

Multiparametrische Bestimmung der Differenzierung humaner osteoblastärer Zellen in vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Till Adler
aus Köln

2012

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med Markus Bücheler
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Friedrich Bootz

Tag der Mündlichen Prüfung: 02.12.2011

Aus Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde/Chirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. F. Bootz

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung.....	9
1.1 Kontext.....	9
1.2 Tissue Engineering.....	11
1.3 Tissue Engineering in Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und Kopf-Hals-Chirurgie.....	13
1.4 Tissue Engineering von Knochen.....	14
1.5 Mesenchymale Stammzellen.....	16
1.6 Bone Morphogenetic Proteins – Osteoinduktive Proteine.....	17
1.7 Biomaterialien als Trägerstrukturen.....	18
1.8 Biodegradable Trägerstrukturen.....	19
1.9 Nicht-Biodegradable Ersatzstrukturen	20
1.10 Knochengewebe.....	23
1.11 Knochenmatrix.....	23
1.12 Knochenarten.....	24
1.13 Osteoblasten.....	24
1.14 Osteoprogenitorzellen.....	25
1.15 Osteozyten.....	25
1.16 Knochenentwicklung.....	26
1.17 Laser Scanning Cytometrie.....	26
1.18 Aufbau und Funktionsweise des Laser Scanning Cytometers(LSC).....	27
1.19 Einzelzellerfassung	29
1.20 Phantom-Contouring.....	31
1.21 Multiparametrische Messungen.....	32
1.22 Alkalische Phosphatase (AP).....	32
1.23 Osteocalcin (OC).....	33
1.24 Propidiumiodid (PI).....	33
1.25 Enzyme-Linked-Fluorescence-97 (ELF-97).....	35
1.26 Allophycocyanin.....	35
2. Material und Methoden.....	36
2.1 Zellkultur.....	36
2.1.1 Verwendetes Gewebe.....	36
2.1.2 Nährmedium.....	36

2.1.3 Herstellung der Primärkulturen.....	37
2.1.4 Herstellung der Sekundär- und Objektträgerkulturen.....	37
2.2 Laser Scanning Cytometrie.....	39
2.2.1 Herstellung der messfertigen Kulturen.....	39
2.2.2 Messungen am LSC.....	40
2.2.3 Propidiumiodid.....	40
2.2.4 ELF-97.....	40
2.2.5 Osteocalcin-AK und Allophycocyanin-assoziiertes AK.....	41
2.2.6 Negativ-Positiv-Abgleich.....	42
2.2.7 Doppelfärbung mit PI und ELF-97.....	42
2.2.8 Dreifachfärbung PI, ELF-97 und OC-APC.....	42
2.2.9 Datenerhebung und –verarbeitung mit dem LSC.....	43
3. Ergebnisse.....	46
3.1 Zellkultur.....	46
3.1.1 Kulturverlauf.....	46
3.2 Laser Scanning Cytometrie.....	47
3.2.1 Einzelmessungen.....	47
3.2.1.1 Propidiumiodid.....	47
3.2.1.2 ELF-97.....	52
3.2.2 Mehrfachmessungen.....	62
3.2.2.1 Doppelmessung mit PI und APC.....	62
3.2.2.2 Doppelmessung mit PI und ELF-97.....	67
3.2.2.3 Dreifachmessung mit PI, OC-APC und ELF-97.....	69
3.2.2.4 Einzelzellanalyse.....	70
PI/DNA.....	70
ELF-97.....	71
APC.....	72
3.2.2.5 Phantomanalyse.....	74
4. Diskussion.....	78
4.1 Zellkultur.....	78
4.1.1 Verwendetes Gewebe.....	78
4.1.2 Nährmedium.....	78
4.1.3 Herstellung der Primär- und Objektträgerkulturen.....	79

4.2 Laser Scanning Cytometrie(LSC).....	80
4.2.1 Zelldichte und Einzelzellerfassung.....	82
4.2.2 Propidiumiodid.....	88
4.2.3 ELF-97.....	93
4.2.4 Doppelfärbung PI und APC.....	95
4.2.5 Doppelfärbung PI und ELF-97.....	96
4.2.6 Dreifachfärbung mit PI, OC-APC und ELF-97.....	97
5. Zusammenfassung.....	103
6. Anhang.....	104
6.1 Materialliste.....	104
7. Literaturverzeichnis.....	105
8. Danksagung.....	115
9. Lebenslauf.....	116

Abkürzungsverzeichnis

- IE – Internationale Einheiten
- LSC – Laser Scanning Cytometry
- FCM – Flow Cytometry
- IA – Image Analysis
- TE – Tissue Engineering
- BMP – Bone Morphogenetic Protein
- MSC – Mesenchymale Stammzellen
- CT – Computer-Tomographie
- CAD – Computer Aided Design
- PI – Propidium Iodid
- ELF-97 - Enzyme-Linked-Fluorescence-97
- APC – Allophycocyanin
- AK – Antikörper
- PMT – Photomultiplier
- AP – Alkalische Phosphatase
- OC – Osteocalcin
- FBS – Fetal Bovines Serum
- PBS – Phosphate Buffered Saline

1. Einleitung

1.1 Kontext

Eine besondere Herausforderung für die Medizin stellen Wiederherstellung und Ersatz von Zell-, Gewebe- und Organfunktionen dar. Vor allem der Mangel an Spenderorganen und Spender-Empfängerinkompatibilität gefährden trotz großer Fortschritte in der Transplantationsmedizin das Überleben von Patienten und die Aufrechterhaltung der Transplantatfunktion. So warteten beispielsweise im Jahr 2008 nach Angaben der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) etwa 12.000 Menschen auf eine Niere. Dem standen lediglich rund 4700 Spenderorgane gegenüber (DSO, 2008).

Oft kommt es trotz immunsuppressiver Begleittherapie zu einer Abstoßungsreaktion. Daneben erreichen Implantate unabhängig davon, ob sie biologisch-humaner oder künstlicher Natur sind, bislang nicht die Qualität, Langlebigkeit oder Funktionalität körpereigener Gewebe. Sie stellen Fremdkörper dar, auf die der Organismus entsprechend reagiert. Laut der Collaborative Transplant Studie (CTS) aus den Jahren 1998 bis 2007 lag die 5-Jahres-Funktionsrate nach Nierentransplantation für Lebendspenden bei etwa 83 % und die von postmortalen Nierenspenden bei rund 70 % (DSO, 2008). Materialspezifische Kompatibilitätsprobleme können den klinischen Einsatz eines Implantates zusätzlich beeinträchtigen. Im Idealfall unterscheidet sich nach Einbringen des Implantates in einen Organismus die physiologische Gewebereaktion kaum von den Abläufen während der normalen Wundheilung. Bei einem ungünstigen Verlauf kann sich um das Implantat herum eine derbe Bindegewebskapsel bilden oder es entsteht eine Entzündungsreaktion, die einen Implantatverlust bzw. weitere rekonstruktive Maßnahmen zur Folge haben kann. Im Gegensatz zur Allotransplantation stellt die Xenotransplantation als speziesübergreifende Transplantation von Zellen und Geweben bestenfalls eine Alternative in Überbrückungssystemen wie zum Beispiel im Falle von porcinen Hepatozyten für den Leberersatz dar (Busse et al., 1999; Gerlach et al., 1994; Naik et al., 1996). Dies gilt zwar nicht für transplantierte Herzklappen tierischen Ursprungs, aber auch sie haben nur eine begrenzte Lebensdauer. Xenotransplantation beinhaltet zudem nicht abschätzbare Risiken wie zum Beispiel die Übertragung porciner endogener Retroviren (PERV). Wie andere Retroviren auch können PERV das Erbgut ihres Wirtes durch Einschleusen eigener Gene schädigen (Meyer, 1998).

Das „ideale Ersatzgewebe“ stammt aufgrund der immunologischen Unbedenklichkeit vom Patienten selbst. In vielen Fällen steht es jedoch nur in begrenztem Umfang oder überhaupt nicht zur Verfügung und reicht damit nicht aus, um beispielsweise ausgedehnte Knochendefekte nach Kraniotomie zu decken. Verfahren aus dem Bereich des Tissue Engineering können bei diesem Problem Abhilfe schaffen:

Körpereigene Zellen werden in vitro vermehrt, mit Hilfe unterschiedlicher Biomaterialien zu einem dreidimensionalen gewebetypischen Konstrukt geformt und implantiert (Bücheler, 2008). Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren ist bislang nur wenig über die funktionelle Gewebeentwicklung in vivo und in vitro bekannt.

Um Wachstumsprozesse in vitro besser steuern zu können, müssen grundlegende Prozesse und Einflüsse unterschiedlicher Substanzen weiter untersucht werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem Wachstums- und Differenzierungsprozesse von Knochengewebe in vitro überwacht und optimiert werden können. Dieses sollte nicht wie die meisten etablierten Verfahren ausschließlich destruktiver Natur sein, bei denen das Kulturmaterial nach einmaliger Untersuchung verworfen wird. Vielmehr sollte das angestrebte Verfahren die Option bieten, Kulturen in vitro mehrfach untersuchen zu können, ohne die Zellen dazu fixieren und damit zerstören zu müssen.

1.2 Tissue Engineering

Seit Mitte der 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts arbeiten Kliniker, Zellbiologen und Werkstofftechniker interdisziplinär in einem Arbeitsfeld zusammen, das sie 1993 als Tissue Engineering definierten. Unter Tissue Engineering versteht man eine Verbindung im Labor erzeugter Gewebe, Zellen und Moleküle mit einem oder verschiedenen Biomaterialien, um einen Funktionsverlust in einem Organismus auszugleichen (Langer et al., 1993). Erste Versuche im Sinne des Tissue Engineering wurden bereits vorher durchgeführt. Mitte der 70er Jahre wurden Hautzellen in Form eines mehrschichtigen ausdifferenzierten Gewebeverbandes gezüchtet. Dieser bestand aus Zellklonen, die über 20 bis 50 Generationen kultiviert werden konnten (Rheinwald et al., 1975). Zu Beginn der 80er Jahre führten diese Fortschritte zur ersten therapeutischen Anwendung von in vitro hergestellten Hauttransplantaten bei Brandverletzungen (Bell et al., 1981; Burke et al., 1981). Seitdem werden Schwerbrandverletzte weltweit mit in vitro hergestellten Hauttransplantaten behandelt und können dadurch ihre lebensgefährlichen Verletzungen überleben (Rennekampff et al., 1996; von Donnersmarck et al., 1995).

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Konzepte zur Herstellung bioartifizieller Gewebe in vitro (Bücheler, 2002b). Dazu sind proliferationsfähige menschliche Zellen erforderlich. Diese werden nach ihrer Isolierung durch geeignete Zellkulturtechniken vermehrt, bis eine ausreichende Zellzahl zur Besiedelung einer künstlichen Matrixstruktur vorhanden ist. Die Trägermaterialien werden in Form von porösen Netzwerken oder Schwämmen hergestellt. Dabei kommen Materialien wie Kollagen, Fibrin, die auch physiologischerweise in der extrazellulären Matrix vorkommen, aber auch Kunststoffe, wie beispielsweise Polytetrafluorethylen (PTFE, besser bekannt als Teflon®) oder Polyethylenterephthalat (PET) zum Einsatz (Wintermantel, 1996a). Um Langzeitnebenwirkungen bei Implantaten, wie Gewebeunverträglichkeit, Wandern im Organismus, Degradation und Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften oder hohe Entwicklungs- und Folgekosten zu vermeiden, sollten die eingesetzten Trägermaterialien biodegradabel sein. Das bedeutet, dass die Zellen das Material (zum Beispiel Poly-L-Lactat) und dessen Stoffwechselprodukte resorbieren (Minuth et al., 2003f). Mittlerweile werden in vielen verschiedenen medizinischen Fachgebieten die Methoden des Tissue Engineering angewandt. Das Spektrum reicht von Grundlagenforschung zur Regeneration der endokrinen Pankreasfunktion (Schroeder et al., 2006) über vorklinische Studien, zum

Beispiel beim Herzklappenersatz (Mendelson et al., 2006) bis zum klinischen Einsatz, zum Beispiel als Ersatz knöcherner Strukturen (Warnke et al., 2006b), zur Hauttransplantation (Metcalf et al., 2006) oder bei der autologen Knorpeltransplantation (Brittberg et al., 2003). Artificielle Gewebe können jedoch nur dann für den Einsatz am Patienten problemlos genutzt werden, wenn sie risikolos ihre Aufgabe als Regenerationsgewebe, Implantate oder Biomodule erbringen. Daher ist die Erforschung des Verhaltens humaner Zellen und Gewebe *in vitro*, deren Beeinflussung und Reaktion auf unterschiedliche Kulturbedingungen eine zwingende Voraussetzung für den klinischen Einsatz des Tissue Engineering (Kotte, 2005a).

Bisher gibt es kein etabliertes Verfahren, Knochendefekte durch *in vitro* gezüchteten Knochen zu ersetzen. Bei den bislang erfolgversprechendsten Versuchen wurden Knochenstammzellen auf biokompatible und präformierte Biomaterialien aufgebracht und implantiert (Warnke et al., 2006b). Beispiele dieser Art unterstreichen den Bedarf an weiterer klinischer Grundlagenforschung.

1.3 Tissue Engineering in Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und Kopf-Hals-Chirurgie

Mittlerweile gibt es einige Möglichkeiten des autologen Gewebeersatzes durch Tissue Engineering im Kopf- und Halsbereich. Eine Übersicht darüber gibt Abbildung 1. Einige dieser Verfahren, wie beispielsweise die Erzeugung künstlicher Trommelfelle oder Speicheldrüsen befinden sich allerdings noch im experimentellen Stadium.

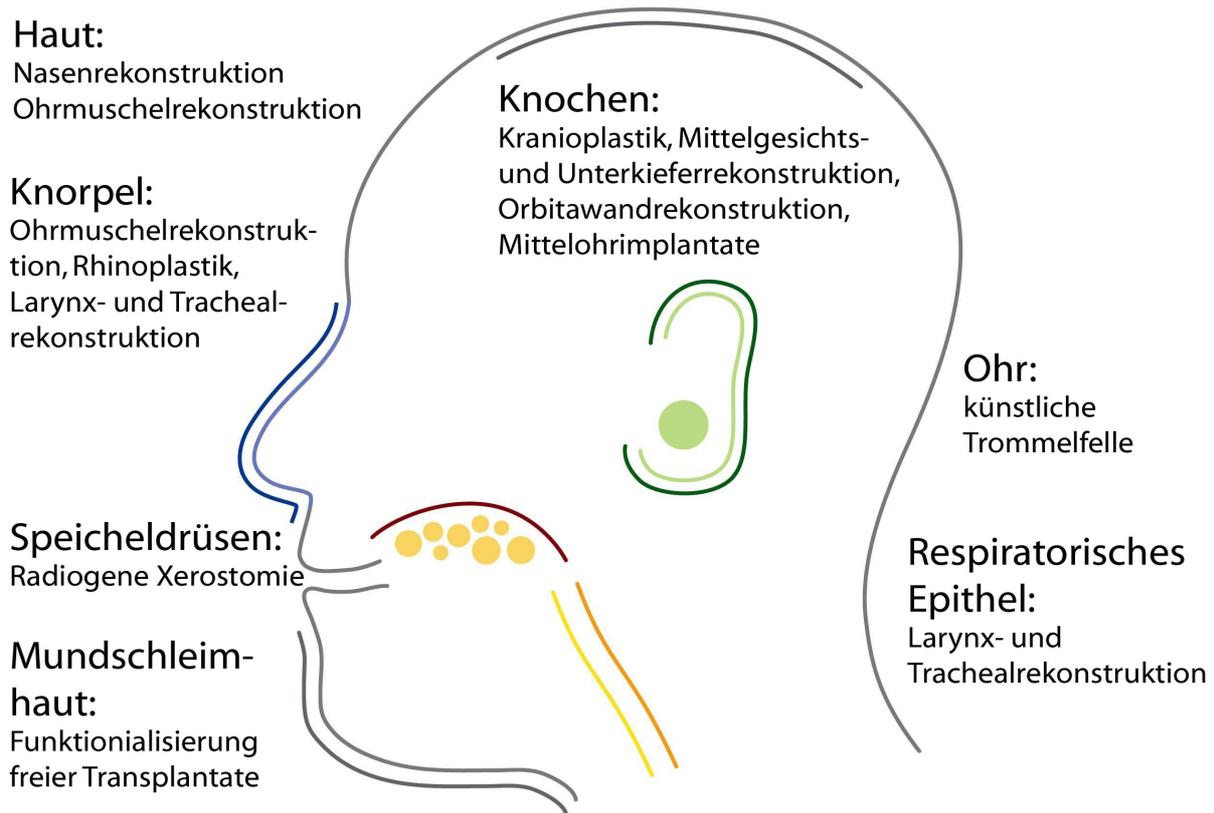


Abb.1 Therapeutische Einsatzmöglichkeiten für Tissue Engineering im Kopf-/Halsbereich (modifiziert nach Bücheler)

Dennoch besteht die Notwendigkeit, neue, auf den Prinzipien des Tissue Engineering basierende Konzepte zu entwickeln oder bestehende zu verbessern. Ein Beispiel sind Verfahren zur Rekonstruktion kurz- und langstreckiger Trachealabschnitte. Die Arbeitsgruppe um Omori et al. entwickelte ein Tissue Engineering Verfahren, um kurze Trachealabschnitte zu rekonstruieren (Omori et al., 2008). Dennoch ist es bislang nicht möglich, ein dauerhaft stabiles Implantat für längere Trachealabschnitte, einschließlich suffizienter Gefäßversorgung und korrekter mukoziliärer Funktion, zu generieren (Bücheler et al., 2008).

Der Knochenersatz im Bereich des Gesichts- oder Hirnschädels kann nach Tumorresektion, Traumata, Entzündungen oder bei Fehlbildungen erforderlich werden. Das dabei verwendete Ersatzmaterial muss bestimmten Anforderungen gerecht werden:

- Es sollte mechanisch stabil sein, um nach der Implantation einen ausreichenden Schutz des Gehirns oder anderer Weichteilstrukturen zu gewährleisten.
- Um die Gefahr von druck- oder wärmebedingten Schädigungen des umliegenden Gewebes zu minimieren, sind geringes Gewicht und eine möglichst geringe Wärmeleitung unabdingbar.
- Idealerweise ist das Material intraoperativ formbar und lässt sich problemlos osteosynthetisch befestigen.
- Um eine komplikationsfreie postoperative Diagnostik zu garantieren, sollten Implantate sowohl röntgentransparent als auch nichtmagnetisch

Da bisher nur wenige Materialien die oben genannten Vorgaben erfüllen, haben autologe Knochentransplantate, zum Beispiel aus der Tabula externa oder dem Beckenkamm, einen sehr hohen Stellenwert für die Rekonstruktion knöcherner Defekte des Gesichtsschädels und der Kalotte (Sanan et al., 1997). Autologe Knochentransplantate erfordern aber häufig einen Zweiteingriff, der zusätzliche Komplikationen, wie kosmetisch störende Narben oder chronische Schmerzzustände zur Folge haben kann (Hill et al., 1999).

Das Tissue Engineering von Knochen könnte die Anzahl erforderlicher Zweiteingriffe und damit die eventuell auftretenden Komplikationen verringern. Zugleich wäre es möglich, die Vorteile autologer Knochentransplantate zu nutzen. Das wahrscheinlich spektakulärste Beispiel der letzten Jahre ist die Unterkieferrekonstruktion bei einem Patienten, dem zuvor tumorbedingt der Unterkiefer bis auf die Processus mandibulae entfernt werden musste. Die Arbeitsgruppe um Warnke et al. implantierte 2004 nach der Tumorentfernung einen individuell angepassten Unterkiefer, der 13 Monate in vivo seine Funktion erfüllte, bevor der Patient an einem Herzleiden verstarb (Warnke et al., 2006b).

1.4 Tissue Engineering von Knochen

Bisher lassen sich drei unterschiedliche Ansätze zur Therapie knöcherner Defekte mittels Tissue Engineering voneinander unterscheiden, die einzeln oder in Kombination

für die Wiederherstellung von Knochen in der kraniofazialen Chirurgie genutzt werden können (Rotter et al., 2005):

1. Die faktorbasierte Therapie
2. Die matrixbasierte Therapie
3. Die zellbasierte Therapie

Bei der **faktorbasierten** Therapie kommen Proteine zum Einsatz, die das Knochenwachstum stimulieren. Daher wird diese Methode auch als osteoinduktiv bezeichnet. Diese Proteine, auch Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) genannt, können nach Zugabe im Gewebe eine Zelldifferenzierung einleiten (Nogami et al., 1975; Urist et al., 1977). BMP-2 und BMP-7 gelten als stärkste osteoinduktive Proteine (Celeste et al., 1990). Die Knochenbildung kann sowohl orthotop im Knochendefekt als auch heterotop, zum Beispiel im Muskelgewebe, induziert werden. Dadurch wird es möglich, Knochen in defektfermem Weichgewebe durch Injektion von BMPs zu bilden, um ihn später frei oder gefäßgestielt in den Knochendefekt zu transplantieren (Terheyden et al., 1999).

Beim **matrixbasierten** Therapieansatz sollen nach dem Einbringen des Implantates Knochenvorläuferzellen, wie zum Beispiel Osteoblasten, in den Implantatwerkstoff einwandern. Diesen Vorgang nennt man Osteokonduktion (Burchardt, 1983; Morishita et al., 2006). Entscheidender Nachteil dieser Methode ist das Fehlen der biologischen Aktivität, beispielsweise der Osteoinduktion, die im Rahmen faktorbasierter Therapieansätze Anwendung finden.

Da das Knochenmark osteogene Vorläuferzellen enthält, die das Potential besitzen, eine Knochenregeneration zu induzieren (Beresford, 1989), wurden die ersten **zellbasierten** Konzepte für den Knochenersatz mit autogenem Knochenmark realisiert. Dabei wurde auf die Zugabe weiterer Substanzen oder Werkstoffe verzichtet und das Material direkt in den Knochendefekt eingebracht (Jackson et al., 1981; Ohgushi et al., 1989; Paley et al., 1986; Werntz et al., 1996; Wolff et al., 1994). Neben den im Knochenmark vorhandenen mesenchymalen Stammzellen können auch osteoblastäre Zellen und differenzierte Osteoblasten verwendet werden (Kotte, 2005b; Rust et al., 2007; Voegele et al., 2000). Osteoblasten können durch Knochenbiopsien oder durch die in vitro induzierte Differenzierung von Vorläuferzellen durch Zugabe von Dexamethason,

Ascorbinsäure oder Osteopontin gewonnen werden (Bruder et al., 1997; Jang et al., 2005; Maniatopoulos et al., 1988).

Für den künftigen klinischen Einsatz in vitro hergestellten Knochens stehen osteogene Vorläuferzellen, mesenchymale Stammzellen und differenzierte Osteoblasten zur Verfügung. Welche der drei Zellarten das größte Proliferationspotential in vitro besitzt und damit als ideale Quelle für das Tissue Engineering von Knochen gilt, ist derzeit noch ungeklärt. Sowohl Osteoblasten als auch mesenchymale Stammzellen (MSCs) und osteogene Vorläuferzellen können in vitro auf biodegradable und nicht-biodegradable Trägerstrukturen aufgebracht werden.

1.5 Mesenchymale Stammzellen

Seit den 90er Jahren des vorigen Jahrhunderts ist bekannt, dass mesenchymale Stammzellen (Mesenchymal Stem Cells = MSCs) aus Periost oder Knochenmark ein erhebliches proliferatives und regeneratives Potential haben (Bruder et al., 1997; Haynesworth et al., 1992; Nakahara et al., 1990). Nakahara et al. postulierten, dass periostale Zellen Subpopulationen von Progenitorzellen beinhalten, die in vivo direkt in Osteoblasten oder Chondroblasten differenzieren können. Es gelang einer Arbeitsgruppe um Yoshimura 2006, mesenchymale Stammzellen im Tierversuch aus verschiedenen Geweben wie zum Beispiel aus Knochenmark, Periost, Synovia, Fett- und Muskelgewebe zu gewinnen (Yoshimura et al., 2006). Sie beschrieben höheres Wachstumspotential und Ertrag von MSCs aus soliden Geweben gegenüber dem aus Knochenmark extrahierten Zellen. Gegenwärtig hat dieses Verfahren nur beim Tissue Engineering im Tiermodell eine Bedeutung. Pittenger et al. beschrieben 1999 mesenchymale Stammzellen als multipotente Zellen, die im adulten (= postnatalen) Knochenmark vorkommen und sich in jedes Gewebe differenzieren können, das der mesenchymalen Reihe entstammt (Pittenger et al., 1999). Dazu gehören Knochen-, Knorpel-, Fett-, Muskel- und Bindegewebe sowie Sehnen und Bänder.

Oreffo et al. hoben 2005 die besondere Bedeutung mesenchymaler Stammzellen in Bezug auf die zunehmende klinische und sozioökonomische Relevanz hervor.

Aufgrund der guten Verfügbarkeit und des hohen regenerativen Potentials besteht großes Interesse an der Weiterentwicklung von Therapieverfahren mithilfe von humanen mesenchymalen Stammzellen. Im Vordergrund steht dabei die Wiederherstellung von traumatisiertem, entzündetem oder degeneriertem Knochen (Oreffo et al., 2005).

1.6 Bone Morphogenetic Proteins – Osteoinduktive Proteine

Osteoinduktive Proteine sind multifunktionale Wachstumsfaktoren, die überwiegend der Proteinfamilie des Wachstumsfaktors TGF- β (Transforming growth factor β) zugeordnet werden (Chen et al., 2004; Wozney et al., 1990). Die Rolle von BMPs in der Embryonal- und in der Postnatalentwicklung wurde in den vergangenen Jahren ausgiebig studiert. Die Aktivität der BMPs wurde zuerst in den 60er Jahren durch Urist entdeckt (Urist, 1965). Er stellte fest, dass eine heterotope Osteoinduktion durch Knochenimplantate nur nach vorheriger Demineralisation des Knochens möglich war. In den späten 70er Jahren beschrieb er die Existenz dieser Proteine. Seinen Ausführungen zufolge handelte es sich um schnell diffundierende Moleküle, die Membranen passieren und eine heterotope Knochendifferenzierung bewirken konnten (Urist et al., 1977). Die besondere Rolle der BMPs bei der Knochenentwicklung wurde in den späten 80er Jahren mittels Isolierung und Sequenzierung von BMP-3 (Osteogenin) durch Luyten et al. und der Klonierung von humanem BMP-2 und -4 durch Wozney et al. entdeckt (Luyten et al., 1989; Wozney et al., 1988; Wozney, 1992). Bisher wurden etwa 20 Mitglieder der BMP-Familie identifiziert und charakterisiert, von denen sechs (BMP-2 bis -7) osteoinduktive Eigenschaften aufweisen. Von diesen sechs haben BMP-2 und BMP-7 das stärkste knochenbildende Potential. BMPs haben trotz ihres Namens auch entscheidenden Einfluss auf Entwicklung und Differenzierung anderer Gewebe. BMP-2 reguliert zum Beispiel die kardiale Entwicklung während der Embryogenese. Durch Inhibition lässt sich die Entwicklung des Myokards stark verzögern (Ghosh-Choudhury et al., 2003; Kawai et al., 2004). BMP-4 Knockoutmäuse weisen keine Mesodermentwicklung auf (Winnier et al., 1995), und die Ausschaltung von BMP-7 führt zu Entwicklungsstörungen von Nieren und Augen (Dudley et al., 1995; Dudley et al., 1997).

Seit einiger Zeit werden in vitro- und in vivo-Verfahren geprüft, bei denen die Bildung osteogener Wachstumsfaktoren, vor allem BMP-2, durch gentechnische Verfahren stimuliert werden soll. Dabei werden Retroviren der Gattung der Lentiviren als Vektoren eingesetzt. Sugiyama et al. verwendeten 2005 Lentiviren als Vektoren, um mittels Gentransfer eine erhöhte Produktion von BMP-2 in vitro zur Knochenneubildung zu induzieren (Sugiyama et al., 2005). Feeley et al. verglichen 2006 Adeno- und Lentiviren hinsichtlich ihrer Eignung als Vektoren (Feeley et al., 2006). Den Untersuchungsergebnissen zufolge gibt es kaum Unterschiede in der Quantität der

Knochenneubildung. Die Arbeitsgruppe um Hsu et al. verglich 2007 verschiedene retroviral veränderte Knochenmarkstammzellpopulationen von Ratten hinsichtlich BMP-Expression und Knochenbildung miteinander (Hsu et al., 2007). Die Ergebnisse bestätigten die Erkenntnisse von Sugiyama et al. aus dem Jahr 2005 hinsichtlich des Potentials von BMP-2. Gersbach et al. veränderten 2007 Skelettmyoblasten gentechnisch, so dass diese mit Hilfe von retroviralem Gentransfer durch Überexpression von BMP-2 eine osteoblastäre Differenzierung annahmen (Gersbach et al., 2007).

1.7 Biomaterialien als Trägerstrukturen

Für das Tissue Engineering werden dreidimensionale Trägerstrukturen (englisch: Scaffolds) verwendet. Sie haben eine Leitfunktion für einwachsende Gewebe und Zellen und können sowohl in vitro als auch in vivo Aufbau und Organisation von Geweben beeinflussen. Scaffolds müssen als Biomaterialien klassifiziert sein und als solche einer der drei Hauptwerkstoffklassen entstammen. Dazu zählen Polymere (organische Festkörper), Keramiken (nichtmetallische anorganische Festkörper) und Metalle. Voraussetzungen für die Verwendung als Biomaterialien sind definierte mechanische Eigenschaften, Struktur und chemische Zusammensetzung sowie Biokompatibilität bzw. gute Verträglichkeit.

Die Biokompatibilität wird in Oberflächen- und Strukturkompatibilität eingeteilt. Unter Oberflächenkompatibilität wird die physikochemische Wechselwirkung zwischen den äußeren Moleküllagen des Werkstoffs und der unmittelbar anliegenden Gewebeschicht verstanden, die Strukturkompatibilität beschreibt in erster Linie die Übertragung von Kräften (Wintermantel et al., 1999). Für das Tissue Engineering wird heute eine Vielzahl unterschiedlicher Biomaterialien eingesetzt. Darunter finden sich häufig Netze, Vliese oder Schäume aus biologische abbaubaren (=biodegradablen) Polyestern, zum Beispiel Polyglycolsäure und Polyactid, oder aus natürlichen Polymeren, wie zum Beispiel Kollagen oder Hyaluronsäure. Für das Tissue Engineering von Knochen finden vor allem keramische Werkstoffe, wie zum Beispiel Hydroxylapatit, und Metalle, beispielsweise Titan, Anwendung (Bücheler, 2002a; Warnke et al., 2006b).

1.8 Biodegradable Trägerstrukturen

Biodegradable Materialien besitzen die Eigenschaft, sich nach Besiedelung mit Zellen oder nach der Implantation aufzulösen und dabei durch die neu gebildete gewebspezifische Extrazellulärmatrix (ECM) ersetzt zu werden. Während des Abbaus des Polymers wird die Umbruchstelle von den verwendeten Zellen permanent erneuert. Seit Jahrzehnten häufig angewendete Trägermaterialien sind Homo- und Heteropolymere aus Poly-L-Lactat (PLA), Poly-Glycolat (PGA) und Poly-Lactat-co-Glycolat (PLGA). Nach Erfüllung ihrer primären Stütz- und Zellbesiedelungsfunktion sollen die Scaffolds durch unterschiedliche Degradationsmechanismen, wie Polymerauflösung, Hydrolyse, enzymatische Degradation und Dissoziation von Polymer-Polymer-Komplexen abgebaut werden (Minuth et al., 2003f). Breitbart et al. nutzten im Tiermodell ein mit vordifferenzierten Osteoblasten besiedeltes Polyglycolsäuregerüst, um einen vollschichtigen Schädeldefekt zu versorgen. 12 Wochen nach der Implantation war eine deutliche Knochenneubildung in vivo nachweisbar (Breitbart et al., 1998). Der Degradationsprozess kann aber zu unerwünschten Nebenwirkungen im angrenzenden Gewebe und zu Forminstabilität führen (Warnke et al., 2005). Werden biodegradable Polymere als Scaffold verwendet, so bilden sich mit der Zeit Abbaumetabolite, wie zum Beispiel Milch- oder Buttersäure, die in das Kulturmedium bzw. in das umgebende Gewebe abgegeben werden. Unter optimalen Bedingungen sollten diese Metabolite in den biologischen Kreislauf des Körpers aufgenommen, abtransportiert und über die normalen Abbauege eliminiert werden. Dennoch besteht die Gefahr bei Verwendung von Polyestern, dass sich vermehrt Carbonsäure bildet, die nicht sofort entfernt wird und durch ihre hohe Konzentration das umgebende Gewebe schädigen kann. Dies kann zusätzlich durch eine möglicherweise inhomogene Degradationskinetik begünstigt werden, bei der der Abbau nicht gleichmäßig stattfindet, sondern von bestimmten Zentren ausgeht. Die lokale Ansäuerung kann sich bis schädlich auf das sich entwickelnde Gewebe auswirken (Minuth et al., 2003f).

1.9 Nicht-Biodegradable Ersatzstrukturen

Vor allem Titan- und Hydroxylapatitverbindungen kommen als nicht-biodegradable Materialien in der Kopf-Hals-Chirurgie zum Einsatz.

Hydroxylapatit hat in Hinblick auf die Anforderungen des klinischen Alltags viele vorteilhafte Eigenschaften. Hervorzuheben sind mechanische Stabilität, gute Formbarkeit, keine Bildung von fibrillärem Bindegewebe, rasches Anwachsen von Knochengewebe, Ausbildung einer Verbindung zwischen Implantat und Gewebe mit hoher Festigkeit, kürzere Heilungsphase als bei Implantaten mit metallischer Oberfläche und reduzierte bis verhinderte Ionenfreisetzung im Gegensatz zu metallischen Materialien (Wintermantel et al., 1996c).

Nicht-Biodegradable Werkstoffe	Medizinische Anwendungsgebiete
Biokeramische Werkstoffe (Hydroxylapatit, Aluminiumoxid, Zinkoxid)	Knochenersatz, orthopädische und Dentalimplantate, Gesichtschirurgie, Ohrimplantate, Wirbelersatz
Metalle (Titan, Platin)	Kranioplastiken, Gesichts- und Neurochirurgische Implantate, Mittelohrimplantate
Polymere (Kollagen, Poly-L-Lactat)	Trachealplastiken, Gefäßimplantate, Nahtmaterial
Textile Gestricke	Trommelfellimplantate (noch in Erforschung)

Tab.1 Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen
(modifiziert nach Wintermantel 1996a-c)

Als metallischer Werkstoff wird vor allem Titan zur Herstellung nicht-biodegradabler Implantatgerüste verwendet. Seine Vorteile sind gute Gewebeerträglichkeit, geringe Toxizität, kaum allergene Wirkung (Duchna et al., 1998; Pohler, 2000; Schuh et al., 2005), sowie mechanische Stabilität und Korrosionsbeständigkeit (Browne et al., 1994; Wintermantel, 1996b). Von Nachteil ist allerdings, dass nicht-resorbierbare Materialien

zwar ihre Grundstabilität behalten, aber auch Remodellingvorgänge im Knochen behindern können (Warnke et al., 2005). Beispiele aus dem klinischen Alltag sind die Implantation individuell angepasster Titanplatten zur Deckung ausgedehnter Defekte im Bereich des Stirnschädels infolge destruierender Osteomyelitiden und maligner Raumforderungen (Bücheler et al., 2002a), oder die Rekonstruktion des Orbitabodens und der medialen Orbitawand mittels vorgefertigter Titan-Meshs (Metzger et al., 2006). Die Abbildungen 2a bis 2f dokumentieren den Fall einer schweren, chronischen Osteomyelitis frontalis, die erst durch Implantation eines formangepassten Titanimplantats erfolgreich therapiert werden konnte. Bei diesem Patienten wurde eine frontale Kraniotomie durchgeführt, um das erkrankte Gewebe zu entfernen. Anhand von CT-Aufnahmen konnte schließlich eine individuell angepasste Titanplatte angefertigt und implantiert werden. In der Folge war der Patient beschwerdefrei.



Abb.2a

Präoperativer Befund:
Ausgedehnte narbige Einziehungen und Fistelbildungen der Stirnweichteile infolge der chronischen Osteomyelitis



Abb.2b

Strukturelle Defizite der Schädelkalotte in der Computertomographie

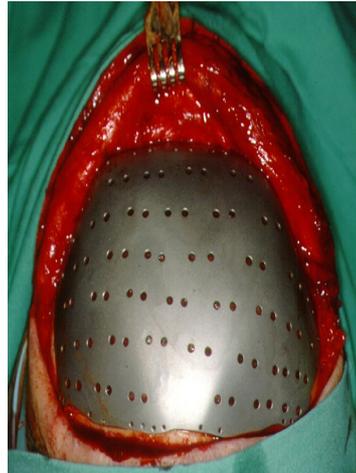


Abb.2c

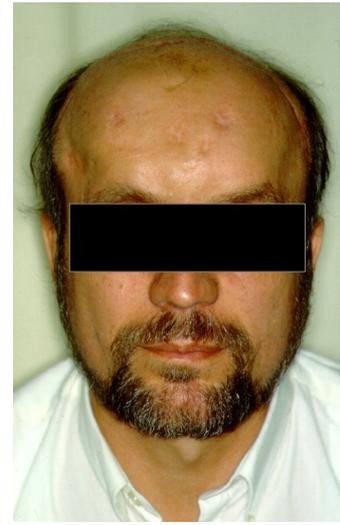
Starke Deformierung des Schädels in der Seitenansicht nach Kraniotomie

**Abb.2d**

Röntgenbefund nach
Kraniotomie

**Abb.2e**

Intraoperativer Befund
der Folgeoperation:
Ersatz der Schädel-
kalotte durch ein
formangepasstes
Titanimplantat

**Abb.2f**

Postoperativer Befund:
Schädelkontur normalisiert

Warnke et al. implantierten 2004 ein durch Tissue Engineering in vivo konstruiertes, gefäßgestieltes Unterkiefertransplantat. Es handelte sich um ein aus Titandraht gefertigtes Gerüst (Scaffold), das nach der Besiedelung mit Knochengewebe zur Wiederherstellung der Funktion implantiert werden konnte. Das Implantat konnte trotz wiederholter Infektionen und Lockerung der Befestigung an der Mandibula über 13 Monate vital erhalten werden. Da der Patient einem Herzleiden erlag, war eine weitere Verlaufsbeurteilung nicht möglich (Warnke et al., 2004; Warnke et al., 2006b). Voraussetzung für die Verwendung dieser Methode ist die Herstellung eines exakt passenden und mechanisch stabilen Implantates (Warnke et al., 2006a). Dazu wurde zunächst mithilfe einer 3D-Computertomographie ein virtuelles Implantat per Computer Aided Design (CAD) am Bildschirm entworfen. Anhand dieses virtuellen Modells konnte dann das Implantat angefertigt werden, das der exakten Form des Idealimplantates entsprach (Eufinger et al., 2002; Scholz et al., 2007).

