



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Wirkung verschiedener Biomaterialien
auf Osteoblasten in vitro“

verfasst von

Carina Kampleitner

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann bedanken. Einerseits für die Bereitstellung eines spannenden Diplomarbeitsthemas und andererseits für die Gelegenheit in einem Projekt wie „InnovaBone“ mitzuarbeiten.

Ein großer Dank gebührt auch Dr. Tristan Fowler, Barbara Berger, Peter Höflich und Yvonne Kosch. Sie standen mir während meiner gesamten Arbeit mit Rat und Tat zur Seite und schafften durch eine herzliche Atmosphäre eine unvergessliche Zeit. Ein aufrichtiges Danke gehört auch meiner Kollegin und Freundin Mag. Beata Gaisbauer. Beata war mir am Ende meines Studiums ein treuer Ansprechpartner und griff mir bei der grammatikalischen und stilistischen Korrektur meine Diplomarbeit tatkräftig unter die Arme.

Viele Menschen haben mich auf meinen gesamten Bildungsweg begleitet, mich inspiriert, mich geprägt, mich angetrieben und mich schlussendlich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin. Ein großes Dankeschön darf ich an dieser Stelle meiner ganzen Familie, besonders aber meinen Bruder, an den ich mich Tag und Nacht wenden konnte und der mir mit Rat und Tat zur Seite stand, und meinen Freunden aussprechen. Ich konnte immer auf ihre Unterstützung und ihren Halt bauen.

„Last but not least“ möchte ich mich noch bei meinem Lebensgefährten Wolfgang bedanken, der jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte. Wolfgang begleitete und unterstützte mich während meiner gesamten Studienzeit. Sein Zuspruch und seine stets optimistische Einstellung gab mir in Situationen der Ratlosigkeit neue Energie.

Liste der verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen

ALP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
BSA	bovine serum albumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS hi	fetal calf serum, heat inactivated
HCl	Salzsäure
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol,2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2-H-tetrazol
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsals
OPG	Osteoprotegerin
PBS/PBS-TC	phosphate buffered saline
PCL	Polycaprolactone
PLA	Polylactidacid (Polymilchsäure)
RANKL	receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand
TRAP	tartrat-resistent acid phosphatase
Vit. C	Vitamin C (Ascorbinsäure)
α-MEM	α-minimum essential Medium
β-GP	β-Glycerophosphat

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Liste der verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen	4
Inhaltsverzeichnis	5
Zielsetzung	8
1. Einleitung	9
1.1. Knochengewebe	9
1.1.1. Osteoblasten	10
1.1.2. Osteoklasten	12
1.2. Knochenheilung	13
1.3. Biomaterialien	15
1.3.1. Natürliches Polymer – Gelatine	16
1.4. Synthetisch abbaubare Polymere	18
2. Materialien und Methoden	20
2.1. Versuchsplan und Versuchsaufbau	20
2.2. Zelltypen	21
2.2.1. Primäre Maus-Osteoblasten	21
2.2.2. MC3T3-E1 – Osteoblasten-Zelllinie	22
2.2.3. NIH3T3 – Fibroblasten-Zelllinie	22
2.3. Mineralisationsassay	22
2.4. Naturpolymer- Gelatine	24
2.4.1. Herstellung der Gelatinelösungen	24
2.4.2. Herstellung der Gelatine – und BSA-Beschichtungen	24
2.5. Synthetische Biomaterialien „LCM“	25
2.6. Färbung aktiver Alkalischer Phosphatase	26
2.6.1. Durchführung der Färbung.....	26
2.7. Alizarin Red S Färbung	27
2.7.1. Durchführung der Färbung.....	28
2.7.2. Quantifizierung des gebundenen Farbstoffes.....	28

2.8.	Sirius Red und Fast Green Färbung	29
2.8.1.	Durchführung der Färbung.....	29
2.8.2.	Berechnung	30
2.9.	Zellviabilitäts – und Zellproliferationsassay – MTS-Assay	31
2.10.	Reagentienherstellung.....	32
2.10.1.	40 mM Alizarin Red S Lösung (pH 4,2)	32
2.10.2.	Ascorbinsäurelösung (Vitamin C)	32
2.10.3.	Herstellung der BCIP/NBT Lösung	32
2.10.4.	10% Cetylpyridiniumchloridlösung.....	32
2.10.5.	Fixierlösung (3,7% Formaldehydlösung)	32
2.10.6.	β -Glycerophosphat Lösung.....	33
2.10.7.	Phosphat-Puffer-Saline (PBS)	33
2.10.8.	Phosphat-Puffer-Saline mit Calcium und Magnesium (PBS + Ca^{++}/Mg^{++})	33
2.10.9.	Phosphatpuffer (pH 7, 10 mM)	33
2.10.10.	Trypsin-EDTA-Lösung (10X)	34
2.10.11.	Waschpuffer	34
2.11.	Statistische Auswertung	34
2.12.	Reagenzien, Material, Geräte.....	35
3.	Resultate	39
3.1.	Austestung isolierter Osteoblastenfraktionen auf Mineralisationsfähigkeit.....	39
3.2.	Bestimmung von knochenspezifischen Markern primärer Maus-Osteoblasten	42
3.2.1.	Aktivität der Alkalische Phosphatase	42
3.2.2.	Mineralisation von extrazellulärer Matrix.....	43
3.2.3.	Sekretion von Kollagen und nicht-kollagenen Proteinen.....	45
3.3.	Austestung von Biomaterialen	48
3.3.1.	Effekt verschiedener Gelatinebeschichtungen auf die Differenzierung und Mineralisation von MC3T3-E1	48
3.3.2.	Einfluss von LCM3 und LCM6 auf die Zellviabilität , Proliferation, Differenzierung und Matrixmineralisation von Osteoblasten	52
4.	Zusammenfassung	58
4.1.	Einfluss von verschiedenen Gelatinetypen auf die Alkalische Phosphatase Aktivität und Mineralisation von MC3T3-E1 Zellen	58

4.2. Effekt der Biomaterialien LCM3 und 6 auf die Proliferation, Differenzierung und Matrixmineralisation von primären Osteoblasten.....	59
5. Diskussion und Conclusio.....	60
6. Abstract	66
7. Lebenslauf.....	67
8. Abbildungsverzeichnis	69
9. Tabellenverzeichnis	73
10. Literaturverzeichnis	75

Zielsetzung

Knochenschäden infolge von traumatischen Verletzungen, Tumorresektionen oder operativen Rekonstruktionen erfordern die Anwendung von Knochenersatzmaterialien. Gegenwärtig verfügbare Transplantate, wie die Verwendung von autologen oder allogenen Knochenmaterialien, und Allotransplantaten mit demineralisierter Matrix oder osteogenen Proteinen sind nur limitiert verfügbar. Das Forschungsgebiet der Knochenregenerationsmedizin hat sich aufgrund dieser Notwendigkeit rasch weiterentwickelt und die Entwicklung von Biomaterialien als Knochenersatz stellt dabei einen wichtigen Forschungsbereich dar.

Ziel dieser Diplomarbeit war die Untersuchung von Effekten potentieller Biomaterialien für den Bereich „bone tissue engineering“. Getestet wurden zwei verschiedene Klassen von abbaubaren Biomaterialien. Einerseits wurden Einflüsse von Gelatine und andererseits von einem synthetischen Copolymer auf den Differenzierungsprozess und der Mineralisationsfähigkeit von Osteoblasten untersucht. Zur Beurteilung dieser Materialien wurden Parameter wie Zellviabilität und knochenspezifische Marker (Alkalische Phosphatase Aktivität und Matrixmineralisation) herangezogen.

1. Einleitung

1.1. Knochengewebe

Der Knochen ist ein starres, jedoch auch ein dynamisches Organ. Biochemisch besteht er aus einer Mischung von anorganischen Elementen und organischer Matrix. Knochen wird kontinuierlich neu gebildet, in Form gebracht und repariert. Dieser Prozess wird auch als Knochenumbau bzw. „bone remodelling“ bezeichnet (Kular et al., 2012).

„Bone remodelling“ ist ein komplexer und streng regulierter Prozess, bewerkstelligt durch zwei Zelltypen: Osteoblasten und Osteoklasten (Abbildung 1). Osteoklasten sind für die Resorption von Knochen zuständig und spielen eine Rolle in der Bildung des Skelettes und in der Regulation der Knochenmasse. Osteoblasten sind knochenbildende Zellen. Sie synthetisieren Knochenmatrix, regulieren die Mineralisation und differenzieren sich letztendlich zu Osteozyten oder „bone-lining cells“. Die zelluläre Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten wird zur Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase durch lokale und systemische Faktoren reguliert (Hill, 1998).

Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität führt zu einer Reihe von Erkrankungen, wie beispielsweise Osteopenie, Osteoporose und Osteopetrose (Kular et al., 2012).

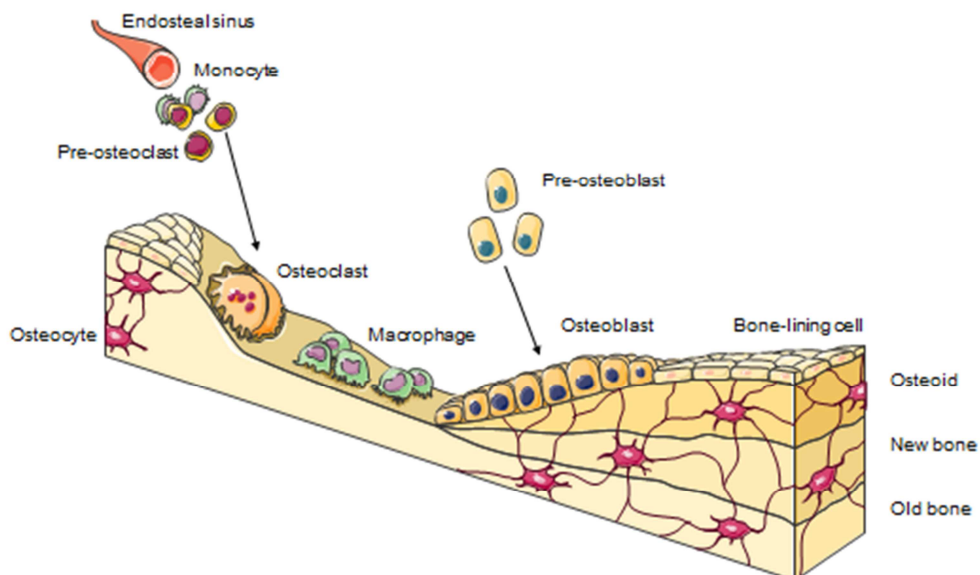


Abbildung 1: Graphische Darstellung des „bone remodeling“-Zyklus und die dabei beteiligten Zelltypen. Diese Abbildung wurde von „Servier Medical Art“ entworfen.

1.1.1. Osteoblasten

Osteoblasten stellen den einzigen Zelltyp in unserem Organismus dar, welcher zur Bildung von Knochen befähigt ist (Pittenger et al., 1999). Diese knochenbildenden Zellen wurden im Jahre 1864 von Gegenbauer als solche benannt und ab diesem Zeitpunkt umfassend studiert (Gegenbauer, 1864). Sie entstammen mesenchymalen Stammzellen, die das Potential besitzen, sich zu Osteoblasten zu differenzieren (Pittenger et al., 1999). Friedenstein und seine Arbeitsgruppe charakterisierten als erstes diese mesenchymalen Stammzellen und entdeckten, dass sich diese Zellen in verschiedene Zelltypen ausdifferenzieren können. Unter bestimmten Bedingungen formen sie nicht nur Osteoblasten, sondern auch Chondrozyten, Myoblasten, Adipozyten (Friedenstein et al., 1987; Friedenstein und Lalykina, 1970).

Der Differenzierungsprozess selbst kann in vier verschiedene Phasen eingeteilt werden: Präosteoblast, Osteoblast, Osteozyt und „bone lining cell“ (Abbildung 2). Sofern ein geeigneter Stimulus vorhanden ist, entstehen aus mesenchymalen Vorläuferzellen Präosteoblasten. Histologisch ähneln sie den Osteoblasten und besitzen Marker wie aktive Alkalische Phosphatase. Jedoch sind sie nicht in der Lage, extrazelluläre Matrix zu mineralisieren (Aubin und Liu, 1996).

Die Hauptaufgabe von reifen, aktiven Osteoblasten ist die Bildung der Knochenmatrix und diese produzieren hierfür eine Kombination von extrazellulären Matrixproteinen. Das am meisten von Osteoblasten sezernierte Protein ist Kollagen Typ 1, welches bestimmend für die Zugfestigkeit des Knochens ist. Neben Kollagen Typ 1 werden noch verschiedene nicht kollagene Proteine produziert. Zu dieser Gruppe von nicht kollagenen Proteinen gehören die Calcium-bindenden Proteine Osteocalcin, Osteopontin und Bone Sialoprotein (Jähn und Bonewald, 2012; Lian und Stein, 2006).

Zytologische Charakteristika sind die kuboidale Zellgestalt, das basophile Zytoplasma, die übergroßen Mitochondrien und endoplasmatischen Reticula, wie auch ein großer Golgi Apparat, passend zu der Anforderung, große Menge an extrazellulärer Matrix zu bilden (Majeska, 2001; Pritchard, 1952).

Ein Teil der Osteoblasten differenzieren zu Osteozyten und werden in die Knochenmatrix eingebettet. Der Rest der Osteoblasten wird entweder in den programmierten Zelltod geschickt oder sie kleiden als „bone-lining cells“, auch bekannt als Saumzellen, die Knochenoberfläche aus. Osteozyten bilden untereinander aber auch mit Osteoblasten und mit den Saumzellen ein Netzwerk auf und spielen als Regulatoren im Knochenumbau eine wichtige Rolle (Long, 2012).

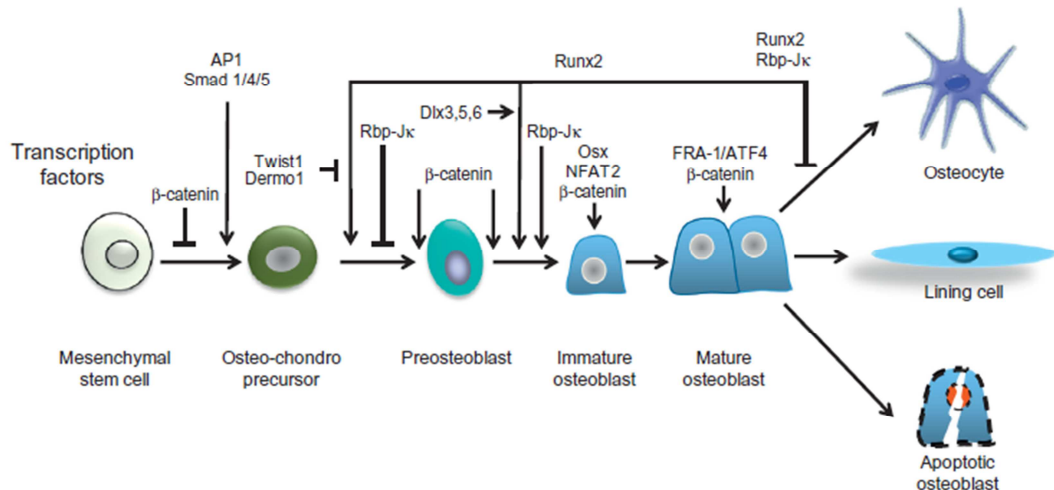


Abbildung 2: Illustration der verschiedenen Stadien der Osteoblasten-Differenzierung (Bellido et al., 2014).

Neben ihrer Funktion im Prozess der Knochenbildung, spielen Osteoblasten aber auch eine Rolle in der Differenzierung von Osteoklasten. Die Regulation der Osteoklasten kann einerseits durch die Sekretion von Faktoren erfolgen, welche durch direkten Zell-Zell Kontakt auf Osteoklasten wirken (Kular et al., 2012). Osteoblasten produzieren M-CSF („makrophage colony-stimulating factor“), RANKL („receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand“) und OPG (Osteoprotegerin). Alle drei Faktoren sind wichtig für die Osteoklastenbildung und Funktion. Während RANKL für die Osteoklasten-Differenzierung essentiell ist, fungiert OPG als „Decoy Receptor“ (Lockvogel) für RANKL und kontrolliert auf diese Weise den aktivierenden Effekt von RANKL (Takahashi et al., 1999).

Andererseits kann die Osteoklasten-Differenzierung auch durch die Freisetzung von chemoattraktorischen Substanzen aus der Knochenmatrix beeinflusst werden. Osteoblasten kontrollieren auf diese Weise die Rekrutierung von Osteoklastenvorstufen. Zu diesen Chemoattraktoren gehören unter anderem Osteocalcin und Typ 1 Kollagen (Malone et al., 1982)

1.1.2. Osteoklasten

Osteoklasten sind mehrkernige große Zellen, die durch Fusion von einkernigen Vorläuferzellen der Monozyten/Makrophagen-Familie entstehen. Dieser Prozess wird auch als Osteoklastogenese bezeichnet (Abbildung 3) (Teitelbaum, 2000).

