, weswegen auch die sensitive PCR aus Ermangelung an Matrizen nicht funktionieren kann. Anderen Gruppen gelang die Quantifizierung bis auf 1 humane Zelle unter  $1 \times 10^6$  murinen Zellen, sie setzten aber zum einen ein anderes PCR System und zum anderen eine höhere DNA Menge von 250ng ein (Becker et al. 2002). Niedriger DNA Einsatz führte auch bei anderen Studien zu einer Einbüßung der Sensitivität. So konnten bei einem Einsatz von 100ng DNA lediglich 1 humane Zelle unter 10.000 murinen Zellen nachgewiesen werden (Funkhouser et al. 2001).

Die Untersuchung der Leitschienen ergab, mit einer Ausnahme, stets Zellzahlen >1.000 und waren somit im Referenzbereich. Aufgrund der Ergebnisse der qualitativen Auswertung hatte diese Einschränkung keine Auswirkungen auf die Auswertung der Organe und des Blutes, da diese nicht quantitativ untersucht werden mussten. Interessant erscheinen in diesem Zusammenhang die Ergebnisse um die Gruppe Pelz et al., die auch humane Zellen lediglich mit Hilfe einer konventionellen PCR in einer Mausumgebung quantifizierten. Durch eine Duplex-PCR, welche gleichzeitig mit zwei definierten Primerpaaren murine und humane Sequenzen amplifiziert, wird über das Bandenstärkeverhältnis beider Produkte auf die Ausgangsmenge geschlossen. Dabei können 1 humane Zelle unter 10.000 detektiert werden (Pelz et al. 2005). Die Sensitivität der in der hier vorliegenden Arbeit beschriebenen RT-PCR kann jedoch um den Faktor 10 nicht erreicht werden, weshalb die Methode auf Labore mit fehlender RT-PCR Technologie beschränkt bleiben sollte.

#### **4.4. Anregungen und Ausblick**

##### 4.4.1. Anregungen

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse geben Anlass weitere Aspekte des TE zu untersuchen. Eine Besiedlungseffizienz von 40 -60 % der initial verwendeten Zellzahl erscheint nicht optimal, vor allem in Hinblick auf eine Knochenneubildung *in vivo*. Darüber hinaus stellt es in gewisser Weise auch einen Verlust an eingesetztem Material und Ressourcen dar. Eine höhere Zellausgangsmenge bei Implantation kann zu einer besseren Integration beitragen. Dies steht jedoch nur dann nicht im Widerspruch mit der Ressourcen-Optimierung, wenn man die Adhärenzmöglichkeiten der Zellen verbessert. Dies kann man erreichen, indem man die Leitschienen nicht zeitnah (binnen Stunden) implantiert, sondern die Zellen mit der Leitschiene kultiviert. Hierbei stehen statische oder dynamische Kultivierungsmethoden zur Verfügung. Es zeigte sich, dass durch die Anwendung eines dynamischen Verfahrens mittels einer Perfusionskammer (Wang et al. 2003b) höhere Zelldichten erreicht werden können. Darüber hinaus gehend zeigten weitere Studien auch einen Vorteil der dynamischen Kultivierung, bezüglich Verteilung der Zellen im Konstrukt und der folgenden Knochenbildung (Bancroft et al. 2002). Ergänzend kann auch bereits

*in vitro* mit einer osteogene Differenzierung der Zellen begonnen werden, um eine Knochenbildung *in vivo* zu fördern.

In dem Zusammenhang erscheint es sinnvoll, sehr zeitnah nach Beimpfung der Leitschienen, einige von ihnen statt einer Implantation auf die Verteilung der Zellen innerhalb der Konstrukte, z.B. elektronenmikroskopisch zu untersuchen.

Die implantierten Leitschienen schienen zu groß für den Einsatz in einem subkutanem Lager, trotz einer Diffusionsstrecke unterhalb der kritischen Grenze von < 3,5mm. Überlegenswert erscheint, Matrizen kleinerer Größe (z.B. Ø 3mm x 2mm) zu wählen. Damit ermöglicht man eine bessere Nährstoffversorgung in dem schlecht vaskularisierten subkutanem Mausgewebe und könnte bei paralleler Implantation von je zwei beimpften Leitschienen, eine für die molekularbiologische Auswertung und die andere für die histologische Auswertung verwenden. Für die einzelnen Untersuchungen stände dann ein gleich großes Explantat zur Verfügung, so dass eine bessere Vergleichbarkeit möglich wäre. Auch könnte gleichzeitig eine oben beschriebene mögliche Fehlerquelle bei der Quantifizierung der Zellen ausgeschlossen werden, indem man auf eine Hochrechnung von einem Drittel auf das Ganze verzichten kann. In darauf aufbauenden Versuchen sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß die Zellen auf den implantierten Leitschienen in direkte Interaktion mit dem subkutanen Gewebe und der Muskelfaszie treten und ob eine Migrationen in diese unmittelbare Umgebung erfolgt. Da ein Einwachsen von murinem Gewebe in die Leitschiene nachgewiesen werden konnte, sollte auf der anderen Seite eine Migration implantierter Zellen in das umgebene Gewebe der Maus ausgeschlossen werden.