1.10 Knochengewebe

Knochen- und Knorpelgewebe bilden das Stützgewebe des menschlichen Körpers. Gemeinsam mit Bändern und Gelenken stellen sie den passiven Bewegungsapparat dar, während der aktive Bewegungsapparat durch die Skelettmuskulatur gebildet wird. Knochen zeichnet sich zum einen durch seine Härte (Druckfestigkeit) und zum anderen durch seine Elastizität (Zugfestigkeit) aus, die durch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Knochenmatrix) bedingt ist. Der hohe Gehalt an Kalziumphosphatkristallen (Hydroxylapatit) bedingt die besondere Härte des Knochens. Die Elastizität wird durch ein trajektorieell ausgerichtetes, den Zugkräften angepasstes dichtes Netz von Kollagenfibrillen erreicht. Die Knochen ermöglichen der Skelettmuskulatur die Übertragung von Kräften auf benachbarte oder entfernte Körperpartien. Sie dienen als schützende Wandstruktur für das Gehirn in Form des Schädels, für die Thoraxeingeweide in Form des Brustkorbes und für die Beckeneingeweide in Form des knöchernen Beckens. Die Knochen enthalten überdies das blutbildende Knochenmark und spielen als Reservoir eine zentrale Rolle bei der Regulation der Calciumhomöostase der Körperflüssigkeiten.

1.11 Knochenmatrix

Das Gesamtgewicht des Knochengewebes eines 70 kg schweren Erwachsenen beträgt im Mittel 4 kg und nimmt ein Volumen von etwa 1720 cm³ ein. Der Wassergehalt der mineralisierten Knochenmatrix beträgt 10-20 %, was verglichen mit Knorpelgewebe (60-80 % Wasser) wenig ist. Die wasserfreie Matrix besteht zu 70 % aus anorganischen und zu 30 % aus organischen Substanzen. Die Mineralsubstanz wird hauptsächlich aus Hydroxylapatitkristallen ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) gebildet und enthält geringe Mengen von Kalziumcarbonat (CaCO_3), amorphem Kalziumhydrogenphosphat (CaHPO_4), Magnesium-, Kalium- und Natriumsalzen. Der reine Kalziumgehalt des Knochengewebes bei einem 70 kg schweren Erwachsenen beträgt ungefähr 1 kg. Neben den Hauptionen Kalzium, Phosphat, Hydroxid und Carbonat enthält die Matrix geringe Mengen weiterer Anionen (u.a. Fluorid, Citrat) und Kationen (u.a. Eisen, Zink, Kupfer, Strontium, Blei). Die Hydroxylapatitkristalle liegen entlang der Kollagenfibrillen und sind von Grundsubstanz umgeben. Um oberflächliche Kristalle befindet sich eine Hydratationshülle aus Wasser und Ionen, die den Ionenaustausch zwischen Kristall und den Körperflüssigkeiten erleichtert.

Der organische Anteil der Matrix besteht zu 90 % aus Kollagen Typ I. Dieses Kollagen bildet typische Fibrillen und ist hoch geordnet angelegt. Die übrigen 10 % der Matrixproteine setzen sich zusammen aus Kollagen Typ V (5 %), Osteocalcin und Matrix-Gla-Protein (20 %), Osteonectin (20 %), Osteopontin, Bone-Sialoprotein und Thrombospondin (insgesamt etwa 20 %), Proteoglykane (Biglycan, Decorin ca. 5 %), sowie Fibronectin, Serumalbumin und anderen Proteinen.

Einige der Glykoproteine, wie zum Beispiel Osteopontin, Osteocalcin oder Sialoprotein können mit ihren sauren Gruppen offenbar Kalziumionen konzentrieren. Sie können daher in vitro als Kristallisationskern wirken bzw. bei der Verkalkung der Matrix förderlich sein (Kojima et al., 2004; Taller et al., 2007). Andere Kollagen Typ I-haltige Gewebe besitzen weder diese Glykoproteine, noch verkalken sie.

1.12 Knochenarten

Man unterscheidet histologisch Geflechtknochen (=Primärknochen) und Lamellenknochen (=Sekundärknochen). Geflechtknochen tritt in der Regel nur während Entwicklungs- und Reparaturprozessen, wie zum Beispiel der Frakturheilung auf. Bei erwachsenen Menschen besteht das Skelett hauptsächlich aus Lamellenknochen. Nicht nur während des Wachstums, sondern auch im ausgewachsenen Zustand unterliegt der Knochen ständig Um- und Abbauprozessen.

1.13 Osteoblasten

Osteoblasten sind für die Synthese der organischen Komponenten der Knochenmatrix (Kollagen Typ I, Proteoglykane, Glykoproteine) verantwortlich. Diese nicht verkalkte Knochenmatrix nennt man Osteoid. Osteoblasten reihen sich palisadenartig an der Osteoidgrenze von Knochenneubildungszonen auf. Im aktiven Zustand sind sie kubisch bis zylinderförmig. Ihre Plasmamembran ist reich an alkalischer Phosphatase, das als Kennmolekül der Osteoblastendifferenzierung angesehen wird. Die alkalische Phosphatase ist durch ihre Verankerung auf der äußeren Zelloberfläche in der Lage Phosphorsäureester wie zum Beispiel β -Glycerophosphat zu hydrolysieren, wodurch die Konzentration an Phosphationen ansteigt und so die Komplexbildung mit Kalziumionen gefördert wird. Osteoblasten besitzen ein basophiles Zytoplasma, das reich an Ribosomen ist, ein gut ausgebildetes raues endoplasmatisches Retikulum und einen ebenfalls stark ausgeprägten Golgi-Apparat. Die Zellen sind durch Adhäsionskontakte,

Nexus und fleckförmige Occludenskontakte miteinander verbunden. Mit nachlassender Aktivität flachen die Zellen ab, die zelluläre Basophilie lässt nach und sie bilden Fortsätze aus.

1.14 Osteoprogenitorzellen

Wie viele andere Gewebe des menschlichen Körpers enthält das Knochengewebe multipotente Progenitorzellen, die unter anderem zu Osteoblasten und Chondroblasten differenzieren können. Faktoren, die bei der Knochenbildung eine Rolle spielen, sind die bereits erwähnten Bone morphogenetic Proteins (BMP-2, -4, -6, -7), die in der Knochenmatrix gebunden vorliegen. BMPs können multipotente Stromazellen in bipotente Progenitorzellen und Präosteoblasten überführen. Progenitorzellen können sich dann sowohl zu Osteoblasten als auch zu Chondroblasten differenzieren. Diese Präosteoblasten können sich zu aktiven Osteoblasten entwickeln. Für die Differenzierung zu Osteoblasten ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CBFA (Core binding factor), auch als Osf2 (Osteoblast specific factor) bezeichnet, notwendig. Präosteoblasten und bipotente Progenitorzellen kommen in Knochenmark, Endost und Periost (Stratum osteogenicum) vor. Als Progenitorzellen werden Zellen mit der Morphologie von Stromafibroblasten angesehen.

1.15 Osteozyten

Osteozyten sind der dominierende Zelltyp des Knochens. Es sind inaktive Osteoblasten, die auf mechanische Beanspruchung reagieren und die extrazelluläre Matrix aufrechterhalten. Sie liegen in Osteozyten-Lakunen und strecken ihre Fortsätze in Canaliculi aus. Über diese Fortsätze sind sie mit anderen Osteozyten über Gap Junctions oder auch Nexus verbunden. Diese Nexus ermöglichen eine Koordinierung der metabolischen Aktivität bzw. einen Stoffaustausch zwischen den Zellen sowie eine Weiterleitung von Signalen. Im Vergleich zu Osteoblasten sind Osteozyten flach, mandelförmig, haben ein deutlich verringertes raues endoplasmatisches Retikulum, einen kleinen Golgi-Apparat und ein stärker kondensiertes Chromatin, was für eine geringere Proteinsyntheseleistung spricht. Sie können nach Freisetzung durch Resorptionsvorgänge wahrscheinlich wieder zu aktiven Osteoblasten differenzieren. Es ist ungeklärt, ob Osteozyten an der Mobilisierung von Kalzium beteiligt sind.

1.16 Knochenentwicklung

Knochen entstehen auf zweierlei Weise: Zum einen durch desmale Ossifikation, bei der die von Osteoblasten sezernierte Matrix verkalkt und zum anderen durch chondrale Ossifikation, bei der die Knorpelmatrix durch Knochengewebe ersetzt wird. Bei beiden Prozessen tritt zunächst Geflechtknochen auf, der durch Lamellenknochen ersetzt wird. Während der Wachstumsphase können Geflechtknochen, Resorptionszonen und Lamellenknochen nebeneinander vorkommen. Ein Remodeling, d.h. ein Knochenauf- und -umbau findet lebenslang statt.

1.17 Laser Scanning Cytometrie

Bei der Laser Scanning Cytometrie handelt es sich um ein Verfahren aus dem Bereich der Objektträger-basierten Cytometrie, die Eigenschaften von Fluoreszenzmikroskopie und Flow-Cytometrie miteinander vereint. Die zu untersuchenden Zellen werden auf Objektträgern, Mikrotiterplatten, Petrischalen oder Chamber slides fixiert oder gezüchtet. Es können auch dünne Gewebeschnitte mit einer Dicke von bis zu 30 µm untersucht werden (Mosch et al., 2007). Beim Laser Scanning Cytometer, wie bei den meisten Objektträger-basierten Cytometern, erfolgt die Anregung durch Laserlicht. Unterschiede zwischen den Cytometern finden sich hinsichtlich der Detektionsverfahren, die für den Nachweis der Fluoreszenz eingesetzt werden (Gerstner et al., 2006b). Kamensky et al. etablierten die Laser Scanning Cytometrie zu Beginn der 90er Jahre, indem sie DNA-Messwerte mit Ergebnissen der Flow Cytometrie, dem damaligen Goldstandardverfahren, verglichen und feststellten, dass die LSC gleichwertige Daten lieferte (Kamensky et al., 1991). Die frühen LSC-Untersuchungen beschäftigten sich fast ausschließlich mit DNA-Ploidie und Zellzyklusanalysen (Luther et al., 1996; Sasaki et al., 1996). Mit zunehmender Verbreitung der Technologie und den Möglichkeiten, die diese bot (Kamensky et al., 1997a), kamen Verfahren wie Immunphänotypisierung (Clatch et al., 1996; Gerstner et al., 2002a), Apoptoseuntersuchungen (Darzynkiewicz et al., 1999b), Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) (Kamensky et al., 1997b) und die Untersuchung solider menschlicher Tumoren hinzu (Bingham et al., 2006; Clatch et al., 1997; Mital et al., 2006; Mosch et al., 2006; Rew et al., 1998).

1.18 Aufbau und Funktionsweise des Laser Scanning Cytometers(LSC)

Das LSC verfügt über ein Mikroskop, das mit einem in X- und Y-Achse motorisierten Tisch ausgestattet ist (siehe Abbildungen 3 und 5 auf Seite 26 bzw. 28). Auf diesem Tisch kann der Glasobjektträger automatisch oder manuell bewegt werden. Die Anregung der mit Fluoreszenzfarbstoffen versehenen Präparate erfolgt durch einen Laser. Nach derzeitigem Stand der Technik kann das LSC mit bis zu drei verschiedenen Lasern, zum Beispiel einem Ultra-Violett-Laser (UV-Laser), einen Argon-Laser und einen Helium-Neon-Laser ausgestattet werden. Das Licht der Laser wird coaxial zu einem Teilerspiegel geführt, der die emittierte Fluoreszenz der Probe abspaltet. Zwischen Spiegel und Objekt verlaufen die Wege des anregenden und des emittierten Lichts gemeinsam, aber in entgegengesetzter Richtung. Anschließend trifft der Laserstrahl auf einen oszillierenden Spiegel, der den Strahl so auslenkt, dass der Laser auf dem Objektträger nicht punktförmig, sondern in Form einer Linie in der Y-Achse abgebildet wird (daher die Bezeichnung Laser-Scanning-Cytometer). Dabei hängen Länge und Breite der Laserlinie vom gewählten Objektiv ab: 10x: 1 μm , 20x: 0,5 μm , 40x: 0,25 μm . Die von den Zellen emittierte Fluoreszenz strahlt zwar in alle Richtungen ab, aber es kann nur der Teil detektiert werden, der in umgekehrter Richtung durch das Objektiv über den oszillierenden Spiegel zum Teilerspiegel gelangt. Dieser blockiert das am Objektträger reflektierte Licht der anregenden Laser und lässt nur das Spektrum der vom Präparat emittierten Fluoreszenz passieren. Nun trifft das Licht auf ein bis vier Filterwürfel, die aus je einem dichroitischen Spiegel und einem Bandpass-Filter bestehen. Jeder Filterwürfel spiegelt die entsprechende Fluoreszenz in einen Photomultiplier (PMT), der ein digitales Ausgangssignal generiert. Aufgrund der Konstruktion des LSCs können nur vier Filterwürfel mit Photomultipliern angeschlossen werden und damit bis zu vier Spektralbereiche simultan gemessen werden. Außer den Fluoreszenzen wird ein weiteres Signal generiert: Durch ein auf dem Objektträger liegendes Objekt, zum Beispiel osteoblastäre Zellen, wird das Licht des Lasers antegrad gestreut (sog. Forward scatter, FSC). Dieses Licht wird mit einer Photodiode gemessen, die sich unterhalb des Objektträgers befindet. Damit das ungestreute Licht kein Signal produziert (zum Beispiel, weil kein Objekt im Lichtstrahl lag, der Objektträger an dieser Stelle also leer war), ist über der Photodiode ein Balken angebracht („obscuration bar“), der senkrecht einfallendes, nicht gestreutes Licht absorbiert. Die von den Photomultipliern und der Forward-Scatter-Photodiode generierten Signale werden mit dem Takt des

oszillierenden Spiegels synchronisiert, so dass sie einer definierten Flächeneinheit auf dem Objektträger zugeordnet werden können.

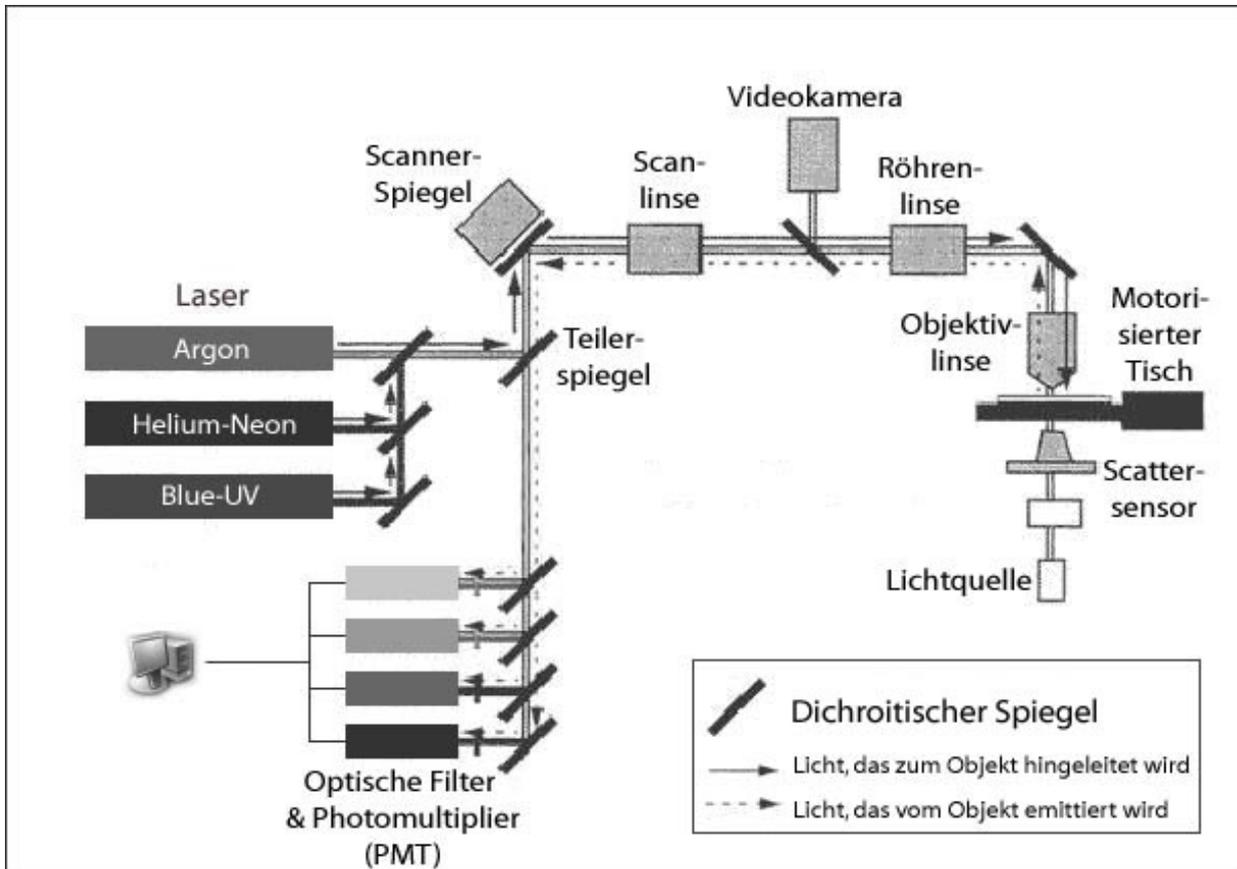


Abb.3 Schematischer Aufbau des LSC und der Wege des Lichtes von den emittierenden Lasern zum Objekt und zu den optischen Filtern und Photomultipliern (modifiziert nach Gerstner et al., 2006b). Die Erläuterung findet sich im Abschnitt 1.18, Seite 25ff..

Das Signal pro Flächeneinheit wird rechnerisch als Pixel dargestellt, dessen Helligkeit in Graustufen die Fluoreszenzstärke des Signals wiedergibt. Dabei sind 2^{14} (16384) Stufen möglich. Bei der Messung werden „pixel-per-pixel-maps“ generiert. Entsprechend der Position der Laserlinie werden die Pixel in Y-Achse als Linie dargestellt, und in X-Achse wird dann eine an die andere Linie gereiht, bis eine definierte Fläche des Objektträgers gemessen ist. Das bedeutet, die zu messende Fläche des Objektträgers wird zunächst in Streifen entlang der X-Achse mit definierter Breite in Y-Richtung geteilt. Diese Streifen werden zunächst weiter in Abschnitte und schließlich in einzelne Laserlinien zerlegt.

Beim Betrieb mit mehreren Lasern arbeiten diese nicht parallel, sondern sequentiell. Nach Vermessung eines Abschnitts fährt der Objektisch um exakt eine Abschnittslänge in X-Achse weiter, damit der sekundäre Laser (oder mehrere Sekundärlaser) das Areal vermessen kann. Bei der Signalverarbeitung wird pro PMT zunächst eine topographische Karte des Objektträgers erstellt, auf dem die belichteten Areale in Grau dargestellt sind. Die Intensität der Fluoreszenz spiegelt sich in der Helligkeit der einzelnen Pixel wieder. Beim zeitgleichen Einsatz mehrerer PMTs entstehen mehrere derartige topographische Karten, bei denen die jeweiligen X-Y-Koordinaten exakt übereinander liegen. Die Verarbeitung der pixel-per-pixel-maps erfolgt mit Hilfe der vom Hersteller gelieferten Software (Wincyte®).

1.19 Einzelzellerfassung

Einzelne Zellen werden über ein Triggersignal erkannt. Über die WinCyte-Software kann definiert werden, welche Kriterien ein Objekt erfüllen muss, um als relevant erkannt („getriggert“) zu werden. Erstens muss jeder Pixel im Triggersignal einen minimalen Fluoreszenzwert oberhalb einer definierten Schwelle („threshold“) haben. Zweitens ist eine Mindestgröße oder -fläche erforderlich, die ein Objekt einnehmen muss („minimal area“). Nur Daten von Pixelgruppen, die diese Bedingungen erfüllen, gelten als relevant und werden analysiert. Ein relevantes Objekt wird von einer Triggerkontur umgeben (Abbildung 4). Der Anwender kann dann die Fläche der Pixelmap, die als Zelle analysiert werden soll, vergrößern, indem er einen Rand von mehreren Pixeln Breite zur Triggerkontur hinzufügt. Damit generiert er die Analysekontur. Der Level unspezifischer Hintergrundfärbung wird für jede Zelle einzeln durch Anwendung einer Hintergrundkontur bestimmt. Diese Kontur wird in einer vom Anwender festgelegten Distanz um die Analysekontur (=außen um die Zelle) herum gelegt. Die Hintergrundfluoreszenz wird automatisch subtrahiert. Die positiven Ereignisse können bei laufender Messung mittels Auswertung des virtuellen Bildes ähnlich der Bildcytometrie überprüft und ggf. korrigiert werden. Alle Pixel, die innerhalb der Analyse-Kontur liegen, werden in die Auswertung einbezogen. Die Informationen der Pixel, die nicht innerhalb der Analysekontur liegen, gehen verloren (Gerstner et al., 2005; Gerstner et al., 2006b; Tärnok et al., 2002).

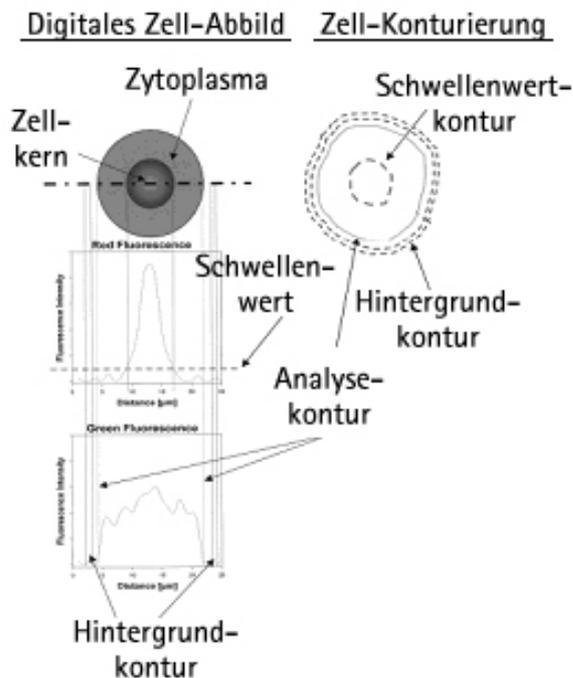


Abb.4 zeigt die Erzeugung der Konturen relevanter Objekte, siehe auch Absatz 1.19 Einzelzellerfassung (modifiziert nach Tàrnok et al. 2002). Dargestellt sind ein schematisiertes digitales Zell-Abbild mit zugehörigen Fluoreszenzhistogrammen darunter. Rechts neben dem digitalen Zellabbild sieht man eine schematische Darstellung der zugehörigen Zellkonturierung. Zur Triggerung benötigt ein Objekt eine Mindestfluoreszenz, um den Schwellenwert zu übersteigen. Dies ist im ersten Histogramm dargestellt. Um diese Mindestfluoreszenz herum wird eine Schwellenwertkontur oder Triggerkontur herum gelegt, um sie von anderen Strukturen abzugrenzen. Dies wird aus der Zell-Konturierungsskizze deutlich. Da nicht nur der Zellkern, der hier als Trigger diente, analysiert werden sollte, sondern auch angrenzende Zellstrukturen, musste zur Triggerkontur eine weitere, die Analysekontur, hinzugefügt werden. Da oftmals nicht nur intrazelluläre Strukturen fluoreszieren, wird von der erfassten Hintergrundfluoreszenz die Fluoreszenz der Analysekontur subtrahiert. Dies verdeutlicht das untere Histogramm.

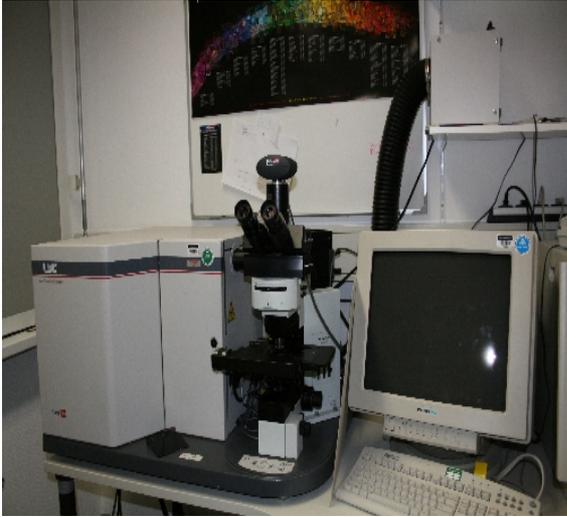


Abb.5 zeigt ein Laser Scanning Cytometer (LSC), bestehend aus dem Mikroskop (Bildmitte), einem Computer (rechts) und der Einheit, die die Laser und die Photomultiplier (PMT) beinhaltet. Nicht zu sehen ist die extern zu bedienende Quecksilberdampfampe.

1.20 Phantom-Contouring

Bei diesem Analyseverfahren werden virtuelle Platzhalter („Phantome“) mit benutzerdefiniertem Radius und benutzerdefiniertem Abstand voneinander regelmäßig auf die zu messende Fläche projiziert. Abbildung 6 zeigt eine solche Projektion. Anschließend wird die Fluoreszenzstärke jeder Stelle des Messareals gemessen, der ein Phantom zugewiesen wurde. Ein Phantom ist also nur als Platzhalter für die tatsächlich darunter liegende Objektträgerfläche zu verstehen. Es dient dem systematischen Scannen einer Fläche, ohne dass eine bestimmte Triggerkontur, wie bei den zellgetriggerten Messungen, vorliegen muss.

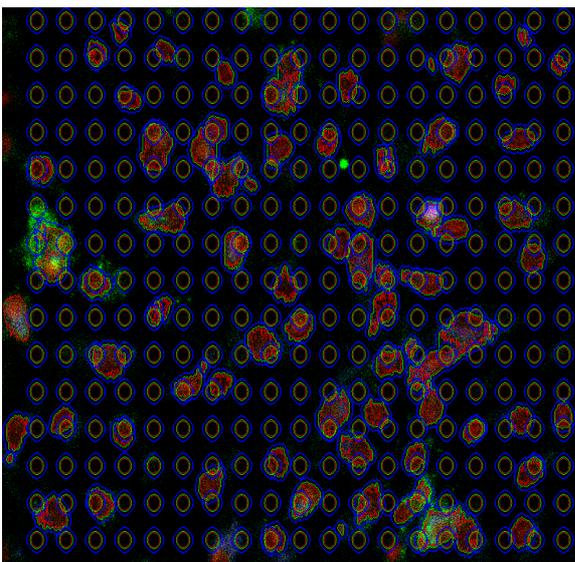


Abb.6 zeigt eine mikroskopische Ansicht einer „Scan Area“. Es finden sich unregelmäßig verteilte Zellen, um die bunte Triggerstrukturen zur Erfassung gelegt wurden. Darüber wurden in regelmäßigen Abständen voneinander kreisrunde Platzhalter (Phantome) projiziert.

1.21 Multiparametrische Messungen

Zu den gemessenen Parametern zählen Eigenschaften, wie z.B. DNA-Menge bzw. Ploidie, Morphologie, Topographie oder verwendete Fluoreszenzen. Bereits bei einer „einfachen“ DNA-Messung mit PI, wie sie Kametsky et al. 1991 bei Einführung des LSC vornahmen (Kametsky et al., 1991), konnten die zwei Parameter DNA-Gehalt und Lage der Zellen beziehungsweise der Zellkerne auf dem Objektträger analysiert werden. 1998 publizierten Clatch et al. ein polychromatisches Protokoll zur Verwendung von fünf verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen bei der Immunphänotypisierung (Clatch et al., 1998). Bis dahin wurden meist dreifarbige Protokolle verwendet. Gerstner et al. steigerten die Zahl verwendeter Fluorochrome 2002 auf sechs und Mittag et al. veröffentlichten 2005 ein Protokoll, in dem acht verschiedene Fluorochrome zur Immunphänotypisierung verwendet wurden (Gerstner et al., 2002b; Mittag et al., 2005). Polychromatische Analysen gewinnen laut Mittag et al. zunehmend an Bedeutung, da sie einen hohen und vor allem detaillierteren Informationsgehalt auf Einzelzellebene vorhalten als bisher möglich. Daher können heute fast alle bekannten Komponenten einer Zelle markiert und gemessen werden (Mittag et al., 2006).

1.22 Alkalische Phosphatase (AP)

Die im menschlichen Körper feststellbare Alkalische Phosphatase (AP) ist kein einheitliches Enzym. Sie besteht zum einen aus den Aktivitätsanteilen der drei genetisch determinierten Isoenzymgruppen Leber-Knochen-Niere, Darm und Plazenta. Zum anderen zählen postgenetische Formen wie zum Beispiel die Gallengangs-AP und Tumorphosphatasen dazu. Letztere sind keine Isoenzyme, weil sie ohne genetische Kontrolle gebildet werden. Alkalische Phosphatasen sind in allen Körperzellen lokalisiert. Sie liegen dort im Zytoplasma gelöst bzw. an Membranstrukturen gebunden vor. Die Halbwertszeit der AP beträgt in Abhängigkeit vom Isoenzym drei bis sieben Tage. Große Enzymmengen sind im Skelettsystem, im Leberparenchym und den Gallenwegsepithelien lokalisiert (Thomas, 1984), die Knochen-AP in den Osteoblasten, bei Heranwachsenden auch in den Chondroblasten (Moss, 1982). Ruhende Osteoblasten haben eine geringe spezifische AP-Aktivität, aktive Osteoblasten eine hohe. So ist die AP-Aktivität im Knochen Heranwachsender um den Faktor 10 höher als bei Erwachsenen. Es wird vermutet, dass die AP Inhibitoren der Knochenkalzifizierung, wie beispielsweise Pyrophosphat, entfernt (Mueller et al., 1983). Die hohe Aktivität der

Serum-AP bei Heranwachsenden beruht nicht allein auf dem Knochenwachstum, sondern reflektiert auch das Wachstum von Bindegewebe. Außerdem kommt es bei Wundheilungen zu einem AP-Anstieg aufgrund der Proliferation von Fibroblasten. Wird der Osteoblast zum Osteozyt, nimmt sein AP-Gehalt stark ab. Die Funktion der alkalischen Phosphatase in vivo ist noch nicht vollständig geklärt.

1.23 Osteocalcin (OC)

Osteocalcin (OC) ist ein aus 49 Aminosäuren bestehendes Protein, das auch „bone gamma carboxylglutamic acid-containing protein (BGP)“ genannt wird (Lian et al., 1978). Es kommt im menschlichen Körper ausschließlich in Knochen und Dentin vor. Es ist für diese Gewebe typisch und kann als spezifischer Marker für Osteoblasten- und Odontoblastentätigkeit verwendet werden (Johansen et al., 1992). Mit einem Anteil von etwa 3 % ist Osteocalcin das in höchster Konzentration vorkommende Nichtkollagenprotein des Knochens. Es wird entsprechend seiner vermuteten Funktion im Rahmen von Knochenaufbau und –differenzierung von den Osteoblasten produziert (Ducy et al., 1996; Price et al., 1976a; Price et al., 1976b; Wolf, 1996). Es ist ein Vitamin-K-abhängiges Vitamin, dessen Synthese durch 1,25-Dihydroxy-Vitamin D reguliert wird (Price, 1989). Gleichzeitig wird seine Konzentration direkt von Calcium regulierenden Hormonen gesteuert (Calcitonin, Parathormon, Vitamin D). Die genaue Funktion des Osteocalcins ist weitgehend ungeklärt.

1.24 Propidiumiodid (PI)

Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der an DNA und RNA bindet. Es wird für tote humane Zellen verwendet, weil es zu groß ist, um intakte Zellmembranen zu permeieren. Nach Fixation der Zellen kann es durch prozessbedingte Poren in der Zellmembran in die Zellen eindringen. Durch Markierung mit PI und anschließender Messung kann der DNA-Gehalt von Zellen zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus verdeutlicht werden (siehe Abb. 7 und 8). Zellen in der G₂- und in der M-Phase des Zellzyklus haben einen doppelt so hohen DNA-Gehalt wie Zellen, die sich in G₀- oder G₁-Phase befinden. Der DNA-Gehalt von Zellen in der S-Phase liegt zwischen diesen beiden Extremen. PI wird im Bereich des orangenen Spektrums zwischen 562 nm und 588 nm detektiert.

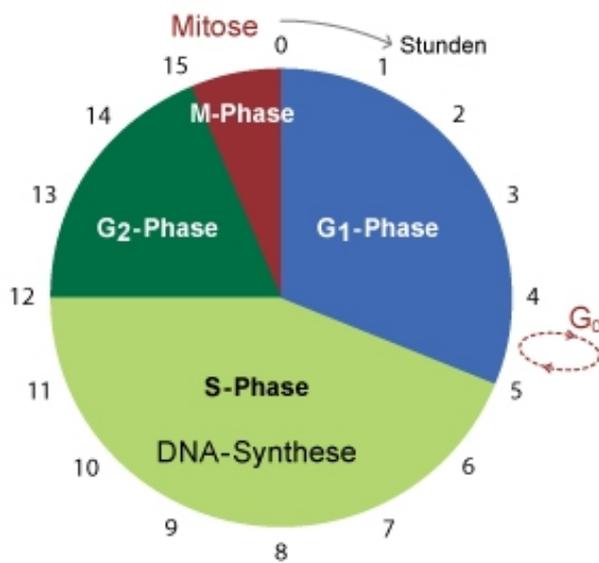


Abb.7 zeigt den Zeitablauf des Zellzyklus in Stunden. In der G₁-Phase wächst die frisch geteilte Zelle innerhalb der nächsten 4-5 Stunden wieder und synthetisiert Zytoplasma und Zellorganellen neu. Wenn die Zelle nicht in eine G₀-Phase (Ruhephase) eintritt, wird während der S-Phase mit der DNA-Synthese mit fast 7 Stunden am meisten Zeit beansprucht. Die G₂-Phase kennzeichnet sich durch Wasseraufnahme und Lösen von Zell-Zellkontakten, bei Zellen eines Gewebeverbandes, und dem Auflösen des Endoplasmatischen Retikulums aus. Dies dauert etwa 3 Stunden. Die kürzeste Phase des Zellzyklus ist mit nur 1 Stunde die Mitosephase.

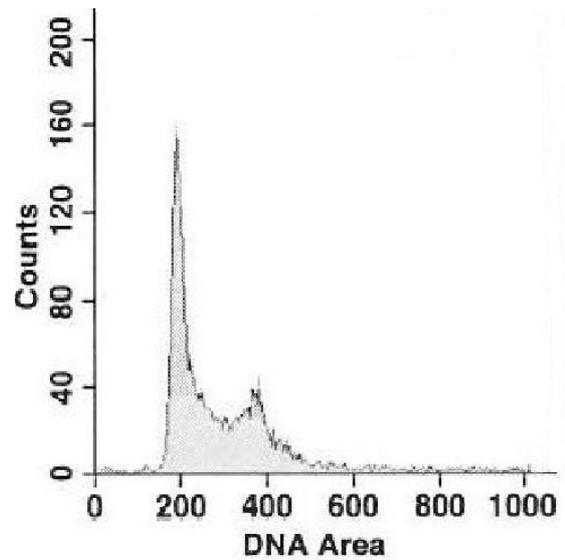


Abb.8 zeigt ein Histogramm einer Flow-Cytometrischen Untersuchung der DNA von T-Zellen mittels PI (nach BD Biosciences). Auf der Ordinate ist die Anzahl PI-positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Fläche der PI-Fluoreszenz (DNA-Area) aufgetragen. Ein hoher Wert entspricht einer hohen DNA-Menge. Die Kurve entspricht dem typischen Fluoreszenzverteilungsmuster einer DNA-Analyse mit PI. Es findet sich ein schmaler und hoher Peak, der für G₀- und G₁- Zellen steht, die mit geringer Zellgröße nur geringe Werte erreichen. Der flache und niedrige Peak steht für G₂-Zellen, die, da sie kurz vor der Mitose stehen, die doppelte Menge an DNA besitzen. Das flache Tal zwischen beiden Peaks repräsentiert die S-Phase-Zellen, die dabei sind, ihren DNA-Gehalt zu verdoppeln.

1.25 Enzyme-Linked-Fluorescence-97 (ELF-97)

ELF-97 stellt ein Substrat für Alkalische Phosphatase dar und formt nach Reaktion mit AP Alkohol-Präzipitate, die als gelb-grüne Fluoreszenz mit einem Optimum im Bereich von 530 nm erscheinen.

1.26 Allophycocyanin

Allophycocyanin (APC) ist Bestandteil eines photochemischen Pigments aus blaugrünen Algen. Es handelt sich um ein großes Protein (Molekulargewicht: 80 KD). Seine Größe bedingt, dass meist nur ein APC-Molekül an einen Antikörper bindet. Es wurde für die Fluorescence-activated- cell sorter- Analyse (FACS-Analyse) entwickelt und gilt als eine der hellsten Fluoreszenzproben, die bisher in der Fluoreszenzassozierten Cytometrie zur Anwendung kamen. Die Anregung kann durch einen Diodenlaser (595 nm - 605 nm) oder einen Helium-Neon-Laser (633 nm) erfolgen. APC emittiert nach Anregung Licht mit einer Wellenlänge von ungefähr 660 nm – 680 nm und liegt damit in einer Region des Spektrums mit einer sehr niedrigen zellulären Autofluoreszenz.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Verwendetes Gewebe

Die für die Primärkulturen verwendeten humanen osteoblastären Zellen entstammten der Kompakta der Lamina perpendicularis und des Vomers. Das Material wurde bei Knochenresektionen im Rahmen plastischer Septumoperationen an der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Universität Bonn gewonnen und üblicherweise entsorgt.

