

Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Allgemeine Orthopädie mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. N. Wülker

**Vergleichende Untersuchung zweier rekombinanter humaner
Bone Sialoproteine auf humane Osteoblasten und
Stromazellen, sowie Osteoblasten und Knochenmarkzellen des
Schweins**

**Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Isa Maria Schmandke, geb. Klopp

aus

Berlin-Charlottenburg

2010

Dekan: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Dipl.-Biochem. W. K. Aicher
2. Berichtstatter: Privatdozent Dr. H.-P. Wendel

In Liebe für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Einordnung Bone Sialoprotein.....	1
1.2 Proteinstruktur und posttranslationale Modifizierungen	1
1.3 Expression.....	5
1.4 Genstruktur.....	9
1.5 Funktion und Stoffwechselbeteiligung.....	11
1.6 Prothesenbeschichtung.....	16
1.7 Beschreibung Projekt	16
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	18
2.1.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial.....	21
2.1.3 Geräte.....	22
2.1.4 Humanes Untersuchungsmaterial	23
2.1.5 Tierisches Untersuchungsmaterial	25
2.1.6 Bone Sialoproteine	25
2.1.6.1 BSP	25
2.1.6.2 DRJ	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Zellkulturmethoden	26
2.2.1.1 Allgemeines.....	26
2.2.1.2 Anlage von Primärkulturen humaner Zellen	26
2.2.1.2.1 Anlage humaner Osteoblastenzellkulturen aus Spongiosa.....	26
2.2.1.2.2 Anlage humaner Stromazellkulturen aus Spongiosa	28
2.2.1.3 Anlage Primärkulturen vom Schwein	28
2.2.1.3.1 Anlage Knochenmarkzellkulturen vom Schwein	28
2.2.1.3.2 Anlage Osteoblastenzellkulturen vom Schwein	29
2.2.1.4 Medium	30
2.2.1.4.1 Herstellung des Osteoblasten-Vollmediums	30
2.2.1.4.2 Herstellung des Stammzell-Vollmediums	30
2.2.1.4.3 Herstellung des Osteoblasten-Differenzierungs-Vollmediums.....	31
2.2.1.5 Mediumwechsel und Zellpflege.....	31
2.2.1.6 Subkultivierung der Zellen	31
2.2.1.7 Zellzahlbestimmung	32
2.2.1.8 Kryokonservierung	32
2.2.2 Methoden zur Untersuchung der verschiedenen Zellparameter	33
2.2.2.1 RT-PCR	33
2.2.2.1.1 RNA-Extraktion	34
2.2.2.1.2 cDNA-Synthese	35
2.2.2.1.3 Primerpaare	36
2.2.2.2 Bestimmung der Zellproliferation mittels MTT	37
2.2.2.3 Bestimmung der Zellproliferation mittels BrdU	39
2.2.2.4 Farbnachweis für die Alkalische Phosphatase-Aktivität	41
2.2.2.5 Von Kossa Färbung	42

2.2.3	Bone Sialoprotein	43
2.2.3.1	Allgemeines	43
2.2.3.2	Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	44
2.2.3.3	Coomassie Färbung	45
2.2.4	Statistische Auswertung.....	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Zellkultur	47
3.1.1	Anlage von Primärkulturen humaner Zellen	47
3.1.2	Anlage von Primärkulturen tierischer Zellen.....	48
3.2	Real Time PCR	50
3.2.1	RNA Isolierung, cDNA-Synthese und PCR	50
3.2.2	Vorversuche RT-PCR	51
3.2.2.2	2. Vorversuch: Induktionsverhalten von Osteoblasten nach BSP-Inkubation.....	53
3.2.3	Hauptversuche RT-PCR	54
3.2.3.1	1. Hauptversuch: Induktionsverhalten von Osteoblasten nach BSP- und DRJ-Inkubation.....	54
3.2.3.2	2. Hauptversuch: Induktionsverhalten von Stromazellen nach BSP- und DRJ-Inkubation.....	55
3.3	MTT-Test.....	56
3.3.1	Vorversuche MTT	56
3.3.1.1	1. Vorversuch.....	56
3.3.1.2	2. Vorversuch.....	57
3.3.1.3	3. Vorversuch.....	57
3.3.1.4	4. Vorversuch.....	59
3.3.1.5	5. Vorversuch.....	60
3.3.2	Hauptversuche MTT	61
3.3.2.1	MTT Untersuchung von Osteoblasten mit BSP	61
3.3.2.2	MTT Untersuchung von Stromazellen mit BSP	62
3.3.2.3	MTT Untersuchung tierischer Osteoblasten mit BSP	62
3.3.2.4	MTT Untersuchung tierischer Knochenmarkzellen mit BSP.....	63
3.3.2.5	MTT Untersuchung von Osteoblasten nach 24h, 48h, 72h, 96h BSP-Inkubation	64
3.3.2.7	MTT Untersuchung von Osteoblasten mit DRJ	66
3.3.2.8	MTT Untersuchung von Stromazellen mit DRJ	66
3.3.2.9	MTT Untersuchung von Osteoblasten nach 24h, 48h, 72h, 96h DRJ-Inkubation	67
3.3.2.10	MTT Untersuchung von Stromazellen nach 24h, 48h, 72h, 96h DRJ-Inkubation	68
3.4	BrdU	69
3.4.1	Vorversuche BrdU	69
3.4.1.1	1. Vorversuch.....	69
3.4.1.2	2. Vorversuch.....	70
3.4.1.3	3. Vorversuch.....	71
3.4.1.4	4. Vorversuch.....	72
3.4.2	Hauptversuche BrdU	73
3.4.2.1	BrdU Untersuchung von Osteoblasten nach BSP-Inkubation	74
3.4.2.2	BrdU Untersuchung von Stromazellen nach BSP-Inkubation	74
3.4.2.3	BrdU Untersuchung von Osteoblasten nach DRJ-Inkubation	75
3.4.2.4	BrdU Untersuchung von Stromazellen nach DRJ-Inkubation.....	75

3.5	Histochemische Färbungen.....	76
3.5.1	Alkalische Phosphatase Färbung	76
3.5.1.1	1. Vorversuch.....	76
3.5.1.2	2. Vorversuch.....	77
3.5.1.3	Hauptversuche.....	78
3.5.2	Von Kossa Färbung.....	78
3.5.2.1	Hauptversuche.....	79
3.6	Problem Protein Inkubationsmethode.....	80
3.6.1	SDS-PAGE Gelelektrophorese.....	80
4	Auswertung, Diskussion.....	82
4.1	Zellkultur.....	82
4.1.1	Osteoblasten, Stromazellen, Knochenmarkzellen.....	82
4.1.2	Real Time PCR.....	84
4.1.2.1	Osteopontin, Osteonectin, TGF- β	84
4.1.3	MTT- und BrdU-Test.....	89
4.1.3.1	Zellproliferation, Zellviabilität.....	89
4.1.3.2	Auswertung Vorversuche MTT	90
4.1.3.3	Auswertung Hauptversuche MTT	93
4.1.3.4	Auswertung Vorversuche BrdU.....	96
4.1.4.2	Auswertung Hauptversuche BrdU	99
4.1.5	Histochemische Färbungen.....	100
4.1.5.1	AP- und von Kossa- Färbung.....	100
4.1.5.2	Auswertung AP-Färbung.....	101
4.1.5.3	Auswertung von Kossa-Färbung	102
4.1.6	BSP, Prothesenbeschichtung.....	104
5	Zusammenfassung	107
6	Literaturverzeichnis.....	108
7	Primär- und Sekundärdaten.....	115
8	Abkürzungsverzeichnis.....	116
9	Danksagung	118
10	Curriculum Vitae	119

1 Einleitung

1.1 Einordnung Bone Sialoprotein

Humanes Bone Sialoprotein (BSP), dessen alte Bezeichnung BSP_{II} lautet, ist mit ca. 70kDa ein kleines, sulfatiertes und phosphoryliertes anionisches Glykoprotein, welches aufgrund seiner Fähigkeit der Integrinbindung der Familie der Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteine (SIBLING) zugeordnet wird (Fisher et al. 2001; Wuttke et al. 2001; Tye et al. 2003). Die erste Isolierung gelang Hering und Kent 1972 aus bovinen Knochen. Mit einem Anteil von bis zu 14% stellt BSP eines der wichtigsten nicht-kollagenartigen Proteine der extracellulären Matrix (ECM) des Knochens dar (Fisher et al. 1983). Es wird hauptsächlich im Knochen und Knorpelgewebe, jedoch auch in verschiedenen Tumoren und deren Knochen assoziierten Metastasen, sowie außerhalb des Skeletts in Trophoblasten der humanen Plazenta exprimiert (Bianco et al. 1991). Funktionen, wie frühe Knochen- und Zementmineralisierung (MacNeil et al. 1995; Xu et al. 2007), Hydroxylapatit Nukleation (Hunter und Goldberg 1993), in vitro Zellbindungsmediator für Fibroblasten (Somerman et al. 1988), Osteoblasten (Grzesik und Robey 1994) und Osteoklasten, mit fraglicher in vivo Übertragung (Flores et al. 1992; Ek-Rylander et al. 1994), Stimulation der Angiogenese (Bellahcene et al. 2000 a), als auch Stimulation der Differenzierung von Knochenvorläuferzellen zu reifen Osteoblasten (Zhou et al. 1995; Mizuno et al. 2000; Gordon et al. 2007), werden mit dem Protein assoziiert.

1.2 Proteinstruktur und posttranslationale Modifizierungen

Die Primärstruktur des humanen BSP wird durch eine Polypeptidkette von 317 Aminosäuren gebildet, welche nach Abspaltung des Signalpeptids noch 301 Aminosäuren umfasst (Fisher et al. 1990, siehe Abb.1). An funktionellen Domänen weist humanes BSP ein C-Terminal gelegenes Arg-Gly-Asp (RGD) Zellbindungs-Tripeptid auf, über welches eine Bindung an den Vitronektin - ähnlichen $\alpha\beta_3$ Integrin-Rezeptor möglich ist (Oldberg et al. 1988 b), N-

Terminal liegt eine große glutamatreiche Region, welche sich aufgliedert in zwei Abschnitte von jeweils 8 hintereinanderliegenden Glutamatsäuren, denen die Funktion der Hydroxylapatit Nukleation zugesprochen wird (Hunter und Goldberg 1994 a), als auch kleinere Regionen von 1-2 Glutamatsäuren (Hulo et al. 2008). Gemäß der cDNA Sequenz beträgt die molekulare Masse des core Proteins 33,6kDA (Fisher et al. 1990), nach Auftrennung mittels SDS-PAGE weist das Protein nach Fisher et al. 1990 eine Größe von ca.80kDA auf, nach den Ergebnissen von Wuttke et al. 2001 jedoch nur ca.70kDa. Mittels Analysen durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde für das unter nicht-denaturierenden Bedingungen gewonnene Protein eine mittlere Molekularmasse von 49kDa ermittelt (Wuttke et al. 2001).

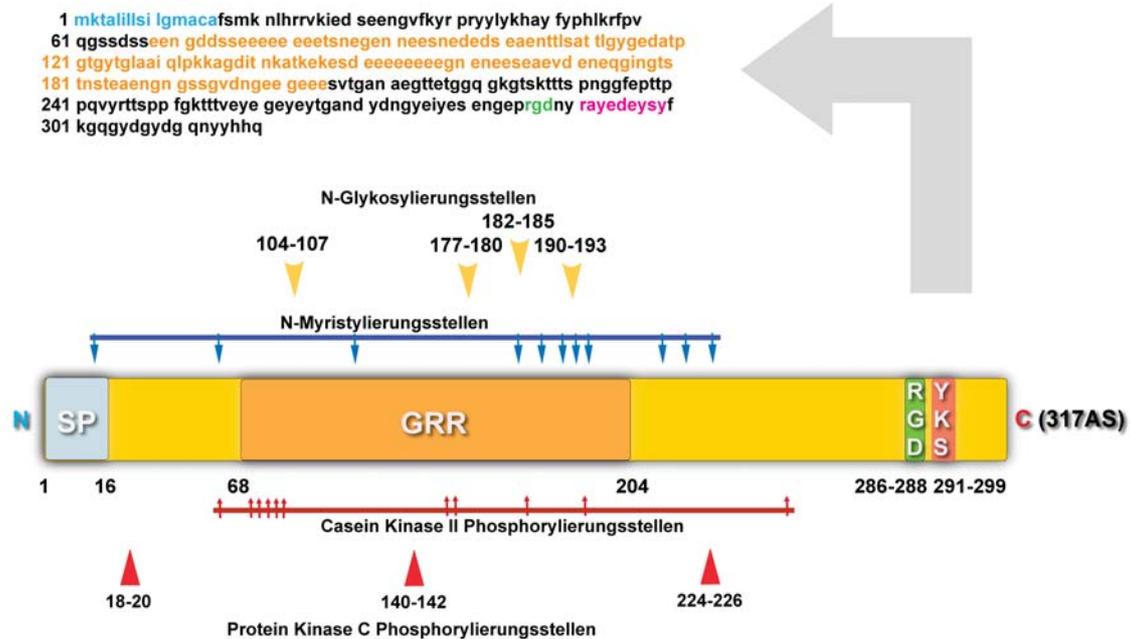


Abb.1: Primärstruktur, funktionelle Domänen und posttranslationale Modifikationsstellen von humanem BSP, erstellt nach PROSITE, Version 20.27 von 2007. Die Abfolge der 317 Aminosäuren des Proteins sind in Form des Einbuchstabencodes oben links dargestellt, funktionelle Domänen sind farbig markiert und gliedern sich auf in das Signalpeptid (SP), die Glutamat-reiche Region (GRR), das RGD Zellbindungs-Tripeptid, die Phosphorylierungsstellen der Tyrosin Kinase (YKS), der Casein Kinase II und Protein Kinase C, sowie N-Glykosylierungsstellen und N-Myristylierungsstellen. In der Abbildung nicht dargestellt sind die O-Glykosylierungsstellen.

Die Ursache des Größenunterschiedes zwischen der molekularen Masse des Proteins auf cDNA-Ebene und den Ergebnissen des SDS-PAGE Gels liegt an

dem hohen Anteil posttranslationaler Modifizierungen, wobei Kohlenhydrate ca. 30-40% der Gesamtgröße des Proteins ausmachen (Wuttke et al. 2001), nach Fisher et al. 1990 sogar 50%. Für fötales BSP wurde ein Kohlenhydratanteil von 50% ermittelt (Fisher et al. 1983).

Posttranslationale Modifizierungen des BSP finden in Form von N- und O-Glykosilierungen, Phosphorylierungen, Sulfatierungen und Myristilierungen statt.

Im humanen BSP gibt es 4 potentielle N-Glykosilierungsstellen (Hulo et al. 2008), die von 10 verschiedenen N-Glykanen, jedoch ausschließlich vom komplexen Typ, gebildet werden (Wuttke et al. 2001; Tye et al. 2003). Die molekulare Masse für die N-Glykane beträgt bei humanem BSP 6kDA und macht damit ca. 40% der posttranslationalen Modifikationen aus (Wuttke et al. 2001). Insgesamt werden posttranslationale Modifizierungen im humanen BSP auf >15kDa geschätzt (Fisher et al. 2001). Die N-Glykosidischen Bindungen beginnen im endoplasmatischen Retikulum und werden im Golgi Apparat beendet. Im Gegensatz dazu finden die O-glykosidischen Bindungen erst im Golgi Apparat statt. Die O-Glykane im humanen BSP weisen keine core 2 Fuku-silierungen auf. 4 verschiedene O-Glykane wurden für humanes BSP ermittelt, sowie eine kurze di-siale core 1 Struktur. Lediglich 12% der O-Glykane fehlen endständige N-Acetylneuraminsäuren. Am wahrscheinlichsten finden die O-Glykosilierungen in der Mitte des Moleküls an der Aminosäure Threonin statt, Verifikationen dazu stehen jedoch noch aus. Der C-Terminus des Proteins bleibt frei von Glykanen. (Wuttke et al. 2001).

Drei verschiedene Proteinkinasen greifen am Protein an. C-Terminal liegt die einzige Phosphorylierungsstelle der Tyrosin Kinase, in der Mitte des Proteins liegen die 11 potentiellen Phosphorylierungsstellen der Casein Kinase II und ebenfalls mittig, als auch N-Terminal, liegen die drei möglichen Phosphorylierungsstellen der Protein Kinase C (Hulo et al. 2008). BSP hat einen hohen Phosphorylierungsgehalt, insbesondere die Aminosäuren Serin (Franzen und

Heinegard 1985) und Threonin werden von der Protein Kinase C und der Casein Kinase II phosphoryliert. BSP kann sowohl intrazellulär, als auch bei der Sekretion, von einer Zell-Oberflächen Casein Kinase II ähnlichen Ektokinase phosphoryliert werden (Zhu et al. 1997). Untersuchungen zur Phosphorylierung des Threonins im Pro-Arg-Gly-Asp-Thr (PRGDT) Zellbindungs-Peptid bei der Maus und Ratte zeigten eine um mehr als 10-fach verminderte Zellbindungsaktivität (Larsson et al. 1993).

Die RGD Sequenz am C-Terminus flankierend finden sich bei allen Säugetieren Tyrosin reiche Regionen (Oldberg et al. 1988 a; Fisher et al. 1990; Shapiro et al. 1993; Young et al. 1994), die mehrheitlich in sulfatierter Form vorliegen (Huttner und Baeuerle 1988). An Ratten BSP wurde gezeigt, dass Sulfatierungen auch N- und O-glykosidisch gebunden in den Kohlenhydratreichen Ketten auftreten können, wobei N-glykosidische Bindungen häufiger zu finden sind als O-glykosidische Bindungen (Midura et al. 1990). Ferner tragen Tyrosin Sulfatierungen zur negativen Ladung des anionischen Moleküls bei (Tye et al. 2003). Obwohl Tyrosin Sulfatierungen als wichtiger Faktor in der Regulation der Protein-Sekretion und -Funktion angesehen werden und beim BSP vor allem in Nähe der wichtigen RGD Sequenz liegen, zeigen Untersuchungen an Ratten BSP, dass eine Hemmung der Sulfatierung durch Chlorate weder auf die Synthese, noch auf die Sekretion und Zellbindungsaktivität des BSP einen signifikanten Einfluss hat (Mintz et al. 1994). Eine weitere mögliche Funktion der Sulfate im Molekül könnte ihre hohe negative Ladung sein, die in einem positiven Zusammenhang mit der Calcium Einlagerung in Hydroxylapatit bei Mineralisationsvorgängen stehen könnte (Weiner und Addadi 1991). Die genauen Funktionen der ausgeprägten C-Terminalen Sulfatierungen sind noch unklar. Die 11 potentiellen Myristylierungsstellen befinden sich mittig und N-Terminal im Molekül (Hulo et al. 2008).

Fötales Kälber BSP weist in Gewichtsprozent eine Zusammensetzung von 50% Protein, 12% Sialinsäuren, 7% Glukosaminen und 6% Galaktosaminen auf, wobei der hohe Anteil an Sialinsäuren dem Protein zu seinem Namen verhalf (Fisher et al. 1983). Insgesamt stellen Glutamin- und Glycinsäuren mit ca 33%

einen hohen Anteil der AS des Proteins (Oldberg et al. 1988 a) dar. Humanes BSP enthält nicht die Aminosäure Cystein (Fisher et al. 1990). Untersuchungen zur Sekundärstruktur bei humanem BSP mittels Circular dichroismus Spektroskopie haben gezeigt, dass 5% α -helikale Strukturen, 32% β -Faltblätter, 17% β -turns und 46% Zufalls-Knäuelstruktur im Protein auftreten (Wuttke et al. 2001). Das multiphosphorylierte BSP wurde als intrinsisch ungeordnet und als Mitglied der SIBLING FAMILIE als extended Protein identifiziert, das in Lösung eine flexible Struktur aufweist und erst bei Bindung an spezifische Liganden eine Struktur annimmt (Fisher et al. 2001; Fisher und Fedarko 2003).

1.3 Expression

Die Expression von BSP ist hoch spezifisch für mineralisierendes Gewebe, wie Knochen, Knorpel, Dentin und Cementum (Oldberg et al. 1988 a; Bianco et al. 1991). Einen Überblick über Gewebe und Zellen, welche BSP exprimieren, als auch die Weichteilgewebe, in denen kein BSP exprimiert wird, geben Tab.1 und Tab.2. BSP ist im Knochen in den Spongiosabälkchen nachweisbar (Fisher et al. 1983; Shen et al. 1995). Bei Ratten hat die Untersuchung der Expression von BSP m-RNA während der Embryogenese und postpartal gezeigt, dass die BSP Expression auf Zellen beschränkt ist, die aktiv an Knochen-, Dentin- und Cementum- Mineralisationsvorgängen beteiligt sind. An dieser Stelle konnte auch gezeigt werden, dass erst differenzierte fötale Osteoblasten BSP in Bereichen von *de novo* intermembranöser und enchondraler Knochenbildung exprimieren. Bei adulten Tieren wurde BSP nur in der Spongiosa der langen Röhrenknochen nachgewiesen (Chen et al. 1992). Dass erst reife Knochenzellen, wie Osteoblasten und junge Osteozyten - und nicht Vorläuferzellen, wie Präosteoblasten und Fibroblasten - BSP exprimieren, konnte auch in anderen, unabhängigen Untersuchungen gezeigt werden (Bianco et al. 1991; Ohnishi et al. 1991). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das BSP Gen erst im Zuge einer Zell - Differenzierung induziert wird und als Grenzmarker von Prä-osteoblasten zu Osteoblasten angesehen werden kann (Bianco et al. 1993). Am höchsten ist die BSP Expression im Stadium der skeletalen- und alveolaren

Knochenentwicklung, früher Dentino- und Cementogenese. Wesentlich niedriger sind die Level der Expression in mineralisierendem Knorpel, Dentin und Enamel (Fisher et al. 1990; Chen et al. 1992; Chen et al. 1993; Shen et al. 1995). Die BSP Expression nimmt mit dem Fortschreiten des Mineralisationsprozesses wieder ab (Chen et al. 1992). Es wird angenommen, dass das Protein in der Knochenmatrix akkumuliert (Chen et al. 1993). Bei Ratten sind deutliche Schwankungsbreiten der BSP Expression erkennbar, wobei die höchsten Expressionslevel während der fötalen intermembranösen und enchondralen Knochenneubildung detektierbar sind und ein zweiter Peak während der Entstehung der sekundären Verknöcherungszonen, den Epiphysenfugen, messbar ist (Chen et al. 1992). Odontoblasten exprimieren BSP während der Dentinogenese und Cementoblasten, während der Cementogenese (Chen et al. 1992; Chen et al. 1993). Mittels Untersuchung verschiedener Organe mehrerer Spezies ging man davon aus gezeigt zu haben, dass BSP nicht im Weichteilgewebe exprimiert wird (Fisher et al. 1983; Franzen und Heinegard 1985; Oldberg et al. 1988 a; Fisher et al. 1990; Bianco et al. 1991; Ohnishi et al. 1991). Anhand aktueller Untersuchungen konnte jedoch eine Expression in Pankreas Gewebe nachgewiesen werden (Kayed et al. 2007). Vereinzelt BSP-positive hypertrophe Chondrozyten sind in humanem Gewebe direkt unterhalb des Perichondriums in Rudimenten, in welchen noch keine Verknöcherung begonnen hat, nachweisbar (Bianco et al. 1991).

Des weiteren deuten Forschungsergebnisse bei Rindern darauf hin, dass BSP auch in Megakaryozyten, den Vorläuferzellen der Thrombozyten (Blutplättchen), gebildet wird und dann vom Plasma durch Endozytose in die noch nicht aktivierten Thrombozyten aufgenommen -und nicht wie zunächst angenommen- von den Thrombozyten selbst exprimiert wird. Im Folgeschritt wird bei einer Stimulation der Thrombozyten durch Thrombin das BSP ins Serum freigesetzt, so dass Konzentrationen im Bereich von 10-30 ng/ml messbar sind (Chenu und Delmas 1992). Ob BSP eine Funktion in der Blutgerinnung hat, ist aber noch unklar. Bei gesunden Erwachsenen sind BSP Serumspiegel von 5,0-21,6 ng/mL messbar, wobei gesunde postmenopausale Frauen signifikant höhere Serumwerte aufweisen als gesunde prämenopausale Frauen (Seibel et al. 1996).

Neuste Untersuchungen haben entgegen bisheriger Annahmen gezeigt, dass die BSP Expression nicht auf Tumore mit primärer Knochenmetastasierung, wie Brust-, Prostata-, Lungen- und Schilddrüsentumore, als auch Multiples Myelom und Neuroblastom beschränkt ist (Bellahcene et al. 1994; Bellahcene et al. 1997 b; Waltregny et al. 1998; Bellahcene et al. 1998 b; Papotti et al. 2006). Nachgewiesenermaßen wird BSP auch in Pankreaskarzinomen (Kayed et al. 2007), malignen Hauttumoren (Riminucci et al. 2003), Zervixkarzinomen (Detry et al. 2003) und oralen Plattenepithel Karzinomen (Ogbureke et al. 2007) exprimiert und die Annahme, dass die BSP Expression eine allgemeine Erscheinung maligne entarteter Zellen ist, wurde formuliert (Bellahcene et al. 2008).

Expression von BSP in mineralisierendem Gewebe	Spezies	Quelle
Spongiosabälkchen	Rind Ratte	(Fisher et al. 1983) (Shen et al. 1995)
Schädelkalotte	Ratte	(Oldberg et al. 1988 a; Fisher et al. 1990)
Mandibula	Ratte Maus	(Ohnishi et al. 1991) (MacNeil et al. 1996)
Dentin	Rind Ratte Maus	(Fisher et al. 1983) (Ohnishi et al. 1991) (MacNeil et al. 1994)
Alveolarknochen	Maus	(MacNeil et al. 1994; MacNeil et al. 1996)
Epyphysen Knorpel	Mensch	(Bianco et al. 1991)
Keine Epression von BSP in folgenden Weichteilgeweben		
Skelettmuskel, Sehne, Augen Gewebe, Sklera, Niere, Lunge, Haut	Mensch	(Bianco et al. 1991)
Muskel, Sehne, Knorpel, Auge, Sklera, Herz, Gehirn, Aorta, Vena Cava, Serum, Leber, Niere, Intestinaltrakt, Haut	Rind	(Fisher et al. 1983; Franzen und Heinegard 1985)
Skelettmuskel, Knorpel, Periost, Gehirn, Leber, Niere, Lunge, Haut, Hoden, Milz	Ratte	(Oldberg et al. 1988 a; Fisher et al. 1990; Ohnishi et al. 1991)

Tab.1: Dargestellt ist sowohl die BSP Expression in mineralisierenden Geweben verschiedener Spezies, als auch das Abhandensein einer BSP Expression in Weichteilgeweben verschiedener Spezies. Erklärung siehe Text.

Expression BSP, skeletal	Spezies	Quelle
Osteoblasten	Mensch Schwein Ratte	(Bianco et al. 1991; Ohnishi et al. 1991) (Chen et al. 1993) (Ohnishi et al. 1991)
Osteozyten	Mensch Schwein Ratte	(Bianco et al. 1991) (Chen et al. 1993) (Ohnishi et al. 1991)
Osteoklasten	Mensch	(Bianco et al. 1991)
Chondrozyten	Mensch Ratte	(Bianco et al. 1991) (Chen et al. 1992; Shen et al. 1995)
Odontoblasten	Schwein Ratte	(Chen et al. 1993) (Chen et al. 1992)
Cementoblasten	Ratte	(Chen et al. 1992)
Ameloblasten	Ratte Hamster	(Chen et al. 1998)
Osteosarkomzellen UMR-106	Ratte	(Fisher et al. 1990)
Expression BSP, extraskelatal		
Trophoblasten Plazenta	Mensch	(Bianco et al. 1991)
Thrombozyten	Rind	(Chenu und Delmas 1992)
Serum und Plasma	Rind	(Chenu und Delmas 1992)
Pankreas Gewebe	Mensch	(Kayed et al. 2007)
Expression BSP in Tumoren		
Odontogene Tumorzellen	Ratte Hamster	(Chen et al. 1998)
Ameloblastom	Ratte Hamster	(Chen et al. 1998)
Brusttumore	Mensch	(Bellahcene et al. 1994; Bellahcene und Castronovo 1997 a; Castronovo und Bellahcene 1998 a; Camparo und Vieillefond 2007)
Lungen Karzinom, NSCLC	Mensch	(Bellahcene et al. 1997 b; Papotti et al. 2006)
Prostata Karzinom	Mensch	(Waltregny et al. 1998; Chaplet et al. 2006)
Neuroblastom	Mensch	(Waltregny et al. 2000)
Multiples Myelom	Mensch	(Bellahcene et al. 2000 b)
Schilddrüsen Karzinom	Mensch	(Bellahcene et al. 1998 b)
Zervix Karzinom	Mensch	(Detry et al. 2003)
Pankreas Karzinom	Mensch	(Kayed et al. 2007)
Malignes Melanom	Mensch	(Riminucci et al. 2003)
PK Mundhöhle	Mensch	(Ogbureke et al. 2007)

Tab.2: Übersicht zum aktuellen Wissenstand der BSP Expression in skeletalen und extraskelatalen Zellen, als auch in Tumoren. Erläuterung siehe Text.

In malignen Melanom Zellen ist die BSP Expression mit der Expression des Cbfa1/Runx2 Transkriptionsfaktors, dem Regulator der osteogenen Zelldifferenzierung, assoziiert. Da dieser Transkriptionsfaktor bei der Maus normalerweise auf knochenbildende Zellen beschränkt ist und sowohl deren Differenzierung regulierend bestimmt, als auch die Expression mindestens zweier Matrix Metalloproteinasen, welche in Beziehung zur Tumor-Invasion und Metastasierung stehen, reguliert, wurde die Ursache einer möglichen Beziehung zwischen der BSP Expression und dem invasiven Wachstumsverhalten humaner epithelialer Tumorzellen einer gemeinsamen Transkriptionskontrolle, reguliert durch Cbfa1 zugeschrieben (Riminucci et al. 2003). 2004 wurde erstmals gezeigt, dass eine Herabregulation der Expression von BSP in humanen Brustkrebszellen (MDA-MB-231) zu einer Abnahme der Koloniebildung, als auch zur Abnahme der osteolytischen Knochen Metastasen bei Ratten führt (Adwan et al. 2004) und zukünftige Therapieansätze gehen in die Richtung BSP als Zielmolekül in der Anti-Krebs-Therapie einzusetzen (Bellahcene et al. 2008).

1.4 Genstruktur

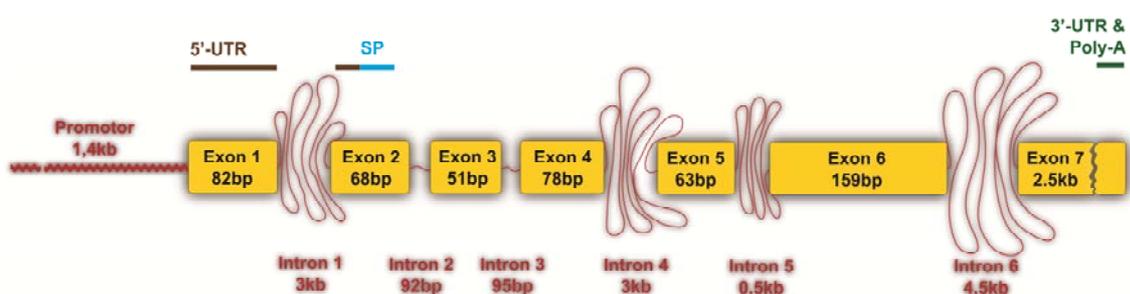


Abb.2: Dargestellt ist die Genstruktur von humanem Bone Sialoprotein, modifiziert nach Ganss et al. 1999. Das Gen umfasst 7 Exons und 6 Introns, Exon 1 und ein Teil des Exon 2 codieren die 5'-UTR-Region und werden nicht translatiert, Exon 2 codiert das Signalpeptid (SP), bestehend aus 16 Aminosäuren (AS), Exon 7 codiert den Hauptanteil des Proteins, sowie die 3'-UTR-Region und die Poly-A-Sequenz. Weitere Erklärungen, siehe Text.

Das Gen für humanes BSP (IBSP) liegt zusammen mit 4 weiteren Mitgliedern der SIBLING Familie, dem Dentin Sialophosphoprotein (DSPP), dem Dentin

Matrix Protein1 (DMP1), dem Matrix Extrazellulär Phosphoglykoprotein (MEPE) und dem Osteopontin (OPN) auf dem langen Arm von Chromosom 4 in der Region 4q21.3, welche ca. 750000 Basenpaare (bp) umfasst (Fisher und Fedarko 2003). In älteren Untersuchungen war bei *in-situ*-Hybridisierungen humanes Bone Sialoprotein der Region 4q21-31 zugeordnet worden (Kerr et al. 1993). Bei der Maus liegt das Gen für BSP auf Chromosom 5 (Young et al. 1994). Das ca. 15kb große humane BSP besteht aus 7 Exons und 6 Introns (siehe Abb.2) mit Klasse O Intron/Exon Übergängen, in welchen die Codon Triplets nicht von Introns unterbrochen werden. Die ersten 6 Exons sind relativ kurz (51-159 bp), wobei das 7. Exon wesentlich größer ist (ca. 2,5-2,6kb) (Kerr et al. 1993; Kim et al. 1994). Exon 1 wird typischerweise bei den Proteinen der SIBLING Familie nicht translatiert (Fisher und Fedarko 2003), kodiert aber die 5'UTR (untranslatierte) Region (Kim et al. 1994). Diese wird transkribiert und beinhaltet eine ribosomale Bindungsstelle, mittels der das Protein an Ribosomen binden kann und anschließend translatiert werden kann. Exon 2 beinhaltet zu Beginn noch 14 Nukleotide der 5'UTR Region, und nicht 13 Nukleotide, wie versehentlich falsch veröffentlicht und zitiert wurde (Kim et al. 1994; Ganss et al. 1999), sowie das hydrophobe, 16 Aminosäuren (AS) lange Signalpeptid, beginnend mit der Startaminosäure Methionin, sowie weitere 6 Nukleotide welche zwei AS vom reifen Protein kodieren. (Kerr et al. 1993; Ganss et al. 1999). Mittels des Signalspeptides wird das Protein nach abgeschlossener Proteinbiosynthese zum rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER) transportiert, posttranslationalen Modifikationen unterzogen und von der Zelle sekretiert (Fisher und Fedarko 2003). Exon 3 codiert 15 AS und Exon 4 27 AS des reifen Proteins, gemeinsam codieren sie den amino - terminalen Abschnitt vom Protein (Ganss et al. 1999). Die aromatischen AS Tyrosin und Phenylalanin stellen häufige AS in diesen Bereichen vom Molekül dar. Exon 5 codiert die erste Sequenz von Polyglutamatsäuren im Molekül und ist relativ Prolin-reich (Kim et al. 1994; Fisher und Fedarko 2003). Über die Codierung des Exons 6 ist noch wenig bekannt. Exon 7 codiert über die Hälfte des Proteins, einschließlich der zweiten Polyglutamat-reichen Region, dem Arg-Gly-Asp (RGD) Zellbindungs-Tripeptid, dem sulphatierten Tyrosin-reichen C-

Terminus vom Protein und der 3'-UTR (untranslatierten) Region, welche sich vom Translations-Stoppcodon bis zum Polyadenylierungs-Startpunkt erstreckt (Kim et al. 1994).

1.5 Funktion und Stoffwechselbeteiligung

BSP kann über das C –Terminal gelegene RGD Tripeptid an $\alpha\beta 3$ Integrine der Zelloberfläche verschiedener Säugetierzellen, wie Osteoblasten (Grzesik und Robey 1994), Chondrozyten (Sommarin et al. 1989), Fibroblasten (Somerman et al. 1988), Osteoklasten (Ross et al. 1993) und humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) binden (Bellahcene et al. 2000 a), wobei an Osteoblasten der Ratte die kleinste notwendige Sequenz für eine starke Zelladhäsion und extensive Mineralisierung von Gewebe 12 Aminosäuren CGGEPARGDTYRA des BSP umfasst (Harbers und Healy 2005). Eine mögliche Adapterfunktion des Moleküls zwischen Zellen und mineralisierendem Gewebe wurde in diesem Kontext formuliert (Ganss et al. 1999). Regulator für die Zelladhäsion und Migration an BSP scheint dabei der Aktivierungszustand des $\alpha\beta 3$ Rezeptors zu sein (Byzova et al. 2000).

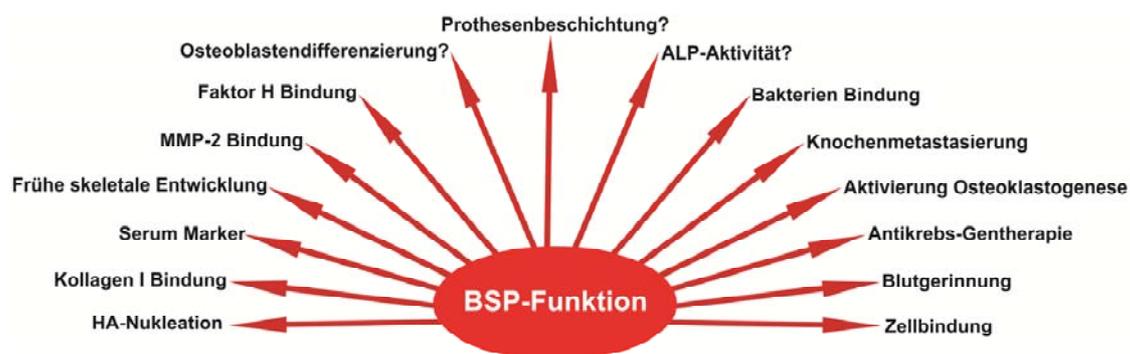


Abb.3: Dargestellt sind die Funktionen des BSP, modifiziert nach (Ogata 2008). Erklärung siehe Text.

Die Angiogenese mit der Bildung von neuen Kapillaren stellt einen zentralen Punkt in der Embryonalentwicklung dar. Endothelzellen von neuen Kapillaren exprimieren $\alpha\beta 3$ Rezeptoren auf Ihrer Oberfläche (Brooks et al. 1994; Brooks et al. 1994 a) und bei einer passenden Ligandenbindung wird ein Überlebens-Pathway induziert, welcher für die Vervollständigung der Angiogenese

entscheidend ist (Brooks et al. 1994 b). Humanes BSP wirkt Dosis-abhängig sowohl in vitro als auch in vivo fördernd auf die Adhäsion und chemotaktische Migration von humanen Endothelzellen (Bellahcene et al. 2000 a).

BSP hat auch eine Schutzfunktion für die Zelle, da durch die Bindung an Faktor H, ein humanes Plasma Protein, die Komplement-vermittelte Zellyse unterbunden wird, was im Rahmen der BSP Expression in Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen kann (Fedarko et al. 2000; Zipfel 2001). BSP bindet spezifisch an die inaktive und aktive Matrix Metalloproteinase 2, wobei diese Bindung durch den Faktor H getrennt werden kann (Fedarko et al. 2004).

Eine selektive Bindung von BSP an *Staphylococcus aureus* konnte bei Patienten mit Knocheninfektionen gezeigt werden (Ryden et al. 1989). Die Bindungsstelle wurde auf einem kleinen N-terminalen Abschnitt des Proteins lokalisiert (Ryden et al. 1997). Als Bindeprotein von *Staphylococcus aureus* konnte ein Oberflächen-Bonesialo-bindendes Protein indentifiziert werden (Tung et al. 2000).

BSP wird in diversen Tumoren wie Brust- (Bellahcene et al. 1994), Lungen- (Bellahcene et al. 1997 b), Schilddrüsen- (Bellahcene et al. 1998 b), Prostata- (Waltregny et al. 1998), Zervix- (Detry et al. 2003) und Multiplen Myelomen (Bellahcene et al. 2000 b) exprimiert, welche häufig in Knochen metastasieren. An humanen Brustkrebszellen konnte gezeigt werden, dass die Migration der Zellen mittels der RGD Sequenz des BSP an $\alpha\beta 3$ Rezeptoren vermittelt wird, wohingegen eine Adhäsion und Proliferation der Zellen über den $\alpha\beta 5$ Rezeptor vermittelt wird. In vitro erhöht BSP die Proliferation von Brustkrebszellen (Sung et al. 1998). Mittels Adhäsions- und Zell-Invasions-Assays konnte in vitro gezeigt werden, dass Brustkrebszellen, welche aktive $\alpha\beta 3$ Integrine exprimieren, verstärkt an BSP angereicherten mineralisierten Knochen, als auch an rekombinantes BSP binden (Pecheur et al. 2002).

Da BSP auch in ektopen Gewebe exprimiert wird, nutzen aktuelle Ansätze der Gentherapie die regulativ lytischen Eigenschaften eines verkürzten BSP

Promotors, welcher in einen Adenovirus integriert wurde und konnten damit sowohl eine Zellyse bei humanen Blasentumorzellen, als auch eine signifikante Reduzierung der Tumorgröße in Blasentumoren eines Mausmodels erzielen (Melquist et al. 2006).