#### 4.4.2. Ausblick

Die Bedeutung der Wachstumsfaktoren (WF) hat durch ihr Verständnis ihrer Aufgaben in Bezug auf Differenzierung und Proliferation der MSC zu matrixbildenden Osteoblasten enorm zugenommen (Cheng et al. 2003). Der Einsatz einiger rekombinant hergestellter Faktoren wie z.B. rhBMP 2 und rhBMP 7 ist über die Tierversuche hinausgekommen und wurde in experimentellen Studien in der Klinik erfolgreich zur Knochenheilung in Verbindung mit unterschiedlichen Matrices eingesetzt (De Biase et al. 2005). RhBMP 7 (OP-1) ist darüber hinaus bereits klinisch für die Behandlung von Pseudarthrosen an langen Röhrenknochen zugelassen und zeigte bei der Verwendung an Patienten sehr positive Ergebnisse (Zimmermann et al. 2006). Insgesamt bleiben jedoch bei der Vielzahl der vorhandenen Faktoren und der Komplexität

ihres Zusammenspiels noch Probleme der richtigen Dosierung, Applikation und der optimalen Anwendungsgebiete.

Die externe Zuführung dieser Wachstumsfaktor kann jedoch ergänzt oder komplett umgangen werden, wenn genetisch veränderte Zellen verwendet werden, die diese Stoffe sezernieren. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass eine Erweiterung des Genoms mittels Transfektion zur Bildung von Wachstumsfaktoren, sowohl bei tierischen als auch bei menschlichen MSC erfolgreich durchgeführt werden kann, ohne dass es zu einer Einschränkung des Stammzellcharakters kommt (Mosca et al. 2000).

Unterschiedliche Arbeitsgruppen zeigten beim Einsatz von veränderten MSC, welche das Gen für BMP-2 überexprimierten, sowohl nach orthotoper als auch ektoper Implantation eine Knochenbildung (Pelled et al. 2002, Lou et al. 1999). Ebenso konnten klinische Erfolge bei der Behandlung von Osteogenesis imperfecta mit Hilfe genetisch veränderter Zellen auch am Patienten erzielt werden (Caplan et al. 2001).

Eine Schlüsselfrage des TE wird ferner sein, wie die Vaskularisierung der Implantate gelöst werden wird. Nur durch Anbindung eines Transplantates an das Gefäßsystem wird es möglich sein große mittels TE gebildeter Transplantate erfolgreich einzusetzen. Ansonsten besteht die Gefahr, dass die kultivierten Zellen und das *in vitro* gebildete Gewebe *in vivo* nekrotisieren und damit untergehen werden. Ein erster viel versprechend Weg zur Bildung eines vaskularisierten Implantates konnte kürzlich durch die Verwendung einer AV-Schlinge gezeigt werden. Hierbei wurde eine körpereigene Vene als ein arteriovenöser Shunt an das Gefäßsystem angeschlossen und um einen mit einer Laufrille versehenen *Tutobone*<sup>®</sup>-Zylinder geschlungen. Im Verlauf kam es zu einer deutlichen Vaskulogenese innerhalb der Leitschienen im Vergleich zu den unvaskularisierten Kontrollen (Kneser et al. 2006b). Eine andere Möglichkeit ist einen interdisziplinären Weg einzuschlagen und mit Hilfe von TE Blutgefäße zu bilden und diese in Konstrukte vor der Zellbesiedlung einzusetzen (Pelled et al. 2002). Abschließend muss festgehalten werden, dass die Erfolge und Fortschritte der letzten Jahre auf dem Gebiet des TE zu einem wachsende Verständnis der Abläufe *in vivo* und *in vitro* geführt haben.

Trotz vieler noch ungeklärter Fragen kann man aber optimistisch in die Zukunft blicken und davon ausgehen, dass das Tissue Engineering von Knochen mit zunehmenden Erkenntnisstand mehr und mehr zu einem festen Bestandteil von klinisch anwendbaren Konzepten sein wird.



## 5. Zusammenfassung

### Zielsetzung und Fragestellung:

Bei der Behandlung ausgedehnter Knochendefekte bietet das Tissue Engineering von Knochen einen zukunftsweisenden Ansatz für eine schnellere Defektheilung.

Der Einsatz von undifferenzierten Stammzellen wirft jedoch die Frage nach deren Verhalten im Anschluss an die Implantation auf. In der vorliegenden Arbeit wurden dies an einem Mausmodell untersucht, indem mit hMSC besiedelte Leitschienen ektop implantiert wurden, um in der Folge sowohl das Wachstum der Stammzellen *in vivo* zu untersuchen, als auch der Frage nachzugehen, ob eine Migration der Zellen ausgeschlossen werden kann. Ziel der Arbeit war hierzu eine molekularbiologische Auswertemethode mittels PCR zu etablieren, mit der man die Entwicklung der Zellzahlen im Implantat verfolgen und ausgewanderte hMSC in ausgewählten Organen nachweisen kann.