Die Verwendung dieses Materials zu Forschungszwecken erfolgte unter Einwilligung der Patienten und mit Genehmigung der Ethikkommission der Universität Leipzig (Reg. Nr. 593). Die Ethikkommission der Universität Bonn schloss sich diesem Votum an.

Nach der Entnahme wurde das Gewebe in eine 0,9 %ige (isotone) NaCl-Lösung gegeben und bis zur Weiterverarbeitung maximal 6 Stunden im Kühlschrank bei Temperaturen zwischen +2° und +8° Celsius aufbewahrt. Für die Versuche wurde Gewebe von 25 Patienten verwendet.

2.1.2 Nährmedium

Die Basissubstanz zur Mischung des Nährmediums bestand aus Dulbecco's Minimal Essential Medium (MEM) (Fa. Biaochem AG, Berlin, DE) mit 3,7 g/l NaHCO₃ ohne D-Glucose und ohne L-Glutamin mit einem pH-Wert von 7,4. Es wurde mit 10 % Fetal Bovinem Serum (FBS) (Fa. Biaochem AG, Berlin, DE), 1 % Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure- (HEPES-) Puffer (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE) und 1 % einer Kombination aus 10.000 IE Penicillin und 10.000 µg/ml Streptomycin versetzt. Der pH-Wert des Kulturmediums sollte 7,2 - 7,4 betragen. Als Indikator für Veränderungen des pH-Wertes der Kultur enthielt das Basismedium Phenolrot, das sich bei Zunahme saurer Stoffwechselprodukte gelb und bei Zunahme basischer Anteile violett färbte. Dies ermöglichte eine visuelle Abschätzung der Stoffwechsellage in den Kulturen und gab unabhängig vom regulären Wechsel Aufschluss über die Notwendigkeit eines Mediumwechsels.

2.1.3 Herstellung der Primärkulturen

Unter einer Reinraumbank (Hera Safe HS12, Fa. Heraeus, Hanau, DE) wurden unter sterilen Bedingungen mit Hilfe eines Skalpell Schleimhaut, größere Blutgefäße, Knochen und Knorpel voneinander getrennt. Der Knochen wurde mit einer Knochenzange in etwa 3x3 mm große Knochenplättchen zerteilt. Etwa 4-5 der Knochenfragmente wurden mit einer Pinzette in eine ebenfalls sterile Kulturflasche aus Polystyrol (Fa. Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, DE) mit einer Bewuchsfläche von 75 cm² eingebracht. Nach dem Auffüllen der Flasche mit 40ml Medium (Dulbecco's MEM) wurde die Flasche flüssigkeitsfest verschlossen, so nur Gase den Verschluss passieren konnten. Die Kulturflaschen wurden in einen Begasungsbrutschrank (Heraeus Cytoperm 2, Fa. Heraeus, Hanau, DE) gestellt. In diesem Brutschrank herrschten kontrollierte und konstante Bedingungen bei 37,0°C, 5,0 % CO₂, 21 % O₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 80 % zur Optimierung von Wachstums- und Vermehrungsprozessen. Die Zellen wurden 3 Wochen ohne Mediumwechsel inkubiert und einmal wöchentlich mikroskopisch unter einem Inversionsmikroskop (Typ IX50, Fa. Olympus, Hamburg, DE) auf ihre Vitalität und eventuellen Pilzbefall hin kontrolliert. Eine grobe Orientierungsmöglichkeit war die optische Kontrolle des Mediums, da sich die Änderung des pH-Wertes durch einen Farbumschlag von rot nach gelb (sauer) und von rot nach violett (alkalisch) zeigte. Nach drei Wochen erfolgte der erste Mediumwechsel. Dabei wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ersetzt. Danach wurde das Medium nach jeweils 5 Tagen zur Hälfte ausgewechselt. Insgesamt wurden 67 Primärkulturen angelegt. Der Versuch der Direktkultivierung auf Chamber slides misslang. Daher wurde die Kultivierung in Plastikgefäßen als Zwischenstufe durchgeführt.

2.1.4 Herstellung der Sekundär- und Objektträgerkulturen

Um später möglichst viele Objektträger-Kulturen untersuchen zu können, wurden nach 60 Tagen in der Mutterkultur Subkulturen angelegt. Das Medium wurde abpipettiert und die Kulturflaschen zweimalig mit Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS) gespült. Dann wurden 10 ml Trypsin (0,25 %ig) (Fa. Biochrom AG, Berlin, DE) zur enzymatischen Ablösung zugegeben und die Kultur 6 Minuten im Brutschrank unter Kulturbedingungen inkubiert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte schließlich durch die Zugabe von 20 ml FBS-haltigem Medium. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle

wurden die restlichen noch adhärennten Zellen mit einem Zellschaber (Fa. TPP, Trasadingen, CH) vom Boden des Kulturgefäßes entfernt. Die nun im Medium suspendierten Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 800 U/Minute zentrifugiert (Kendro Megafuge 1.0R, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, DE). Der weitgehend zellfreie Überstand wurde aus dem Zentrifugenröhrchen abpipettiert und durch 40 ml frisches Medium ersetzt. Das durch die Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde im Röhrchen resuspendiert. Dieser Vorgang wurde anschließend einmal wiederholt.

Es erfolgte eine gleichmäßige Verteilung der Zellsuspension auf 4 neue, mit 40 ml FBS-haltigem Medium gefüllte Kulturgefäße als Subkulturen. Eine lichtmikroskopische Kontrolle garantierte, dass sich ausreichend Zellen in jedem Gefäß befanden. Die Hälfte des Mediums (20 ml) der Subkulturen wurde nach jeweils 5 Tagen gewechselt. Ähnlich wie bei den Primärkulturen erfolgte eine mikroskopische Vitalitätskontrolle und der Ausschluss einer mikrobiellen Besiedelung einmal pro Woche.

Um die Zellen mit dem Laser Scanning Cytometer untersuchen zu können, waren Objektträgerkulturen erforderlich. Die Herstellung dieser Kulturen erfolgte nach ähnlichem Prinzip wie bei der oben erwähnten Subkultivierung nach durchschnittlich 13 Tagen Kultivierung. Es kamen pro Subkultur 5 spezielle Objektträger, sogenannte Chamber slides (Fa. Nunc, Wiesbaden, DE) (siehe Abb. 9a und 9b auf S. 36) zur Anwendung. Diese Objektträger verfügen über zwei Felder mit aufgeklebter 5 mm hoher Plastikumrahmung und Deckel, so dass sich ein rechteckiges zweigeteiltes Gefäß ergibt, das nach Entfernung der Kunststoffwände in einen Objektträger umgewandelt werden kann. Jede Kammer wurde mit insgesamt 2 ml Medium aufgefüllt.

Nach Besiedelung der Objektträger erfolgte der erste Mediumwechsel von 1 ml Medium nach 2 Tagen und die endgültige Fixierung nach 4 bis 5 Tagen. Die gezüchteten Zellen wurden auf Morphologie, Vitalität und Anordnung unter dem Inversionsmikroskop untersucht. Schließlich wurden die Zellen nach Entfernung der Plastikumrandung in 70 %iger Ethanollösung für 15 Minuten fixiert, 10 Minuten in einem Tauchbad mit PBS gespült und luftgetrocknet. Sie wurden in einem Objektträgermagazin bei Raumtemperatur bis zur Präparation für die Untersuchung unter dem LSC gelagert.

Da in einigen Primär- und Sekundärkulturen nach einer Woche kein Wachstum nachweisbar war, wurden diese verworfen. In einigen wenigen Fällen war die Erstellung der Chamber Slide Kulturen nicht erfolgreich. So entstanden aus den 67 Primärkulturen

ungefähr 200 Sekundärkulturen, aus denen schließlich 100 Chamber Slide Kulturen gezüchtet werden konnten. Die Gesamtkultivierungszeit lag bei durchschnittlich 75-80 Tagen, davon 60 Tage in der Primärkultur, 10-15 Tage in der Subkultur und etwa 5 Tage als Chamber slide-Kulturen.

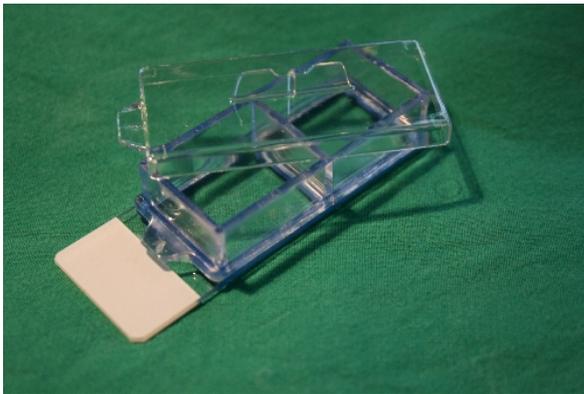


Abb.9a zeigt einen Chamber slide mit Kulturaufsatz und Deckel. Es handelt sich um einen Glasobjektträger, auf den zwei separate Kunststoffkammern geklebt sind. Diese Kammern können nach befüllen mit einem Deckel verschlossen werden. Nach Entfernung des Kulturaufsatzes bleibt ein einfacher Objektträger zurück.

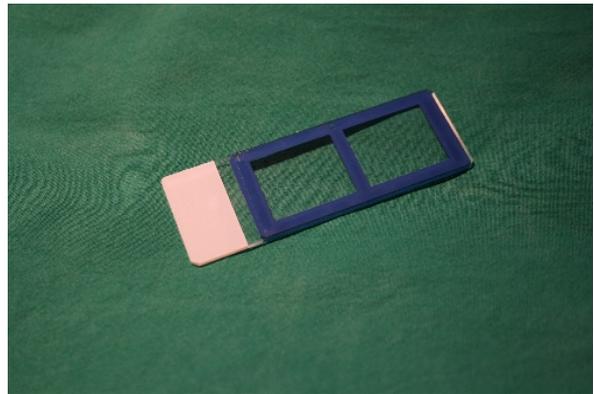


Abb.9b zeigt einen Chamber slide nach Entfernung des Kulturaufsatzes. Dieser kann nun wie ein Standard-Laborobjektträger zum einfärben oder inkubieren verwendet werden und schließlich zur Untersuchung unter ein Mikroskop gelegt werden.

2.2 Laser Scanning Cytometrie

2.2.1 Herstellung der messfertigen Kulturen

Das Aufbringen der Fluoreszenzfarbstoffe und Antikörper erfolgte nach dem „Prinzip des hängenden Tropfens“. Dabei wurden 20 µl der jeweils vorgesehenen Fluorochrome beziehungsweise Antikörper (PI, ELF-97, OC-AK und APC-AK) auf ein Deckglas pipettiert und dieses um 180° in der Vertikalebene gedreht, so dass die Flüssigkeit nun vom Deckglas herab hing. Das so präparierte Deckglas wurde auf den Objektträger gelegt. Die Objektträger wurden nach Zugabe des entsprechenden Reagenz in einer „feuchten Kammer“ inkubiert.

Für die Inkubation mit mehreren Fluorochromen wurde der Objektträger zwischen den Arbeitsschritten in ein mit PBS gefülltes Wasserbad getaucht, um das Deckglas ohne Abrieb und damit verbundenem Zellverlust sowie nicht assoziierte Fluorochrompartikel vom Objektträger zu entfernen. Die Inkubation fand bei Raumtemperatur statt. Nach dem letzten Inkubationsschritt wurde das Deckglas mit einem schnell härtendem Kunststoff (FixoGum, Fa. Marabu GmbH&Co KG, Tamm, DE) fixiert.

2.2.2 Messungen am LSC

Alle Substanzen (PI, ELF-97, OC-AK, APC-AK) wurden zur Feststellung ihrer Eignung und zur Gewinnung weiterer Erkenntnisse über Kinetik und Inkubationsoptimum einzeln gemessen. Später erfolgte die Kombination zweier und schließlich aller drei Substanzen entsprechend ihrer optimalen Konzentrationen und Inkubationszeiten. Bei der Einzelzelltriggerung wurden die Zellen zunächst mikroskopisch untersucht und die Fluoreszenz mit einer Quecksilberdampfampe angeregt. Dieser Schritt war für die Einstellung der Fokusebene notwendig. Insgesamt wurden einschließlich der Vorversuche zur Ermittlung der Konzentrationen und Inkubationszeiten 62 Chamber Slide Felder (=31 Chamber Slides mit je 2 Feldern) gemessen.

2.2.3 Propidiumiodid

Um die DNA in den Zellkernen zu färben, wurden 20 µl PI (Fa. BD Bioscience, Heidelberg, DE) pro Feld verwendet. Der Hersteller liefert PI in einer Phosphat-gepufferten Lösung, die einen pH-Wert von 7,2 hatte und 0,09 % Natriumchlorid enthielt. Die Ausgangskonzentration des PI betrug 10 µg/ml. Es wurde mit PBS versetzt, so dass folgende Verdünnungen zum Einsatz kamen: 5 µg/ml, 7 µg/ml, 8 µg/ml, 8,5 µg/ml, 9,5 µg/ml, 10 µg/ml. Die Messung erfolgte nach 15, 30, 60 und 120 Minuten sowie nach 24 Stunden. Es wurden der Argon-Ion-Laser (Emission bei 488 nm) und ein 580DF30-Filter (565 nm-595 nm) verwendet.

2.2.4 ELF-97

Zum Nachweis alkalischer Phosphatase wurde das ELF-97 Endogenous Phosphatase Kit (Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE) eingesetzt. Die Herstellung eines messfertigen Präparates erforderte entsprechend den Herstellerempfehlungen zwei Schritte. Zunächst erfolgte die Inkubation mit ELF-97, danach die Unterbrechung

der Reaktion und Fixierung der Fluoreszenz: Zur Herstellung der ELF-97-Suspension wurden 1 µl der Komponente A (ELF-97 phosphate substrate) in unterschiedlichen Mengen (19 µl, 29 µl und 39 µl) der Komponente B (Detection buffer) gelöst. Das Zwei-Komponentengemisch wurde dann durch einen vom Hersteller mitgelieferten Mikrofilter bei 800 U/Min für 2 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge: EBA86, Fa. Hettich, Tuttlingen, DE). So wurden Suspensionen mit Verdünnungen von 1:20, 1:30 und 1:40 hergestellt. Auf jedes der beiden Messfelder wurden 20 µl der ELF-97-Suspensionen in unterschiedlicher Konzentration aufgebracht. Nach abgeschlossener Inkubation wurde der Objektträger für 10 Minuten in ein PBS-Bad getaucht, danach 20 µl der Komponente C (Mounting Medium) aufgebracht und schließlich das Deckglas mit schnellhärtendem Kunststoff fixiert. Zur Anregung der Fluoreszenzen wurde der UV-Laser (405 nm) und für den Emissionsempfang ein 530DF30-Filter (515 nm-545 nm) verwendet. Die Proben wurden direkt nach Aufbringen auf den Objektträger und danach in 20 minütigen Abständen bis zu 180 Minuten gemessen.

2.2.5 Osteocalcin-AK und Allophycocyanin-assoziiertes AK

Zum Nachweis von Osteocalcin wurde eine Kombination aus einem primären Anti-Osteocalcinantikörper und einem sekundären fluoreszenzassoziierten Antikörper eingesetzt. Bei dem primären Antikörper handelte es sich um einen monoklonalen Maus-Anti-human-Osteocalcin-Antikörper der Klasse IgG₁ (Fa. R&D Systems GmbH, Wiesbaden Nordenstadt, DE). Zur Visualisierung des nicht fluoreszierenden Primärantikörpers wurde ein Ratte-Anti-Maus-IgG₁-AK verwendet, der Allophycocyanin (APC)- assoziiert war (Fa. Caltag, Invitrogen Corp., Calsbad, Kalifornien, USA).

Sowohl der OC-AK, als auch der APC-AK wurden im Verhältnis 1:50, 1:100 und 1:200 in PI (Konzentration: 10 µg/ml) gelöst.

Ein Objektträger wurde für 60 Minuten in eine Mischung aus PBS und 1 % BSA (Bovines Serum Albumin) getaucht. Anschließend wurde die Probe 30 Minuten in einer Lösung aus PBS und 0,1 % BSA belassen.

Nach der Inkubation mit 20 µl des 1:50, 1:100 oder 1:200 verdünnten Osteocalcin-Antikörpers pro Feld für 24 Stunden schloss sich eine 10-minütige Verweilphase im PBS-Bad an. Dann wurde das Präparat mit 20 µl des 1:50, 1:100 oder 1:200 verdünnten APC-Antikörpers pro Feld für 1 Stunde inkubiert. Jede der drei OC-Verdünnungen wurde mit den drei APC-Verdünnungen kombiniert, so dass 9

Kombinationen untersucht werden konnten. Bei der Analyse wurden zellgetriggert Fluoreszenzstärke und Verteilung von APC auf dem Objektträger gemessen. Zur Anregung des APC wurde der Helium-Neon-Laser (633 nm) und für dem Emissionsempfang wurde ein 650EFLP-Filter (>650 nm) verwendet.

2.2.6 Negativ-Positiv-Abgleich

Osteocalcin-AK und APC-AK wurden im Verhältnis 1:50, 1:100 und 1:200 in PI (Konzentration: 10 µg/ml) gelöst. Ein Objektträger wurde eine Stunde mit 20 µl des APC-Antikörpers pro Feld inkubiert, ohne dass eine Exposition mit dem primären Osteocalcin-Antikörper stattfand. Dann wurde die erste Messung, also die Negativmessung, durchgeführt. Nach der Negativmessung wurde die Probe für 30 Minuten in einem PBS-Bad belassen. Anschließend wurde zunächst mit 20 µl des primären Anti-Osteocalcin-AK, dann mit 20 µl des sekundären APC-AK pro Feld inkubiert und schließlich die Positivmessung durchgeführt.

2.2.7 Doppelfärbung mit PI und ELF-97

Zur Vorbereitung wurden zu 10 µl des Eindeckmediums des ELF-97-Kits (Komponente C) 10 µl PI (Konzentration: 10 µg/ml) hinzugefügt. ELF-97 wurde 1:20 verdünnt. Beide Felder eines Objektträgers wurden mit jeweils 20 µl PI für 30 Minuten inkubiert. Es folgten 10 Minuten Verweildauer in einem PBS-Bad. Danach wurde der Träger mit 20 µl des 1:20 verdünnten ELF-97-Gemisches für 3 Stunden inkubiert. Dem erneuten Eintauchen des Objektträgers im PBS-Bad für 10 Minuten folgte die Zugabe von 20 µl des mit PI versetzten Eindeckmediums. Schließlich wurde das Deckglas mit schnell härtendem Klebstoff fixiert und der Objektträger in 20-minütigen Abständen mit dem LSC analysiert.

2.2.8 Dreifachfärbung PI, ELF-97 und OC-APC

Zur Vorbereitung wurden der OC-AK (1:100) und der APC-AK (1:100) mit PI (10 µg/ml) und das Eindeckmedium im Verhältnis 1:1 mit PI verdünnt. ELF-97 wurde im Verdünnungsverhältnis 1:20 eingesetzt.

Ein Objektträger wurde für 60 Minuten in eine Mischung aus PBS und 1 % BSA getaucht. Anschließend wurde die Probe 30 Minuten in einer Lösung aus PBS und 0,1 % BSA belassen. Jedes Messfeld wurde mit 20 µl der Suspension aus OC-AK und

PI für 24 Stunden inkubiert. Darauf folgte eine 10-minütige Tauchphase im PBS-Bad. Es schloss sich eine 1-stündige Inkubation mit 20 µl des APC-Antikörpers an. Der Objektträger wurde erneut für 10 Minuten ins PBS-Bad getaucht. Dann folgten eine 3-stündige Inkubation mit ELF-97 und die letzte PBS-Tauchphase, bevor schließlich 20 µl mit PI versetztes Eindeckmedium pro Feld zugegeben wurden. Zum Schluss wurde das Deckglas mit Flüssigkleber fixiert. Bei der Analyse der Felder mit dem LSC wurden die drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe PI, ELF-97 und APC sowohl mit der Einzelzellerfassung als auch mit der Phantomerfassung gemessen.

2.2.9 Datenerhebung und -verarbeitung mit dem LSC

Es wurde ein Laser Scanning Cytometer der Firma CompuCyte® (Boston, USA) verwendet, das über drei verschiedene Laser (UV-Laser, Argon-Laser, Helium-Neon-Laser) mit unterschiedlichen Emissionsspektren ($\lambda = 405 \text{ nm} / 488 \text{ nm} / 633 \text{ nm}$) verfügte. Die emittierten Fluoreszenzen wurden mit den jeweils aktiven Photomultipliern (PMT) gemessen. Dabei kamen folgende Fluorochrome zum Einsatz (angegeben ist zusätzlich der verwendete Laser und der Messkanal): PI (Argon, PMT#3, orange), ELF-97 (blue-UV, PMT#1, blau), OC-APC (Helium-Neon, PMT#4, rot). Die übrigen drei Messkanäle der Laser (Argon: PMT#1, PMT#2, PMT#4; Helium-Neon: PMT#1, PMT#2, PMT#3; blue-UV: PMT#2, PMT#3, PMT#4) wurden nicht aktiviert. Die dynamische Hintergrundkalkulation war für alle Parameter aktiviert. Die Laserstärken wurden wie folgt festgesetzt: Argon: 20 mW, Helium-Neon: 5 mW, Ultraviolett: 5 mW. Die Größe der gemessenen Fläche wurde zu Beginn der Versuche festgelegt und blieb bei allen Messungen konstant. Gelegentlich musste die Lage des zu messenden Feldes an den Objektträger angepasst werden, ohne die Größe des Feldes zu verändern. Eine Messung dauerte zwischen 20 und 25 Minuten. Als Trigger für die Einzelzellen wurde das PI-Signal (DNA der Zellkerne) als Schwellenkontur (Threshold) um den Zellkern herum festgelegt. Die verwendete Thresholdkonfiguration, d.h. der Schwellenwert, ab dem die WinCyte-Software die positiven Ereignisse als Zellkerne erkannte, lag bei 1200. Diese Konfiguration wurde in Vorversuchen als Optimum ermittelt und als Standardwert festgelegt. Um das Zytoplasma und die übrigen relevanten Zellbestandteile zu messen, wurde die Analysekontur auf eine Distanz von 2 Pixeln von der Triggerkontur eingestellt. Die minimale Fläche, die als Zelle erkannt werden sollte, betrug $10 \mu\text{m}^2$. Die innere Hintergrundkontur lag 4 Pixel und die Äußere 6 Pixel von der Triggerkontur entfernt. Mit

der Einzelzelltriggerung wurden die PI- und APC-Fluoreszenzen erfasst. Zur Erfassung der ELF-97-Fluoreszenz wurden Phantome eingesetzt. Dazu war kein Fluoreszenzsignal mit bestimmter Stärke zur Erreichung eines Schwellenwertes notwendig. Die Projektion der Phantome erfolgte entsprechend den Spezifikationen des Anwenders: Der Radius der Phantome betrug 5 μm . Die Zentren der Phantome waren 25 μm voneinander entfernt. Vor Beginn jeder Messung wurde die Fluoreszenz optisch mittels Mikroskop nach Anregung durch eine Quecksilberdampfampe überprüft. Während dessen erfolgte die manuelle Einstellung der Fokusebene. Anschließend wurde die korrekte Lage der Scan-Area, die Einstellung des Thresholds und der Konturparameter kontrolliert. Die Einstellungen der Photomultiplier wurden zu Beginn der Versuche auf die Proben abgestimmt und konnten über den gesamten Zeitraum der Messungen beibehalten werden: voltage, offset und gain wurden wie folgt eingestellt: Für rot nach Anregung durch den Argon-Laser auf 30 %, 2073 und 255, für grün nach Anregung durch den UV-Laser auf 30 %, 2048 und 255 und für long-red nach Anregung durch den Helium-Neon-Laser auf 55 %, 2073 und 255. Mit Hilfe der computergestützten Kolorierungsfunktion der WinCyte Software ließen sich die gemessenen Fluoreszenzen visualisieren (siehe Abbildung 13b, Seite 45 oder Abbildung 23, Seite 62). Die Grundlage für die Interpretation der gemessenen Daten waren die von der WinCyte-Software erstellten Histogramme und Punkt-Wolken-Diagramme. Darin wurden jeweils zwei gemessene Parameter, deren Häufigkeit und Verteilung dargestellt. Von diesen Basisdaten ausgehend konnten weitere Diagramme und Histogramme zur Datenanalyse erstellt werden. Das X-/Y-Punktdiagramm, das zuerst bei jeder Messung generiert wurde, ist in seiner Darstellung geographischen Höhenlinienkarten vergleichbar. Jedem Punkt auf der "Karte" entspricht eine für die entsprechende Fluoreszenz positive Zelle. So konnten zweidimensionale Karten zur Darstellung der PI-, ELF-97- und OC-APC-Verteilung erstellt werden. Die Intensität der Fluoreszenzen wurde im Histogramm durch das Auftragen der positiven Ereignisse gegen das Integral der entsprechenden Fluoreszenz dargestellt. Für beide Messungstypen (Einzelzellgetriggert, Phantome) wurde zur Auswertung eine einheitliche Skalierung des zugehörigen Integrals verwendet. Es wurden fünf Regionen ausgehend von den hellen Fluoreszenzbereichen in aufsteigender Nummerierung zur niedrigsten Fluoreszenz gewählt, wie in Abb. 17a auf Seite 52 zu sehen ist. Die Einteilung der Skala erfolgte willkürlich. Diesen Regionen wurden die folgenden Perzentilen hinsichtlich der relativen

Fluoreszenzintensität zugeordnet: Region 1: 85-100 %, Region 2: 70-85 %, Region 3: 50-70 %, Region 4: 25-50 %, Region 5: 0-25 %. Bei den Zellgetriggerten Daten wurde für die weitere Analyse der Fokus auf die G_0 - und G_1 -Zellen gelegt (Abb. 14d, Seite 46). Die Fokussierung erfolgte durch Abgrenzung bestimmter Objektträgerareale, Integralabschnitte oder Zellpopulationen. Dazu wurde mit Hilfe der Software ein „Gate“ im entsprechenden X-Y-Punktdiagramm oder Integralabschnitt eingerichtet (siehe Abb. 10). Eine mikroskopische Einzelanalyse separierter Ereignisse war dadurch möglich (siehe Abb. 11).

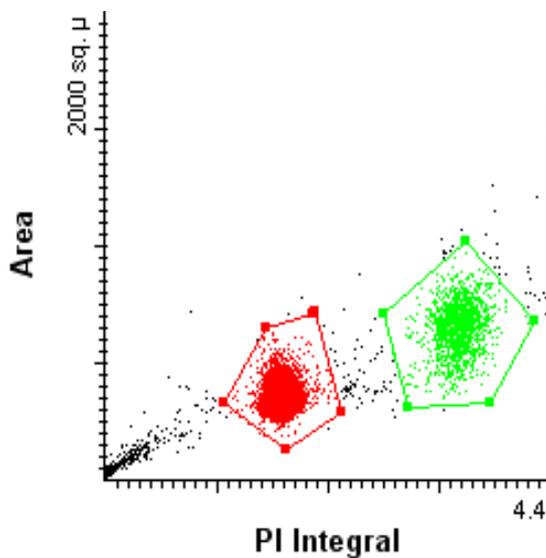


Abb.10 zeigt ein Punktwolkendiagramm einer LSC-Messung. Auf der Ordinate ist die Objektgröße (Area) gegen die Fluoreszenzintensität (PI-Integral) aufgetragen. Auffällig sind zwei Zellpopulationen: G_0 - und G_1 -Zellen entsprechen der roten Punktwolke und G_2 -Zellen der grüne Punktwolke. Zur isolierten Darstellung dieser Populationen ist die Abgrenzung mittels eines „Gates“ möglich, dargestellt als rotes und grünes Polygon.

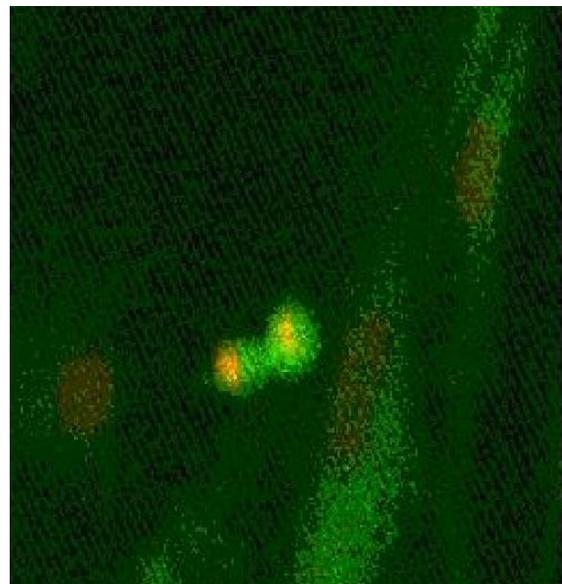


Abb.11 Telophase-Zellkernpaar (Bildmitte), wie es durch Verwendung eines Gates und erneute Untersuchung mikroskopisch dargestellt werden kann. Jedes als Zelle erkannte und getriggerte Objekt kann auf diese Weise erneut untersucht werden.

3. Ergebnisse

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kulturverlauf

Nach einer mittleren Kultivierungszeit von 75-80 Tagen (70-75 Tage in einer Plastikflasche inklusive einem Subkultivierungsschritt und noch einmal 5 Tage in der Chamberslide-Kultur) hatten sich die in der Zellsuspension zunächst noch abgerundeten Zellen auf dem Boden des jeweiligen Kulturgefäßes niedergelassen. Dort nahmen sie ihre charakteristische, den Fibroblasten ähnliche Form mit dem schlanken spindelförmig-angezogenen Zelleib und großem, deutlich erkennbarem Zellkern an (Abb. 12). Sie konnten lichtmikroskopisch ihrer Morphologie entsprechend charakterisiert werden. Die Anhaftung der Zellen hatte zur Folge, dass bei einem Mediumwechsel die Flüssigkeit durch Absaugen oder Abschütten leicht ausgewechselt werden konnte, ohne dabei Zellen zu verlieren. Die Zelldichte war regional unterschiedlich und abhängig von der Anzahl der lokal eingebrachten Zellen beziehungsweise der Größe des abgesetzten Zellkonglomerates. Zwischen den Zellen war lichtmikroskopisch eine je nach Lokalisation stark ausgeprägte Extrazellulärmatrix erkennbar. Durch sanftes Schütteln des Kulturgefäßes oder durch Zugabe frischen Kulturmediums war der Zellrasen nicht mehr von der Unterlage zu lösen.

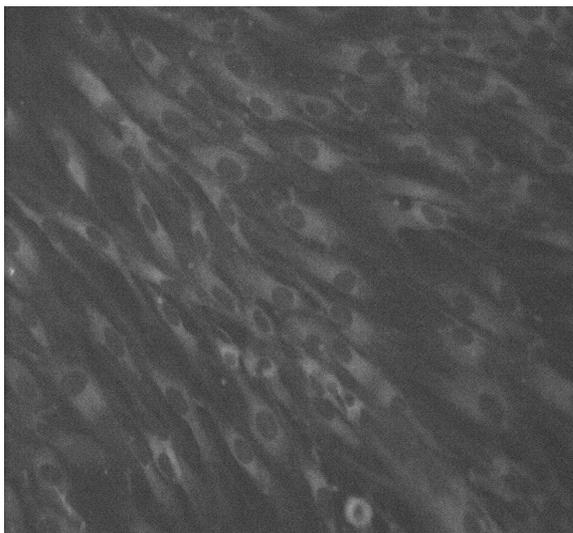


Abb. 12 zeigt eine mikroskopische Aufnahme dicht aneinander gelegener osteoblastärer Zellen auf einem „chamber slide“. Charakteristisch ist der schlanke spindelförmige Zelleib mit ovalen Zellkernen.

3.2 Laser Scanning Cytometrie

3.2.1 Einzelmessungen

3.2.1.1 Propidiumiodid

Bei der mikroskopischen Untersuchung imponierten die mit PI gefärbten DNA-Bestandteile des Zellkerns nach Anregung mit der Quecksilberdampfampe als rote, ovale Strukturen. Das Chromatin war in Form schwarzer Punkte zu erkennen. Aus den Abb. 13a und 13b geht im direkten optischen Vergleich zwischen der niedrigsten (5 µg/ml) und der höchsten (10 µg/ml) verwendeten PI-Konzentration hervor, dass die Zellkerne, die mit 10 µg/ml gefärbt wurden, am besten erkennbar waren.

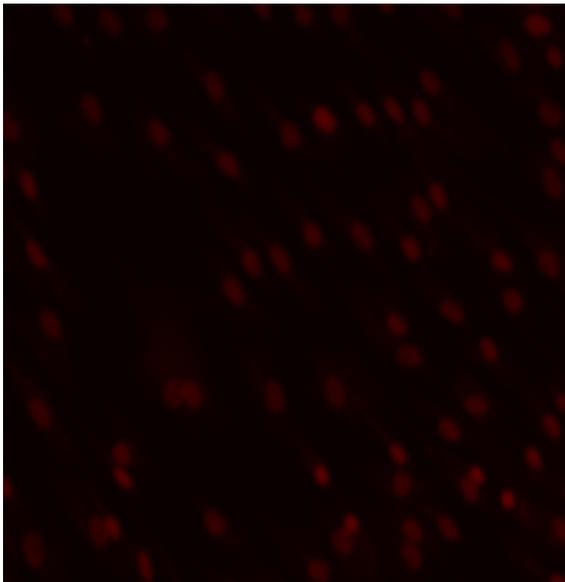


Abb.13a zeigt eine Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellkernen nach Färbung mit **5µg/ml PI**. Die Zellkerne imponieren als rote, ovale Strukturen.

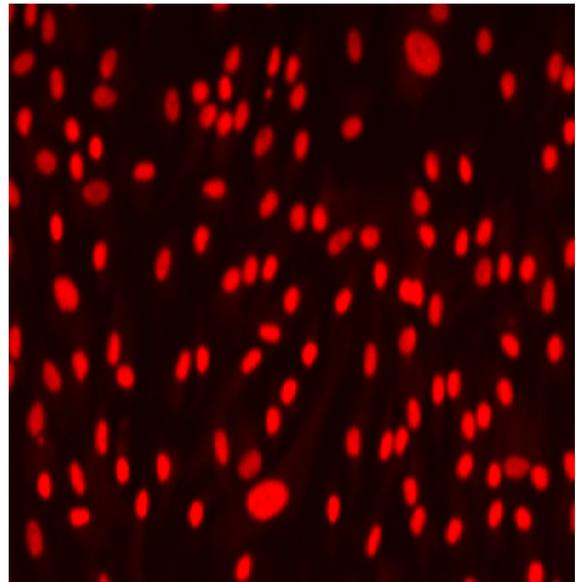


Abb.13b zeigt eine Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellkernen nach Färbung mit **10µg/ml PI**. Bei verdoppelter PI-Konzentration sind die Zellkerne als rote, ovale Strukturen deutlicher erkennbar (vergleiche Abbildung 13a).

In einem Histogramm (Abb. 14a, Seite 45), in dem auf der X-Achse das Integral der Fluoreszenzhelligkeit gegen die Anzahl der als Zellkerne identifizierten Fluoreszenzen (Y-Achse) aufgetragen wurde, lässt sich dieser Sachverhalt noch deutlicher darstellen.

Abgebildet sind die geringste verwendete PI-Konzentration (5 µg/ml, blaues Overlay) und die höchste PI-Konzentration (10 µg/ml, rotes Overlay). Bei ersterem zeigte sich eine Verbreiterung des charakteristischen G_0 - / G_1 -Peaks, der G_2 -Peak war nicht separat zu erkennen, sondern stellte sich als „Schulter“ am G_1 -Peak dar.

Die für PI typische Doppelgipfligkeit fand sich erst bei einer Konzentration von 10 µg/ml (siehe rotes Overlay). Daher wurde diese als Standardkonzentration etabliert.