Da während der Knochenmineralisation Hydroxylapatit (HA) Kristalle in der extrazellulären Matrix (ECM), bestehend aus Typ I Kollagen und nicht kollagenartigen Proteinen, abgelagert werden und in einem Festphase Agarosegelsystem gezeigt werden konnte, dass Knochen BSP als *de novo* Nukleator für Hydroxylapatit (HA) fungiert (Hunter und Goldberg 1993), wobei bereits Konzentrationen von 0,3µg BSP/ml (9nM) in diesem System als ausreichend ermittelt wurden (Hunter et al. 1996), wird vermutet, dass BSP eine wichtige Rolle im Mineralisationsprozess des Knochens spielt. Bemerkenswerterweise geht die Nukleationsaktivität nach chemischer Modifizierung der Carboxylgruppen, nicht jedoch nach enzymatischer Dephosphorylierung des Proteins verloren. Durch vergleichende Untersuchungen an Polymeren konnte die Eigenschaft der Nukleation den zwei N -Terminal lokalisierten Polyglutamat reichen Regionen des Proteins zugesprochen werden (Hunter und Goldberg 1994 a). Analysen von BSP Fragmenten vom Schwein indizieren ebenfalls, dass die Nukleationsaktivität innerhalb der zwei Polyglutamat - reichen Sequenzen liegt, wobei die erste Sequenz effektiver als die zweite Sequenz zu sein scheint und die komplette Struktur des Proteins dafür nicht erforderlich, aber eine helikale Struktur wichtig ist (Goldberg et al. 1996). Verschiedene Algorithmen sagen den Polyglutamat reichen Sequenzen im BSP eine α -helikale Struktur voraus (Shapiro et al. 1993). Andere Ergebnisse zeigen, dass 8 benachbarte Glutamatsäuren für die Nukleationsaktivität benötigt werden und diese nicht in einer α -helikalen Form vorliegen. Synthetische Glutamatpolymere besitzen ebenfalls eine α -helikale Struktur, können aber unter physiologischen Umständen eine links gewundene, sog. extended helix bevorzugen. Dies könnte eine Erklärung für die geringere Nukleationsaktivität synthetischer, glutamatreicher Polymere im Vergleich zu BSP darstellen (Hunter und Goldberg 1994 a). Bei der Lokalisierung der Domäne von BSP zur Vermittlung der HA Nukleation konnte diese in darauf folgenden Untersuchungen rekombinanter

BSP Fragmente der Ratte auf ein Fragment, welches für die erste Glutamat reiche Region codiert (42-87bp), eingegrenzt werden (Harris et al. 2000). Des weiteren zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen von Primärkulturen fötaler Rattenzellen der Schädelkalotte nach 15 Tagen Inkubation mittels Immungold Antikörpern gegen BSP, in Bereichen mineralisierender Matrix, eine Assoziation von BSP mit HA Kristallen (Nefussi et al. 1997). An BSP von Rattenzellen wurde ebenfalls mittels einer modifizierten Scatchard Analyse die Affinität für HA untersucht und eine Dissoziationskonstante von 2.6×10^{-9} ermittelt (Stubbs et al. 1997). Dieser Wert scheint der bisher stärkste HA Bindungswert für ein Matrixprotein zu sein.

BSP kann über noch ungeklärte Mechanismen an Kollagen I binden, wobei die dreifach helikale Struktur des Kollagens wichtig scheint, jedoch die Telopeptide des Kollagens bei der Bindung nicht involviert sind und die Bindung von rekombinanten BSP an Kollagen I die HA Nukleation fördern kann (Baht et al. 2008). Die Bindung des BSP an Kollagen I scheint dabei unabhängig von den posttranslationalen Modifizierungen des BSP statt zu finden (Tye et al. 2005).

In den vergangenen Jahren gewann BSP als unabhängiger, nichtinvasiver, sensitiver, und prognostischer Serummarker für Knochen turnover bei malignen, oder metabolischen Erkrankungen (Seibel et al. 1996), wie der Knochenmetastasierung bei Brustkrebs Patientinnen (Diel et al. 1999), sowie bei Untersuchungen der Knochenbeteiligung und Tumorzell Belastung beim Multiplen Myelom (Woitge et al. 2001) an Bedeutung. Mittels eines diesbezüglich entwickelten Radioimmunoassays können BSP-Konzentrationen im Serum bestimmt werden (Karmatschek et al. 1997). Auch als quantitativer Verlaufsp parameter der skelettalen Antwort auf eine Hormonersatztherapie bei postmenopausalen Frauen rückt BSP weiter in das Zentrum der Aufmerksamkeit (Stork et al. 2000).

Die enzymatische Aktivität der Alkalischen-Phosphatase (AP) steht in enger Beziehung zur Differenzierung von Osteoblasten. Rekombinantes BSP (rBSP)

kann in primären Osteoblastenkulturen der Ratte die Alkalische-Phosphatase Aktivität am 3. und 5. Tag *in vitro* erhöhen, nach 10 Tagen ist jedoch, im Vergleich zu Kontrollkulturen ohne BSP, kein signifikanter Unterschied mehr nachweisbar. Unbehandelte Osteoblasten-ähnliche MC3T3E1 Kontrollkulturen zeigen in den ersten 5 Tagen ebenfalls eine erhöhte AP Aktivität, wobei diese Aktivität auch nach 20 Tagen noch geringer ist, als die der BSP behandelten Osteoblastenkulturen. Inwieweit BSP die Differenzierung von Knochen-vorläuferzellen zu reifen Osteoblasten beeinflusst ist noch unklar. Gezeigt werden konnte, dass die Knochen-assoziierten Transkriptionsfaktoren Runx2 und Osx in primären Osteoblasten der Ratte bei einer Inkubation mit rBSP am 3. und 5. Tag, im Vergleich zu Kontrollkulturen, signifikant erhöht sind, nach 10 Tagen jedoch ähnlich hoch exprimiert werden (Gordon et al. 2007).

BSP spielt eine entscheidende Rolle in der frühen skeletalen Entwicklung, so weisen BSP knock-out Mäuse im Vergleich zu Wildtypen ein geringeres Gewicht und eine geringere Größe auf. 4 Monate alte knock-out Mäuse haben kürzere Femurknochen mit einer dünneren Kortikalis und einem höheren trabekulären Knochenanteil, als vergleichbare Wildtypen, wobei die Kortikalisdicke, nicht jedoch die Femurlänge, im Verlauf der Entwicklung wieder ausgeglichen werden kann. Die Mineralisierung der Knochenmatrix von BSP knock-out Mäusen ist bis zu einem Alter von 12 Monaten geringer als bei den Wildtypen (Malaval et al. 2008).

Anhand von RAW264.7 – Zellen und von vom Knochenmark abstammenden Makrophagen der Maus konnte jedoch auch gezeigt werden, dass rekombinantes BSP synergistisch mit RANKL den Hauptregulator der Osteoklastogenese, den Kernfaktor für aktivierte T-Zellen NFAT-2 aktiviert und somit zu einem Anstieg von Osteoklasten und einer Abnahme von Apoptose – Signaling in den Osteoklasten führen kann (Valverde et al. 2005).

An humanen Megakaryozyten konnte gezeigt werden, dass aktivierte Thrombozyten BSP frei setzen, wobei dessen folglich mögliche Rolle in der Blutgerinnung noch ungeklärt ist (Chenu und Delmas 1992).

1.6 Prothesenbeschichtung

Die aseptische Prothesenlockerung stellt eine mögliche Langzeit-Komplikation im Rahmen der Gelenkersatztherapie dar. Hauptsächlich induziert durch Abriebpartikel der Prothese entsteht ca. 10-20 Jahre nach Gelenkersatz eine Entzündungsreaktion mit sich anschließenden osteolytischen Prozessen, wobei diverse Zellen, wie Makrophagen, Fibroblasten, Riesenzellen, neutrophile Lymphozyten und vor allem Osteoklasten daran beteiligt sind (Abu-Amer et al. 2007). Etwa 1,5 Mio Gelenkersatzoperationen werden jährlich weltweit durchgeführt, wobei das Versagen von Implantaten mittlerweile ein sozio-ökonomisches Problem darstellt (Drees et al. 2007). Aktuelle Ansätze der Forschung sind zum einen die Materialverbesserung der Prothesen, um Abriebpartikel zu minimieren, und zum anderen die Beschichtung von Prothesen um ein besseres Einwachsen des körperfremden Materials zu begünstigen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Knochen-BSP beschichtete Titan-Implantate in den Oberschenkelknochen von Ratten osteoinduktiv wirken, die Implantate jedoch nicht fester eingewachsen waren als Kontrollimplantate (O'Toole et al. 2004). Mit rekombinantem His-Myc-Ek-BSP beschichtete glatte Titan- und raue Titan-Hydroxylapatit-Keramik-Implantatoberflächen zeigen, im Vergleich zu Kontrollversuchen, keine signifikant höheren Werte für angesiedelte Zellen auf, wobei jedoch eine osteoinduktive Wirkung für die Expression von Osteonectin immunhistochemisch detektierbar ist (Graf et al. 2008).

1.7 Beschreibung Projekt

Eingebettet in ein größeres Projekt zur Untersuchung der Wirkung von verschiedenen Biomaterialien und Wachstumsfaktoren als neuartige Beschichtungsmöglichkeiten von Endo-Prothesen für die klinische Anwendung, galt es im Rahmen dieser Arbeit die Knochenbildung-assoziierte Wirkung zweier rekombinanter humaner Bone Sialoproteine der Firma Immunodiagnostik auf humane Osteoblasten und Stromazellen, sowie auf Osteoblasten

und Knochenmarkzellen vom Schwein zu untersuchen. Rekombinantes Bone Sialoprotein wurde dabei in humanen HeLa-Zellen, sowie in E. coli Bakterien hergestellt. Mittels RT-PCR wurden die Gene TGF- β , Osteopontin und Osteonectin auf eine mögliche Induktion seitens der zwei BSPs untersucht.

Die Zunahme der Zellzahl und insbesondere die Proliferationsrate wurden indirekt durch Bestimmung der mitochondrialen Stoffwechselaktivität im MTT-Test bestimmt. Immunzytochemisch wurde die Zellproliferation auch auf DNA-Ebene durch den Einbau synthetischer Thyminanaloga mittels des BrdU-Assays untersucht. Neben der Alkalischen Phosphatase-Färbung, als qualitativer Nachweis für aktive Osteoblasten, wurde auch die von Kossa-Färbung, welche dem histochemischen Nachweis von Kalziumhydroxylapatit-Ablagerungen in mineralisiertem Gewebe und dem Nachweis der Osteoblastendifferenzierung dient, angewandt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Materialien	Produkt, Cat. No., Firma, Ort
Aceton:	Lot. No. K38345914 805, Merck, D-Darmstadt
Acrylamid:	30% Acrylamide/Bis Solution 29:1, Cat. No.161-0156, Bio-Rad, USA, CA
Alkalische Phosphatase Färbereagenzien:	5,5 Diäthylbarbitursäure Na-Salz, Art. No. 6318 Merck, D-Darmstadt, Variaminblausalz B, Art. No. 94820, Fluka, Sigma-Aldrich, D-Steinheim Natriumnaphtyl-(1)-sulfat, Art. No. 71090, Fluka, Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Alkohole:	Alkohol 80% vergällt, Universitätsapotheke, D-Tübingen Ethanol p.a., Lot. No. K36759083 647, Merck, D-Darmstadt Methanol p.a., Lot. No. K36193709 630, Merck, D-Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS) 10%:	Cat. No. 161-0700, Bio-Rad, USA, CA
Ampuwa:	PZN-0041476, Zul. No. 40676.00.00, Fresenius Kabi, D-Homburg
Antibiotika:	Penicillin/Streptomycin, Cat. No. 15140-122, Invitrogen Corporation, Gibco, D-Eggenstein
Antimykotikum:	Amphotericin B (250 µg/ml) Cat. No. 1672348 MP Biomedicals, Incorporation, UK
Aqua dest.:	Aqua dest., Universitätsapotheke, D-Tübingen
Bromphenolblau:	Cat. No. 15375, SERVA, D-Heidelberg
BSA-Rinderalbuminserum:	Albumine from bovine serum, Cat. No.

Cell Proliferation ELISA BrdU Kit:	A 39021G, Sigma-Aldrich, USA, St. Louis 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) labeling reagent, Kit, Cat. No. 11647229001, Roche, D-Mannheim
Cell Proliferation Kit I MTT:	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid) labelling reagent (MTT), Kit, Cat. No. 11465007001, Roche, D-Mannheim
Coomasie Brillant Blue R-250:	Cat. No. 161-0400, Bio-Rad Laboratories, USA, CA
DEPEC:	Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser, aus Advantage® RT-for-PCR Kit, Cat. No. 639506, Clontech, USA, CA
Desinfektionsmittel:	Descosept AF, Cat. No. 311.010, UN 1987, Dr. Schumacher GMBH, D-Melsungen
DMSO (Dimethylsulfoxid):	Dimethyl Sulphoxide, Lot. No. 114K2301, Sigma-Aldrich, D-Steinheim
DNA-Synthese Kit:	RNase-Free DNase Set, Cat. No. 79254, Qiagen, D-Hilden
EDTA-Natrium:	Triplex® III, Cat. No. K31678818 308, Merck, D-Darmstadt
Essigsäure:	Eisessig 100%, Cat. No. K28319163 039, Merck, D-Darmstadt
Ethidiumbromid:	Cat. No. E-8751, Sigma, USA, St. Louis
Fötales Kälberserum:	FBS, Cat. No. S0615, Biochrom AG, D-Berlin
Glycerin:	Cat. No. K19201793 336, Merck, D-Darmstadt
Glycin:	Cat. No. 4201, Merck, D-Darmstadt
Indometacin:	Cat. No. 57413, Fluka, Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Kollagenase:	Type XI, Art. No. 9407, Sigma-Aldrich, D-Steinheim
LightCycler SYBR Green I:	Cat. No. 12239264001, Roche, D-Mannheim
Marker Polyacrylamid-Gel:	MagicMark XP Western Protein Standard, Invitrogen, D-Karlsruhe

Medium Stammzellen:	MCGS (Mesenchymal Cell Growth Supplement), 50 ml, Cat. No. PT-4106E, Cambrex; L-Glutamine, 10 ml, Cat. No. PT-4107E; Penicillin-Streptomycin, 0,5 ml, Cat. No. PT-4108 E; MSCBM Mesenchymal Stem Cell Basal Medium, 440 ml, Cat. No. PT-3238, Cambrex, D-Potsdam
Medium Osteoblasten:	DMEM/F-12 [1:1], 500 ml, REF 31330-038, Gibco, D-Eggenstein
Mercaptoethanol:	2-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol), EC No. 200-464-6, Lot. No. 102K0025, Sigma-Aldrich, D-Steinheim
PCR-Kit:	RT-for-PCR Kit, Ref. 639506, Lot. No. 6060379, Clontech, D-Heidelberg
PBS-Pufferlösung:	DPBS, 500 ml, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , Cat. No. BE 17-512F, Cambrex, B-Verviers
Percoll:	Ficoll-Paque TM Plus, <0,12EU/ml, Cat. No. 17-1440-02, GE Healthcare Biosciences AB, Schweden
RNA Kit:	RNeasy Mini Kit (250), Cat. No. 74106, Qiagen, D-Hilden
SDS (Natriumdodecylsulfat):	Sodium dodecyl sulphate, Cat. No. 161-0416, Bio-Rad, USA, CA
Tetramethylethylendiamin(TEMED):	Cat. No. 161-0801, Bio-Rad, USA, CA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan:	10x Tris/Glycine Buffer, Cat. No. 161-0734, Bio-Rad, D-München
Trypanblau:	Trypan Blue (0,4%), Lot. No. 90K2315, Sigma-Aldrich, D-Steinheim
Trypsinlösung/EDTA:	Trypsin – EDTA 0,5 %, 100 ml, Cat. No. 25300-054, Gibco, D-Eggenstein
Trypsinlösung/EDTA (Stammz):	Cat. No. CC-3232, 100 ml, Gibco, D-Eggenstein
Vitaminlösung:	MEM Vitamins, Cat. No. 11120-037, Gibco, D-Eggenstein

2.1.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterial

Materialien	Produkt, Cat. No., Firma, Ort
Deckgläser:	21x26 mm, Cat. No. H 876, Roth, D-Karlsruhe
Eppendorf-Cups:	Tubes 2 ml, Lot. No. V125127J; Tubes 1,5 ml, Lot. No. V125140J; Tubes 0,5 ml, Lot. No. V125165J, Eppendorf AG, D-Hamburg
Faltenfilter:	18,5 cm Durchmesser, Marchery-Nagel, D-Düren
Handschuhe:	Kimberly-Clark, D-Koblenz
Kulturflaschen:	25 cm ² Kulturflaschen, Cat. No. 137211, 0,2 µm Vented Blue Plug Seal Cap, Falcon, Becton Dickinson, D-Heidelberg
Kulturflaschen:	75 cm ² Kulturflaschen, Cat. No. 137787, 0,2 µm Vented Blue Plug Seal Cap, Falcon, Becton Dickinson, D-Heidelberg
Kryo-Vials:	Cryo.S, Lot. No. 06100176, Greiner Bio-One, D-Frickhausen
Makroplatten:	Tissue Culture Plate, 6 Well, Cat. No. 657160, Cellstar, Greiner Bio-One, D-Frickhausen
Mikroplatten:	Tissue Culture Plate, 96 Well, flat bottom, Cat. No. 655180, Cellstar, Greiner Bio One, D-Frickhausen
Petrischalen:	Petrischalen rund, steril, Lot. No. 305391, Greiner Bio One, D-Frickhausen
Pipetten:	Eppendorf Research, D-Wesseling-Berzdorf
Pipetten:	2 ml Cat. No. 357507; 5 ml Cat. No. 357543; 10 ml Cat. No.357551; 25 ml Cat. No. 357525, Falcon Becton Dickinson, D-Heidelberg
Pipettenspitzen:	Safe Seal-Tips Premium (Filter), 100, 200, 500 µl, Biozym, D-Hess
Pipettierhilfe:	Pipetus-Akku, Cat. No. L3010131, Hirschmann, Laborgeräte, D-Eberstadt
Skalpelle:	Cutfix, Cat. No. 5518016, Braun, Aesculap,

	D-Tuttlingen
Spritzen:	Insulinspritzen 1 ml., Cat. No. 300026, Becton Dickinson, D-Heidelberg
Sterilfilter:	Minisart, Porengröße 0,45 µm, Lot. No. 17598 050086 Sartorius, D-Göttingen
Sterilfilter Pipettierhilfe:	Minisart, Porengröße 20 µm, Lot. No. 17597010396 Sartorius, D-Göttingen
Tubes:	Tubes 15 ml, Cat. No. 62.554.002, Sarstedt, D-Nürmbrecht Tubes 50 ml, Cat. No. 210261, Cellstar, Greiner Bio-One, D-Frickenhausen
Zählkammer:	Neubauer Zählkammer, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm ² , Assistent Glasswarenfabrik, D-Sondheim

2.1.3 Geräte

Materialien	Produkt, Cat. No., Firma, Ort
Absaugpumpe:	Typ 86KN.18, Cat. No. 1099874, KNF Neuberger, D- Freiburg
Autoklav:	Typ V150, Cat. No. 0458, Systec, D-Bettenberg
Brutschrank:	Typ B5060EK-CO2, DIN. Nr. 12880, Heraeus, D-Hanau
ELISA Photometer:	PowerWave, Cat. No. 125596, BioTek, D-Bad Friedrichshall
Feinwaage:	Electronic Balance, ABJ 220-4M, Cat. No. WB 0350016, Kern und Sohn GmbH, D-Balingen-Frommern
Lichtmikroskop:	Leica Fluovert FS, Type:090-128.012, Ernst Leitz GMBH, D-Wetzlar
Light-Cycler:	Cat. Nr. 1401101, Roche GMBH, D-Mannheim
PCR-Block:	Uno II Thermoblock, Cat. No. 9703065, Biometra, D-Göttingen

Photometer:	RNA/DNA Calculator, Cat. No. 82738, GeneQuant pro, Biochrom, UK-Cambridge
Schüttler:	IKA MTS 2/4 digital, Cat. Nr. 01.298974, IKA-Werk GMBH, D-Staufen
Sterilbank:	Typ UVF6.12S, BDK, D-Sonnenbühl
Wasserbad:	WB22, Cat. No. 15010065, Din. 12876-1-K1, Mettler, D-Schwabach
Zentrifuge:	Centrifuge 5415 D, Cat. No. 542544000, Eppendorf AG, D-Hamburg

2.1.4 Humanes Untersuchungsmaterial

In dieser Doktorarbeit wurde das humane Untersuchungsmaterial hauptsächlich von Patienten der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen gewonnen, welche entweder die Diagnose Coxarthrose, oder Gonarthrose hatten. Bei den Eingriffen der Coxarthrose wurde auf der betreffenden Hüftseite eine Hüfttotalendoprothese (HTP) implantiert, der körpereigene Hüftkopf entfernt und aus diesem im Labor unter sterilen Bedingungen die Knochenzellen gewonnen. Bei den Operationen der Gonarthrose wurde eine Knieendoprothese (KTP) implantiert und aus den entfernten Knochenfragmenten von Femur und Tibia, ebenfalls unter sterilen Bedingungen, die Knochenzellen gewonnen. Ziel war hier Osteoblasten und Stromazellen zu isolieren und kultivieren. Insgesamt wurden 11 Osteoblasten- und 9 Stromazell-Primärkulturen kultiviert (siehe Tab.3). Des Weiteren wurden zwei Chargen Osteoblasten aus dem Labor von Prof. Dr. rer. nat. Gerd Klein, Medizinische Universitätsklinik, Sektion für Transplantationsimmunologie, Zentrum für Med. Forschung (ZMF) der Universitätsklinik Tübingen, sowie eine bei der Firma Promocell, Heidelberg, erworbene Charge Osteoblasten (siehe Tab.4) kultiviert. Die Gewebekulturen wurden nicht gepoolt. Die Verwendung humaner Zellen dieser Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt.

Übersicht Zell-Donatoren

Verschlüsselung	Alter [Jahre]	Geschlecht	Operation	Diagnose	Bemerkung Osteobl.	Bemerkung Stromaz.
SRW/1	57	männlich	HTP	Coxarthr. Seite n. b.	verpilzte Primärkultur	i. O.
HRL/2	67	weiblich	HTP	Coxarthr. Seite n. b.	i. O.	i. O.
VRH/3	62	weiblich	HTP	Coxarthr. Seite n. b.	verpilzte Primärkultur	i. O.
O-SEP/4	n. b.	männlich	HTP	Coxarthr. li	i. O.	i. O.
SRI/5	67	weiblich	HTP	Coxarthr. re	i. O.	i. O.
ALH/6	69	weiblich	HTP	Coxarthr. re	i. O.	n. i.
EGG/7	51	männlich	HTP	Coxarthr. re	i. O.	n. i.
LBI/8	68	weiblich	KTP	Gonarthr. li	i. O.	i. O.
POF/9	62	weiblich	KTP	Gonarthr. li	i. O.	i. O.
SLJ/10	64	männlich	KTP	Gonarthr. re	i. O.	i. O.
SRT/11	64	männlich	HTP	Coxarthr. re	verpilzte Primärkultur	i. O.

Tab.3: Übersicht der Zell-Donor Patienten.**Weitere verwendete Osteoblasten**

Verschlüsselung	Alter [Jahre]	Geschlecht	Operation	Diagnosen	Bemerkung Osteobl.	Bemerkung Stromaz.
HOB-1	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	i. O.	n. i.
HOB-2	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	i. O.	n. i.
HOB-C	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	i. O.	n. i.

Tab.4: Die Osteoblasten HOB-1 und HOB-2 wurden uns freundlicherweise aus dem Labor von Prof. Gerd Klein überlassen. Die Charge HOB-C (Normal Humane Osteoblasts) Cat. No. C-12720, Lot. No. 5112902.1, >500.000 Zellen/ml, wurde von der Firma PromoCell, Heidelberg, bezogen.

2.1.5 Tierisches Untersuchungsmaterial

Zur Gewinnung der Knochenzellen von jungen Schweinen wurden zwei Ansätze durchgeführt. Zum einen erfolgte die Isolierung direkt aus dem Femur frisch geschlachteter Schweine. Zum anderen konnten Knochenzellen mittels Differenzierung aus steril gewonnenem Knochenmark von jungen Schweinen im Rahmen von Tierversuchen der Herz-Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Tübingen gewonnen werden. Ziel war es Knochenmarkzellen zu isolieren und aus diesen, mittels Osteoblasten-Differenzierungsmedium, Osteoblasten zu differenzieren. Die Gewebekulturen wurden nicht gepoolt.

2.1.6 Bone Sialoproteine

Es wurden zwei Typen rekombinanter Bone Sialoproteine von der Firma Immunodiagnostik, Bensheim, Germany unsteril und ungelöst zur Verfügung gestellt.

2.1.6.1 BSP

Folgende Information wurde uns gegeben:

Protein: Human Bone Sialoprotein, rekombinant, C-terminal His-tag.

Referenz Nr.: Locus ID 3381

Herstellung: Serumfrei in humaner HeLa- Zelllinie

Katalog Nr.: A 1004AG.10

Größe: 70-80kDA

Lot. Nr.: AK072/06AIBI1

In dieser Arbeit wird das Protein unter der Bezeichnung **BSP**, oder auch 1. rek. BSP aufgeführt.

2.1.6.2 DRJ

Folgende Information wurde uns gegeben:

Protein: Human Bone Sialoprotein, DRJ, rekombinant, His-tag.

Charge: vBSP3-030805A8

Größe: ca.60kDA

Expressionswirt: E. coli.

In dieser Arbeit wird das Protein unter der Bezeichnung **DRJ**, oder auch 2. rek. BSP aufgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturmethoden

2.2.1.1 Allgemeines

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Sterilbank mit „laminar airflow“) durchgeführt. Die Inkubation der verschiedenen Zelltypen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Es wurden sowohl sterile Arbeitsmaterialien, als auch sterile Medien verwendet.

2.2.1.2 Anlage von Primärkulturen humaner Zellen

Das intraoperativ steril gewonnene humane Knochenmaterial wurde in ein steriles, verschließbares Plastikgefäß gegeben und mit PBS-Pufferlösung bedeckt, um einer Kontamination und vorzeitigen Austrocknung des Gewebes vorzubeugen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden an der Sterilbank im Labor durchgeführt.

2.2.1.2.1 Anlage humaner Osteoblastenzellkulturen aus Spongiosa

Das Knochenmaterial wurde in einer Petrischale mit 10 ml PBS-Pufferlösung bedeckt, mittels einer chirurgischen Pinzette und Zange vorsichtig die Spongiosa von der Kompakta des Knochens getrennt, sowie die Spongiosa zerkleinert und die Kompakta verworfen. Zur feineren Zerkleinerung der spong-

lösen Knochenbälkchen wurden sterile Einmalskalpelle verwendet. Die feinen Spongiosafragmente wurden dann mittels eines sterilen Spatels in 50 ml Tubes überführt, mit reichlich PBS(-) überschichtet und zentrifugiert (siehe Abb.1). Das Waschen mittels PBS(-) und anschließender kurzer Zentrifugation bei 1700U/min. wurde so oft wiederholt, bis der Überstand klar wurde (ca.5x). Anschließend wurden die Knochenbälkchen mit 5 ml Kollagenase versetzt und für 20 Minuten im Wasserbad bei 37°C unter mehrmaligem Schütteln inkubiert. Um die Reaktion der Kollagenase zu stoppen wurden 5 ml Osteoblastenmedium hinzugegeben und es folgte die Zentrifugation für 5 min. bei 1700U/min. Aus dem Überstand wurden, wie in 2.2.1.2.2 beschrieben, Stromazellen isoliert und die Knochenfragmente erneut mehrmals mit PBS(-) gewaschen. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Knochenbälkchen mittels eines weiteren sterilen Spatels in eine (75 cm²) Kulturflasche überführt und mit 15 ml Osteoblastenmedium im Brutschrank inkubiert. Die Kulturflaschen wurden darauf hin möglichst wenig bewegt um das Anwachsen der Osteoblasten nicht zu beeinträchtigen. Nach 24h erfolgte der erste Mediumwechsel. Inkubiert wurde mit Osteoblastenmedium.

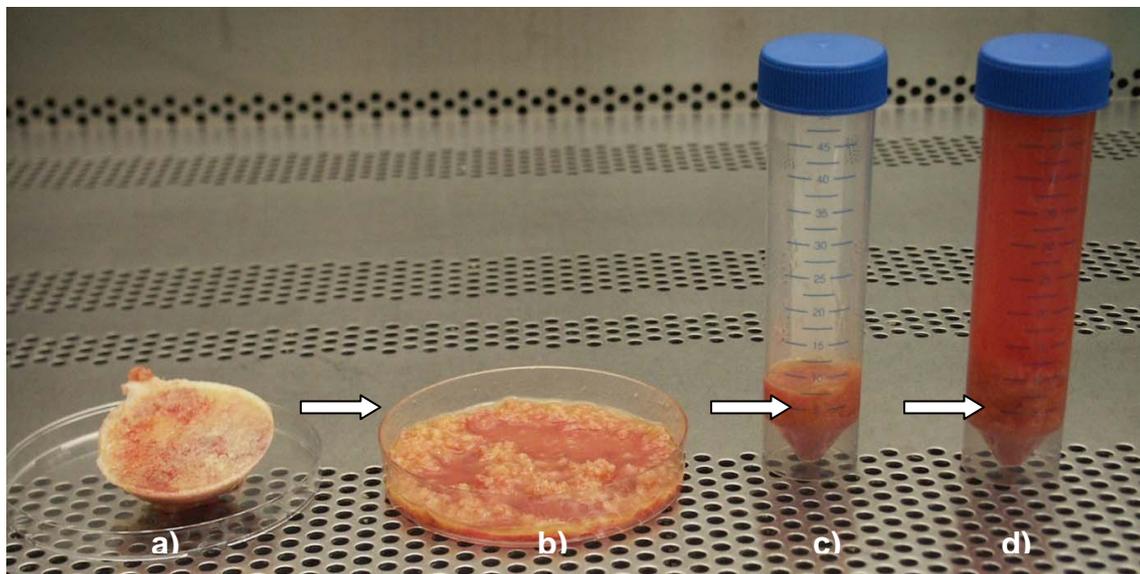


Abb.4: Dargestellt sind Teile der Arbeitsschritte bei der Aufarbeitung eines humanen Hüftkopfes. a) Proximales Ende eines humanen Hüftkopfes vor Aufarbeitung zur Isolierung humaner Osteoblasten und Stromazellen wenige Stunden nach dem operativen Eingriff einer Hüfttotalendoprothese. b) Mittels Zangen und Skalpell zerkleinerte spongiose Anteile distaler Fragmente des Hüftkopfes, c) Verteilung dieser kleinen Knochenfragmente auf 50ml Tubes. d) Mehrere Waschschrte mit PBS (-) folgen.

2.2.1.2.2 Anlage humaner Stromazellkulturen aus Spongiosa

Die humanen Stromazellen wurden bei der Isolierung humaner Osteoblasten aus dem Überstand (siehe 2.2.1.2.1) gewonnen. Der Überstand wurde mit einer Pipette in ein steriles 50 ml Tube überführt und 2x 5 min. bei 1700U/ min. zentrifugiert, so dass das Pellet weitgehend von Blutzellen gereinigt wurde und weiß erschien. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1-2 ml Stammzellmedium gelöst und auf eine 6 Well Platte verteilt. Die 6 Well Platten wurden nun möglichst wenig bewegt um das Anwachsen der stromalen Knochenzellen nicht zu beeinträchtigen. Nach 24h erfolgte der erste Mediumwechsel. Inkubiert wurde mit Stammzellmedium; ab der 1.Passage wurde mit Osteoblastenmedium weiter inkubiert.

2.2.1.3 Anlage Primärkulturen vom Schwein

Wie in 2.1.5 erwähnt gab es zwei Ansätze bei der Isolierung von Knochenzellen junger Schweine. Die sterile Isolierung von Knochenmarkbälkchen direkt aus dem Femur der Schweine, stellte sich mit unseren Mitteln im Labor als schwierig dar. Weder mit einer sterilen Knochensäge, noch mit sterilen Zangen ließen sich zufrieden stellende Ergebnisse erzielen. Daher wurden Knochenmarkzellen vom Schwein gewonnen und aus diesen Osteoblasten differenziert. Hier wurde zunächst die Haut über dem Femur desinfiziert, wobei sich das Tier in Vollnarkose befand. Der Femur wurde mit einer Spezialnadel punktiert und über eine, der Punktionsnadel aufgesetzte Spritze, wurden ca. 60 ml Knochenmark in EDTA Röhrchen (Verhinderung der Gerinnung) aspiriert. Dieses Knochenmark sieht aus wie Blut und enthält Markflüssigkeit und Fettzellen. Die EDTA- Röhrchen galt es dann möglichst rasch im Labor aufzuarbeiten.

2.2.1.3.1 Anlage Knochenmarkzellkulturen vom Schwein

Das Knochenmark wurde aus den EDTA-Röhrchen mittels einer Pipette in

50 ml Tubes überführt, im Verhältnis 1:4 mit PBS (-) verdünnt und gut homogenisiert. Eine Zentrifugation bei 150g, für 10 min. bei Raumtemperatur folgte. Fettschicht und Überstand wurden abgenommen und verworfen. Das Knochenmarkpellet wurde in PBS (-) aufgenommen, wobei das Verhältnis Knochenmark zu PBS (-) nicht >1:1 und nicht <1:2 sein sollte. Zur Trennung der Knochen- von den Blutzellen wurden ca. 15 ml Percoll-Trennlösung (Dichte ρ 1,077g/ml) in ein 50 ml Tube gegeben, vorsichtig mit der Zellsuspension überschichtet und bei 400g 30 min. bei Raumtemperatur, ohne aktiven Abremsvorgang am Ende, zentrifugiert. Aufgrund der unterschiedlichen Zelldichten setzen sich die Erythrozyten am Boden ab und die mononuklearen Zellen, deren Dichte $\rho < 0,1077\text{g/ml}$ ist, bilden zwischen der Percoll-Lösung (unten) und dem PBS (-) (oben) eine schmale weiße Interphase, welche abpipetiert und in ein frisches 50 ml Tube überführt werden kann. Anschließend erfolgte eine Verdünnung mittels PBS (-) und Zentrifugation für 10 min. bei 4°C und 150g, ebenfalls ohne aktiven Abremsvorgang. Das Pellet wurde in Stammzellmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Knochenmarkstammzellen wurden in einer Dichte von 6×10^3 Zellen/cm² in Kulturflaschen (75cm²) ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Nach 24h erfolgte der erste Mediumwechsel. Inkubiert wurde mit Stammzellmedium. Die mesenchymalen Stammzellen wurden bei jeder Passage in einer Dichte von 6×10^3 Zellen/cm² ausgesät. Dies ist wichtig, da diese Zellen schnell wachsen und eine Differenzierung der Zellen- bei Zell-Zell Kontakt- vermieden werden soll.

2.2.1.3.2 Anlage Osteoblastenzellkulturen vom Schwein

Zur Differenzierung von Osteoblasten aus Knochenmarkzellen von jungen Schweinen wurde ein Osteoblasten-Differenzierungsmedium verwendet. Insgesamt wurden von zwei jungen Schweinen mesenchymale Stammzellen aufgearbeitet und ab der zweiten Passage wurde ein Teil dieser Stammzellen in einer Dichte von 20000 Zellen/cm² in Kulturflaschen (75cm²) ausgesät und mit dem Osteoblasten-Differenzierungsmedium für 2-3 Wochen inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24h.

2.2.1.4 Medium

2.2.1.4.1 Herstellung des Osteoblasten-Vollmediums

Zur Herstellung des ca. 10% FCS/D-MEM Vollmediums wurden zu 500 ml Dulbecco's MEM/Nutrient Mix F12 Grundmedium je 50 ml FCS, 13 ml MEM-Vitamine (Gibco), 10 ml Penicillin-Streptomycin (Gibco), 6,5 ml Amphotericin-B (Fungizone, Gibco) hinzugegeben. Für die Zusätze Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat wurden Stammlösungen angesetzt und diese portioniert bei -20°C eingefroren.

- Dexamethason Stammlösungen

Stammlösung 1: 10mg Dexamethason in 25,45ml H_2O

Stammlösung 2: 4ml der Stammlösung 1 in 36ml H_2O

- Ascorbinsäure Stammlösung

Stammlösung 1: 0,05 molar; 0,44g Ascorbinsäure in 50ml PBS (-)

- β -Glycerophosphat Stammlösungen

Stammlösung 1: 10mM; 1,53mg in 50ml PBS (-)

Stammlösung 2: 10 μM ; 40 μl Stammlösung 1 in 40ml PBS (-)

Zu den 500ml Dulbecco's MEM/Nutrient Mix F12 Grundmedium wurden 500 μl Stammlösung 2 Dexamethason, 500 μl Stammlösung Ascorbinsäure und 50 μl Stammlösung 2 β -Glycerophosphat gegeben.

Das Osteoblasten-Vollmedium wurde bei 4°C im Kühlschrank für max. 3 Wochen aufbewahrt. Das fötale Kälberserum wurde vor Gebrauch über Nacht im Kühlschrank aufgetaut, auf 25°C erwärmt, 30 min. bei 56°C hitzeinaktiviert, mit 1g/250 ml FCS versetzt und 30 min. auf dem Schüttler leicht geschüttelt. Nach der Inaktivierung wurde die Lösung steril filtriert (Porengröße 0,45 μm), in 50 ml Röhrchen portioniert und bei -20°C eingefroren.

2.2.1.4.2 Herstellung des Stammzell-Vollmediums

Als Grundmedium wurden 440 ml Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (Cambrex) verwendet, welches zusätzlich mit 50 ml Mesenchymal Cell Growth

Supplement (Cambrex), 10 ml L-Glutamine und 0,5 ml Penicillin-Streptomycin (Cambrex) versetzt wurde. Das Stammzell-Vollmedium wurde bei 4°C im Kühlschrank für max. 3 Wochen aufbewahrt.

2.2.1.4.3 Herstellung des Osteoblasten-Differenzierungs-Vollmediums

Zur Herstellung des 20% FCS/D-MEM Vollmediums wurden zu 500 ml Dulbecco's MEM/Nutrient Mix F12 Grundmedium je 100 ml FCS, 13 ml MEM-Vitamine (Gibco), 10 ml Penicillin-Streptomycin (Gibco), 6 ml Amphotericin-B (Fungizone, Gibco), sowie 1 µM Dexamethason, 50 µM Ascorbinsäure und 10 mM β-Glycerophosphat hinzugefügt. Das Osteoblastendifferenzierungs-Vollmedium wurde bei 4°C im Kühlschrank für max. 3 Wochen aufbewahrt. Wie in 2.2.1.4.1 beschrieben wurden Dexamethason, Ascorbinsäure und β-Glycerophosphat als Stammlösung angelegt, steril filtriert, portioniert und bei -20°C eingefroren.

2.2.1.5 Mediumwechsel und Zellpflege

Der Mediumwechsel wurde alle 2-3 Tage durchgeführt. Das jeweilige Vollmedium wurde aus diesen Gründen maximal 2-3 Wochen lang verwendet, bei 4°C im Kühlschrank gelagert und dann wieder frisch angesetzt. Beim Mediumwechsel wurden 10 ml frisches Vollmedium je Kulturflasche zugefügt.

2.2.1.6 Subkultivierung der Zellen

Zum Umsetzen der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 1-2x mit vorgewärmtem PBS(-) gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS(-) wurden 5 ml Trypsin/Flasche hinzugefügt und die Zellen mit dem Trypsin für ca. 5 min. im Brutschrank inkubiert. Nachdem alle Zellen abgelöst waren, wurde die Reaktion mit 5 ml des jeweiligen Vollmediums gestoppt und die Zellen gut resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt und bei 1500U/min. 5 min. bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in frisches Vollmedium aufgenommen und entweder erst ausgezählt (siehe 2.2.1.7), oder sogleich auf mehrere Kulturflaschen verteilt.

2.2.1.7 Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurde ein Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) verwendet. Die abgelösten Zellen wurden in Vollmedium aufgenommen und 20 µl Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau, also im Verhältnis 1:1 verdünnt, gut resuspendiert und an den Rand des Deckglases pipettiert. Mittels Lichtmikroskop wurden für die Auswertung vier großen Eckquadrate ausgezählt. Das Volumen dieser Felder betrug 4×10^{-4} ml und dementsprechend die Gesamtzellzahl bei n ausgezählten Zellen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors 2: $n \times 2 \times (4 \times 10^{-4})^{-1}$ ml = $n \times 5000$ Zellen/ml. Vitale Zellen sehen im Lichtmikroskop hell und glatt berandet aus, tote und avitale Zellen weisen eine defekte Zellmembran auf, nehmen das Trypanblau auf und sehen im Lichtmikroskop blau und deformiert aus. Für einen guten Versuch ist die vorherige korrekte Zählung und Aussaat der Zellen absolut notwendig.

2.2.1.8 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen, wie in 2.2.1.6 beschrieben, mittels Trypsin abgelöst, mit der äquivalenten Menge des jeweiligen Vollmediums die Reaktion gestoppt, die Zellen ggf. gezählt, abzentrifugiert bei 1500U/min und 4°C, sowie das Pellet in Einfriermedium aufgenommen und sogleich auf Eis gestellt. Das Einfriermedium für humane Osteoblasten und humane Stromazellen bestand aus frischem, gekühltem (4°C) Osteoblasten-Vollmedium mit 10% DMSO. Das Einfriermedium für die Stammzellen der Schweine bestand aus frischem, gekühltem Stammzell-Vollmedium, ebenfalls mit Zugabe von 10% DMSO. Für die differenzierten Osteoblasten vom Schwein wurde Differenzierungsmedium für Osteoblasten, auch mit 10% DMSO versetzt.

Das Pellet wurde im jeweiligen Einfriermedium aufgenommen, suspendiert und in kleine Kryoröhrchen (Inhalt ca. 1,8 ml) mit einer Zellzahl von ~1Mio. Zellen/Röhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen wurden zunächst 24h bei -70°C eingefroren, dann in einer Styroporbox in einen der Halter des Flüssigstickstoffs gegeben, wobei sich die Box in der Gasphase des Stickstofftanks befand. Die Zellen konnten hier über Monate gelagert werden. Dokumentiert wurden der Inhalt, die Zellmenge und das Datum der Kryokonservierung, die verantwortliche Person, sowie die Box im Stickstofftank.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank heraus genommen und auf Eis bis zur Sterilbank transportiert. Das vorgewärmte (37°C) Vollmedium, entsprechend dem jeweiligen Zelltyp, wurde in kleinen Mengen in die Kryoröhrchen pipettiert, sogleich mit den bereits aufgetauten Zellen wieder abpipettiert, in 50 ml Tubes überführt, welche bereits mit 20 ml Vollmedium und 20 ml PBS gefüllt waren und anschließend zentrifugiert.

Die Zentrifugation erfolgte bei 1500U/min. für 5 min. bei 4°C. Der Überstand mit dem bei Raumtemperatur zytotoxischem DMSO wurde verworfen, das Pellet in frischem Vollmedium aufgenommen und die Zellen in Kulturflaschen (75cm²) ausgesät. Nach 24h erfolgte der erste Mediumwechsel mit dem entsprechenden Vollmedium.