### Material und Methoden:

Für die Implantation wurden mit FBS benetzte zylinderförmige Leitschienen ( $\varnothing$  9mm x 3mm) mit jeweils  $1 \times 10^6$  hMSC besiedelt und in immundefiziente Mäuse subkutan paravertebral eingepflanzt. Nach 2, 4, 8 und 12 Wochen wurden die Tiere geopfert und die Leitschienen, ausgewählte Organe und Blut entnommen. Aus den Explantaten wurde die DNA isoliert und mittels einer PCR auf die Existenz humaner DNA hin untersucht und die Anzahl der überlebenden Zellen in den Matrices ermittelt.

### Ergebnisse:

In Vorversuchen ist es gelungen mit der ausgewählten PCR Untersuchung aus einem Zellgemisch von hMSC und Mausfibroblasten menschliche DNA zu detektieren und beim Nachweis eine Sensitivität von einer humanen Zelle unter  $1 \times 10^6$  muriner Zellen zu erreichen.

Bei den folgenden Auswertungen der entnommenen Leitschienen konnte zu jedem der vier Explantationszeitpunkte in allen besiedelten Konstrukten humane DNA nachgewiesen werden.

Dagegen konnte zu keinem Untersuchungszeitpunkt in den ausgewählten Organen, im Blut der Versuchstiere und in den unbesiedelten Vergleichsleitschienen menschliche DNA detektiert werden.

Des Weiteren zeigte sich eine kontinuierliche abnehmende Zahl der implantierten hMSC in den Leitschienen im Versuchsverlauf.

Schlussfolgerungen:

Mit der verwendeten PCR steht eine molekularbiologische Methode zur Verfügung welche hochspezifisch eine humane Zelle mit einer Sensitivität von 1 menschlicher Zelle unter  $1 \times 10^6$  Mauszellen detektieren kann.

Die Auswertung zeigte, dass auch nach einer Implantationsdauer von 12 Wochen hMSC in den Leitschienen in fremder Umgebung überleben konnten.

Über den gesamten Beobachtungszeitraum konnte eine Migration der hMSC in die untersuchten Organe oder in den Blutkreislauf nicht detektiert werden.

Die Abnahme der Zellzahlen im Verlauf deuten darauf hin, dass bei einer ektopen subkutanen Implantation von Konstrukten der verwendeten Größe, eine adäquate Nährstoffversorgung nicht sicher gestellt werden kann und in der Folge zur Apoptose der Zellen führt.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abukawa H, Terai H, Hannouche D, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ (2003); Formation of a mandibular condyle in vitro by tissue engineering; *J Oral Maxillofac Surg* 61(1):94-100
2. Alard P, Matriano JA, Socarras S, Ortega MA, Streilein JW (1995); Detection of donor-derived cells by polymerase chain reaction in neonatally tolerant mice. Microchimerism fails to predict tolerance; *Transplantation* 60(10):1125-1130
3. Arinzech TL, Peter SJ, Archambault MP, van den BC, Gordon S, Kraus K et al. (2003); Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect; *J Bone Joint Surg Am* 85-A(10):1927-1935
4. Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K et al. (2003); Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells; *Transplantation* 76(7):1061-1067
5. Aubin JE (1998); Bone stem cells; *J Cell Biochem Suppl* 30-31:73-82
6. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ (1998); Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts; *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7):3908-3913
7. Baer W, Schaller P, Carl HD (2002); Spongy hydroxyapatite in hand surgery--a five year follow-up; *J Hand Surg [Br ]* 27(1):101-103
8. Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den DJ, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA et al. (2002); Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner; *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20):12600-12605
9. Bareille R, Lafage-Proust MH, Faucheux C, Laroche N, Wenz R, Dard M et al. (2000); Various evaluation techniques of newly formed bone in porous hy-

- droxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extra-osseous site; *Biomaterials* 21(13):1345-1352
10. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (1999); Growth factor regulation of fracture repair; *J Bone Miner Res* 14(11):1805-1815
  11. Bauer TW, Muschler GF (2000); Bone graft materials. An overview of the basic science; *Clin Orthop*(371):10-27
  12. Becker M, Nitsche A, Neumann C, Aumann J, Junghahn I, Fichtner I (2002); Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems; *Br J Cancer* 87(11):1328-1335
  13. Betz RR (2002); Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions; *Orthopedics* 25(5 Suppl):s561-s570
  14. Boden SD, Kang J, Sandhu H, Heller JG (2002); Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies; *Spine* 27(23):2662-2673
  15. Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K et al. (2002); Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold; *J Craniofac Surg* 13(2):231-239
  16. Bostrom M, Lane JM, Tomin E, Browne M, Berberian W, Turek T et al. (1996); Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model; *Clin Orthop*(327):272-282
  17. Bostrom MP, Saleh KJ, Einhorn TA (1999); Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models; *Orthop Clin North Am* 30(4):647-658
  18. Boyde A, Corsi A, Quarto R, Cancedda R, Bianco P (1999); Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism; *Bone* 24(6):579-589
  19. Bruder SP, Fox BS (1999b); Tissue engineering of bone. Cell based strategies; *Clin Orthop*(367 Suppl):S68-S83