Osteoklasten sind spezielle Zellen, die die Knochenresorption bewerkstelligen. Sie sind sowohl für das Wachstum, als auch für das Formen des Knochens während der Entwicklung und des „bone remodelling“ zur Aufrechterhaltung eines gesunden Skelettes wichtig. Osteoklastenbildung und deren Funktion und Überleben werden reguliert durch ein Netzwerk von Signaltransduktionswegen (Mellis et al., 2011).

Osteoklasten stammen von hämatopoetischen Stammzellen, aus denen Osteoklastenvorläuferzellen hervorgehen. Diese Zellen benötigen zur Ausdifferenzierung Wachstumsfaktoren. Diese Faktoren werden entweder von Knochenmarkzellen, Osteoblasten oder T-Lymphozyten gebildet (Udagawa et al., 1990). Zwei dieser wichtigen Faktoren sind M-CSF und RANKL (Kular et al., 2012).

RANKL wirkt auf bereits durch M-CSF stimulierte Vorläuferzellen. Diese Zellen vom Osteoklast-Phenotyp exprimieren Marker wie TRAP („tartrate resistant acid phosphatase“). Durch den Stimulus von M-CSF und RANKL fusionieren Präosteosteoklasten und bilden mehrkernige Zellen. Diese mehrkernigen Zellen exprimieren weitere für Osteoklasten spezifische Marker, wie Calcitonin-Rezeptoren und Cathepsin K (Lam et al., 2001).

Osteoklasten können in zwei Phasen vorliegen: in der beweglichen Phase oder in der Resorptionsphase. Während dieser beweglichen Phase migrieren sie vom Knochenmark zum Ort der Resorption. Ihre Aufgabe zur Resorption der Knochenmatrix üben sie in der Resorptionsphase aus (Li et al., 2006).

In jeder dieser Phasen zeigen Osteoklasten morphologische Unterschiede. Frei bewegliche Osteoklasten sind abgeflacht und nicht polarisiert. Ihre zelluläre Gestalt ist charakterisiert durch das Vorhandensein von Lamellipodien und des Podosomen-Komplex, bestehend unter anderem aus Aktin. Die Bewegung der Osteoklasten wird über diese Lamellipodien gesteuert. Reichen die Osteoklasten nun den Resorptionsort, reorganisieren sie ihr Zytoskelett. Dieser Prozess wird als Polarisation bezeichnet. Während der Polarisation werden zahlreiche Membrandomänen ausgebildet. Es kommt zur Bildung der sogenannten „ruffled border“, der „sealing zone“, sowie einer Resorptionsdomäne und einer basolateralen Membran (Vaananen

und Horton, 1995). Die „ruffled border“ und die „sealing zone“ können nur bei resorbierenden Zellen beobachtet werden (Kular et al., 2012).

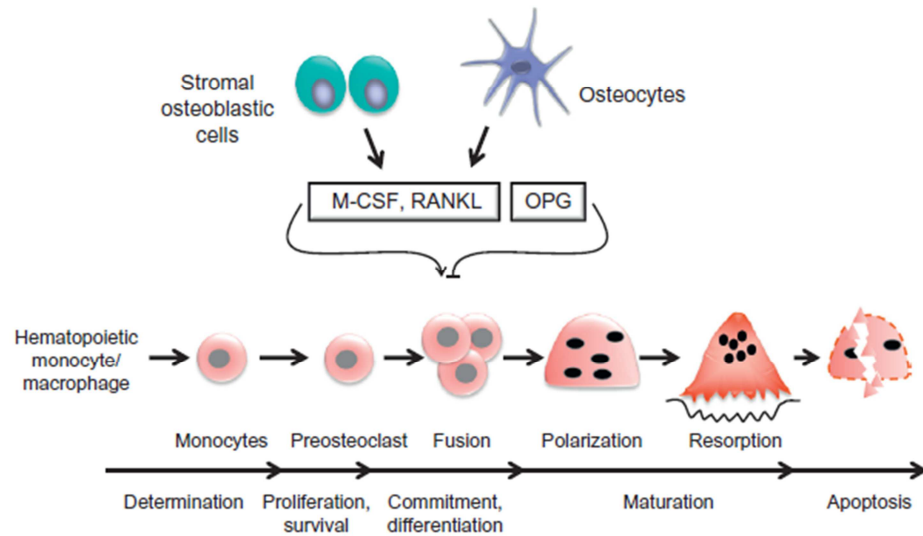


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Osteoklasten-Differenzierung (Bellido et al., 2014).

1.2. Knochenheilung

Der Knochen hat das Potential zur Heilung und der Regeneration nach Verletzungen oder nach operativen Eingriffen. Knochenheilung ist ein komplexer biologischer Prozess, welcher nach einem bestimmten Schema erfolgt und die Erhöhung des Expressionslevels von Tausenden von Genen bedingt. In beiden Prozessen, Verletzung oder operativer Eingriff, sind die Integration von Zellen und der Einfluss von lokal und systemisch wirksamen Faktoren (Wachstums- und Differenzierungsfaktoren), Hormonen, Zytokinen und die extrazelluläre Matrix involviert (Ai-Aqi et al., 2008; Tsiridis et al., 2007).

Der Heilungsprozess eines Knochens kann entweder durch direkte (primäre) oder indirekte (sekundäre) Frakturheilung erfolgen. Eine direkte Frakturheilung erlaubt das Wiederherstellen der Knochenstruktur durch umgehende Regeneration des Lamellenknochens und des Havers-Systems (Marsell und Einhorn, 2011). Die Bedingungen für diesen Typ von Knochenheilung sind dann gegeben, wenn beide Fraktarenden in Kontakt bleiben. Während der Regeneration kommt es zu keiner Kallusbildung und zu keiner Resorption von Knochenfragmenten (Baroli, 2009).

Der Großteil der Knochenbrüche heilt jedoch durch indirekte Frakturheilung. Diese Form der Regeneration geht mit einer Kallusbildung einher und setzt sich aus einer Kombination von intramembranöser und endochondraler Frakturheilung zusammen (Marsell und Einhorn, 2011;

Tsiridis et al., 2007). Diese Form der Heilung findet man vor allem bei fragmentierten Brüchen (z.B. Stuckbrüche, Trümmerbrüche) (Baroli, 2009; Marsell und Einhorn, 2011). Während bei der intramembranösen Ossifikation Knochengewebe ohne vorhergehende Bildung von Knorpelgewebe geformt wird, kommt es bei der endochondralen Ossifikation zur Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen zu Knorpelgewebe, welches durch Knochengewebe ersetzt und letztendlich auch umgebaut wird (Tsiridis et al., 2007).

Zeitlich kann dieser Heilungsprozess in vier sich überlappende Phasen gegliedert werden:

- 1) Hämatombildung und Entzündungsreaktion,
- 2) Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen und Differenzierung zu Chondrozyten und Osteoblasten,
- 3) Bildung von Knorpelgewebe und Substitution von Knorpelgewebe zu Knochengewebe und
- 4) anschließender Knochenumbau (Ai-Aql et al., 2008).

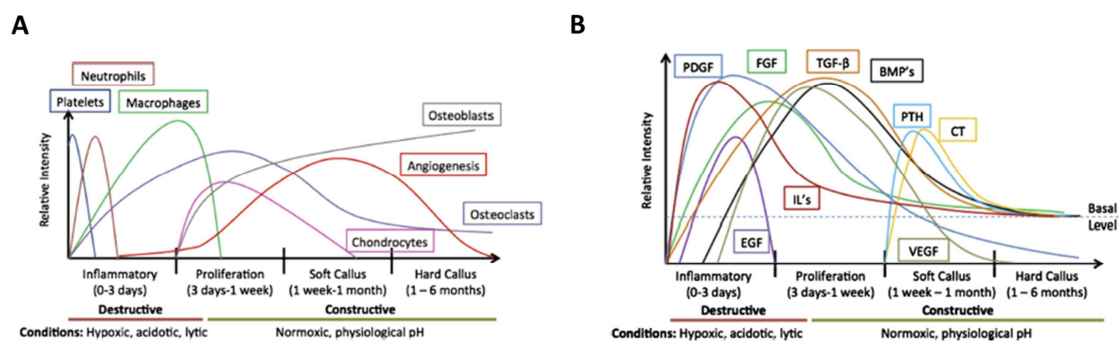


Abbildung 4: Graphische Darstellung der temporalen Aktivität essentieller Zelltypen (A) und dem Vorhandensein von biologischen Faktoren (B) während der Knochenheilung (Ai-Aql et al., 2008).