2.2.2 Methoden zur Untersuchung der verschiedenen Zellparameter

2.2.2.1 RT-PCR

1. Inkubationsansatz:

Über Nacht (12h)-Beschichtung der 75cm² Flaschen mit einer Absolutmenge von 60µg Protein/Flasche (6ml Proteinlösung, bei einer Arbeitskonzentration von 10µg/ml) im Kühlschrank bei 4°C. Anschließend unter sterilen Bedingungen vorsichtiges abpipettieren der Proteinlösung und Hinzufügen der ausgezählten Zellen (1x10⁶ Zellen/Flasche), gelöst in 10ml Osteoblastenmedium/Flasche. Inkubation der Zellen in den BSP beschichteten Flaschen für 24h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend folgte die Ablösung der

Zellen, RNA Extraktion, cDNA-Synthese und Real Time PCR der drei untersuchten Gene. Aufgrund von parallel angesetzten MTT-Vorversuchen mit der gleichen Beschichtungsmethode des Proteins und dortigen negativen Ergebnissen, wurde an dieser Stelle auf die ursprünglich geplante RT-PCR verzichtet. Stattdessen wurde ein 2. Inkubationsansatz erprobt.

2. Inkubationsansatz:

Direkte Inkubation der ausgezählten Zellen mit den zwei Proteinen. In den Vorversuchen wurde ausschließlich das BSP und nicht das DRJ-Protein untersucht. Im ersten Vorversuch wurden Proteinkonzentrationen von 1µg und 3µg Protein/Flasche (100µl, bzw. 300µl Proteinlösung, bei einer Arbeitskonzentration von 10µg/ml) untersucht. Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche wurden in den Hauptversuchen BSP und DRJ Proteinkonzentrationen von 3µg und 10µg Protein/Flasche eingesetzt. Sowohl humane Osteoblasten, als auch Stromazellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/Flasche in 10ml Osteoblastenmedium/Flasche ausgesät und für 24h im Brutschrank inkubiert. Anschließend folgte, wie im ersten Inkubations-Ansatz beschrieben, die Ablösung der Zellen, RNA Extraktion, cDNA-Synthese und Real Time PCR der drei untersuchten Gene.

2.2.2.1.1 RNA-Extraktion

Zur Isolierung der mRNA (messenger RNA) der humanen Osteoblasten und Stromazellen wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Zur RNA-Extraktion wurden die Zellen geerntet und gewaschen. Aus 10^6 Zellen/Flasche wurde die RNA extrahiert. Zunächst wurden 350µl RLT Puffer zu dem Zellpellet in das 50ml Tube gegeben und die Zellen mit einer Insulinspritze mehrfach resuspendiert. Der schaumigen Zellsuspension wurden 350µl 70% Ethanol hinzugefügt und die Lösung erneut kurz homogenisiert. Dann wurde das gesamte Volumen mittels der Spritze auf eine kleine im Kit enthaltene Plastiksäule aufgetragen und 15 sec. Bei 10.000U/min. zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen.

Zur RNA-Aufreinigung wurden auf die Säulenmitte 80µl DNase-Lösung aufgetragen (Kit RNase free DNase Set, Firma Qiagen) und 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 sec. bei 10.000U/min. Das Eluat wurde verworfen. Die Säule wurde nun in eine neues 2 ml Tube überführt, mit 500µl RPE Puffer versetzt und erneut für 15 sec. Bei 10.000U/min. zentrifugiert. Das Eluat wurde abermals verworfen. Dieser Vorgang wurde 1x wiederholt, anschließend jedoch 2 min. bei 10.000U/min. zentrifugiert und das Eluat wieder verworfen. Zum Trocknen der Säule wurde selbige ca. 15 sec. bei 10.000U/min. zentrifugiert um das Ethanol vollständig zu entfernen. Zur RNA-Eluierung wurde die Säule, in deren Flies sich nun die mRNA befand, in ein neues Eppendorf Tube gestellt, 40µl RNase freies Wasser zugegeben und selbiges 1 min. bei 10.000U/min. zentrifugiert um die aufgereinigte RNA zu eluieren. Die Proben wurden sofort auf Eis gestellt, die RNA mittels RNA Calculator quantifiziert und anschließend in cDNA umgeschrieben.

2.2.2.1.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde ein Kit (RNase-Free DNase Set, Qiagen) verwendet. Für die Umschreibung in cDNA wurde immer 1 µg RNA eingesetzt. Jede RNA Probe wurde in einem Eppendorf-Cup mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von insgesamt 12,4 µl verdünnt und mit 1 µl Oligo-dt-Primer versetzt. Die Proben wurden gevortext, zentrifugiert und sofort auf Eis gestellt. Im PCR Block wurden die Proben 2 min. auf 70°C erhitzt, dann wieder auf Eis abgekühlt und anschließend mit je 6,5 µl Master-Mix versetzt. Die Umschreibung in cDNA erfolgte durch einstündige Inkubation der Proben bei 42°C im PCR-Block. Die umgeschriebenen Proben wurden danach auf Eis gestellt und jeweils mit 80 µl DEPC-Wasser versetzt. Geringe Mengen dieser Proben wurden in den Light-Cycler Versuchen (2.2.2.1.4) direkt weiter untersucht und der restliche Anteil der Proben bei -20°C eingefroren. Der Master-Mix umfasste je Probe 4µl Reaktions-Puffer, 1 µl dNTP-Mix, 1µl reverse Transkriptase und 5µl RNase-Inhibitor.

2.2.2.1.3 Primerpaare

Die Primer für die Gene GapDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), TGF- β (Transforming Growth Factor- β) und Osteopontin wurden kommerziell von der Firma Search LC, D-Heidelberg erworben. Die Sequenzen teilt die Firma nicht mit. Annealingtemperaturen aus LC-Product sheets wurden genutzt. Für das Gen Osteonectin kamen zwei verschiedene Primer zum Einsatz.

Osteonectin (1) Upper Primer: 5'-CCTGAGGCTGTAAGTGAAGAGAAAG-3'
Lower Primer: 5'-GTGGGAGGGGAAACAAGAAGATAA-3'
Annealing Temperatur: 59,5°C

MWG Primer, Biotech AG
(Kantorow et al. 2000)

Osteonectin (2) Upper Primer: 5'-TGCGGGACTGGCTCAAG-3'
Lower Primer: 5'-TTGGGGGAAACACGAAGG-3'
Annealing Temperatur: 58,5°C

MWG Primer, Biotech AG

2.2.2.1.4 Versuchsdurchführung Light Cycler

Die cDNA wurde entweder direkt nach der Umschreibung verwandt, oder auf Eis aufgetaut. Zunächst wurde in 0,5 ml Eppendorf Cups eine Standardverdünnungsreihe von 4 Verdünnungen angelegt, bestehend jeweils aus 18 μ l Stabilizer (RT-for-PCR Kit, Clontech), sowie in der ersten Probe 2 μ l Standard GapDH. In die Proben 2-4 wurden nach vorherigem vortexen und zentrifugieren, jew. 2 μ l aus der Probe der höheren Konzentration, also von Probe 1 in Probe 2 und von Probe 2 in Probe 3 und von dieser in Probe 4 überführt, um eine Konzentrationsreihe zu erhalten. Für die Standardverdünnungsreihe wurde anschließend ein Standard-Mix angesetzt, bestehend aus 6 μ l H₂O, 2 μ l SyberGreen und 2 μ l GapDH Primer je Probe. Der Mix wurde gevortext, abzentrifugiert und in die Kapillaren jew. 10 μ l Standard-Mix und 10 μ l Standardverdünnung pipettiert. Für die Gene GapDH, TGF- β und Osteopontin (Search LC Primer) wurde für jede Probe ein Mastermix angelegt, bestehend aus 14 μ l

H₂O, 2 µl SyberGreen und 2 µl vom jeweiligen Primerpaar. In der Kapillare wurden 18 µl Mix vorgelegt und 2 µl cDNA von der untersuchten Probe hinzupipettiert. Für das Gen Osteonectin (MWG Primer) wurde ein Master-Mix angelegt, bestehend aus 12,6 µl H₂O, 2,4 µl MgCl₂, 1 µl PrimerMix (0,5 µM je Primer) und 2 µl SyberGreen je Probe. In der Kapillare wurden 18 µl Mix vorgelegt und 2 µl cDNA von der untersuchten Probe hinzupipettiert.

Die gefüllten Glas Kapillaren wurden 30 sec. bei 200U/min. zentrifugiert und in den LightCycler gestellt.

Wie in anderen Laboratorien (Ge et al. 2008) fand bei diesen Untersuchungen eine relative Quantifizierung zu dem konstitutiv exprimierten housekeeping Gen, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GapDH) Anwendung. Die kalkulierten Konzentrationen der mit, oder ohne BSP inkubierten mRNA wurden durch Bezugnahme auf das unter gleichen Reaktionsbedingungen ermittelte housekeeping Gen GapDH relativiert, um einen unterschiedlichen cDNA-Gehalt der Proben auszugleichen und eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen.

2.2.2.2 Bestimmung der Zellproliferation mittels MTT

Zellzahl und insbesondere die Zell-Proliferation wurden indirekt durch Bestimmung der Stoffwechselaktivität untersucht. Da die mitochondriale Aktivität als Indikator für die Zellviabilität gilt, wurde die mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität (Umwandlung von NADH → NAD⁺ + H⁺ und NADPH → NADP⁺ + H⁺) im MTT-Assay (MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid) bestimmt. Vitale Zellen reduzieren das gelbe Tetrazoliumsalz MTT zum blauen Formazansalz, welches zunächst in Wasser schlecht löslich ist, jedoch durch 2-Propanol in Lösung gebracht werden kann und anschließend im Spektrophotometer bei 550nm gemessen und quantifiziert werden kann (Mosmann 1983). Die Zellen wurden zunächst, wie in 2.2.1.6 beschrieben abgelöst und anschließend die Zellzahl bestimmt (siehe 2.2.1.7). Die Etablierung der Methode erfolgte in den Vorversuchen 3.3.1.1-3.3.1.5, hier wurden möglichst optimale Zell- und Proteinkonzentrationen für die Hauptversuche ermittelt.

In den Hauptversuchen 3.3.2.1-3.3.2.10 wurden einen Bereich von drei Größenordnungen umspannende BSP und DRJ Proteinkonzentrationen eingesetzt. Die Proteinkonzentrationen betragen jeweils $1 \cdot 10^{-6}$, $3 \cdot 10^{-07}$, $1 \cdot 10^{-07}$, $3 \cdot 10^{-08}$, $1 \cdot 10^{-08}$, $3 \cdot 10^{-09}$ [g Protein/200 μ l Medium] und eine Zellzahl von 5×10^3 Zellen/96 Well wurde in einer Absolutmenge von 200 μ l Medium/Well eingesetzt.

Beide Proteine waren jeweils in einer Konzentration von 10 μ g Protein/ml PBS(-) gelöst. Die Zellen wurden 24h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Verwendet wurde das Cell Proliferation Kit I (MTT) von Roche, sowie 96 Well Platten (flat bottom). Nach entsprechenden Vorversuchen (3.3.1.1-3.3.1.5) kam folgendes Pipettierschema zum Einsatz:

c [g BSP, DRJ/200 μ lMedium]	c [5×10^3 Zellen/100 μ lMedium]	Protein[10 μ g/ml]	Medium
1,00E-06	100 μ l	100 μ l	0
3,00E-07	100 μ l	30 μ l	70 μ l
1,00E-07	100 μ l	10 μ	90 μ l
3,00E-08	100 μ l	3 μ l	97 μ l
1,00E-08	100 μ l	1 μ l	99 μ
3,00E-09	100 μ l	0,3 μ l	99,7 μ l
Kontrolle	100 μ l	0	100 μ l

Tab.5: Pipettierschema der Hauptversuche für MTT und BrdU. Die eingesetzten BSP und DRJ Proteinkonzentrationen umspannen einen Bereich von 3 Größenordnungen. Es erfolgte immer eine 3-fach-Bestimmung der Proben.

Anschließend wurde das Medium und somit auch die nicht adhärenen Zellen vorsichtig abgesaugt, je Well 100 μ l frisches Vollmedium und 10 μ l MTT Reagenz hinzu pipettiert und 4h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Um das schlecht lösliche blaue Formazansalz in Lösung zu bringen, wurden je Well 100 μ l Solubilisationslösung (Kit) hinzugefügt und über Nacht (12h) erneut im Brutschrank inkubiert. Die 96 Wells wurden anschließend bei einer Wellenlänge von 550nm photometrisch auf ihre Extinktion untersucht.

Um störende Extinktionen der Test Reagenzien bei 550nm zu vermeiden wurde immer ein „Blank“ (4-fach-Bestimmung) in den 96 Well Platten mitgeführt. Dieser enthielt alle Reagenzien (100 μ l Medium, 10 μ l MTT Reagenz, 100 μ l Solubilisation), jedoch keine Zellen und wurde synchron mit den Proben pipettiert. Bei den photometrischen Messungen wurden die Extinktionen des

„Blanks“ bei 550nm gemessen, die Ergebnisse gemittelt und in einem zweiten Schritt wurde dieser gemittelte Wert von den Versuchsproben abgezogen. So konnten störende Extinktionen der Test- Lösungen bei 550nm vermieden werden.

2.2.2.3 Bestimmung der Zellproliferation mittels BrdU

Die Zellproliferation wurde immunzytochemisch auch auf DNA-Ebene, durch den Einbau eines synthetischen Thyminanalogons (5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU), untersucht. Zur Quantifizierung der BrdU Inkorporation wird die DNA denaturiert und ein monoklonaler Primärantikörper hinzu gegeben, welcher an die BrdU Basen bindet. Durch Zugabe eines Peroxidase-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörpers (Fab-Fragment) entsteht ein Immunkomplex. Das anschließend zugegebene Tetramethylbenzidin (TMB) wird durch die an den BrdU-Anti-BrdU-Komplex konjugierte Peroxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, dessen Farbe durch die anschließend hinzu gegebene Schwefelsäure nach gelb umschlägt. Die photometrische Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Farbintensität der Reaktion korreliert mit der Anzahl lebender und sich replizierender Zellen.

Im Versuch wurde das Cell Proliferation ELISA BrdU Kit von Roche verwendet. Die Zellen wurden zunächst, wie in 2.2.1.6 beschrieben, abgelöst und anschließend, wie in 2.2.1.7 beschrieben, die Zellzahl bestimmt.

Da der Wirkungsbereich des BSPs unbekannt war, wurden in den Hauptversuchen einen Bereich von 3 Größenordnungen umspannende Proteinkonzentrationen eingesetzt. Die Protein- und Zellkonzentrationen betragen, wie bei den MTT Hauptversuchen, jeweils $1 \cdot 10^{-6}$, $3 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $3 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-8}$, $3 \cdot 10^{-9}$ g Protein/200µl Medium, eine Zellzahl von 5×10^3 Zellen/96 Well wurde in einer Absolutmenge von 200µl Medium/96 Well eingesetzt. Beide Proteine waren jeweils in einer Arbeitskonzentration von 10µg/ml PBS(-) gelöst. Das in Tab.5 dargestellte Pipettierschema kam dabei zum Einsatz. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Messergebnisse zwischen den zwei verschiedenen Bone Sialoproteinen zu gewährleisten, wurden die Hauptversuche am gleichen Tag

kurz hintereinander durchgeführt, somit befanden sich die Zellen der einzelnen Patienten jeweils in gleichen Zellpassagen. Die Zellen wurden mit dem gelösten Protein 24h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurde das Medium und die nicht adhärenen Zellen vorsichtig abpipettiert, 100µl frisches Vollmedium und 10µl BrdU-Reagenz in jedes Well gegeben (Endkonzentration 10µM BrdU) und die Zellen 13-15 Stunden mit dem BrdU-Reagenz im Brutschrank inkubiert (siehe hierzu 3.4.1). Anschließend wurde das labeling Medium abgesaugt. Alle weiteren Arbeitsschritte fanden unter unsterilen Bedingungen statt. In jedes Well wurden 200µl Fix. Denat (ready to use) pipettiert und dann bei Raumtemperatur (20-25°C) 30 min. inkubiert. Die denaturierende Lösung wurde abgesaugt, 100µl Anti-BrdU/Well zugefügt und 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Absaugen der Anti-BrdU Lösung wurde 3x mit jeweils 200µl Waschpuffer/Well (ready to use) gewaschen, wobei die Waschlösung über dem Waschbecken, durch ein kurzes, ruckartiges Ausschütteln der 96 Well Platte, entfernt wurde. Im letzten Schritt wurden 100µl Substrat/Well zugefügt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit 25µl 1M Schwefelsäure (H₂SO₄) die Enzym-Substrat-Reaktion abgestoppt und die Farbextinktion im ELISA bei 450nm gemessen. Es wurde immer ein sog. „Blank“ (4-fach-Bestimmung) auf den 96 Well Platten mitgeführt. Dieser enthielt keine Zellen und kein Protein, jedoch alle Reagenzien und Lösungen des BrdU Tests (100µl Medium, 10µlBrdU und 100µl Anti-BrdU-Antikörper). Bei der photometrischen Messung (450nm) wurden die gemittelten Messwerte des Blanks in einem zweiten Schritt von den übrigen Messergebnissen abgezogen. So konnten störende Extinktionen der Test-Reagenzien herausgerechnet werden. Ebenfalls wurde immer eine Background-Probe, welche lediglich die entsprechende Zellkonzentration in Kulturmedium gelöst und 100µl Anti-BrdU-Antikörper enthielt mitgeführt. Diese Probe gab Auskunft über das Ausmaß einer unspezifischen Bindung des Anti-BrdU-Antikörpers mit den Zellen. In den Primärdaten sind die durch Abzug des „Blanks“ korrigierten Messwerte aufgeführt.

2.2.2.4 Farbnachweis für die Alkalische Phosphatase-Aktivität

Im menschlichen Körper kommen mehrere Isoenzyme der alkalischen Phosphatase (AP) vor. Die enzymatische Aktivität der alkalischen Phosphatase im Knochen wird als osteogener Marker der Zelldifferenzierung (Lind 1998; Kessler et al. 2000) betrachtet und eine hohe AP-Aktivität wird dem Osteoblastenphänotyp zugesprochen (Mizuno et al. 2000), wobei der AP-Nachweis als ein früher Proliferationsmarker der Osteoblasten gilt (Declercq et al. 2005). In dieser Arbeit wurde der qualitative Farbnachweis der AP nach dem Protokoll von Schaumburger (2000) mit der Fragestellung durchgeführt, ob durch eine 4-5 tägige Inkubation der Zellen mit Bone Sialoprotein eine verstärkte AP-Aktivität beobachtet werden kann. An Reagenzien wurden verwendet:

- Puffer: 0,7g 5,5-Diäthylbarbitursäure Na-Salz in 35ml Aqua dest.
- Lösung 1: 35mg Variaminblausalz B gelöst in 7,5ml des Puffers
- Lösung 2: 17,5mg Natriumnaphtyl-1-sulfat gelöst im restlichen Puffer (27,5ml)

Lösung1 wurde durch einen Papier-Faltenfilter in Lösung 2 filtriert, wodurch die fertige Färbelösung entstand. In den Vorversuchen wurden Zellkonzentrationen von 1×10^4 , 1×10^5 und 5×10^4 Zellen/6 Well untersucht. Im ersten Vorversuch wurden die 6 Well Platten über Nacht mit 1ml BSP/Well ($10 \mu\text{g}$ BSP Absolutmenge) beschichtet, anschließend die Proteinlösung abgesaugt, die Zellen ausgesät und nach 4-5 Tagen Inkubation im Brutschrank die Alkalische Phosphatase Färbung durchgeführt. In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen direkt mit 20 und 60ng BSP/Well (Absolutkonzentration) im Brutschrank inkubiert und ebenfalls nach 4-5 Tagen die Färbung durchgeführt. In den Hauptversuchen kamen die direkte Inkubationsmethode der Zellen mit Proteinlösung, sowie Zellkonzentration von 5×10^4 Zellen/6 Well und Proteinkonzentrationen von 60 und 200ng BSP/Well (Absolutkonzentration) zum Einsatz. Nach 4-5 Tagen Inkuabtion im Brutschrank wurde die Färbung durchgeführt. Je Patient wurde immer eine zweifach-Bestimmung der Proben durchgeführt. Vor der Färbung wurden die Zellen 2x mit 2ml PBS(-)/Well gewaschen, mit 1,5ml/Well Färbelösung überschichtet und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. An-

schließlich wurde die Färbelösung abgesaugt und die Zellen mit 1,5ml Osteoblastenmedium/Well überschichtet. Bei einer positiven AP-Reaktion färben sich, in Abhängigkeit der Höhe der Expressierung und Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die Zellen selektiv hellbraun bis tief schwarz an. Die Farbreaktionen der Vorversuche wurden mit dem Lichtmikroskop photographisch dokumentiert.

2.2.2.5 Von Kossa Färbung

Die von Kossa Färbung dient dem histochemischen Nachweis von Kalziumhydroxylapatit-Ablagerungen in mineralisiertem Gewebe, als auch zum Nachweis der Differenzierung von Knochenmarkzellen in Osteoblasten und wurde mit der Fragestellung eingesetzt, ob durch eine 4-5 tägige (ca.96h) Inkubation mit BSP eine erhöhte Kalzifizierung (verifizierbar durch eine erhöhte Osteocalcinsekretion und damit qualitativ stärkere Anfärbung der Zellen) beobachtet werden kann. Die Sekretion des Knochenmatrixproteins Osteocalcin wird als typischer später Marker der reifen Osteoblasten angesehen (Declercq et al. 2005). Bei der von Kossa Färbung wird das Kalzium in den Karbonaten und Phosphaten gegen Silberionen ausgetauscht und anschließend zu metallischem Silber reduziert. Bereiche in denen Kalzium eingelagert ist stellen sich dann schwarz granuliert dar. Nach entsprechenden Vorversuchen der Alkalischen Phosphatase Färbung (siehe 3.5.1), wurden die humanen Osteoblasten von 5 Patienten und die Knochenmarkzellen von zwei jungen Schweinen bei einer Zellkonzentration von 5×10^4 Zellen/Well für 96 Stunden mit 600ng BSP und $2 \mu\text{g}$ BSP/Well (Absolutkonzentration), sowie 1,8-2ml Osteoblastenmedium (insgesamte Menge 2ml/Well) im Brutschrank bei 5% CO_2 inkubiert.

Gesamtmenge BSP	V _{Zellen} (c= 5×10^4 Zellen/1000 μl Medium)	V _{BSP} (c= $10 \mu\text{g/ml}$)	V _{Medium}
2 μg	1000 μl	200 μl	800 μl
600ng	1000 μl	60 μl	940 μl
0	1000 μl	0	1000 μl

Tab.6: Pipettierschema der von Kossa-Färbung (Kalzifizierungsnachweis im Well). Es erfolgte immer

eine 2-fach Bestimmung der Proben/Patient. Aus einem Mangel an DRJ Protein erfolgte hier ausschließlich die Untersuchung des BSP Proteins.

Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 3 Tagen mit frischem Osteoblastenvollmedium. Nach 96 Stunden wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und die Färbung nach folgendem Schema durchgeführt:

- 20 min. Fixieren der Zellen in eiskaltem Ethanol bei Raumtemperatur (1ml/Well)
- 1x spülen mit H₂O (1ml/Well)
- 5% Silbernitratlösung in H₂O (1ml/Well), 1h Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur
- 1x spülen mit H₂O (1ml/Well)
- Reduktion mit Na-Carbonat (1ml/Well) für 2 Minuten unter dem Abzug (5g Carbonat, 75ml H₂O, 25ml Formalin 36%)
- Inkubation mit Na-Thiosulfat (1ml/Well) für 2 Minuten (5g Na-Thiosulfat, 100ml H₂O)
- 1x spülen mit H₂O (1ml/Well)
- Gegenfärbung mit Giemsa-Eosin-Methylenblau-Lsg. (1,5ml/Well) für 3 Minuten
- Absaugen der Eosin-Lsg., Überschichtung mit 1 ml H₂O und Analyse unter dem Lichtmikroskop

In den Präparaten sieht man bei einem Positivnachweis von Kalziumablagerungen schwarz bis rot-braune Körnchen in den Zellen. Aufgrund geringerer Liefermengen des DRJ Proteins, kam in der von Kossa-Färbung lediglich das BSP Protein zum Einsatz.

2.2.3 Bone Sialoprotein

2.2.3.1 Allgemeines

Die Firma Immunodiagnostik stellte uns zwei Typen humaner rekombinanter Bone Sialoproteine (BSPs), welche unsteril und ungelöst geliefert wurden, zur

Verfügung. Die ersten Arbeitsschritte in unserem Labor umfassten die sterile Lösung der Proteine in PBS(-). Aufgrund unveröffentlichter Vorversuche ähnlicher Proteine entschieden wir uns für eine Arbeitskonzentration von 10µg Protein/ml. Nachdem die Proteine in entsprechender Konzentration in PBS(-) gelöst worden waren, wurden sie durch sterile Minisart Filter der Porengröße 0,45µm filtriert, in 50ml Tubes überführt und bei 4°C im Kühlschrank für max. 4 Wochen aufbewahrt. Aufgrund unterschiedlicher Lieferzeiten und Proteinmengen der zwei Bone Sialoproteine wurden die Vorversuche hauptsächlich mit dem zuerst gelieferten BSP Protein durchgeführt. Als die Methoden der Versuche weitestgehend etabliert waren, traf das 2. BSP Protein der Firma Immunodiagnostik ein. Aufgrund seiner Etikett-Aufschrift wurde es bei uns unter der Bezeichnung DRJ Protein geführt. Die Wirkungen der zwei unterschiedlichen Bone Sialoprotein-Typen wurden sowohl in den Vor- als auch in den Hauptversuchen untersucht und miteinander verglichen.

2.2.3.2 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Qualitätskontrolle wurde das Bone Sialoprotein mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid) Gelelektrophorese auf Verunreinigungen untersucht.

Folgende Mengen sind für zwei Gele ausreichend:

- Nativer Probenpuffer:

1,5g SDS (Natriumdodecylsulfat)

125 mM Tris (hydroxymethyl)-aminomethan/HCl (pH 6,8) 3,75ml

0,05% Bromphenolblau 0,02g

H₂O 7,5ml

20% Glycerol 7,5ml

Sowie je 1ml Puffer/50µl Mercaptoethanol

- Trenngel:

H₂O 5,9 ml

30% Acrylamid 5,0 ml

1,5 M Tris (hydroxymethyl)-aminomethan/HCl (pH 8,8) 3,8 ml

10% SDS 150 μ l

10% Ammoniumpersulfat (APS) 150 μ l

Tetramethylethyldiamin (TEMED) 6 μ l

- Sammelgel:

H₂O 3,4 ml

30% Acrylamid 830 μ l

1,5 M Tris (hydroxymethyl)-aminomethan/HCl (pH 6,8) 630 μ l

10% SDS 50 μ l

10% Ammoniumpersulfat (APS) 50 μ l

Tetramethylethyldiamin (TEMED) 5 μ l

- Laufpuffer:

100ml Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan-Glycin

10ml 10% SDS

1l Aqua dest.

- Marker: MagicMark XP Western Protein Standard der Firma Invitrogen.

Für die denaturierende Gelelektrophorese wurden 20 μ l der Proteinprobe (Arbeitskonzentration 10 μ g BSP/ml) mit 5 μ l des Probenpuffers in Eppendorf-Cups gemischt, kurz herunterzentrifugiert, 5 min im 95°C heißen Wasserbad inkubiert, abgekühlt, erneut abzentrifugiert und auf Eis gelagert. Nach Hinzufügung von 20 μ l der denaturierten Protein-Probenpufferlösung, sowie 5 μ l des Markers in eine der Geltaschen, wurde die Apparatur an einen Kühlwasserkreislauf angeschlossen und bei einer Spannung von 100V für eine Stunde laufen gelassen.

2.2.3.3 Coomassie Färbung

Zur visuellen Darstellung der aufgetrennten Proteine wurde die Coomassie-Färbung eingesetzt. Dazu wurde zunächst das Gel ca.20 min. in der Coomassie-Färbelösung schüttelnd inkubiert, anschließend der Überschuss an Färbelösung durch mehrmaliges Waschen mit Coomassie-Entfärbelösung entfernt und die einzelnen Banden dadurch sichtbar. Im Rahmen der

Vorversuche wurde die Coomassi-Färbung auch zum Nachweis der BSP-Beschichtung in Kulturflaschen und im 6 Well angewandt. Hierzu wurden die zuvor über Nacht mit BSP beschichteten Kulturflaschen (Absolutmenge 6µg BSP/Flasche) und 6 Wells (Absolutmenge 1µg BSP/Well) nach Absaugen der Proteinlösung großzügig mit Färbelösung beschichtet (6ml/Flasche, 2ml/6 Well), 20 Minuten unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch mehrmaliges Waschen mit Entfärbelösung überschüssige Farbniederschläge entfernt. Zur Kontrolle wurden zwei Flaschen mit 6ml PBS(-), sowie 2 Wells einer 6 Well Platte mit 1ml PBS(-)/Well bei 4°C über Nacht beschichtet. Die Färbung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Coomassi-Färbelösung:

45ml Methanol

45ml H₂O

10ml Eisessig

0,25g Coomassi Brillantblau

Die Färbelösung wurde anschließend durch einen Faltenfilter filtriert

Coomassi-Entfärbelösung:

Gleiche Zutaten wie bei Coomassi Färbelösung, jedoch ohne Coomassi Brillantblue.

2.2.4 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen dieser Arbeit wurden mit Excel erstellt, dazu gehören Mittelwertbildungen, Standardabweichungen und T-Test, bei gleicher Anzahl von Proben 2-Seitig, Typ 2, bei ungleicher Anzahl 2-Seitig, Typ 3.

Als signifikante Ergebnisse im T-Test wurden festgelegt:

<0,05 = ☆ (signifikant)

<0,005 = ☆☆

<0,0005 = ☆☆☆

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur

3.1.1 Anlage von Primärkulturen humaner Zellen

Die sterile Aufarbeitung humaner Osteoblasten aus dem spongiösen Material von Hüftköpfen und distalen Femuranteilen gelang bei 8 von 11 Patienten. Bei 3 Patienten verpilzten die Primärkulturen. Nach 3-5 Tagen waren in der Zellkultur vereinzelt adhärente Zellen auf dem Boden der Zellflaschen erkennbar. Nach 3-4 Wochen waren die Zellflaschen konfluent und wurden dann in die erste Passage überführt. Humane Osteoblasten bildeten zunächst feine lange Ausläufer, jedoch ab einer gewissen Konfluenz (ca. 20 Tage nach Aufarbeitung und 1 Woche nach Passagieren) schienen die Zellen vitaler, sie nahmen eine eher kubisch-längliche Form an und lange dünne Zellausläufer waren dann nur noch vereinzelt zu finden (siehe Abb.5 a). Weniger vitale Zellen fielen sowohl durch ein langsames Zellwachstum, als auch durch ihre gespreizten, flachen Zellformen (siehe Abb.5 c ↗), feine lange Ausläufer (siehe Abb.5 c ⇒) und viel Zytoplasma auf.

Bei der Aufarbeitung humaner Osteoblasten wurden Stromazellen aus dem Überstand der Osteoblastenpräparation bei Proben von 9 Patienten gewonnen. Kontaminationsprobleme traten dabei nicht auf. Die Gestalt der Stromazellen war schmaler, länglicher und weniger verzweigt als die der humanen Osteoblasten. Sie zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie humane Osteoblasten.

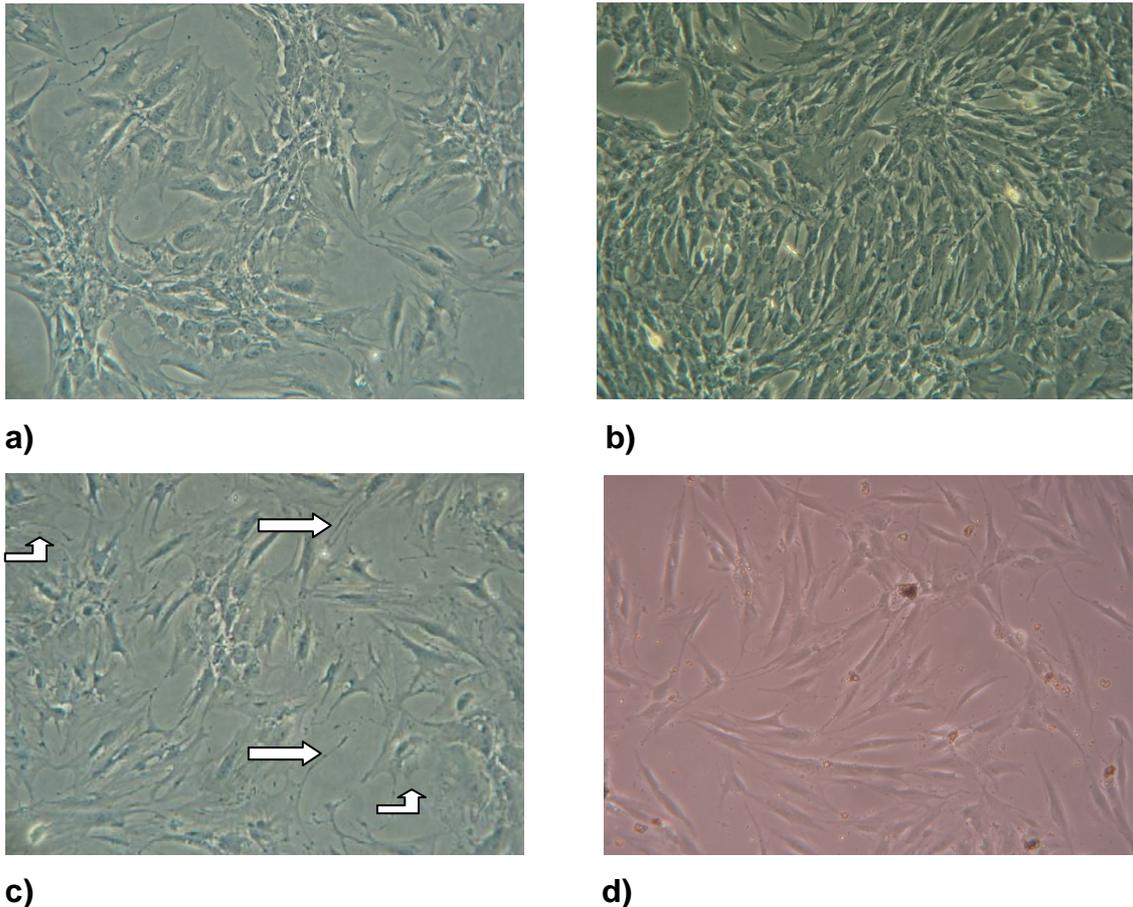
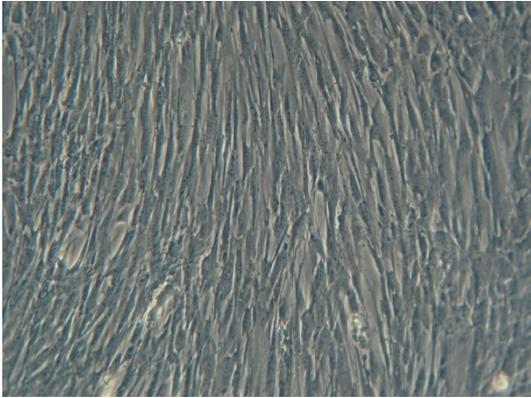


Abb.5: a) Vitale humane Osteoblasten, 1.Passage (Pat. HRL/2), 5 Wochen nach Aufarbeitung, Vergrößerung 200-fach. Gut zu erkennen sind die kubisch-länglichen Zellformen und die Koloniebildung der Zellen. b) Gleiche Zellen wie in a), 4 Tage später, kurz vor der Konfluenz, Vergrößerung 200-fach. Hier ist das pflastersteinähnliche Wachstumsmuster gut erkennbar. c) 1.Passage (Pat. ALH/6), weniger vitale Osteoblasten, 5 Wochen nach Aufarbeitung, Vergrößerung 200-fach. Auffällig sind lange Zellausläufer (⇒) und flache gespreizte Zellen (⇄). d) Humane Stromazellen, Pat. HRL/2, Primärkultur, nach 10 Tagen Inkubation mit Stammzellmedium, Vergrößerung 200-fach.

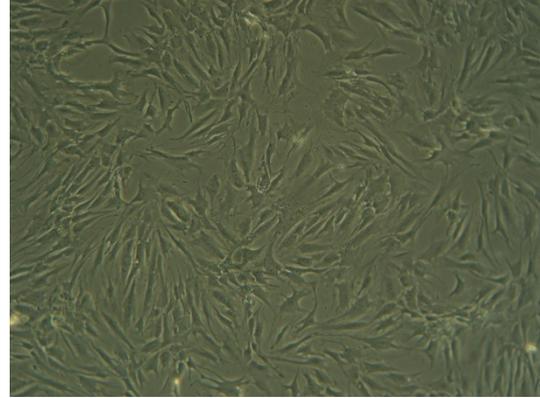
3.1.2 Anlage von Primärkulturen tierischer Zellen

Tierische Knochenmarkzellen wurden insgesamt von 2 jungen Schweinen operativ gewonnen und aufgearbeitet (2.2.1.3). Ein Teil dieser Zellen wurde ab der zweiten Zellpassage mittels Osteoblasten-Differenzierungsmedium in Osteoblasten differenziert. Erste adhärenente Knochenmarkzellen waren nach 3-4 Tagen zu beobachten. Sobald diese Zellen adhärenent waren, zeigten sie höhere Proliferationsraten als humane Osteoblasten und Stromazellen. Sie wiesen auch wesentlich schmalere und länglichere Zellformen auf (vgl. hierzu Abb.5

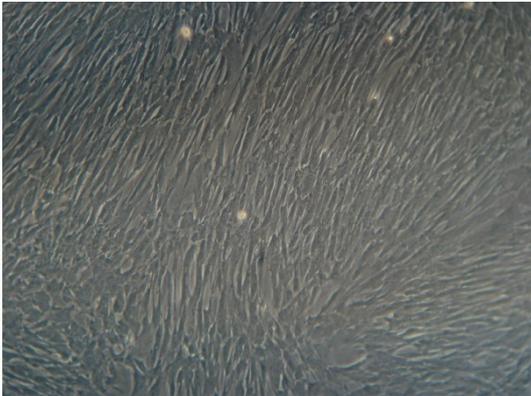
a,b mit Abb.6 a,c). Eine erfolgreiche Differenzierung der Zellen in Osteoblasten war bereits wenige Tage nach der Inkubation mit entsprechendem Medium im Mikroskop zu beobachten (Abb.6 b,f).



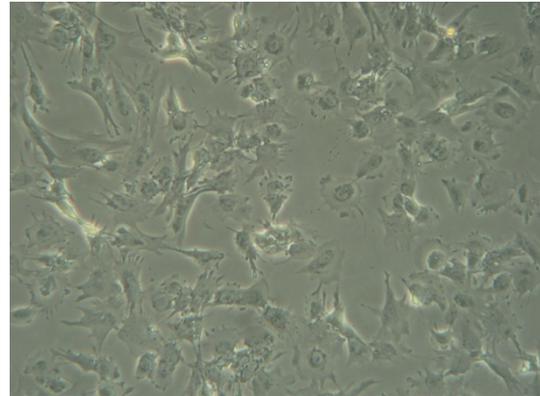
a)



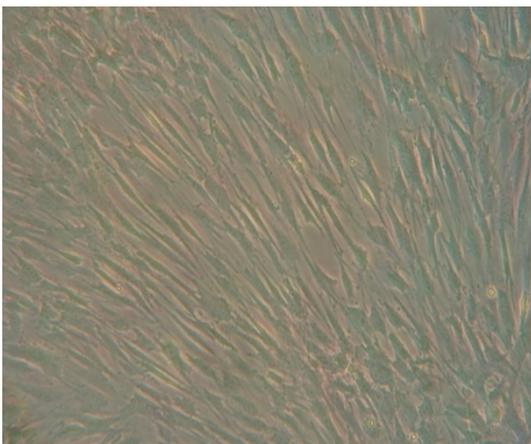
b)



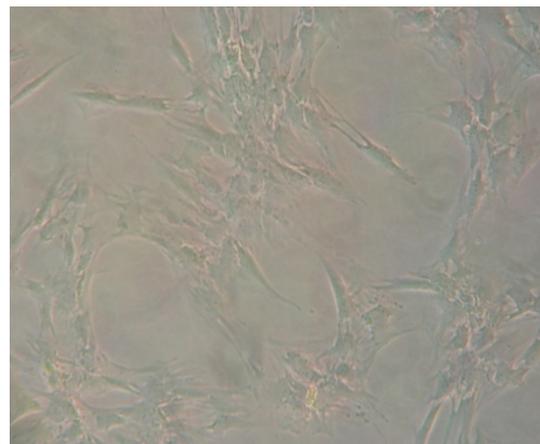
c)



d)



e)



f)

Abb.6: a) Knochenmarkzellen Schwein Nr.1, 4.Passage, Vergrößerung 200-fach. b) Gleiche Zellen wie in a), auch 4.Pasage, nach 12 Tagen Inkubation mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium (ab der 2.Passage), Vergrößerung 100-fach. c) Knochenmarkzellen Schwein Nr.1, 5.Passage, Vergrößerung 100-fach. d) Gleiche Zellen wie in c), 5.Passage, nach 3 wöchiger Inkubation mit Osteoblasten-Differen-

zierungsmedium, Vergrößerung 200-fach. e) Knochenmarkzellen vom Schwein Nr.1, 5.Passage, 4 Tage nach Wiederauftauen, Vergrößerung 200-fach. f) Gleiche Zellen wie in e), gleiche Zellpassage nach Wiederauftauen und 4 Tagen Inkubation mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium, Vergrößerung 200-fach.

Die differenzierten Osteoblasten hatten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie humane Osteoblasten und wuchsen langsamer als die tierischen Knochenmarkzellen, was besonders nach dem Passagieren auffällig war. Bemerkenswert war, dass bei beiden untersuchten Schweinen die Osteoblasten nach einer 3 wöchigen Inkubation mit Differenzierungsmedium in ihrem Proliferationsverhalten stagnierten. Außerdem schienen die Zellen den Zell-Zell Kontakt zu verlieren, wiesen optisch mehr Zytoplasma auf und nahmen gespreizte Zellformen an (vgl. hierzu Abb.6 d). Zur mikroskopischen Veranschaulichung der Differenzierung von tierischen Knochenmarkzellen zu Osteoblasten, siehe Abb.6 a-f.