20. Bruder SP, Fox BS (1999a); Tissue engineering of bone. Cell based strategies; Clin Orthop(367 Suppl):S68-S83
21. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S (1998a); The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects; J Bone Joint Surg Am 80(7):985-996
22. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S (1998b); The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects; J Bone Joint Surg Am 80(7):985-996
23. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S (1998c); The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects; J Bone Joint Surg Am 80(7):985-996
24. Burchardt H (1983); The biology of bone graft repair; Clin Orthop(174):28-42
25. Butler JM (2006); Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing; J Forensic Sci 51(2):253-265
26. Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R (2003a); Cell therapy for bone disease: a review of current status; Stem Cells 21(5):610-619
27. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R (2003b); Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone; Matrix Biol 22(1):81-91
28. Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G, Derubeis A, Muraglia A, Quarto R (2003c); Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone; Novartis Found Symp 249:133-143
29. Caplan AI (1991); Mesenchymal stem cells; J Orthop Res 9(5):641-650
30. Caplan AI, Bruder SP (2001); Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century; Trends Mol Med 7(6):259-264
31. Caplan AI, Goldberg VM (1999); Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues; Clin Orthop(367 Suppl):S12-S16

32. Carter DR, Beaupre GS, Giori NJ, Helms JA (1998); Mechanobiology of skeletal regeneration; Clin Orthop Relat Res(355 Suppl):S41-S55
33. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L et al. (2003); Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs); J Bone Joint Surg Am 85-A(8):1544-1552
34. Cheng SL, Lou J, Wright NM, Lai CF, Avioli LV, Riew KD (2001); In vitro and in vivo induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene; Calcif Tissue Int 68(2):87-94
35. Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, Blyszczuk P, Cross M, Wobus AM (2003); Potential of embryonic and adult stem cells in vitro; Biol Chem 384(10-11):1391-1409
36. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP (2004); Failure of in vitro-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo; Arthritis Rheum 50(1):142-150
37. De Biase P, Capanna R (2005); Clinical applications of BMPs; Injury 36 Suppl 3:S43-S46
38. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R (2003); Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates; Blood 101(8):2999-3001
39. Ferrera D, Poggi S, Biassoni C, Dickson GR, Astigiano S, Barbieri O et al. (2002); Three-dimensional cultures of normal human osteoblasts: proliferation and differentiation potential in vitro and upon ectopic implantation in nude mice; Bone 30(5):718-725
40. Funkhouser AW, Vahed S, Soriano HE (2001); A "real time" PCR assay to detect transplanted human liver cells in RAG-1<sup>-/-</sup> mice; Cell Transplant 10(1):91-99
41. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI (2001); The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion; Cells Tissues Organs 169(1):12-20

42. Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1991); The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks; *Clin Orthop*(262):298-311
43. Grob D (1986); [Problems at the donor site in autologous bone transplantation]; *Unfallchirurg* 89(8):339-345
44. Grompe M (2002a); Adult versus embryonic stem cells: it's still a tie; *Mol Ther* 6(3):303-305
45. Grompe M (2002b); Adult versus embryonic stem cells: it's still a tie; *Mol Ther* 6(3):303-305
46. Hallfeldt KK, Stutzle H, Puhlmann M, Bulut N, Kessler S, Schweiberer L (1994); [Bridging long tibial shaft defects by partially demineralized bone matrix]; *Unfallchirurg* 97(10):518-524
47. Harris MT, Butler DL, Boivin GP, Florer JB, Schantz EJ, Wenstrup RJ (2004); Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphatase activity in constructs; *J Orthop Res* 22(5):998-1003
48. Hentz VR, Chang J (2001); Tissue engineering for reconstruction of the thumb; *N Engl J Med* 344(20):1547-1548
49. Holy CE, Shoichet MS, Davies JE (2000); Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period; *J Biomed Mater Res* 51(3):376-382
50. Isogai N, Landis W, Kim TH, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP (1999); Formation of phalanges and small joints by tissue-engineering; *J Bone Joint Surg Am* 81(3):306-316
51. Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, Yu SF, Dusich J, Purchio T et al. (2003); Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis; *Clin Exp Metastasis* 20(8):733-744
52. Joshi A, Kostakis GC (2004); An investigation of post-operative morbidity following iliac crest graft harvesting; *Br Dent J* 196(3):167-171

53. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP (1997); Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro; *Cell Transplant* 6(2):125-134
54. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Armstrong R, Schelling SH, Carmel LA (1998); Healing bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2 and copolymer; *Clin Orthop Relat Res*(349):205-217
55. Kneser U, Polykandriotis E, Ohnolz J, Heidner K, Grabinger L, Euler S et al. (2006a); Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop; *Tissue Eng* 12(7):1721-1731
56. Kneser U, Polykandriotis E, Ohnolz J, Heidner K, Grabinger L, Euler S et al. (2006b); Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop; *Tissue Eng* 12(7):1721-1731
57. Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH (2006); Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences; *Am J Hematol*
58. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I et al. (2000); Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones; *J Biomed Mater Res* 49(3):328-337
59. Korbling M, Estrov Z (2003); Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?; *N Engl J Med* 349(6):570-582
60. Kraus KH, Kirker-Head C (2006); Mesenchymal stem cells and bone regeneration; *Vet Surg* 35(3):232-242
61. Kruyt MC, de Bruijn JD, Wilson CE, Oner FC, van Blitterswijk CA, Verbout AJ et al. (2003); Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats; *Tissue Eng* 9(2):327-336