Unmittelbar nach einem Trauma kommt es einerseits zur Inangsetzung von Entzündungsreaktionen und andererseits durch die Ruptur lokaler Blutgefäße zur Hämatombildung. Diese beiden Prozesse sind verantwortlich für die Entstehung einer speziellen Mikroumgebung. Die dort vorherrschenden Bedingungen, wie Hypoxie und gesenkter pH-Wert, sind für die Funktionalität einiger Zelltypen wie Leukozyten, Lymphozyten, Makrophagen und Chondrozyten besonders wichtig. Diese erste Phase der Knochenheilung wird auch als destruktive Phase bezeichnet. Makrophagen und Osteoklasten entfernen abgestorbenes Gewebe und Knochenfragmente in organisierten Einheiten (Hollinger und Wong, 1996).

An diese Entzündungsphase schließt eine Proliferationsphase an. Diese zeichnet sich durch die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) aus. Stimulans für diese Neubildung sind hypoxische Zustände, die während der inflammatorischen Phase herrschen. Durch die Neubildung von Gefäßen können mesenchymale Stammzellen rekrutiert werden, welche sich zu Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren können. Während die Chondrozyten für die Bildung von Knorpelgewebe verantwortlich sind, produzieren Osteoblasten neuen Knochen, welcher durch das Wechselspiel zwischen Osteoklasten und Osteoblasten umgebaut werden kann. Aus dem Granulationsgewebe entsteht durch Bildung von Knorpelgewebe ein „soft callus“, welcher zur Stabilisierung der Fraktur dient. Die dort angesiedelten Chondrozyten werden später in den programmierten Zelltod geschickt und durch von Osteoblasten sezernierte Knochenmatrix ersetzt (Shrivats et al., 2014).

Durch das darauffolgende Remodelling erhält man im Laufe von Monaten bis Jahren wieder eine vollständig normale Knochenstruktur (Marsell und Einhorn, 2011).

1.3. Biomaterialien

Biomaterialien sind definiert als “any material, natural or man-made, that consists of whole or part of a living structure or a biomedical device that performs, augments, or replaces a function that has been lost through disease or injury” (Kundu et al., 2013).

Biomaterialien sollen biokompatibel und dadurch weder auf zellulären noch auf systemischen Level schädlich für ein biologisches System sein. Biokompatibel Materialien sollen eine körpereigene Immunreaktion hervorrufen und ihre beabsichtigte Funktion ausüben, ohne Nebenwirkungen zu verursachen. (Bose und Bandyopadhyay, 2013)

Biomaterialien werden verwendet um Gewebe-, Organ- oder andere Funktionen im Körper, welche infolge eines Traumas, einer Erkrankung oder einer Verletzung verloren gegangen sind, zu steigern, zu regenerieren oder zu ersetzen. In der medizinischen Praxis werden zur Geweberekonstruktion häufig Autotransplantate verwendet, wo Gewebe oder ein Organ von einem Ort im Körper an einen anderen verpflanzt wird. Eine potentielle Alternative ist die Anwendung von Allotransplantaten oder Xenotransplantaten. Dies sind Gewebe- oder Organtransplantate von einem Donor derselben Spezies bzw. von einem Donor einer anderen Spezies. Die Verwendung von Allotransplantaten und Xenotransplantaten ist aufgrund von Immunreaktionen und der schlechteren Biokompatibilität eingeschränkt und kann den Bedarf

nicht abdecken. Die Aufmerksamkeit lenkt sich aus diesen Gründen auf synthetische oder natürliche Biomaterialien (Bose und Bandyopadhyay, 2013).

Im Bereich der Knochenregeneration sollen Biomaterialien gewisse Kriterien erfüllen, um eine erfolgreiche Knochenheilung zu erzielen. Zu diesen Kriterien gehören die Osteogenität, Osteoinduktivität und die Osteokonduktivität. Osteogenität beschreibt den Prozess, der durch Osteoblasten bewerkstelligt wird. Osteoblasten synthetisieren Knochenmatrix, welche mineralisiert wird, wodurch neuer Knochen entsteht. Osteoinduktivität ist die Fähigkeit die Differenzierung von Osteoblastenvorläuferzellen oder undifferenzierter Zellen zu fördern. Osteokonduktivität ist die Eigenschaft eines Transplantates, das Anheften von Osteoblastenvorläuferzellen und Osteoblasten zu unterstützen. Ideale Knochentransplantate zeichnen sich durch das Vorhandensein aller dieser drei Eigenschaften aus (Shrivats et al., 2014).

Biomaterialien können in vier große Gruppen eingeteilt werden: Polymere, Metalle, Keramiken und Kompositmaterialien. Die Gruppe der Polymere stellt dabei die Größte dar. Diese Polymere können sowohl natürlichen als auch synthetischen Ursprunges sein (Bose und Bandyopadhyay, 2013).

1.3.1. Natürliches Polymer – Gelatine

Gelatine ist ein Biomakromolekül und entsteht bei der Hydrolyse von Kollagen, dem häufigsten Protein der Haut, des Bindegewebes, des Knorpelgewebes und des Knochens (Farris et al., 2010). Das Kollagenmolekül ist eine rechtsgängige Superhelix. Sie wird aus drei parallel angeordneten linksgängigen α -Helices aufgebaut, welche durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden (Haug et al., 2004). Die Primärstruktur (Abbildung 5) des Moleküls bildet ein sich wiederholendes Sequenzmotiv bestehend aus $(\text{Glycin-X-Y})_n$, wobei für X größtenteils Prolin und Y Hydroxyprolin vorzufinden ist. Dieses Sequenztriolett ist für die Ausbildung der helikalen Struktur verantwortlich (Nair und Laurencin, 2007).

Molekülketten können verschiedene Strategien gewählt werden. Zur Anwendung kommen sowohl physikalische Methoden (UV-Bestrahlung oder Erhitzen), als auch chemische Reagenzien, wie Formaldehyd, Glutaraldehyd, Carbodiimid oder Dextrandialdehyd (Ito et al., 2003).

Neben der Anwendung als Biomaterial im Bereich „Tissue Engineering and Regeneration“ findet Gelatine in der pharmazeutischen Industrie, Lebensmittelindustrie, Photographie Anwendung (Lou und Chirila, 1999).

1.4. Synthetisch abbaubare Polymere

Zu der Gruppe der synthetisch abbaubaren Polymeren zählen mehrere Familien mit verschiedenen Eigenschaften, welche bestimmend für ihre Anwendung sind (Abbildung 6) (Samavedi et al., 2014). In diesem Teil wird speziell auf jene Polymere fokussiert, die Bestandteil des Scaffoldmaterials sind.

Synthetic Degradable Polyesters	Current Major Research Applications
Poly(glycolic acid) (PGA), poly(lactic acid) (PLA) and copolymers	Barrier membranes, drug delivery, hormone delivery, guided tissue regeneration (in dental applications), orthopedic applications, vascular/urological stents, staples, sutures, injectable fillers, dura mater substitutes, skin replacement materials, tissue engineering
Poly(hydroxybutyrate) (PHB), poly(hydroxyvalerate) (PHV), and copolymers thereof	Long-term drug delivery, orthopedic applications, stents, artificial skin, surgical patching materials for congenital heart defects, sutures
Polycaprolactone (PCL)	Long-term drug delivery, implantable contraceptive drug devices, orthopedic applications, staples, stents
Polydioxanone (PDS)	Fracture fixation in non-load-bearing bones, sutures, wound clips
Other Synthetic Degradable Polymers	
Polyanhydrides	Drug delivery
Polycyanoacrylates	Adhesives, drug delivery
Poly(amino acids) and "pseudo"-poly(amino acids)	Drug delivery, tissue engineering, orthopedic applications, stents, anti-adhesion barriers
Poly(ortho ester) (POE)	Drug delivery, and stents
Polyphosphazenes	Blood contacting devices, drug delivery, skeletal reconstruction, vaccine adjuvants
Poly(propylene fumarate) (PPF)	Orthopedic applications
Poly(trimethylene carbonate) (PTMC)	Sutures, orthopedic applications

Abbildung 6: Abbaubare synthetische Polymere und deren Applikation (Treiser et al., 2013).

Polyester sind eine spezielle Klasse von Polymeren, welche durch ihre Biokompatibilität und ihrer Abbaubarkeit in weiten Bereichen der regenerativen Medizin eingesetzt werden (Samavedi et al., 2014).