3.2 Real Time PCR

Um auf RNA- bzw. cDNA-Ebene gezielt eine eventuelle Induktion einzelner Gene durch die zwei rekombinanten Bone Sialoproteine erfassen zu können, wurde die Polymerase Kettenreaktion (PCR) angewandt. Als charakteristischer Marker der Osteoblasten wurden in dieser Arbeit die Gene TGF- β , Osteonectin und Osteopontin untersucht. In Vorversuchen wurde zunächst eine geeignete Inkubationsmethode der Zellen mit Bone Sialoprotein ermittelt.

3.2.1 RNA Isolierung, cDNA-Synthese und PCR

Um die Höhe der Expression einzelner Gene untersuchen und quantitativ bestimmen zu können, wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR gemessen.

c [g Protein/10ml Medium]	0 (Kontrolle)	1·10 ⁻⁶	3·10 ⁻⁶	1·10 ⁻⁵
Vorversuche:				
Patientenanzahl (n) untersuchter Osteoblasten mit BSP	3	3	3	n. b.
Patientenanzahl (n) untersuchter Stromazellen mit BSP	1	1	1	n. b.
Hauptversuche:				
Patientenanzahl (n) untersuchter Osteoblasten mit BSP	9	n. b.	9	9
Patientenanzahl (n) untersuchter Stromazellen mit BSP	2	n. b.	2	2
Patientenanzahl (n) untersuchter Osteoblasten mit DRJ	9	n. b.	9	9
Patientenanzahl (n) untersuchter Stromazellen mit DRJ	2	n. b.	2	2

Tab.7: Dargestellt ist die Anzahl der untersuchten Osteoblasten- und Stromazellkulturen der Vor- und Hauptversuche zur RT-PCR, sowie die untersuchten rekombinanten Bone Sialoproteine und eingesetzte Proteinkonzentrationen derselbigen.

Bei der Wahl der Primerpaare (2.2.2.1.3) stellte sich das Primerpaar Osteonectin (1) als nicht geeignet dar. Es kam zu keiner messbaren Vervielfältigung des untersuchten Gens (Vorversuch im Rahmen dieser Arbeit nicht abgebildet). Bei der Fehlersuche wurde deutlich, dass im Referenzartikel (Kantorow et al. 2000) eine falsche Base in der Sequenz des lower Primers an Position 1970bp angegeben wurde. Statt Adenin findet sich dort Cytosin. Daraufhin wurde im Labor nach entsprechender Recherche in der Genbank, ein zweites Primerpar, Osteonectin (2), designed. Für das humane Osteonectin-Gen wurde die Schnittstelle des upper Primers in der Mitte des Exon 7, sowie des lower Primers am Anfang von Exon 10 gewählt. Dieses Primerpaar lieferte gute Ergebnisse. Die Primerpaare TGF- β und Osteopontin lieferten ebenfalls aussagekräftige Ergebnisse, wobei das Gen Osteopontin insgesamt nur sehr gering exprimiert wurde.

3.2.2 Vorversuche RT-PCR

Zu Beginn galt es eine geeignete Beschichtungsmethode der untersuchten Proteine mit den Zellen zu finden und sinnvolle, aussagekräftige Proteinkonzentrationen zu erruieren.

3.2.2.1 1. Vorversuch: Induktionsverhalten von Osteoblasten und Stromazellen nach BSP-Inkubation

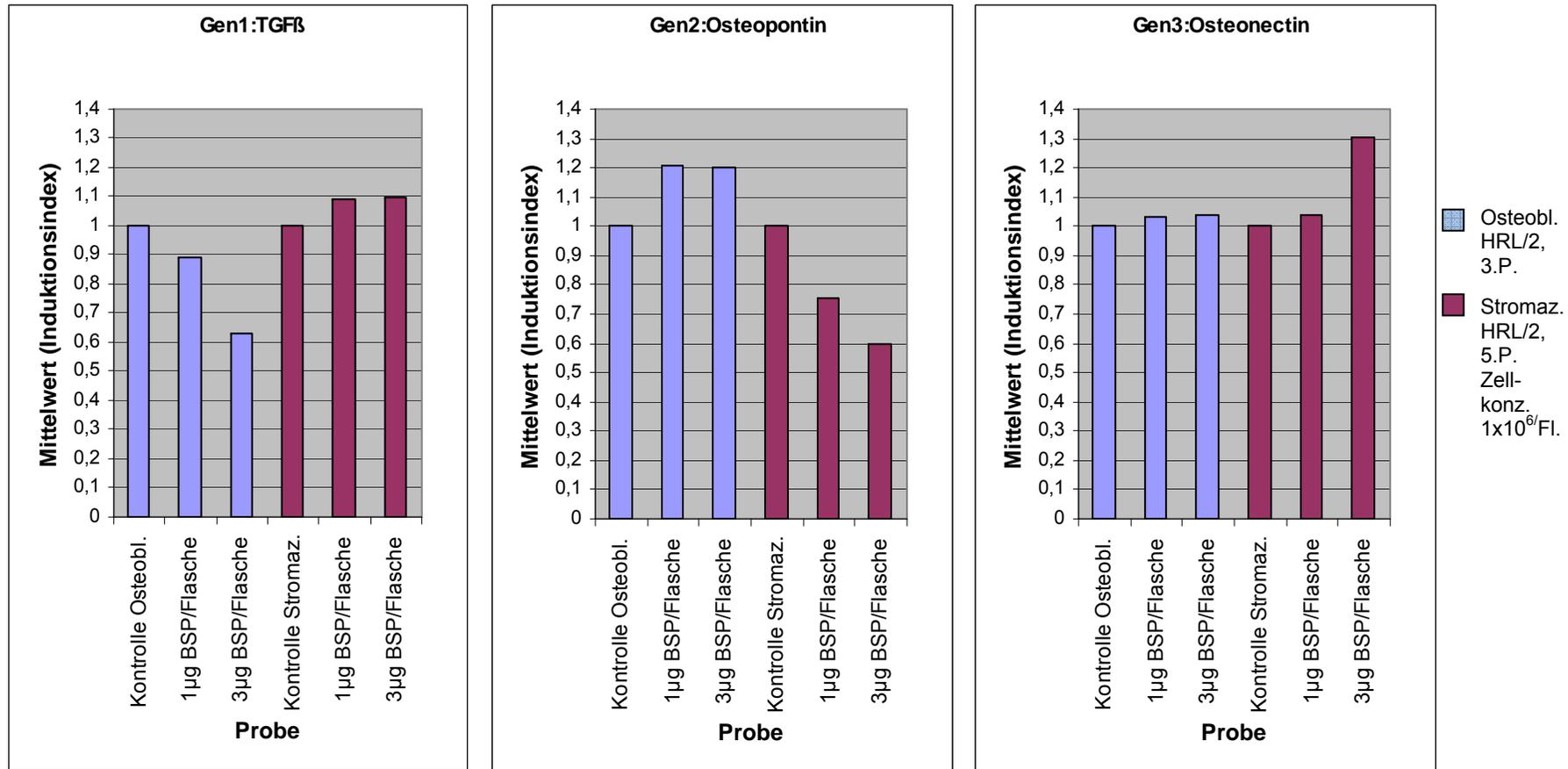


Abb.7: Vorversuch zur Untersuchung der Genexpression von TGF-β, Osteopontin und Osteonectin bei einer 24h BSP-Inkubation (Inkubationsansatz, siehe 2.2.2.1) zweier Proteinkonzentrationen (1μg und 3μg BSP Protein/Flasche). Verglichen wurden die Osteoblasten (3.Passage) und Stromazellen (5.Passage) des Patienten HRL/2. In dieser Figur nicht dargestellt: das Gen Osteopontin wird nur sehr schwach exprimiert (siehe Primärdaten 7.1.1); hier sind die normierten Werte (ID) dargestellt.

3.2.2.2 2. Vorversuch: Induktionsverhalten von Osteoblasten nach BSP-Inkubation

Um eine höhere Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Osteoblasten untereinander zu erzielen, wurde die gleiche Inkubationsmethode, mit den gleichen Proteinkonzentrationen (1 μ g und 3 μ g BSP/Flasche) an Osteoblasten von zwei weiteren Patienten untersucht, die Ergebnisse der 3 Patienten gepoolt, die Mittelwerte gebildet und auf Standardabweichung und Signifikanz (nicht gezeigt) geprüft.

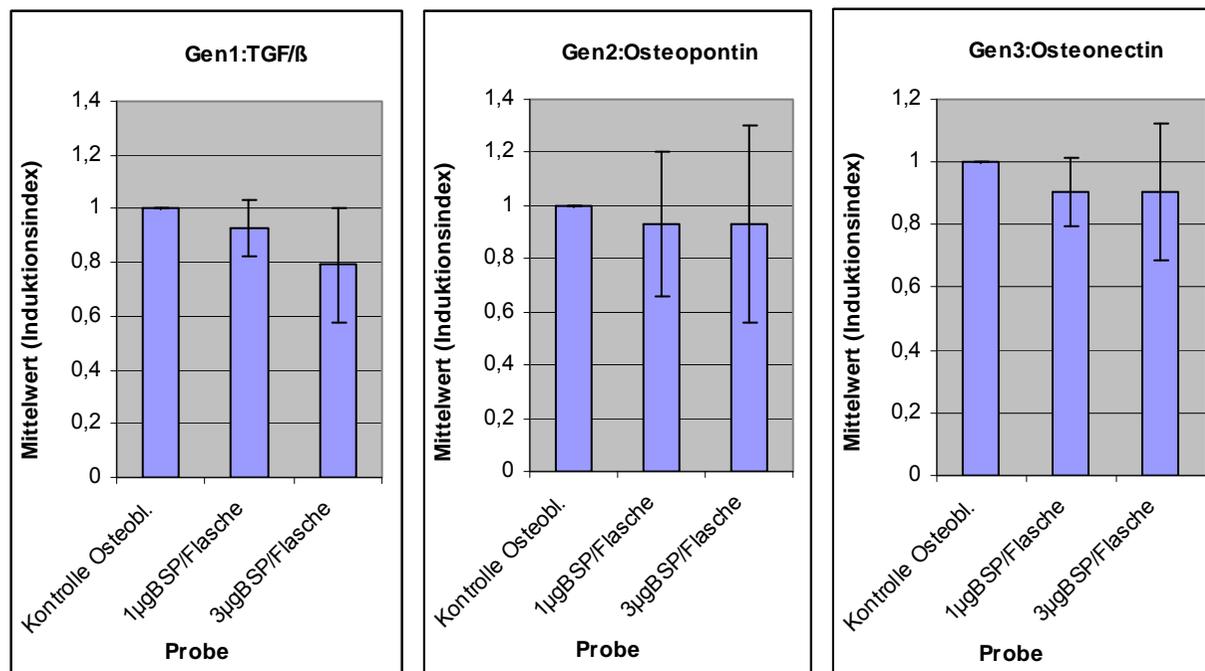


Abb.8: Untersucht wurde hier die Genexpression (TGF- β , Osteopontin, Osteonectin) der Osteoblasten von 3 Patienten (n=3) nach 24h-Inkubationszeit (Inkubationsansatz, siehe 2.2.2.1) Patient 1: O-HRL/2, (3.Passage), aus 3.2.2.1; Patient 2 :O-SEP/4, (5.Passage); Patient 3: O-POF/9, (6.Passage). Im Schaubild sind die Mittelwerte (Induktionsindex) als Balkendiagramme, sowie die Standardabweichung, bezogen auf den Induktionsindex von Patient 1-3, dargestellt. In dieser Figur nicht dargestellt: das Gen Osteopontin wird nur sehr schwach exprimiert (siehe Primärdaten 7.1.2); hier sind die normierten Werte (ID) dargestellt.

3.2.3 Hauptversuche RT-PCR

3.2.3.1 1. Hauptversuch: Induktionsverhalten von Osteoblasten nach BSP- und DRJ-Inkubation

Untersucht wurde das Induktionsverhalten der zwei Bone Sialoproteine, BSP und DRJ bei Osteoblasten von 9 Patienten. Zwei Proteinkonzentrationen, 3µg und 10µg Protein/Flasche kamen zum Einsatz.

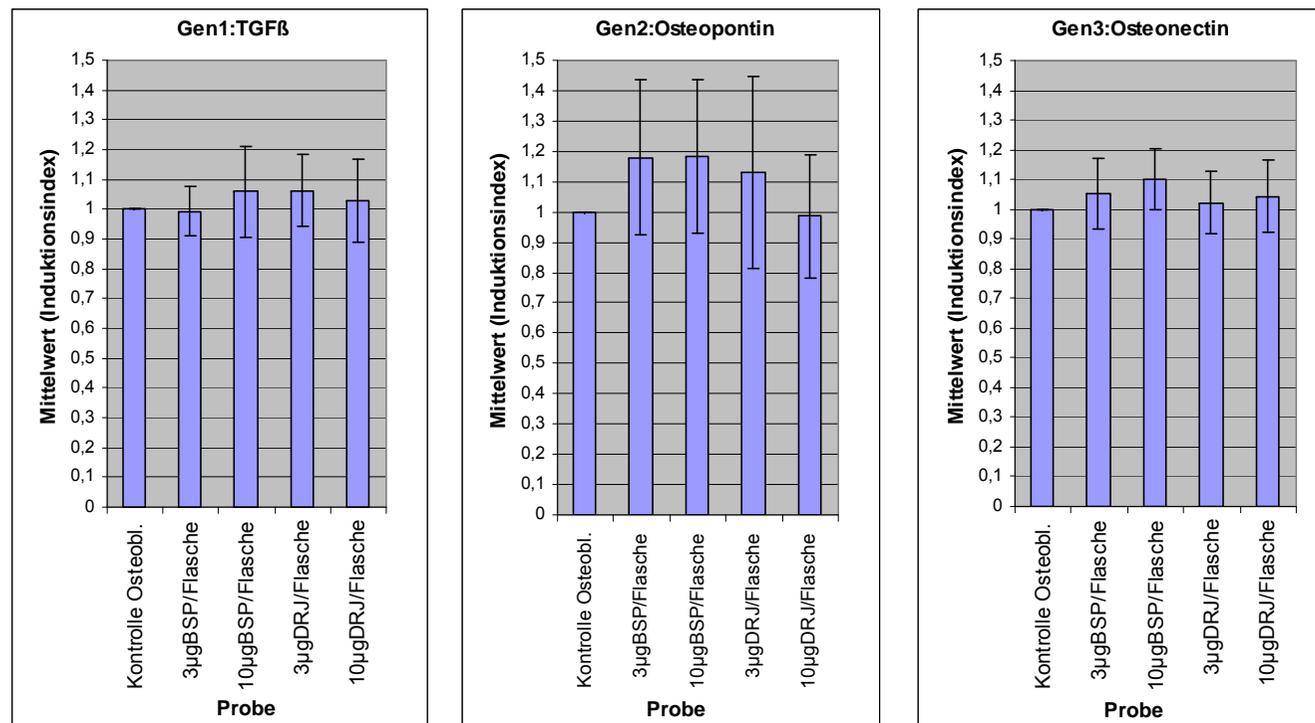


Abb.9: Genexpression von TGF-β, Osteopontin und Osteonectin in Osteoblasten nach 24h-Inkubation mit jeweils 2 verschiedenen Konzentrationen von BSP oder DRJ Protein. Patient 1: O-HRL/2; (6.P.); Patient 2: HOB-1, (6.P.); Patient 3: HOB-2, (6.P.); Patient 4: HOB-C, (5.P.); Patient 5: O-SRI/5, (5.P.); Patient 6: O-SLJ/10, (6.P.); Patient 7: O-EGG/7, (4.P.); Patient 8: O-LBI/8, (8.P.); Patient 9: O-POF/9, (6.P.). Im Schaubild sind die Mittelwerte (Induktionsindex) von 9 Osteoblastenpatienten als Balkendiagramme, sowie die Standardabweichung, bezogen auf den Induktions-index von Patient 1-9, dargestellt. In dieser Figur nicht dargestellt:

das Gen Osteopontin wird nur sehr schwach exprimiert (siehe Primärdaten 7.1.3). Hier sind die normierten Werte (ID) dargestellt.

3.2.3.2 2. Hauptversuch: Induktionsverhalten von Stromazellen nach BSP-und DRJ-Inkubation

Hier wurde das Induktionsverhalten der zwei Bone Sialoproteine, BSP und DRJ bei Stromazellen von 2 Patienten untersucht. Eingesetzte Proteine und Proteinmengen wie in 3.2.3.2.1.

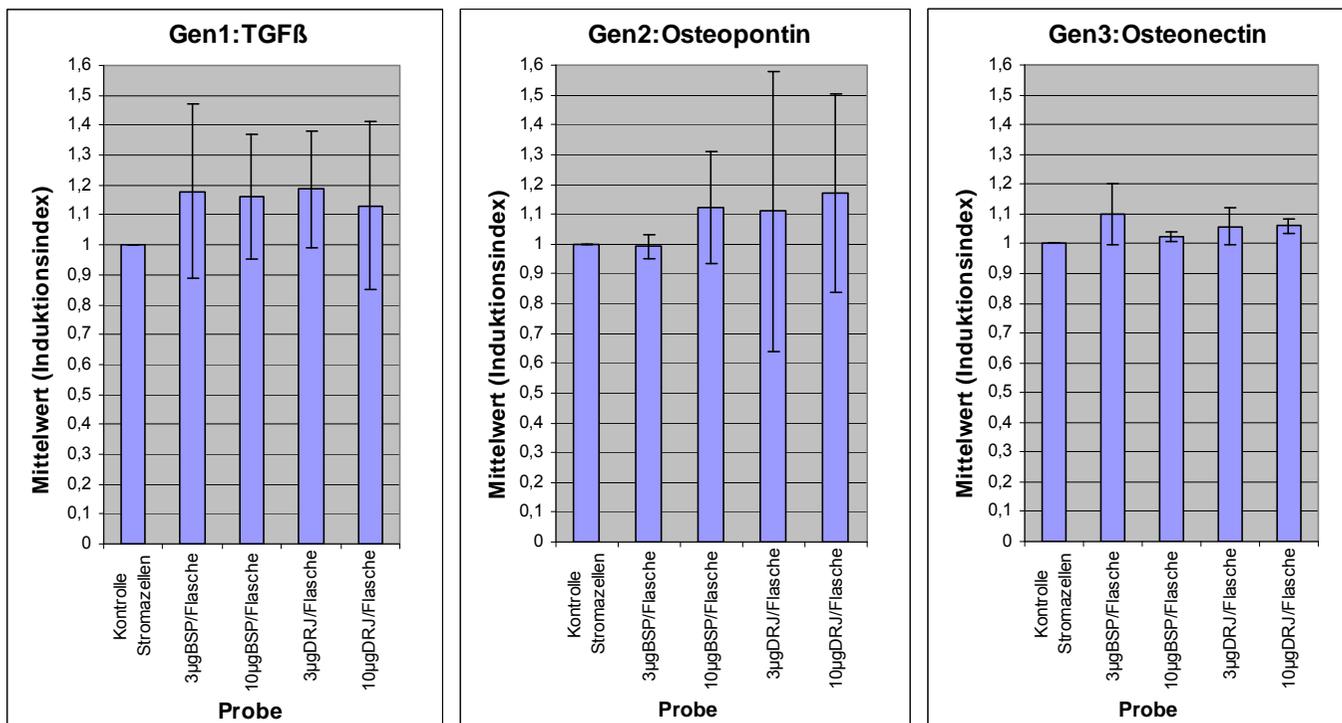


Abb.10: Genexpression von TGF-β, Osteopontin und Osteonectin in Osteoblasten nach 24h-Inkubation mit jeweils 2 verschiedenen Konzentrationen von BSP oder DRJ Protein. Patient 1: STR-HRL/2, (8.P.); Patient 2: STR-LBI/8, (7.P.). Im Schaubild sind die Mittelwerte (Induktionsindex) der zwei untersuchten Zellpopulationen als Balkendiagramme, sowie die Standardabweichung, bezogen auf den Induktionsindex von Patient 1-2, dargestellt. In dieser Figur nicht dargestellt: das Gen Osteopontin wird nur sehr schwach exprimiert (siehe Primärdaten 7.1.4). Hier sind die normierten Werte (ID) dargestellt.

3.3 MTT-Test

Zur Etablierung der Methode mussten für die untersuchten Proteine zunächst geeignete Beschichtungsmethoden und anschließend geeignete Zell- und Proteinkonzentrationen ermittelt werden. Primärdaten siehe Anhang.

3.3.1 Vorversuche MTT

3.3.1.1 1. Vorversuch

1. Inkubationsansatz:

Über Nacht (12h) Beschichtung der unbeschichteten 96well Platte mit einer Absolutkonzentration von $1\mu\text{g}$ BSP/Well ($100\mu\text{l}$ Proteinlösung, Arbeitskonzentration $10\mu\text{g/ml}$) bei 4°C im Kühlschrank, anschließend vorsichtiges Abpipettieren der Proteinlösung. Im ersten Ansatz galt es eine aussagekräftige Zellkonzentration für den MTT-Test zu finden. Eingesetzt wurden 3×10^3 und 1×10^4 Zellen/Well, verglichen wurde das Proliferationsverhalten von Osteoblasten und Stromazellen eines Patienten, es erfolgte immer eine dreifach-Bestimmung der Proben.

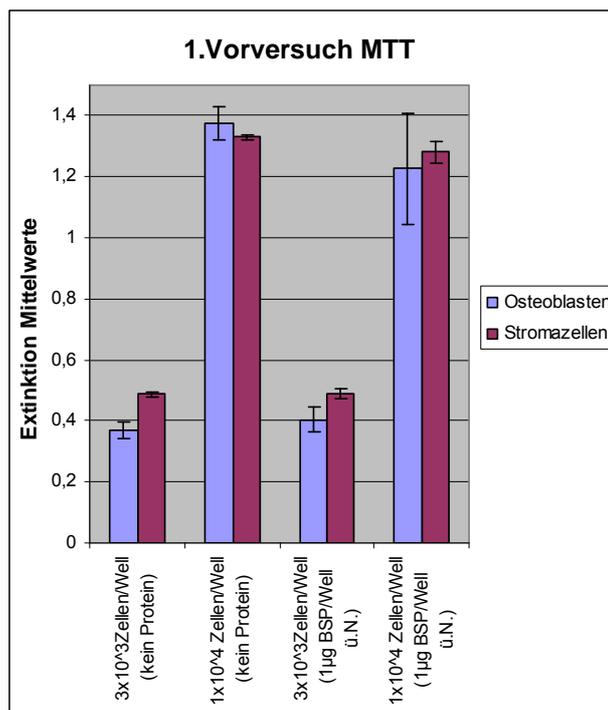


Abb.11: Vergleich der Mittelwerte der Osteoblasten und Stromazellen eines Patienten. Patient O-LBI/8, (3.Passage) und STR-LBI/8, (3.Passage). Die Mittelwerte (p1-3) sind als Balkendiagramme dargestellt, die Standardabweichung bezieht sich auf die Osteoblasten und Stromazellen untereinander.

3.3.1.2 2. Vorversuch

Inkubationsansatz wie in 3.3.1.1, jedoch wurden 5×10^3 Zellen/Well eingesetzt und eine 8-fach-Bestimmung der Proben erfolgte. Verglichen wurde das Proliferationsverhalten von Osteoblasten und Knochenmarkzellen eines Schweines.

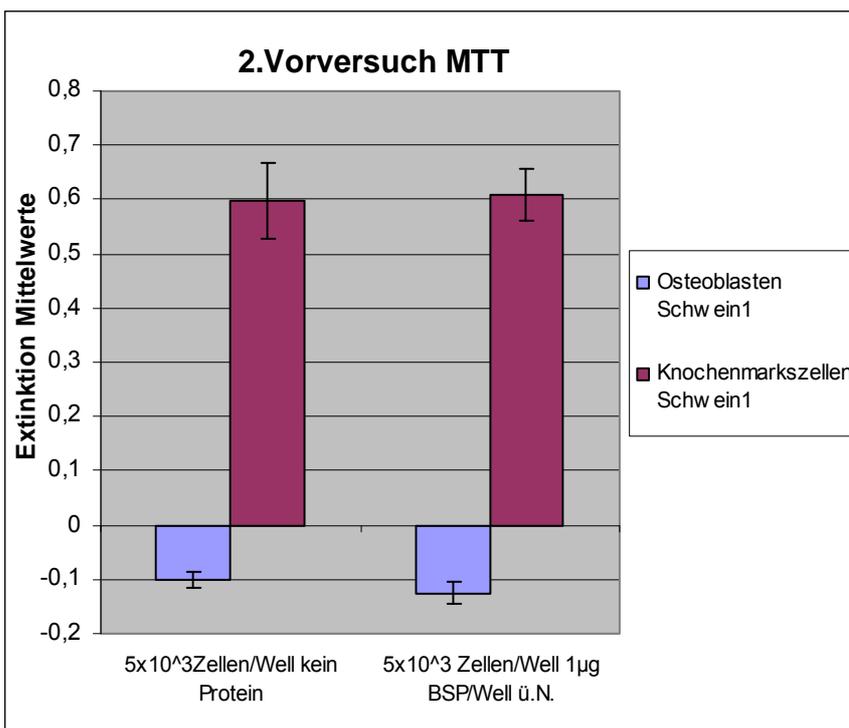


Abb.12: Vergleich der Mittelwerte der Extinktionen der Knochenmarkszellen (6.P.) und daraus differenzierten Osteoblasten eines jungen Schweins (5.P. nach 3 Wochen Inkubation mit Differenzierungsmedium, siehe auch 3.1.2, Abb.6,d) Die Mittelwerte (p1-8) sind als Balkendiagramme dargestellt, die Standardabweichung bezieht sich auf die Knochenmarkszellen und Osteoblasten untereinander.

3.3.1.3 3. Vorversuch

2. Inkubationsansatz:

Direkte Inkubation der ausgezählten Zellen mit dem Protein für 24h bei 37°C im Brutschrank. Die Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^3 und 1×10^4 Zellen/Well ausgesät und für 24h mit einer Absolutkonzentration von 20ng und 60ng BSP inkubiert (2µl und 6µl Proteinlösung, Arbeitskonzentration 10µg/ml). Es erfolgte eine 4-fach-Bestimmung der Proben.

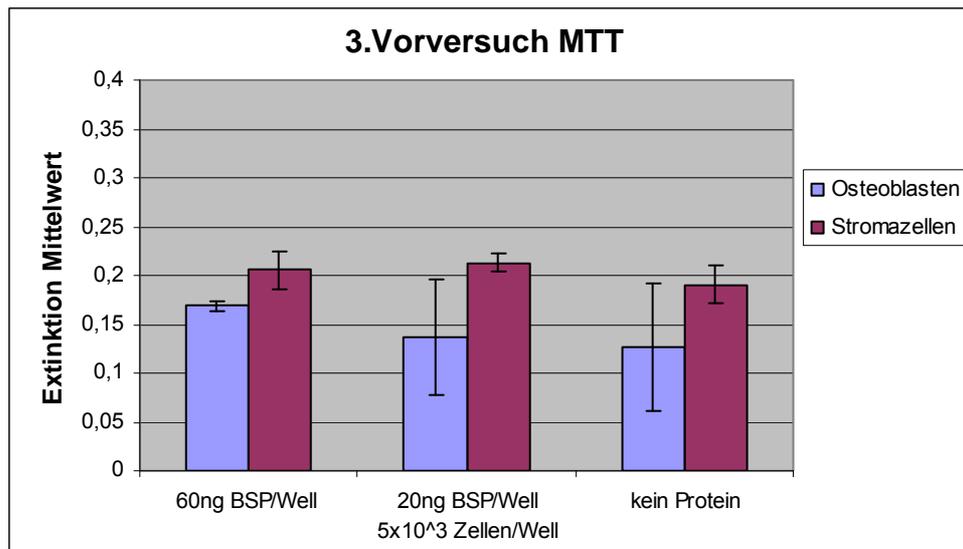


Abb.13: Erklärung siehe Abb.14.

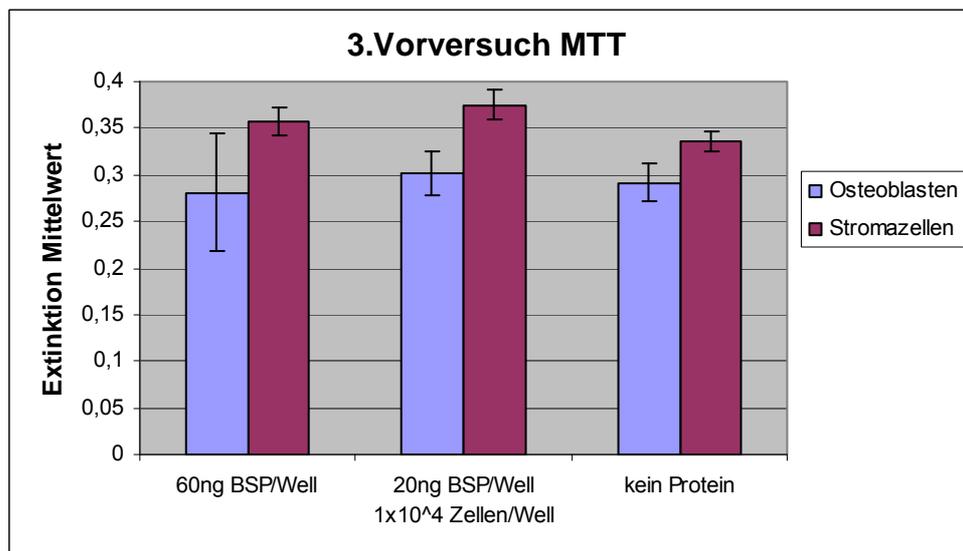


Abb.14: Dargestellt ist der 3. Vorversuch MTT der Osteoblasten (3.Passage) und Stromazellen (3.Passage) des Patienten HRL/2. Hauptaugenmerk liegt sowohl auf den unterschiedlich eingesetzten Zellkonzentrationen, als auch auf den unterschiedlich eingesetzten Proteinmengen. Die Mittelwerte sind als Balkendiagramme dargestellt, die Standardabweichung bezieht sich auf die Osteoblasten und Stromazellen untereinander.

3.3.1.4 4. Vorversuch

Inkubationsansatz wie in 3.3.1.3, untersucht wurde die mitochondriale Aktivität der Osteoblasten mittels Extinktionsmessung bei 550nm im MTT von Osteoblasten zweier Patienten.

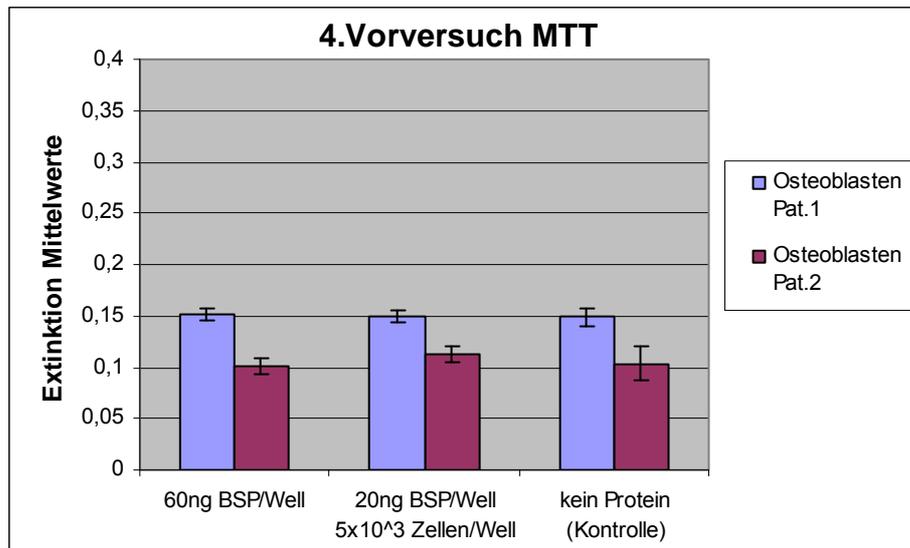


Abb.15: Erklärung siehe Abb.16.

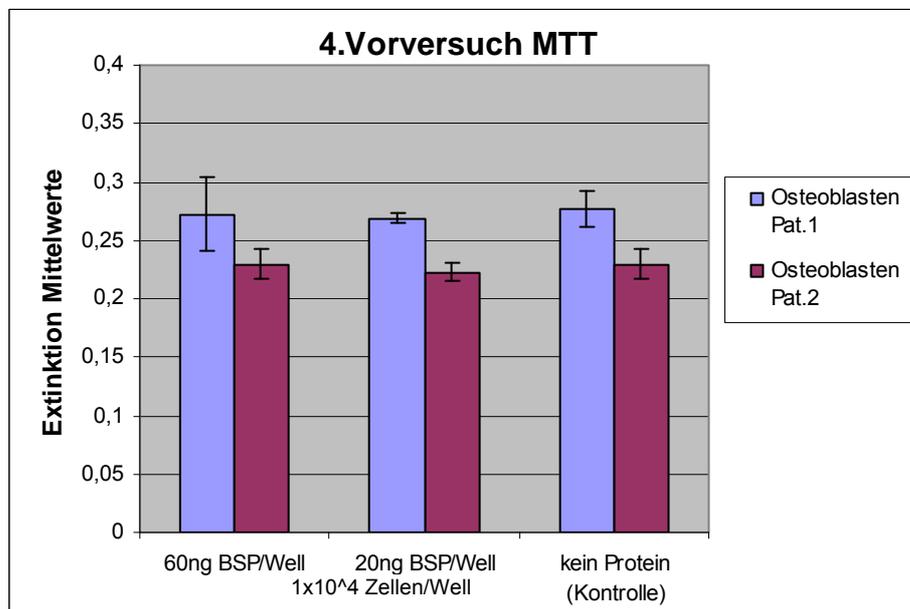


Abb.16: Dargestellt ist der 4. MTT-Vorversuch. Vergleich der Mittelwerte der Osteoblasten von Patient 1, O-POF/9 (3.Passage) und Patient 2, O-LBI/8 (3.Passage). Untersuchung der mitochondrialen Aktivität nach einer 24h BSP Inkubation.

3.3.1.5 5. Vorversuch

Inkubationsansatz wie in 3.3.1.3, jedoch wurden ausschließlich Zellkonzentrationen von 5×10^3 Zellen/Well eingesetzt und drei BSP Konzentrationen 20ng/60ng/120ng BSP (Absolutkonzentration/Well) an Osteoblasten von drei Patienten untersucht.

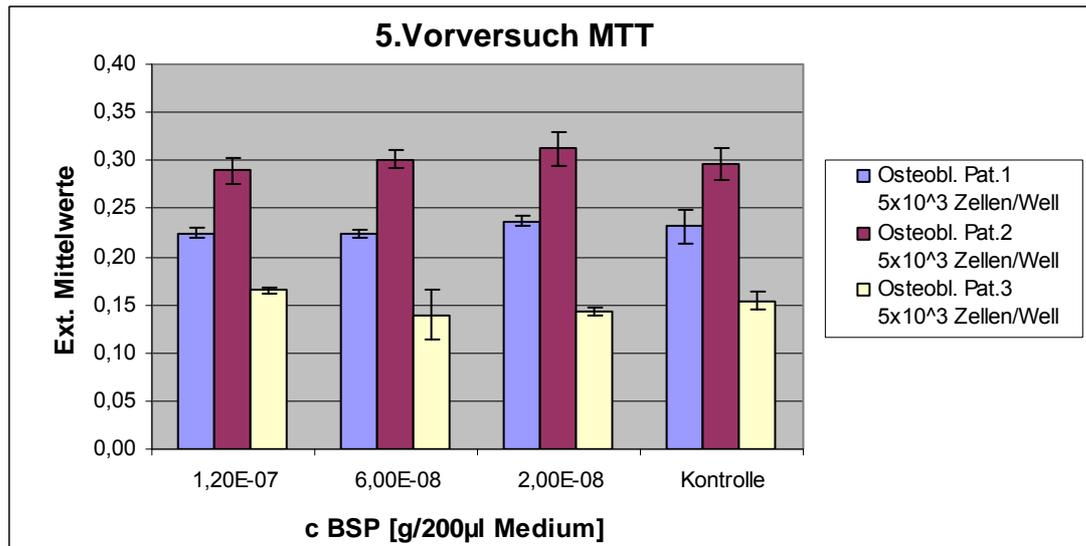


Abb.17: Als farbige Balkendiagramme sind die Mittelwerte der Extinktionen bei 550nm der Osteoblasten von drei Patienten dargestellt, sowie die jeweilige Standardabweichung - bezogen auf die einzelnen Messwerte (p1-4) untereinander. Auf der x-Achse sind die verschiedenen eingesetzten Proteinkonzentrationen aufgetragen. Pat. 1, O-SLJ/10 (4.Passage), Pat. 2, O-SEP/4 (4.Passage), Pat. 3, O-POF/9 (6.Passage).

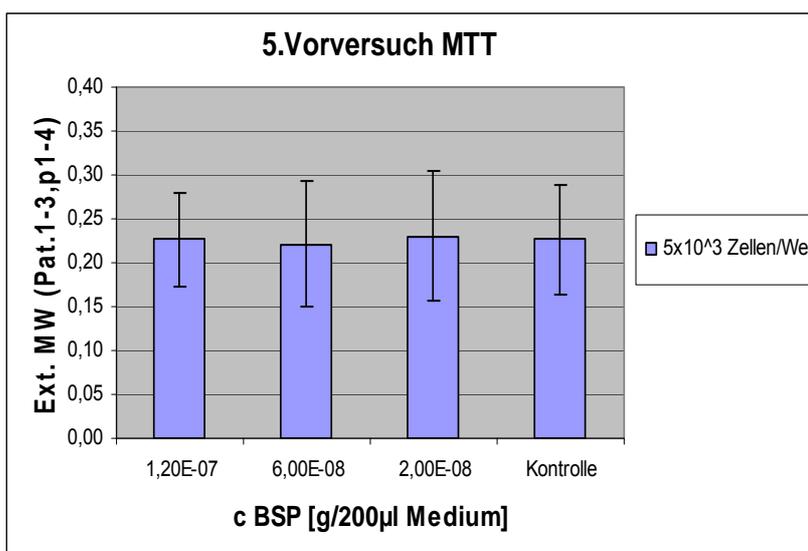


Abb.18: Als Balkendiagramme sind die Mittelwerte der Extinktionen von Pat. 1-3, sowie die Standardabweichungen, bezogen auf die einzelnen Messwerte (p1-4), dargestellt. Auf der x-Achse sind die verschiedenen BSP Konzentrationen aufgetragen.

3.3.2 Hauptversuche MTT

Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche und um mit hoher Wahrscheinlichkeit in den potentiellen Wirkungsbereich des BSPs zu gelangen wurden - einen Bereich von 3 Größenordnungen umspannende – Proteinkonzentrationen eingesetzt. Die Zellkonzentration 5×10^3 Zellen/Well wurde ebenfalls basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche gewählt. Die direkte Inkubationsmethode des Proteins mit den Zellen wurde beibehalten, siehe hierzu 3.3.1.3. Generell erfolgte eine 3-fach-Bestimmung der Proben.

Folgende Chargen Bone Sialoprotein wurden untersucht:

- BSP
- DRJ

3.3.2.1 MTT Untersuchung von Osteoblasten mit BSP

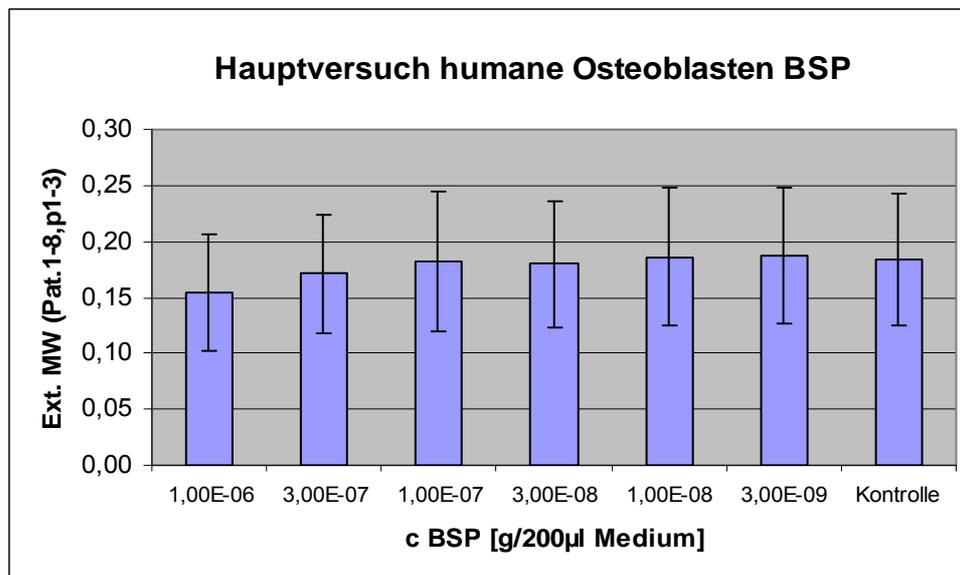


Abb.19: Untersuchung der mitochondrialen Aktivität der Osteoblasten von 8 Patienten mittels Extinktionsmessung bei 550nm. Patienten 1-8 humane Osteoblasten. Pat. 1: HOB-1, (6.Passage); Pat. 2: HOB-2, (5.Passage); Pat. 3: HOB-C, (5.Passage); Pat. 4: O-SEP/4, (7.Passage); Pat. 5: O-SRI/5, (5.Passage); Pat. 6: O-SLJ/10, (5.Passage); Pat. 7: O-EGG/7, (5.Passage); Pat. 8: O-POG/9, (7.Passage) bei einer 24h BSP Inkubation. Im Schaubild sind die Mittelwerte der Extinktionen der Patientenproben als Balkendiagramme, sowie die Standardabweichung -bezogen auf die einzelnen Messwerte (p1-p3)- dargestellt. Auf der x-Achse sind die eingesetzten Proteinkonzentrationen des BSPs aufgetragen.