62. Kruyt MC, Dhert WJ, Yuan H, Wilson CE, van Blitterswijk CA, Verbout AJ et al. (2004); Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat; *J Orthop Res* 22(3):544-551
63. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K et al. (2006); The real-time polymerase chain reaction; *Mol Aspects Med* 27(2-3):95-125
64. Le Blanc K (2006); Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation; *Cytotherapy* 8(6):559-561
65. Lee KY, Alsberg E, Mooney DJ (2001a); Degradable and injectable poly(aldehyde guluronate) hydrogels for bone tissue engineering; *J Biomed Mater Res* 56(2):228-233
66. Lee YM, Seol YJ, Lim YT, Kim S, Han SB, Rhyu IC et al. (2001b); Tissue-engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices; *J Biomed Mater Res* 54(2):216-223
67. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA (2002); The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications; *J Bone Joint Surg Am* 84-A(6):1032-1044
68. Liu XJ, Chen Y, Yuan L, Yu L, Wang F, Liao H (2003); [Morphological observation of mesenchymal stem cells cultured with allogenic decalcified bone matrix]; *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 23(1):40-42
69. Lou J, Xu F, Merkel K, Manske P (1999); Gene therapy: adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein-2 gene transfer induces mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo; *J Orthop Res* 17(1):43-50
70. Mackenzie TC, Flake AW (2001); Human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentiation, and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep; *Blood Cells Mol Dis* 27(3):601-604

71. Martinelli G, Trabetti E, Farabegoli P, Testoni N, Bandini G, Motta MR et al. (1997); Early detection of bone marrow engraftment by amplification of hyper-variable DNA regions; *Haematologica* 82(2):156-160
72. McBride C, Gaupp D, Phinney DG (2003); Quantifying levels of transplanted murine and human mesenchymal stem cells in vivo by real-time PCR; *Cytotherapy* 5(1):7-18
73. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR (2000); Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow; *Science* 290(5497):1779-1782
74. Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, Davis-Sproul J, Chuang LC, Majumdar MK et al. (2000); Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery; *Clin Orthop Relat Res*(379 Suppl):S71-S90
75. Muramatsu K, Bishop AT, Sunagawa T, Valenzuela RG (2003); Fate of donor cells in vascularized bone grafts: identification of systemic chimerism by the polymerase chain reaction; *Plast Reconstr Surg* 111(2):763-772
76. Muramatsu K, Kurokawa Y, You-Xin S, Bishop AT, Doi K (2005); Cell traffic between donor and recipient following rat limb allograft; *J Orthop Res* 23(1):181-187
77. Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA (2001); Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors; *J Orthop Res* 19(1):117-125
78. Niemeyer P, Kasten P, Simank HG, Fellenberg J, Seckinger A, Kreuz PC et al. (2006); Transplantation of mesenchymal stromal cells on mineralized collagen leads to ectopic matrix synthesis in vivo independently from prior in vitro differentiation; *Cytotherapy* 8(4):354-366
79. Nitsche A, Becker M, Junghahn I, Aumann J, Landt O, Fichtner I et al. (2001); Quantification of human cells in NOD/SCID mice by duplex real-time polymerase-chain reaction; *Haematologica* 86(7):693-699

80. O'Neill PA, Lawler M, Pullens R, Kloosterman T, Hudson J, Martens AC et al. (1996); PCR amplification of short tandem repeat sequences allows serial studies of chimaerism/engraftment following BMT in rodents; *Bone Marrow Transplant* 17(2):265-271
81. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA (2001); Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines; *Stem Cells* 19(3):193-204
82. Ohgushi H, Miyake J, Tateishi T (2003); Mesenchymal stem cells and bio-ceramics: strategies to regenerate the skeleton; *Novartis Found Symp* 249:118-127
83. Olivier V, Faucheux N, Hardouin P (2004); Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery; *Drug Discov Today* 9(18):803-811
84. Ozturk A, Yetkin H, Memis L, Cila E, Bolukbasi S, Gemalmaz C (2006); Demineralized bone matrix and hydroxyapatite/tri-calcium phosphate mixture for bone healing in rats; *Int Orthop* 30(3):147-152
85. Parikh SN (2002); Bone graft substitutes: past, present, future; *J Postgrad Med* 48(2):142-148
86. Pelled G, G T, Aslan H, Gazit Z, Gazit D (2002); Mesenchymal stem cells for bone gene therapy and tissue engineering; *Curr Pharm Des* 8(21):1917-1928
87. Pelz O, Wu M, Nikolova T, Kamprad M, Ackermann M, Egger D et al. (2005); Duplex polymerase chain reaction quantification of human cells in a murine background; *Stem Cells* 23(6):828-833
88. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M et al. (2000); Tissue-engineered bone regeneration; *Nat Biotechnol* 18(9):959-963
89. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. (1999); Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells; *Science* 284(5411):143-147

90. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A et al. (2001a); Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells; *N Engl J Med* 344(5):385-386
91. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A et al. (2001b); Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells; *N Engl J Med* 344(5):385-386
92. Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, Boehnlein E, Pastor G, Blancuzzi V et al. (2002); Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects; *Biomaterials* 23(1):109-119
93. Rieger K, Marinets O, Fietz T, Korper S, Sommer D, Mucke C et al. (2005); Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation; *Exp Hematol* 33(5):605-611
94. Rueger JM (1998); [Bone substitution materials. Current status and prospects]; *Orthopade* 27(2):72-79
95. Rutledge RG, Cote C (2003); Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves; *Nucleic Acids Res* 31(16):e93
96. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. (1985); Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia; *Science* 230(4732):1350-1354
97. Schantz JT, Hutmacher DW, Chim H, Ng KW, Lim TC, Teoh SH (2002); Induction of ectopic bone formation by using human periosteal cells in combination with a novel scaffold technology; *Cell Transplant* 11(2):125-138
98. Sedrakyan S, Zhou ZY, Perin L, Leach K, Mooney D, Kim TH (2006); Tissue engineering of a small hand phalanx with a porously casted polylactic Acid-polyglycolic Acid copolymer; *Tissue Eng* 12(9):2675-2683

99. Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y (2001); Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells; *J Craniofac Surg* 12(6):586-593
100. Speel EJ (1999); Robert Feulgen Prize Lecture 1999. Detection and amplification systems for sensitive, multiple-target DNA and RNA in situ hybridization: looking inside cells with a spectrum of colors; *Histochem Cell Biol* 112(2):89-113
101. Stengele M. Knochenzellwachstum im dreidimensionalen Zellkultursystem; Dissertation. 2004.
102. Suwa F, Fang YR, Toda I, Tang CS, Yang LJ, Gao YH et al. (1998); SEM study on microvascular changes following implantation of bone morphogenetic protein combined with hydroxyapatite into experimental bone defects; *J Osaka Dent Univ* 32(1):27-34
103. Thiede C, Florek M, Bornhauser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C et al. (1999); Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection; *Bone Marrow Transplant* 23(10):1055-1060
104. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. (1998); Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts; *Science* 282(5391):1145-1147
105. Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, Manske P, Lou J (2003); Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats; *J Orthop Res* 21(1):44-53
106. Tuan RS, Boland G, Tuli R (2003); Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering; *Arthritis Res Ther* 5(1):32-45
107. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2006); Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells; *Eur J Immunol* 36(10):2566-2573
108. Urist MR (1965); Bone: formation by autoinduction; *Science* 150(698):893-899

109. Vacanti CA, Bonassar LJ (1999); An overview of tissue engineered bone; Clin Orthop(367 Suppl):S375-S381
110. Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shufflebarger J (2001); Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone; N Engl J Med 344(20):1511-1514
111. Vacanti CA, Vacanti JP (2000); The science of tissue engineering; Orthop Clin North Am 31(3):351-356
112. van den DJ, Vehof JW, Spauwen PH, Jansen JA (2002); Bone formation by rat bone marrow cells cultured on titanium fiber mesh: effect of in vitro culture time; J Biomed Mater Res 62(3):350-358
113. van Oorschot RA, Gutowski SJ, Robinson SL (1994); HUMTH01: amplification, species specificity, population genetics and forensic applications; Int J Legal Med 107(3):121-126
114. von Garrel T, Gotzen L (1998); [Allogenic bone transplantation and bone banking]; Unfallchirurg 101(9):713-727
115. Wang X, Rosol M, Ge S, Peterson D, McNamara G, Pollack H et al. (2003a); Dynamic tracking of human hematopoietic stem cell engraftment using in vivo bioluminescence imaging; Blood 102(10):3478-3482
116. Wang Y, Uemura T, Dong J, Kojima H, Tanaka J, Tateishi T (2003b); Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials; Tissue Eng 9(6):1205-1214
117. Warburton PE, Greig GM, Haaf T, Willard HF (1991); PCR amplification of chromosome-specific alpha satellite DNA: definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis; Genomics 11(2):324-333
118. Werber KD, Brauer RB, Weiss W, Becker K (2000); Osseous integration of bovine hydroxyapatite ceramic in metaphyseal bone defects of the distal radius; J Hand Surg [Am ] 25(5):833-841

119. Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Lauer G, Hubner U, Schmelzeisen R (2002); How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials; *Biomaterials* 23(16):3319-3328
120. Yang ZM, Zhao YF, Xie HQ (2000); [Huge thoracic wall defect repaired by tissue engineered bone transplantation]; *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 14(6):365-368
121. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA (1992); The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats; *J Bone Joint Surg Am* 74(5):659-670
122. Zimmermann G, Moghaddam A, Wagner C, Vock B, Wentzensen A (2006); [Clinical experience with bone morphogenetic protein 7 (BMP 7) in nonunions of long bones]; *Unfallchirurg* 109(7):528-537