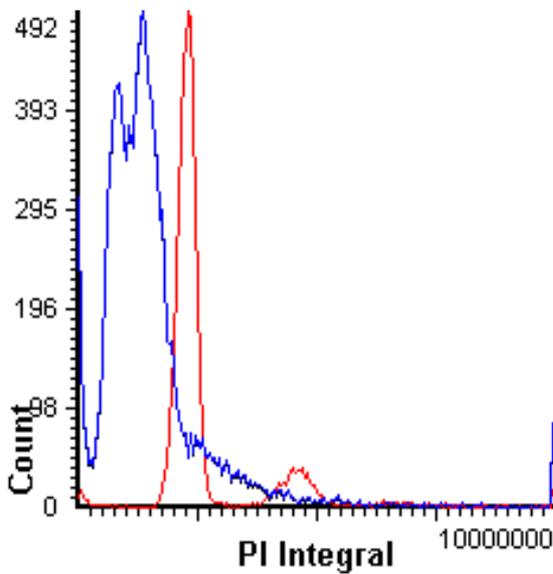


Abb.14a zeigt ein Histogramm zum Vergleich der PI-Konzentration nach der Standardinkubationszeit von 30 Minuten. Auf der Ordinate ist die Anzahl PI-positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz (PI-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert analog zu einer hohen Fluoreszenzstärke ist. Die rote Kurve entspricht dem typischen Fluoreszenzverteilungsmuster einer DNA-Analyse mit PI. Es wurde die Standardkonzentration mit $c=10$ µg/ml verwendet. Es handelt sich um eine Doppelgipfelkurve mit einem hohen und

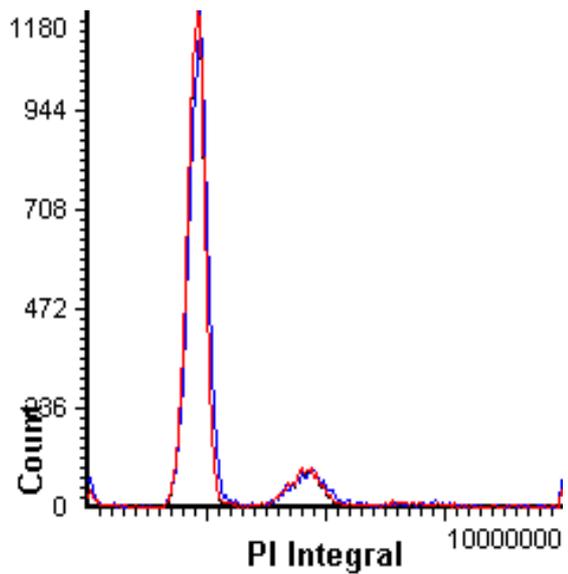


Abb.14b zeigt ein Histogramm zum Vergleich der PI-Inkubationszeiten. Auf der Ordinate ist die Anzahl PI-positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz (PI-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert analog zu einer hohen Fluoreszenzstärke ist. Die rote Kurve entspricht der Standardinkubationszeit mit 30 Minuten, die blaue Kurve dagegen steht für eine Verlängerung der Inkubation auf 120 Minuten. Die Verkürzung der Inkubationszeit veränderte das Ergebnis kaum. Sowohl die rote als auch die blaue Kurve bildeten die typische Fluoreszenzsignatur.

schmalen Peak im niedrigeren Fluoreszenzbereich und einem wesentlich flacheren und breiteren Peak im höheren Fluoreszenzbereich. Der hohe Anteil der Kurve repräsentiert die häufiger vorkommende G_0 - und G_1 -Zellen (bezogen auf den Zellzyklus) und der flache die seltener vorkommenden G_2 -Zellen. Von der typischen roten Kurve ist eine blaue deutlich deformierte Kurve abgrenzbar. Hier wurde mit einer Konzentration von $c=5 \mu\text{g/ml}$ inkubiert. Es ist kein Doppelgipfel erkennbar, eine Differenzierung in G_0 - und G_1 - bzw. G_2 -Zellen war nicht möglich

Die Abbildungen 14b und 14c zeigen die typische Doppelgipfform mit dem hohen Peak der G_0 - und G_1 -Zellen und dem flachen der G_2 -Zellen (bezogen auf den Zellzyklus). In beiden Darstellungen liegen die Kurven fast exakt aufeinander, was darauf hindeutet, dass keine signifikanten Unterschiede im Ergebnis zwischen der Standardinkubationsdauer von 30 Minuten, der minimalen von 15 Minuten und der maximalen Inkubationszeit von 120 Minuten bestanden. Außer der Fluoreszenzintensität wurde die topographische Verteilung gemessen. Zur weiteren Bearbeitung der gewonnenen Daten wurden G_0 - und G_1 -Zellen von G_2 -Zellen durch farbliche Markierung („Gates“, bunte Polygone) voneinander getrennt (Abb. 14d, Abb. 14f). Mit Hilfe der farblichen Unterscheidung war die topographische Verteilung leichter erkennbar. Abbildung 14e zeigt eine von der WinCyte-Software erstellte zweidimensionale Karte. Jeder grüne, rote oder schwarze Punkt steht für ein als Zelle erkanntes Ereignis anhand des eingestellten Triggers für PI.

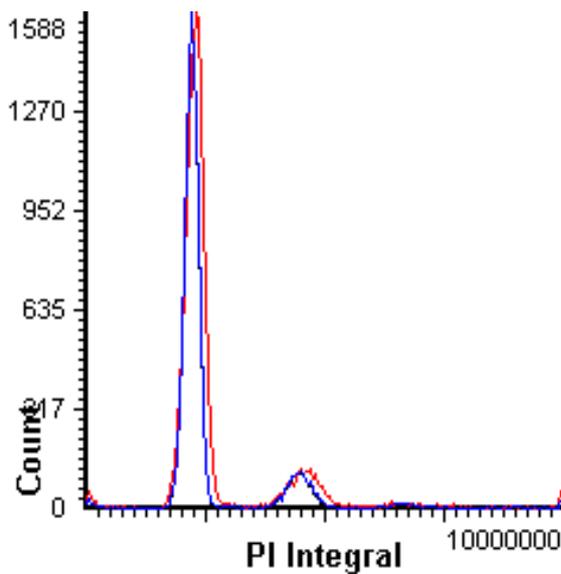


Abb.14c zeigt ein Histogramm zum Vergleich der PI-Inkubationszeiten. Auf der Ordinate ist die Anzahl PI-positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz (PI-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert analog zu einer hohen Fluoreszenzstärke ist. Die rote Kurve entspricht der Standardinkubationszeit mit 30 Minuten, die blaue Kurve dagegen steht für eine Verlängerung der Inkubation auf 120 Minuten. Die Verlängerung der Inkubationszeit veränderte das Ergebnis kaum. Sowohl die rote als auch die blaue Kurve bildeten die typische Fluoreszenzsignatur.

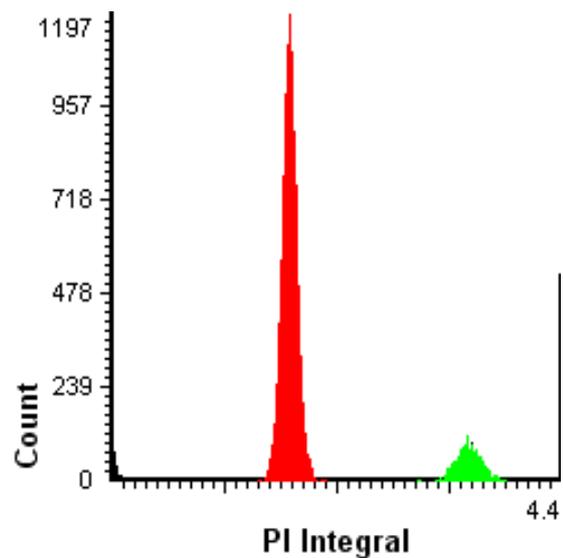


Abb.14d zeigt ein Histogramm mit Unterscheidung der Fluoreszenzen entsprechend ihrer Intensität. Diese Darstellung wird durch Separierung der Zellpopulationen im Punktwolkendiagramm möglich (siehe Abbildung 14f). Auf der Ordinate ist die Anzahl PI-positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz (PI-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert analog zu einer hohen Fluoreszenzstärke ist. Der rote hohe Peak entspricht den diploiden G_0 - und G_1 -Zellen mit einfachem DNA-Gehalt, die grüne flache Kurve steht für die selteneren tetraploiden G_2 -Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt. Insgesamt bilden beide Peaks die typische Fluoreszenzsignatur einer DNA-Analyse mit PI.

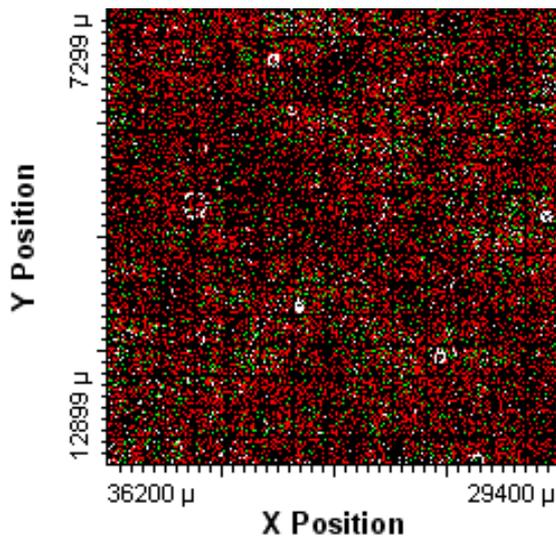


Abb.14e 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung. Topographische Verteilung diploider Zellen (rot), tetraploider Zellen (grün) und anderer, nicht identifizierter Zellen (schwarz) auf dem Objektträger. Das dichte Fluoreszenzmuster belegte eine dichte Besiedelung des Objektträgers. Ein Histogramm mit der Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzen (=Zellen) findet sich in Abbildung 14d. Aus dieser topographischen Karte lässt sich auch eine Auftrennung der Zellen nach Größe erstellen (Siehe Abbildung 14f).

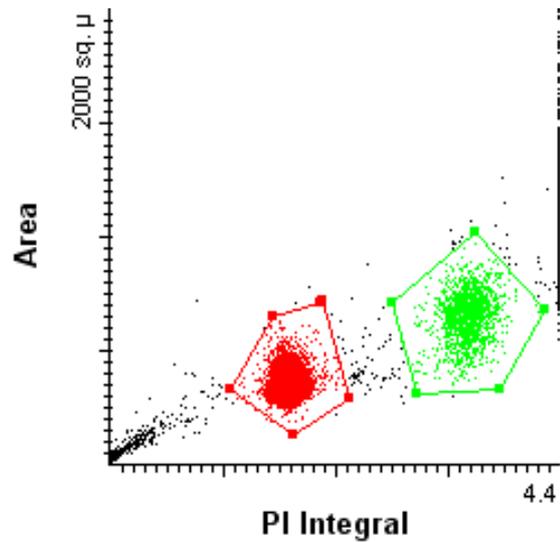


Abb.14f zeigt ein Punktwolkendiagramm zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen PI-Fluoreszenzstärke und Zellgröße. Auf der Ordinate ist die Größe der PI-Fluoreszenz (=Fläche der DNA /Zellgröße) aufgetragen. Auf der Abszisse ist dagegen die Helligkeit der PI-Fluoreszenz (PI-Integral) dargestellt. Dabei entspricht ein hoher Integralwert einer hohen Fluoreszenzstärke. Es sind zwei Zellpopulationen durch eine rote bzw. grüne Punktvolke je durch ein „Gate“ (rotes bzw. grünes Polygon) abgegrenzt. Die rote Punktvolke entspricht diploiden G_0 - und G_1 - Zellen, die grüne Punktvolke markiert tetraploide G_2 -Zellen. Die G_2 -Zellen weisen höhere Werte bei Fluoreszenzintensität und Größe auf. Aufgrund der beiden Parameter Größe und Fluoreszenzintensität lassen sich Rückschlüsse auf die Zellart schließen.

In Abb. 14f wurden Fluoreszenz und Größe der Zellen bzw. der Zellkerne miteinander verglichen. Diese beiden Parameter lassen Rückschlüsse auf die Art der Zellen zu (G_0 - und G_1 -Zellen oder G_2 -Zellen). In dieser Darstellung lassen sich die zwei Zellgruppen deutlich voneinander unterscheiden. Mit der im Histogramm (Abb. 14d) bzw. im Punktwolkendiagramm (Abb. 14f) deutlichen Trennung zweier Zellpopulationen lag eine suffiziente Triggerung vor. Damit war die Voraussetzung geschaffen, die APC- und ELF-97-Fluoreszenz PI-getriggert zu erfassen. Außerdem machte die korrekte Triggerung eine weitere Analyse hinsichtlich unterschiedlicher Parameter, wie zum Beispiel Größe und Verteilung der Zellkerne, möglich.

3.2.1.2 ELF-97

Die mit ELF-97 markierte alkalische Phosphatase stellte sich im Mikroskop des LSC nach Anregung mit der Quecksilberdampfampe als gelb-grün leuchtende Fluoreszenz dar. Es wurde die Fluoreszenzstärke in Form eines Integrals auf der X-Achse gegen die Anzahl der gemessenen Phantome aufgetragen. Die Messung erfolgte mittels Phantomtriggerung. Zur Bestimmung der optimalen Konzentration wurden mehrere Messungen mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt (Abb. 15a). Dargestellt sind die minimale (1:40, blau) und die maximale (1:20, rot) verwendete Konzentration. Bei einer Konzentration von 1:20 zeigte sich ein breiteres, weiter rechts liegendes, also fluoreszenzstärkeres Integral, so dass diese Verdünnung als Standard etabliert wurde.

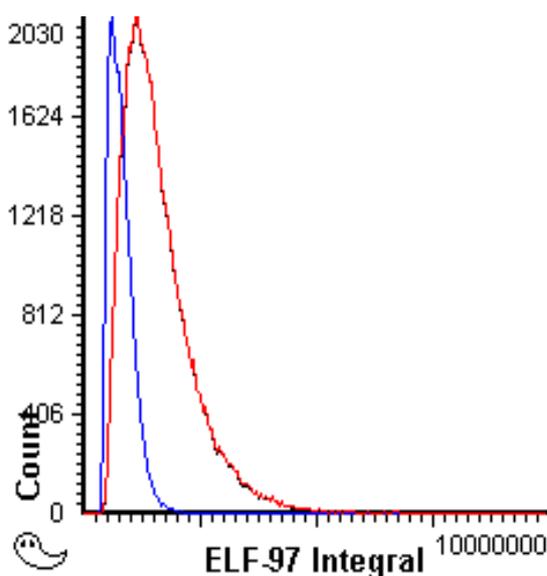


Abb.15a zeigt ein Histogramm zum

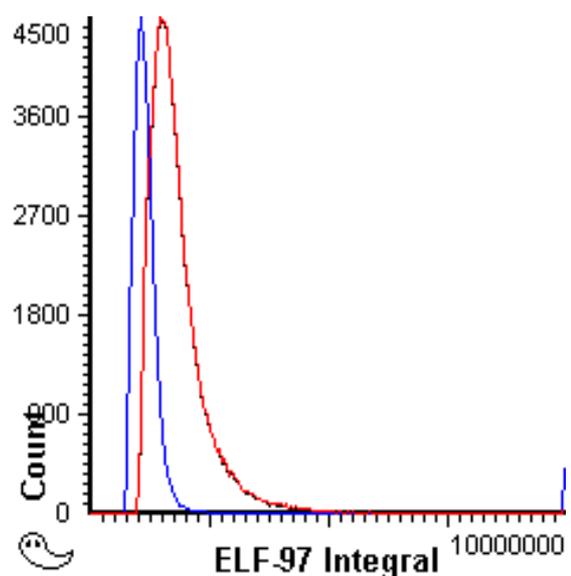


Abb.15b zeigt Histogramm zum

Vergleich zweier Konzentrationen mit der ELF-97-Phantommessung nach 3h Inkubationszeit. Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count) und auf der Abszisse die Helligkeit der ELF-97-Fluoreszenz (ELF-97 Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert einer hohen Fluoreszenzstärke entspricht. Die rote Kurve entspricht einer Verdünnung von 1:20 und die blaue Kurve markiert eine Verdünnung auf 1:40. Aufgrund der deutlich stärkeren Fluoreszenzstärke wurde die Verdünnung 1:20 als Standardverdünnung festgelegt.

Vergleich zweier Inkubationszeiten mit der ELF-97-Phantommessung. Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count) und auf der Abszisse die Helligkeit der ELF-97-Fluoreszenz (ELF-97 Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert einer hohen Fluoreszenzstärke entspricht. Die rote Kurve entspricht einer Inkubationszeit von 180 Minuten und die blaue Kurve markiert eine Inkubationsdauer von 5 Minuten. Die stärkere Fluoreszenz der roten Kurve wird deutlich sichtbar. Zur Ermittlung einer Inkubationszeit, die zwischen diesen beiden Werten liegt wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, deren Ergebnisse sich in den Abb. 16a bis 17d zeigen.

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit erfolgte die Messung der Objektträger nach verschiedenen Intervallen. Bis 3 Stunden nach Zugabe der Reagenz konnte eine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden, wie die rote und die blaue Kurve in Abb. 15b zeigen. Entsprechend wurde für alle weiteren Versuche eine Inkubations- bzw. Reaktionszeit von 180 Minuten als Standardbedingung definiert.

Die topographischen Veränderungen der Fluoreszenzintensität auf dem Objektträger zeigen die Abbildungen 16a bis 16d. Es wurden die Inkubationszeiten nach 20, 60, 120 und 180 Minuten dargestellt. Der Bereich, den das schwarze Polygon einfasst, wurde als Artefakt klassifiziert und mit Hilfe eines Gates von der Bewertung ausgenommen.

Zur besseren Verdeutlichung der Fluoreszenzintensitäten wurden Histogramme erstellt, darin 5 Regionen verifiziert und farblich markiert: Dabei nimmt die Fluoreszenzintensität von blau nach rot hin zu (Abb. 17a bis 17d). Es zeigte sich in allen Messungen ein uneinheitliches Fluoreszenzbild in der topographischen Karte. Regionen mit schwacher Fluoreszenzintensität wechseln sich mit Regionen hoher Intensität ab, so dass

sogenannte „Hotspots“ entstanden. Nach 20 Minuten Inkubationszeit dominierte insgesamt eine geringe Intensität, die sich nach 3 Stunden deutlich verstärkte. Die inhomogene Fluoreszenzverteilung blieb bei Zunahme der Gesamtfluoreszenzintensität weiterhin bestehen. Die „Hotspots“ waren lagekonstant aber größenprogreident.

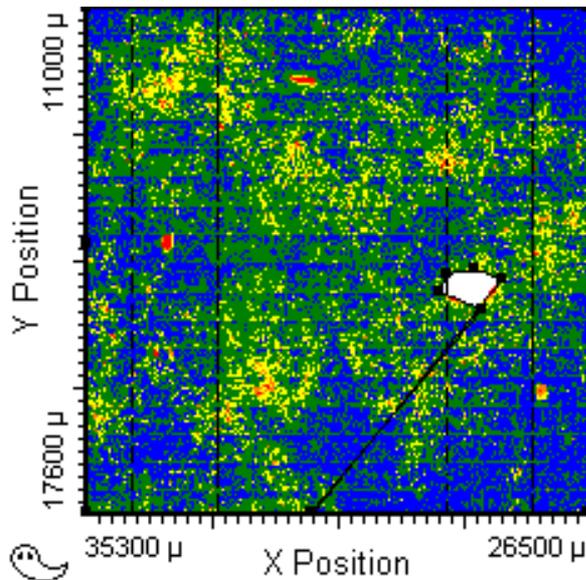


Abb.16a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der ELF-97-Fluoreszenzintensitäten bei Phantommessung auf dem Objektträger bei $t=20$ Min. Starke Fluoreszenzen erschienen gelb bis rot, schwache grün bis blau. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke findet sich in den Histogrammen in Abbildung 17a bis 17d. Nach 20 Minuten Inkubationszeit herrschte flächendeckend eine schwache Fluoreszenz mit vereinzelt hellen Zentren vor.

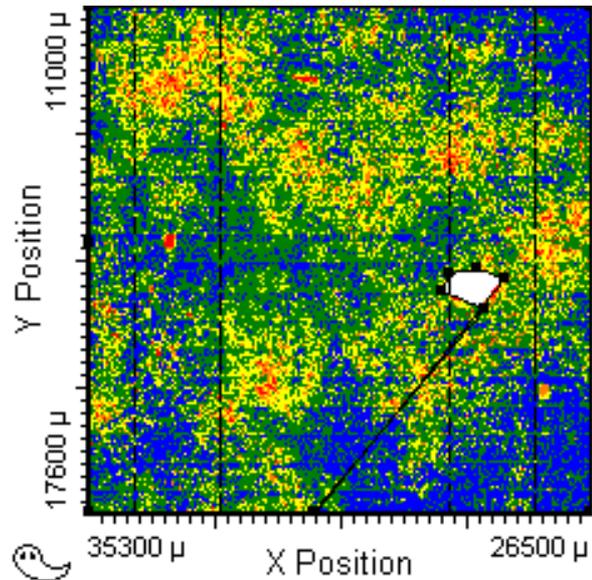


Abb.16b 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der ELF-97-Fluoreszenzintensitäten bei Phantommessung auf dem Objektträger bei **$t=60$ Min.** Starke Fluoreszenzen erschienen gelb bis rot, schwache grün bis blau. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke findet sich in den Histogrammen in Abbildung 17a bis 17d. Nach 60 Minuten vergrößerten sich die Zentren heller Fluoreszenzen und verdrängten die schwachen Fluoreszenzen in die Randbereiche.

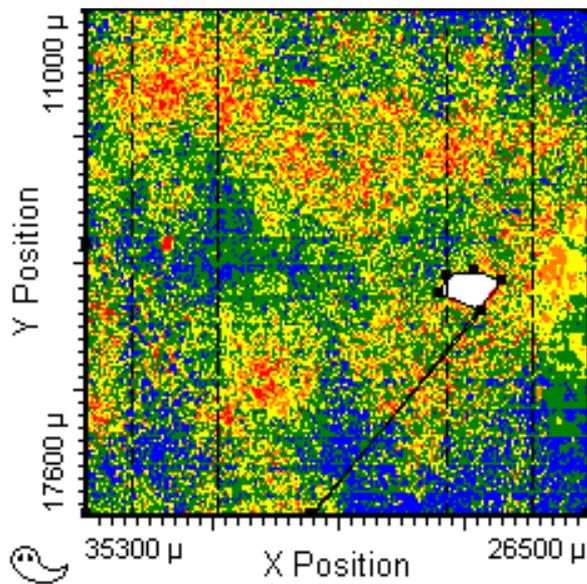


Abb.16c 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der ELF-97-Fluoreszenzintensitäten bei Phantommessung auf dem Objektträger bei **t=120 Min.** Starke Fluoreszenzen erschienen gelb bis rot, schwache grün bis blau. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke findet sich in den Histogrammen in Abbildung 17a bis 17d. Nach 120 Minuten bildeten sich die Fluoreszenzzentren immer deutlicher heraus, so dass allmählich die starken Fluoreszenzen dominierten.

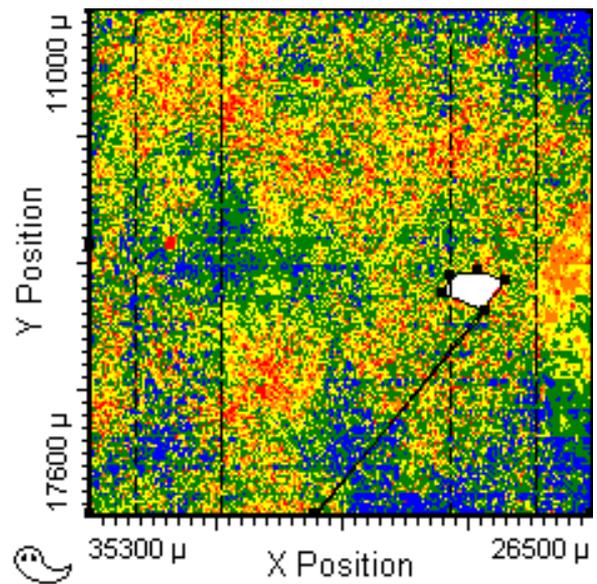


Abb.16d 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der ELF-97-Fluoreszenzintensitäten bei Phantommessung auf dem Objektträger bei **t=180 Min.** Starke Fluoreszenzen erschienen gelb bis rot, schwache grün bis blau. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke findet sich in den Histogrammen in Abbildung 17a bis 17d. Nach Abschluss der Inkubationszeit und Fixierung der Fluoreszenz überwogen die starken Fluoreszenzen. Aber auch hier waren Zentren besonders starker Fluoreszenzaktivität deutlich erkennbar.

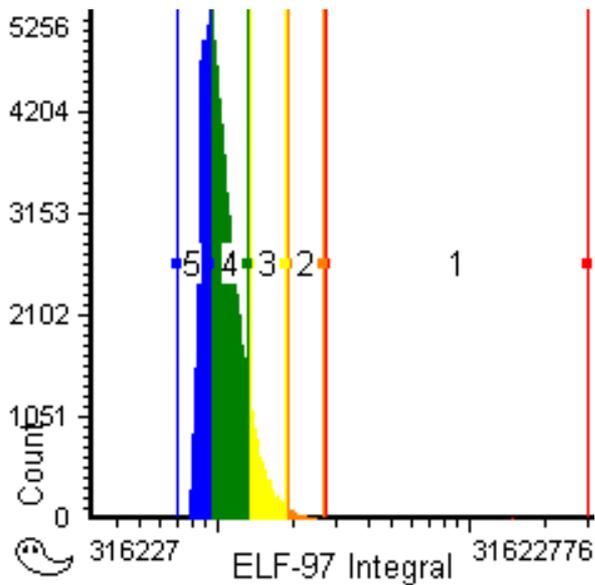


Abb.17a Histogramm zur Einteilung der ELF-97-positiven Ereignisse in fünf verschiedene Fluoreszenzintensitäten (Region 5. Blau=gering, Region 1. rot=hoch) nach **t=20 Min.** Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse, auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz aufgetragen. Die Verteilung der Fluoreszenzen auf dem Objektträger gemäß dieser Charakterisierung ist in Abbildung 16a dargestellt. In der Frühphase fiel besonders der schmale, hohe Peak im Bereich der schwachen Fluoreszenz auf. Die hohen Fluoreszenzaktivitäten waren kaum vertreten.

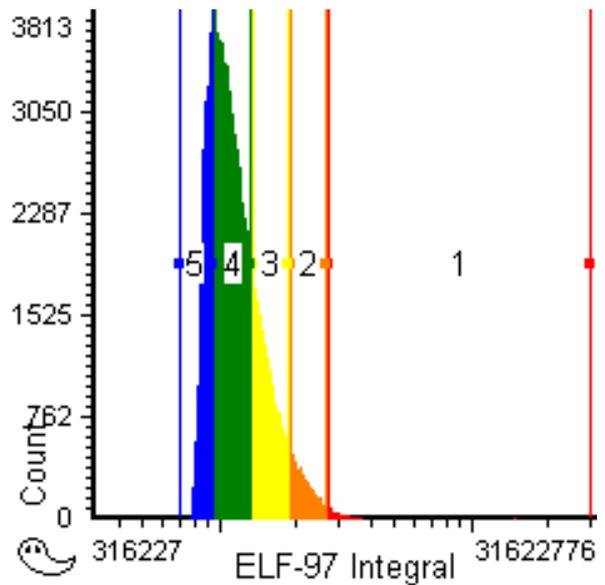


Abb.17b Histogramm zur Einteilung der ELF-97-positiven Ereignisse, eingeteilt in fünf verschiedene Fluoreszenzintensitäten (Region 5. Blau=gering, Region 1. rot=hoch) nach **t=60 Min.** Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse, auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz aufgetragen. Die Verteilung der Fluoreszenzen auf dem Objektträger gemäß dieser Charakterisierung ist in Abbildung 16b dargestellt. Nach 60 Minuten begann sich die Kurve zu verbreitern und der Fluoreszenzschwerpunkt verlagerte sich allmählich in hellere Fluoreszenzbereiche.

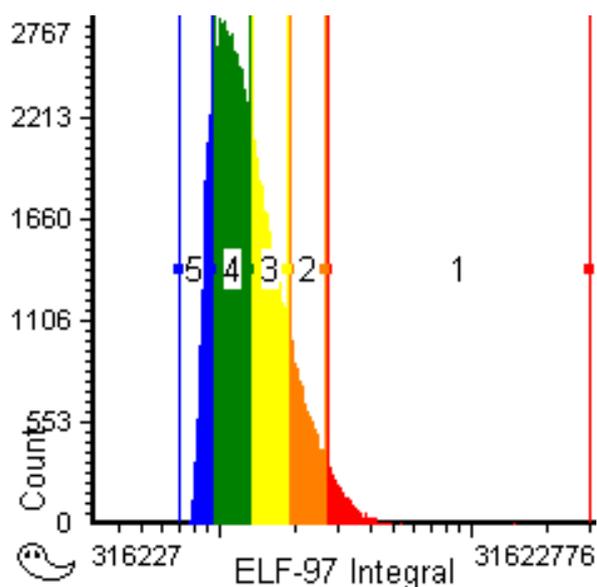


Abb.17c Histogramm zur Einteilung der ELF-97-positiven Ereignisse, eingeteilt in fünf verschiedene Fluoreszenzintensitäten (Region 5. Blau=gering, Region 1. rot=hoch) nach **t=120 Min.** Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse, auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz aufgetragen. Die Verteilung der Fluoreszenzen auf dem Objektträger gemäß dieser Charakterisierung ist in Abbildung 16c dargestellt. Nach 120 Minuten Inkubationszeit wurde der Anteil der schwachen Fluoreszenzen merklich geringer, während Fluoreszenzen mit hoher Aktivität deutlicher hervortraten.

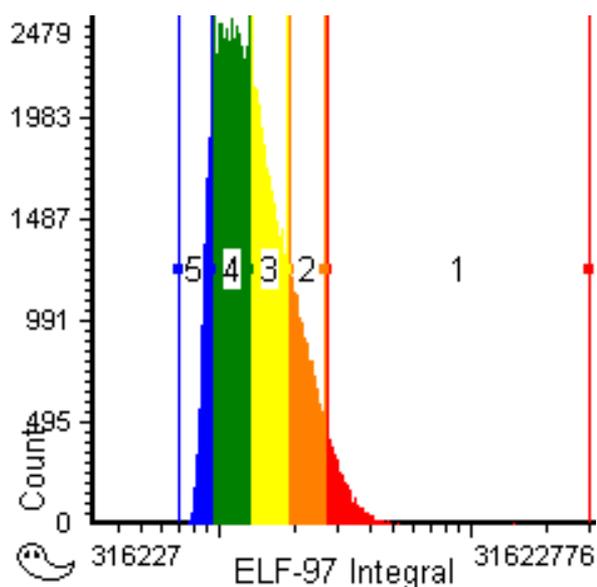


Abb.17d Histogramm zur Einteilung der ELF-97-positiven Ereignisse, eingeteilt in fünf verschiedene Fluoreszenzintensitäten (Region 5. Blau=gering, Region 1. rot=hoch) nach **t=180 Min.** Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse, auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz aufgetragen. Die Verteilung der Fluoreszenzen auf dem Objektträger gemäß dieser Charakterisierung ist in Abbildung 16a dargestellt. Nach Beenden der Inkubation zeigte sich eine deutliche Verbreiterung der Kurve mit Schwerpunkt auf den hoch aktiven Fluoreszenzanteilen.

In den Histogrammen manifestierte sich die Zunahme der Fluoreszenzintensität in einer Rechtsverschiebung des Integrals. Die Analyse der Messwerte der Regionen 1 und 5 verschiedener Proben im Vergleich (Tabellen 2 und 3) zeigte eine Veränderung der Fluoreszenzintensität in Bezug auf den zeitlichen Fortschritt.

Als Count wurden ELF-97-positive Ereignisse bezeichnet, die vom LSC als solche detektiert wurden. Region 1 als der Fluoreszenzbereich mit der größten Intensität nahm in allen Proben gleichmäßig zu. Eine Ausnahme bildete Probe 5-2-1 Feld 1. In dieser fand sich zunächst ein steilerer Anstieg mit nachfolgendem Abfall der Werte (Abb. 18a, Seite 56). In Region 5, die den Bereich mit der niedrigsten Fluoreszenzintensität repräsentierte, fielen die Werte kontinuierlich ab. Auch hier stach die Probe 5-2-1 Feld 1 heraus. Bei ihr fielen die Fluoreszenzwerte abrupt ab (Abb. 18b, Seite 57).

Count Region 1

	$t_1=5$	$t_2=25$	$t_3=45$	$t_4=65$	$t_5=85$	$t_6=105$	$t_7=125$	$t_8=145$	$t_9=165$	$t_{10}=185$
5-2-3 F1	318	390	638	1098	1804	2670	3470	4071	4181	4436
5-2-3 F2	438	626	893	1265	2032	2582	3138	3648	3693	3588
5-2-1 F1	118	525	1024	2546	9513	10692	10121	9501	8868	7405
5-2-2 F1	754	772	848	928	1104	1421	1660	1909	2149	2462
5-2-2 F2	1229	287	445	578	796	1453	1665	1983	2287	2193
5-2-4 F1	892	1001	1182	1429	1872	2023	2359	2830	3135	3562

Tabelle 2: Diese Tabelle bezieht sich auf die numerische Auswertung der Ergebnisse der Region 5 der ELF-97-Fluoreszenzmessungen (Abb.17a-d). Count steht dabei für ELF-97-positive Ereignisse. Es wurden die Werte 6 verschiedener Chamber slides, z.B. 5-2-3, 5-2-1 usw. jeweils mit Angabe des gemessenen Feldes F1 oder F2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten ($t_1=5$ Minuten, $t_2=25$ Minuten usw.) gemessen und erfasst. Von zwei Proben (Probe Nr. 5-2-2, Feld 2 zum Zeitpunkt $t_1=5$ Minuten, bei Probe 5-2-1 Feld 1 steigen die Werte an und fallen dann wieder ab) abgesehen, nehmen alle Werte vom Zeitpunkt $t_1=5$ Minuten bis zum Zeitpunkt $t_{10}=185$ Minuten kontinuierlich zu. Da Region 1 die mit der höchsten Fluoreszenzintensität auf der Skala ist, ist dies gleichbedeutend mit einer Gesamtzunahme der Fluoreszenzintensität des ELF-97 über die Zeit bei allen Proben. Eine entsprechend umgekehrte Progredienz findet sich in Region 5 (Tab.3). Dort zeigt sich eine kontinuierlich Abnahme der Fluoreszenz bei fast allen Proben. Dieser Sachverhalt wird in Abb.18a graphisch verdeutlicht.

Count Region 5

	$t_{1=5}$	$t_{2=25}$	$t_{3=45}$	$t_{4=65}$	$t_{5=85}$	$t_{6=105}$	$t_{7=125}$	$t_{8=145}$	$t_{9=165}$	$t_{10=185}$
5-2-3 F1	38401	30660	24231	20672	17537	14597	12371	10556	10292	9362
5-2-3 F2	43117	38615	35089	32089	27532	26428	24647	22604	22721	23573
5-2-1 F1	15782	15783	11893	32	6	0	0	0	0	0
5-2-2 F1	41625	36522	31001	28024	25139	21806	20214	18665	17240	15971
5-2-2 F2	47297	33113	27469	27190	24378	18498	18513	17528	16512	17596
5-2-4 F1	33459	35999	37309	37408	34901	35784	35821	34642	34484	22056

Tabelle 3 Diese Tabelle bezieht sich auf die numerische Auswertung der Ergebnisse der Region 5 der ELF-97-Fluoreszenzmessungen (Abb.17a-d). Count steht dabei für ELF-97-positive Ereignisse. Es wurden die Werte 6 verschiedener Chamber slides, z.B. 5-2-3, 5-2-1 usw. jeweils mit Angabe des gemessenen Feldes F1 oder F2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten ($t_1=5$ Minuten, $t_2=25$ Minuten usw.) gemessen und erfasst. Alle Werte vom Zeitpunkt $t_1=5$ Minuten bis zum Zeitpunkt $t_{10}=185$ Minuten nehmen kontinuierlich ab. Da Region 5 die mit der niedrigsten Fluoreszenzintensität auf der Skala ist, ist dies gleichbedeutend mit einer Gesamtabnahme der Fluoreszenzintensität des ELF-97 über die Zeit bei allen Proben. Eine entsprechend umgekehrte Progredienz findet sich in Region 1 (Tab.2). Dort zeigt sich eine kontinuierlich Steigerung der Fluoreszenz bei fast allen Proben. Dieser Sachverhalt wird in Abb.18b graphisch verdeutlicht.

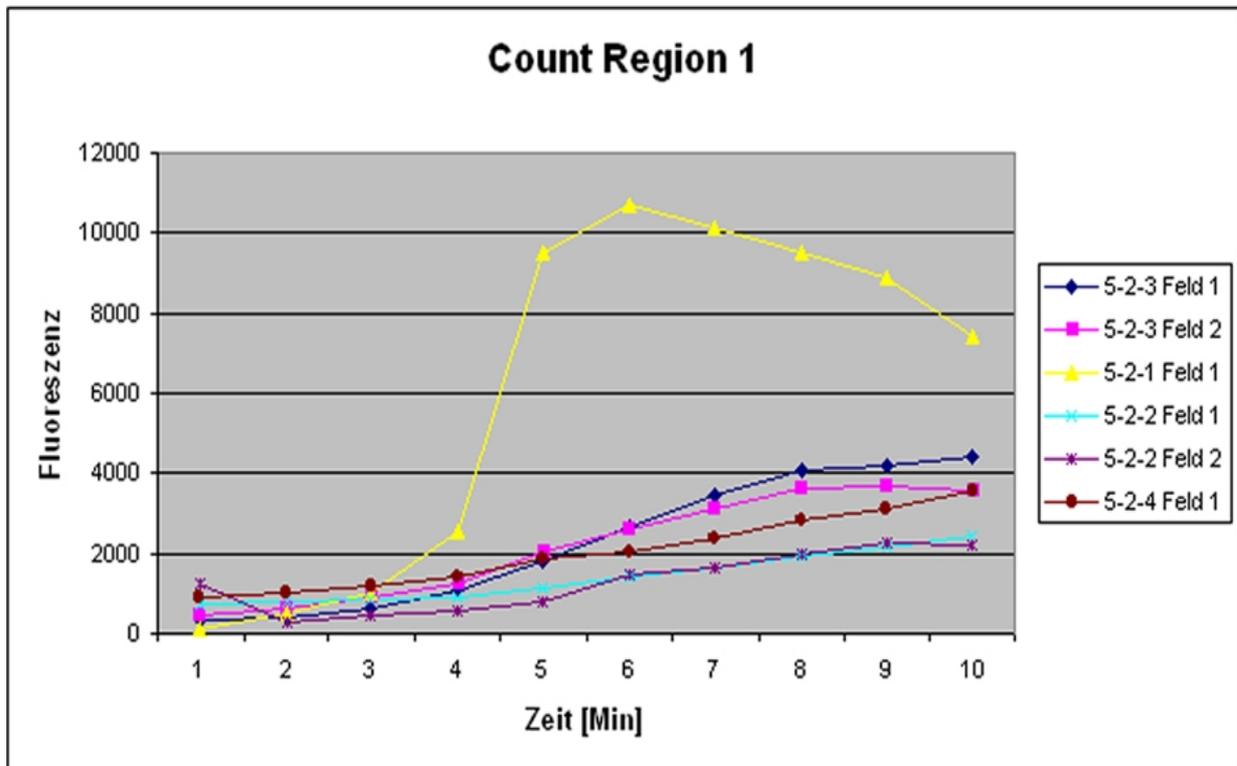


Abb. 18a zeigt eine Graphische Darstellung der Ergebnisse der ELF-97-Fluoreszenzmessungen der Region 1 (Abb. 17a-d). Es wurden die Werte 6 verschiedener Chamber slides, z.B. 5-2-3, 5-2-1 usw. jeweils mit Angabe des gemessenen Feldes F1 oder F2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten ($t_1=5$ Minuten, $t_2=25$ Minuten usw.) gemessen und erfasst. Auf der Ordinate ist die Fluoreszenzstärke gegen den zeitlichen Ablauf auf der Abszisse aufgetragen. Die ermittelten Verlaufswerte zeigen einen meist kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenzwerte aller Proben für die Region 1. Da Region 1 die mit der höchsten Fluoreszenzintensität auf der Skala ist, ist dies gleichbedeutend mit einer Gesamtzunahme der Fluoreszenzintensität des ELF-97 über die Zeit bei allen Proben. Eine entsprechend umgekehrte Progredienz findet sich in Region 5 (Abb.18b). Dort zeigt sich eine kontinuierlich Abnahme der Fluoreszenz bei fast allen Proben. Die entsprechenden Zahlenwerte zu dieser Darstellung finden sich in Tabelle 2.

