

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1	Knochengewebe	3
2.1.1	Die Zellen des Knochens	3
2.1.2	Osteoblastäre Differenzierung	4
2.1.3	Proteine der Knochengrundsubstanz	4
2.1.4	Knochenmatrix	6
2.1.5	Knochenentwicklung	7
2.2	Blutgefäßsystem	8
2.2.1	Gefäßbildung	9
2.2.2	Das Gefäßsystem im Knochen	9
2.2.3	Nachweis der Gefäßbildung	9
2.3	Induktionsfaktoren	10
2.3.1	Bone Morphogenetic Protein	11
2.3.2	Vascular Endothelial Growth Factor	12
2.3.3	Weitere endotheliale Wachstumsfaktoren	13
2.3.4	Einsatz von BMP-2, VEGF und DAG	14
2.4	Stammzellen	14
2.4.1	Embryonale Stammzellen	17
2.4.2	Adulte Stammzellen	18
2.4.3	Unrestringierte Somatische Stammzellen	19
2.5	Tissue Engineering	22
2.6	Ausblick für die Veterinärmedizin	25
3	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1	Material	28
3.1.1	Biologische Materialien	28
3.1.1.1	Zellen	28
3.1.1.2	ICBM als Träger- und Freisetzungssystem	28
3.1.2	Medien, Puffer und Enzyme für die Zellkultur	28
3.1.3	Chemikalien	29
3.1.4	Test-Kits/Enzymassays	30
3.1.5	Materialien und Chemikalien für die Histologie	31
3.1.6	Materialien für die Proteinisolierung	31

3.1.7	Materialien für den Western Blot	31
3.1.8	Materialien für die cDNA-Synthese	32
3.1.9	Materialien für die PCR	33
3.1.9.1	Primer	33
3.1.9.2	Sonden	34
3.1.10	Materialien zur Darstellung der PCR-Produkte	34
3.1.11	RT ² Profiler™ PCR Array System	34
3.1.12	Geräte, Laborhilfsmittel und Verbrauchsmaterialien	35
3.2	Methoden	38
3.2.1	Zellkultur	38
3.2.1.1	U2OS	38
3.2.1.1.1	Kultivieren der Zellen	38
3.2.1.1.2	Passagieren der Zellen	38
3.2.1.2	HeLa	39
3.2.1.2.1	Kultivieren der Zellen	39
3.2.1.2.2	Passagieren der Zellen	39
3.2.1.3	HUVEC	40
3.2.1.3.1	Kultivieren der Zellen	40
3.2.1.3.2	Passagieren der Zellen	40
3.2.1.4	Einsatz als Kontrolle für die Färbung	41
3.2.1.5	Einsatz als Kontrolle für Proteine und RNA	41
3.2.1.6	Zellzahlbestimmung	41
3.2.1.7	Kryokonservierung der Zellen	41
3.2.2	Dotierung von Chamber Slides mit Zellen	42
3.2.3	Differenzierung der Zellen im Monolayer und auf Chamber Slides	42
3.2.4	ICBM als Träger- und Freisetzungssystem	43
3.2.4.1	Sterilisieren der ICBM-Träger	44
3.2.5	Dotierung der ICBM-Träger mit Zellen	44
3.2.6	Zellproliferationsassay	45
3.2.7	Zellvitalitätsassay	46
3.2.8	Probenaufbereitung für die histologische Untersuchungen	47
3.2.8.1	Fixierung der Objektträger	47
3.2.8.2	Technovit® 9100 NEU	47
3.2.8.3	Paraffineinbettung und -schnitte	49
3.2.8.4	Gefrierschnitte	49
3.2.9	Histologische Nachweisverfahren	49
3.2.9.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	49
3.2.9.2	Alizarinrot S-Färbung	50
3.2.9.3	Von Kossa-Färbung	50