Polycaprolacton (PCL) ist eines dieser aliphatischen Polyester, welches ausführlich für die Anwendung als Biomaterial untersucht wurde. Sowohl das Monomer (ϵ -Caprolacton), als auch das Polymer können als nicht toxisch und biokompatibel angesehen werden. Der Abbau erfolgt

unter physiologischen Bedingungen durch Hydrolyse. Unter bestimmten Gegebenheiten kann auch ein enzymatischer Abbau erfolgen. Im Vergleich zu anderen Polyestern wie Polyglykolsäure oder Polymilchsäure erfolgt der Abbau deutlich langsamer. Polycaprolacton ist daher für das Design von implantierbaren Systemen zur Langzeitanwendung geeignet (Zhang et al., 2014).

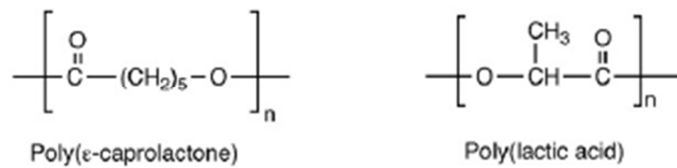


Abbildung 7: Chemische Struktur von Polycaprolacton (PCL) und Polymilchsäure (PLA) (Treiser et al., 2013).

Polymilchsäure (PLA) ist ein chirales Molekül und existiert in zwei stereoisomeren Formen. D-PLA und L-PLA sind die beiden stereoregulären Polymere (Zhang et al., 2014). Die L-Isoform und besonders die racemische Form (D,L-Polymilchsäure) werden routinemäßig in Bereichen der regenerativen Medizin eingesetzt. Durch ihren hohen Zug- und Elastizitätsmodus, wird Polymilchsäure häufig für die Verankerung von Knochenimplantaten verwendet. In wässrigem Milieu wird PLA nur langsam abgebaut. Der Abbaurate ist aber auch abhängig vom Molekulgewicht. Polymere mit einem niedrigeren Molekulgewicht werden schneller abgebaut. Wie auch bei Polycaprolacton, ist der zugrunde liegende Abbaumechanismus die Hydrolyse der Esterbindungen (Samavedi et al., 2014).

2. Materialien und Methoden

2.1. Versuchsplan und Versuchsaufbau

In der ersten Phase der praktischen Arbeit stand die Gewinnung von mineralisationsfähigen Maus-Osteoblasten durch Modifikation einer bereits etablierten Methode und die Analyse knochenspezifischer Marker wie Aktivität der Alkalischen Phosphatase, Kollagensynthese und Matrixmineralisation im Vordergrund. Weiterfolgend wurden die daraus resultierenden Kenntnisse und erarbeiteten Techniken zur Untersuchung von Biomaterialien und deren Einfluss auf Differenzierungsprozess und Mineralisation knochenbildender Zellen herangezogen.

Knochenspezifische Parameter aber auch Zellproliferation bzw. Zellviabilität wurden von zwei verschiedenen Biomaterialtypen bestimmt. Getestet wurden einerseits synthetische Biomaterialien, bezeichnet als LCMs, und andererseits verschiedener Gelatintypen in Form von Beschichtungen. Für sämtliche Experimente, die zur Charakterisierung der LCM-Materialien im Rahmen des European Union Seventh Framework Programme „InnovaBone“ durchgeführt wurden, kamen primäre Maus-Osteoblasten zur Anwendung. Für die Bestimmung von Effekten verschiedener Gelatintypen wurde eine Maus-Osteoblasten-Zelllinie, MC3T3-E1, herangezogen.

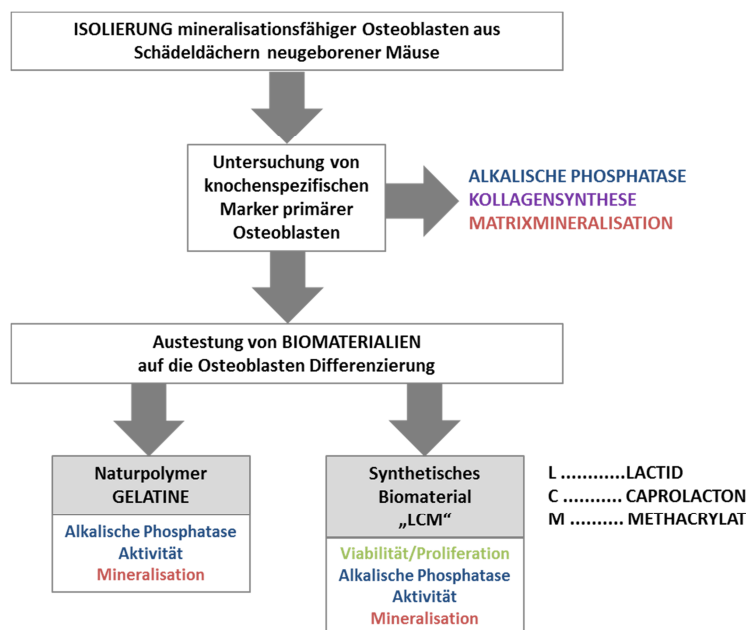


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsplans und Versuchsaufbaues.

Unabhängig von dem Parameter, der analysiert wurde, waren im Versuchsaufbau sowohl eine Kontrollgruppe, als auch eine „Treatment“-Gruppe inkludiert. Bei der Kontrollgruppe wurden Zellen auf einer „tissue culture treated“-Oberfläche oder auf den jeweiligen Materialien mit 10% α -MEM als Kulturmedium kultiviert. Bei der „Treatment“-Gruppe erfolgte die Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium zur Initialisierung der Differenzierung von Osteoblasten. Zur Untersuchung der Zellviabilität und Zellproliferation wurde ausschließlich eine Kultivierung in 10% α -MEM gewählt. Jede Gruppe und auch jedes Material wurde zumindest in Triplikaten getestet.

2.2. Zelltypen

2.2.1. Primäre Maus-Osteoblasten

2.2.1.1. Isolierung von Osteoblasten aus Schädeldächern neugeborener Mäuse

Die angewandte und modifizierte Methode zur Isolierung der Osteoblasten aus Mauskalvarien basiert auf dem Protokoll der „Isolation and Culture of Bone Cells from Neonatal Mouse Calvaria“ publiziert im „Bone Research Protocol 2012“ (Bakker and Klein-Nulend). Bereits im Jahre 1964 begannen Peck (Peck et al., 1964) und seine Arbeitsgruppe primäre Knochenzellen aus fetalen und neugeborenen Ratten mittels Kollagenase zu gewinnen.

Kurz zusammengefasst wurden Schädeldächer (Calvarien) von 1 bis 2 Tage alten Mäusen isoliert und mit einer Enzymlösung bestehend aus 0,1% Kollagenase und 0,2% Dispase II in α -MEM im Schüttelinkubator bei 37°C für 10 min inkubiert. Der erste Überstand wurde verworfen. Mit den Überständen (II-IV) von weiteren 3 Inkubationsschritten wurde separat oder gesammelt weitergearbeitet. Die gewonnenen Zellen wurden bis zur Subkonfluenz auf Petrischalen kultiviert und mit einer Splittingrate von entweder 1:4 oder 1:5 mit Trypsin-EDTA-Lösung (1X) einmal passagiert.

Die Anzahl an primären Zellen wurde mittels „Casy“-Zellzählgerät bestimmt. Anschließend wurden diese bis zu ihrer Verwendung in Einfriermedium (40% α -MEM, 50% FCS hi und 10% DMSO) in flüssigem Stickstoff eingefroren. .

2.2.1.2. Kultivierung

Primäre Maus-Osteoblasten wurden in einer Zelldichte von 41 600 Zellen/cm² oder 65 000 Zellen/cm² – für MTS-Assay - ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in α -MEM, ergänzt mit 10% FCS hi und 1% Penicillin/Streptomycin, bei 37°C und 5% CO₂. Ein Mediumtausch wurde dreimal pro Woche durchgeführt.

Experimente, welche der Untersuchung von Einflüssen auf die Osteoblasten-Differenzierung dienen, wurden ausschließlich mit primären Maus-Osteoblasten der Fraktion III durchgeführt. Für die Beurteilung der Zellviabilität bzw. Zellproliferation wurde eine gemischte Zellpopulation herangezogen.

2.2.2. MC3T3-E1 – Osteoblasten-Zelllinie

MC3T3-E1 repräsentieren eine populäre Osteoblastenzelllinie vom Präosteoblastentyp aus Mauskalvarien. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 33 300 Zellen/cm² ausgesät. Kultiviert wurden die Zellen in α -MEM, ergänzt mit 10% FCS hi und 1% Penicillin/Streptomycin, bei 37°C und 5% CO₂. Ein Mediumtausch wurde dreimal pro Woche durchgeführt.