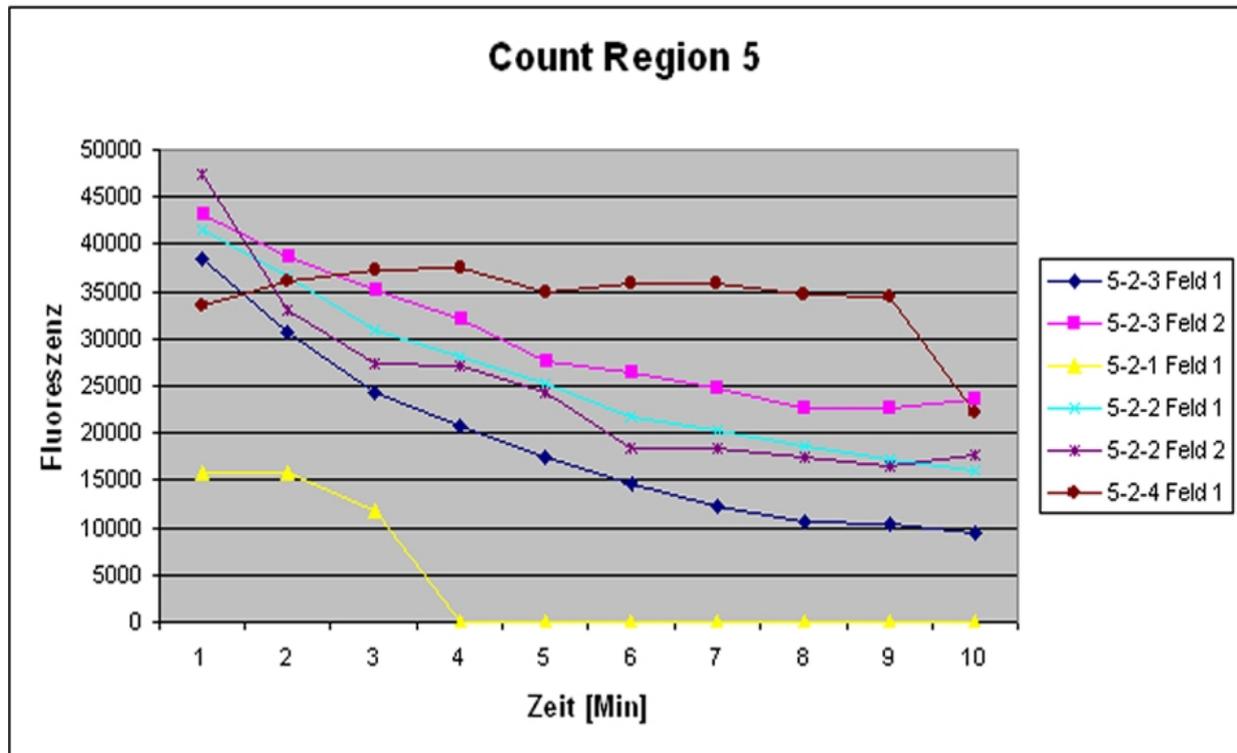


Abb. 18b zeigt eine Graphische Darstellung der Ergebnisse der ELF-97-Fluoreszenzmessungen der Region 5 (Abb. 17a-d). Es wurden die Werte 6 verschiedener Chamber slides, z.B. 5-2-3, 5-2-1 usw. jeweils mit Angabe des gemessenen Feldes F1 oder F2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten ($t_1=5$ Minuten, $t_2=25$ Minuten usw.) gemessen und erfasst. Auf der Ordinate ist die Fluoreszenzstärke gegen den zeitlichen Ablauf auf der Abszisse aufgetragen. Die ermittelten Verlaufswerte zeigen einen meist kontinuierlichen Abfall der Fluoreszenzwerte aller Proben für die Region 5. Da Region 5 die mit der niedrigsten Fluoreszenzintensität auf der Skala ist, ist dies gleichbedeutend mit einer Gesamtabnahme der Fluoreszenzintensität des ELF-97 über die Zeit bei allen Proben. Eine entsprechend umgekehrte Progredienz findet sich in Region 1 (Abb.18a). Dort zeigt sich eine kontinuierlich Zunahme der Fluoreszenz bei fast allen Proben. Die entsprechenden Zahlenwerte zu dieser Darstellung finden sich in Tabelle 3.

3.2.2 Mehrfachmessungen

3.2.2.1 Doppelmessung mit PI und APC

Abb. 19 zeigt Negativ- und Positivmessung: Die blaue Kurve markiert den Messwert vor und die rote nach Inkubation der Probe mit dem osteocalcinspezifischen Antikörper. Es stellte sich eine Rechtsverschiebung des APC-Integrals bei der Positivmessung dar.

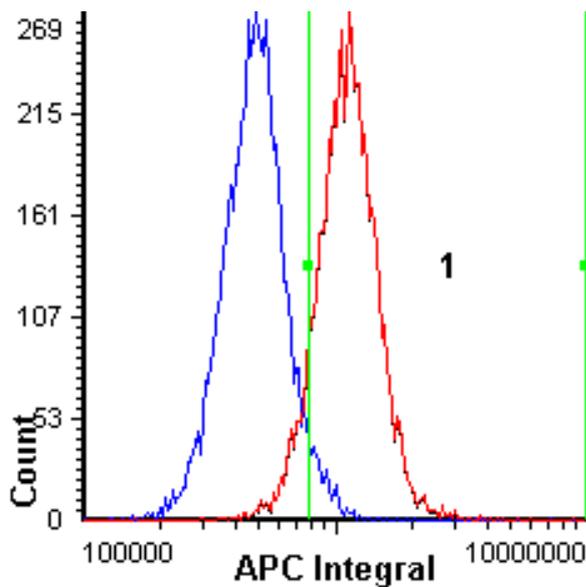


Abb.19 zeigt ein Histogramm zur Darstellung APC-positiver Ereignisse mit und ohne den OC-AK bei derselben Probe. Auf der Ordinate ist die Anzahl der APC-positiven Ereignisse und auf der Abszisse die Helligkeit der APC-Fluoreszenz aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert einer hohen Fluoreszenzstärke entspricht. Die blaue Kurve zeigt die APC-Fluoreszenz ohne den OC-AK, die rote Kurve markiert das APC-Fluoreszenzsignal mit dem OC-AK. Die senkrechten grünen Balken markieren eine 5%-Cut-off-Markierung der blauen Kurve, die die Fluoreszenzsteigerung durch die Verwendung des OC-AK verdeutlichen soll. Dies zeigt sich in der Verlagerung der roten Kurve in den Bereich des Cut-offs.

Es ist zusätzlich ein 5 %-Cut-Off (Abb. 19: grün, Region 1) eingezeichnet. In der Positivmessung ergab sich ein Wert von 90,9 % und damit eine Steigerung der Fluoreszenz um 85,9 %. Die Ergebnisse mehrerer Messreihen ergaben, dass eine Konzentration von 1:100 des primären Osteocalcin-Antikörpers und des sekundären APC-Antikörpers zu einer optimalen Detektion der Fluoreszenz führten. Abweichende Konzentrationen beider Antikörper ergaben ein schwächeres Ergebnis (siehe Abb. 20a bis 20h). Für die weiteren Messungen wurde daher diese Verdünnung als Standard verwendet.

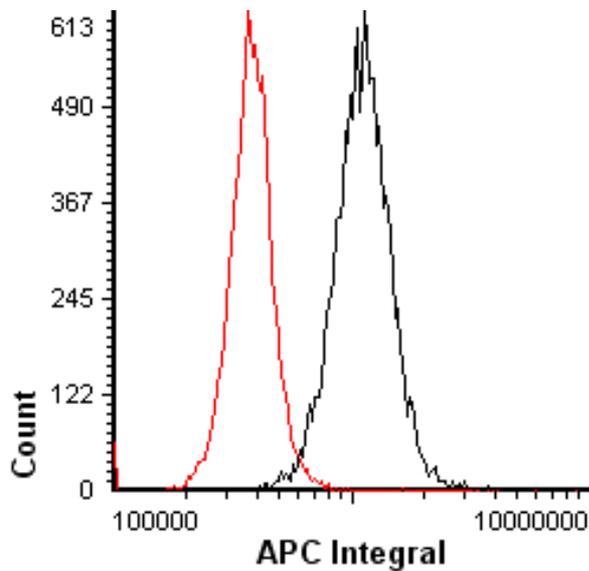


Abb.20a zeigt ein Histogramm mit dem APC-Fluoreszenzintegral zur Vergleichsdarstellung der OC-APCKonzentrationen. Die Standardkonzentration entsprach 1:100 OC und 1:100 APC und wurde durch die schwarze Kurve gekennzeichnet. Die Vergleichskonzentration entsprach OC1:50 und APC1:50 und war mit dem roten Overlay markiert. Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count) und auf der Abszisse die Helligkeit der APC-Fluoreszenz (APC-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert einer hohen Fluoreszenzstärke entsprach. Im Vergleich zeichnete sich die Standardverdünnung durch eine deutlich höhere Fluoreszenzaktivität aus.

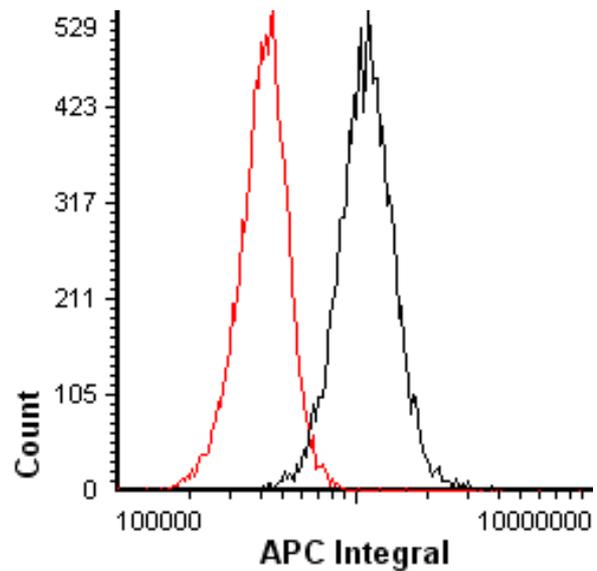


Abb.20b zeigt ein Histogramm mit dem APC-Fluoreszenzintegral zur Vergleichsdarstellung der OC-APCKonzentrationen. Die Standardkonzentration entsprach 1:100 OC und 1:100 APC und wurde durch die schwarze Kurve gekennzeichnet. Die Vergleichskonzentration entsprach OC1:50 und APC1:100 und war mit dem roten Overlay markiert. Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count) und auf der Abszisse die Helligkeit der APC-Fluoreszenz (APC-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert einer hohen Fluoreszenzstärke entsprach. Im Vergleich zeichnete sich die Standardverdünnung durch eine deutlich höhere Fluoreszenzaktivität aus.

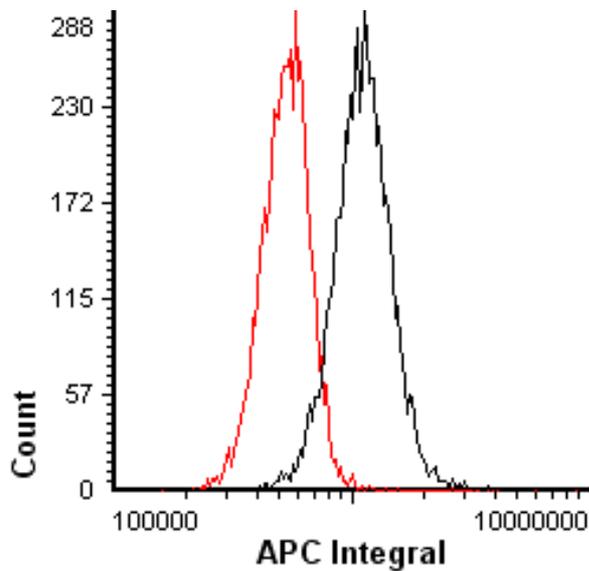


Abb.20c zeigt ein Histogramm mit dem APC-Fluoreszenzintegral zur Vergleichsdarstellung der OC-APCKonzentrationen. Die Standardkonzentration entsprach 1:100 OC und 1:100 APC und wurde durch die schwarze Kurve gekennzeichnet. Die Vergleichskonzentration entsprach OC1:50 und APC1:200 und war mit dem roten Overlay markiert. Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count) und auf der Abszisse die Helligkeit der APC-Fluoreszenz (APC-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert einer hohen Fluoreszenzstärke entsprach. Im Vergleich zeichnete sich die Standardverdünnung durch eine deutlich höhere Fluoreszenzaktivität aus.

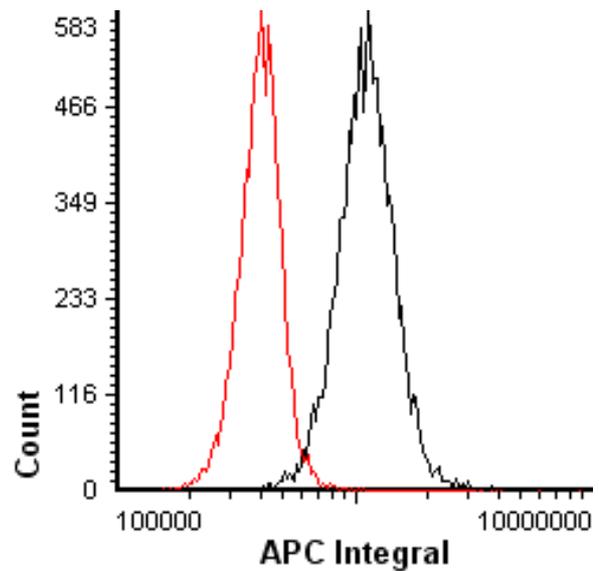


Abb.20d zeigt ein Histogramm mit dem APC-Fluoreszenzintegral zur Vergleichsdarstellung der OC-APCKonzentrationen. Die Standardkonzentration entsprach 1:100 OC und 1:100 APC und wurde durch die schwarze Kurve gekennzeichnet. Die Vergleichskonzentration entsprach OC1:100 und APC1:50 und war mit dem roten Overlay markiert. Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count) und auf der Abszisse die Helligkeit der APC-Fluoreszenz (APC-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert einer hohen Fluoreszenzstärke entsprach. Im Vergleich zeichnete sich die Standardverdünnung durch eine deutlich höhere Fluoreszenzaktivität aus.

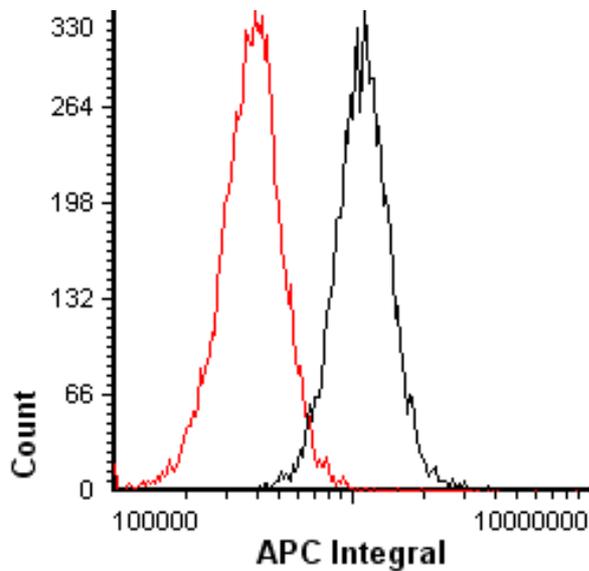


Abb.20e zeigt ein Histogramm mit dem APC-Fluoreszenzintegral zur Vergleichsdarstellung der OC-APCKonzentrationen. Die Standardkonzentration entsprach 1:100 OC und 1:100 APC und wurde durch die schwarze Kurve gekennzeichnet. Die Vergleichskonzentration entsprach OC1:100 und APC1:200 und war mit dem roten Overlay markiert. Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count) und auf der Abszisse die Helligkeit der APC-Fluoreszenz (APC-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert einer hohen Fluoreszenzstärke entsprach. Im Vergleich zeichnete sich die Standardverdünnung durch eine deutlich höhere Fluoreszenzaktivität aus.

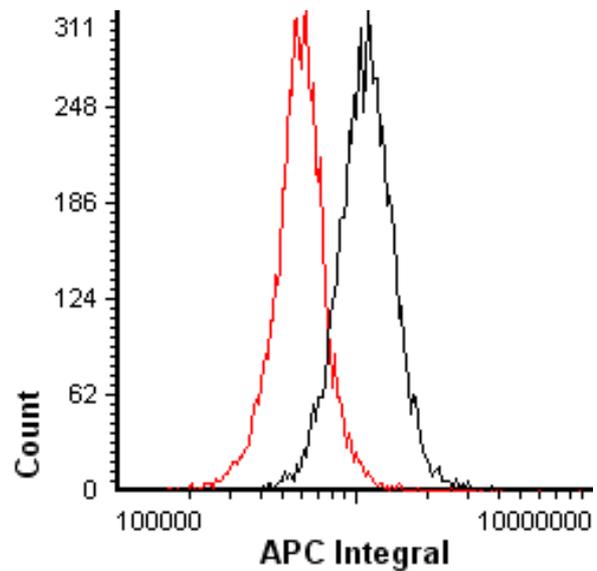


Abb.20f zeigt ein Histogramm mit dem APC-Fluoreszenzintegral zur Vergleichsdarstellung der OC-APCKonzentrationen. Die Standardkonzentration entsprach 1:100 OC und 1:100 APC und wurde durch die schwarze Kurve gekennzeichnet. Die Vergleichskonzentration entsprach OC1:200 und APC1:50 und war mit dem roten Overlay markiert. Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count) und auf der Abszisse die Helligkeit der APC-Fluoreszenz (APC-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert einer hohen Fluoreszenzstärke entsprach. Im Vergleich zeichnete sich die Standardverdünnung durch eine deutlich höhere Fluoreszenzaktivität aus.

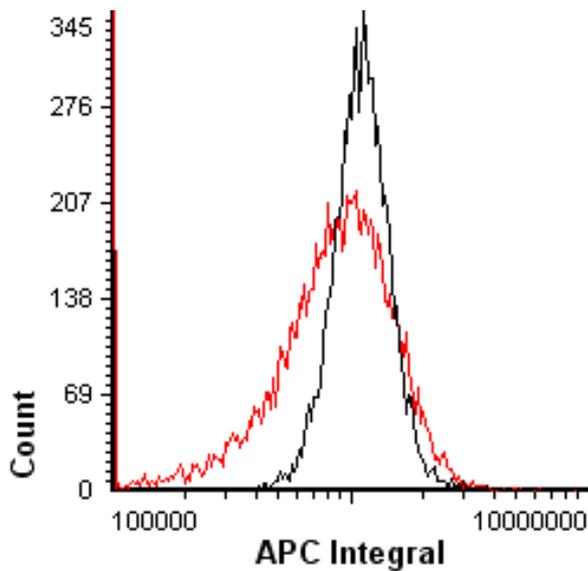


Abb.20g zeigt ein Histogramm mit dem APC-Fluoreszenzintegral zur Vergleichsdarstellung der OC-APCKonzentrationen. Die Standardkonzentration entsprach 1:100 OC und 1:100 APC und wurde durch die schwarze Kurve gekennzeichnet. Die Vergleichskonzentration entsprach OC1:200 und APC1:100 und war mit dem roten Overlay markiert. Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count) und auf der Abszisse die Helligkeit der APC-Fluoreszenz (APC-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert einer hohen Fluoreszenzstärke entsprach. Im Vergleich zeichnete sich hier eine breitere und flachere Kurve.

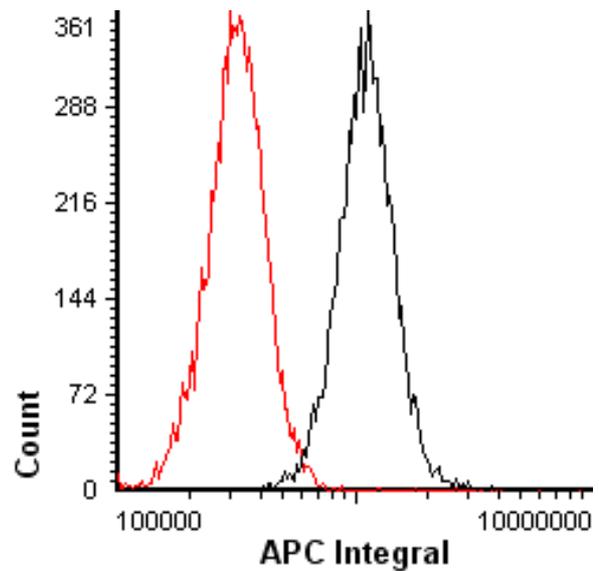


Abb.20h zeigt ein Histogramm mit dem APC-Fluoreszenzintegral zur Vergleichsdarstellung der OC-APCKonzentrationen. Die Standardkonzentration entsprach 1:100 OC und 1:100 APC und wurde durch die schwarze Kurve gekennzeichnet. Die Vergleichskonzentration entsprach OC1:200 und APC1:200 und war mit dem roten Overlay markiert. Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count) und auf der Abszisse die Helligkeit der APC-Fluoreszenz (APC-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert einer hohen Fluoreszenzstärke entsprach. Im Vergleich zeichnete sich die Standardverdünnung durch eine deutlich höhere Fluoreszenzaktivität aus.

3.2.2.2 Doppelmessung mit PI und ELF-97

Die Abbildungen 21a und 22a zeigen die topographischen Fluoreszenzverteilungen auf dem Objektträger. Dabei entspricht in Abb. 21a rot den G_0 - und G_1 -Zellen und grün den G_2 -Zellen (vergleiche Abb. 21b). Insgesamt zeigte sich eine durchgehend dichte Fluoreszenz, die vor allem der G_0 - und G_1 -Zellen entspricht und damit den Schluss nahe legte, der Objektträger sei dicht (v.a. mit G_0 - und G_1 -Zellen) besiedelt. Ausnahmen fanden sich im oberen Bereich des Messareals. Dort waren fluoreszenzfreie Bereiche („Gaps“) zu erkennen.

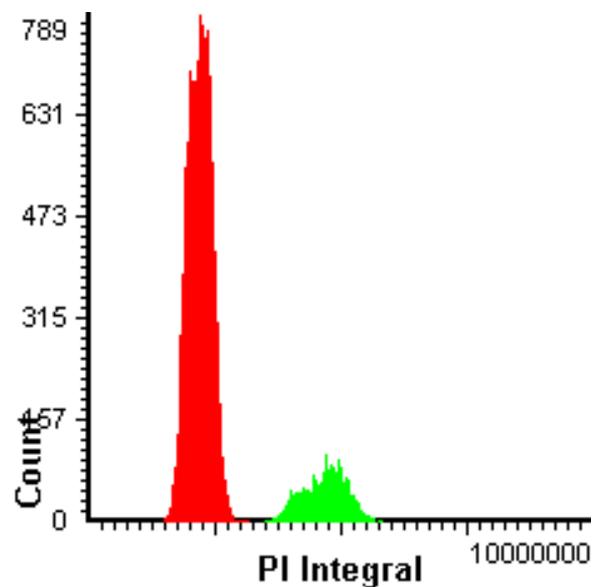
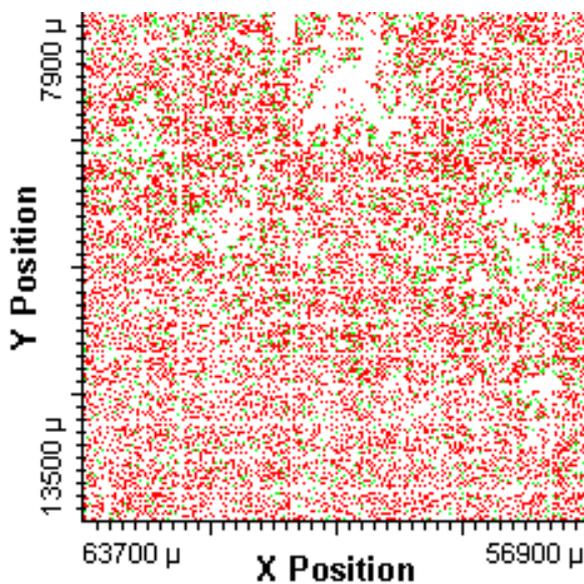


Abb.21a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der PI-Fluoreszenz bei Einzelzellmessung auf dem Objektträger. Die G_0 - und G_1 -Zellen sind rot, die G_2 -Zellen grün dargestellt. Die farbliche Kennzeichnung entspricht der Auftrennung der Zellpopulationen in Abb.24b. Insgesamt zeigte sich eine durchgehend dichte Fluoreszenz, die vor allem der G_0 - und G_1 -Zellen entsprach und damit den Schluss nahe legte, der

Abb.21b zeigt ein Histogramm zur Unterscheidung der Zellpopulationen nach Färbung mit PI. Auf der Ordinate ist die Anzahl PI-positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz (PI-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert analog zu einer hohen Fluoreszenzstärke ist. Das Messergebnis entspricht der typischen Häufigkeitsverteilung mit hohem, schmalen Gipfel der G_0 - und G_1 -Zellen (rote Kurve) und breitem, flachem Gipfel

Objektträger sei dicht besiedelt. Im gesamten Messbereich waren Areale ohne Fluoreszenzaktivität erkennbar.

der G₂-Zellen (grüne Kurve). Die topographische Verteilung dieser Zellen auf dem Objektträger wird aus Abb.21a ersichtlich.

Das Farbspektrum von Abb. 22a ergibt sich aus Abb. 22b und beginnt mit geringer Fluoreszenzintensität (blau, Region 5) und endet bei hoher Intensität (rot, Region 1). Es imponierten in Abb. 22a Zentren mit hoher Fluoreszenzaktivität („Hotspots“), die von Fluoreszenzen der nächst niedrigeren Stufe umgeben waren, bis sich peripher im unteren Teil des Messareals nur noch schwache Fluoreszenzmuster fanden.

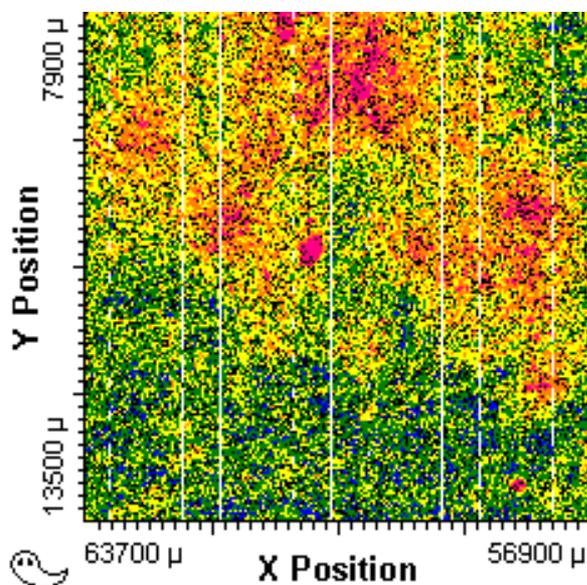


Abb.22a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der ELF-97-Fluoreszenzintensitäten bei Phantommessung auf dem Objektträger. Starke Fluoreszenzen erschienen gelb bis rot, schwache grün bis blau. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke entspricht der des Histogramms in Abbildung 22b. Es imponierten Zentren der ELF-97-

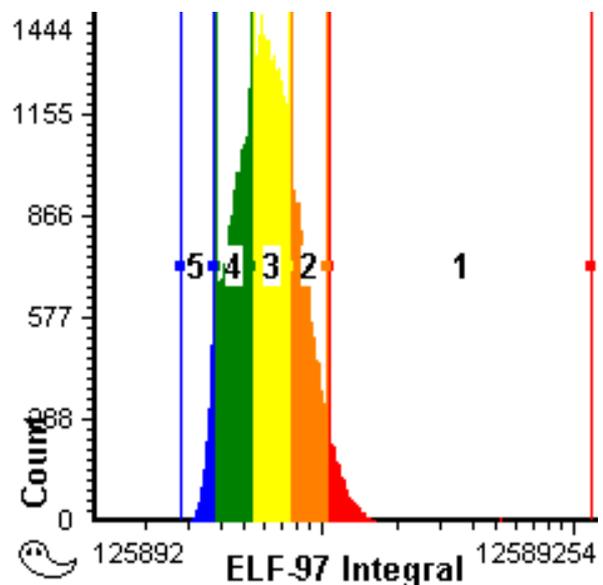


Abb.22b zeigt ein Histogramm der ELF-97positiven Ereignisse der Phantomanalyse, eingeteilt in fünf verschiedene Fluoreszenzintensitätsstufen. Beginnend mit der geringsten Intensität in Region 5 (blau), bis zur stärksten Fluoreszenzintensität in Region 1 (rot). Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der ELF-97-Fluoreszenz

Aktivität im oberen Bereich des Messareals. Diese Zentren befanden sich an exakt der Stelle, an der bei der Einzelzellanalyse der PI-Fluoreszenz keine Aktivität gemessen werden konnte (siehe Abb.21a).

aufgetragen. Die Verteilung der Fluoreszenzen auf dem Objektträger gemäß dieser Charakterisierung ist in Abb.22a dargestellt.

3.2.2.3 Dreifachmessung mit PI, OC-APC und ELF-97

Abbildung 23 zeigt eine computergenerierte Fusion der Fluoreszenzbilddaten, die durch LSC-Mikroskopie nach Anregung mit der Quecksilberdampflampe entstanden waren: Die roten Strukturen stellen die mit PI gefärbten Zellkerne dar. Sie sind umgeben von mit APC, also Osteocalcin (blau) gefärbten Zelleibern, die langgestreckt sind und Vesikel mit ELF-97, also alkalischer Phosphatase (grün) enthalten.

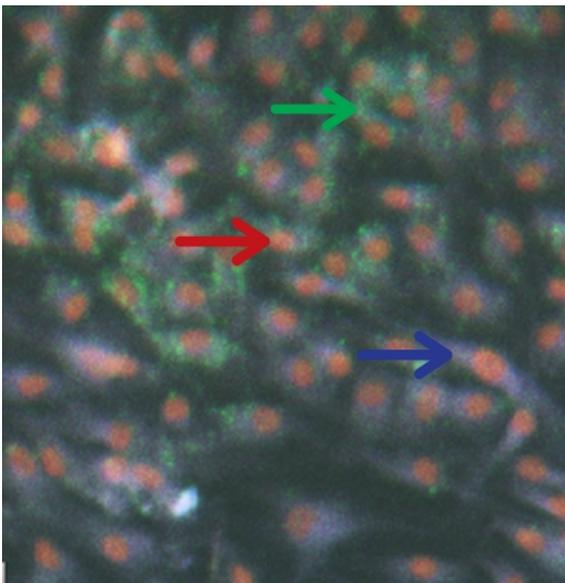


Abb.23 zeigt ein fluoreszenzmikroskopisches Foto der mit Farbstoffen inkubierten Zellen. Der rote Pfeil zeigt auf PI (DNA=Zellkern), der grüne Pfeil: auf ELF-97 (Alkalische Phosphatase) und der blaue Pfeil auf APC (Osteocalcin)

3.2.2.4 Einzelzellanalyse

Bei jeder Messung wurde mit einem Punktwolkendiagramm X-Position versus Y-Position eine 2-dimensionale topographische Karte generiert, in dem alle gemessenen Ereignisse vom WinCyte-Programm dargestellt wurden. Dabei fielen scheinbar fluoreszenzfreie Areale („Gaps“) auf, die bei allen verwendeten Fluoreszenzen an derselben Stelle vorhanden waren (Abb. 24a, 25a und 26a, Seite 66 bis 68). Während der Messung war in der Scan Data (siehe auch Abb.31b, Seite 79) dieser Areale eine hohe Anzahl von Zellen zu sehen, die durch die vorgegebenen Erkennungsparameter auf Einzelzellbasis nicht getriggert werden konnten.

PI/DNA

Es zeigte sich eine regelrechte Auftrennung der gemessenen PI-Fluoreszenz in Abb. 24b in G_0/G_1 - (rot, diploid) und G_2 - Zellen (grün, tetraploid). Gemäß der Trennung der Zellen in eine diploide und eine tetraploide Fraktion ist in Abb. 24a die topographische Verteilung auf dem Objektträger in Form einer 2-dimensionalen Karte zu sehen. Dabei war die übliche dichte Besiedelung des Objektträgers, überwiegend mit G_0/G_1 - Zellen (rot) und vereinzelt dazwischen liegenden G_2 - Zellen (grün) zu erkennen. Außerdem imponierten die zuvor bereits beschriebenen fluoreszenzfreien Areale („Gaps“).

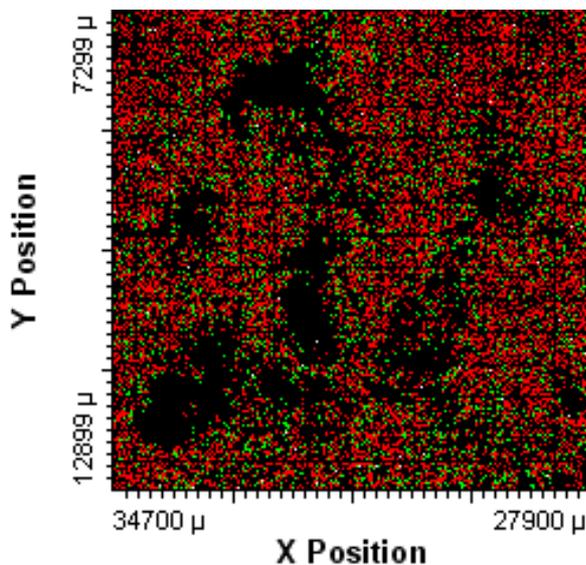


Abb.24a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer

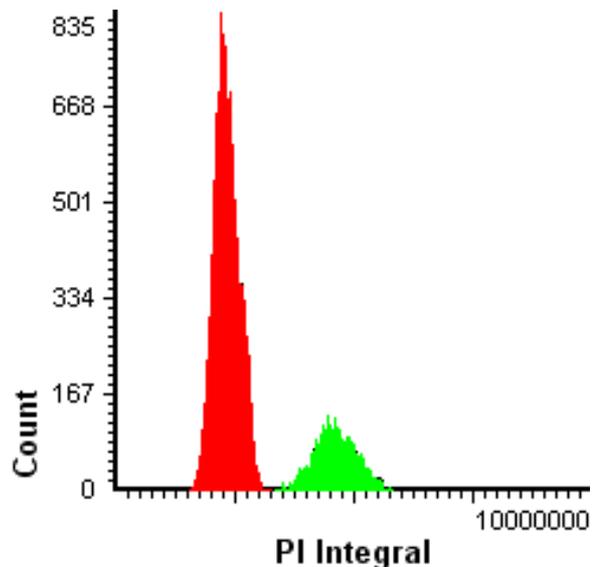


Abb.24b zeigt ein Histogramm zur Unterscheidung der Zellpopulationen nach

Verteilung der PI-Fluoreszenz bei Einzelzellmessung auf dem Objektträger. Die G_0 - und G_1 -Zellen sind rot, die G_2 -Zellen grün dargestellt. Die farbliche Kennzeichnung entspricht der Auftrennung der Zellpopulationen in Abb.24b. Insgesamt zeigte sich eine durchgehend dichte Fluoreszenz, die vor allem der G_0 - und G_1 -Zellen entsprach und damit den Schluss nahe legte, der Objektträger sei dicht besiedelt. Im gesamten Messbereich waren Areale ohne Fluoreszenzaktivität erkennbar. Diese „Gaps“ fanden sich analog bei allen Einzelzellmessungen (Abb. 25a und 26a)

Färbung mit PI. Auf der Ordinate ist die Anzahl PI-positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz (PI-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert analog zu einer hohen Fluoreszenzstärke ist. Das Messergebnis entspricht der typischen Häufigkeitsverteilung mit hohem, schmalen Gipfel der G_0 - und G_1 -Zellen (rote Kurve) und breitem, flachem Gipfel der G_2 -Zellen (grüne Kurve). Die topographische Verteilung dieser Zellen auf dem Objektträger wird aus Abb 24a ersichtlich.

ELF-97

Die farbliche Einteilung der Fluoreszenzstärke in Abb. 25a lässt sich aus Abb. 25b entnehmen. Die Einteilung des ELF-97-Fluoreszenzintegrals erfolgte nach dem üblichen Schema in vier Regionen. Sie begann in Region 5 mit schwacher Fluoreszenz in blau bis zu den starken roten Fluoreszenzen in Region 1.

In der 2-dimensionalen topographischen Karte der einzelzellgetriggerten ELF-97-Messung war im Messfeld kein auffälliges Muster zu erkennen (Abb. 25a). Es fanden sich zwar einzelne kleine Bereiche, in denen eine Dominanz bestimmter Fluoreszenzen ausgeprägt war, sie hatten aber keinen flächigen Charakter.

Auch hier waren scheinbar fluoreszenzfreie Flächen, also „Gaps“ zu erkennen.

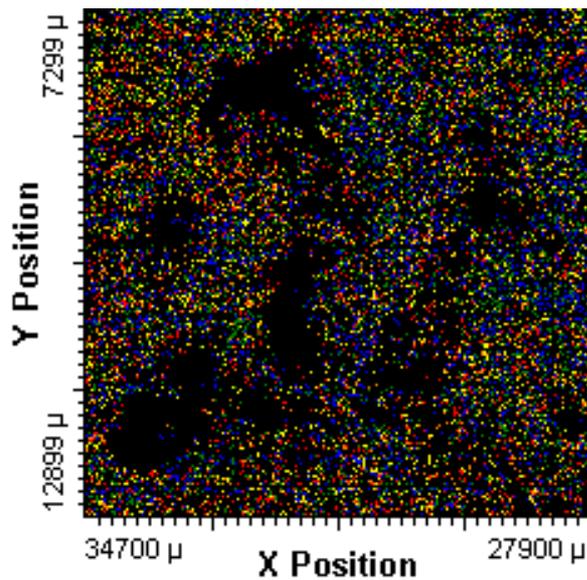


Abb.25a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der ELF-97-Fluoreszenz bei Einzelzellmessung auf dem Objektträger. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenz-stärke entspricht der des Histogramms in Abbildung 25b. Insgesamt zeigte sich eine diffus verteilte Fluoreszenz. Im gesamten Messbereich waren Areale zu erkennen, in denen keine Fluoreszenzaktivität gemessen werden konnte. Diese „Gaps“ fanden sich analog bei allen Einzelzellmessungen (Abb. 24a und 26a).