3.3.2.2 MTT Untersuchung von Stromazellen mit BSP

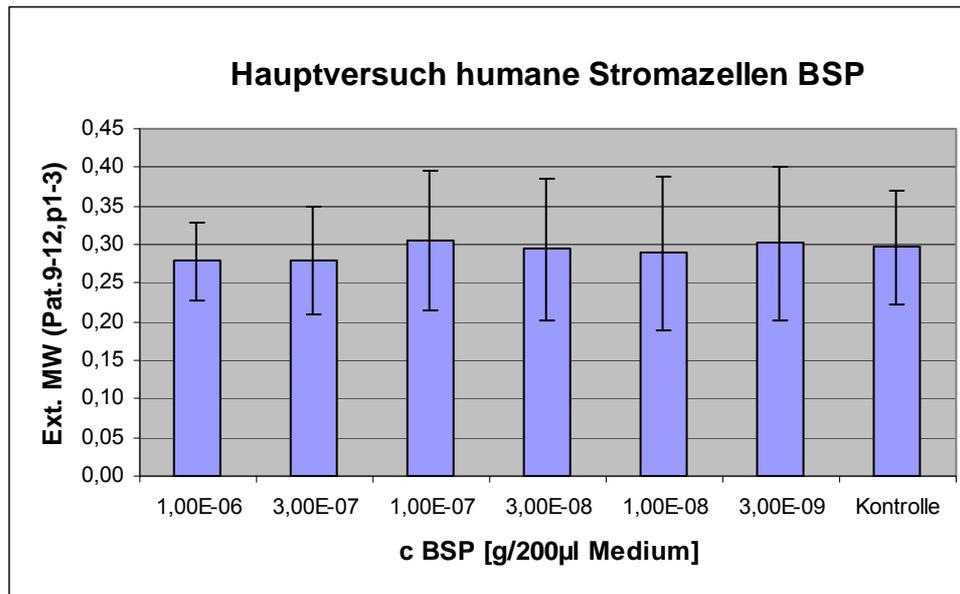


Abb.20: Untersuchung der mitochondrialen Aktivität der Stromazellen von 4 Patienten mittels Extinktionsmessung bei 550nm. Patienten 9-12 humane Stromazellen. Pat. 9: STR-SEP/4, 6.Passage; Pat. 10: STR-SRI/5, 5.Passage; Pat. 11: STR-HRL/2, 8.Passage; Pat. 12: STR-LBI/8, 6.Passage bei einer 24h BSP Inkubation. Im Schaubild sind die Mittelwerte der Extinktionen der Patientenproben als Balkendiagramme, sowie die Standardabweichung -bezogen auf die einzelnen Messwerte (p1-p3)- dargestellt. Auf der x-Achse sind die eingesetzten Proteinkonzentrationen des BSPs aufgetragen.

3.3.2.3 MTT Untersuchung tierischer Osteoblasten mit BSP

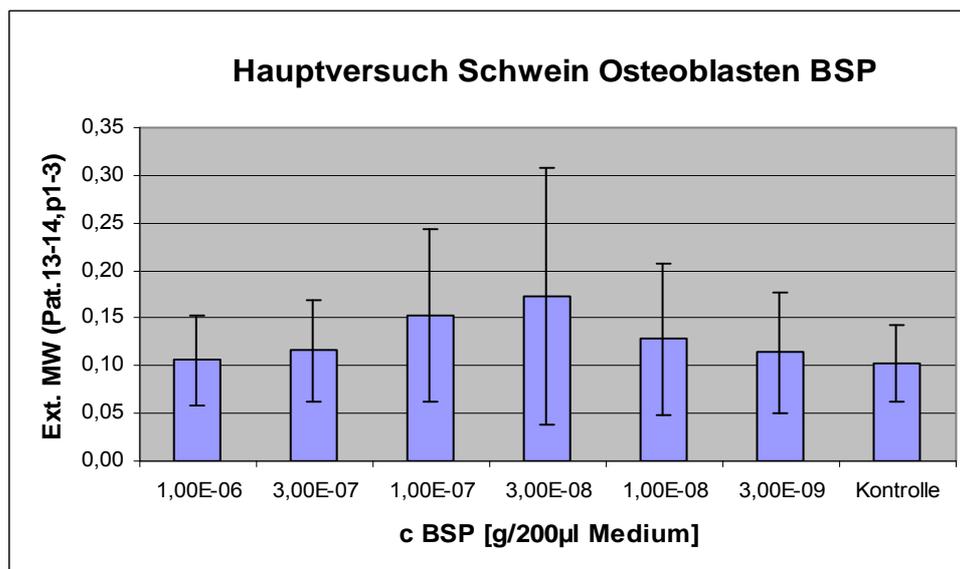


Abb.21: Untersuchung der mitochondrialen Aktivität der Osteoblasten von zwei jungen Schweinen (differenziert aus deren Knochenmarkzellen ab der 2.Passage) mittels Extinktionsmessung bei 550nm nach einer 24h BSP Inkubation. Patienten 13-14 Osteoblasten vom Schwein. Pat. 13: O-Schwein 1,

4.Passage; Pat. 14: O-Schwein 2, 3.Passage. Im Schaubild sind die Mittelwerte der Extinktionen der Patienten als Balkendiagramme, sowie die Standardabweichung -bezogen auf die einzelnen Messwerte (p1-p3)- dargestellt, auf der x-Achse sind die eingesetzten BSP Konzentrationen aufgetragen.

3.3.2.4 MTT Untersuchung tierischer Knochenmarkszellen mit BSP

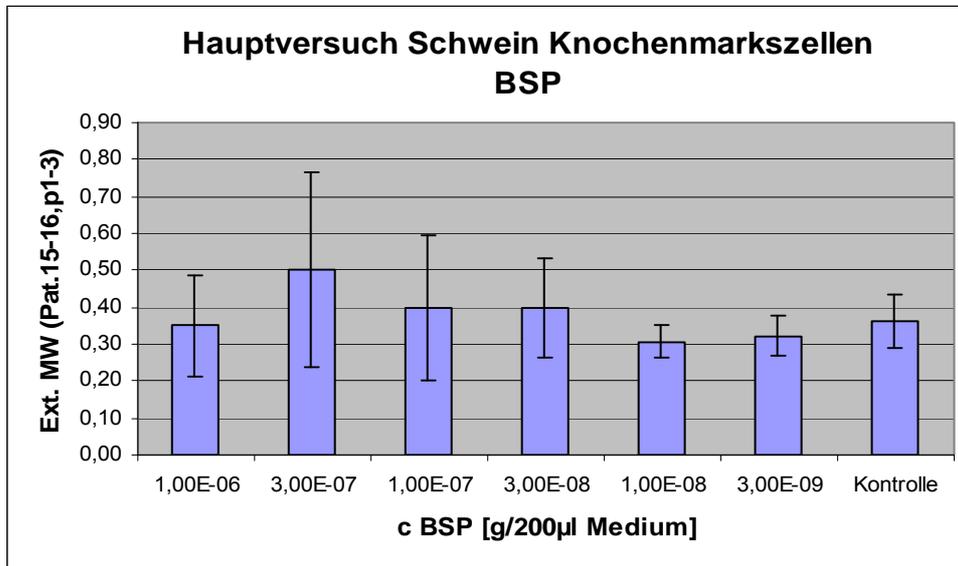


Abb.22: Untersuchung der mitochondrialen Aktivität der Knochenmarkszellen von zwei jungen Schweinen mittels Extinktionsmessung bei 550nm nach einer 24h BSP Inkubation. Patienten 15-16 Knochenmarkszellen Schwein. Pat. 15: MSCB Schwein 1, 5.Passage; Pat. 16: MSCB Schwein 2, 1.Passage. Im Schaubild sind die Mittelwerte der Extinktionen der Patienten als Balkendiagramme, sowie die Standardabweichung -bezogen auf die einzelnen Messwerte (p1-p3)- dargestellt, auf der x-Achse sind die verschiedenen BSP Konzentrationen aufgetragen.

3.3.2.5 MTT Untersuchung von Osteoblasten nach 24h, 48h, 72h, 96h BSP-Inkubation

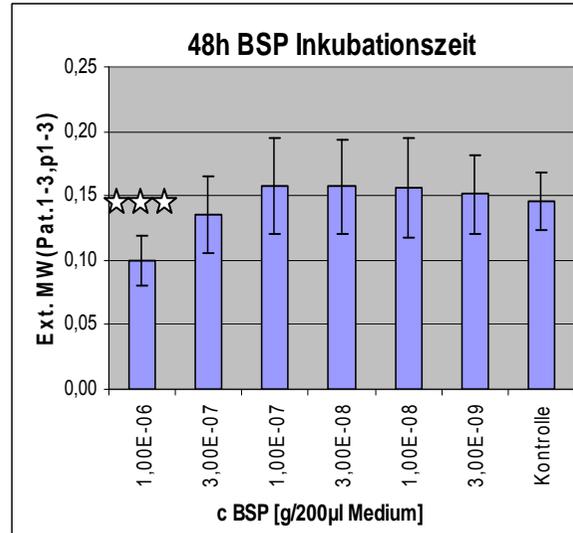
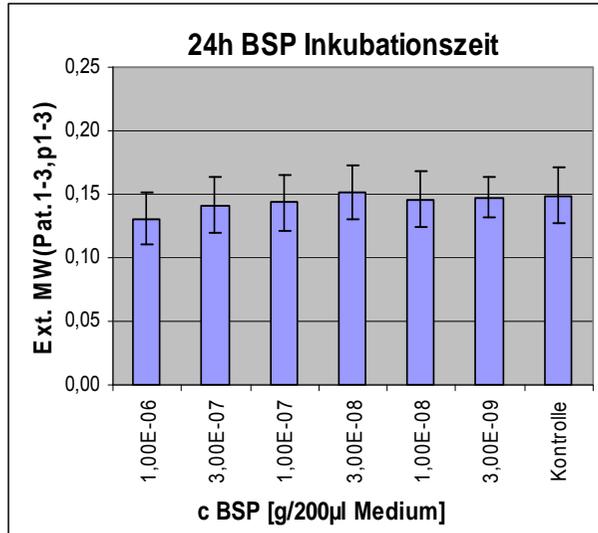
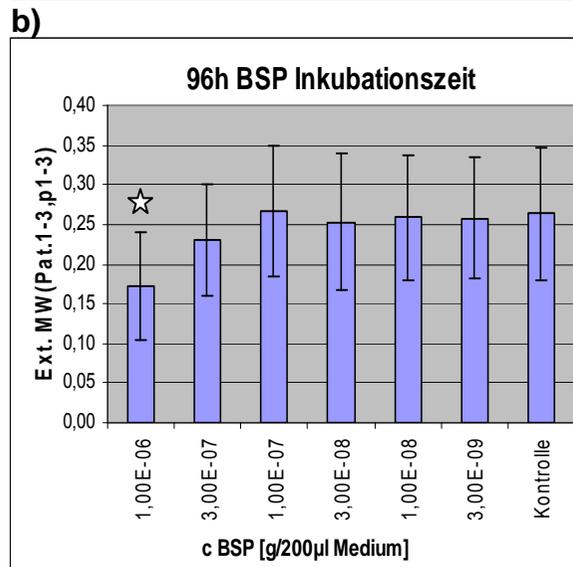
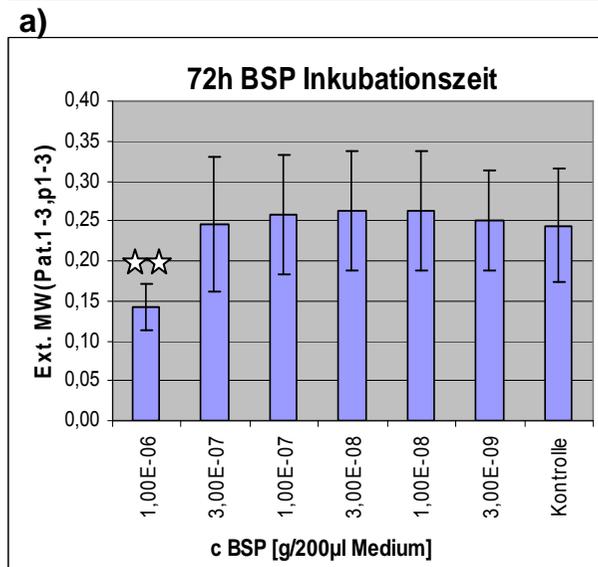


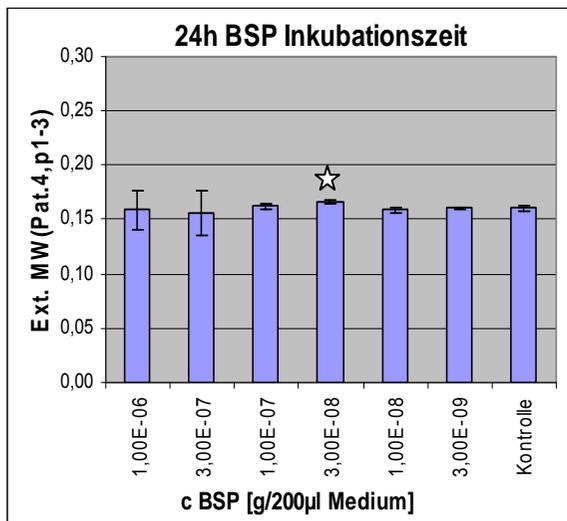
Abb.23: Hier wurde die Extinktion bei 550nm an humanen Osteoblasten dreier Patienten bei einer 24h, 48h, 72h und 96h BSP- Inkubation und verschiedenen Protein-Konzentrationen mit der Fragestellung untersucht, ob eine längere Inkubationszeit zu einer veränderten Zellaktivität führt. (Patient 1, O-LBI/8, 6.Passage; Patient 2,O-SRI/5, 9.Passage; Patient 3,O-SLJ/10, 6.Passage). Im Schaubild sind die Mittelwerte der Extinktionen der Patienten als Balkendiagramme, sowie die Standardabweichung -bezogen auf die einzelnen Messwerte (p1-p3) – dargestellt, auf der x-Achse sind die verschiedenen BSP Konzentrationen aufgetragen.



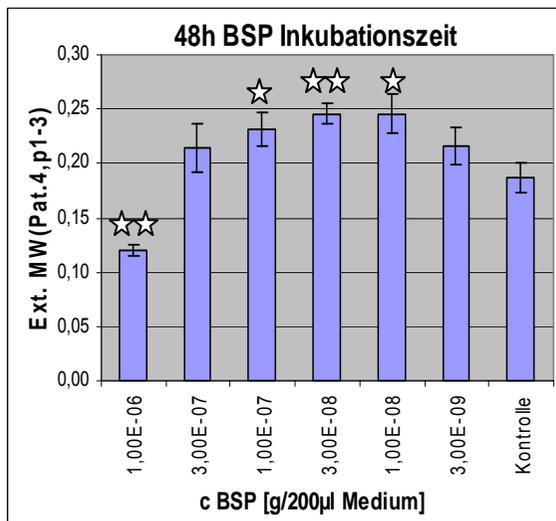
c)

d)

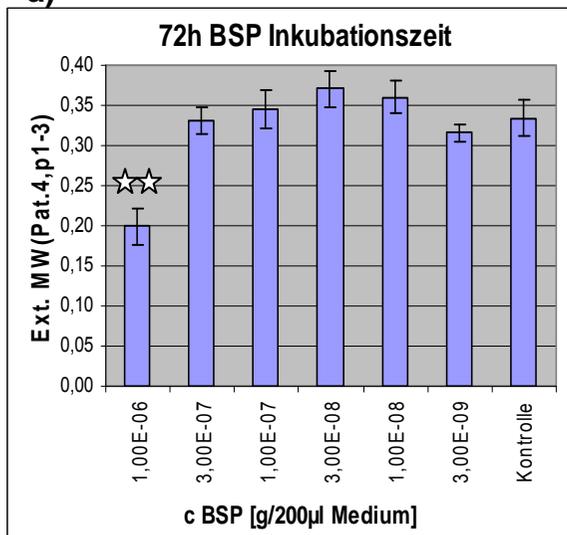
3.3.2.6 MTT Untersuchung von Stromazellen nach 24h, 48h, 72h, 96h BSP-Inkubation



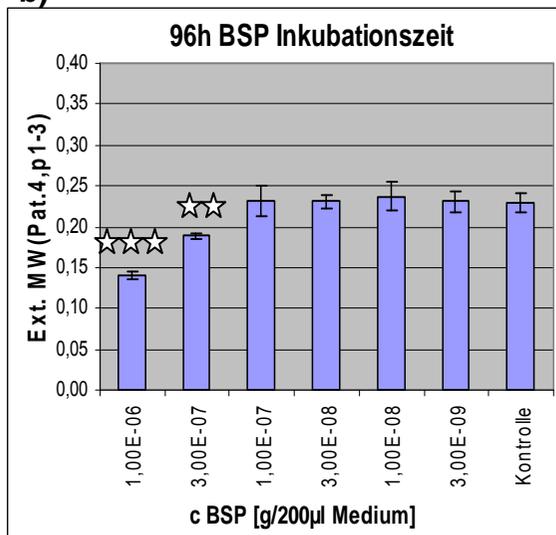
a)



b)



c)



d)

Abb.24: Wie in 3.3.2.5 wurde die Extinktion bei 550nm, jedoch hier an humanen Stromazellen eines Patienten, (Pat. SRT-HRL/2, 9.P.) bei einer 24h, 48h, 72h und 96h-Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von BSP mit der Fragestellung untersucht, ob eine längere Inkubationszeit zu einer veränderten Zellaktivität führt. Im Schaubild sind die Mittelwerte der Extinktionen des Patienten als Balkendiagramme, sowie die Standardabweichung - bezogen auf die einzelnen Messwerte (p1-p3) - dargestellt, auf der x-Achse sind die verschiedenen BSP Konzentrationen aufgetragen.

3.3.2.7 MTT Untersuchung von Osteoblasten mit DRJ

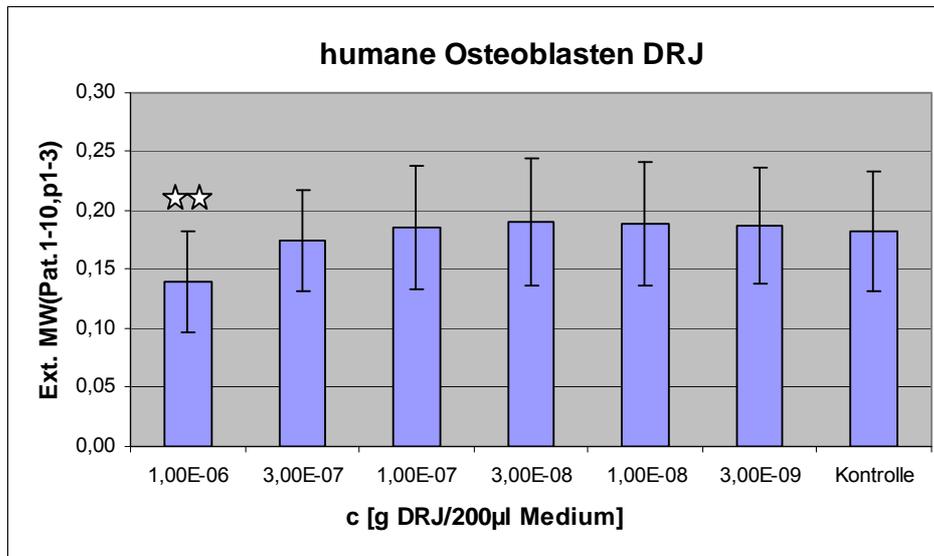


Abb.25:

MTT Hauptversuch, vergleichbar mit Versuch 3.3.2.1. Untersuchung der mitochondrialen Aktivität mittels Extinktionsmessung bei 550nm der Osteoblasten

von 10 Patienten bei einer 24h DRJ Inkubation. Pat. 1, HOB-1, 6.Passage; Pat. 2, HOB-2, 5.Passage; Pat. 3, HOB-C, 5.Passage; Pat. 4, O-SEP/4, 5.Passage; Pat. 5, O-SRI/5, 5.Passage; Pat. 6, O-SLJ/10, 5.Passage; Pat. 7, O-EGG/7, 5.Passage; Pat. 8, O-POG/9, 7.Passage; Pat. 9, O-HRL/2, 6.Passage; Pat. 10, O-LBI/8, 8.Passage. Im Schaubild sind die Mittelwerte der Extinktionen von den Patienten 1-10 als Balkendiagramme, sowie die Standardabweichung - bezogen auf die einzelnen Messwerte (p1-p3) dargestellt. Auf der x-Achse sind die eingesetzten Proteinkonzentrationen des DRJ Proteins aufgetragen.

3.3.2.8 MTT Untersuchung von Stromazellen mit DRJ

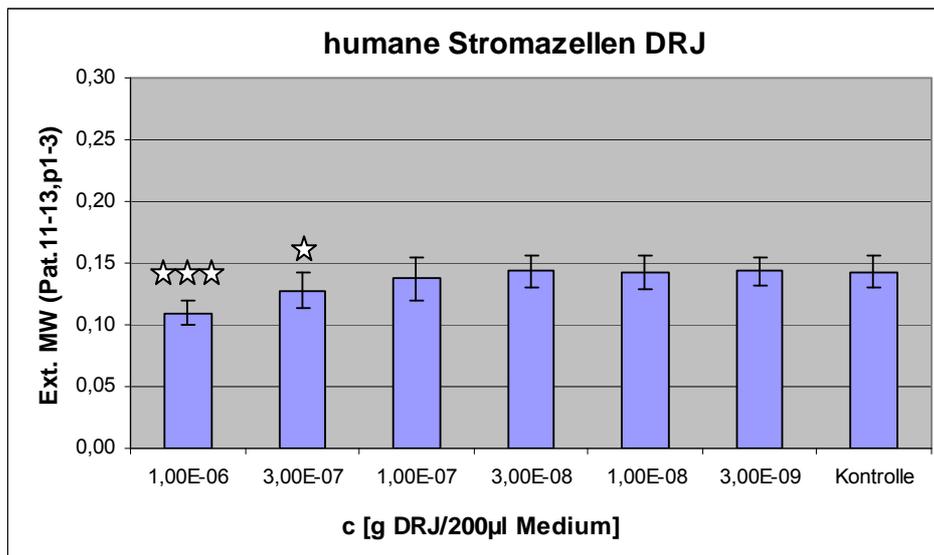


Abb.26:

MTT Hauptversuch, vergleichbar mit Versuch 3.3.2.2 zur Untersuchung der mitochondrialen Aktivität mittels Extinktionsmessung bei 550nm der Stromazellen

von 3 Patienten bei einer 24h DRJ Inkubation. Pat. 11, STR-SRI/5, 6.Passage; Pat. 12, STR-LBI/8, 5.Passage; Pat. 13, STR-HRL/2, 5.Passage. Im Schaubild sind die Mittelwerte der Extinktionen von den Patienten 11-13 als Balkendiagramme, sowie die Standardabweichung - bezogen auf die einzelnen Messwerte (p1-p3) dargestellt. Auf der x-Achse sind die eingesetzten Proteinkonzentrationen des DRJ Proteins aufgetragen.

3.3.2.9 MTT Untersuchung von Osteoblasten nach 24h, 48h, 72h, 96h DRJ-Inkubation

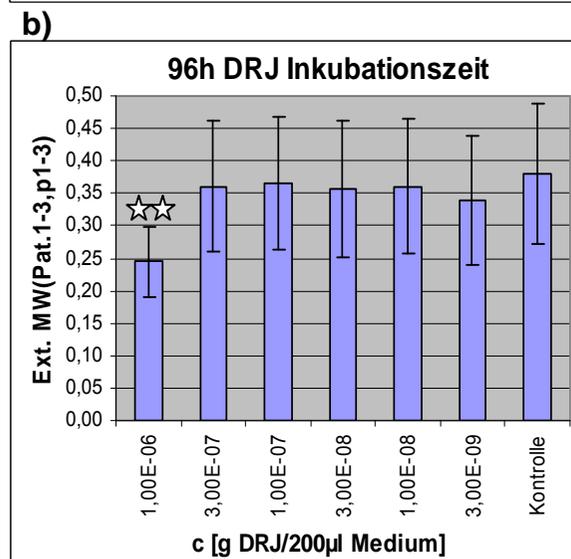
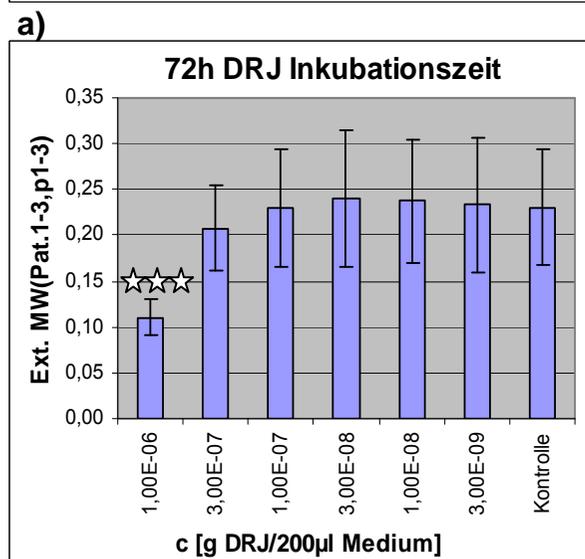
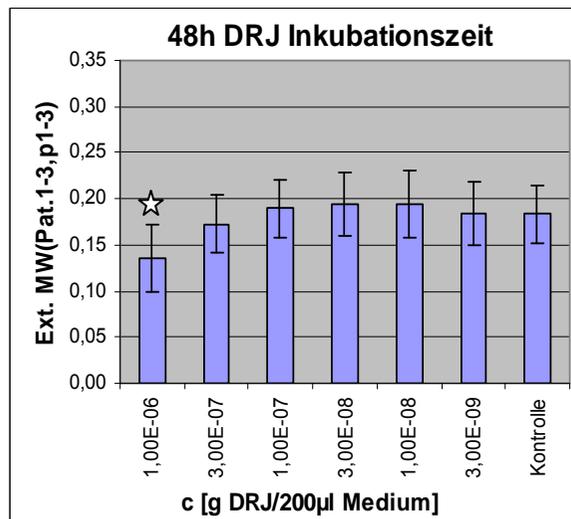
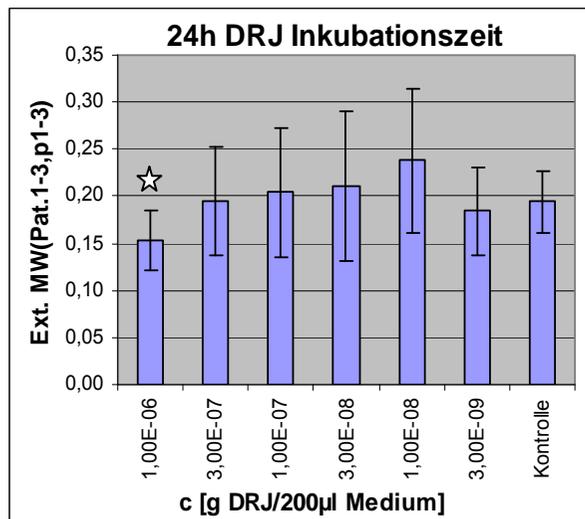


Abb.27: MTT Hauptversuch, hier wurde die Extinktion bei 550nm von humanen Osteoblasten dreier Patienten nach einer 24h-, 48h-, 72h- und 96h-Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des DRJ Proteins mit der Fragestellung untersucht, ob eine längere Inkubationszeit zu einer veränderten Zellaktivität führt. Patient 1, O-LBI/8, 6.Passage; Patient 2, O-SRI/5, 9.Passage; Patient 3, O-SLJ/10, 6.Passage. Es erfolgte immer eine 3-fach-Bestimmung der Messwerte. Im Schaubild sind die Mittelwerte der Extinktionen des Patienten als Balkendiagramme, sowie die Standardabweichung - bezogen auf die einzelnen Messwerte (p1-p3) - dargestellt, auf der x-Achse sind die verschiedenen BSP Konzentrationen aufgetragen. Vergleiche hierzu 3.3.2.5 und ggf. 3.3.2.6.

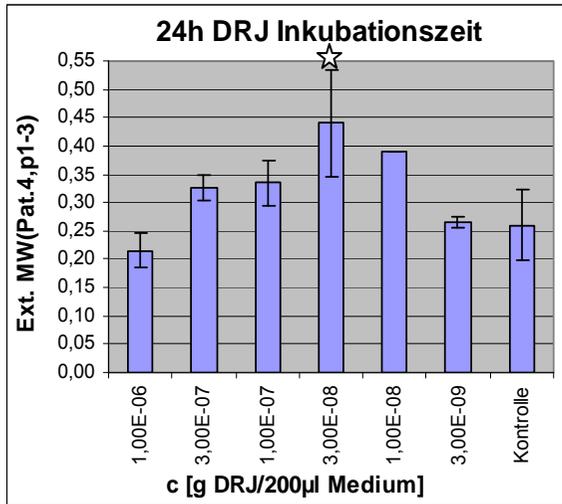
a)

b)

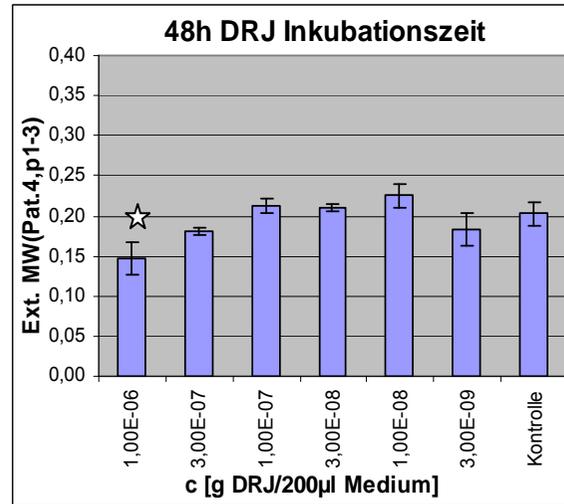
c)

d)

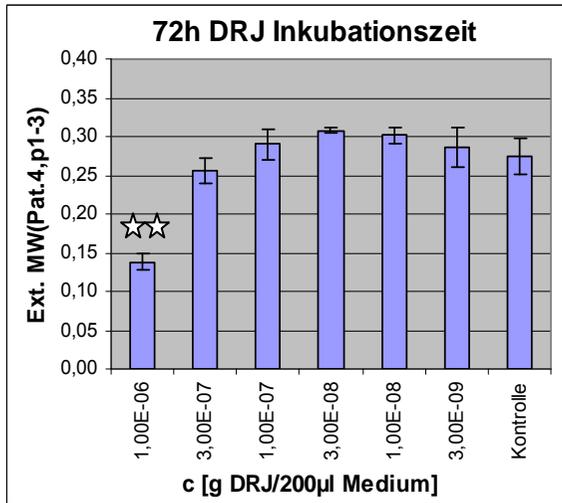
3.3.2.10 MTT Untersuchung von Stromazellen nach 24h, 48h, 72h, 96h DRJ-Inkubation



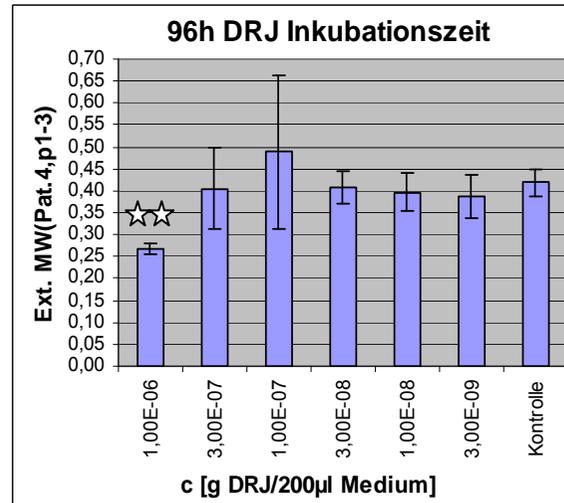
a)



b)



c)



d)

Abb.28: MTT Hauptversuch, hier wurde die Extinktion bei 550nm humaner Stromazellen eines Patienten bei einer 24h, 48h, 72h und 96h-Inkubation verschiedener Konzentrationen des DRJ Proteins mit der Fragestellung untersucht, ob eine längere Inkubationszeit zu einer ver-änderten Zellaktivität führt. Patient 4, STR-HRL/2, 9.Passage. Im Schaubild sind die Mittelwerte der Extinktionen des Patienten als Balkendiagramme, sowie die Standardabweichung -bezogen auf die einzelnen Messwerte (p1-p3) - dargestellt, auf der x-Achse sind die verschiedenen DRJ Konzentrationen aufgetragen. Vergleiche hierzu 3.3.2.6 und ggf. 3.3.2.5/3.3.2.9.

3.4 BrdU

Mit diesem Test wurde die Proliferationsrate der Zellen auf DNA-Ebene durch DNA-Einbau des Thymidinanalogs BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) und anschließende photometrische Messung zur Quantifizierung des Gehalts an BrdU, bestimmt. Im Folgenden sind die 4 Vorversuche zur Etablierung der Methode, sowie die 4 Hauptversuche aufgeführt. Primärdaten siehe Anhang.

3.4.1 Vorversuche BrdU

3.4.1.1 1. Vorversuch

Bei der Etablierung der Methode galt es zunächst eine möglichst optimale Einwirkzeit des BrdU-Reagenz und eine aussagekräftige Zellkonzentration für diesen Test zu finden. Untersuchungen zum Proliferationsverhalten der Zellen auf DNA-Ebene bei einer Inkubation mit BSP/DRJ erfolgten ab dem 2. Vorversuch.

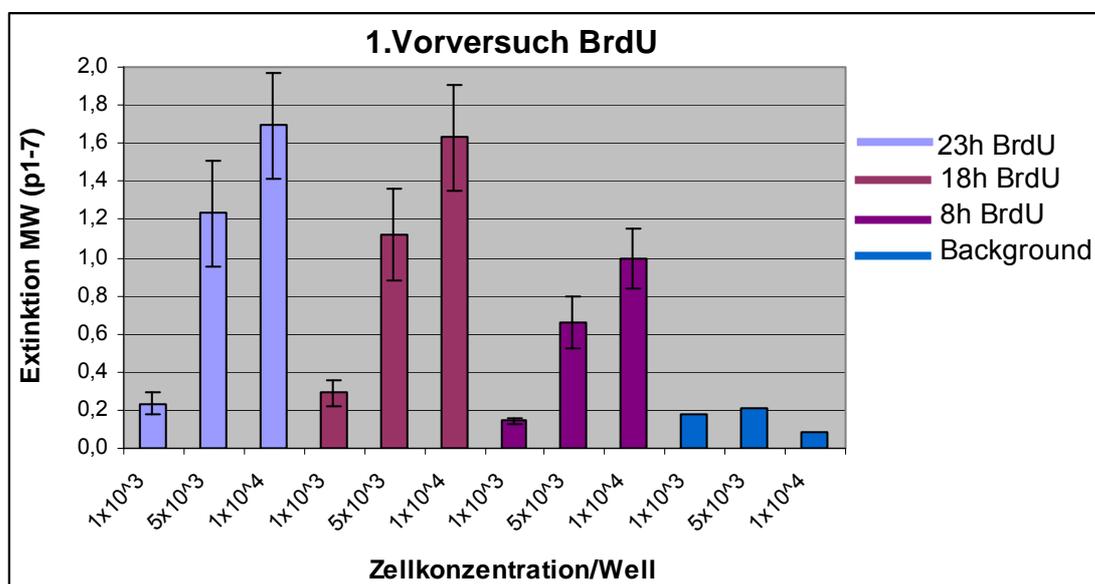


Abb.29: Vorversuch zur Untersuchung der Inkubationszeit des BrdU-Reagenz auf DNA-Ebene bei humanen Osteoblasten. Hier wurden die Osteoblasten eines Patienten (O-LBI/8, 4.Passage) bei verschiedenen Zellkonzentrationen (1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 Zellen/Well) und einer Extinktion von 450nm untersucht. Es erfolgte eine 7-fach-Bestimmung der Proben. Die farbigen Balkendiagramme stellen die Mittelwerte der Extinktionen der Proben dar, die Standardabweichung bezieht sich auf die einzelnen Messwerte p1-7. Der Background enthielt kein BrdU-Reagenz, er lieferte Informationen über die un-

spezifische Bindung des Anti-BrdU Antikörpers mit den Zellen (siehe 2.2.2.3). Hier erfolgte eine 1-fach-Bestimmung der Proben. In diesem Versuch wurde kein BSP/DRJ Protein untersucht.

3.4.1.2 2. Vorversuch

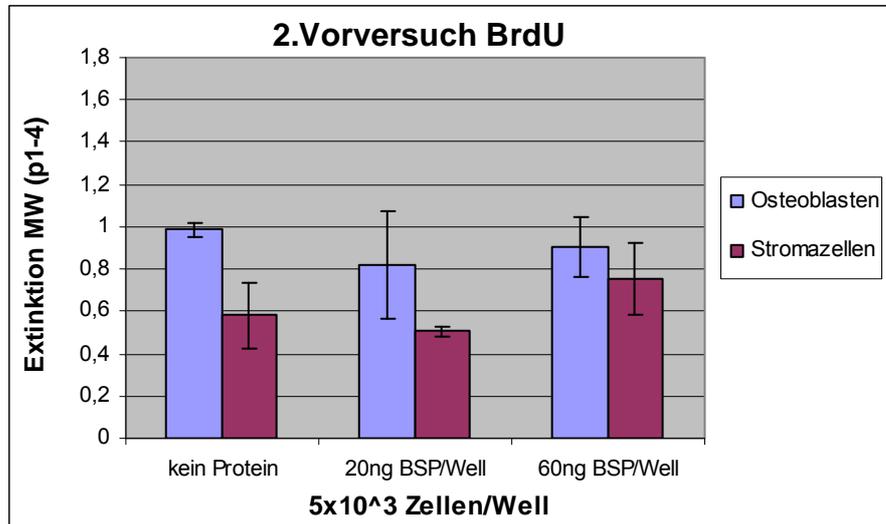


Abb.30: Erklärung siehe Abb.31.

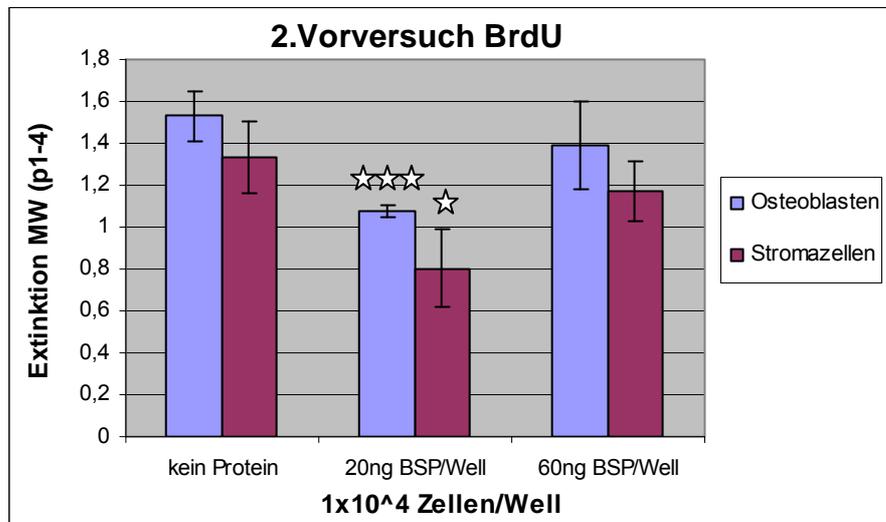


Abb.31: Vorversuch BrdU, hier wurde die Extinktion (450nm) der Osteoblasten (4.Passage) und Stromazellen (6.Passage) des Patienten HRL/2 bei einer Zellkonzentration von 5×10^3 Zellen/Well (Abb.30) und 1×10^4 Zellen/Well (Abb.31), bei einer 24h-Inkubation mit zwei Konzentrationen an BSP (20 und 60ng Absolutkonzentration BSP/Well) untersucht. Es wurde immer eine 4-fach-Bestimmung der Proben durchgeführt. Auf der y-Achse sind die Mittelwerte der 4-fach-Bestimmung der Extinktionen und auf der x-Achse die eingesetzten Proteinkonzentrationen aufgetragen. Die Standardabweichung bezieht sich auf die einzelnen Messwerte p1-4 untereinander. Im T-Test (2-seitig, Typ 2) wurden die Messergebnisse (p1-4) der Kontrollen (kein Protein) mit den Messergebnissen (p1-4) der BSP-behandelten Osteoblasten und Stromazellen verglichen.

3.4.1.3 3. Vorversuch

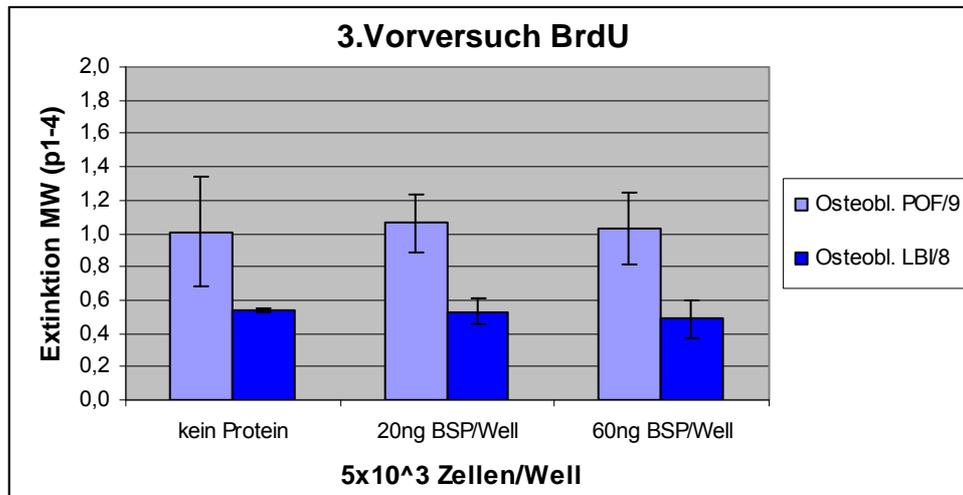


Abb.32: Beschreibung siehe Abb.33.