2.2.3. NIH3T3 – Fibroblasten-Zelllinie

NIH3T3 bezeichnet eine Zelllinie von embryonalen Fibroblasten der Gattung *Mus musculus* (ATCC® CRL-1658™). Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 41 600 Zellen/cm² ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in α -MEM, ergänzt mit 10% FCS hi und 1% Penicillin/Streptomycin, bei 37°C und 5% CO₂. Das Kulturmedium wurde dreimal pro Woche getauscht.

2.3. Mineralisationsassay

Für die Bildung von Mineralisation in vitro sind vor allem der Zusatz von Ascorbinsäure (Vitamin C) und unter anderem auch die Zugabe von Phosphat, in organischer oder anorganischer Form, erforderlich. Das am meisten verwendete Phosphat ist das organische β -Glycerophosphat (β -GP). Vitamin C nimmt als Kofaktor der Hydroxylierung von Lysin und Prolin eine wichtige Funktion in der Biosynthese der extrazellulären Matrix ein, β -GP als Phosphatquelle, welches zur Einlagerung in die extrazelluläre Matrix zur Verfügung steht.

Vitamin C fungiert aber nicht nur als Kofaktor der Kollagensynthese oder als Förderer dieser, sondern steigert nebenher auch die Zellproliferation, die Genexpression der Alkalischen Phosphatase und die Proteinsynthese (Czekanska et al., 2012; zur Nieden et al., 2003).

Zelltyp	Kulturbedingungen für Matrixmineralisation
Primäre Maus Osteoblasten	50 µg/ml Vit. C 5 mM β-GP
MC3T3-E1	50 µg/ml Vit. C 10 mM β-GP

Tabelle 1: Kulturbedingungen für Osteoblastenkulturen zur Initialisierung von Matrixmineralisation.



Abbildung 9: Darstellung des Kultivierungsschemas zur Initialisierung von Differenzierung und der Fähigkeit zur Matrixmineralisation. Knochenspezifische Parameter wurden während eines Kultivierungszeitraumes von maximal 21 Tagen bestimmt. Kulturmedium = α-MEM + 10% FCS hi; Mineralisationsmedium = α-MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 µg/ml) + β-GP (5 mM bzw. 10 mM)

2.4. Naturpolymer- Gelatine

2.4.1. Herstellung der Gelatinelösungen

Es wurden 5% wässrige Gelatinelösungen verschiedener Gelatintypen hergestellt.

Gelatintyp	Spezifikationen
Gelatin from porcine skin, Type A	300 g Bloom
Gelatin from porcine skin, Type A	90 – 110 g Bloom
Gelatin from bovine skin, Type B	225 g Bloom
Gelatin bovine, granular, TypeB	Keine genauen Spezifikationen.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Gelatintypen einschließlich ihrer Spezifikationen.

Die jeweilige Gelatine wurde in ein Glasgefäß mit der gewünschten Menge an Milli Q Wasser vermengt und anschließend im Autoklaven bei 121°C für 15 min. sterilisiert.

Sobald die Gelatinelösungen nach dem Autoklavieren abgekühlt waren, wurden diese im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert. Keine dieser Lösungen wurde über einen Monat hinaus aufbewahrt.

2.4.2. Herstellung der Gelatine – und BSA-Beschichtungen

Es wurden sowohl Beschichtungen der einzelnen Gelatintypen als auch 50:50 Mischungen verschiedener Typen hergestellt.

Gelatinekompositionen zur in vitro Testung:

- Gelatine Typ A 300 g
- Gelatine Typ A 90-110 g
- Gelatine Typ A 300 g/90-110 g
- Gelatine Typ B 225 g
- Gelatine Typ B 225 g/300 g
- Gelatine Typ B 225 g/90-110 g
- Gelatine p.a.

Dafür wurden 300 µl der jeweiligen Lösungen pro Well einer 24-Well Platte hineinpipettiert. Nach vollständigem Abdampfen des Wassers unter sterilen Bedingungen konnte nach 2 Tagen ein Film aus Gelatine beobachtet werden. Diese Beschichtungen wurden ohne weitere Behandlung für Experimente herangezogen.

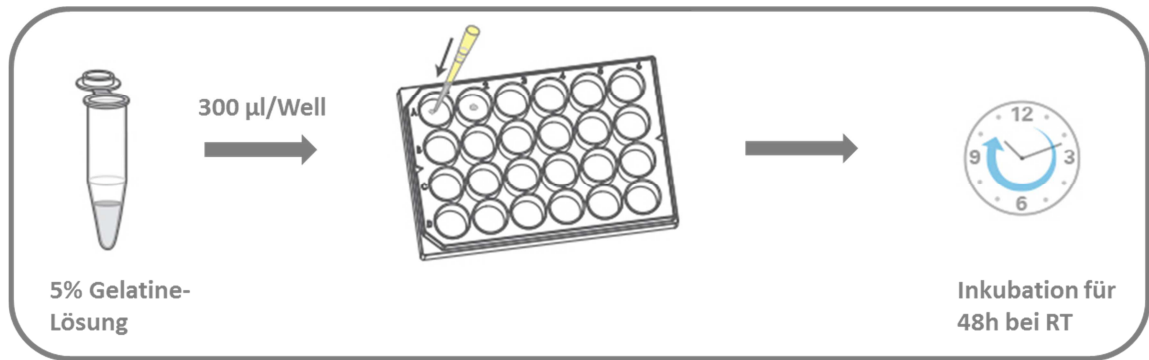


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Herstellung der Gelatinebeschichtungen.

Für die Beschichtungen mit BSA wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS mit Calcium und Magnesium verwendet. Hierfür wurden 500 µl der BSA Lösung pro Well einer 24-Well Platte hineinpipettiert und 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und nachfolgend 2-mal mit PBS gewaschen.

2.5. Synthetische Biomaterialien „LCM“

Im Zuge des geförderten European Union Seventh Framework Programmes “InnovaBone” wurden Ausgangsmaterialien zur Scaffoldherstellung in Form von Plättchen mit einem Durchmesser von 14 mm zur Charakterisierung der Osteoblasten-Differenzierung und Mineralisierung ausgetestet.

Die Hauptkomponenten stellen Lactid, Caprolacton und Methacrylat dar, deren Konzentrationen variieren. Die Herstellung erfolgte mittels UV-Polymerisation.

Material- Typ	Zusammensetzung	
	Anteil Lactid : Caprolacton	Methacrylat
LCM3	8 : 2	85%
LCM6	9 : 1	40%

Tabelle 3: Tabellarische Übersicht über die verhältnismäßige Zusammensetzung der einzelnen Materialtypen.

Um eine möglichst geringe Zellanhaftung rund um die Plättchen zu erhalten, wurden für die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase und der Matrixmineralisation ausschließlich Suspensionskulturplatten verwendet. Zusätzlich wurden die Materialien über Nacht vor Aussaat der Osteoblasten mit 10% α -MEM im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ vorinkubiert. Im Gegensatz zu den LCM3 Materialien bekamen jene vom LCM6-Typ eine 4-tägige Vorbehandlung mit PBS um Komponenten, die eventuell zur Azidifizierung des Kulturmediums bzw. Mineralisationsmedium führen, auszuwaschen.

Für die Durchführung des Zellviabilitäts- und Zellproliferationsassays in einer 96-Well Zellkulturplatte wurden aus den ursprünglichen Plättchen ($\varnothing=14$ mm) mittels eines Lochkartenstanzers 5 mm Plättchen ausgestanzt. Die erhaltene Größe füllte das gesamte Well aus, wodurch hier mit einer „tissue-culture treated“- Oberfläche gearbeitet wurde. Nach beidseitiger UV-Bestrahlung für 15 min. im Laminar Air Flow wurden diese in gleicher Art und Weise wie bereits oben beschrieben vorbehandelt.

2.6. Färbung aktiver Alkalischer Phosphatase

Aktive Alkalische Phosphatase proliferierender Osteoblasten wurde durch eine Färbung mit einer BCIP/NBT Lösung (SigmaFast™ BCIP®/NBT) sichtbar gemacht. Die Methode und die Durchführung wurden aus einem Protokoll der Firma Promocell GmbH, Deutschland übernommen.

2.6.1. Durchführung der Färbung

Für die Färbung der Alkalischen Phosphatase wurden die Zellen mit warmen PBS gewaschen und mit 3,7% gepufferten Formaldehydlösung für 60 sec. fixiert. Nach einem zusätzlichen Waschschrift mit einem Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS-TC) wurden die Zellen mit der BCIP/NBT Lösung bei Raumtemperatur für 10 min. inkubiert. Die gefärbten Kulturen wurden zur Beurteilung der Färbung und Aktivität eingescannt.