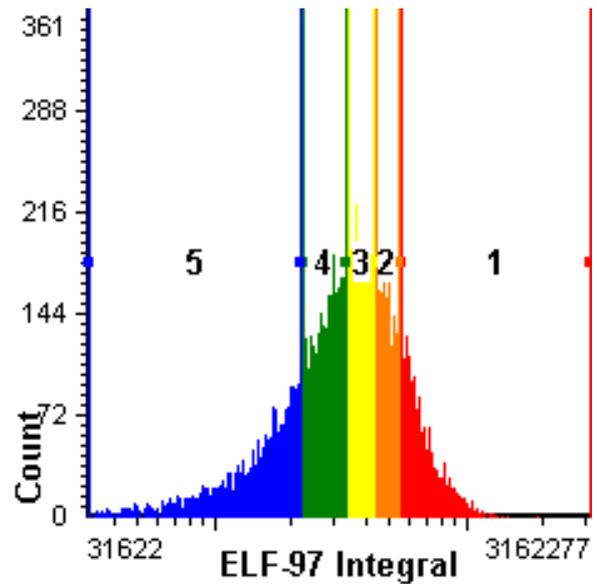


Abb.25b zeigt ein Histogramm der ELF-97positiven Ereignisse der Phantomanalyse, eingeteilt in fünf verschiedene Fluoreszenzintensitätsstufen. Beginnend mit der geringsten Intensität in Region 5 (blau), bis zur stärksten Fluoreszenzintensität in Region 1 (rot). Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der ELF-97-Fluoreszenz aufgetragen. Die Verteilung der Fluoreszenzen auf dem Objektträger gemäß dieser Charakterisierung ist in Abbildung 25a dargestellt.

APC

Die Einteilung der Fluoreszenzfarbgebung ergibt sich aus Abb. 26b. Dabei werden wieder fünf verschiedene Regionen, beginnend mit der schwächsten Fluoreszenz Region 5 in blau aufsteigend bis zur stärksten Fluoreszenz Region 1 in rot unterschieden. Die APC-Verteilung (Abb. 26a) unterschied sich von denen der anderen

Fluoreszenzen (Abb. 24a und Abb. 25a) durch ein eindeutiges Verteilungsmuster. Direkt um die scheinbar leeren Areale herum lagen Bereiche mit niedriger Fluoreszenzintensität. In der Peripherie fanden sich flächige Areale mit besonders hoher Fluoreszenz. Bei näherer Betrachtung der einzelnen Messquadrate der Laser zeigte sich eine typische Fluoreszenzanordnung innerhalb jedes Quadrates. So ist im oberen Anteil in fast allen Messfeldern eine niedrige Fluoreszenz und im Rest des Quadrates eine mittlere bis hohe Fluoreszenzintensität vorhanden. Je nach Lage im Messfeld variierte das Verhältnis der Fluoreszenzanteile zueinander. Die Aneinanderreihung der einzelnen Messquadrate ergab horizontale Linien einer Fluoreszenz, die sich zeilenartig über das gesamte Messfeld zogen.

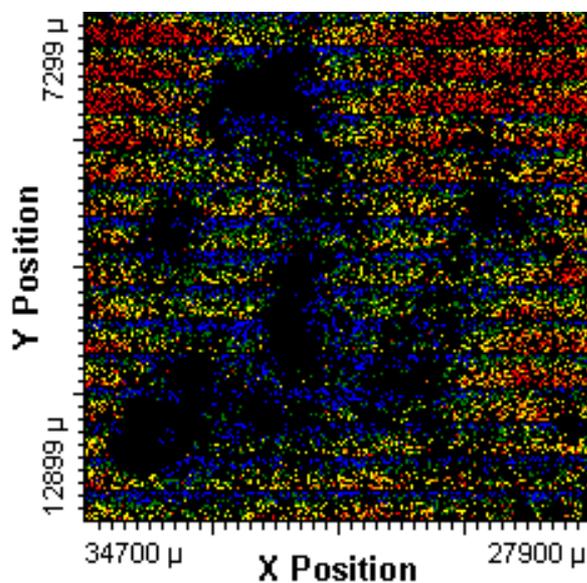


Abb.26a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der APC-Fluoreszenz bei Einzelzellmessung auf dem Objektträger. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke entspricht der des Histogramms in Abbildung 26b. Insgesamt zeigte sich eine dichte Fluoreszenz. Im gesamten Messbereich waren fluoreszenzfreie Areale

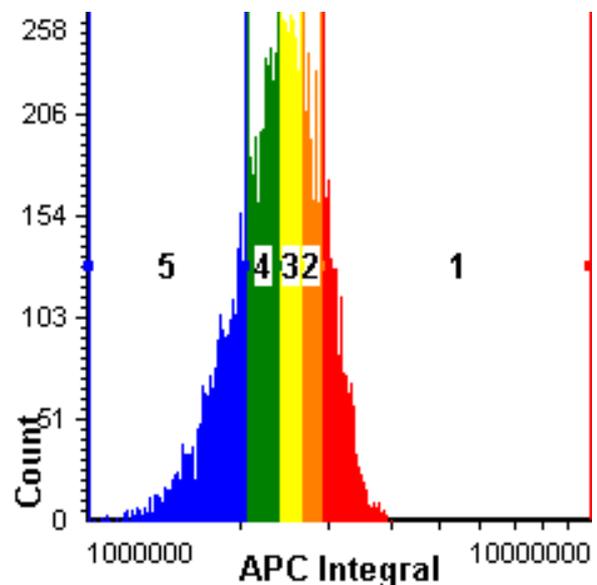


Abb.26b zeigt ein Histogramm der ELF-97positiven Ereignisse der Phantomanalyse, eingeteilt in fünf verschiedene Fluoreszenzintensitätsstufen. Beginnend mit der geringsten Intensität in Region 5 (blau) bis zur stärksten Fluoreszenzintensität in Region 1 (rot). Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der ELF-97-Fluoreszenz

zu erkennen. Diese „Gaps“ finden sich analog bei allen Einzelzellmessungen (Abb. 24a und 25a). Es zeigte sich im Randbereich der „Gaps“ nur eine geringe, peripher dagegen eine sehr hohe Fluoreszenz-aktivität. Die Fluoreszenzverteilung innerhalb eines Messquadrates wies eine horizontale Sortierung, oben beginnend mit den schwachen Fluoreszenzen, unten mit starken Fluoreszenzen auf. Die Aneinanderreihung der einzelnen Messquadrate ergab horizontale Linien einer Fluoreszenz, die sich zeilenartig über das gesamte Messfeld zogen.

aufgetragen. Die Verteilung der Fluoreszenzen auf dem Objektträger gemäß dieser Charakterisierung ist in Abbildung 26a dargestellt.

3.2.2.5 Phantomanalyse

Die farbliche Unterscheidung der Fluoreszenzverteilungen in den Abb. 27a, 28a und 29a ergibt sich aus den Begleithistogrammen in Abb. 27b, 28b und 29b, die jeweils in fünf Regionen eingeteilt sind. Die schwächsten Fluoreszenzmuster finden sich in Region 5 in blau und die stärksten Fluoreszenzen werden Region 1 in rot zugeordnet. Bei der Analyse der topographischen 2-dimensionalen Phantom-X-Y-Karten fielen bei jeder gemessenen Probe Areale mit besonders hoher Fluoreszenzintensität, so genannte „Hotspots“ auf (Abb. 27a, 28a, 29a, Seite 71 bis 73). Diese „Hotspots“ sind jeweils umgeben von Phantomen der nächst geringeren Fluoreszenzstufe. Diese sind wiederum von Phantomen geringerer Fluoreszenzstärke umgeben, bis sich peripher eine weitgehend einheitliche Grundfluoreszenz nachweisen lässt. Dies erinnert an eine Höhenkarte aus der Geographie. Die Hotspots sind bei allen drei Fluoreszenztypen (PI/ELF-97/APC) gleich lokalisiert. Unterschiede fanden sich hinsichtlich der sie umgebenden geringeren Fluoreszenzintensitäten.

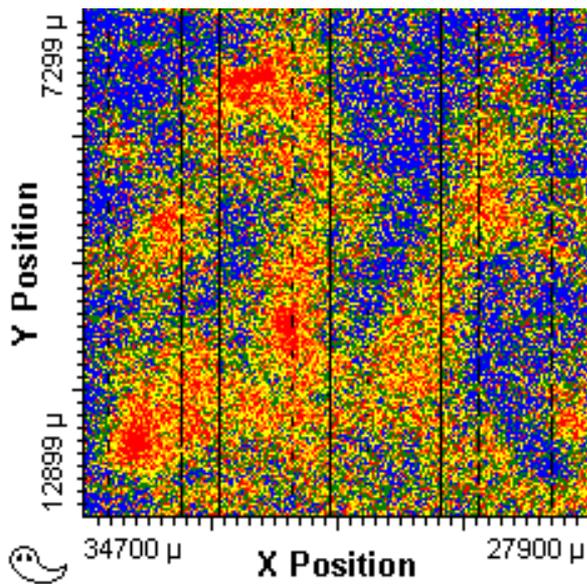


Abb.27a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der PI-Fluoreszenz bei Phantommessung auf dem Objektträger. Starke Fluoreszenzen erschienen gelb bis rot, schwache grün bis blau. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke entspricht der des Histogramms in Abbildung 27b. Besonders auffällig erschienen die drei Zentren mit besonders hoher Fluoreszenzaktivität („Hotspots“). Ihre Lage entsprach in etwa den Hotspots bei der PI- und APC-Messung (Abb. 28a und 29a).

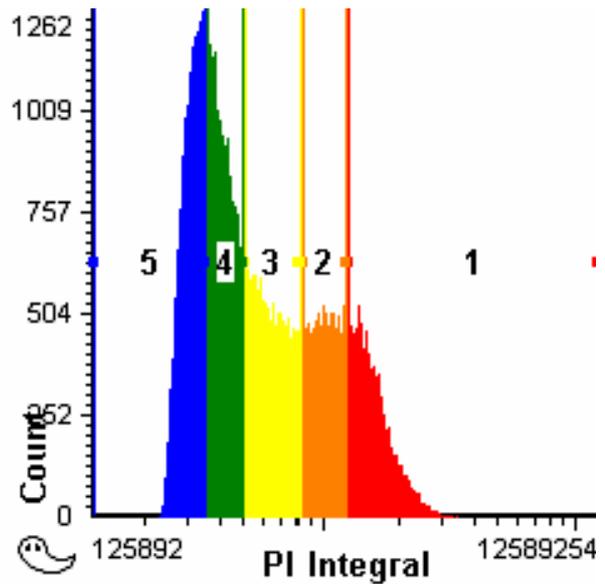


Abb.27b zeigt ein Histogramm der ELF-97positiven Ereignisse der Phantomanalyse, eingeteilt in fünf verschiedene Fluoreszenzintensitätsstufen. Beginnend mit der geringsten Intensität in Region 5 (blau) bis zur stärksten Fluoreszenzintensität in Region 1 (rot). Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der ELF-97-Fluoreszenz aufgetragen. Die Verteilung der Fluoreszenzen auf dem Objektträger gemäß dieser Charakterisierung ist in Abbildung 27a dargestellt.

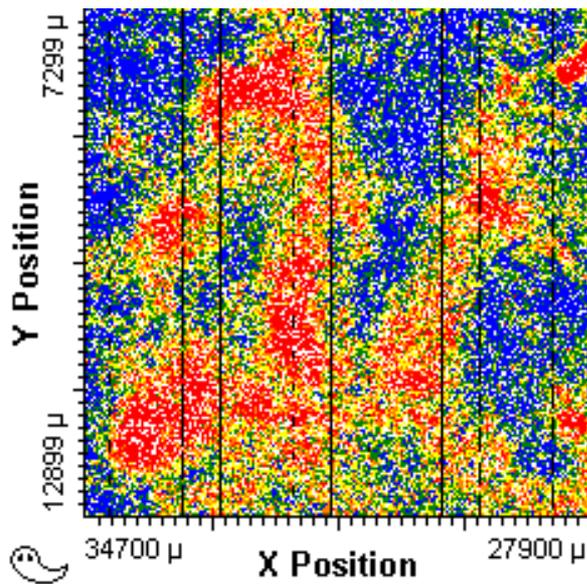


Abb.28a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der ELF-97-Fluoreszenzen bei Phantommessung auf dem Objektträger. Starke Fluoreszenzen erschienen gelb bis rot, schwache grün bis blau. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke findet sich im Histogramm in Abbildung 28b. Es fielen vor allem die roten Zentren mit besonders hoher ELF-97-Aktivität auf. Ihre Lage entsprach in etwa den Hotspots bei der PI- und APC-Messung (Abb. 27a und 29a).

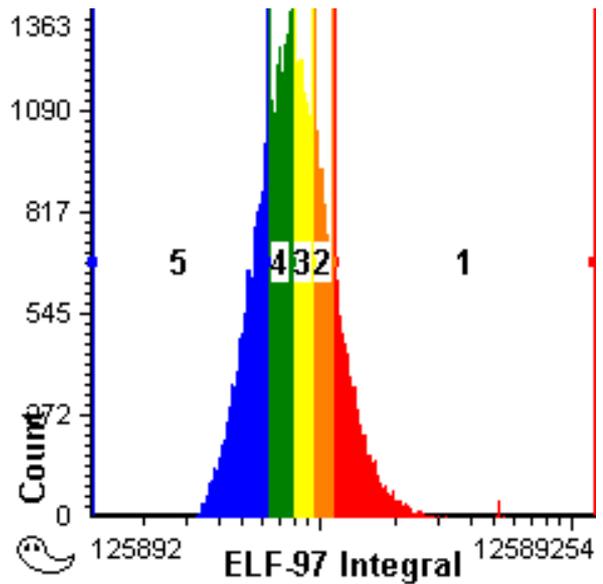


Abb.28b zeigt ein Histogramm der ELF-97positiven Ereignisse der Phantomanalyse, eingeteilt in fünf verschiedene Fluoreszenzintensitätsstufen. Beginnend mit der geringsten Intensität in Region 5 (blau) bis zur stärksten Fluoreszenzintensität in Region 1 (rot). Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der ELF-97-Fluoreszenz aufgetragen. Die Verteilung der Fluoreszenzen auf dem Objektträger gemäß dieser Charakterisierung ist in Abbildung 28a dargestellt.

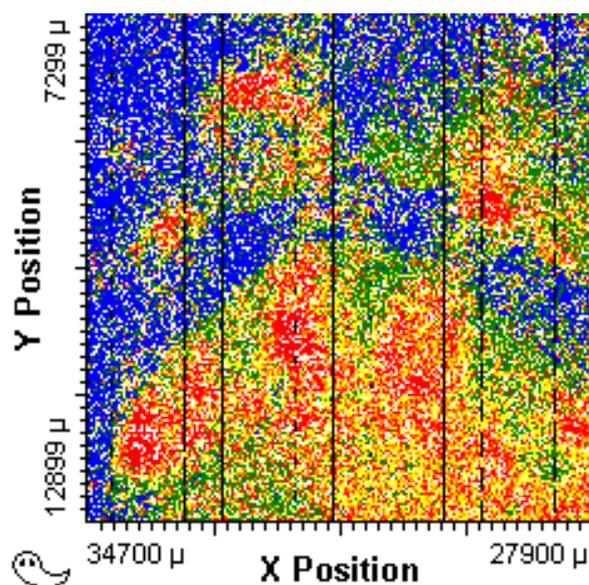


Abb.29a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der APC-Fluoreszenzen bei Phantommessung auf dem Objektträger. Starke Fluoreszenzen erschienen gelb bis rot, schwache grün bis blau. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke findet sich im Histogramm in Abbildung 29b. Es fielen vor allem die roten Zentren mit besonders hoher APC-Aktivität auf. Ihre Lage entsprach in etwa den Hotspots bei der PI- und ELF-97-Messung (Abb. 27a und 28a).

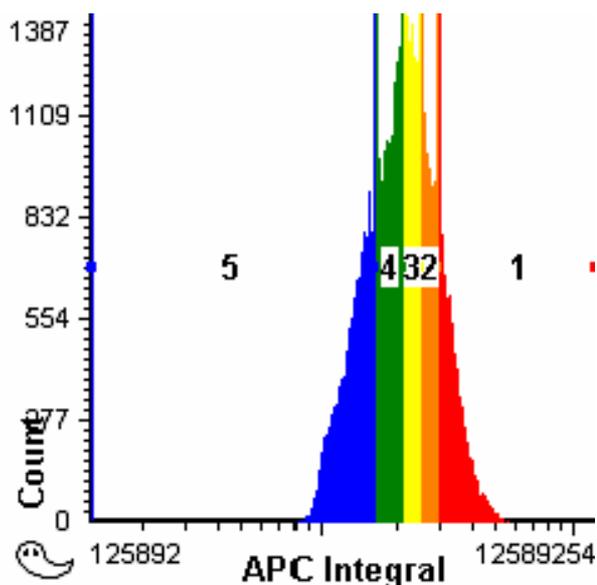


Abb.29b zeigt ein Histogramm der ELF-97positiven Ereignisse der Phantomanalyse, eingeteilt in fünf verschiedene Fluoreszenzintensitätsstufen. Beginnend mit der geringsten Intensität in Region 5 (blau) bis zur stärksten Fluoreszenzintensität in Region 1 (rot). Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der ELF-97-Fluoreszenz aufgetragen. Die Verteilung der Fluoreszenzen auf dem Objektträger gemäß dieser Charakterisierung ist in Abbildung 29a dargestellt.

4. Diskussion

4.1 Zellkultur

4.1.1 Verwendetes Gewebe

Aufgrund ihres hohen Vermehrungspotentials stellten osteoblastäre Zellen aus dem Nasenseptum eine geeignete Zellpopulation zur in vitro Züchtung dar (Kotte, 2005d). Die Arbeitsgruppe um Pradel und Tenbrieg beschrieb 2005 Knochenfragmente gegenüber „crushed bone“ als überlegen in Bezug auf das proliferative Potential (Pradel et al., 2005). Dementsprechend wurden Knochenstücke für die vorliegende Arbeit verwendet. Das Patientenalter hatte laut Kotte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Vermehrungspotential der auswachsenden Zellen (Kotte, 2005c). Daher gab es keine Einschränkungen bei der Auswahl des Patientenkollektivs.

4.1.2 Nährmedium

Entgegen dem allgemeinen Arbeitsstandard in Zellkulturen konnte bei der vorliegenden Arbeit nicht auf die Verwendung von Antibiotika verzichtet werden, da die verwendeten Primärkulturen keinem sterilen Umfeld entstammten. Die physiologische Flora der menschlichen Nasenhöhle beinhaltet viele Bakterien- und einige Pilzarten, so dass aufgrund möglicher zytotoxischer Einflüsse Penicillin und Streptomycin in minimaler Konzentration zugesetzt wurden (Minuth et al., 2003c).

Der pH-Wert des Kulturmediums sollte 7,2 bis 7,4 betragen (Minuth et al., 2003b). Der konstante pH-Wert wurde durch die Pufferung mit Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), das dem Medium ab Werk zugesetzt war, gewährleistet. Dieser NaHCO_3 -Puffer ist abhängig vom CO_2 -Partialdruck in der Atmosphäre. Zur Stabilisierung des pH-Wertes unter Raumatmosphäre, wie bei der Arbeit unter der sterilen Reinraumbank, wurde HEPES- Puffer verwendet.

Das Medium der Kulturen wurde nie komplett, sondern nur partiell ersetzt, weil laut Minuth im Kulturmedium wachstumsfördernde Substanzen vorhanden sind. Diese werden von den proliferierenden Zellen parakrin abgegeben (Minuth et al., 2003d).

4.1.3 Herstellung der Primär- und Objektträgerkulturen

Die Ergebnisse der Arbeit belegen, dass osteoblastäre Zellen auf Objektträgern gezüchtet werden können und dass die Zellen nach ihrer Fixierung mit Ethanol in ihrer Morphologie und Position auf dem Trägermaterial unverändert bleiben.

Die Benutzung von Plastikkulturflaschen erlaubte dabei eine schnelle und großflächige Anzucht osteoblastärer Zellen, was eine ebenso zügige und zahlreiche Subkultivierung ermöglichte. Die Nutzung der Laser Scanning Cytometrie erforderte die Zucht von Zellen auf für mikroskopische Untersuchungen geeigneten Glasobjektträgern.

Nachteilig bei der Direktkultivierung waren die hohen technischen Anforderungen an die Prozedur des Mediumwechsels und die geringe Wachstumsfläche. Dem stehen ein geringerer Material- und Zeitaufwand und ein jüngeres Zellalter gegenüber. Bei der vorliegenden Arbeit gelang die Direktkultivierung von osteoblastären Zellen auf Chamber slides trotz mehrmaliger Versuche nicht. Mikroskopisch waren auch nach 2 Wochen keine Zellen nachweisbar. Daher wurden Zellverbände osteoblastärer Zellen in Polystyrolkulturgefäßen gezüchtet und nach 70 bis 75 Tagen auf gläserne Objektträger überführt, um sie dort weiter zu kultivieren.

Minuth schrieb 2003 in seinem Buch „Zukunftstechnologie Tissue Engineering“: „Mancher Zelltyp wächst besonders gut auf einem Kulturschalenboden aus Polystyrol, während andere Zelltypen sich auf diesem Material aus unbekanntem Gründen unwohl fühlen, nicht anhaften und infolgedessen absterben“. Um dem Problem mangelnder Adhärenz und seinen Folgen zu begegnen, sollten dem Autor zufolge Kulturschalen mit unterschiedlichen Beschichtungen, wie Kollagen, Fibronectin oder Laminin versehen sein. Dies stelle den schlecht anhaftenden Zellen eine Unterlage zur Verfügung, die in möglichst vielen Aspekten den Eigenschaften der natürlichen extrazellulären Matrix entspreche (Minuth et al., 2003a). Zur Förderung der Adhärenz wurden deshalb bei der vorliegenden Arbeit physikalisch beschichtete Kulturgefäße verwendet.

Dadurch wurden bereits nach 5 Tagen mikroskopisch erkennbare Erfolge bei der Kultivierung erzielt. Ein dichter Zellrasen konnte allerdings erst nach etwa 3 Wochen beobachtet werden.

Die Subkultivierung erfolgte in Abhängigkeit von Ausdehnung und Dichte des Zellrasens. Die Kultivierungszeit der Subkulturen lag mit durchschnittlich 13 Tagen unter der der Mutterkulturen (circa 60 Tage), da eine höhere Anzahl der Einzelzellen in der Subkultur und eine gleichmäßigere Aussaat vorlag. Dies ermöglichte ein zügigeres

Wachstum als in den Mutterkulturen. Insgesamt ergab sich ein langer Kultivierungsvorgang (75-80 Tage) und damit ein hohes Zellalter. Somit war nicht gewährleistet, dass es sich mehrheitlich um osteoblastäre Zellen (unter anderem Präosteoblasten) handelte, sondern mitunter um reife Osteoblasten. Ein Ansatz zur Senkung des durchschnittlichen Zellalters könnte die Verwendung kleinerer Kulturgefäße sein. Dies würde zum einen die Übersichtlichkeit und zum anderen die schnellere Ausbildung eines Monolayers fördern. Durch die mechanische Ablösung mittels Zellschaber wurden ganze Zellverbände von der Unterlage abgelöst, was möglicherweise mit Zerstörung der Adhäsionsstrukturen einher ging. Es wurde versucht, eine Auftrennung in kleinere Einheiten, das heißt einzelne Zellen, durch die Zugabe von niedrig konzentriertem Trypsin und Zentrifugation mit nachfolgender Resuspension zu erreichen. Dies gelang nicht immer, so dass auch Zellkonglomerate bestehend aus einigen hundert Zellen in die Tochterkulturen beziehungsweise in die Chamber slides gelangten. Der enzymatische und mechanische Lösungsvorgang zur Erstellung der Zellsuspension verursachte möglicherweise Veränderungen spezifischer Eigenschaften der Zellen und der sie umgebenden Matrix. Um diese wieder aufzubauen war dann eine erneuerte Kultivierung notwendig. Die direkte Anzucht der Zellen auf dem Objektträger wäre für die Erhaltung des extrazellulären Milieus von Vorteil.

Bei der Subkultivierung der Zellen auf Chamber slides fiel auf, dass die Zellen bevorzugt in der Nähe der Plastikwand adhärend wurden. Als Grund wurde das weiter oben beschriebene Phänomen der Affinität der Zellen zu Polystyrol (Minuth et al., 2003a) oder auch die höhere Konzentration von Nährstoffen und proliferationsfördernden Substanzen an der Kulturgefäßwand gesehen. Durch dort auftretende Kapillarkräfte entstand eine höhere Flüssigkeitssäule, die möglicherweise mit höheren Konzentrationswerten einher ging.

4.2 Laser Scanning Cytometrie(LSC)

Die Laser Scanning Cytometrie kombiniert Attribute von Flow Cytometrie (Flow Cytometry, FCM) und Bildanalyse (Image Analysis, IA) (Darzynkiewicz et al. 1999a; Martin-Reay et al., 1994). Es handelt sich um Analysen biochemischer und physikalischer Prozesse zur Markierung relevanter Zellstrukturen mit Fluorochromen, wie zum Beispiel DNA, Rezeptoren, Membranproteine oder Mitochondrien (Gerstner et

al., 2006b). Parallel zur Fluoreszenzmessung können besondere Ereignisse sowohl mikroskopiert als auch fotografiert werden.

Sowohl Darzynkiewicz et al., als auch Tàrnok et al. hoben in ihren Publikationen die breit gefächerte, klinische Anwendungsmöglichkeit des Laser Scanning Cytometers und die Validität der gewonnenen Daten im Vergleich zur FCM hervor (Darzynkiewicz et al., 1999a; Tàrnok et al., 2002). Das entscheidende Merkmal der Objektträger-basierten Cytometrie besteht darin, dass die Objekte auf einem Objektträger immobilisiert sind, sich also jeweils an einer festen Stelle des Objektträgers befinden. Sie lassen sich zu unterschiedlichen Zwecken wiederholt untersuchen (Gerstner et al., 2006b). So können zum Beispiel Enzymkinetiken in situ oder andere zeitbezogene Prozesse dargestellt werden (Darzynkiewicz et al., 1999a; Gerstner et al., 2006a; Pozarowski et al., 2006). Es können sequentielle Untersuchungen derselben Zelle mit unterschiedlichen Markersubstanzen oder Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt werden. Diese ermöglichen es, Informationen über Immunphänotyp, Zellfunktionen, Expression bestimmter Proteine, DNA-Ploidie und anderes zu gewinnen und miteinander zu verbinden. Außerdem sind Aussagen zur topographischen Fluoreszenzverteilung sowohl innerhalb der Zellen als auch auf der Zelloberfläche und auf dem Objektträger möglich. Dies kann bei der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) nützlich sein (Kamentsky et al., 1997b). Das LSC verfügt über die vorteilhafte Eigenschaft, dass nach der Initialmessung die Position jeder Zelle, jeder Fluoreszenz und jedes sonstigen Ereignisses gespeichert wird und jederzeit relokalisiert, erneut gemessen oder gefärbt werden kann (Clatch et al., 1996; Gerstner et al., 2006b; Gorczyca et al., 1996b; Luther et al., 1996). Schließlich ist theoretisch eine unendlich lange Lagerung der analysierten Zellen, zum Beispiel zu Archivierungszwecken oder späterer Analyse mit anderen Antikörpern oder anhand anderer Fragestellungen möglich (Darzynkiewicz et al., 1999a).

Tàrnok und Gerstner beschrieben 2002 den Hauptvorteil der LSC gegenüber der FCM als Kombination von minimal notwendigem Probenvolumen mit der Möglichkeit der Erfassung morphologischer und fluoreszenzbasierter Daten (Tàrnok et al., 2002). Auch hypozelluläre Proben mit einem Zellgehalt von 10.000-50.000 Zellen, wie beispielsweise Feinnadelaspirationsbiopsien, Tupferabstriche oder Liquorpunktate, können analysiert werden. Daher bietet sich das LSC für Bereiche der klinischen Analyse an, in denen andere Verfahren versagen (Gerstner et al., 2002a; Gerstner et al., 2003; Gerstner et

al., 2005; Tàrnok et al., 2002). Die Verwendung kleiner Probenvolumina (ca. 14µl) ist möglich, weil bei Präparation und Färbung weniger Zellverlust auftritt, als bei anderen Verfahren (Darzynkiewicz et al., 1999a).

Nach Ansicht vieler Autoren wiegen die oben genannten Vorteile die Nachteile gegenüber der FCM (die relativ langsame Zellmessrate oder vergleichsweise geringe Anzahl einsetzbarer Fluorochrome) wieder auf (Mittag et al., 2005). Bei der FCM sind derzeit bis zu 17, bei der LSC bis zu 8 Farbstoffe mit 3 Lasern simultan einsetzbar (Perfetto et al., 2004).

Mit steigender Anzahl messbarer Zellcharakteristika in Kombination mit morphologischen Untersuchungen stellt sich die multiparametrische Zellanalyse mit Hilfe Objektträger-basierter Verfahren wie der LSC als hervorragendes Analysewerkzeug für den klinischen Alltag dar (Mittag et al., 2006).

4.2.1 Zelldichte und Einzelzellerfassung

Die Zellen müssen untereinander über einen bestimmten Abstand verfügen, um vom LSC als einzelne Zellen erkannt zu werden.

Da es sich bei den kultivierten und vor allem bei den auf den Objektträgern subkultivierten Zellen nicht ausschließlich um Einzelzellen, sondern mitunter um ganze Monolayerflächen von 1-2 mm² Größe handelte, lagen die Zellen in den Chamber slide Kulturen meist sehr dicht beieinander.

Durch die Relokation von Zellen mit besonders hohen Fluoreszenzwerten war es möglich, Mitosen von Zellhaufen abzugrenzen. Dadurch konnten falsch positive Ergebnisse individuell korrigiert werden (Darzynkiewicz et al., 1999a).

Besonders dichte Zellcluster wurden ab einer bestimmten Größe als eine große Zelle mit hohem PI-Gehalt erkannt. Durch Veränderung des Schwellenwertes (Thresholds) war eine Korrektur dieses Fehlers möglich (siehe Abb. 30a bis 30f, Seite 78). Durch Anhebung des Schwellenwertes konnten mehr Ereignisse als Einzelzellen erkannt und getriggert werden. Dies bezieht sich vor allem auf die großen, eng gewachsenen Zellhaufen. Für bereits zuvor als solche erkannte Einzelzellen sinkt die Erkennungsrate deutlich ab.

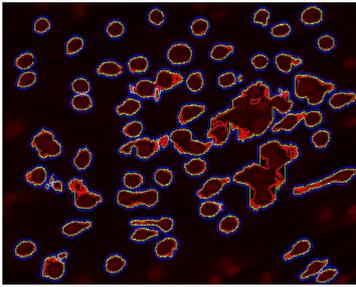


Abb.30a Mikroskopische Ansicht der „Scan Data“. Darstellung der getriggerten Zellen (bunt umringte Strukturen) bei einem Schwellenwert („Threshold“) von **800**

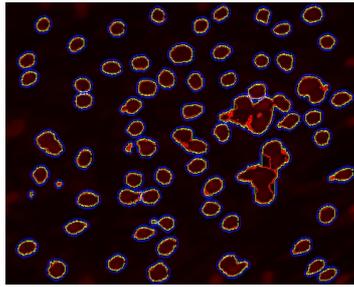


Abb.30b Mikroskopische Ansicht der „Scan Data“. Darstellung der getriggerten Zellen (bunt umringte Strukturen) bei einem Schwellenwert („Threshold“) von **1000**

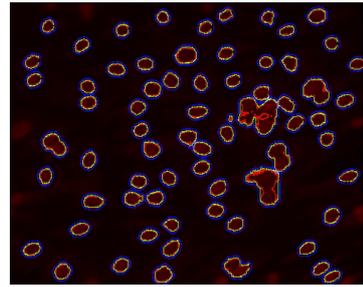


Abb.30c Mikroskopische Ansicht der „Scan Data“ . Darstellung der getriggerten Zellen (bunt umringte Strukturen) bei einem Schwellenwert („Threshold“) von **1200**

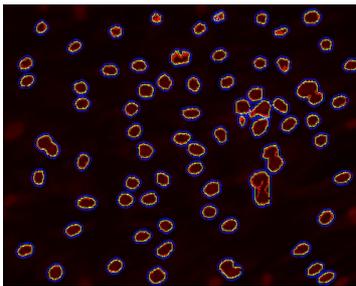


Abb.30d Mikroskopische Ansicht der „Scan Data“. Darstellung der getriggerten Zellen (bunt umringte Strukturen) bei einem Schwellenwert („Threshold“) von **1800**

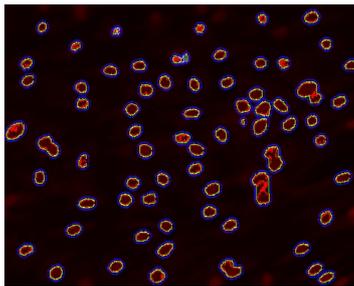


Abb.30e Mikroskopische Ansicht der „Scan Data“. Darstellung der getriggerten Zellen (bunt umringte Strukturen) bei einem Schwellenwert („Threshold“) von **2500**

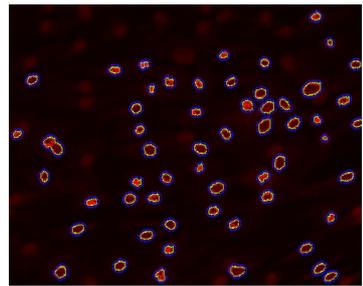


Abb.30f Mikroskopische Ansicht der „Scan Data“. Darstellung der getriggerten Zellen (bunt umringte Strukturen) bei einem Schwellenwert („Threshold“) von **3000**

Eine individuelle Anpassung des Schwellenwertes jedes Gesichtsfeldes war technisch nicht möglich. Daher wurde ein mittlerer Schwellenwert von 1200 als Standard definiert. Bei diesem Wert zeigte sich, dass die Verluste sowohl der Einzelzellen als auch der Zellhaufen am geringsten waren. Das Auftreten dieser Zellclusterfehlmessungen konnte nie ganz verhindert werden.

Das LSC verzeichnete bei besonders großen und dicht gewachsenen Zellclustern im Punktwolkendiagramm X- versus Y-Position stattdessen freie Flächen, sogenannte „Gaps“, wie sie in Abb. 31a zu sehen sind. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (ScanData) dieser Areale zeigte vorhandene Zellen, die nicht getriggert und damit nicht erfasst wurde (Abb. 31b). Damit schieden die besonders dicht besiedelten Areale und deren potentielle Messdaten als Ergebnisse aus. Bei genauerer Untersuchung der Gaps in den zellbasierten Punktwolkendiagrammen X-Position versus Y-Position (zum Beispiel Abb. 32a, Seite 83) fanden sich im Randbereich der „Gaps“ Zellen mit hohem DNA-Gehalt, die weder den G_0/G_1 -, noch den G_2 -Zellen zugeordnet werden konnten (blaue Punktwolke Abb. 32c, Seite 82). Die isolierte Darstellung dieser Zellen (Abb. 32d, Seite 82) bestätigte die Lokalisation am Rand der Gaps. Eine Untersuchung der Ausprägung der alkalischen Phosphatase in diesem Bereich (Abb. 32b, Seite 81) zeigte, dass sich im Zentrum der Gaps besonders hohe AP-Konzentrationen (Pfeile) fanden. Dies bestätigte die Vermutung, dass es sich hier nicht um zellfreie Areale, sondern um dichte Zellcluster Gewebe handelte, die nicht mehr vom LSC getriggert werden konnten. Die multiparametrische Analyse unter Punkt 4.2.6 führt dies noch genauer aus.

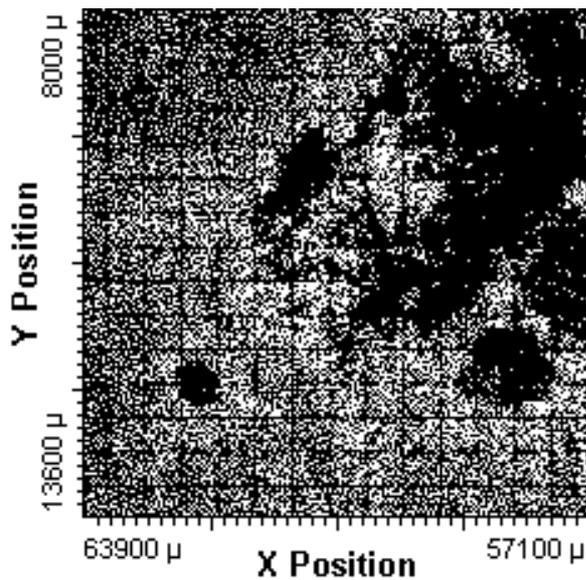


Abb.31a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der PI-Fluoreszenz bei Einzelzellmessung auf dem Objektträger. Die große Fläche am oberen rechten Rand, die sich bis zur Mitte des Messareals zog, in der mittels der Einzelzellerfassung mit den Standardtriggereinstellungen keine Zellen erfasst werden konnten, erwies sich bei Analyse der Scandata (Abb. 31b) als zu dicht besiedelt, so dass keine Triggerung möglich war: „Gaps“.

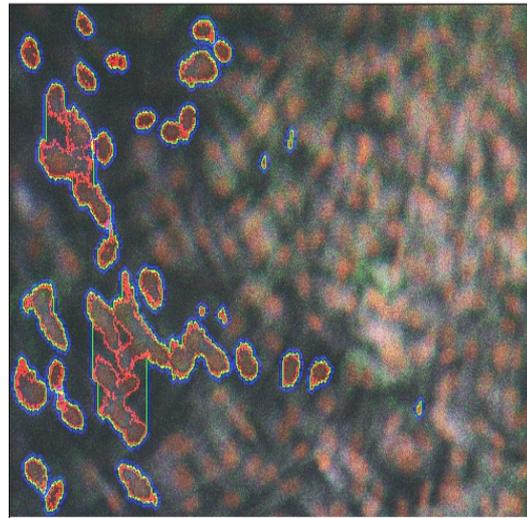


Abb.31b zeigt die Scan Data mit Triggerkonturen. In der linken Bildhälfte wurden Zellen als solche erkannt und mit einer mehrfarbigen Triggerkontur umrandet. In der rechten Bildhälfte (unscharfe Bildkontur) finden sich rote Punkte, die der PI-Fluoreszenz entsprechen, die an Zellkerne (DNA) gebunden hatte. Die grüne und blaue Fluoreszenz entsprach Alkalischer Phosphatase (ELF-97-Fluoreszenz) und Osteocalcin (APC-Fluoreszenz). Insgesamt erkennt man, dass aufgrund der hohen Dichte nur ein geringer Teil der Zellen als solche erkannt und getriggert wurden (linke Bildhälfte). Im Zellcluster in der rechten Bildhälfte wurden Einzelzellen nicht als solche erkannt und analysiert und blieben daher bei der Analyse unberücksichtigt.