3.2.9.4	Bisbenzimid-Färbung	51
3.2.10	Mineralisierungsnachweis	51
3.2.11	Rasterelektronenmikroskopie	52
3.2.12	Transmissionselektronenmikroskopie	53
3.2.13	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	54
3.2.13.1	Allgemeine Grundlagen der RT-PCR	54
3.2.13.2	RNA-Isolierung aus Zellen und besiedelten Probenkörpern	55
3.2.13.3	Konzentrationsbestimmung der RNA	56
3.2.13.4	Aufreinigung der RNA	56
3.2.13.5	cDNA-Synthese	57
3.2.13.6	Durchführung der RT-PCR und RT-qPCR	57
3.2.13.7	Elektrophoretische Auftrennung	58
3.2.13.8	Quantitative RT-PCR	59
3.2.14	Quantitative RT-PCR mittels RT ² Profiler™ PCR Array System	60
3.2.14.1	RNA-Isolierung	60
3.2.14.2	cDNA-Synthese	61
3.2.14.3	Quantitative RT-PCR	61
3.2.15	Western Blot	62
3.2.15.1	Allgemeine Grundlagen	62
3.2.15.2	Proteinisolierung	62
3.2.15.3	Proteinmengenbestimmung	62
3.2.15.4	Herstellung der Proteingele	63
3.2.15.5	SDS-PAGE	63
3.2.15.6	Elektrotransfer der Proteine	64
3.2.15.7	Immunmarkierung	64
3.2.16	ICBM als Freisetzungssystem von VEGF	67
3.2.16.1	Dotierung der ICBM-Träger mit VEGF	67
3.2.16.1.1	Trocknung	67
3.2.16.1.2	Agarose-Gelatine Beschichtung	67
3.2.16.2	Freisetzung von VEGF aus dem ICBM	67
3.2.16.3	Messung der Proteinfreisetzung mittels ELISA	67
4	ERGEBNISSE	69
4.1	Osteogene Differenzierung der USSC auf zweidimensionaler Oberfläche	69
4.1.1	Morphologische Beurteilung der Zellen	69
4.1.2	Kalziumnachweis mittels Alizarinrot S- und Von Kossa Färbung	73
4.1.3	Hydroxylapatitmessung und -darstellung	74
4.1.4	Transkriptionsanalyse anhand von RT-PCR	76
4.1.4.1	Qualitative RT-PCR	76

4.1.4.2	Quantitative RT-PCR	78
4.1.5	Expressionsprofil auf Proteinebene	82
4.2	Osteogene Differenzierung der USSC im dreidimensionalen Modell	85
4.2.1	Proliferations- und Vitalitätstest	85
4.2.2	Morphologische Beurteilung der Zellen	88
4.2.3	Beurteilung der Mikrostruktur im Rasterelektronenmikroskop	89
4.2.4	Beurteilung der Mikrostruktur im Transmissionselektronenmikroskop	92
4.2.5	Transkriptionsanalyse anhand von RT-PCR	95
4.2.6	Expressionsprofil auf Proteinebene	99
4.3	ICBM als Freisetzungssystem von VEGF	99
4.4	Einfluss angiogener Wachstumsfaktoren auf USSC	101
5	DISKUSSION	105
5.1	Zielsetzung	105
5.2	Kritische Wertung von Material und Methoden	105
5.2.1	Auswahl der Zellen	105
5.2.2	Osteogene und angiogene Differenzierung	106
5.2.3	Auswahl des Trägermaterials	109
5.2.4	Nachweis der Differenzierung auf Proteinebene und durch Transkriptionsanalyse	109
5.2.5	Grundzüge der Freisetzungskinetik	111
5.3	Kritische Wertung der Ergebnisse	112
5.3.1	Osteogene Differenzierung der USSC auf zweidimensionaler Oberfläche	112
5.3.2	Osteogene Differenzierung der USSC im dreidimensionalen Modell	116
5.3.3	Einfluss angiogener Wachstumsfaktoren auf USSC	119
6	ZUSAMMENFASSUNG	124
7	SUMMARY	126
8	LITERATUR	128
9	ANHANG	145
9.1	Belegung der PCR-Platten	145
9.2	C _P -Werte der im Monolayer osteogen differenzierten USSC	145
9.3	C _P -Werte der im 3D-Modell osteogen differenzierten USSC	148
9.4	RT ² Profiler™ - Angiogenese	150
DANKSAGUNG		153
ERKLÄRUNG		156