Die Färbelösung beinhaltet ein Substrat (BCIP = 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat), welches durch die Alkalische Phosphatase hydrolysiert werden kann. Durch diese Hydrolyse entsteht ein Produkt, welches tautomerisiert und dadurch dimerisiert. Die dadurch anfallenden

Wasserstoffionen reduzieren das ebenfalls enthaltene NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsalz) und erzeugen ein nichtlösliches Diformazan (Anderson, 2008). Zellen mit aktiver Alkalischen Phosphatase sind dadurch dunkelblau bis violett gefärbt. Je höher die Aktivität der Alkalischen Phosphatase ist, desto intensiver die Farbintensität. Die Beurteilung der Farbintensität wurde optisch vorgenommen.

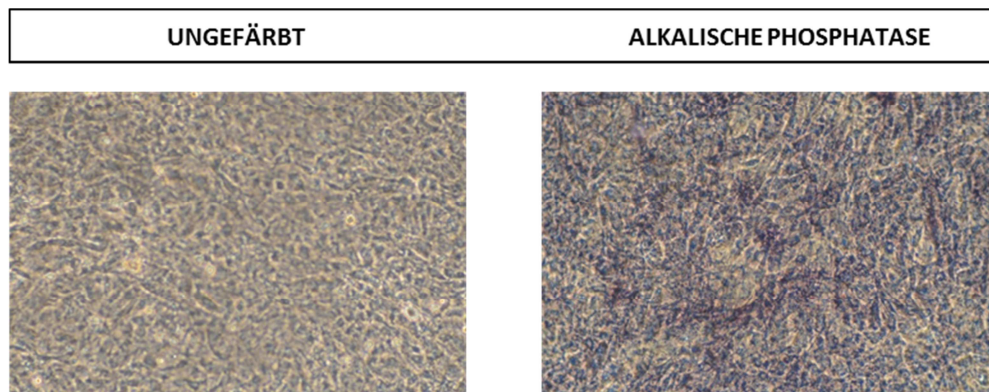


Abbildung 11: Alkalische Phosphatase Färbung primärer Maus-Osteoblasten. Repräsentative Aufnahmen einer 4 Tage alten Kultur (links= ungefärbt; rechts= positive Färbung für ALP; Originalvergrößerung x 10).

2.7. Alizarin Red S Färbung

Alizarin Red S ist ein anionischer Antrachinonfarbstoff, der einen löslichen Chelatkomplex mit Calcium bildet (Smith und Hafer, 2010). Die Anwendung von Alizarin Red S ist im Allgemeinen sehr vielseitig. Seit Jahrzehnten wird es für die Evaluierung von Calcium in der Zellkultur verwendet. Eine Quantifizierung kann durch Extraktion des gebundenen Farbstoffes erfolge (Gregory et al., 2004). Das Färbeprotokoll und die anschließende quantitative Auswertung basiert auf einer etablierten Methode des Labors.

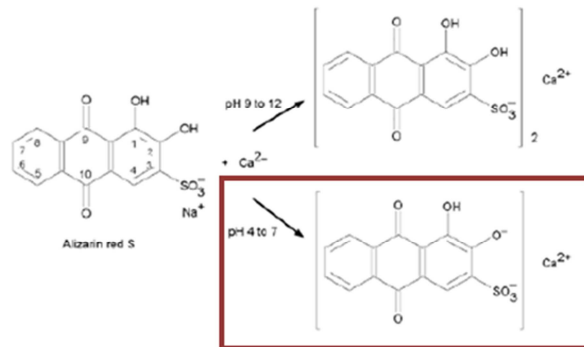


Abbildung 12: Chemische Struktur von Alizarin Red S und Darstellung des Chelatkomplexes mit Calcium (Smith and Hafer, 2010)

2.7.1. Durchführung der Färbung

Für die Färbung mit Alizarin Red S wurde der Zelloberflächen mit kaltem PBS gewaschen, danach mit eiskaltem 70% Alkohol auf Eis bei 4°C für 1 h fixiert und nach einem erneuten Waschschriff mit Milli Q Wasser mit einer 40 mM Alizarin Red S Lösung für 10 Minuten unter sanftem Schütteln gefärbt. Um unspezifische Färbungen zu entfernen wurde vier Mal mit Milli Q Wasser gewaschen. Nach Waschen mit kaltem PBS wurden die gefärbten Kulturen eingescantet.

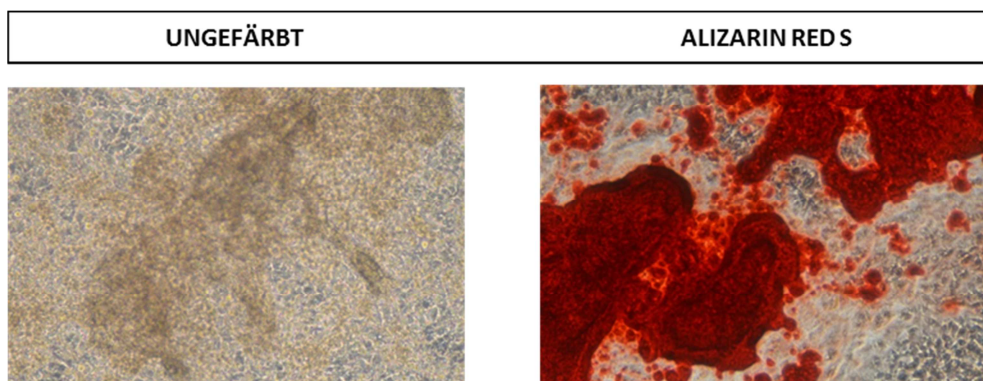


Abbildung 13: Alizarin Red S Färbung primärer Maus-Osteoblasten. Repräsentative mikroskopische Bilder einer 21 Tage alten Kultur (links= ungefärbt; rechts= gefärbt mit Alizarin Red S; Originalvergrößerung x 10).

2.7.2. Quantifizierung des gebundenen Farbstoffes

Für die Quantifizierung des gebundenen Farbstoffes wurde dieser mit 10% Cetylpyridiniumchloridlösung extrahiert. Die Absorption wurde gegen eine Alizarin Red

Standardkurve bei 520 nm vermessen (Abbildung 14). Ein Aliquot des extrahierten Farbstoffes wurde hierfür 1:10 oder 1:20 mit 10% Cetylpyridiniumchloridlösung verdünnt. Die Absorptionsmessung erfolgte als Doppelbestimmungen in einer 96-Well Platte (Volumen = 300 µl/Well).

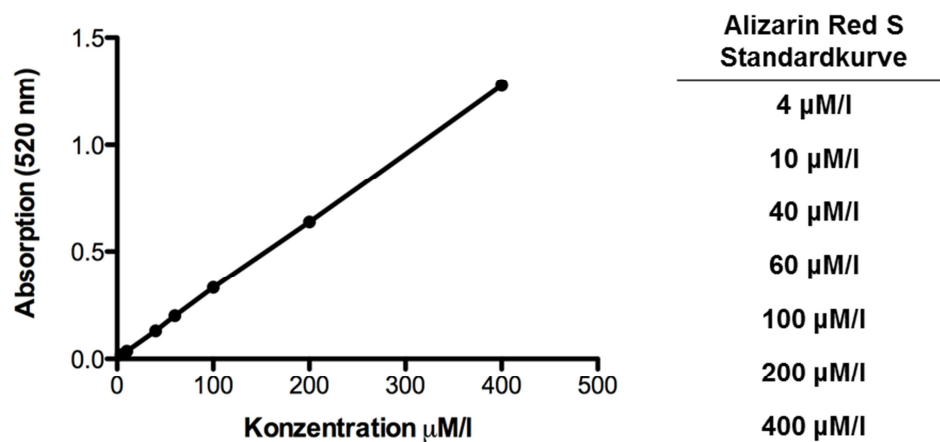


Abbildung 14: Alizarin Red S Standardkurve zur Berechnung der Konzentrationen in µM/l.

2.8. Sirius Red und Fast Green Färbung

Sirius Red gehört zu den Azofarbstoffen und bindet an die helikalen Strukturen von Kollagen. Jedoch unterscheidet Sirius Red nicht zwischen den verschiedenen Kollagen-Typen (Typ I bis V).

Fast Green gehört zu der Gruppe der Triarylmethanfarbstoffe und dient zur Detektion von nicht-kollagenen Proteinen. Sämtliche Informationen zu den Farbstoffen und dem Kit, als auch die Durchführung der Färbung, wurden aus dem der Firma Chondrex beigelegtem Protokoll entnommen.