## Anhang

### Reagenzienmengen für DNA-Isolierung aus Organen Leber, Niere, Herz und explantierter Leitschiene

Organmenge in mg	Prot. K Menge in $\mu$ l	ATL Puffer Menge in $\mu$ l
10	12	72
15	18	108
20	24	144
25	30	180
30	36	216
35	42	252
40	48	288
45	54	324
50	60	360
55	66	396
60	72	432
65	78	468
70	84	504
75	90	540
80	96	576
85	102	612
90	108	648
95	114	684
100	120	720
105	126	756
110	132	792
115	138	828
120	144	864
125	150	900
130	156	936
135	162	972
140	168	1008
145	174	1044
150	180	1080
155	186	1116



Reagenzienmengen für DNA-Isolierung aus Organen Lunge, Hoden, Hirn

Organmenge in mg	Prot. K Menge in $\mu$ l	ATL Puffer Menge in $\mu$ l
10	16	72
15	24	108
20	32	144
25	40	180
30	48	216
35	56	252
40	64	288
45	72	324
50	80	360
55	88	396
60	96	432
65	104	468
70	112	504
75	120	540
80	128	576
85	136	612
90	144	648
95	152	684
100	160	720
105	168	756
110	176	792
115	184	828
120	192	864
125	200	900
130	208	936
135	216	972
140	224	1008
145	232	1044
150	240	1080
155	248	1116

Reagenzienmengen für DNA-Isolierung aus Organ Milz

<b>Organmenge in mg</b>	<b>Prot. K Menge in µl</b>	<b>ATL Puffer Menge in µl</b>
10	40	180
12	48	216
14	56	252
16	64	288
18	72	324
20	80	360
22	88	346
24	96	432
26	104	488
28	112	504
30	120	540
32	128	576
34	136	612
36	144	648
38	152	684
40	160	720
42	168	756
44	176	792
46	184	828
48	192	864
50	200	900
52	208	936
54	216	972
56	224	1008
58	232	1044
60	240	1080
62	248	1116
64	256	1152

## Danksagung

Ich danke sehr herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolf Mutschler für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der ausgezeichneten Laborbedingungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Matthias Schiecker, der nicht nur mein Interesse für das spannende Gebiet des Tissue Engineering wecken konnte und mir aktiv vorlebte was Begeisterung und Einsatz für ein Forschungsziel bedeutet, sondern mir durch Anregungen und Ratschläge auch stets hilfreich zur Seite stand.

Für die intensive Einführung in das molekularbiologische Arbeiten, die kontinuierliche Betreuung und die vielen ergebnisreichen und ermutigenden Diskussionen bedanke ich mich vielmals bei Dr. Hülya Bülle. Dank ihrer Geduld und ihrer positiven Ausstrahlung gelang es mir auch in mühsamen Zeiten das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Dr. Sebastian Seitz danke ich für die Organisation, die Betreuung und Überwachung der Experimente und meiner literarischen Fortschritte. Ebenfalls danke ich ihm und Dr. Markus Regauer für die Unterstützung bei den Operationen.

Ich danke Dr. Michael Stengele für die persönlichen Gespräche und natürlich auch für seine prompte und geduldige Hilfestellung in allem softwaretechnischen und administrativen Belangen. Ein Dank auch an den Kollegen Martin Nentwich und die Mitdoktoranten, sowie Brigitte Hackl und allen weiteren Mitarbeitern im Labor.

Ein persönliches Dankeschön besonders an Björn, aber auch an Andrea, Florian und Ulla für die praktischen Hilfen und die intensiven Gespräche bis zum Abschluss der Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die in den äußerst ereignisreichen letzten Jahren während des Studiums und der Dissertation mich stets auf Ihre persönliche unverwechselbare und liebevolle Weise maximal und geduldig unterstützten.

## Lebenslauf

### Gabor Horvath

---

Geburtsdatum: 22. Mai 1978  
Geburtsort: Székesfehérvár  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

#### SCHULISCHE AUSBILDUNG

09/88 – 07/98 Gymnasium Werner von Siemens, München

#### UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

06/06 Dritter Abschnitt der Ärztliche Prüfung und Erteilung der Approbation (07/06)

05/99 – 06/06 Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der LMU München

#### KLINISCHE AUSBILDUNG

02/02 – 03/02 Famulatur in der Unfall-, Hand- u. Wiederherstellungschirurgie und Zentralen Notaufnahme (Städt. Krankenhaus München Schwabing)

09/02 – 10/02 Famulatur in der Allgemeinarztpraxis Dr. Ranker München

08/03 – 09/03 Famulatur in der Chirurgie des Klinikums Innenstadt der LMU

02/04 – 03/04 Famulatur in der Neurologischen Klinik und der neurologischen Notaufnahme (Krankenhaus München Harlaching)