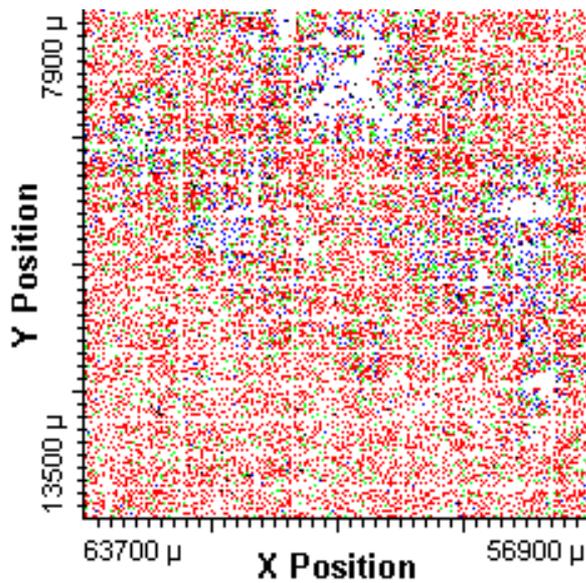


Abb.32a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der PI-Fluoreszenz bei Einzelzellmessung auf dem Objektträger. Rot= G_0 - und G_1 -Zellen, Grün= G_2 -Zellen, Blau: „Riesenzellen“ im Randbereich der Gaps. Die „Riesenzellen“ entsprechen großen Zellansammlungen, die zusammen als eine Zelle getriggert wurden. Die farbliche Kennzeichnung entspricht der Auftrennung der Zellpopulationen in Abb.33c. Deutlich erkennbar: „Fluoreszenzfreie“ Flächen („Gaps“), analog zu den „Hotspots“ der ELF-Phantommessungen (s. Abb.32b). Nach Auswertung der Phantommessungen desselben Areals zeigte sich, dass es sich bei den „Gaps“ nicht um zellfreie Areale, sondern um solche mit zu dichter Besiedelung für die Triggerung handelte.

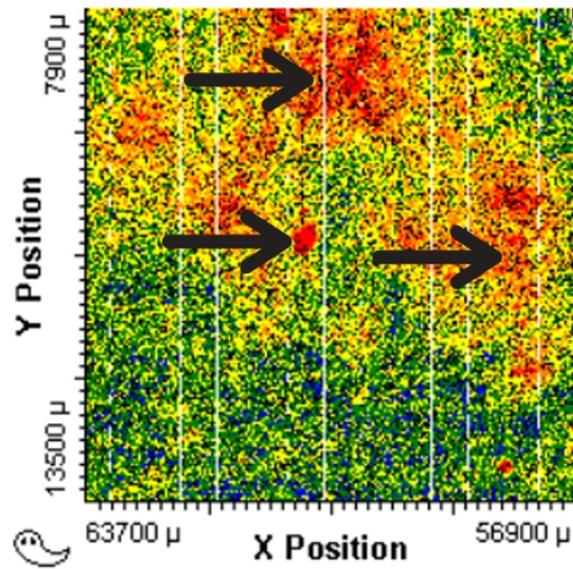


Abb.32b 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der ELF-97-Fluoreszenzen bei Phantommessung auf dem Objektträger. Starke Fluoreszenzen erschienen gelb bis rot, schwache grün bis blau. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke findet sich im Histogramm in Abb.29b. Die Pfeile deuten auf Zentren mit besonders hoher ELF-97-Aktivität („Hotspots“). Ihre Lage entsprach in etwa den „Gaps“ bei der PI-Einzelzellmessung (Abb. 32a). Dies zeigte, dass die zellfreien Areale der Einzelzellmessung eben nicht zellfrei, sondern, wie Abb. 31a und 31b zeigen, zu dicht besiedelt sind, als dass eine Einzelzellerkennung möglich war. Durch die Phantommessung konnten die Fluoreszenzen eindeutig erfasst werden.

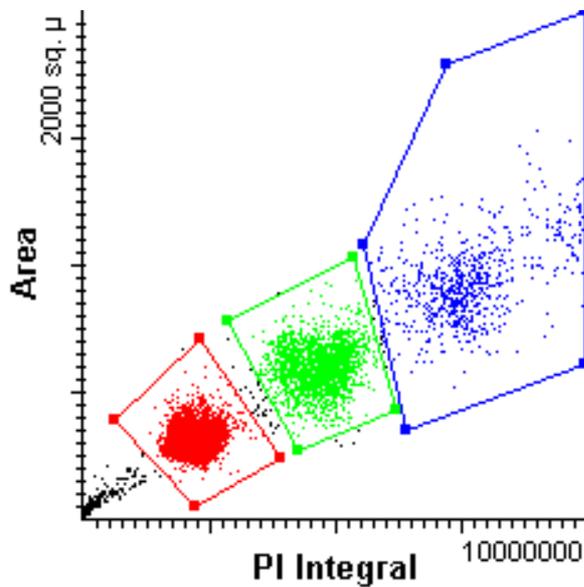


Abb.32c Punktwolkendiagramm zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen PI-Fluoreszenzstärke (PI-Integral) und Zellgröße (Area) diploider Zellen (rot), tetraploider Zellen (grün) und „Riesenzellen“ (Blau). Die „Riesenzellen“ entsprachen großen Zellansammlungen, die zusammen als eine Zelle getriggert wurden. Um die verschiedenen Populationen isoliert untersuchen zu können, werden sie mittels „Gates“ (bunte Polygone) voneinander getrennt. Dabei sind die G₀- und G₁-Zellen durch das rote Polygon, die G₂-Zellen durch das grüne Polygon und die „Riesenzellen“ durch das blaue Polygon markiert. Die isolierte räumliche Verteilung dieser Zellen auf dem Objektträger ließ sich aus Abb. 32d ablesen.

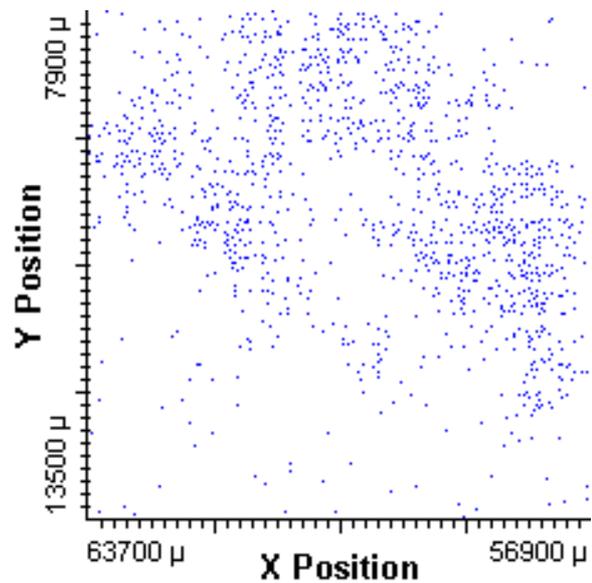


Abb.32d 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der PI-Fluoreszenz der „Riesenzellen“ (blau) bei Einzelmessung auf dem Objektträger. Die „Riesenzellen“ entsprachen großen Zellansammlungen, die zusammen als eine Zelle getriggert wurden. Besonders viele dieser Zellen fanden sich im Randbereich der „Hotspots“ bzw. der „Gaps“ (s. Abb. 32b), also im Übergang zu den Bereichen, in denen keine Einzelerfassung möglich war.

Das Phantomcontouring wurde als Alternative zur zellgetriggerten Fluoreszenzerfassung verwendet. Megyeri et al. führten 2005 pharmakodynamische Untersuchungen mit Hilfe dieses Verfahrens durch (Megyeri et al., 2005). Die Phantommethode lieferte im Rahmen der vorliegenden Arbeit Daten über die Verteilung der Fluoreszenz und damit über die Verteilung von DNA, Alkalischer Phosphatase und Osteocalcin. Die Phantommessungen lassen aber keine Rückschlüsse auf eine intra- oder extrazelluläre Lokalisation zu. Derartige Informationen können bislang nur durch zellgetriggerte Verfahren gewonnen werden. Durch Kombination von Phantom- und Zelldaten könnten aber entsprechende Informationen über Zellen und Extrazellulärmatrix gewonnen werden.

4.2.2 Propidiumiodid

Bei der Analyse der Einzelzellen eignete sich PI als Trigger, weil es für DNA hochspezifisch ist und der Färbeprozess leicht vorzunehmen war. Wie bereits Flow-Cytometrische- und andere Objektträger-basierte Verfahren zeigten, kann die Bestimmung des DNA-Gehaltes Informationen über den Zellzyklus und die Proteine, die an dessen Regulation beteiligt sind, enthüllen (Douglas et al., 1995; Kalejta et al., 1997). Gorczyca et al. setzten bereits 1996 PI ein, um die Phasen des Zellzyklus mit dem LSC zu untersuchen (Gorczyca et al., 1996a).

Vor Beginn der Mehrfachmessungen wurden Vorversuche mit unterschiedlichen Konzentrationen von PI (5 µg/ml, 7 µg/ml, 8 µg/ml, 8,5 µg/ml, 9,5 µg/ml, 10 µg/ml) durchgeführt, um die optimale Konzentration zu ermitteln. Im Idealfall wird zur Konzentrationsermittlung nur eine einzige Probe verwendet. Sie würde nacheinander mit unterschiedlich hohen Antikörper-Konzentrationen inkubiert, nachdem dieser vorher wieder vollständig entfernt wurde. Da PI nach Angaben von BD Biosciences durch Interkalierung relativ fest an DNA und RNA bindet, ist seine restlose Entfernung aus der Probe zur Schaffung konstanter Ausgangsbedingungen überaus aufwendig. Deshalb wurden in diesem Fall zur Konzentrationsermittlung unterschiedliche Proben verwendet. Der Vergleich der ermittelten PI-Integral-Histogramme (siehe Abb. 33a und 33b, Seite 84) zeigte bei ausreichender Konzentration die für PI typische Auftrennung mit dem charakteristischen Doppelgipfel.

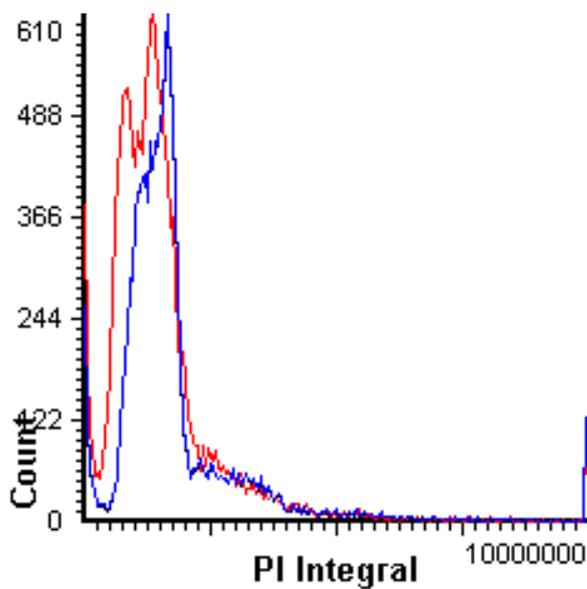


Abb.33a zeigt ein Histogramm zur Verlaufsdokumentation des Effektes der Inkubationszeitverlängerung bei zu geringer PI-Konzentration ($c=5\mu\text{g/ml}$) (Standardkonzentration: $c=10\mu\text{g/ml}$). Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz (PI-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert analog zu einer hohen Fluoreszenzstärke ist.. Die rote Kurve entspricht den Messwerten nach 30 Minuten, die blaue Kurve wurde nach 120 Minuten Inkubationszeit gemessen. Die Verlängerung der Inkubationszeit konnte den Effekt zu geringer PI-Konzentration nicht ausgleichen. Auch nach 120 Minuten hatte die Fluoreszenzkurve nicht annähernd die typische Doppelgipfel-Form, wie sie in Abb. 33b zu sehen ist.

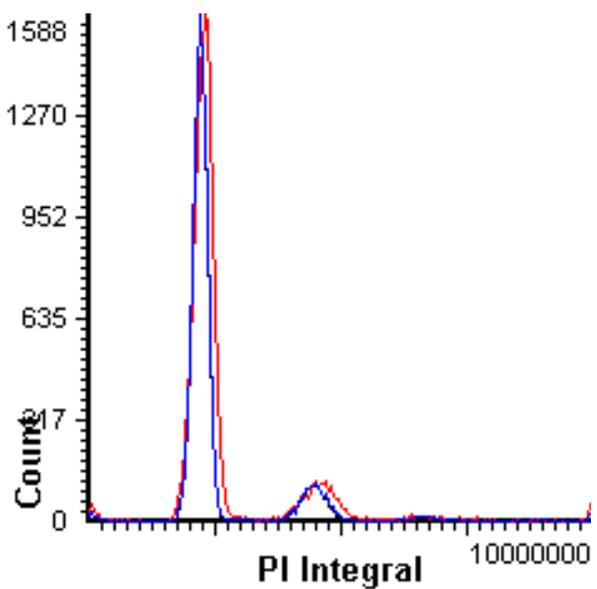


Abb.33b zeigt ein Histogramm zum Vergleich der PI-Inkubationszeiten bei Standardkonzentration ($c=10\mu\text{g/ml}$). Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz (PI-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert analog zu einer hohen Fluoreszenzstärke ist.. Die rote Kurve entspricht den Messwerten nach 30 Minuten, die blaue Kurve denen nach 120 Minuten Inkubationszeit. Die Verlängerung der Inkubationszeit veränderte das Ergebnis nicht. Sowohl die rote als auch die blaue Kurve bildeten die typische Fluoreszenzsignatur des PI mit hohem, schmalen Gipfel der G_0 - und G_1 -Zellen und breitem, flachem Gipfel der G_2 -Zellen.

Der Peak geringgradiger Fluoreszenzintensität steht für die Zellen, die sich in der G_0 - beziehungsweise G_1 -Phase befinden und einen diploiden Chromosomensatz besitzen. Demgegenüber sind G_2 -Zellen und mitotische Zellen mit tetraploidem Chromosomensatz in Form des Peaks mit hoher Fluoreszenzintensität dargestellt. Zwischen beiden Gipfeln liegen die S-Phase-Zellen, die generell nur in geringer Zahl gefunden werden.

Bei Inkubation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ PI konnte keine ausreichende beziehungsweise gleichmäßige DNA-Färbung erreicht werden. Das Histogramm in Abb. 33a zeigt auch nach 2 Stunden Inkubationszeit nicht die typische Integralform. Bei Verwendung von 10 $\mu\text{g/ml}$ PI war die typische Kontur des PI-Integrals bereits nach 30 Minuten nachweisbar (Abb. 33b), so dass mit dieser Konzentration eine optimale DNA-Färbung gewährleistet war.

Der Hersteller empfahl eine Inkubationszeit von 15 Minuten. Diese Empfehlung galt für Flow-Cytometrische Verfahren und Zellsuspensionen. Bei dem verwendeten Material handelte es sich um eng beieinander liegende Zellen, die durch Extrazellulärmatrix verbunden waren und somit ein annähernd solides Gewebe darstellten. Daher bestand eine Diffusionsbarriere, für deren Überwindung eine längere Inkubationsphase notwendig war, so dass 15 Minuten zu keiner ausreichenden Färbung führten. Weitere Versuche ergaben, dass 30 Minuten Inkubationszeit ausreichend waren, um eine suffiziente Färbung zu erreichen (siehe Abb. 33b).

Im Falle des Beispiels in Abb. 34a kam es trotz ausreichender Konzentration (10 $\mu\text{g/ml}$ PI) nicht zu einer homogenen Färbung. Das PI-Integral (Abb. 34a, Seite 86) ließ die typische Doppelgipfeligkeit vermissen. In diesem Fall konnte durch eine Verlängerung der Inkubationszeit bis 24 bzw. 48 Stunden eine homogene Verteilung von PI erreicht werden. Mit andauernder Inkubationszeit kristallisierte sich im PI-Integral der erwünschte Doppelgipfel heraus (Abb. 34c, Seite 86).

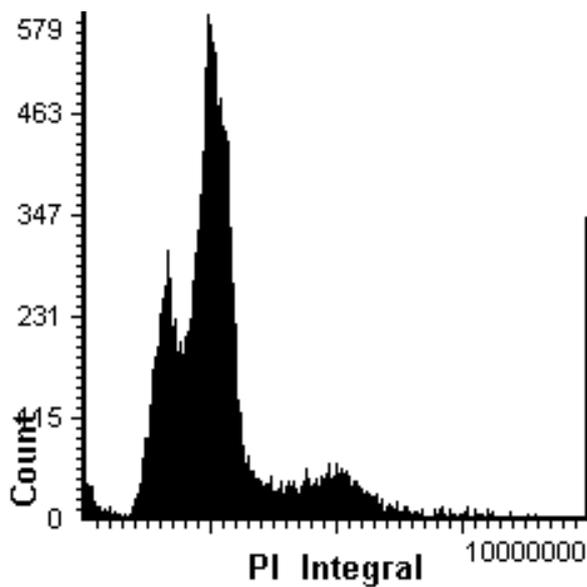


Abb.34a zeigt ein Histogramm der PI-positiven Ereignisse bei der Einzelzellmessung bei Standardkonzentration ($c=10\mu\text{g/ml}$) nach 30 Minuten Inkubationszeit. Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz (PI-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert analog zu einer hohen Fluoreszenzstärke ist. Die abgebildete Kurve entsprach trotz Standardbedingungen nicht der typischen PI-Fluoreszenzkurve (s. Abb.33b). Daraufhin wurde die Inkubationszeit verlängert (s. Abb. 34b und 34c).

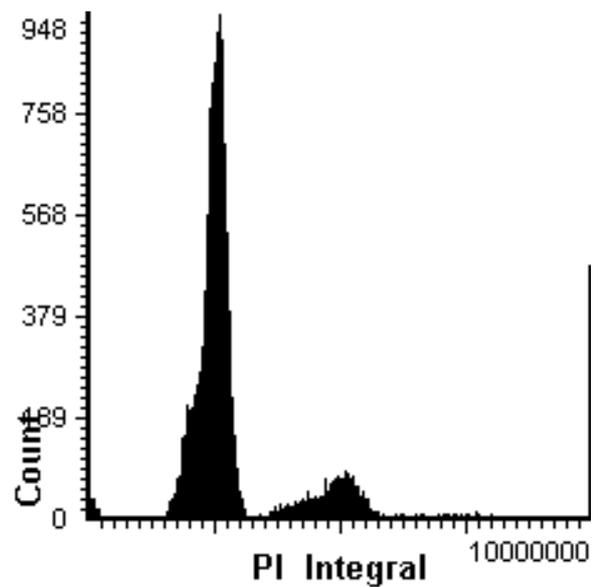


Abb.34b zeigt das Histogramm der PI-positiven Ereignisse der Einzelzellmessung bei Standardkonzentration ($c=10\mu\text{g/ml}$) derselben Probe wie in Abb. 34a, aber nach 24 Stunden Inkubationszeit. Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz (PI-Integral) aufgetragen, wobei ein hoher Integralwert analog zu einer hohen Fluoreszenzstärke ist. Die abgebildete Kurve entsprach trotz Standardkonzentration und verlängerter Inkubationszeit noch nicht der typischen PI-Fluoreszenzkurve (s. Abb.33b). Daraufhin wurde die Inkubationszeit erneut verlängert (s. Abb. 34c).

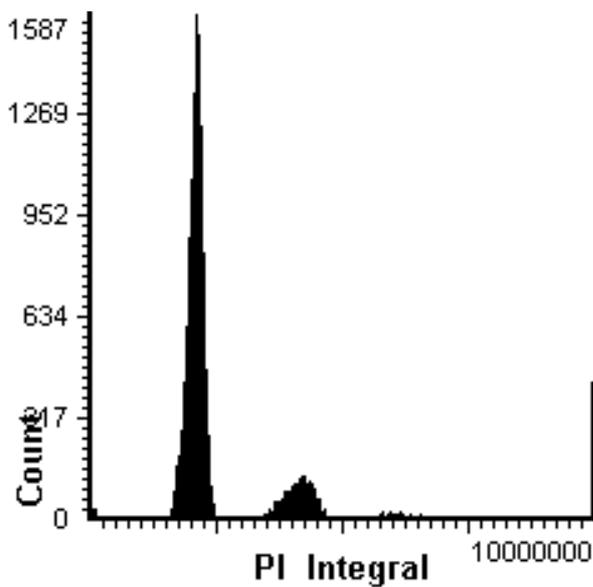


Abb.34c zeigt das Histogramm der PI-positiven Ereignisse bei der Einzelzellmessung bei Standardkonzentration ($c=10\mu\text{g/ml}$) derselben Probe wie in Abb. 34a und Abb. 34b, aber nach 48 Stunden Inkubationszeit. Auf der Ordinate ist die Anzahl positiver Ereignisse (Count), auf der Abszisse die Helligkeit der PI-Fluoreszenz (PI-Integral) abgebildet, wobei ein hoher Integralwert analog zu einer hohen Fluoreszenzstärke ist. Nach 48h Stunden entsprach die PI-Fluoreszenzkurve der Standardkurve (s. Abb. 33b). Die nötige Verlängerung der Inkubationszeit hing möglicherweise mit der hohen Zelldichte zusammen (s. Abschnitt 4.2.2).

Da PI im Rahmen der Dreifachfärbung als Verdünnungssubstanz eingesetzt wurde, betrug die Inkubationszeit 28 bis 30 Stunden. Dies garantierte (von wenigen Ausnahmen abgesehen) eine homogene PI-Inkubation des Testfeldes und damit eine zuverlässige Voraussetzung für die Triggerung.

Die Abgrenzung bestimmter Abschnitte von Integralen oder Objekträgerarealen („Gaten“) als etabliertes Werkzeug im Rahmen der LSC-Datenanalyse war problemlos möglich (zum Beispiel Abb. 32c auf Seite 83). Bei der Beurteilung der Fluoreszenzintensität (PI-Integral) in Bezug auf die Zellgröße (Area) ließen sich teilungsaktive Zellen von ruhenden Zellen anhand dieser beiden Parameter unterscheiden: Mitotische G_2 -Zellen haben wegen ihres tetraploiden Chromosomensatzes eine höhere Fluoreszenzintensität (grüne Punktvolke) als ruhende G_0 - und G_1 -Zellen mit diploidem Chromosomensatz (rote Punktvolke). Durch diese Art der Selektion war es möglich, G_0 - und G_1 -Zellen zu isolieren und zu bewerten.

Mit Hilfe der Colorierungsfunktion der WinCyte-Software war die topographische Verteilung der Zellen im Punktwolkendiagramm X- versus Y-Position (Abb. 32a,

Seite 82) gut darstellbar. Dass diese Art der Zellselektion zuverlässig funktioniert und es sich um Einzelzellen ohne Mitoseaktivität handelte, zeigten bereits die Untersuchungen von Martin-Reay et al., 1994 und Sasaki et al., 1996.

Bei allen weiteren zellgetriggerten Messungen wurde nur die Gruppe der G₀- und G₁-Zellen analysiert, weil sie von den vorhandenen Zellpopulationen am besten als homogene Gruppe abgrenzbar war. Die Auftrennung von G₂-Zellen und falsch getriggerten Zellen (= nahe beieinander liegende Zellgruppen, siehe Punkt 4.2.1, Seite 78ff.) war durch das Punktwolkendiagramm nicht eindeutig möglich, wie eine mikroskopische Einzelzellanalyse zeigte.

4.2.3 ELF-97

Dass Alkalische Phosphatase als Marker für osteoblastäre Differenzierung und Knochenmetabolismus geeignet ist, gilt seit dem Erscheinen der beiden Übersichtsarbeiten von Aubin et al. und Christenson als erwiesen (Aubin et al., 1995; Christenson, 1997).

Cox et al. verwendeten ELF-97 1999 zum Nachweis von AP im Rahmen immunhistochemischer Untersuchungen (Cox et al., 1999). Im selben Jahr veröffentlichten Telford et al. eine Publikation, in der sie auf die Eignung von ELF-97 für die Flow-Cytometrie hinwiesen (Telford et al., 1999).

Laut Hersteller sollten unterschiedliche Verdünnungen von 1:20, 1:30 und 1:40 getestet werden, um die optimale Konzentration zu ermitteln. Cox et al. untersuchten die Konzentrationen 1:20 und 1:40, Telford et al. begnügten sich mit der Verwendung der Verdünnung 1:20.

Nach Angaben des Herstellers soll sich eine Reaktion nach 30-90 Sekunden beobachten lassen. Cox et al. bestätigten dies in ihrer Arbeit. Telford et al. wiesen auf eine Verstärkung des ELF-97-Signals zwischen 1 und 30 Minuten hin.

Die vom Hersteller empfohlene Zeit konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse entsprachen eher denen von Telford et al., übertrafen diese mit 180 Minuten dennoch deutlich.

Dieses Ergebnis erklärt sich durch die ermittelte hohe Zelldichte und die Tatsache, dass es sich um ein Gewebe mit osteoblastären Zellen und einer intakten Extrazellulärmatrix handelt. Die Extrazellulärmatrix hat eine Barrierefunktion und erschwert die Diffusion der

ELF-97-Moleküle, wie auch die aller anderen Fluoreszenzen (unter anderem PI). Daraus ergab sich die verlängerte Reaktionszeit.

Sowohl Cox et al. als auch Telford et al. verwendeten in ihren Versuchen Osteosarkomzellen oder Zebrafischpräparate. Sie beschrieben Alkalische Phosphatase als intrazellulär gelegenes und geordnet in Vesikeln vorhandenes Protein.

Bei der vorliegenden Arbeit wurden osteoblastäre Zellen im Zellverbund mit intakter extrazellulärer Matrix untersucht. Auch hier konnte bei der Fluoreszenzmikroskopie Alkalische Phosphatase in Form intrazellulärer Vesikel nachgewiesen werden (siehe Abbildung 23, Seite 65). Durch die Nähe der Zellen zueinander und die intrazelluläre Verteilung der AP-Vesikel war die Einzelzellerfassung mittels ELF-97-Messung nicht möglich. Ein Zellkonglomerat bestehend aus 5 dicht gelegenen Einzelzellen wurde nicht als solches, sondern als eine große Zelle erkannt.

Bei genauerer Betrachtung fiel auf, dass sich auch extrazellulär ungeordnete und größenvariable, aber schwache ELF-97-positive Signale erfassen ließen. Diese Ansammlungen von AP waren nicht systematisch erfassbar. Die extrazellulären ELF-97-Signale deuteten darauf hin, dass Alkalische Phosphatase auch extrazellulär zu finden war. Gemäß den unter Punkt 1.19 (Seite 27) erläuterten Voraussetzungen bedarf es eines punktuellen Triggersignals, mit definiertem Schwellenwert und einer einheitlichen Mindestgröße, um vom LSC als Objekt erkannt zu werden. Da diese Bedingungen weder von den intrazellulär-, noch von den extrazellulär-ELF-97-positiven Ereignissen einheitlich erfüllt wurden, stellte sich bereits während der ersten Messversuche heraus, dass ELF-97 sich nicht als zelluläre Triggersubstanz eignete. Größe, Lage und Anordnung der AP-Ansammlungen war zu variabel, der Schwellenwert nicht einheitlich festlegbar. Um die Alkalische Phosphatase dennoch messen und die Ergebnisse verwerten zu können, wurde auf eine zellgetriggerte Erfassung verzichtet und statt dessen Phantome als Platzhalter verwendet. Megyeri et al. verwendeten 2005 das Phantom-Contouring, um den Einfluss von Medikamenten auf Tumorzellen zu untersuchen. Die Versuchsanordnung bestand aus einer zufälligen Verteilung der Phantome im Gegensatz zur regelmäßigen Anordnung, die für diese Arbeit verwendet wurde (Megyeri et al., 2005). Megyeri et al. verwendeten eine Regionsunterteilung des Fluoreszenzintegrals, um die Enzymaktivität auf dem Objektträger zu verdeutlichen, was auch bei der vorliegenden Arbeit genutzt wurde. Die wiederholten Messungen zeigten die enzymatische Aktivität der Reaktionspartner auf dem Objektträger und das

Fortschreiten der Reaktion (Gerstner et al., 2006a). Diese Art von "Enzymkinetik" von ELF-97 in solidem Knochengewebe könnte für weitere Untersuchungen des Proliferationsverhaltens von Knochengewebe in vitro mit dem LSC verwendet werden.

4.2.4 Doppelfärbung PI und APC

Zur Vorbereitung der Inkubation mit dem Primärantikörper, der sich gegen humanes Osteocalcin (OC) richtete, wurde ein Objektträger für 60 Minuten in eine Mischung aus PBS und 1 %igem Bovinem Serum Albumin (BSA) getaucht, um freie Epitope zu blocken und die Anzahl der falsch positiven Messergebnisse klein zu halten. Anschließend wurde die Probe 30 Minuten in einer Lösung aus PBS und 0,1 %igem BSA belassen, um überschüssiges BSA zu entfernen.

Nach der Inkubation mit dem Osteocalcin-Antikörper für 24 Stunden schloss sich eine 10 minütige Verweilzeit im PBS-Bad an, ehe das Präparat mit dem Sekundärantikörper (APC-assoziiertes IgG₁) für 1 Stunde inkubiert wurde. Beide Antikörper wurden in PI (10 µg/ml) gelöst. PI wurde als Triggersubstanz zugesetzt. Damit entsprach seine Inkubationszeit denen der beiden Antikörper (24 Stunden, 1 Stunde).

In Vorversuchen wurden die optimale Antikörperverdünnung und die beste Konzentration beider Antikörper in Kombination ermittelt (OC 1:100 und APC 1:100). Dabei wurden Primär- und Sekundär-AK jeweils in folgenden Verdünnungen miteinander kombiniert: 1:200, 1:100, 1:50. Sowohl Primär- als auch Sekundär-AK wurden im Verhältnis 1:50, 1:100, 1:200, mit PI (10 µg/ml) verdünnt, miteinander kombiniert und gemessen.

Um festzustellen, ob der APC-Antikörper spezifisch reagierte, wurde in einer Versuchsreihe ein Negativ-Positiv-Abgleich durchgeführt. Bei der „Negativ-Messung“ wurde der Objektträger nur mit dem sekundären APC-Antikörper inkubiert. Nach der Negativmessung wurde der Objektträger für 30 Minuten in einem PBS-Bad belassen, um die APC-Fluoreszenzmoleküle aus zu waschen. Darauf folgte der reguläre Inkubationsprozess mit dem primären OC-Antikörper und erneut mit dem sekundären APC-Antikörper. Der Negativ-Positiv-Abgleich (dargestellt in Abb. 19 auf Seite 58) ergab einen unspezifischen APC-Nachweis. In der Probe, die nicht mit dem OC-AK inkubiert worden war, wurde ein geringgradiges APC-Signal gemessen (Abb. 19, blaue Kurve). Nach Inkubation mit dem sekundären APC-Antikörper (Abb. 19, rote Kurve) zeigte sich eine Rechtsverschiebung der Kurve. Diese Rechtsverschiebung ließ sich anhand der 5

%-Cut-off-Analyse in Tabelle 4 und 5 nachweisen. Aus der Fluoreszenzverschiebung von 85,9 % nach rechts ergab sich, dass die OC-APC-Färbung spezifisch war.

Aufgrund der Vorversuche wurden für den Osteocalcin-Antikörper 24 Stunden und für APC 1 Stunde als Standardinkubationszeit festgelegt, wobei sowohl der primäre Osteocalcin-AK als auch der APC-assoziierte Antikörper in PI (10 µg/ml) gelöst waren.

In Hinblick auf die unter Punkt 5.2.1 diskutierten Probleme bei der PI-Färbung, die mit Diffusionsstörungen in Verbindung gebracht wurden, war die Verlängerung der PI-Inkubationszeit von Vorteil, weil sie sich positiv auf das Ergebnis auswirkte.

Da sich die Emissionsspektren beider Fluoreszenzen nicht überlappten

(PI: 562 nm-588 nm, APC: 660 nm-680 nm), konnten beide Fluorochrome parallel verwendet werden.

Auch Osteocalcin ist kein ausschließlich intrazellulär gelegenes Enzym, so dass als Zelltrigger PI verwendet wurde.

Wie aus den Abb. 26a und 37a (siehe Seite 69 und Seite 97) hervorgeht, fanden sich bei der Messung der APC-Fluoreszenzintensität regelmäßig Ergebnisse, die im Vergleich mit den beiden anderen Fluorochromverteilungen Unterschiede aufwiesen. Warum lagen Bereiche mit hoher Fluoreszenzstärke, also großer Proteinmenge dort, wo laut DNA-Scan vor allem inaktive G₀- und G₁-Zellen lagen und umgekehrt (Abb. 35a und 35b, Seite 95)? Dies wurde auf eine Fehlfunktion der Steuerung des Helium-Neon-Lasers zurückgeführt, die trotz wiederholter Messungen auftrat und nicht behoben werden konnte. Um fehlerfreie Messergebnisse zu bekommen, müssten weitere Untersuchungen mit einem anderen LSC durchgeführt werden. Für die These der Fehlmessung sprachen die Messergebnisse der phantombasierten Analysen. Bei diesen korrelierte die räumliche Verteilung aller drei gemessenen Fluoreszenzen miteinander (Abb. 35a-75b, Seite 95 bis 97).

4.2.5 Doppelfärbung PI und ELF-97

Um das Vorhandensein von alkalischer Phosphatase nachzuweisen, war es nötig, eine Fluoreszenz zu wählen, die eine zellgebundene Triggerung ermöglichte. Von den verwendeten Substanzen kam dafür nur PI in Frage, weil es obligat an intrazelluläre Strukturen (DNA) bindet. Da mit PI aber DNA und keine alkalische Phosphatase nachgewiesen werden kann, wurde parallel zur PI-Messung mit dem Phantom contouring alkalische Phosphatase gemessen. Telford et al. beschrieben 2001

eine Kombination unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe, unter anderem PI in Kombination mit ELF-97 als multiparametrischen Analyseansatz für die Durchflusszytometrie. Die spektralen Charakteristika beider Farbstoffe erlaubten eine gemeinsame und störungsfreie Verwendung (Telford et al., 2001).

Um ein deutliches Triggersignal durch PI zu generieren und für längere Zeit zu erhalten wurde PI vor und nach der ELF-97-Inkubation zugegeben. Zwischen den Inkubationsschritten wurde der Objektträger in ein PBS-Bad getaucht, um das Deckglas abzulösen und den nächsten Färbeschritt vorzubereiten.

Schließlich wurde dem Eindeckmedium PI zugegeben, um zuvor im PBS-Bad eventuell entfernte Fluoreszenzen nachzufärben, bevor das Deckglas fixiert wurde.

4.2.6 Dreifachfärbung mit PI, OC-APC und ELF-97

Am Beginn der multiparametrischen Analysen stand der Vergleich der zellbasierten PI-Fluoreszenzen mit den phantombasierten AP-Fluoreszenzen (siehe Absatz 4.2.1, Seite 78). Zunächst als Zufallsbefund aufgefallen, führte er zu einem systematischen Vergleich aller Fluoreszenzdaten und zu zusätzlichen Messungen, zum Beispiel einer PI- getriggerten Analyse der AP- und APC-Fluoreszenz, sowie einer Phantomanalyse der PI- und der APC-Fluoreszenzen.

Eine Besonderheit trat wiederholt im Rahmen der zellgetriggerten APC-Messungen auf (siehe Abb. 37a, Seite 97). Um die besonders zellreichen (nicht erfassten) Areale herum fand sich nur eine geringe und im Gegensatz dazu in der Peripherie eine besonders hohe Fluoreszenz (=Osteocalcinmenge).

Der Unterschied zwischen APC-Fluoreszenz und den übrigen Einzelzellanalysen bestand in dieser inversen Fluoreszenzverteilung des APCs.

Es war ein Verteilungsmuster entsprechend dem der übrigen Fluoreszenzen mit hohen Fluoreszenzwerte in den Randbereichen der Gaps und niedrigen Werte in der Peripherie erwartet worden.

Eine der atypischen, inversen APC-Einzelzellverteilung entgegen gesetzte Verteilung zeigte sich bei den APC-Phantommessungen (siehe Abb. 37b, Seite 97). Dieses Ergebnis wiederum entsprach den Analysen der übrigen Fluoreszenzmessungen (Abb. 35b,36b,37b, Seite 95 bis 97).

Die auffällige Verteilung der Einzelzellmessungen der APC-Fluoreszenzen wurde als Fehlanalyse im Rahmen eines Gerätefehlers gewertet.

Der Vergleich der jeweiligen Fluoreszenzdatenpaare (zell- versus phantomgetriggert) führte zu der Schlussfolgerung, dass die in den zellbasierten Messungen ermittelten Gaps mit den Hotspots der phantombezogenen Daten identisch waren (siehe Abb. 35a-37b, Seite 95 bis 97). Dabei darf nicht vergessen werden, dass die Einzellanalysen nur G₀- und G₁-Zellen einschlossen und die Ergebnisse der Phantommessungen darüber hinaus auch G₂-Zellen beinhalteten.

Die Einbeziehung der G₂-Zellen in den Vergleich mit den Phantomzellen war wegen der unter Punkt 4.2.1 (Seite 78ff.) erläuterten fehlerhaften Triggerung nicht möglich. Die Zellen wären nicht als einheitliche Population von fehlgetriggerten „Riesenzellen“ abzugrenzen gewesen. Insbesondere die Untersuchung der Hotspots in Hinblick auf Differenzierung von Einzelzellpopulationen und Interzellulärmatrix erschien interessant. Denn die Fluoreszenzverteilung der phantombezogenen Daten aller drei Fluoreszenzen zeigte im Zentrum der Hotspots besonders hohe Werte und damit besonders große Proteinmengen (daher „Hotspots“ Abb. 35b,36b,37b Seite 95 und 97). Voraussetzung für weitere Untersuchungen muss daher eine verbesserte Einzelzellerkennung sowohl der G₀- und G₁-Zellen als auch der G₂-Zellen sein. Sie könnte helfen, eine eindeutige Fluoreszenzzuordnung zu intra- oder extrazellulären Strukturen zu ermöglichen.