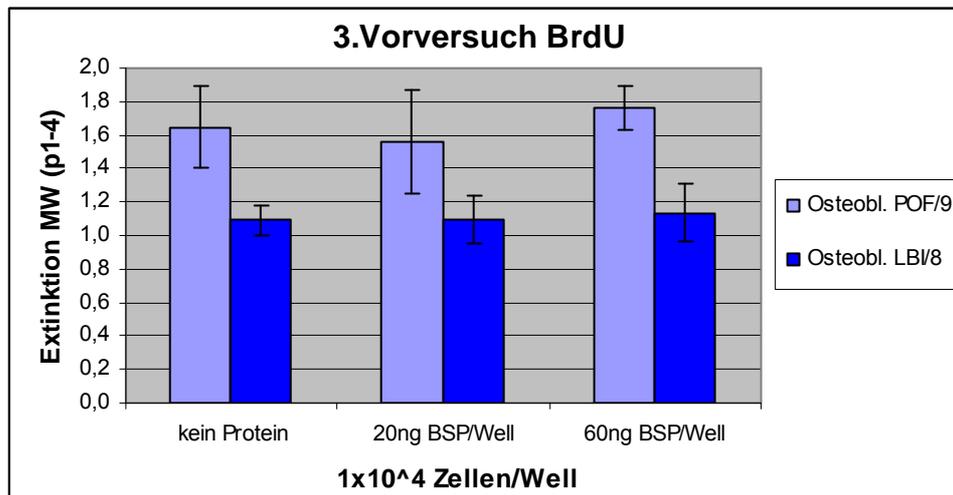


Abb.33: Vorversuch BrdU. Ansatz wie in 3.4.1.2, hier wurde die Extinktion bei 450nm von Osteoblasten zweier Patienten, O-POF/9 (5.Passage) und O-LBI/8 (7.Passage) bei einer Zellkonzentration von 5×10^3 Zellen/Well (Abb.32) und 1×10^4 Zellen/Well (Abb.33), nach einer 24h-Inkubation mit 20 und 60ng BSP/Well untersucht. Dieser Versuch wurde durchgeführt um die Ergebnisse aus 3.4.1.2 zu bestätigen. Auf der y-Achse sind die Mittelwerte der Extinktionen und auf der x-Achse die eingesetzten Proteinkonzentrationen aufgetragen. Die Standardabweichung bezieht sich auf die einzelnen Messwerte p1-p4 untereinander. Im T-Test (2-seitig, Typ 2) wurden die Messergebnisse (p1-p4) der Osteoblasten-Kontrolle (kein Protein) mit den Messergebnissen (p1-p4) der Osteoblasten mit Protein verglichen. Die Mittelwerte der Extinktionen der Osteoblasten der Patienten aus 3.4.1.2 und 3.4.1.3 sind in Abb.34 graphisch vereint als Balkendiagramme dargestellt. Im T-Test wurden jedoch keine signifikanten Ergebnisse ermittelt.

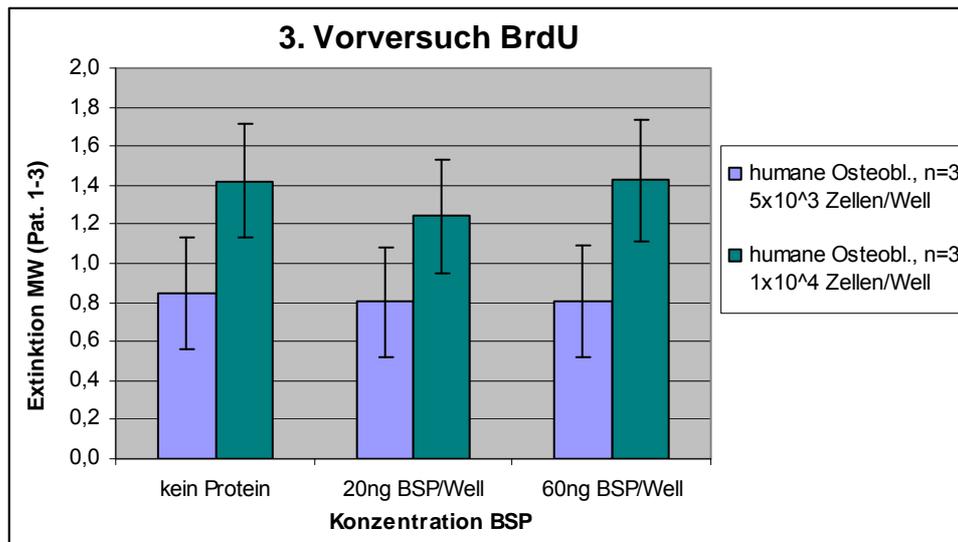


Abb.34: Im Schaubild sind die Mittelwerte der Extinktionen der Osteoblasten O-HRL/2 (4.Passage), O-POF 9 (5.Passage) und O-LBI/8 (7.Passage) aus 3.4.1.2/3.4.1.3 bei zwei untersuchten Zellkonzentrationen und zwei unterschiedlichen Konzentrationen von BSP dargestellt. Es wurde jeweils die Standardabweichung, bezogen auf die einzelnen Messwerte (p1-4) berechnet und in die Balkendiagramme eingezeichnet. Bei den angegebenen Proteinkonzentrationen handelt es sich um Absolutkonzentrationen/Well. Im T-Test wurden keine signifikanten Ergebnisse ermittelt

3.4.1.4 4. Vorversuch

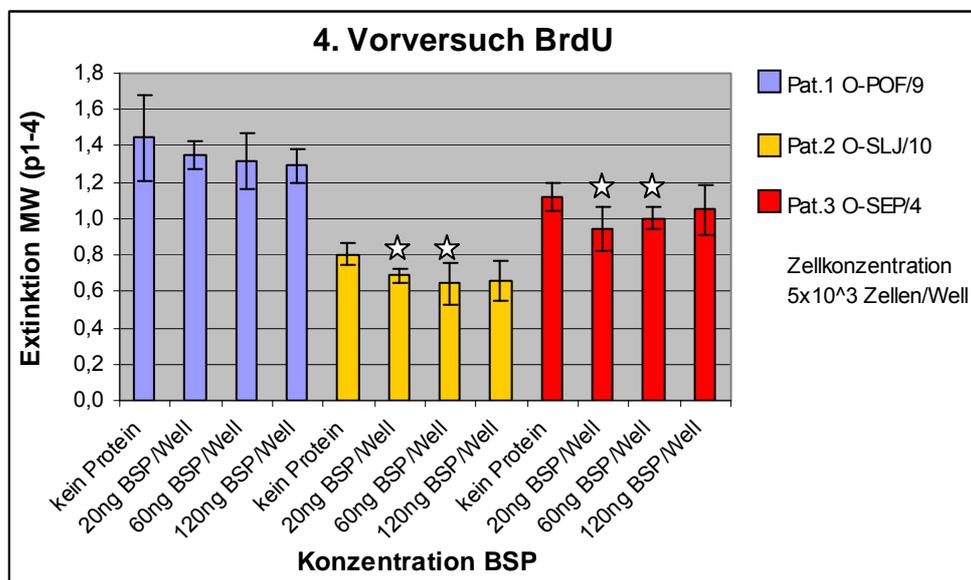


Abb.35: Beschreibung siehe Abb.36.

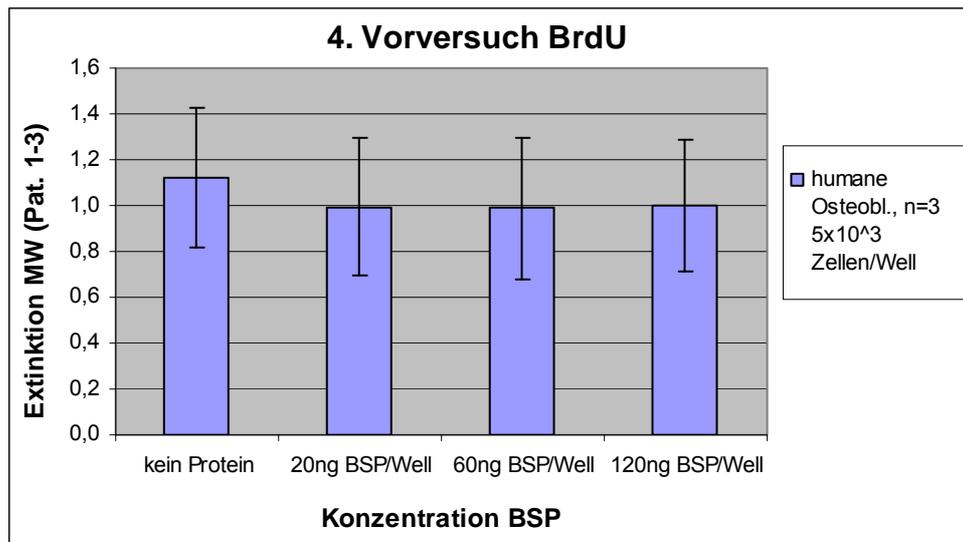


Abb.36: Vorversuch BrdU. Hier wurde die Extinktion (450nm) der Osteoblasten dreier Patienten (O-POF/9, 6.Passage; O-SLJ/10, 4.Passage; O-SEP/4, 4.Passage) bei einer Zellkonzentration von 5×10^3 Zellen/Well, nach 24 stündiger Inkubation mit 20, 60 und 120ng BSP/Well gemessen und in zwei Figuren dargestellt. In Abb.35 sind die Mittelwerte der Extinktionen der drei untersuchten Patienten – aufgeschlüsselt nach untersuchtem Patient - und in Abb.36 vereint ($n=3$) dargestellt. Es wurde immer eine 4-fach-Bestimmung der Proben durchgeführt. Auf den x-Achsen sind die eingesetzten Proteinkonzentrationen und auf der y-Achse die Mittelwerte der Extinktionen aufgetragen. Im Gegensatz zur statistischen Auswertung der einzelnen Patienten in Abb.35, wurden in Abb.36 bei der Mittelung der Messwerte der verschiedenen Patienten, keine signifikanten Ergebnisse nachgewiesen.

3.4.2 Hauptversuche BrdU

Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche und um mit hoher Wahrscheinlichkeit in den potentiellen Wirkungsbereich des BSPs zu gelangen wurden wie in 3.3.2 - einen Bereich von 3 Größenordnungen umspannende – Proteinkonzentrationen eingesetzt. Die Zellkonzentration von 5×10^3 Zellen/Well wurde ebenfalls basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche gewählt. Die direkte Inkubationsmethode des Proteins mit den Zellen, siehe 3.3.1.3, wurde beibehalten. Es wurden humane Osteoblasten und Stromazellen, jedoch keine tierischen Zellen in den Hauptversuchen untersucht. Es erfolgte regelhaft eine 3-fach-Bestimmung der Proben. Primärdaten siehe Anhang.

Folgende Bone Sialoproteine wurden untersucht:

- BSP
- DRJ

3.4.2.1 BrdU Untersuchung von Osteoblasten nach BSP-Inkubation

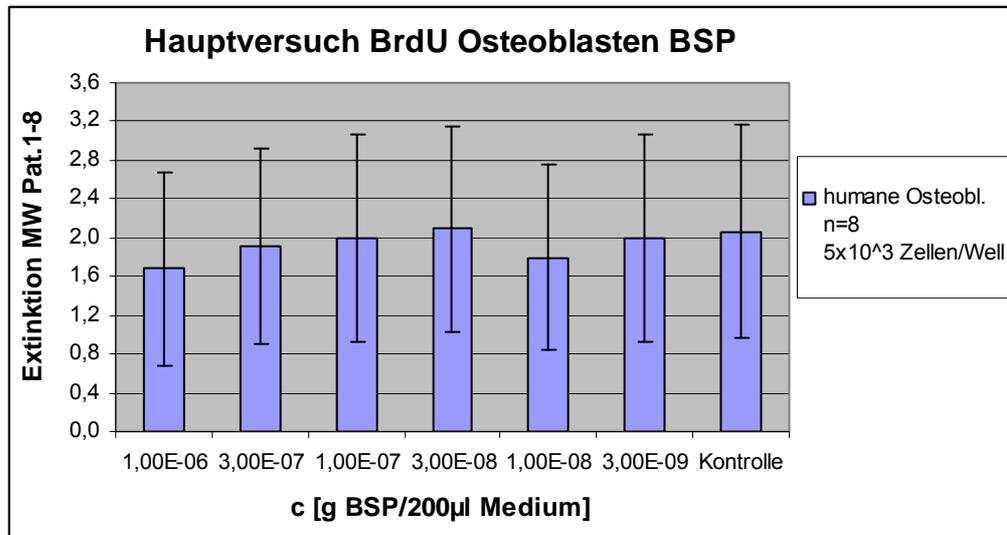


Abb.37: Hauptversuch BrdU humane Osteoblasten. Die Zellproliferation wurde hier mittels eines colorimetrischen Immunoassays, basierend auf dem BrdU Einbau während der DNA Synthese proliferierender Zellen (S-Phase), via spektrophotometrischer Messung (450nm) quantitativ bestimmt. Es wurden humane Osteoblasten von 8 Patienten untersucht. Pat. 1, HOB-1, 6.Passage; Pat. 2, HOB-2, 5.Passage; Pat. 3, HOB-C, 5.Passage; Pat. 4, O-SRI/5, 5.Passage; Pat. 5, O-SLJ/10, 5.Passage; Pat. 6, O-EGG/7, 5.Passage; Pat. 7, O-HRL/2, 6.Passage; Pat. 8, O-LBI/8, 8.Passage. Auf der y-Achse sind die Mittelwerte der Extinktionen von Pat. 1-8 und auf der x-Achse die eingesetzten Proteinkonzentrationen aufgetragen.

3.4.2.2 BrdU Untersuchung von Stromazellen nach BSP-Inkubation

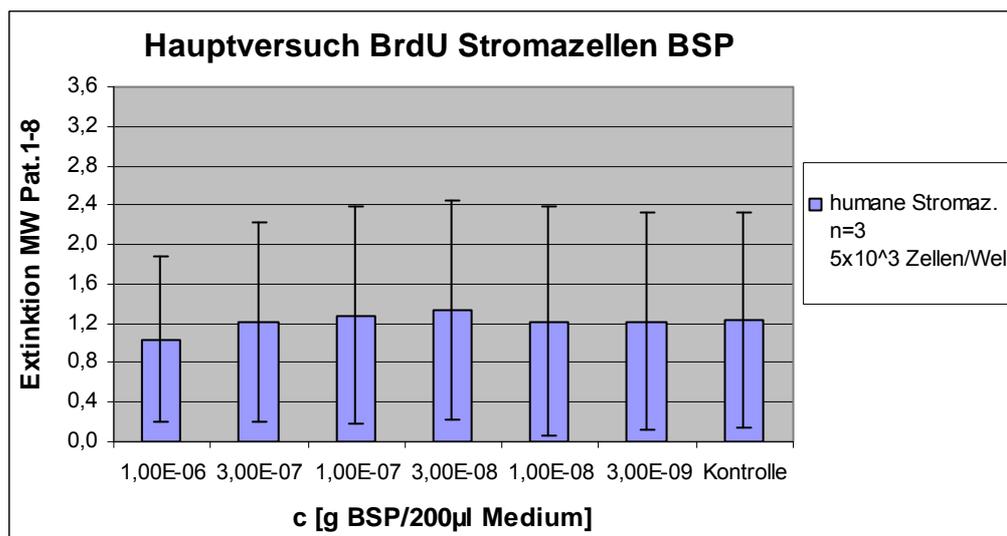


Abb.38: Hauptversuch BrdU. Die Zellproliferation wurde hier wie in 3.4.2.1, mittels BrdU-Assay quantitativ bestimmt. Es wurden humane Stromazellen von 3 Patienten (Pat. 9-11) untersucht. Pat. 9 STR-SRI/5, 6.Passage; Pat. 10 STR-LBI/8, 5.Passage; Pat. 11 STR-HRL/2, 5.Passage. Auf der y-Achse sind

die Mittelwerte der Extinktionen von Pat. 9-11 und auf der x-Achse die eingesetzten Proteinkonzentrationen aufgetragen.

3.4.2.3 BrdU Untersuchung von Osteoblasten nach DRJ-Inkubation

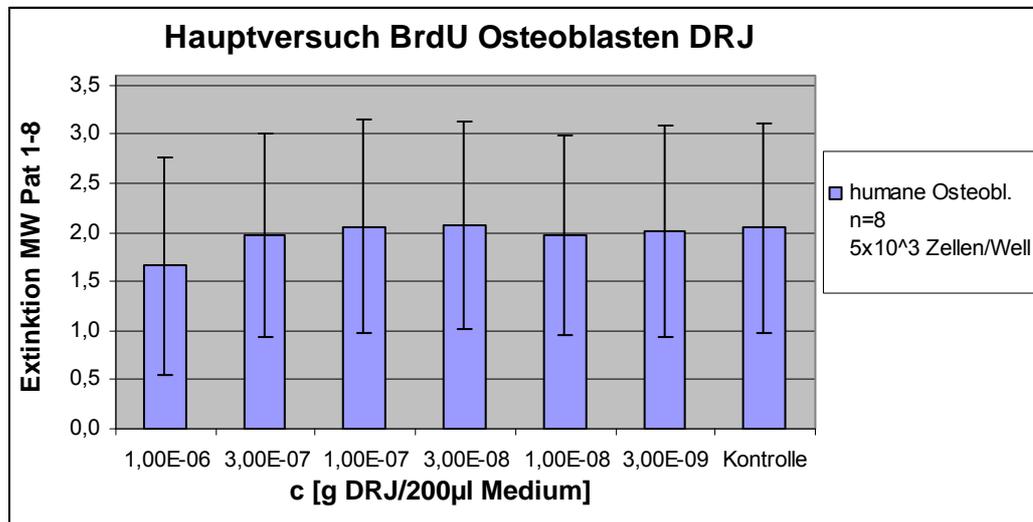


Abb.39: Wie im Hauptversuch 3.4.2.1, dort jedoch zur Untersuchung des BSPs, wurde hier bei Inkubation mit dem DRJ Protein die Zellproliferation mittels BrdU-Assay quantitativ bestimmt. Es wurden humane Osteoblasten von 8 Patienten (Pat. 1-8) untersucht. (Pat. 1 HOB-1, 6.Passage; Pat. 2 HOB-2, 5.Passage; Pat. 3 HOB-C, 5.Passage; Pat. 4 O-SRI/5, 5.Passage; Pat. 5 O-SLJ/10, 5.Passage; Pat. 6 O-EGG/7, 5.Passage; Pat. 7 O-HRL/2, 6.Passage; Pat. 8 O-LBI/8, 8.Passage). Auf der y-Achse sind die Mittelwerte der Extinktionen von Pat. 1-8 und auf der x-Achse die eingesetzten Proteinkonzentrationen aufgetragen.

3.4.2.4 BrdU Untersuchung von Stromazellen nach DRJ-Inkubation

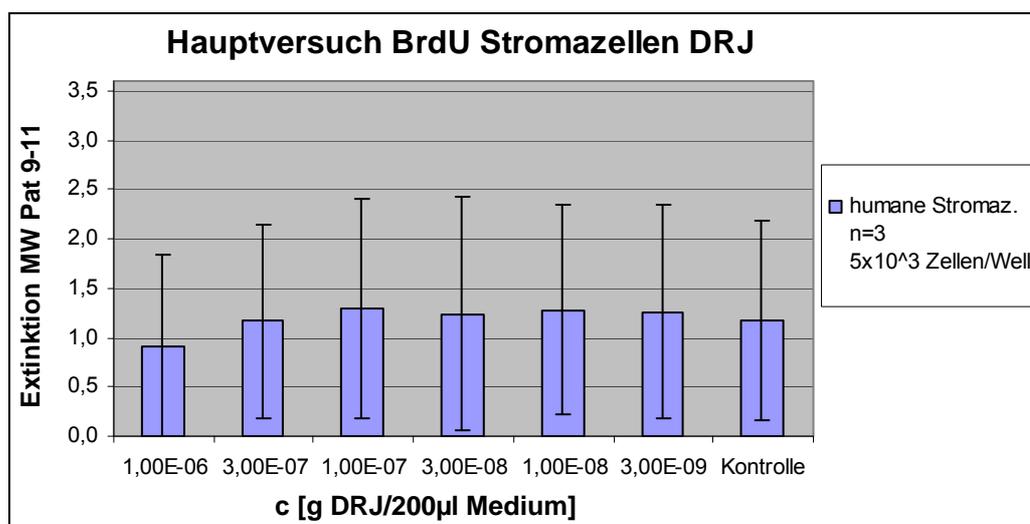


Abb.40: Hauptversuch BrdU. Die Zellproliferation wurde wie in 3.4.2.1, 3.4.2.2 und 3.4.2.3 mittels BrdU-

Assay quantitativ bestimmt. Im Gegensatz zur Untersuchung des BSPs in 3.4.2.2, wurde hier das DRJ Protein untersucht. Es wurden humane Stromazellen von 3 Patienten (Pat. 9-11) untersucht. (Pat. 9 STR-SRI/5, 6.Passage; Pat. 10 STR-LBI/8, 5.Passage; Pat. 11 STR-HRL/2, 5.Passage). Auf der y-Achse sind die Mittelwerte der Extinktionen Pat. 9-11 (p1-3) und auf der x-Achse die eingesetzten Proteinkonzentrationen aufgetragen.

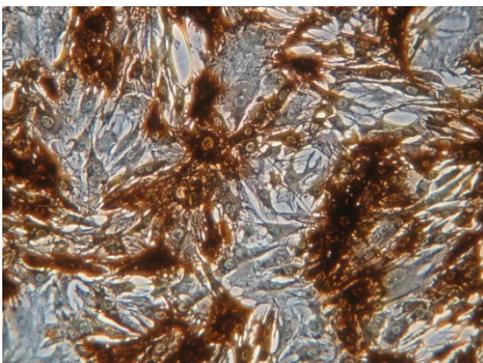
3.5 Histochemische Färbungen

Mit der Fragestellung, ob nach einer Inkubation mit Bone Sialoprotein auf histochemischer Ebene eine Stimulation der Zellen beobachtet werden kann, wurden zwei qualitative Färbungen angewandt. Die Alkalische Phosphatase (AP) Färbung dient als Nachweis des gleichnamigen Enzyms in der Umgebung osteoinduktiver Zellen und die von Kossa Färbung wird zum Nachweis der Kalzifizierung der Zellen im Well eingesetzt.

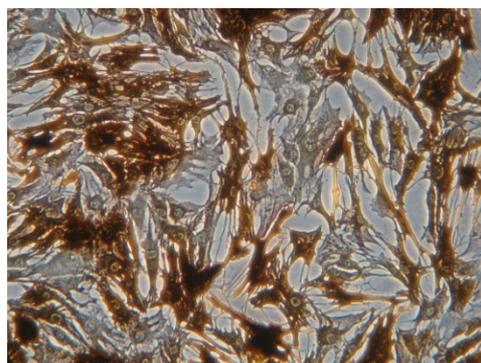
3.5.1 Alkalische Phosphatase Färbung

3.5.1.1 1. Vorversuch

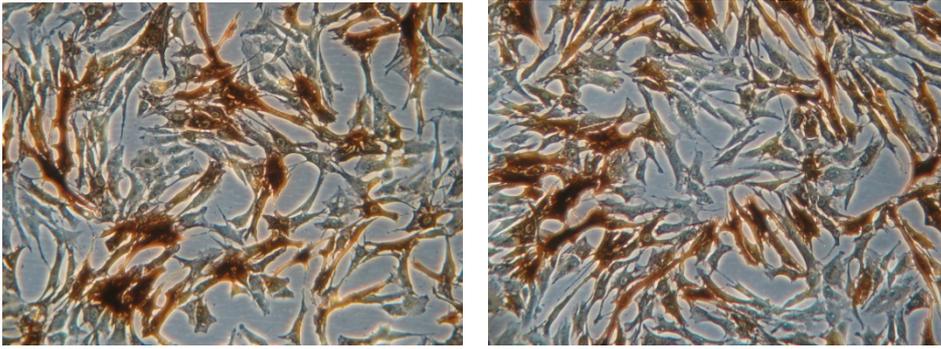
Im 1. Vorversuch wurden exemplarisch an Osteoblasten und Stromazellen eines Patienten die Zellkonzentrationen 1×10^4 und 1×10^5 Zellen/6 Well untersucht und verglichen. Die Abb.41 a-d wurden 2h nach Entfernen der Färbelösung aufgenommen.



a)



b)



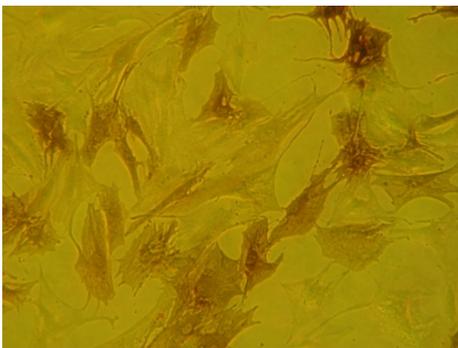
c)

d)

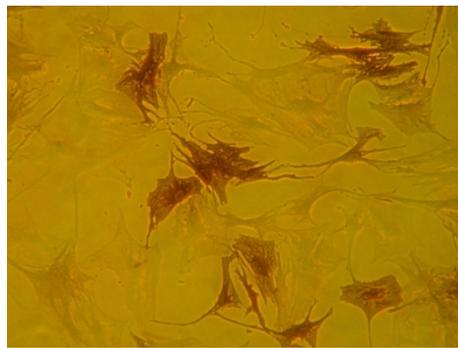
Abb.41: a) Osteoblasten Patient LBI/8, 5.P., 1×10^5 Zellen/Well, ohne BSP Beschichtung ü. N. b) Osteoblasten Patient LBI/8, 5.P., 1×10^5 Zellen/Well mit BSP ü. N. c) Osteoblasten Patient LBI/8, 5.P., 1×10^4 Zellen/Well, ohne BSP Beschichtung ü. N. d) Osteoblasten Patient LBI/8, 5.P., 1×10^4 Zellen/Well mit BSP ü. N. Vergrößerung jeweils 100-fach.

3.5.1.2 2. Vorversuch

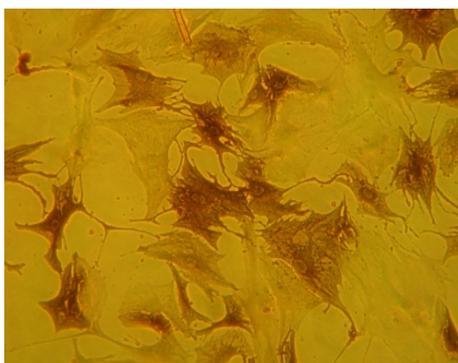
Osteoblasten und Stromazellen wurden unmittelbar nach der Aussaat direkt mit Proteinmengen von $2,00 \times 10^{-6}$ und $6,00 \times 10^{-7}$ g BSP/2ml Medium je 6 Well für 4-5 Tage inkubiert. Folgende Bilder wurden unmittelbar nach der Färbung, vor Entfernung der Färbelösung aufgenommen. Da die Färbelösung rasch nachdunkelt variieren die Farben leicht.



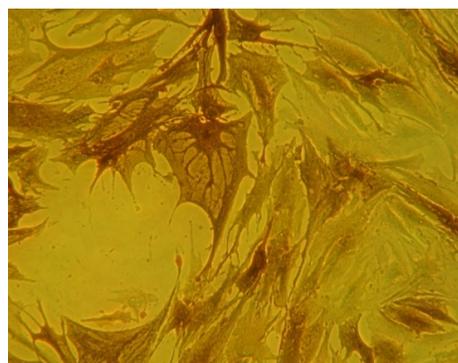
a)



b)



c)



d)

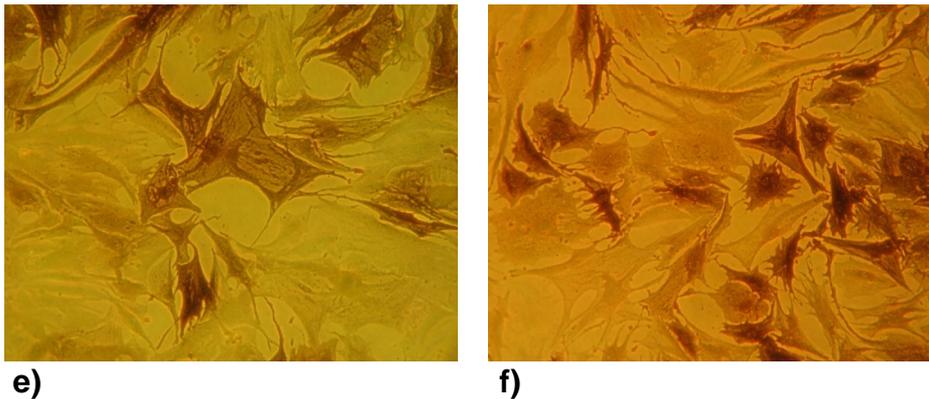


Abb.42: a) Osteoblasten Pat. SEP/4, 4.P., 5×10^4 Zellen/Well, ohne BSP, b) Osteoblasten Pat. SEP/4, 4.P., 5×10^4 Zellen/Well mit 200ngBSP/Well, c) Osteoblasten Pat. SEP/4, 4.P., 5×10^4 Zellen/Well mit 600ngBSP/Well, d) Stromazellen Pat. HRL/2, 4.P., 5×10^4 Zellen/Well, ohne BSP, e) Stromazellen Pat. HRL/2, 4.P., 5×10^4 Zellen/Well, mit 200ngBSP/Well, f) Stromazellen Pat. HRL/2, 4.P., 5×10^4 Zellen/Well, mit 600ngBSP/Well. Vergrößerung jeweils 200-fach.

3.5.1.3 Hauptversuche

Die Alkalischen Phosphatase Färbungen der Hauptversuche wurden an Osteoblasten von 9 Patienten, sowie Osteoblasten von 2 Schweinen und Knochenmarkzellen von 2 Schweinen mit Proteinkonzentrationen von $6,00 \times 10^{-7}$ und $2,00 \times 10^{-6}$ g BSP/2ml Medium, bei einer Zellzahl von 5×10^4 Zellen/Well durchgeführt. Das Protein DRJ wurde parallel an Osteoblasten von 3 Patienten untersucht. Alle untersuchten Zellen befanden sich in der 4.-8.Passage. Zu einer qualitativ positiven Farbreaktion, bzw. dem selektiven Anfärben der Zellen kam es bei allen humanen und auch tierischen Osteoblasten, sowohl der Kontrollzellen, als auch der mit BSP/DRJ inkubierten Zellen. Eine positive Farbreaktion ähnelte im Mikroskop stark der Abb.42. Zu keiner positiven Farbreaktion kam es bei den Knochenmarkzellen vom Schwein, hier färbten sich weder die Kontrollzellen, noch die mit BSP inkubierten Zellen an.

3.5.2 Von Kossa Färbung

Zum qualitativen Kalzifizierungsnachweis der Zellen wurde die von Kossa Färbung angewandt. Da auch diese Färbung im 6 Well durchgeführt wurde,

übernahmen wir die eingesetzten Zell- und Bone Sialoprotein-Konzentrationen der Hauptversuche der Alkalischen Phosphatase Färbung (siehe 3.5.1.3).

3.5.2.1 Hauptversuche

Die von Kossa Färbung wurde bei Osteoblasten von 5 Patienten und Knochenmarkzellen von zwei Schweinen durchgeführt. Es wurde nur das BSP-Protein und nicht das DRJ-Protein auf seine osteoinduktiven Eigenschaften hin untersucht.

Patient	Passage	Zellkonz./Well	c[g BSP/2ml Medium]	Protein	Ergebnis Färbung
O-SRI/5	5.P.	5x10 ⁴	2,00E-06	BSP	Schwach
		5x10 ⁴	6,00E-07	BSP	Schwach
		5x10 ⁴	kein Protein	-	Schwach
HOB-1	6.P.	5x10 ⁴	2,00E-06	BSP	Gut
		5x10 ⁴	6,00E-07	BSP	Gut
		5x10 ⁴	kein Protein	BSP	Gut
HOB-C	5.P.	5x10 ⁴	2,00E-06	BSP	Gut
		5x10 ⁴	6,00E-07	BSP	Gut
		5x10 ⁴	kein Protein	-	Gut
O-EGG/7	4.P.	5x10 ⁴	2,00E-06	BSP	Gut
		5x10 ⁴	6,00E-07	BSP	Gut
		5x10 ⁴	kein Protein	-	Gut
HOB-2	6.P.	5x10 ⁴	2,00E-06	BSP	Gut
		5x10 ⁴	6,00E-07	BSP	Gut
		5x10 ⁴	kein Protein	BSP	Gut
Osteobl. Schwein Nr.1	2.P.	5x10 ⁴	2,00E-06	BSP	Gut
		5x10 ⁴	6,00E-07	BSP	Gut
		5x10 ⁴	kein Protein	-	Gut
Osteobl. Schwein Nr.2	1.P.	5x10 ⁴	2,00E-06	BSP	Gut
		5x10 ⁴	6,00E-07	BSP	Gut
		5x10 ⁴	kein Protein	-	Gut

Tab.8: Hauptversuch von Kossa-Färbung. Dargestellt sind die untersuchten Zellen, die jeweilige Zellpassage, eingesetzte Zell- und Proteinkonzentrationen, das untersuchte Protein, sowie das Ergebnis der Färbung. Nicht dargestellt sind die untersuchten Knochenmarkzellen der Schweine, als auch die mit DRJ Protein inkubierten Osteoblasten. Das BSP Protein wurde für 4 Tage mit den Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

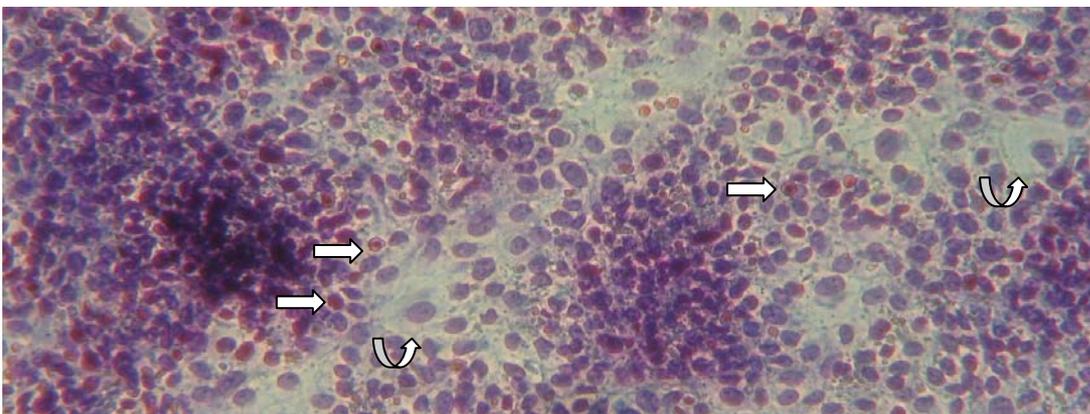


Abb.43: Von Kossa Färbung im 6 Well. Osteoblasten vom Schwein Nr.1, 2.P., 5×10^4 Zellen/Well, nach 4 Tagen ohne BSP Inkubation, Vergrößerung 100-fach. Zellkerne die Osteokalzin sezernieren stellen sich in dieser Färbung schwarz bis rot-braun dar (siehe gerader Pfeil), das Zytoplasma der Zellen färbt sich zart blau an (siehe gebogener Pfeil). Aufgrund eines Kameradefektes konnten nach diesem Bild keine weiteren Bilder aufgenommen werden, die humanen Osteoblasten stellten sich jedoch ganz ähnlich im Mikroskop dar, unabhängig davon ob sie mit, oder ohne BSP inkubiert worden waren.

3.6 Problem Protein Inkubationsmethode

3.6.1 SDS-PAGE Gelelektrophorese

Wie aus den Messwerten und graphischen Abbildungen der MTT Vorversuche (3.3.1.1/3.3.1.2) und auch aus den Vorversuchen der histochemischen alkalischen Phosphatase Färbung (3.5.1.1) hervorgeht, schien sich die Beschichtungsmethode der Flaschen und Wells, über Nacht (12h) bei 4°C im Kühlschrank, nicht zu bewähren. Um nachzuweisen, ob das BSP Protein bei dieser Inkubationsmethode überhaupt auf der Plastikoberfläche der Flaschen und Wells haften blieb, wurde die Coomassie Färbung durchgeführt (siehe 2.2.3.3). Nach der Färbung wurden sowohl die mit BSP und PBS (-) beschichteten, als auch die nicht beschichteten Flaschen/Wells unter dem Mikroskop betrachtet und verglichen. Die unterschiedlich behandelten Oberflächen ähnelten sich stark und BSP Proteinanteile waren nicht eindeutig nachweisbar. Es stellte sich die Frage, ob das Protein überhaupt in Lösung war, oder eventuell beim sterilen filtrieren verloren gegangen war. Wir entschieden uns gegen eine Proteinbestimmung nach Lowry, da dieser Nachweis zu unsensitiv gewesen wäre, da die Arbeitskonzentration des Proteins $10 \mu\text{g/ml}$ betrug, statt dessen entschieden wir uns für eine Polyacrylamid Gelelektrophorese, mit anschließender Coomassie Färbung und Coomassie Entfärbung zum Nachweis des Proteins. Dazu wurden, wie in Abb.44 dargestellt, zwei gelöste Proben vom BSP Protein in die Taschen c) und d) und Rückstände von der vorherigen Coomassie Färbung des BSP Proteins im 6 Well vorsichtig abgeschabt und in die Tasche b) pipettiert, ganz links wurde der Marker a) aufgetragen.

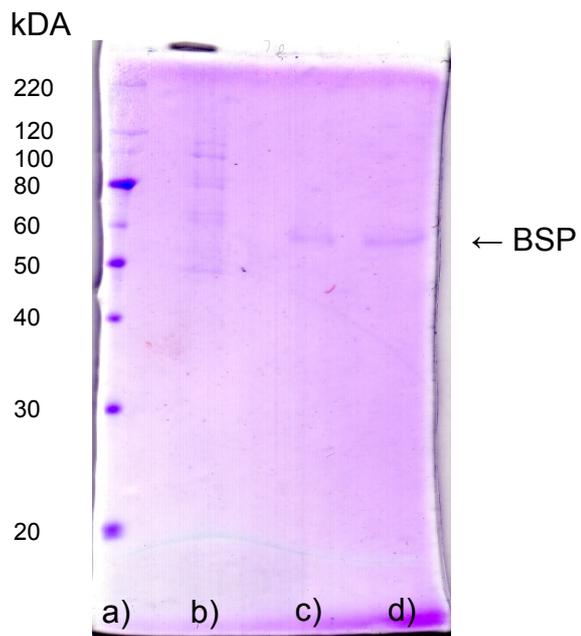


Abb.44: Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassie-Färbung und Entfärbung zur Darstellung der BSP Proteine. Die Spuren c) und d) stellen das BSP Protein bei ca. 60 kDA dar, die Spur b) zeigt abgetragene Überreste aus einer BSP-beschichteten 6 Well-Plate der Coomassie Färbung. Die Probe in Spur a) stellt den Marker (MagicMark XP Western Blot Protein Standard, Invitrogen) dar. Ergebnis dieses Gels: Das BSP Protein befand sich in beiden steril filtrierten BSP Lösungen und war bei dem sterilen Filtrieren im Labor nicht aus der Lösung filtriert worden. Eine prominente Beschichtung der Flaschen mit BSP konnte aber nicht nachgewiesen werden (siehe Spur b), da auf Höhe von etwas 60kDA keine deutliche Proteinbande nachweisbar war.

4 Auswertung, Diskussion

4.1 Zellkultur

4.1.1 Osteoblasten, Stromazellen, Knochenmarkzellen

Wie in 3.1.1 beschrieben, war beim Aufarbeiten von humanen Osteoblasten, als auch bei der Differenzierung von tierischen Knochenmarkzellen zu Osteoblasten, im Vergleich zu Knochenmarkzellen vom Schwein, ein deutlich langsames Wachstum bemerkbar. Humane Osteoblasten waren in den Flaschen nach ca. 4 Wochen konfluent, ein Ergebnis welches mit anderen Beobachtungen übereinstimmt (Schaumburger 2000). Humane Stromazellen waren in der 6 Well Platte nach ca. 3 Wochen konfluent, da hier jedoch auch weniger Zellen eingesetzt wurden, sind vergleichende Rückschlüsse bzgl. des Proliferationsverhaltens gegenüber den humanen Osteoblasten nicht zulässig. Knochenmarkzellen vom Schwein waren nach ca. 2 Wochen in den Flaschen konfluent, daraus differenzierte Osteoblasten wuchsen wesentlich langsamer und waren ähnlich, wie humane Osteoblasten erst nach ca. 4 Wochen konfluent. Bei der Aufarbeitung des humanen Knochenmaterials stellten anfänglich Kontaminationsprobleme mit Pilzen ein Problem dar. Humane Osteoblasten und -aus dem Überstand des jeweiligen Patienten- gewonnene Stromazellen, unterschieden sich optisch, wie in 3.1.1, Abb.5 a) und d) dargestellt. Die erfolgreiche Differenzierung von tierischen Knochenmarkzellen zu Osteoblasten war ebenfalls optisch mittels mikroskopischer Untersuchungen erkennbar, siehe 3.1.2, Abb.6 a) bis f). Der Verdacht, dass die differenzierten tierischen Osteoblasten nach einer 3-wöchigen Inkubation mit Osteoblastenmedium in ihrer Proliferation geschwächt waren, wurde im MTT Vorversuch 3.3.1.2 durch negative Messergebnisse bestätigt. Die Zellen waren nicht mehr vital genug, um –im Rahmen des Versuches- innerhalb von 24h adhärent zu werden. Dementsprechend entschieden wir, die MTT Hauptversuche an tierischen Osteoblasten (3.3.2.3) bereits 1-2 Wochen nach Inkubation mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium zu untersuchen.