04/05 – 07/05 1. Tertial des „Praktischen Jahres“ im Fachbereich Innere Medizin in der I. Medizinischen Abteilung im Städt. Krankenhaus München Schwabing (Schwerpunkt Infektiologie und Tropenmedizin)

08/05 – 11/05 2. Tertial des „Praktischen Jahres“ im Fachbereich Neurologie am Städt. Krankenhaus München Harlaching

12/05 – 03/06 3. Terial des „Praktischen Jahres“ im Fachbereich Chirurgie an der Asklepios Fachklinik für Thoraxchirurgie und Pneumologie (Gauting)

#### BERUFLICHER WERDEGANG

01/07 – 03/07 Klinik Vincentinum Augsburg gGmbH – Assistenzarzt im Fachbereich Innere Medizin

04/07 – heute Städtisches Klinikum München Bogenhausen – Assistenzarzt Fachbereich Neurologie

#### DISSERTATION

11/02 – heute „Nachweis von Knochenwachstum in besiedelten Konstrukten in vivo - Molekularbiologische Untersuchungen“  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler  
Experimentelle Arbeit in der Forschungsgruppe Tissue Engineering Knochen unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. Matthias Schieker an der Chirurgischen Klinik Innenstadt der LMU München

#### STIPENDIEN

09/04 Oskar-Karl-Forster Stipendium über 400 €

#### AUSSERUNIVERSITÄRE TÄTIGKEITEN

01/04 – 12/06 Nebentätigkeit als Punktionskraft der Mobilen Blutspende des Bayerischen Roten Kreuzes

01/03 – 01/05 Nebentätigkeit als Pflegehilfskraft und Sitzwache am Universitätskrankenhaus München Großhadern

10/99 – 01/04 Teilnahme am Sportprogramm der ZHS München zum Erwerb der Zusatzbezeichnung Sportmedizin

## Publikationen

### PUBLIKATIONEN

- 12/2004 M. Schieker, S. Seitz, H. Gülkan, N. Nentwich, **G. Horvath**, M. Regauer, S. Milz, W. Mutschler: *Tissue Engineering von Knochen: Integration und Migration von humanen mesenchymalen Stammzellen in besiedelten Konstrukten im Mausmodell*. Orthopäde, 2004 Dez; 33 (12), 1354-60

### VORTRÄGE

Bibliographisch zitierfähige Abstracts von Vorträgen und Postern:

- 06/2004 Seitz S, Gülkan H, **Horvath G**, Nentwich M, Milz S, Neth P, Mutschler W, Schieker M, *Human Mesenchymal Stem Cells on 3D Constructs in vivo - Histological and Molecular Detection*. Strategies in Tissue Engineering, Würzburg, 17.-19.06.04. Abstract in: Cytotherapy, 2004; 6(3): 260, O-24
- 10/2004 Nentwich M, Seitz S, Regauer M, **Horvath G**, Gülkan H, Milz S, Mutschler W, Schieker M. *Human mesenchymal stem cells on scaffolds in a mouse model*. Poster, 8. Chirurgische Forschungstage, Mannheim, 28.-30.10.04. Abstract in: Langenbeck's Arch Surg 2004; 389(5): 463

Sonstige Vorträge:

- 02/2004 **Horvath G**, Gülkan H, Seitz S, Regauer M, Neth P, Mutschler W, Schieker M. *Tissue Engineering von Knochen: Molekularbiologischer Nachweis zur Detektion migrierter Zellen nach Implantation von humanen mesenchymalen Stammzellen im Mausmodell*. XXVI. Münchner Symposium für experimentelle Orthopädie, München, 06.-07.02.04
- 02/2004 Seitz S, Pautke C, Nentwich M, **Horvath G**, Regauer M, Milz S, Mutschler W, Schieker M. *Tissue Engineering von Knochen: Nachweis von Knochenzellwachstum in besiedelten Konstrukten im Mausmodell*. XXVI. Münchner Symposium für experimentelle Orthopädie, München, 06.-07.02.04
- 05/2004 Schieker M, **Horvath G**, Guelkan H, Seitz S, Regauer M, Neth P, Mutschler W. *Composite substitutes in vivo – molecular detection of dis-*

- seminated human mesenchymal stem cells*. Vortrag, 6th European Trauma Congress, Prague, 16.-19.05.04
- 07/2004 Seitz S, Gülkan H, Nentwich M, **Horvath G**, Pautke C, Regauer M, Milz S, Mutschler W, Schieker M. *Tissue-Engineering von Knochen: Zellwachstum von humanen mesenchymalen Stammzellen im Mausmodell*. Vortrag, 81. Jahrestagung der Vereinigung der Bayerischen Chirurgen, München, 21.-23.07.04
- 06/2005 S. Seitz, **G. Horvath**, H. Gülkan, M. Regauer, P. Neth, W. Mutschler. *Tissue Engineering of bone: molecular detection of human mesenchymal stem cells after implantation*, Vortrag, 7th Congress of EFFORT, Lisboa, 04.-07.06.2005146.