Das Vorkommen der Hotspots warf die Frage nach ihrem Ursprung auf. Wie konnten sie sich entwickeln? Warum finden sich gerade dort eine hohe Enzymaktivität und DNA-Dichte? Möglicherweise handelte es sich um Zellgruppen, die bereits beim Transfer von der Primärkultur zum Chamber slide als dichter Zell- bzw. Gewebeverband vorlagen. In der Chamber slide Kultur könnten diese dann über parakrine Stimulationsmechanismen einen höheren Wachstumsstimulus erhalten haben als die umgebenden Einzelzellen.

Im Zentrum der Hotspots könnten sich besonders gut differenzierte Zellen befunden haben. Möglicherweise handelte es sich bei ihnen nicht nur um osteoblastäre Zellen, sondern um reife Osteoblasten und Osteozyten. Die Hotspots könnten als Ossifikationszentren fungiert haben, von denen ausgehend die Entwicklung des umliegenden Gewebes parakrin gesteuert wurde. Der Beweis dieser Hypothese steht noch aus. Dazu bedarf es weiterer Untersuchungen, die nicht im Rahmen dieser Promotion durchgeführt werden konnten, da zunächst eine Methode entwickelt werden muss, die Zellen und die Interzellulärmatrix im Bereich der Hotspots zu untersuchen.

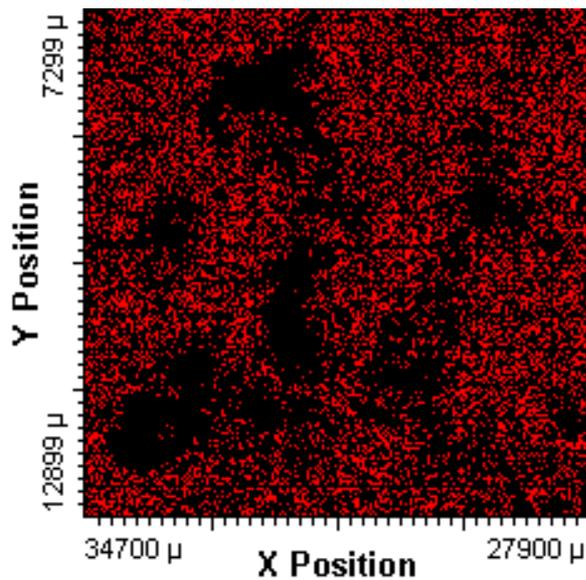


Abb.35a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der PI-Fluoreszenz (=DNA) bei Einzelzellmessung auf dem Objektträger. Rot= G_0 - und G_1 -Zellen. Die farbliche Kennzeichnung entspricht der Auftrennung der Zellpopulationen in Abb.24b. Insgesamt zeigte sich eine durchgehend dichte Fluoreszenz der G_0 - und G_1 -Zellen. Dies legte den Schluss nahe, der Objektträger sei dicht besiedelt. Es waren Areale zu erkennen, in denen keine Fluoreszenzaktivität gemessen werden konnte. Diese „Gaps“ fanden sich analog bei allen Einzelzellmessungen (Abb. 36a und 37a). Bei den Phantommessungen befanden sich an derselben Stelle die Bereiche höchster Fluoreszenzaktivität (Abb.35b, 36b, 37b).

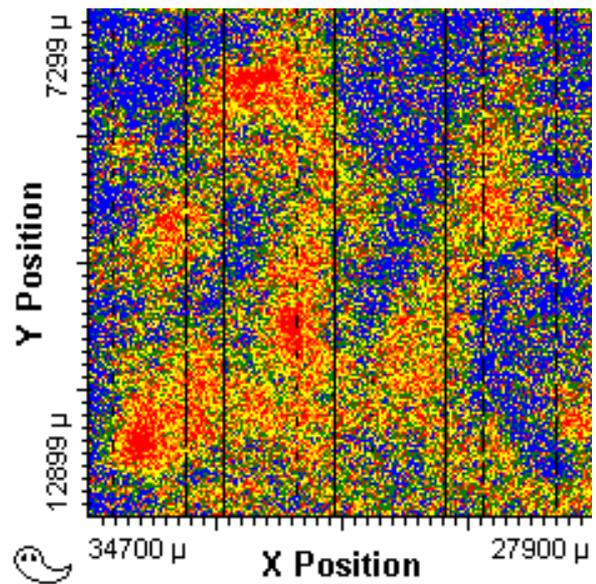


Abb.35b 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der PI-Fluoreszenz (=DNA) bei Phantommessung auf dem Objektträger. Starke Fluoreszenzen erschienen gelb bis rot, schwache grün bis blau. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke entspricht der des Histogramms in Abbildung 27b. Auffällig erschienen die Zentren mit besonders hoher Fluoreszenzaktivität („Hotspots“). Ihre Lage entsprach in etwa der der „Hotspots“ der PI- und APC-Messungen der Phantome (Abb. 36b und 37b) und der der „Gaps“ der Einzelzellmessungen aller drei Fluoreszenzen (Abb. 35a, 36a, 37a).

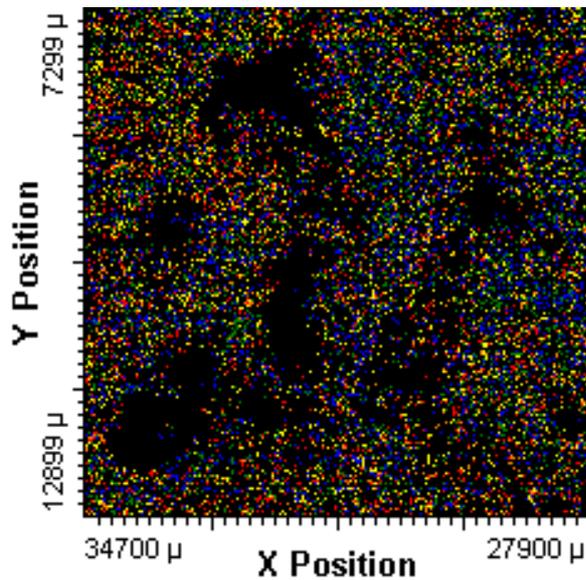


Abb.36a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der ELF-97-Fluoreszenz (Verteilung der Alkalischen Phosphatase) bei Einzelzellmessung auf dem Objektträger. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke entspricht der des Histogramms in Abbildung 25b. Insgesamt zeigte sich eine diffus verteilte Fluoreszenz. Im gesamten Messbereich waren fluoreszenzfreie Areale zu erkennen. Diese „Gaps“ fanden sich analog bei allen Einzelzellmessungen (Abb. 35a und 37a). Bei den Phantommessungen befanden sich an derselben Stelle die Bereiche höchster Fluoreszenzaktivität (Abb.35b, 36b, 37b).

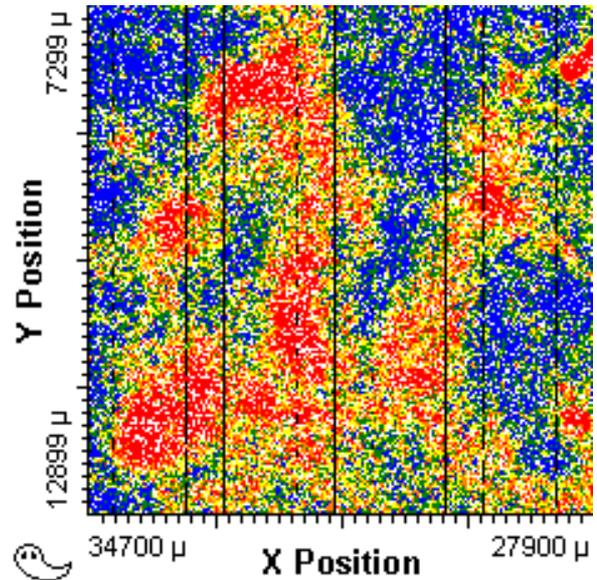


Abb.36b 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der ELF-97-Fluoreszenzen (Verteilung der Alkalischen Phosphatase) bei Phantommessung auf dem Objektträger. Starke Fluoreszenzen erschienen gelb bis rot, schwache grün bis blau. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke findet sich im Histogramm in Abbildung 28b. Es fielen vor allem die roten Zentren mit besonders hoher ELF-97-Aktivität („Hotspots“) auf. Ihre Lage entsprach in etwa der der „Hotspots“ der PI- und APC-Messungen der Phantome (Abb. 35b und 37b) und der der „Gaps“ der Einzelzellmessungen aller drei Fluoreszenzen (Abb. 35a, 36a, 37a).

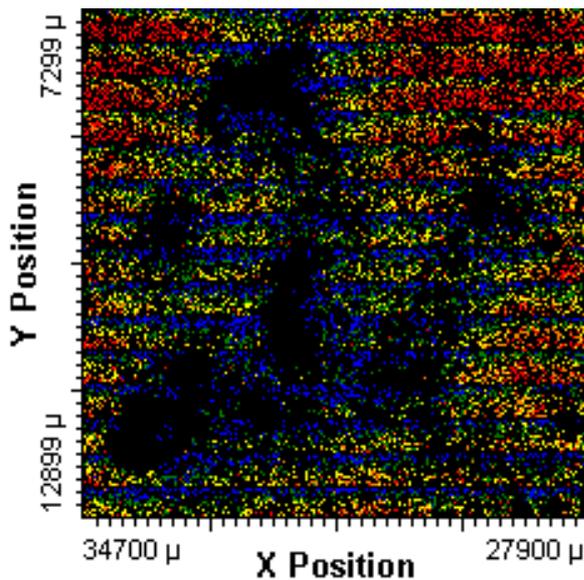


Abb.37a 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der APC-Fluoreszenz (Verteilung des Osteocalcins) bei Einzelzellmessung auf dem Objektträger. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke entspricht der des Histogramms in Abbildung 26b. Insgesamt zeigt sich eine dichte Fluoreszenz. Im gesamten Messbereich waren Areale zu erkennen, in denen keine Fluoreszenzaktivität gemessen werden konnte. Diese „Gaps“ fanden sich analog bei allen Einzelzellmessungen (Abb. 35a und 36a). Es zeigte sich im Randbereich der Lücken nur eine geringe, peripher dagegen eine sehr hohe Fluoreszenzaktivität. Die Fluoreszenzverteilung innerhalb eines Messquadrates wies eine horizontale Sortierung, oben beginnend mit den schwachen Fluoreszenzen, unten mit starken Fluoreszenzen auf. Die

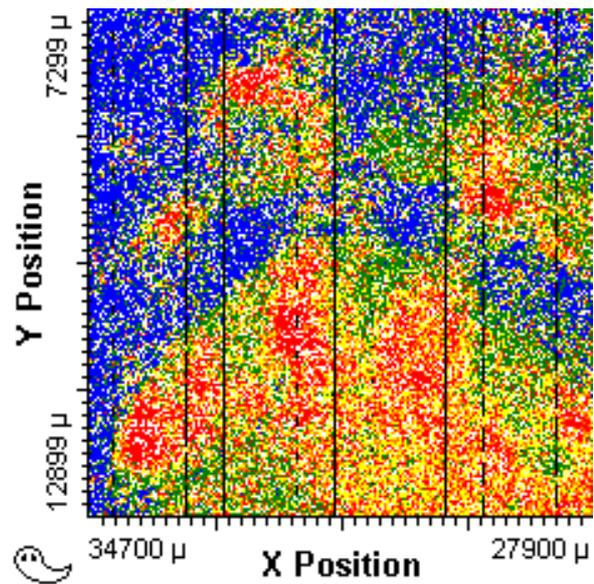


Abb.37b 2-dimensionale Karte einer LSC-Messung mit topographischer Verteilung der APC-Fluoreszenz (Verteilung des Osteocalcins) bei Phantommessung auf dem Objektträger. Starke Fluoreszenzen erschienen gelb bis rot, schwache grün bis blau. Die farbliche Abstufung der Fluoreszenzstärke findet sich im Histogramm in Abbildung 29b. Es fielen vor allem die roten Zentren mit besonders hoher APC-Aktivität auf. Ihre Lage entsprach in etwa der der Hotspots der PI- und ELF-97-Messungen der Phantome (Abb. 35a und 36a) und der der „Gaps“ der Einzelzellmessungen aller drei Fluoreszenzen (Abb. 35a, 36a, 37a).

Aneinanderreihung der einzelnen Messquadrate ergab horizontale Linien einer Fluoreszenz, die sich zeilenartig über das gesamte Messfeld zogen. Bei den Phantommessungen befanden sich an derselben Stelle die Bereiche höchster Fluoreszenzaktivität (Abb. 35b, 36b, 37b).

5. Zusammenfassung

Es besteht ein hoher Bedarf an Materialien für die rekonstruktive Chirurgie im Kopf-Hals-Bereich. Dem steht eine überschaubare Anzahl kompatibler Werkstoffe gegenüber. Die bislang verwendeten Materialien sind teuer, aufwendig herzustellen oder nicht immer ausreichend biokompatibel. Das optimale Verfahren wäre eine autologe Knochen-
transplantation. Aber auch hier steht meist zu wenig und nicht adäquat geformtes Material zur Verfügung, so dass nach Entnahme des Materials zunächst eine Vermehrung in vivo oder in vitro zielführend wäre.

Für das Verständnis und die Steuerung von in-vitro Prozessen bei der Vermehrung von Knochengewebe sind entscheidende Fragen nicht geklärt. Es ist bislang nicht gelungen, autologe Knochen-
transplantate mit stabiler Funktion in vitro zu züchten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Analyseverfahren zu entwickeln, um Knochen-
differenzierungsprozesse und deren Steuerbarkeit in vitro besser zu verstehen.

Dazu verwendeten wir Knochenvorläuferzellen aus dem Nasenknochen, die wir in vitro vermehrten und auf spezielle Objektträger, sog. Chamber slides züchteten. Anschließend wurden diese mit drei unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern inkubiert, um knochenspezifische Proteine und DNA nachzuweisen.

Die Arbeit belegt, dass eine Zucht von Zellen, die knochenspezifische Proteine exprimieren, auf Chamber slides möglich ist und die Zellen mit mindestens drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gleichzeitig inkubiert werden können. Außerdem wurde nachgewiesen, dass eine simultane Messung dieser drei Markersubstanzen möglich ist. Die Messergebnisse lassen Rückschlüsse auf Lage, Menge und Differenzierungsstatus der Zellen zu.

Die beschriebene Methode ist durch Einbeziehung eines Zellzählers vor Aussaat der Zellen auf die Chamber slides noch verbesserungsfähig. Dadurch sind auch quantitative Aussagen möglich. Das geschilderte Analyseverfahren kann somit eine Beurteilung der Knochenzucht und -differenzierung in vitro erleichtern.

6. Anhang

6.1 Materialliste

- Laser Scanning Cytometer (LSC), Fa. CompuCyte®, Boston, USA
- Reinraumbank: Hera Safe HS12, Fa. Heraeus, Hanau, DE
- Begasungsbrutschrank: Heraeus Cytoperm 2, Fa. Heraeus, Hanau, DE
- sterile Kulturflaschen (75cm² Bewuchsfläche) aus Polystyrol, Fa. Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, DE
- Kulturmedium: Dulbecco's Minimal Essential Medium (MEM), Fa. Biochrom AG, Berlin, DE
- Fetal Bovines Serum (FBS): Fa. Biochrom AG, Berlin, DE
- HEPES-Puffer: Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
- Trypsin: Schweinepankreas (gelöst in PBS), Fa. Biochrom AG, Berlin, DE
- Phosphate buffered Saline (PBS): Fa. Biochrom AG, Berlin, DE
- Zellschaber mit schwenkbarem Kopf: Fa. TPP, Trasadingen, CH
- Zentrifuge: Kendro Megafuge 1.0R, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, DE
- Chamber slides: Fa Nunc, Wiesbaden, DE
- Inversionsmikroskop: Typ IX50, Fa. Olympus, Hamburg, DE
- Schnell härtender Kunststoff: FixoGum, Fa. Marabu GmbH&CoKG, Tamm, DE
- Propidium Iodid (PI): Fa. BD Biosciences, Heidelberg, DE
- ELF-97 Endogenous Phosphatase Kit E6601: Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
- Monoklonaler Osteocalcin-Antikörper: Fa. R&D-Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, DE
- APC-assoziiertes Antikörper: Fa. Caltag, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornien, USA
- Zentrifuge für Eppendorf-Hütchen: EBA86, Fa. Hettich, Tuttlingen, DE

7. Literaturverzeichnis

- Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 1995; 17: 77-83
- Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* 1981; 211: 1052-1054
- Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res* 1989; 240: 270-280
- Bingham B, Kotnis S, Hendry-Rinde B, Shen R, Wood A, Kennedy JD. Laser scanning cytometry in the characterization of the proapoptotic effects of transiently transfected genes in cerebellar granule neurons. *Cytometry A* 2006; 69: 1114-1122
- Breitbart AS, Grande DA, Kessler R, Ryaby JT, Fitzsimmons RJ, Grant RT. Tissue engineered bone repair of calvarial defects using cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101: 567-574
- Brittberg M, Peterson L, Sjogren-Jansson E, Tallheden T, Lindahl A. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A Suppl 3: 109-115
- Browne M, Gregson PJ. Surface modification of titanium alloy implants. *Biomaterials* 1994; 15: 894-898
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64: 278-294
- Bücheler M, Weihe S, Eufinger H, Wehmoller M, Bootz F. Reconstruction of the frontal bone with individual titanium implants after surgical therapy of osteomyelitis of the frontal bone. *HNO* 2002a; 50: 339-346
- Bücheler M. Tissue Engineering in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie. *Laryngo-Rhino-Otol* 2002b; 81: 61-80
- Bücheler M, von Foerster U, Haisch A, Bootz F, Lang S, Rotter N. Tissue engineering of respiratory epithelium. Regenerative medicine for reconstructive surgery of the upper airways. *HNO* 2008; 56: 275-280
- Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res* 1983; 174: 28-42
- Burke JF, Yannas IV, Quinby WC Jr, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg* 1981; 194: 413-428
- Busse B, Smith M, Gerlach J. Treatment of liver failure: hybrid liver support- a critical overview. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384: 588-599

Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 9843-9847

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22: 233-241

Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 1997; 30: 573-593

Clatch RJ, Walloch JL, Zutter MM, Kamensky LA. Immunophenotypic analysis of hematologic malignancy by laser scanning cytometry. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 744-755

Clatch RJ, Walloch JL, Foreman JR, Kamensky LA. Multiparameter analysis of DNA content and cytokeratin expression in breast carcinoma by laser scanning cytometry. *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121: 585-592

Clatch RJ, Foreman JR. Five-color immunophenotyping plus DNA content analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 1998; 34: 36-38

Cox WG, Singer VL. A high resolution, fluorescence-based method for localization of endogenous alkaline phosphatase activity. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 1443-1456

Darzynkiewicz Z, Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR. Laser-scanning cytometry: A new instrumentation with many applications. *Exp Cell Res* 1999a; 249: 1-12

Darzynkiewicz Z, Li X, Bedner E. Detection of DNA strand breakage in the analysis of apoptosis and cell proliferation by flow and laser scanning cytometry. *Methods Mol Biol* 1999b; 113: 607-619

Douglas RS, Tarshis AD, Pletcher CH, Jr., Nowell PC, Moore JS. A simplified method for the coordinate examination of apoptosis and surface phenotype of murine lymphocytes. *J Immunol Methods* 1995; 188: 219-228

Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2008: Jahresbericht 2008. http://www.dso.de/zahlenunddaten/grafikpakete/main_idx.html (25.03.2010)

Duchna HW, Nowack U, Merget R, Muhr G, Schultze-Werninghaus G. Prospective study of the significance of contact sensitization caused by metal implants. *Zentralbl Chir* 1998; 123: 1271-1276

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382: 448-452

Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 1995; 9: 2795-2807

Dudley AT, Robertson EJ. Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. *Dev Dyn* 1997; 208: 349-362

Eufinger H, Machtens E. Microsurgical tissue transfer for rehabilitation of the patient with cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J* 2002; 39: 560-567

Feeley BT, Conduah AH, Sugiyama O, Krenek L, Chen IS, Lieberman JR. In vivo molecular imaging of adenoviral versus lentiviral gene therapy in two bone formation models. *J Orthop Res* 2006; 24: 1709-1721

Gerlach JC, Brombacher J, Kloppel K, Schnoy N, Neuhaus P. Comparison of four methods for mass hepatocyte isolation from pig and human livers. *Transplantation* 1994; 57: 1318-1322

Gersbach CA, Guldberg RE, Garcia AJ. In vitro and in vivo osteoblastic differentiation of BMP-2- and Runx2-engineered skeletal myoblasts. *J Cell Biochem* 2007; 100: 1324-1336

Gerstner AO, Machlitt J, Laffers W, Tarnok A, Bootz F. Analysis of minimal sample volumes from head and neck cancer by laser scanning cytometry. *Onkologie* 2002a; 25: 40-46

Gerstner AO, Lenz D, Laffers W, Hoffman RA, Steinbrecher M, Bootz F, Tárnok A. Near-infrared dyes for six-color immunophenotyping by laser scanning cytometry. *Cytometry* 2002b; 48: 115-123

Gerstner AO, Müller AK, Machlitt J, Tárnok A, Tannapfel A, Weber A, Bootz F. Slide-based cytometry for predicting malignancy in solid salivary gland tumors by fine needle aspirate biopsies. *Cytometry B Clin Cytom* 2003; 53: 20-25

Gerstner AO, Tárnok A, Bootz F. Objektträgerbasierte multiparametrische Zytometrie in der HNO - Perspektiven für Klinik und Forschung. *HNO* 2005; 53: 134-141

Gerstner AO, Adler T, Jakob M, Laffers W, Tárnok A, Bücheler M. Slide-Based Imaging of Proliferation and Differentiation in Tissue Engineering. *Zeitschrift für Regenerative Medizin* 2006a; 1: 51

Gerstner AO, Lenz D, Bosci J. Technische und methodische Grundlagen der Objektträger-basierten Zytometrie. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, Hrsg. *Zelluläre Diagnostik - Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Freiburg: Karger Verlag, 2006b: 71-82

Ghosh-Choudhury N, Abboud SL, Mahimainathan L, Chandrasekar B, Choudhury GG. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)-induced myocyte enhancer factor 2A-dependent transcription of BMP-2 gene in cardiomyocyte precursor cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 21998-22005

Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Laser scanning cytometer (LSC) analysis of fraction of labelled mitoses (FLM). *Cell Prolif* 1996; 29: 539-547

Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992;13: 81-88

Hill NM, Horne JG, Devane PA. Donor site morbidity in the iliac crest bone graft. *Aust N Z J Surg* 1999; 69: 726-728

Hsu WK, Sugiyama O, Park SH, Conduah A, Feeley BT, Liu NQ, Krenek L, Virk MS, An DS, Chen IS, Lieberman JR. Lentiviral-mediated BMP-2 gene transfer enhances healing of segmental femoral defects in rats. *Bone* 2007; 40: 931-938

Jackson IT, Schecker LR, Vandervord JG, McLennan JG. Bone marrow grafting in the secondary closure of alveolar-palatal defects in children. *Br J Plast Surg* 1981; 34: 422-425

Jang JH, Kim JH. Improved cellular response of osteoblast cells using recombinant human osteopontin protein produced by *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 2005; 27: 1767-1770

Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, Price PA. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 501-512

Kalejta RF, Shenk T, Beavis AJ. Use of a membrane-localized green fluorescent protein allows simultaneous identification of transfected cells and cell cycle analysis by flow cytometry. *Cytometry* 1997; 29: 286-291

Kamentsky LA, Kamentsky LD. Microscope-based multiparameter laser scanning cytometer yielding data comparable to flow cytometry data. *Cytometry* 1991; 12: 381-387

Kamentsky LA, Burger DE, Gershman RJ, Kamentsky LD, Luther E. Slide-based laser scanning cytometry. *Acta Cytol* 1997a; 41: 123-143

Kamentsky LA, Kamentsky LD, Fletcher JA, Kurose A, Sasaki K. Methods for automatic multiparameter analysis of fluorescence in situ hybridized specimens with a laser scanning cytometer. *Cytometry* 1997b; 27: 117-125

Kawai T, Takahashi T, Esaki M, Ushikoshi H, Nagano S, Fujiwara H, Kosai K. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J* 2004; 68: 691-702

Kojima H, Uede T, Uemura T. In vitro and in vivo effects of the overexpression of osteopontin on osteoblast differentiation using a recombinant adenoviral vector. *J Biochem* 2004; 136: 377-386

Kotte B. Optimierung der Wachstumsbedingungen humaner Osteoblasten in vitro. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, 2005a: 2

Kotte B. Optimierung der Wachstumsbedingungen humaner Osteoblasten in vitro. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, 2005b: 71

Kotte B. Optimierung der Wachstumsbedingungen humaner Osteoblasten in vitro. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, 2005c: 72-73

- Kotte B. Optimierung der Wachstumsbedingungen humaner Osteoblasten in vitro. Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig, 2005d: 83
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-926
- Lian JB, Hauschka PV, Gallop PM. Properties and biosynthesis of a vitamin K-dependent calcium binding protein in bone. *Fed Proc* 1978; 37: 2615-2620
- Luther E, Kamensky LA. Resolution of mitotic cells using laser scanning cytometry. *Cytometry* 1996; 23: 272-278
- Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumar N, Hammonds RG, Nevins WB, Woods WI, Reddi AH. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* 1989; 264: 13377-13380
- Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 1988;254: 317-330
- Martin-Reay DG, Kamensky LA, Weinberg DS, Hollister KA, Cibas ES. Evaluation of a new slide-based laser scanning cytometer for DNA analysis of tumors. Comparison with flow cytometry and image analysis. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 432-438
- Megyeri A, Bacso Z, Shields A, Eliason JF. Development of a stereological method to measure levels of fluoropyrimidine metabolizing enzymes in tumor sections using laser scanning cytometry. *Cytometry A* 2005; 64: 62-71
- Mendelson K, Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng* 2006; 34: 1799-1819
- Metcalfe AD, Ferguson MW. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface* 2006; 4: 413-437
- Metzger MC, Schon R, Weyer N, Rafii A, Gellrich NC, Schmelzeisen R, Strong BE. Anatomical 3-dimensional pre-bent titanium implant for orbital floor fractures. *Ophthalmology* 2006; 113: 1863-1868
- Meyer R. Diskussion um Xenotransplantation: Tierorgane als trojanische Pferde für Erreger. *Dt Arztebl* 1998; 95: 1895-1896
- Minuth WW. Kulturbehälter. In: Minuth WW, Strehl R, Schumacher K, Hrsg. *Zukunftstechnologie Tissue engineering - Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003a: 87-89
- Minuth WW. PH im Medium. In: Minuth WW, Strehl R, Schumacher K, Hrsg. *Zukunftstechnologie Tissue engineering - Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003b: 98-99
- Minuth WW. Antibiotika. In: Minuth WW, Strehl R, Schumacher K, Hrsg. *Zukunftstechnologie Tissue engineering - Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003c: 99-100

- Minuth WW. Wirkung von Wachstumsfaktoren. In: Minuth WW, Strehl R, Schumacher K, Hrsg. Zukunftstechnologie Tissue engineering - Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. Weinheim: Wiley-VCH, 2003d: 102-103
- Minuth WW. Kultivierung von Kardiomyozyten. In: Minuth WW, Strehl R, Schumacher K, Hrsg. Zukunftstechnologie Tissue Engineering - Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. Weinheim: Wiley-VCH, 2003e: 111-112
- Minuth WW. Bioabbaubare Scaffolds. In: Minuth WW, Strehl R, Schumacher K, Hrsg. Zukunftstechnologie Tissue Engineering - Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. Weinheim: Wiley-VCH, 2003f: 179-180
- Mital J, Schwarz J, Taatjes DJ, Ward GE. Laser scanning cytometer-based assays for measuring host cell attachment and invasion by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cytometry A* 2006; 69: 13-19
- Mittag A, Lenz D, Gerstner AO, Sack U, Steinbrecher M, Kokschi M, Raffael A, Bocsi J, Tárnok A. Polychromatic (eight-color) slide-based cytometry for the phenotyping of leukocyte, NK, and NKT subsets. *Cytometry A* 2005; 65: 103-115
- Mittag A, Lenz D, Gerstner AO, Tárnok A. Hyperchromatic cytometry principles for cytomics using slide based cytometry. *Cytometry A* 2006; 69: 691-703
- Morishita T, Honoki K, Ohgushi H, Kotobuki N, Matsushima A, Takakura Y. Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 2006; 30: 115-118
- Mosch B, Mittag A, Lenz D, Arendt T, Tárnok A. Laser scanning cytometry in human brain slices. *Cytometry A* 2006; 69: 135-138
- Mosch B, Morawski M, Mittag A, Lenz D, Tárnok A, Arendt T. Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2007; 27: 6859-6867
- Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem* 1982; 28: 2007-2016
- Mueller HD, Stinson RA, Mohyuddin F, Milne JK. Isoenzymes of alkaline phosphatase in infantile hypophosphatasia. *J Lab Clin Med* 1983; 102: 24-30
- Naik S, Trenkler D, Santangini H, Pan J, Jauregui HO. Isolation and culture of porcine hepatocytes for artificial liver support. *Cell Transplant* 1996; 5: 107-115
- Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM, Caplan AI. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clin Orthop Relat Res* 1990; (259): 223-232
- Nogami H, Urist MR. Transmembrane bone matrix gelatin-induced differentiation of bone. *Calcif Tissue Res* 1975; 19: 153-163
- Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. *Experiments in rats. Acta Orthop Scand* 1989; 60: 334-339

- Omori K, Tada Y, Suzuki T, Nomoto Y, Matsuzuka T, Kobayashi K, Nakamura T, Kanemaru S, Yamashita M, Asato R. Clinical application of in situ tissue engineering using a scaffolding technique for reconstruction of the larynx and trachea. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2008; 117: 673-678
- Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev* 2005; 1: 169-178
- Paley D, Young MC, Wiley AM, Fornasier VL, Jackson RW. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. An experimental study in rabbits. *Clin Orthop Relat Res* 1986; 208: 300-312
- Paragas VB, Kramer JA, Fox C, Haugland RP, Singer VL. The ELF -97 phosphatase substrate provides a sensitive, photostable method for labelling cytological targets. *J Microsc* 2002; 206: 106-119
- Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 648-655
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147
- Pohler OE. Unalloyed titanium for implants in bone surgery. *Injury* 2000; 31: 7-13
- Pozarowski P, Holden E, Darzynkiewicz Z. Laser scanning cytometry: principles and applications. *Methods Mol Biol* 2006; 319: 165-192
- Pradel W, Tenbrieg P, Lauer G. Influence of harvesting technique and donor site location on in vitro growth of osteoblastlike cells from facial bone. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20: 860-866
- Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976a; 73: 1447-1451
- Price PA, Poser JW, Raman N. Primary structure of the gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976b; 73: 3374-3375
- Price PA. Gla-containing proteins of bone. *Connect Tissue Res* 1989; 21: 51-57
- Rennekampff HO, Kiessig V, Hansbrough JF. Current concepts in the development of cultured skin replacements. *J Surg Res* 1996; 62: 288-295
- Rew DA, Reeve LJ, Wilson GD. Comparison of flow and laser scanning cytometry for the assay of cell proliferation in human solid tumors. *Cytometry* 1998; 33: 355-361
- Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6: 331-343

- Rotter N, Haisch A, Bucheler M. Cartilage and bone tissue engineering for reconstructive head and neck surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005; 262: 539-545
- Rust PA, Kalsi P, Briggs TW, Cannon SR, Blunn GW. Will Mesenchymal Stem Cells Differentiate into Osteoblasts on Allograft. *Clin Orthop Relat Res* 2007; 457: 220-226
- Sanan A, Haines SJ. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. *Neurosurgery* 1997; 40: 588-603
- Sasaki K, Kurose A, Miura Y, Sato T, Ikeda E. DNA ploidy analysis by laser scanning cytometry (LSC) in colorectal cancers and comparison with flow cytometry. *Cytometry* 1996; 23: 106-109
- Scholz M, Wehmöller M, Lehmbrock J, Schmieder K, Engelhardt M, Harders A, Eufinger H. Reconstruction of the temporal contour for traumatic tissue loss using a CAD/CAM-prefabricated titanium implant-case report. *J Craniomaxillofac Surg* 2007; 35: 388-392
- Schroeder IS, Kania G, Blyszczuk P, Wobus AM. Insulin-producing cells. *Methods Enzymol* 2006; 418: 315-333
- Schuh A, Thomas P, Kachler W, Göske J, Wagner L, Holzwarth U, Forst R. Allergic potential of titanium implants. *Orthopade* 2005; 34: 327-330
- Sugiyama O, An DS, Kung SP, Feeley BT, Gamradt S, Liu NQ, Chen IS, Liebermann JR. Lentivirus-mediated gene transfer induces long-term transgene expression of BMP-2 in vitro and new bone formation in vivo. *Mol Ther* 2005; 11: 390-398
- Taller A, Grohe B, Rogers KA, Goldberg HA, Hunter GK. Specific adsorption of osteopontin and synthetic polypeptides to calcium oxalate monohydrate crystals. *Biophys J* 2007; 93: 1768-1777
- Tàrnok A, Gerstner AO. Clinical applications of laser scanning cytometry. *Cytometry* 2002; 50: 133-143
- Telford WG, Cox WG, Stiner D, Singer VL, Doty SB. Detection of endogenous alkaline phosphatase activity in intact cells by flow cytometry using the fluorogenic ELF-97 phosphatase substrate. *Cytometry* 1999; 37: 314-319
- Telford W, Cox W, Singer V. Detection of endogenous and antibody-conjugated alkaline phosphatase with ELF-97 phosphate in multicolor flow cytometry applications. *Cytometry* 2001; 43: 117-125
- Terheyden H, Jepsen S, Rueger DR. Mandibular reconstruction in miniature pigs with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: a preliminary study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1999; 28: 461-463
- Thomas L. Alkalische Phosphatase. In: Thomas L, Hrsg. *Labor und Diagnose*. Frankfurt/Main: TH-Books, 2000: 37-46
- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-899

- Urist MR, Granstein R, Nogami H, Svenson L, Murphy R. Transmembrane bone morphogenesis across multiple-walled diffusion chambers. New evidence for a diffusible bone morphogenetic property. *Arch Surg* 1977; 112: 612-619
- Voegelé TJ, Voegelé-Kadletz M, Esposito V, Macfelda K, Oberndorfer U, Vecsei V, Schabus R. The effect of different isolation techniques on human osteoblast-like cell growth. *Anticancer Res* 2000; 20: 3575-3581
- Von Donnersmarck G, Mühlbauer W, Höfter E, Hartinger A. Die Verwendung von Keratinozytenkulturen in der Schwerbrandverletztenbehandlung - bisherige Erfahrungen, Ausblicke zur weiteren Entwicklung. *Unfallchirurg* 1995; 98: 229-232
- Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmöller M, Russo PA, Bolte H, Sherry E, Behrens E, Terheyden H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 2004; 364: 766-770
- Warnke PH, Terheyden H, Springer I, Wiltfang J. Tissue Engineering in der Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie. *Oralchirurgie Journal*. 2005; 4: 26-32
- Warnke PH, Springer IN, Acil Y, Julga G, Wiltfang J, Ludwig K, Russo PA, Sherry E, Sivanathan S, Hedderich J, Terheyden H. The mechanical integrity of in vivo engineered heterotopic bone. *Biomaterials* 2006a; 27: 1081-1087
- Warnke PH, Wiltfang J, Springer I, Acil Y, Bolte H, Kosmahl M, Russo PA, Sherry E, Lützen U, Wolfart S, Terheyden H. Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials* 2006b; 27: 3163-3167
- Werntz JR, Lane JM, Burstein AH, Justin R, Klein R, Tomin E. Qualitative and quantitative analysis of orthotopic bone regeneration by marrow. *J Orthop Res* 1996; 14: 85-93
- Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 1995; 9: 2105-2116
- Wintermantel E, Ha SW. Biokompatible Polymere. In: Wintermantel E, Hrsg, *Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen*. Berlin: Springer Verlag 1996a: 163-210
- Wintermantel E, Ha SW. Biokompatible Metalle. In: Wintermantel E, Hrsg, *Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen*. Berlin: Springer Verlag 1996b: 139-162
- Wintermantel E, Ha SW. Biokompatible keramische Werkstoffe. In: Wintermantel E, Hrsg, *Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen*. Berlin: Springer Verlag 1996c: 211-231
- Wintermantel E, Mayer J, Ruffieux K, Bruinink A, Eckert K-L. Biomaterialien - humane Toleranz und Integration. *Chirurg* 1999; 70: 847-857
- Wolf G. Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. *Nutr Rev* 1996; 54: 332-333

Wolff D, Goldberg VM, Stevenson S. Histomorphometric analysis of the repair of a segmental diaphyseal defect with ceramic and titanium fibermetal implants: effects of bone marrow. *J Orthop Res* 1994; 12: 439-446

Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 1992; 32: 160-167

Wozney JM, Rosen V, Byrne M, Celeste AJ, Moutsatsos I, Wang EA. Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci Suppl* 1990; 13: 149-156

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RW, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242: 1528-1534

Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 2007; 327: 449-462

8. Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. M. Bücheler für die Bereitstellung des Themas und für die Betreuung, die diese Promotion ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. A. Gerstner und Frau Dr. med. W. Laffers für ihre Unterstützung bei der Arbeit mit dem LSC so wie Prof. Dr. med J. Rathgeber für die Durchsicht dieser Arbeit.

Für die Geduld, kritische Anmerkungen und viele gute Anregungen möchte ich mich bei Frau S. Mirbach, Herrn M. Koch, Frau Dr. med. H. Topp, Herrn B. Scholz und Herrn PD Dr. med. P. Allam bedanken. Für die Unterstützung bei der Erstellung und Modifikation der Grafiken danke ich Frau V. Müller und Frau M. Hofmann.

Schließlich danke ich herzlich meinen Eltern Frau G.Adler und Herrn K. Adler, die mir das Studium der Humanmedizin und die Anfertigung dieser Promotion ermöglicht haben.