10% des knöchernen Skelettsystems des Menschen befinden sich in einem ständigen Umbauprozess, zwischen Knochenauf- und Abbau, dem sog. Knochen-remodeling. Alter Knochen wird dabei kontinuierlich durch Osteoklasten abgebaut und durch neues Gewebe ersetzt, was die Interaktion verschiedener Zell-Phänotypen, allen voran von Osteoblasten, als auch biochemische und mechanische Faktoren einschließt (Hadjidakis und Androulakis 2006). Da Osteoblasten primär an der Knochenheilung beteiligt sind, stellen Sie für uns die wichtigsten Zellen in den Untersuchungen dieser Arbeit dar. Da Osteoblasten auch an BSP binden können und BSP wiederum an Hydroxylapatit und Titan binden kann, verfolgten wir den Gedanken die Eigenschaften des BSP zur Biologisierung der Titan-Oberflächen und Verbesserung des Einwachsens von Prothesen zu nutzen. Da sich aber die Beschichtung von Plastikoberflächen mittels BSP als schwierig erwies, (siehe 3.6 und 4.1.2.1) entschieden wir uns das gelöste Protein im Laufe der Versuche direkt mit den Zellen zu inkubieren. Knochenmarkzellen lassen sich durch eine Knochenmarkpunktion relativ einfach isolieren (2.2.1.3) und können *in vitro* durch Stimulation über induzierbare Osteoprogenitorzellen, zu determinierten Osteoprogenitorzellen und weiter zu Prä-Osteoblasten, welche Alkalische Phosphatase und Kollagen Typ1 exprimieren, zu reifen Osteoblasten, welche u.a. BSP, Kollagen Typ1, Osteocalzin, Osterix und Runx2 exprimieren, differenzieren (Marie und Fromigue 2006; Titorencu et al. 2007). Daher eignen sie sich für vergleichende Untersuchungen zu humanen Osteoblasten im Hinblick auf Knochenregeneration und eine möglicherweise -durch BSP induzierte- veränderte Zellproliferation. Knochenmarkzellen wachsen typischerweise in Kolonien (Krebsbach et al. 1999), wobei jede Kolonie aus einer Vorläuferzelle entsteht. Die Stromazellen, welche aus dem Überstand bei der Isolierung der humanen Osteoblasten gewonnen wurden, ähnelten in ihrem Wachstumsverhalten mehr den humanen Osteoblasten, waren jedoch länglicher und schmaler und proliferierten zwar stärker als humane Osteoblasten, jedoch nicht so stark wie die isolierten tierischen Knochenmarkzellen, dementsprechend betrachteten wir sie als eine eigene Zellpopulation.

4.1.2 Real Time PCR

4.1.2.1 Osteopontin, Osteonectin, TGF- β

Im Rahmen der PCR Untersuchungen lag unser Hauptaugenmerk auf Genen, welche im Zusammenhang mit Mineralisationsprozessen stehen, wie Osteopontin und Osteonectin, welche gemeinsam mit BSP zu den nicht-kollagenartigen Proteinen der Extrazellulären Matrix zählen (Roach 1994), sowie TGF- β , ein Transkriptionsfaktor, welcher bzgl. der Differenzierung von humanen Knochenmarkzellen zu Osteoblasten einen stimulierenden Effekt hat (Ahdjoudj et al. 2004). Osteopontin (OPN) ist wie Bone Sialoprotein ein saures, phosphoryliertes und glykosiliertes extrazelluläres Matrixprotein, welches ähnliche Struktureigenschaften wie Bone Sialoprotein aufweist, ebenfalls hauptsächlich in der Knochenmatrix exprimiert wird und in vitro an Prozessen der Knochenmineralisierung beteiligt, jedoch etwas kleiner, als BSP ist. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass OPN die Hydroxylapatit (HA)-Nukleation hemmt, wobei für diese Funktion Phosphat- und Carboxylgruppen im Protein entscheidend sind (Hunter et al. 1994 b). Hier unterscheiden sich OPN und BSP, dem die Funktion der HA-Nukleation zugesprochen wird und welches zwar nach enzymatischer Decarboxylierung, nicht jedoch nach enzymatischer Dephosphorylierung in dieser Funktion beeinträchtigt wird (Hunter und Goldberg 1993; Hunter und Goldberg 1994 a). Eine BSP induzierte Stimulation der OPN-Exprimierung könnte sich dementsprechend ungünstig auf Knochenmineralisierungsprozesse, bzw. auf das Einwachsen von Prothesenmaterial auswirken, sollte der Nukleationseffekt von BSP durch einen Osteopontin vermittelten negativen Stimulationseffekt überlagert werden.

OPN kann wie BSP über einen $\alpha\beta 3$ Rezeptor, RGD-vermittelt, mit einer charakteristischen irregulären Morphologie, bestehend aus vielfältigen, peripher gelegenen Aktin-reichen Podosomen an Osteoklasten binden, wird von humanen und Ratten-Osteoklasten synthetisiert und es stellt sich die Frage, welchen Effekt eine solche Bindung zur Folge hat. Ob es dadurch zu einer Stimulation, oder Hemmung der Knochenresorption kommen kann ist aktuell

noch nicht geklärt. Inwieweit Bone Sialoprotein nicht nur als Matrixprotein, sondern auch als Gen-Induktor fungiert, ist bisher noch wenig erforscht. Sowohl eine Induktion, als auch Repression wäre in Kombination mit einer BSP-Prothesenbeschichtung hochinteressant. Aus diesem Grunde untersuchten wir das Exprimierungs-Verhalten humaner Osteoblasten und Stromazellen nach Zugabe von BSP.

Da sich die direkte Beschichtung der Flaschen mit dem Protein über Nacht bei 4°C als schwierig herausstellte, siehe hierzu 2.2.2.1, sowie Vorversuche MTT (3.3.1.1-3.3.1.3) und sich eine erfolgreiche Bindung des Proteins an die Plastikoberfläche der Flaschen als unwahrscheinlich darstellte, das Protein sich jedoch sicher in Lösung befand (3.6.1), entschieden wir uns, das Protein direkt mit den jeweils ausgezählten Zellen für 24h im Brutschrank zu inkubieren. So konnte sichergestellt werden, dass sich das Protein in unmittelbarer Umgebung der Zellen befand und während der Inkubationszeit im Brutschrank gute Wachstumsbedingungen für die Zellen gewährleistet waren. Folge dieser direkten Inkubationsmethode war jedoch auch ein Verlust an Nährmedium durch Verdünnung mit gelöstem Protein. In den Vorversuchen belief sich der Verlust bei 1µg und 3µg BSP/Flasche (100ml und 300ml BSP Lösung) auf 100µl und 300µl Nährmedium/10ml, in den Hauptversuchen ebenfalls bei 3µgBSP/Flasche auf 300µl und bei 10µgBSP/Flasche auf 1ml/10ml Nährmedium. Diesen Zellen stand, im Vergleich zu den Kontrollzellen, bis zu 10% weniger Nährmedium zur Verfügung. Da jedoch die Inkubationszeit nur 24h umfasste und die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/Flasche ausgesät wurden, schlussfolgerten wir, dass dieser Verlust an Nährmedium in diesem kurzen Zeitraum keinen gravierenden Einfluss auf die Vitalität der Zellen haben sollte. Unser erstes Ziel galt der Exploration einer aussagekräftigen Proteinkonzentration, bei welcher es, von BSP induziert, zu einer Induktion, oder Repression der Genexprimierung der drei untersuchten Gene, TGF-β, Osteopontin und Osteonectin kommt.

So wurden im ersten Ansatz die diesbezüglichen RNA-Level der Osteoblasten und Stromazellen eines Patienten, bei Proteinkonzentrationen von 1µg und 3µg BSP/10ml Nährmedium/Flasche untersucht, siehe 3.2.2.1. Insgesamt zeigen

die Ergebnisse des 1. Vorversuchs ein kontroverses Genexpressionsverhalten der Osteoblasten und Stromazellen eines Patienten. Ein möglicher Grund könnte in der unterschiedlichen Herkunft der Zellen liegen. Denkbar wäre, dass sich die Stromazellen in ihrem Expressionsmuster eher wie Knochenmarkzellen verhalten (siehe hierzu 4.1.1) und das unterschiedliche Verhalten zweier Zellpopulationen hier widergespiegelt wird. Zu beachten ist jedoch, dass, obgleich die Zellen von einem Patienten gewonnen wurden, zwei verschiedene Zellpassagen vorliegen. Der 2. Vorversuch wurde durchgeführt um bei gleichen Proteinkonzentrationen eine höhere Vergleichbarkeit im Genexpressionsmuster der Osteoblasten erzielen zu können. Da im Rahmen der Vorversuche keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden konnten -und um bei der Inkubation der Zellen mit dem Protein, sicher ausreichend hohe Proteinnengen zu gewährleisten- wurden für die Hauptversuche zwei relativ hohe Proteinkonzentrationen, 3µg Protein/Flasche und 10µg Protein/Flasche, eingesetzt und beide rekombinanten Bone Sialoprotein diesbezüglich untersucht. Im Serum ist BSP an den Komplement Faktor H gebunden. Zur Messung der BSP Konzentration wurde empfohlen diese Bindung zu trennen (Fedarko et al. 2000) um dadurch den Gesamt-BSP Spiegel erfassen zu können. Nach dieser Trennung wurden Serum-Spiegel für BSP im Bereich von 285 +/- 19 ng/ml ermittelt (Fedarko et al. 2001). Wie hoch die BSP-Konzentrationen im Knochengewebe sind, ist in der Literatur bisher nicht beschrieben und es bleibt fraglich, inwieweit die Serum BSP-Konzentrationen auf den Knochen übertragbar sind. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Stromazellen deuten die Ergebnisse der Osteoblasten in 3.2.2.1 bei höheren BSP-Proteinkonzentrationen eher auf eine Hemmung der Genexpression von TGF-β hin, wobei sich dieser Trend im Rahmen der Hauptversuche (3.2.3.1-3.2.3.2) weder für BSP, noch für das DRJ-Protein bestätigen ließ. Eher gegenteilig scheint nun für die Stromazellen bei 10µg BSP/Flasche ein sehr leichter Trend zur gesteigerten Expression beobachtbar zu sein, jedoch ohne signifikantes Ergebnis. Für das Gen Osteopontin ist ebenfalls ein leichter nicht-signifikanter Trend Richtung Induktion mittels BSP als auch DRJ für die humanen Osteoblasten in 3.2.2.1 und 3.2.3.1 erkennbar. Aufgrund der geringen Expressionsraten dieser Gene

könnten diese Ergebnisse aber täuschen. Bei Betrachtung der Primärdaten (7.1.1-7.1.3) wird deutlich, dass sich die Osteoblasten der verschiedenen Patienten im Transkriptionsverhalten widersprüchlich zueinander verhalten. Es kann hier weder eindeutig von einer Stimulation, noch einer Hemmung auf Genebene gesprochen werden. Interessant ist, dass die Osteoblasten des Patienten O-HRL/2 sowohl in der 3. Zellpassage in 3.2.2.1 (7.1.1), als auch in der 6. Zellpassage in 3.2.3.1 (7.1.3), bei höheren BSP-Konzentrationen ein gesteigertes Genexpressionsverhalten für Osteopontin und Osteonectin zeigen, was, wenn auch nicht statistisch überprüft, für den Aspekt einer BSP induzierten Genexpression auch noch in höheren Zellpassagen- und gegen ein herabgesetztes Genexprimierungs-verhaltens in höheren Zellpassagen spricht. Bei höheren BSP Proteinkonzentrationen (3µgBSP/Flasche) ist für das Gen Osteonectin der Stromazellen eine leicht gesteigerte Expression in 3.2.2.1 und 3.2.3.2 sichtbar, jedoch ohne signifikantes Ergebnis. Bei den eingesetzten Proteinkonzentrationen war für die untersuchten Osteoblasten, weder in den Vorversuchen, noch im Rahmen der Hauptversuche, ein signifikantes Ergebnis erruierbar und die Expression von Osteonectin sowohl bei einer BSP-, als auch DRJ-Inkubation relativ stabil. Dieses Ergebnis weist Ähnlichkeiten zu Forschungsergebnissen auf, bei denen -in Abwesenheit von BSP- fötale humane Osteoblasten, welche auf einem Lactid und Glycolid-beschichteten 3-D Gerüst in vitro inkubiert wurden, nach 3 Wochen eine stabile Osteonectin Expression aufwiesen, wohingegen die Expression für Osteopontin nach einer 2-wöchigen Inkubation abnahm (Ge et al. 2008).

Dass mit rekombinantem BSP beschichtete Oberflächen einen leichten Einfluss auf die Exprimierung von Osteonectin und TGF-β haben können, wurde zwar nicht direkt mittels PCR-Untersuchungen, jedoch auf histochemischer Ebene, mittels Antikörper-Bindung gezeigt (Graf et al. 2008). Bei diesen Untersuchungen wurde, unabhängig von unserem Labor, die gleiche Arbeitskonzentration von (10µg BSP/ml PBS) verwendet. Die zu untersuchenden Titan- und Ticer ® Oberflächen wurden lediglich 2h mit 300µl der Proteinlösungen beschichtet, selbige anschließend wieder entfernt, die Oberflächen bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen 12h getrocknet und erst an-

schließlich mit humanen Osteoblasten inkubiert. Die Expression von Osteonectin und TGF- β wurde nach 3,5 und 7 Tagen untersucht. Zellen wurden hier in der ersten Zellpassage untersucht. Für Osteonectin war erst am 3.Tag eine AK-Bindung nachweisbar, wobei BSP-beschichtete und unbeschichtete Oberflächen ähnliche Ergebnisse lieferten. Für TGF- β konnten auf BSP-vorbeschichteten Oberflächen erhöhte AK-Bindungswerte ermittelt werden, jedoch ohne signifikantes Ergebnis.

Bei Untersuchungen zur Zelladhäsion zeigen BSP-beschichtete Titan und Ticer® Oberflächen, im Vergleich zu Kontrolloberflächen, binnen der ersten 7 Tage, zwar eine erhöhte Anzahl adhärenter Osteoblasten, jedoch ohne signifikantes Ergebnis. Am 3. Tag der BSP Beschichteten Ticer® Oberflächen ließen sich keine erhöhten Zellbindungswerte ermitteln, was die Überlegenheit von BSP-beschichteten Oberflächen doch in Frage stellt.

In diesen Versuchen wurden die Osteoblasten lediglich von zwei Spendern gewonnen und es stellt sich die Frage, inwieweit diese Ergebnisse verallgemeinert werden sollten, da auch in unseren Versuchen, mittels RT-PCR, wenn gleich auch nur ein Messwert/eingesetzter BSP Konzentration/Proband erfasst wurde, sowie aber auch im Rahmen der MTT und BrdU Versuche, unter den verschiedenen Probanden starke Schwankungen bemerkbar waren. Da hier erst nach 3 Tagen eine Osteonectin Induktion nachweisbar war, stellt sich für uns die Frage, ob in unserem Versuchsansatz eine 24h-Inkubation zu kurz war, auch stellt sich die Frage, ob eine sehr frühe Zellpassage doch einen aussagekräftigeren Effekt hätte erzielen können.

Eine andere Überlegung wäre, dass Osteoblasten, welche ja selbst im Zuge der Differenzierung und Wundheilung BSP produzieren, bei einer Zugabe von BSP bereits abgesättigt sind und folglich das BSP keine zusätzliche Wirkung mehr ausüben kann. Gegen diese Überlegung sprechen aktuellste Forschungsergebnisse, in welchen gezeigt werden konnte, dass primäre Osteoblasten der Ratte, welche täglich mit rekombinantem eukaryotisch hergestelltem BSP inkubiert worden waren, nach 3 und 5, nicht jedoch nach 10 Tagen, mittels RT-PCR nachweisbar signifikant erhöhte Expressionslevel für die Knochen-

assoziierten Transkriptionsfaktoren Runx2 und Osx aufweisen (Gordon et al. 2007). Auch stellt sich die Frage ob die untersuchten rekombinanten Bone Sialoproteine überhaupt funktionsfähig sind. Wie in 1.2 beschrieben, spielen die posttranslationalen Modifikationen für die multiplen Funktionen des Moleküls (siehe 1.5), eine entscheidende Rolle. Ausgehend von dieser Annahme würde man erwarten, dass das in Eukaryoten hergestellte BSP sich in seiner Wirkung deutlich von prokaryotisch hergestelltem DRJ Protein, welchem posttranslationale Modifizierungen fehlen und welches aus diesem Grund auch kleiner ist (siehe 2.1.6.1 und 2.1.6.2), unterscheiden würde. Wie in den Versuchen ersichtlich, sind aber keine deutlichen Unterschiede zwischen den Proteinen erkennbar. Möglich auch, dass die posttranslationalen Modifikationen auf die Aktivität nur einen geringen Einfluss nehmen, oder aber sich das rekombinante His-Myc-EK-BSP Protein der Versuche von Graf HL et al. 2008, mittels welchem sich nach mehreren Tagen Inkubation eine gesteigerte Expressionen von Osteonectin und TGF- β nachweisen ließ, im Vergleich zu dem von uns untersuchten BSP der Firma Immunodiagnostik, in dafür wichtigen posttranslationalen Modifikationen unterschied.

Für eine höhere Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse wäre in zukünftigen Untersuchungen sinnvoll, die Zellen in einer möglichst niedrigen und gleichen Zellpassage zu untersuchen. So könnte sicherer gewährleistet werden, dass die Zellen noch ausreichend vital sind. Zur Vermeidung von falsch-negativen Ergebnissen wäre ein Ansatz denkbar, in dem die Arbeitskonzentration der Lösung des untersuchten Proteins höher konzentriert ist, so dass die mit Proteinlösung inkubierten Zellen ähnlich viel Nährmedium erhalten könnten, wie Kontrollzellen und die Ergebnisse dadurch authentischer würden.

4.1.3 MTT- und BrdU-Test

4.1.3.1 Zellproliferation, Zellviabilität

Wie in 2.2.2.2 und 2.2.2.3 beschrieben, erfolgte die Bestimmung der Zellproliferation und Viabilität der untersuchten Zelllinien mittels des MTT und

BrdU-Assays, wobei wir die Fragestellung verfolgten, ob durch eine vorausgehende Beschichtung der 96 Wells, als auch eine direkte Inkubation mit den zwei rekombinanten Bone Sialoproteinen auf mitochondrialer und/oder DNA-Ebene eine Veränderung der Zellen im Proliferationsverhalten erkennbar würde.

4.1.3.2 Auswertung Vorversuche MTT

Bei der Etablierung der Methode galt es zunächst eine geeignete Zellkonzentration, sowohl für die Untersuchung der humanen Osteoblasten, als auch Stromazellen und Knochenmarkzellen vom Schwein zu finden. Die Arbeit von J. Schaumburger (Tübingen, 2000) diente uns dabei als Grundlage, so wählten wir im Rahmen der Vorversuche Zellkonzentrationen von 3×10^3 , 5×10^3 und 1×10^4 Zellen/96 Well, wobei die Zellkonzentration 1×10^4 bei Schaumburger für Spongiosazellen zum Einsatz kam und er in seinen Untersuchungen damit signifikante Ergebnisse erzielen konnte. Da im Rahmen des ersten Vorversuches (siehe 3.3.1.1) für die Zellkonzentration von 3×10^3 Zellen/96 Well im Vergleich zu der höher eingesetzten Zellkonzentration von 1×10^4 Zellen/96 Well etwas niedrigere Extinktionswerte ermittelt worden waren und der MTT-Test zwar Rückschlüsse auf die Zellzahl und Stoffwechselaktivität der Zellen erlaubt, nicht jedoch unterschieden werden kann, ob es sich im Test um wenig sehr aktive, oder aber viele, jedoch weniger aktive Zellen handelt (Mosmann 1983), wir jedoch nach mikroskopischer Kontrolle den Eindruck hatten, dass zu wenige Zellen/Well adhärent geworden waren und dementsprechend ein geringeres Proliferationsverhalten detektierbar war, entschieden wir uns in den folgenden Vorversuchen höhere Zellkonzentrationen von 5×10^3 einzusetzen. Um den Bereich einer Sättigung zu meiden wurden keine noch höheren Zellkonzentrationen eingesetzt. Für die Stromazellen wurden in den Vorversuchen höhere Extinktionswerte und wesentlich geringere Fehlerbalken ermittelt als für die Osteoblasten. Nun ist, wie oben angesprochen, nicht eindeutig, ob dies auf eine erhöhte mitochondriale Aktivität dieser Zellen, oder aber, basierend auf einem erhöhten Proliferationsverhalten der Zellen, auf eine erhöhte Zellzahl zurück zu

führen ist. Sicher ist aber, dass diese erhöhten Extinktionswerte sowohl in den Vorversuchen, als auch in den Hauptversuchen für BSP, weniger aber für das untersuchte DRJ-Protein, reproduzierbar sind, was unsere Vermutung, dass diese Zellen Knochenmarkzellen- welche u. a. durch ihre hohen Proliferationsraten charakterisiert werden- ähnlich sind, untermauert. Auf die Untersuchung einer möglichen Signifikanz, zwischen dem Proliferationsverhalten der Osteoblasten und Stromazellen, wurde an dieser Stelle verzichtet, da dies nicht primär unsere Fragestellung war. Die geringere Abweichung der Messergebnisse der Stromazellen der Vorversuche steht sicherlich auch in Zusammenhang mit der Anzahl der untersuchten Probanden, da sich diese Vorversuchs-Ergebnisse auf die 3-fach-Bestimmung der Zellen jeweils nur eines Patienten bezogen und in den Hauptversuchen beim Vergleich von 3-4 Patienten größere Fehlerbalken ermittelt wurden, wobei diese immer noch geringer waren, als vergleichbare Ergebnisse humaner Osteoblasten.

An den Messergebnissen der ersten zwei Vorversuche wird deutlich, dass die BSP-Beschichtungsmethode über Nacht keinen Effekt zeigt. Denkbar wäre, dass die Polystyrol-Oberfläche der 96 Well Platten eine ungeeignete Binde- fläche für das BSP Molekül darstellt. Da die flat-bottom 96 Well Platten jedoch für kolorimetrische Messungen bei Enzym-Assays empfohlen werden und die Haftungseigenschaften des BSP in den Wells oder Flaschen (siehe auch 4.1.2.1) nicht Ziel dieser Arbeit waren, sondern wir eine mögliche Veränderung der Stoffwechselaktivität der Zellen in Kombination mit BSP untersuchen wollten, entschieden wir uns nach Verifikation der BSP-Lösung (siehe 3.6), das Protein, wie in 3.3.1.3 beschrieben direkt mit den Zellen zu inkubieren.

Ein Unterpunkt dieser Doktorarbeit stellte die Untersuchung des Proliferations- verhaltens tierischer Osteoblasten und Knochenmarkzellen vom Schwein, bei einer Inkubation mit BSP dar, wobei aufgrund einer geringeren Liefermenge des DRJ-Proteins, in den MTT-Versuchen für die tierischen Zelllinien nur das BSP-Protein zum Einsatz kam. Die negativen Messergebnisse in 3.3.1.2 lassen sich auf unsere oben aufgeführten Erkenntnisse aus der Beobachtung der Zellkultur zurück führen. Nach 3-wöchiger Inkubation der Knochenmarkzellen mit Osteoblasten- Differenzierungsmedium zeigten die Zellen nur noch geringe

Teilungsraten und mikroskopisch ließen sich im 96 Well nur wenige adhärenente Zellen beobachten. Wir schlussfolgerten aus diesem Ergebnis und den Beobachtungen der Zellkultur, die differenzierten Osteoblasten vom Schwein zu einem früheren Zeitpunkt in Bezug auf Ihr Proliferationsverhalten zu untersuchen, so konnten in den Hauptversuchen (3.3.2.3) aussagekräftige Extinktionen erzielt werden und die mikroskopische Kontrolle zeigte wesentlich mehr adhärenente Zellen. Das rege Proliferationsverhalten der tierischen Knochenmarkzellen spiegelt sich bereits in 3.3.1.2 wieder und die gemessenen Extinktionen liegen weit über den Messergebnissen der humanen Osteoblasten- und Stromazellen. Obwohl sich in 3.3.1.2 die Zellen bereits in der 6. Passage befanden, zeigten die Zellen, vergleichbar mit 3.1.2, Abb.6 a) und c), ein ebenso reges, wie homogenes Wachstumsverhalten.

Die Abb.15 und 16 in 3.3.1.4 des 4. Vorversuches veranschaulichen, dass die Osteoblasten der verschiedenen Patienten- obgleich in der gleichen Zellpassage- unterschiedlich aktiv sind und bei Vergleich der zwei Zellkonzentrationen zeigt sich in Bezug zum 3. Vorversuch eine gewisse Kontinuität der Messergebnisse, wobei bei der niedrigeren Zellkonzentration in 3.3.1.3 deutlichere Messwertdifferenzen in Bezug auf die BSP Inkubation erfassbar sind und dementsprechend entschieden wir uns die Zellkonzentration von 5×10^3 Zellen/96 Well für die Hauptversuche zu verwenden- und gegen die Zellkonzentration von J. Schaumburger (Tübingen, 2000).

Nachdem wir uns auf die Zellkonzentration festgelegt hatten galt unser Fokus erneut den eingesetzten BSP Konzentrationen. Wie in 3.3.1.5, Abb.17 und 18 ersichtlich, konnte bei den eingesetzten Proteinkonzentrationen, außer feinen individuellen Unterschieden der Patienten, kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden. Weder Anzeichen einer Repression, noch Induktion der Zellaktivität ließen sich bei eingesetzten Proteinkonzentrationen von 120ng BSP/96 Well verzeichnen.

Um einen weiten Bereich von BSP Konzentrationen abdecken zu können, entschieden wir uns in den Hauptversuchen 3 Größenordnungen umspannende Proteinkonzentrationen einzusetzen (Pipettierschema siehe 2.2.2.2), wobei dies den Nachteil hatte, dass bei unserer Arbeitskonzentration von 10µg BSP/ml,

und der höchsten eingesetzten BSP Konzentration von 1µg BSP/96 Well, die eingesetzte Proteinlösung 100µl entsprach und bei einer Absolutmenge von 200µl Nährmedium, selbiges um 50% verdünnt wurde, den Zellen also 50% weniger Nährstoffe zur Verfügung standen.

4.1.3.3 Auswertung Hauptversuche MTT

Neben den Hauptversuchen 3.3.2.5, 3.3.2.6, 3.3.2.9 und 3.3.2.10, in welchen eine Langzeitinkubation von 24h, 48h, 72h und 96h mit den zu untersuchenden Bone Sialoproteinen durchgeführt wurde, erfolgte für die weiteren Hauptversuche eine 24h Protein-Inkubation. Sowohl das BSP-, als auch DRJ-Protein kamen zum Einsatz. Aus den Abb.19-22 geht bereits hervor, dass weder für die Zelllinie der humanen Osteoblasten und Stromazellen, noch für die Knochenmarkzellen und daraus differenzierten Osteoblasten vom Schwein, bei einer 24h-Inkubation mit BSP, signifikante Veränderungen im Proliferationsverhalten auf mitochondrialer Ebene erkennbar sind. Im Gegensatz dazu sind für die humanen Osteoblasten und Stromazellen bei einer DRJ-Protein Inkubation für 24h, bei hohen Proteinkonzentrationen, signifikante Ergebnisse, in Bezug auf verminderte Extinktionswerte im MTT-Assay nachweisbar (siehe 3.3.2.7 und 3.3.2.8, Abb.25 und 26). Hier wird ein Unterschied zwischen den zwei untersuchten Proteinen deutlich. Dieses Ergebnis wird auch im Vergleich von 3.3.2.9 zu 3.3.2.5 bestätigt.

In 3.3.2.3 zeigen die untersuchten tierischen Osteoblasten, in Bezug auf die Höhe der gemessenen Extinktionen, ein ähnliches Zellaktivitätsverhalten, wie humane Osteoblasten, wobei insgesamt eine relativ niedrige Zellaktivität auffällt. In 3.3.2.4 hingegen kommt das hohe Zellproliferationsverhalten der tierischen Knochenmarkzellen zum vorschein, welche wesentlich höhere Extinktionswerte aufweisen, als daraus differenzierte Osteoblasten. Diese Ergebnisse gehen konform mit der Annahme, dass Knochenmarkzellen, im Gegensatz zu Osteoblasten, sehr stark proliferierende Zellen sind.

Insgesamt sind zwischen und innerhalb der humanen und tierischen Zelllinien Unterschiede in der Stärke des Proliferationsverhaltens bemerkbar, jedoch wie

es scheint, BSP-unabhängig. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen der Vorversuche überein und so weisen Stromazellen höhere Extinktionswerte auf, als vergleichbare humane Osteoblasten, wobei aufgrund des MTT-Test-Designs unklar bleibt, ob dies auf eine höhere Zellzahl, oder aber eine weniger hohe Zellzahl mit stark erhöhter mitochondrialer Aktivität, oder aber auf eine ähnliche Zellzahl mit erhöhter Stoffwechselaktivität zurück zu führen ist. Auch apoptotische Aspekte könnten hier eine Rolle spielen.

Da bei der Ablösung der Zellen von Ihrer Unterfläche, Apoptose induziert werden kann, ein Prozess der auch als Anoikis bezeichnet wird (Degterev und Yuan 2008), wäre auch denkbar, dass bedingt durch einen Mangel an Nährstoffen –wie zuvor bereits diskutiert- eine verstärkte Ablösung der Zellen, mit sich anschließendem apoptotischen Signaling die Folge sein könnte. So könnte man hier falsch positive Rückschlüsse auf eine BSP, oder auch DRJ-Protein vermittelte Repression des Proliferationsverhaltens auf mitochondrialer Ebene ziehen.

Da bei einer 24h BSP-Inkubation keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden konnten erschien uns eine Langzeitinkubation bis zu 96h mit BSP als interessanter Ansatzpunkt. Hoch signifikante Ergebnisse konnten bei einer 48h BSP Inkubation bei sehr hohen Protein-Konzentrationen (Absolutkonzentration $1\mu\text{g}$ BSP/96 Well, siehe Pipettierschema 2.2.2.2), im Vergleich zu leicht signifikanten Ergebnissen nach 24h und 48h bei einer DRJ-Protein-Inkubation, bei der Untersuchung der humanen Osteoblasten von 3 Patienten, ermittelt werden, siehe hierzu 3.3.2.5 und 3.3.2.9, Abb.23, sowie Abb.23 und 27. Deutlich wird hier gezeigt, dass in Bezug auf eine Abnahme der Extinktionen für beide untersuchten Proteine, bei einer Langzeitinkubation über mehrere Tage, hoch signifikante Ergebnisse nachweisbar sind. Hierbei beträgt der Mittelwert der Extinktionen bezüglich der Kontrolle und damit der Gehalt an MTT bei der höchst eingesetzten Proteinkonzentration 68,49% vom Grundwert und ist damit 31,51% geringer, als der Grundwert.

Nun ist, wie bereits in den Vorversuchen angesprochen, bei diesen Ergebnissen zu beachten, dass eingesetzte Proteinkonzentration von $c[1,00\text{E}-06\text{g}$ Protein/200 μl Medium] bei einer Verdünnung des Mediums mit einem 50%

Verlust an Nährmedium einhergehen und schlussfolgernd könnte man sagen, dass bei den unterschiedlich eingesetzten Proteinkonzentrationen die Zellen somit nicht mehr über gleiche Nährstoffmengen verfügen und Kontrollzellen somit einen deutlichen Vorteil hätten. Nun könnte erwartet werden, dass dieses Ergebnis nach 96h am deutlichsten ausfallen würde, dem ist jedoch nicht so und hoch signifikante Ergebnisse werden bereits nach 24h-48h Inkubationszeit ermittelt, ein Ergebnis welches in Zusammenhang mit einer verstärkten Proliferation binnen der ersten 72h stehen könnte. Wie in 2.2.2.2 beschrieben spielte diese unterschiedliche Menge an Nährmedium bei der Messung selbst jedoch keine Rolle, da die einzelnen Proben zu Beginn der eigentlichen Versuchsdurchführung, nach der Inkubation mit dem Protein, vorsichtig abpipetiert und alle Wells mit gleichen Mengen an Medium, MTT und Solubilisationsmittel behandelt wurden. Durch das zusätzliche Pipettieren eines Blanks welcher keine Zellen, jedoch alle Reagenzien des Versuches in gleichen Mengen, wie in den Wells enthielt und beim Messen der Extinktion bei 550nm von der Extinktion der Proben subtrahiert wurde, konnten unerwünschte, störende Absorptionen durch Medium, MTT und Solubilisationsmittel herausgefiltert und gezielt die MTT Extinktion der Zellen ermittelt werden.

Die Ergebnisse der BSP und DRJ-Protein Langzeitinkubations-Versuche der humanen Stromazellen sind, obgleich ihrer Signifikanz, weniger aussagekräftig, als vergleichbare Untersuchungen an humanen Osteoblasten, da zwar eine 3-fach-Bestimmung der Proben erfolgte, jedoch nur die Stromazellen eines Patienten untersucht wurden und Schwankungen zwischen verschiedenen Probanden als wahrscheinlich zu betrachten sind (siehe hierzu 3.3.2.6 und 3.3.2.10). Ob die signifikanten Ergebnisse verminderter Extinktionswerte, sowohl bei einer 24h DRJ Inkubation humaner Osteoblasten und Stromazellen, als auch die hoch signifikanten Ergebnisse der Langzeit-Inkubationsversuche von bis zu 96h mittels MTT-Assay auf einen Mangel an Nährstoffen und auf apoptotische Prozesse zurückzuführen sind, gilt es in zukünftigen Versuchen zu erforschen. So könnte der gleiche Versuchsaufbau, jedoch mit einer höheren Proteinkonzentration als Arbeitslösung zum Vergleich erneut durchgeführt

werden und dadurch eine mögliche Repression der Proliferation, vermittelt durch die zwei untersuchten rekombinanten Proteine, weiter geklärt werden.

4.1.3.4 Auswertung Vorversuche BrdU

Zur genaueren Bestimmung des Proliferationsverhaltens der Zellen wurde der BrdU-Assay angewandt. Über die Messung des DNA-Gehaltes der verschiedenen Versuchsansätze, konnten Angaben zur Quantität der zu untersuchenden Zellen gemacht werden. Durch diese Möglichkeit stellte dieser Test bei unserer Fragestellung eine deutliche Bereicherung zum MTT-Assay dar. Zur Etablierung der Methode galt es zunächst eine geeignete BrdU-Inkorporationszeit für die Zelllinien humaner Osteoblasten- und Stromazellen zu finden, wobei eine Spanne zwischen 2-24h vom Hersteller Roche empfohlen wurde und in den Untersuchungen von Magaud et al. bereits nach 10 Minuten Inkubation mit dem BrdU-Reagenz, der Einbau in die DNA nachweisbar war.

Auch orientierten wir uns an der Arbeit von J. Schaumburger (Tübingen, 2000), bei dessen Untersuchungen an Apophysenzellen eine 18-stündige Inkubationszeit, sowie eine Zellkonzentration von 1×10^3 Zellen/Well zum Einsatz kamen. Der Abb.29, in 3.4.1.1 ist zu entnehmen, dass bei niedrigen Zellkonzentrationen von 1×10^3 Zellen/Well zum einen kein deutlicher Unterschied im Proliferationsverhalten der humanen Osteoblasten verschiedener Patienten erkennbar ist, als auch, dass sich die Zellaktivität nicht deutlich vom Background abhebt. Bei dieser niedrigen Zellkonzentration wären, anhand der untersuchten humanen Osteoblasten, keine aussagekräftigen Ergebnisse erruierbar. Auch deutet sich bei einer Zellkonzentration von 1×10^4 Zellen/Well und einer BrdU-Inkorporationszeit zwischen 18-23h ein Sättigungsbereich an, daher entschieden wir uns zum einen für eine 13-15 stündige BrdU-Inkubationszeit und um der optimalen Zellkonzentration möglichst nahe zu sein, im Rahmen der Vorversuche, für die Untersuchung von zwei verschiedenen Zellkonzentrationen von 5×10^3 und 1×10^4 Zellen/Well. So konnte sich die aussagekräftigste Zellkonzentration für die Hauptversuche feststellen lassen. Bei einer 24h Inkubation von 20ng BSP/Well lassen sich für humane Osteoblasten und Stromazellen bei

einer Zellkonzentration von 1×10^4 Zellen/Well eines Patienten hoch signifikante Extinktionsabnahmen ermitteln, siehe Abb.31, 3.4.1.2. Bei einer Inkubation von 60ng BSP/Well in Abb.31 lassen sich, im Vergleich zur Kontrolle, ebenfalls geringere Extinktionswerte ermitteln, jedoch ohne signifikantes Ergebnis. Lediglich das Proliferationsverhalten der humanen Stromazellen bei 60ng BSP/Well und einer Zellkonzentration von 5×10^3 Zellen/Well in Abb.30 ist hierzu widersprüchlich. Anschaulich ist diesen beiden Abbildungen zu entnehmen, dass bei den unterschiedlich eingesetzten Zellkonzentrationen, auch unterschiedlich starke Proliferationsraten im BrdU-Assay detektierbar sind und höhere Zellkonzentrationen auch höhere Proliferationsraten aufweisen. Diese Ergebnisse lassen Parallelen zu den Untersuchungen des Proliferationsverhaltens im MTT erkennen. Ob diese Hemmung lediglich auf das rekombinante BSP, oder auch das Knochen-extrahierte BSP zutrifft, bleibt zu klären. Mit dem Ziel die Ergebnisse dieser signifikanten Hemmung zu verifizieren, wurden Osteoblasten von zwei weiteren Patienten, bei identischen Zellkonzentrationen und Inkubationsmethoden wie im 2. Vorversuch, in einem 3. Vorversuch untersucht.

Aus den Messwerten und den Abb.32 und 33 in 3.4.1.3 geht jedoch hervor, dass sich diese signifikante Hemmung nicht bestätigen ließ. Betrachtet man in Abb.32, bei eingesetzten Proteinkonzentration von 60ng BSP/Well des Patienten O-LBI/8 und 20ng BSP/Well des Patienten O-POF/9, sowie in Abb.33, die Mittelwerte der Extinktionen, scheint eine leichte Hemmung des Proliferationsverhaltens bemerkbar zu sein, wobei die Standardabweichung zu hoch für ein signifikantes Ergebnis ist. Zu bedenken ist an dieser Stelle, dass sich die Osteoblasten dieses 3. Vorversuches in höheren Zellpassagen (5./7.Passage), als die Osteoblasten aus 3.4.1.2 befanden (4.Passage). Denkbar wäre, wie bereits angesprochen, dass aussagekräftige Ergebnisse lediglich in niedrigeren Zellpassagen erzielt werden können. Mittelt man die Ergebnisse der humanen Osteoblasten des 2. und 3. Vorversuches, wie in Abb.34 dargestellt, so erkennt man, dass nun lediglich bei der höher eingesetzten Zellkonzentration Unterschiede im Extinktionsverhalten erkennbar sind, wobei auch hier die hohen Standardabweichungen ein aussagekräftiges

Ergebnis verhindern. Bei der Betrachtung der Primärdaten wird eines der Kernprobleme deutlich. Die Differenz zwischen den Messwerten der Osteoblasten eines Patienten erscheint recht hoch. Ein technischer Fehler ließ sich nach Prüfung des Gerätes weitestgehend ausschließen. Pipetierfehler stellen eine weitere Möglichkeit verfälschter Messwerte dar, sowie auch die Frage, ob die langsam wachsenden, empfindlichen Osteoblasten geeignete Zellen für diesen Assay darstellen (siehe hierzu 4.1.1). Da wir jedoch das Proliferationsverhalten dieser Zellen, in Kombination mit einer BSP-Inkubation, näher bestimmen wollten, entschieden wir uns die Hauptversuche, wie geplant, mit humanen Osteoblasten und Stromazellen durchzuführen.

In 3.4.1.4, Abb.35, wurde erneut die Zellkonzentration von 5×10^3 humanen Osteoblasten/Well von 3 Patienten untersucht und für die eingesetzten Konzentrationen von 20 und 60ng BSP/Well der Patienten O-SLJ/10 und O-SEP/4 ließen sich signifikante Minderungen der Extinktionen mittels des BrdU-Assays ermitteln. Eine Hemmung der Proliferation, bedingt durch einen Mangel an Nährstoffen, im Vergleich zu Kontrollzellen, kann hier weitgehend ausgeschlossen werden, da bei den betreffenden Zellen über einen Zeitraum von 24h lediglich eine Nährstoffminderung von bis zu 3% bestand.

In Abb.36 wird nun ein weiteres Mal deutlich, wie sehr sich die Osteoblasten der unterschiedlichen Patienten in der Höhe ihrer Proliferations-Level unterscheiden, denn bei der Mittelung der gemessenen Extinktionen sind zwar noch geminderte Extinktionswerte erkennbar, jedoch ohne signifikantes Ergebnis. Da die Fragestellung dieser Arbeit der Untersuchung einer möglichen Änderung im Proliferationsverhalten der Zellen, bei einer BSP Inkubation galt, fokussierten wir uns, nach Eruiierung einer aussagekräftigen Zellkonzentration, auf die Untersuchung eben jenen Effektes. In 3.4.1.4 kam eine Verdoppelung der BSP-Höchstdosis von 3.4.1.3 zum Einsatz, jedoch ohne signifikantes Ergebnis. Da lediglich bei Absolutkonzentrationen von 20ng BSP/Well und einer Zellkonzentration von 1×10^4 Zellen/Well an humanen Osteoblasten und Stromazellen, als auch bei Absolutkonzentrationen von 20 und 60ng BSP/Well und einer Zellkonzentration von 5×10^3 Zellen/Well an humanen Osteoblasten signifikante Ergebnisse ermittelt werden konnten (siehe Abb.31 und 35), diese

Ergebnisse bei Mittelung der Ergebnisse der unterschiedlichen Patienten jedoch nicht mehr reproduzierbar waren, entschieden wir uns wie in 3.3.2 die Hauptversuche mit weit umfassenden Proteinkonzentrationen über drei Größenordnungen durchzuführen, um relativ sicher einen potentiellen Wirkungsbereich der zwei untersuchten Proteine abzudecken.

4.1.4.2 Auswertung Hauptversuche BrdU

Wie in den Vorversuchen beobachtet, ließen sich im Rahmen der Hauptversuche, bei der Mittelung der Messwerte der untersuchten humanen Osteoblasten und Stromazellen verschiedener Patienten, keine signifikanten Ergebnisse erzielen und bei Betrachtung der Primärdaten wird deutlich, dass die gemessenen Extinktionen zwar für die Zellen eines Patienten relativ stabil sind, jedoch zwischen den Patienten stark divergieren. Besonders anschaulich wird dies an den Primärdaten der untersuchten Stromazellen bei einer BSP (Abb.38) und DRJ (Abb.40) Inkubation. Bei Betrachtung der Balkendiagramme könnte man den Eindruck bekommen, dass diese Zellen im Vergleich zu humanen Osteoblasten (Abb.37 und 39), entgegen den bisherigen Beobachtungen, relativ schwach proliferierende Zellen sind. Die Primärdaten entschlüsseln jedoch, dass für die untersuchten Zellen von Patient STR-SRI/5 über 10-fach höhere Extinktionswerte, als für Zellen des Patienten STR-HRL/2 ermittelt wurden. Da sich die Zellpassagen der verschiedenen Zellen nur unwesentlich unterschieden, konnte dies als Fehlerquelle weitgehend ausgeschlossen werden und da in anderen Untersuchungen die Anwendung eines BrdU-Assays an humanen Osteoblasten und stromalen Knochenmarkzellen erfolgreich durchgeführt worden war, verlor die Frage nach einer anderen Zellpopulation an Gewicht (Fuchs et al. 2007). Zur Vermeidung eventueller Veränderungen der Zellen in ihrer Zell-Viabilität, ihrem Proliferations- und Adhäsionsverhalten in höheren Passagen, sollten zukünftige Versuche möglichst in einer frühen und vergleichbaren Zellpassage durchgeführt werden.

4.1.5 Histochemische Färbungen

4.1.5.1 AP- und von Kossa- Färbung

Das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gilt als ein früher Osteoblasten Differenzierungs-Marker, erreicht ein Aktivitäts-Maximum am 10.-12. Tag der Knochenneubildung und ist vor einer Osteopontin Expression und Kalzifizierung nachweisbar. Anhand fötaler Osteoblasten der Ratte konnte gezeigt werden, dass kurz nach der Proliferationsphase der Zellen eine erhöhte AP-Aktivität nachweisbar ist, gefolgt von einer Osteopontin und Osteocalzin Expression zum Zeitpunkt der frühen Knochenmineralisierung. Erhöhte Expressionslevel für AP wurden auch bei einer Hemmung des Proliferationsverhaltens der Zellen beobachtet und die These, dass die Sekretion von Extrazellulärer Matrix sowohl zur Hemmung im Proliferationsverhalten der Zellen, als auch zur Entwicklung des Phänotyps der Osteoblasten beiträgt, wurde formuliert (Stein et al. 1990; Peters 2005). Das Enzym AP spielt eine wichtige Rolle bei der Knochenmineralisierung und Mutationen des Gens führen zu Mineralisierungsstörungen des Knochens und dem Krankheitsbild der Hypophosphatase (Whyte 1994). Da die AP das anorganische Pyrophosphat spaltet, daraus Phosphat frei gesetzt wird, welches mit Kalzium in den Osteoblasten zu Knochenmineral vereint wird, reichert sich bei einem Defekt der AP das anorganische Pyrophosphat im Organismus an, eine weitere Knochenmineralisierung wird gehemmt und über eine damit verbundene Erhöhung der Prostaglandinwerte kann es im Knochen zu entzündlichen Prozessen kommen.

Da osteoinduktive Zellen, im Vergleich zu nicht-osteoinduktiven Zellen, eine erhöhte AP-Aktivität aufweisen (Wlodarski 1991), galt unser Interesse der Untersuchung dieses Enzyms in einer Kombination mit einer BSP Inkubation. In unseren Untersuchungen wurde der qualitative Nachweis des Enzyms durchgeführt. Ein positiver Farbnachweis erlaubt den Rückschluss auf eine erfolgreiche Differenzierung der Osteoblasten.

Die von Kossa Färbung im Well dient dem Kalzifizierungs-Nachweis. Im Gegensatz zur AP wird die Osteokalzin Sekretion mit der Endphase der Pro-

liferation der Zellen und frühen Knochenmineralisierung assoziiert und es konnte an humanen periostalen Zellen, welche zu Osteoblasten differenziert wurden gezeigt werden, dass die Osteokalzinexpression zeitabhängig zunimmt, wobei nach 6 Wochen Differenzierung die höchsten Expressions- und Sekretionslevel in den Untersuchungen detektierbar waren und ein weiterer Anstieg sich als wahrscheinlich erwies (Park et al. 2007).

Andere aktuelle Ergebnisse zeigen mittels der von Kossa-Färbung, dass Kollagen I gebundenes Bone Sialoprotein in Zellen der Schädelkalotte von Ratten nach 4-7 Tagen eine erhöhte Knochenmineralisierung induziert (Xu et al. 2007).

4.1.5.2 Auswertung AP-Färbung

Wir konnten in unseren Untersuchungen bestätigen, dass humane Osteoblasten AP in Ihrer Membran exprimieren und wir konnten auch zeigen, dass humane Stromazellen (siehe Abb.42 d-f) und Osteoblasten vom Schwein das Enzym exprimieren, wobei zwischen den eingesetzten BSP-Konzentrationen im Vergleich zu Kontrollzellen makro- und mikroskopisch kein Unterschied im Färbeverhalten erkennbar war. Da durch Kopplung von BSP an Kollagen nach einer 2-5 tägigen Inkubationszeit an Ratten in vivo eine quantitative Erhöhung der AP-Aktivität, sowie erhöhte Kalzium-Werte nachgewiesen werden konnten (Wang et al. 2006), stellt sich die Frage, ob unsere eingesetzte Färbemethode nicht sensibel genug für eine mögliche mikroskopisch sichtbare Induktion der AP Aktivität durch BSP war, oder aber, ob sich die rekombinanten Bone Sialoproteine vom Knochen-BSP in dafür wichtigen posttranslationalen Modifikationen unterscheiden. Möglich wäre auch, dass diese induzierende Eigenschaft des BSP nur Kollagen-gebunden vermittelt werden kann. Gegen diese Annahmen spricht, dass Osteoblasten der Ratte, welche täglich mit einem eukaryotisch hergestelltem rekombinatem BSP (2µg Protein/ml Medium) inkubiert worden waren, am 3. und 5.Tag, nicht jedoch früher, oder später, eine erhöhte AP-Aktivität aufwiesen, welche jedoch

im Vergleich zu Kontrollzellen zu keinem Zeitpunkt signifikante Ergebnisse aufwies (Gordon et al. 2007).

Entgegen den Ergebnissen anderer Untersuchungen, in welchen gezeigt werden konnte, dass Knochenmarkzellen der Ratte, welche zunächst 3 Wochen auf einer Kollagen-Matrix und anschließend 48h mit Rinder-BSP inkubiert worden waren, eine signifikant erhöhte AP-Aktivität, und Osteokalzinsekretion aufwiesen (Mizuno et al. 2000), konnten wir in Knochenmarkzellen vom Schwein keine AP-Aktivität nachweisen. Auch konnte bei diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass in Knochenmarkzellen, welche mit BSP-Antikörpern inkubiert worden waren, die AP-Aktivität und Osteokalzinsynthese gehemmt wurden und diese Effekte durch die Hinzugabe von Rinder-BSP aufgehoben werden konnten. Da die AP-Aktivität und Osteokalzinsekretion als phänotypische Merkmale der Osteoblasten betrachtet werden, wurde in diesen Untersuchungen der Rückschluss gezogen, dass die 3-wöchige Inkubation der Knochenmarkzellen auf einer Kollagen-Matrix zu einer Differenzierung in Osteoblasten-ähnlichen Zellen geführt hatte. Dieser Rückschluss könnte auch eine mögliche Erklärung für unser negativ-Ergebnis der AP-Aktivität in den Knochenmarkzellen darstellen, welche nicht im Begriff der Differenzierung zu Osteoblasten waren und dementsprechend keinen Osteoblasten typischen Marker, wie AP, exprimierten. Man könnte in diesem Ergebnis einen Hinweis auf den Unterschied dieser Zellen, im Vergleich zu humanen Osteoblasten und Stromazellen sehen und man könnte auch den Rückschluss ziehen, dass die, im Rahmen unserer Untersuchungen durchgeführte, Differenzierung der tierischen Knochenmarkzellen in Osteoblasten erfolgreich war.

4.1.5.3 Auswertung von Kossa-Färbung

Kalzifizierungen im Well konnten wir mittels der von Kossa-Färbung an humanen Osteoblasten und auch Knochenmarkzellen vom Schwein in unseren Untersuchungen nachweisen. Da es sich in unserem Ansatz um einen qualitativen Nachweis handelte, waren keine quantitativen Rückschlüsse möglich. Zellen, welche mit unterschiedlichen Bone Sialoprotein- Konzen-

trationen inkubiert worden waren, zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen bei mikroskopischer Betrachtung keinen Hinweis auf vermehrte oder verminderte Kalzifizierungen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das hier untersuchte rekombinante Bone Sialoprotein, weder zu einer verstärkten, noch zu einer verminderten Kalzifizierung der Osteoblasten und Knochenmarkzellen beiträgt. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Untersuchungen überein, so konnten bei einer Inkubation von primären Osteoblasten der Ratte mit rekombinantem, eukaryontischem Ratten-BSP, im Vergleich zu Kontrollzellen, bei der von Kossa-Färbung ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden, leicht erhöhte Werte der Kalzium-Inkorporation wurden jedoch ermittelt. Für Osteoblasten, welche mit einem adenoviralen Cytomegalie Virus (adCMV) transfiziert worden waren, in welchen zuvor die cDNA für Ratten-BSP eingebaut worden war, ließen sich in der Kalzium-Fluoreszenz-Messung, im Vergleich zu Kontrollkulturen, signifikant erhöhte Ergebnisse ermitteln (Gordon et al. 2007). Für diese Zellen konnten auch nach 10 und 20 Tagen signifikant erhöhte Osteokalzin mRNA-Level ermittelt werden. Osteoblasten, welche täglich mit einem eukaryotisch hergestellten rekombinanten BSP inkubiert worden waren, zeigten, ähnlich wie in unseren Versuchen, auch nach 20 Tagen Inkubation in der von Kossa-Färbung, keine signifikante Erhöhung der Osteokalzin Exprimierung (Gordon et al. 2007).

Wie bereits angesprochen, könnte auch die rekombinante Herstellung des Proteins zu einem Funktionsverlust geführt haben. Zu einem besseren Vergleich der mit BSP inkubierten Zellen und Kontrollkulturen, wäre in folgenden Untersuchungen die quantitative Bestimmung der Kalzifizierung der Zellen wichtig, als auch, wie in anderen Untersuchungen beschrieben, eine tägliche Zugabe des Proteins zu den Zellen denkbar. Möglich wäre auch, dass die hohen Zellpassagen der humanen Osteoblasten einen BSP-vermittelten Effekt verschleierten, dagegen spricht jedoch, dass auch die sehr jungen, hoch proliferationsfähigen Knochenmarkzellen der zwei untersuchten Schweine ebenfalls keinen Effekt auf eine 96h BSP-Inkubation gezeigt haben. Dennoch bleibt diese Frage offen und in weiteren Untersuchungen könnte man humane Osteoblasten in niedrigeren Zellpassagen untersuchen. Das BSP-Protein

könnte auch, wie in 4.1.5.2 angesprochen, eventuell erst an ein Trägermolekül gekoppelt eine Wirkung zeigen und es wäre denkbar z.B. Kollagen I gebundenes rekombinantes BSP zunächst in vitro und später auch mittels Knochen-Implantation in vivo zu testen. Obgleich in unseren Untersuchungen zur induktiven Rolle des BSP in der Knochenmineralisierung zwar keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde in anderen Untersuchungen gezeigt, dass bei einer Inkubation von Osteoblasten mit BSP-Antikörpern, ein Abhandensein von Mineralisierungen in der von Kossa-Färbung, als auch eine fehlende Osteopontin und Osteokalzin Expression auffällig waren (Cooper et al. 1998). Diese Resultate verdeutlichen die wichtige Rolle von BSP an Mineralisierungsprozessen des Knochens.

4.1.6 BSP, Prothesenbeschichtung

In wieweit Knochen-BSP auf Osteoblasten, Osteozyten und Osteoid in vivo einen induktiven Effekt hat ist fraglich. In Femurknochen von Ratten konnte zwar mittels Hämatoxylin/Eosin-Färbung gezeigt werden, dass BSP-beschichtete Titan-Implantate nach 30 Tagen Inkubation optisch wesentlich besser eingewachsen waren, als angerauhte und unbeschichtete Kontrollimplantate. Bei der Quantifizierung des Einwachsens der beschichteten Titan-Implantate (pull-out strength), konnte jedoch auch nach 30 Tagen Inkubation für BSP-beschichtete Titan-Implantate, im Vergleich zu angerauhten Stahl-Implantaten und BSP-beschichtete Stahl-Implantaten, kein besseres Einwachsen nachgewiesen werden. In diesen Untersuchungen war BSP, im Bereich der eingebrachten Implantate, schon nach wenigen Tagen nicht mehr nachweisbar, was ein weiteres Problem der Prothesenbeschichtung deutlich werden lässt (O'Toole et al. 2004). Die Gewährleistung einer kontinuierlichen BSP-Abgabe am Ort der Applikation könnte, wie in der Arbeit von Gordon et al. 2007 beschrieben, über den Einbau des BSP-Gens in eine Virus-DNA erfolgen, damit waren - über einen Zeitraum von 20 Tagen - im Vergleich zu Kontrollkulturen, kontinuierlich signifikant höhere BSP Expressionslevel mittels Densitometrie und PCR-Messung detektierbar.

Aus medizinischer Sicht stellt sich auch die Frage, inwieweit eine medikamentöse Therapie mit Glukokortikoiden über das Glukokortikoid-Response Element eine BSP-Expression beeinflussen könnte.

In unveröffentlichten Arbeiten unseres Labors konnten wir mittels Adhäsionsuntersuchungen zeigen, dass bei einer ca. 20-minütigen BSP und Kollagen I Beschichtung von 6 Well Platten, anschließender Lufttrocknung bei Raumtemperatur und 24h-Inkubation mit humanen Osteoblasten, die BSP Beschichtung, im Vergleich zu Kontrolloberflächen, keine vermehrte Zelladhäsion fördert, jedoch auf Kollagen I beschichteten Oberflächen deutlich mehr Osteoblasten adhären werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass rekombinantes BSP im Rahmen der Beschichtung von Oberflächen nur eine eingeschränkte Zelladhäsions-Funktion hat. Des weiteren konnte in unseren Untersuchungen ein völlig neuer Aspekt der osteogenen Wirkung des humanen, rek. BSPs beobachtet werden. Im Rahmen der Differenzierung humaner Knochenmarkzellen zu Osteoblasten, mittels BSP beinhaltendem verdünntem Osteoblasten-Differenzierungsmedium, konnten wir nach einer zwei wöchigen Inkubation im 6 Well zeigen, dass rekombinantes BSP die Adipozytogenese humaner Knochenmarkzellen hemmt (Daten noch nicht veröffentlicht) und die Differenzierung in humane Osteoblasten fördert, was u.a. mittels verstärkter Alizarinrot-Färbung gezeigt werden kann (siehe Abb.45). Parallel, mit verdünntem Stammzellmedium und BSP Zusätzen inkubierte Knochenmarkzellen, weisen in der Färbung keine Anzeichen einer Kalzifizierung auf. Diese Ergebnisse waren bei unterschiedlich eingesetzten Zellkonzentrationen und den untersuchten Probanden variabel.



Abb.45: Alizarinrot-Färbung nach zwei wöchiger Inkubation mit BSP (von links nach rechts: 100ng BSP/ml, 30ng BSP/ml, 0ng BSP/ml) angereichertem, verdünntem Stammzell-Medium (SM)- Reihe A und Osteoblasten-Differenzierungsmedium (OD), Reihe B, humaner Knochenmarkzellen in der 2. Zellpassage.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass BSP auf die Zellen verschiedener Patienten einen unterschiedlich starken Einfluss hat. Die Beobachtung, dass BSP unter bestimmten Bedingungen die Adipozytogenese der Knochenmarkzellen hemmen kann, könnte einen wichtigen Aspekt für die zukünftigen Einsatzgebiete des BSPs darstellen.

5 Zusammenfassung

Im Zuge der Fragestellung, ob rekombinantes Bone Sialoprotein sowohl auf Gen- als auch mitochondrialer und histochemischer Ebene die Expression und Proliferationsraten, als auch die Sekretion typischer Osteoblasten Marker beeinflusst, kamen in unseren Untersuchungen zwei unterschiedlich hergestellte BSP-Proteine der Firma Immunodiagnostik zum Einsatz. Da BSP eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Knochenmarkzellen zu Osteoblasten spielt und stimulierende Effekte beobachtet werden konnten, wurden in dieser Arbeit sowohl humane Osteoblasten und Stromazellen, als auch Knochenmarkzellen und daraus differenzierte Osteoblasten von jungen Schweinen untersucht. Mittels RT-PCR Untersuchungen an humanen Osteoblasten und Stromazellen konnten wir zeigen, dass bei einer Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der zwei untersuchten rekombinanten Bone Sialoproteine, die Gene Osteopontin, Osteonectin und TGF- β weder induziert, noch gehemmt werden. Hoch signifikante Ergebnisse einer Hemmung der mitochondrialen Aktivität konnten im MTT-Assay nach 48, 72 und 96h, nicht jedoch nach 24h-Inkubation für BSP an humanen Osteoblasten und Stromazellen erzielt werden. Das DRJ Protein zeigte bereits nach 24h-Inkubation hoch signifikante Ergebnisse einer Hemmung. In Vorversuchen konnte an humanen Osteoblasten mehrerer Patienten bei niedrigen BSP-Konzentrationen und verschiedenen Zellkonzentrationen mittels BrdU-Assay nach 24h-Inkubationszeit eine signifikante Hemmung der Proliferation auf DNA-Ebene gezeigt werden. Diese Ergebnisse ließen sich jedoch in den Hauptversuchen, bei dem Einsatz weit umfassender Proteinkonzentrationen und der Mittelung der Messwerte humaner Zelllinien, weder für BSP, noch für DRJ bestätigen. In den Histochemischen Untersuchungen konnten die typischen Osteoblastenmarker, wie das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) und mittels der von Kossa-Färbung, die Osteokalzin Sekretion, in humanen Osteoblasten und Stromazellen, sowie auch in differenzierten Osteoblasten vom Schwein nachgewiesen werden, BSP vermittelte Effekte waren jedoch nicht erkennbar.

6 Literaturverzeichnis

- Abu-Amer, Y., I. Darwech, et al. (2007). "Aseptic loosening of total joint replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies." Arthritis Res Ther **9** **Suppl 1**: S6.
- Adwan, H., T. J. Bauerle, et al. (2004). "Downregulation of osteopontin and bone sialoprotein II is related to reduced colony formation and metastasis formation of MDA-MB-231 human breast cancer cells." Cancer Gene Ther **11**(2): 109-20.
- Ahdjoudj, S., O. Fromigue, et al. (2004). "Plasticity and regulation of human bone marrow stromal osteoprogenitor cells: potential implication in the treatment of age-related bone loss." Histol Histopathol **19**(1): 151-7.
- Baht, G. S., G. K. Hunter, et al. (2008). "Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation." Matrix Biol.
- Bellahcene, A., V. Albert, et al. (1998 b). "Ectopic expression of bone sialoprotein in human thyroid cancer." Thyroid **8**(8): 637-41.
- Bellahcene, A., K. Bonjean, et al. (2000 a). "Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis." Circ Res **86**(8): 885-91.
- Bellahcene, A., V. Castronovo, et al. (2008). "Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer." Nat Rev Cancer **8**(3): 212-26.
- Bellahcene, A., N. Maloujahmoum, et al. (1997 b). "Expression of bone sialoprotein in human lung cancer." Calcif Tissue Int **61**(3): 183-8.
- Bellahcene, A., M. P. Merville, et al. (1994). "Expression of bone sialoprotein, a bone matrix protein, in human breast cancer." Cancer Res **54**(11): 2823-6.
- Bellahcene, A., I. Van Riet, et al. (2000 b). "Bone sialoprotein mRNA and protein expression in human multiple myeloma cell lines and patients." Br J Haematol **111**(4): 1118-21.
- Bianco, P., L. W. Fisher, et al. (1991). "Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues." Calcif Tissue Int **49**(6): 421-6.
- Bianco, P., M. Riminucci, et al. (1993). "Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition." J Histochem Cytochem **41**(2): 183-91.
- Brooks, P. C., R. A. Clark, et al. (1994 a). "Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis." Science **264**(5158): 569-71.
- Brooks, P. C., A. M. Montgomery, et al. (1994 b). "Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels." Cell **79**(7): 1157-64.
- Byzova, T. V., W. Kim, et al. (2000). "Activation of integrin alpha(V)beta(3) regulates cell adhesion and migration to bone sialoprotein." Exp Cell Res **254**(2): 299-308.
- Chaplet, M., D. Waltregny, et al. (2006). "Expression of dentin sialophosphoprotein in human prostate cancer and its correlation with tumor aggressiveness." Int J Cancer **118**(4): 850-6.

- Chen, J., C. A. McCulloch, et al. (1993). "Bone sialoprotein in developing porcine dental tissues: cellular expression and comparison of tissue localization with osteopontin and osteonectin." Arch Oral Biol **38**(3): 241-9.
- Chen, J., H. S. Shapiro, et al. (1992). "Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues." J Bone Miner Res **7**(8): 987-97.
- Chenu, C. und P. D. Delmas (1992). "Platelets contribute to circulating levels of bone sialoprotein in human." J Bone Miner Res **7**(1): 47-54.
- Cooper, L. F., P. K. Yliheikkila, et al. (1998). "Spatiotemporal assessment of fetal bovine osteoblast culture differentiation indicates a role for BSP in promoting differentiation." J Bone Miner Res **13**(4): 620-32.
- Declercq, H. A., R. M. Verbeeck, et al. (2005). "Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures." Biomaterials **26**(24): 4964-74.
- Degterev, A. und J. Yuan (2008). "Expansion and evolution of cell death programmes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 378-90.
- Detry, C., D. Waltregny, et al. (2003). "Detection of bone sialoprotein in human (pre)neoplastic lesions of the uterine cervix." Calcif Tissue Int **73**(1): 9-14.
- Diel, I. J., E. F. Solomayer, et al. (1999). "Serum bone sialoprotein in patients with primary breast cancer is a prognostic marker for subsequent bone metastasis." Clin Cancer Res **5**(12): 3914-9.
- Drees, P., A. Eckardt, et al. (2007). "Mechanisms of disease: Molecular insights into aseptic loosening of orthopedic implants." Nat Clin Pract Rheumatol **3**(3): 165-71.
- Ek-Rylander, B., M. Flores, et al. (1994). "Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro." J Biol Chem **269**(21): 14853-6.
- Fedarko, N. S., B. Fohr, et al. (2000). "Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack." J Biol Chem **275**(22): 16666-72.
- Fedarko, N. S., A. Jain, et al. (2004). "Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases." Faseb J **18**(6): 734-6.
- Fedarko, N. S., A. Jain, et al. (2001). "Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer." Clin Cancer Res **7**(12): 4060-6.
- Fisher, L. W. und N. S. Fedarko (2003). "Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins." Connect Tissue Res **44 Suppl 1**: 33-40.
- Fisher, L. W., O. W. McBride, et al. (1990). "Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization." J Biol Chem **265**(4): 2347-51.
- Fisher, L. W., D. A. Torchia, et al. (2001). "Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin." Biochem Biophys Res Commun **280**(2): 460-5.

- Fisher, L. W., S. W. Whitson, et al. (1983). "Matrix sialoprotein of developing bone." J Biol Chem **258**(20): 12723-7.
- Flores, M. E., M. Norgard, et al. (1992). "RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin." Exp Cell Res **201**(2): 526-30.
- Franzen, A. und D. Heinegard (1985). "Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix." Biochem J **232**(3): 715-24.
- Fuchs, T. F., W. Petersen, et al. (2007). "Influence of synovial fluid on human osteoblasts: an in vitro study." ScientificWorldJournal **7**: 2012-20.
- Ganss, B., R. H. Kim, et al. (1999). "Bone sialoprotein." Crit Rev Oral Biol Med **10**(1): 79-98.
- Ge, Z., L. Wang, et al. (2008). "Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts within 3D printed Poly-Lactic-co-Glycolic Acid Scaffolds." J Biomater Appl.
- Goldberg, H. A., K. J. Warner, et al. (1996). "Determination of the hydroxyapatite-nucleating region of bone sialoprotein." Connect Tissue Res **35**(1-4): 385-92.
- Gordon, J. A., C. E. Tye, et al. (2007). "Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro." Bone **41**(3): 462-73.
- Graf, H. L., S. Stoeva, et al. (2008). "Effect of bone sialoprotein and collagen coating on cell attachment to TICER and pure titanium implant surfaces." Int J Oral Maxillofac Surg **37**(7): 634-40.
- Grzesik, W. J. und P. G. Robey (1994). "Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro." J Bone Miner Res **9**(4): 487-96.
- Hadjidakis, D. J. und Androulakis, II (2006). "Bone remodeling." Ann N Y Acad Sci **1092**: 385-96.
- Harbers, G. M. und K. E. Healy (2005). "The effect of ligand type and density on osteoblast adhesion, proliferation, and matrix mineralization." J Biomed Mater Res A **75**(4): 855-69.
- Harris, N. L., K. R. Rattray, et al. (2000). "Functional analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis." Bone **27**(6): 795-802.
- Hulo, N., A. Bairoch, et al. (2008). "The 20 years of PROSITE." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D245-9.
- Hunter, G. K. und H. A. Goldberg (1993). "Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8562-5.
- Hunter, G. K. und H. A. Goldberg (1994 a). "Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein." Biochem J **302** (Pt 1): 175-9.
- Hunter, G. K., P. V. Hauschka, et al. (1996). "Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins." Biochem J **317** (Pt 1): 59-64.

- Hunter, G. K., C. L. Kyle, et al. (1994 b). "Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation." Biochem J **300 (Pt 3)**: 723-8.
- Icaro Cornaglia, A., M. Casasco, et al. (2006). "Stimulation of osteoblast growth by an electromagnetic field in a model of bone-like construct." Eur J Histochem **50(3)**: 199-204.
- Kantorow, M., Q. Huang, et al. (2000). "Increased expression of osteonectin/SPARC mRNA and protein in age-related human cataracts and spatial expression in the normal human lens." Mol Vis **6**: 24-9.
- Karmatschek, M., I. Maier, et al. (1997). "Improved purification of human bone sialoprotein and development of a homologous Radioimmunoassay." Clin Chem **43(11)**: 2076-82.
- Kayed, H., J. Kleeff, et al. (2007). "Effects of bone sialoprotein on pancreatic cancer cell growth, invasion and metastasis." Cancer Lett **245(1-2)**: 171-83.
- Kerr, J. M., L. W. Fisher, et al. (1993). "The human bone sialoprotein gene (IBSP): genomic localization and characterization." Genomics **17(2)**: 408-15.
- Kessler, S., S. Kastler, et al. (2000). "[Stimulation of primary osteoblast cultures with rh-TGF-beta, rh-bFGF, rh-BMP 2 and rx-BMP 4 in an in vitro model]." Orthopade **29(2)**: 107-11.
- Kim, R. H., H. S. Shapiro, et al. (1994). "Characterization of the human bone sialoprotein (BSP) gene and its promoter sequence." Matrix Biol **14(1)**: 31-40.
- Krebsbach, P. H., S. A. Kuznetsov, et al. (1999). "Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application." Crit Rev Oral Biol Med **10(2)**: 165-81.
- Larsson, E., B. Luning, et al. (1993). "Synthesis and function of an O-phosphorylated peptide corresponding to the cell adhesion sequence of bone sialoprotein (BSP)." Acta Chem Scand **47(6)**: 565-9.
- Lind, M. (1998). "Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation." Acta Orthop Scand Suppl **283**: 2-37.
- MacNeil, R. L., J. Berry, et al. (1995). "Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis." Connect Tissue Res **33(1-3)**: 1-7.
- Malaval, L., N. M. Wade-Gueye, et al. (2008). "Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis." J Exp Med **205(5)**: 1145-53.
- Marie, P. J. und O. Fromigue (2006). "Osteogenic differentiation of human marrow-derived mesenchymal stem cells." Regen Med **1(4)**: 539-48.
- Melquist, J. J., M. Kacka, et al. (2006). "Conditionally replicating adenovirus-mediated gene therapy in bladder cancer: an orthotopic in vivo model." Urol Oncol **24(4)**: 362-71.
- Midura, R. J., D. J. McQuillan, et al. (1990). "A rat osteogenic cell line (UMR 106-01) synthesizes a highly sulfated form of bone sialoprotein." J Biol Chem **265(9)**: 5285-91.

- Mintz, K. P., L. W. Fisher, et al. (1994). "Chlorate-induced inhibition of tyrosine sulfation on bone sialoprotein synthesized by a rat osteoblast-like cell line (UMR 106-01 BSP)." J Biol Chem **269**(7): 4845-52.
- Mizuno, M., T. Imai, et al. (2000). "Bone sialoprotein (BSP) is a crucial factor for the expression of osteoblastic phenotypes of bone marrow cells cultured on type I collagen matrix." Calcif Tissue Int **66**(5): 388-96.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Nefussi, J. R., G. Brami, et al. (1997). "Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro." J Histochem Cytochem **45**(4): 493-503.
- O'Toole, G. C., E. Salih, et al. (2004). "Bone sialoprotein-coated femoral implants are osteoinductive but mechanically compromised." J Orthop Res **22**(3): 641-6.
- Ogata, Y. (2008). "Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism." J Periodontal Res **43**(2): 127-35.
- Ogbureke, K. U., N. G. Nikitakis, et al. (2007). "Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer." Oral Oncol **43**(9): 920-32.
- Ohnishi, T., N. Arakaki, et al. (1991). "Purification, characterization, and studies on biosynthesis of a 59-kDa bone sialic acid-containing protein (BSP) from rat mandible using a monoclonal antibody. Evidence that 59-kDa BSP may be the rat counterpart of human alpha 2-HS glycoprotein and is synthesized by both hepatocytes and osteoblasts." J Biol Chem **266**(22): 14636-45.
- Oldberg, A., A. Franzen, et al. (1988 a). "The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein." J Biol Chem **263**(36): 19430-2.
- Oldberg, A., A. Franzen, et al. (1988 b). "Identification of a bone sialoprotein receptor in osteosarcoma cells." J Biol Chem **263**(36): 19433-6.
- Papotti, M., T. Kalebic, et al. (2006). "Bone sialoprotein is predictive of bone metastases in resectable non-small-cell lung cancer: a retrospective case-control study." J Clin Oncol **24**(30): 4818-24.
- Park, B. W., Y. S. Hah, et al. (2007). "Osteogenic phenotypes and mineralization of cultured human periosteal-derived cells." Arch Oral Biol **52**(10): 983-9.
- Pecheur, I., O. Peyruchaud, et al. (2002). "Integrin alpha(v)beta3 expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone." Faseb J **16**(10): 1266-8.
- Peters, A. (2005). "Knochenersatzmaterialien: Etablierung eines osteoblastenspezifischen Biokompatibilitätstests in vitro." Medizinische Fakultät, Univ. Hamburg (Dissertation)
- Riminucci, M., A. Corsi, et al. (2003). "Coexpression of bone sialoprotein (BSP) and the pivotal transcriptional regulator of osteogenesis, Cbfa1/Runx2, in malignant melanoma." Calcif Tissue Int **73**(3): 281-9.
- Roach, H. I. (1994). "Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone

- sialoprotein in bone mineralisation and resorption." Cell Biol Int **18**(6): 617-28.
- Ross, F. P., J. Chappel, et al. (1993). "Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption." J Biol Chem **268**(13): 9901-7.
- Ryden, C., H. S. Tung, et al. (1997). "Staphylococcus aureus causing osteomyelitis binds to a nonapeptide sequence in bone sialoprotein." Biochem J **327 (Pt 3)**: 825-9.
- Ryden, C., A. I. Yacoub, et al. (1989). "Specific binding of bone sialoprotein to Staphylococcus aureus isolated from patients with osteomyelitis." Eur J Biochem **184**(2): 331-6.
- Schaumburger, J. (2000). "Charakterisierung chondro- und osteogener Zellen und deren Beeinflussung durch Azathioprin, Diclofenac, Indometacin und Methotrexat in vitro." Medizinische Fakultät, Univ. Tübingen (Dissertation)
- Seibel, M. J., H. W. Voitge, et al. (1996). "Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease." J Clin Endocrinol Metab **81**(9): 3289-94.
- Shapiro, H. S., J. Chen, et al. (1993). "Characterization of porcine bone sialoprotein: primary structure and cellular expression." Matrix **13**(6): 431-40.
- Shen, Z., D. Heinegard, et al. (1995). "Distribution and expression of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein show marked changes during rat femoral head development." Matrix Biol **14**(9): 773-81.
- Somerman, M. J., L. W. Fisher, et al. (1988). "Human bone sialoprotein I and II enhance fibroblast attachment in vitro." Calcif Tissue Int **43**(1): 50-3.
- Sommarin, Y., T. Larsson, et al. (1989). "Chondrocyte-matrix interactions. Attachment to proteins isolated from cartilage." Exp Cell Res **184**(1): 181-92.
- Stein, G. S., J. B. Lian, et al. (1990). "Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation." Faseb J **4**(13): 3111-23.
- Stork, S., C. Stork, et al. (2000). "Bone sialoprotein is a specific biochemical marker of bone metabolism in postmenopausal women: a randomized 1-year study." Osteoporos Int **11**(9): 790-6.
- Stubbs, J. T., 3rd, K. P. Mintz, et al. (1997). "Characterization of native and recombinant bone sialoprotein: delineation of the mineral-binding and cell adhesion domains and structural analysis of the RGD domain." J Bone Miner Res **12**(8): 1210-22.
- Sung, V., J. T. Stubbs, 3rd, et al. (1998). "Bone sialoprotein supports breast cancer cell adhesion proliferation and migration through differential usage of the Alpha(v)beta3 and Alpha(v)beta5 integrins." J Cell Physiol **176**(3): 482-94.
- Titorencu, I., V. V. Jinga, et al. (2007). "Proliferation, differentiation and characterization of osteoblasts from human BM mesenchymal cells." Cytotherapy **9**(7): 682-96.
- Tung, H., B. Guss, et al. (2000). "A bone sialoprotein-binding protein from Staphylococcus aureus: a member of the staphylococcal Sdr family." Biochem J **345 Pt 3**: 611-9.

- Tye, C. E., G. K. Hunter, et al. (2005). "Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction." J Biol Chem **280**(14): 13487-92.
- Tye, C. E., K. R. Rattray, et al. (2003). "Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein." J Biol Chem **278**(10): 7949-55.
- Valverde, P., Q. Tu, et al. (2005). "BSP and RANKL induce osteoclastogenesis and bone resorption synergistically." J Bone Miner Res **20**(9): 1669-79.
- Waltregny, D., A. Bellahcene, et al. (2000). "Increased expression of bone sialoprotein in bone metastases compared with visceral metastases in human breast and prostate cancers." J Bone Miner Res **15**(5): 834-43.
- Waltregny, D., A. Bellahcene, et al. (1998). "Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer." J Natl Cancer Inst **90**(13): 1000-8.
- Wang, J., H. Y. Zhou, et al. (2006). "Site-specific in vivo calcification and osteogenesis stimulated by bone sialoprotein." Calcif Tissue Int **79**(3): 179-89.
- Weiner, S. und L. Addadi (1991). "Acidic macromolecules of mineralized tissues: the controllers of crystal formation." Trends Biochem Sci **16**(7): 252-6.
- Whyte, M. P. (1994). "Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization." Endocr Rev **15**(4): 439-61.
- Wlodarski, K. H. (1991). "Bone histogenesis mediated by nonosteogenic cells." Clin Orthop Relat Res(272): 8-15.
- Woitge, H. W., M. Pecherstorfer, et al. (2001). "Serum bone sialoprotein as a marker of tumour burden and neoplastic bone involvement and as a prognostic factor in multiple myeloma." Br J Cancer **84**(3): 344-51.
- Wuttke, M., S. Muller, et al. (2001). "Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding." J Biol Chem **276**(39): 36839-48.
- Xu, L., A. L. Anderson, et al. (2007). "Role of fibrillar structure of collagenous carrier in bone sialoprotein-mediated matrix mineralization and osteoblast differentiation." Biomaterials **28**(4): 750-61.
- Young, M. F., K. Ibaraki, et al. (1994). "Murine bone sialoprotein (BSP): cDNA cloning, mRNA expression, and genetic mapping." Mamm Genome **5**(2): 108-11.
- Zhou, H. Y., H. Takita, et al. (1995). "Stimulation by bone sialoprotein of calcification in osteoblast-like MC3T3-E1 cells." Calcif Tissue Int **56**(5): 403-7.

- Zhu, X., C. Luo, et al. (1997). "Evidence of ectokinase-mediated phosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoblasts during bone formation in vitro." Biochem J **323 (Pt 3)**: 637-43.
- Zipfel, P. F. (2001). "Complement factor H: physiology and pathophysiology." Semin Thromb Hemost **27(3)**: 191-9.

7 Primär- und Sekundärdaten

Primär- und Sekundärdaten wurden bei Prof. Aicher hinterlegt und sind auf Wunsch einsehbar.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen
abh.	abhängig
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BSP	(1. rekombinantes) Bone Sialoprotein
bp	Basen-Paare
BrdU	5-bromo-2`-desoxyuridin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Coxarthr.	Coxarthrose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRJ	(2. rekombinantes) Bone Sialoprotein
ECM	extrazelluläre Matrix
Ext.	Extinktion
Fl.	Flasche
GapDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gonarthr.	Gonarthrose
GRR	Glutamat-reiche Region
HA	Hydroxylapatit
HTP	Hüfttotalendoprothese
ID	Induktionsindex
i. O.	in Ordnung
Kb	Kilo-Basenpaare
KTP	Knietotalendoprothese
LC	LightCycler
li	links
Lsg.	Lösung
min.	Minute
MMP-2	Matrix-Metalloproteinase-2
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromid
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n. b.	nicht bekannt
n. i.	nicht isoliert
NSCLC	nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
Osteobl.	Osteoblasten
P.	Zell-Passage
p1-p3	Extinktion der Proben: (3-fach Bestimmung)
p1-p4	Extinktion der Proben: (4-fach Bestimmung)
p1-p7	Extinktion der Proben: (7-fach-Bestimmung)
p1-p8	Extinktion der Proben: (8-fach-Bestimmung)
Pat.	Patient
PK	Plattenepithelkarzinom
rBSP	Rekombinantes BSP
re	rechts
rek.	rekombinant
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat-Zellbindungstripeptid
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real Time-Polymerase-Kettenreaktion
Sek.	Sekunde
sog.	sogenannte
SP	Signalpeptid
Stromaz.	Stromazellen
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
U/min.	Umdrehungen/Minute
UTR	untranslatierter Bereich
ü. N.	über Nacht
YKS	Tyrosin Kinase
Zellkonz.	Zellkonzentration

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher, unter dessen Leitung diese Promotion durchgeführt wurde. Bei Fragen und Verbesserungsvorschlägen stand er mir stets hilfreich zur Seite und beantwortete meine E-Mails so schnell, wie kein anderer Professor der medizinischen Fakultät Tübingen. Sehr gerne habe ich bei Ihm meine Promotion absolviert.

Ebenso möchte ich mich bei Anita Hack, welche während des experimentellen Teils dieser Arbeit eine große Hilfe für mich darstellte, bedanken. Ich wünsche Ihr und Ihrer Familie alles Gute für die Zukunft. Auch möchte ich mich bei Katrin Warstat, Michaela Weiss-Klemm und Tino Felka bedanken, es hat mir Freunde gemacht mit Ihnen zusammen zu arbeiten. Dank Katrin Warstat hat die Arbeit auch an zahlreichen Wochenenden Spaß gemacht.

Dr. Mathieu Meyer und Dr. Hugues Pascal-Moussellard danke ich für die freien Stunden im OP, in welchen ich an meiner Promotion arbeiten konnte.

Meiner Familie möchte ich für die kontinuierliche Unterstützung während dieser Arbeit danken. Insbesondere möchte ich mich für das Verständnis und die Geduld meiner Eltern und die ideenreichen Motivationsanrufe von meinem Bruder David, in der Endphase dieser Arbeit, bedanken.

Meinem Freund, André Schmandke, danke ich für die vielen guten Ideen, die Hilfe bei der graphischen Umsetzung einiger Figuren in der Einleitung, sowie der Korrektur dieser Arbeit. Auch möchte ich mich bei seinem Bruder, Antonio Schmandke für das Korrekturlesen bedanken. Die zahlreichen Diskussionen mit Ihnen über die Ergebnisse dieser Arbeit haben mir gezeigt, wie spannend Forschung sein kann. Familie Schmandke gilt für Ihre Motivation ebenso mein Dank, wie meinen Kommilitoninnen und Freundinnen Carolin Urban, Dinah Landauer mit Familie und Lena Mertiens.

Auch möchte ich mich bei allen anderen Personen, welche zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und hier aus Platzgründen nicht namentlich erwähnt wurden, bedanken.

10 Curriculum Vitae

Isa Maria Schmandke

- 18.06.1980 Geboren in Berlin - Charlottenburg als Tochter von Dr. Hans - Weert Klopp, Kinder- und Jugendarzt, und Rosemarie Klopp, Lehrerin
- 1987-2000 Schulzeit an der Freien Waldorfschule Engelberg bis zum Abitur,
1997 ½ Jähriger Auslandsaufenthalt in den USA (Colorado), dortiger Besuch der William J. Palmer High – School
- 2000-2001 Dreimonatiges Pflegepraktikum an der Universitäts - Frauenklinik in Freiburg, Arbeit auf der Wochenstation und im Kreißsaal
- 2002 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt Universität in Greifswald
- 2005 Wechsel an die Eberhard Karls Universität in Tübingen
- 2006-2007 Experimentelle Doktorarbeit im Fachbereich Orthopädie bei Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher
- 2007 ERASMUS Stipendium: ½ Jähriges Auslandsstudium an der Universität Pierre et Marie Curie in Paris. Dreimonatige Arbeit im Kinderklinikum Armand Trousseau in der Abteilung Pulmologie und Allergologie bei Prof. A. Grimfeld und Prof. J. Just, sowie dreimonatige Arbeit im Klinikum Pitié Salpêtrière in der Abteilung Orthopädie und Traumatologie bei Prof. Y. Catonne
- 2008 Seit Juli 08 Scheinfrei im Studiengang Humanmedizin der Universität Tübingen
- 2008 1. Preis der Medizinischen Fakultät Tübingen zur Verbesserung der Lehre
- 2008-2009 August 08-Juli 09 Absolvierung des Praktischen Jahres
- 17.07.2009 Eheschließung mit André Schmandke und Namensänderung
- 16./17.11.2009 Ärztliche Prüfung (2.Staatsexamen)