2.8.1. Durchführung der Färbung

Vor der Färbung wurde erstmals der Zelllayer mit warmen PBS gewaschen und mit einer kalten Fixierlösung bestehend aus Ethanol und 5% Eisessig fixiert. Schließlich wurde die Kulturen mit der „ready to use“ Färbelösung der Firma Condrex für 30 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Nach Entfernen der Färbelösung und gutem Waschen mit Milli Q Wasser wurden die gefärbten Kulturen unter dem Mikroskop betrachtet und eingescannt.

Für die Quantifizierung der gebundenen Farbstoffe wurden diese mittels eines Extraktionspuffers eluiert. Ein Aliquot (300 µl) der extrahierten Lösungen wurde anschließend bei 540 nm und 605 nm vermessen.



Abbildung 15: Sirius Red und Fast Green Färbung primärer Maus-Osteoblasten. Mikroskopische Detailaufnahmen einer 16 Tage alten Kultur. Dargestellt links die ungefärbte Kultur im Gegensatz dazu rechts: (A) Anfärbung von Kollagen (rosa-rot= Sirius Red) und (B) Färbung von nicht-kollagenen Proteinen (grün= Fast Green; Originalvergrößerung x 10).

2.8.2. Berechnung

Zur die Berechnung der Menge an Kollagen und nicht-kollagenen Proteinen wurden folgende Formeln herangezogen:

$$Kollagen = \frac{OD\ 540 - (OD\ 605 * 0,291)}{0,0378}$$

$$Nicht - kollagene\ Proteine = \frac{OD\ 605}{0,00204}$$

Nach Einsetzen der Absorptionmesswerte in die jeweiligen Formeln erhält man ein Ergebnis in µg/Well (Wachstumsareal NUNC® 24-Well Zellkulturplatte= 1,8 cm²). Die Darstellung der Resultate erfolgt in µg/cm².

2.9. Zellviabilitäts – und Zellproliferationsassay – MTS-Assay

Lebende Zellen reduzieren MTS [3-(4,5-Dimethylthiazol,2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2-H-tetrazol] zu einem gefärbten Formazanprodukt, welches durch Absorptionsmessung mit einem Spektrophotometer detektiert werden kann. Das gebildete Formazanprodukt ist im Zellkulturmedium löslich und direkt proportional zur Anzahl an lebenden Zellen.

Die Reduktion des Tetrazols zum Formazan wird vermutlich durch NADPH oder NADH von Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen bewerkstelligt (Promega Corporation, 2012).

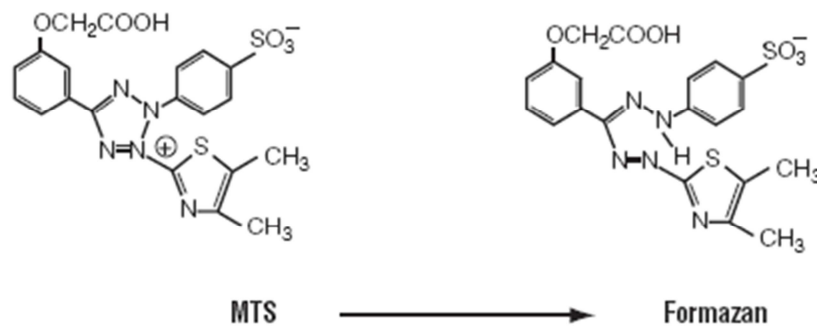


Abbildung 16: Chemische Struktur des MTS-Reagenzes und des gebildeten Formazanproduktes (Promega Corporation, 2012).

Zur Beurteilung der Zellviabilität bzw. Zellproliferation wurden 20 μl CellTiter96TM One Solution Reagent pro Well einer 96-Well Zellkulturplatte, welche die zu bestimmende Probe und 100 μl Kulturmedium beinhaltet, hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Absorption bei 490 nm gemessen. Um einer möglichen Absorption durch die Materialien entgegenzuwirken, wurden für die spektrophotometrische Bestimmung die gesamten 120 μl (100 μl Kulturmedium + 20 μl CellTiter96TM One Solution Reagent) mittels Mikroliterpipette abgenommen und in einer neuen Platte vermessen.

Durch Komponenten im Kulturmedium kann ebenfalls eine gewisse „Background“-Absorption auftreten. Um diesbezüglich eine Korrektur vorzunehmen, wurde eine Dreifachbestimmung mit denselben Volumina an Kulturmedium und CellTiter96TM One Solution Reagent nur ohne Zellen durchgeführt. Der Mittelwert dieser drei Absorptionsmessungen wurde von allen anderen Messwerten subtrahiert.

2.10. Reagentienherstellung

2.10.1. 40 mM Alizarin Red S Lösung (pH 4,2)

Für die Herstellung von 10 ml einer 40 mM Alizarin Red S Lösung wurden 139,92 mg Alizarin Red S eingewogen und anschließend in 10 ml Milli Q Wasser am Magnetrührer gelöst. Für die Einstellung des pH Wertes (pH 4,2) wurde eine 1% Ammoniumhydroxidlösung verwendet.

2.10.2. Ascorbinsäurelösung (Vitamin C)

Für die Herstellung von 10 ml einer 100X Stocklösung (= 1% Lösung) wurden 50 mg Ascorbinsäure in 10 ml PBS ohne Kalzium und Magnesium gelöst. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert (0,22 µm Filter), portioniert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

2.10.3. Herstellung der BCIP/NBT Lösung

Für die Herstellung der BCIP/NBT- Lösung wurde eine Tablette (SigmaFast™ BCIP/NBT) in 10 ml Milli Q Wasser durch Vortexen kurz vor dem Gebrauch aufgelöst. Die Lösung wurde bis zur ihrer Verwendung unter Lichtausschluss gelagert.

2.10.4. 10% Cetylpyridiniumchloridlösung

Für die Herstellung von 100 ml Lösung wurden 10 g Cetylpyridiniumchlorid in einem Messkolben eingewogen, mit Phosphatpuffer pH 7 (10mM) auf 100 ml aufgefüllt und unter Erwärmen (37°C) vollständig gelöst.

2.10.5. Fixierlösung (3,7% Formaldehydlösung)

Die Fixierlösung (3,7% Formaldehydlösung) wurde durch eine 1:10 Verdünnung einer 37% Formaldehydlösung mit PBS hergestellt.

2.10.6. β -Glycerophosphat Lösung

Für die Herstellung von 10 ml einer 100X Stocklösung (= 1% Lösung) wurden 2,16 g β -Glycerophosphat eingewogen und in 10 ml Milli Q Wasser gelöst. Nach der Sterilfiltration (0,22 μ m Filter) wurde die Lösung portioniert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

2.10.7. Phosphat-Puffer-Saline (PBS)

Für die Herstellung von 1000 ml einer Phosphat-Puffer-Saline-Lösung in zehnfacher Konzentration (10X) wurden 2,00 g KCl, 2,00 g KH_2PO_4 , 80,00 g NaCl und 27,07 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ eingewogen und in bidestilliertem Wasser gelöst.

Nach der Verdünnung auf eine Konzentration von 1X wurde die Lösung sterilfiltriert (0,2 μ m Filter) und bei 4°C gelagert.

2.10.8. Phosphat-Puffer-Saline mit Calcium und Magnesium (PBS + $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$)

Für die Herstellung von 1000 ml einer Phosphat-Puffer-Saline Lösung mit $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ (10X) wurden 2,00 g KCl, 2,00 g KH_2PO_4 , 80,00 g NaCl, 1,00 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und 14,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ eingewogen und in bidestilliertem Wasser gelöst. Nach Einstellung des pH-Wertes auf pH 2-3 mit 5M HCl wurde 1,00 g CaCl_2 hinzugefügt. Am Ende wurde mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Nach der Verdünnung auf eine Konzentration von 1X wurde der pH-Wert mit 5N NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

2.10.9. Phosphatpuffer (pH 7, 10 mM)

Für den Phosphatpuffer wurden 2 Lösungen hergestellt:

- Lösung A: Es wurden 6,95 g KH_2PO_4 in 250 ml Wasser gelöst.
- Lösung B: Es wurden 8,91 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 250 ml Wasser gelöst.

Für die Herstellung einer Stammlösung wurden 19,5 ml der Lösung A und 30,5 ml der Lösung B mit Milli Q Wasser auf 100 ml verdünnt. Ein Aliquot dieser Stammlösung wurde anschließend 1:10 mit Milli Q verdünnt und der pH Wert genau auf 7 eingestellt.

2.10.10. Trypsin-EDTA-Lösung (10X)

Für die Herstellung von 100 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung in zehnfacher Konzentration (10X) wurde Trypsin 0,50 g in bidestilliertem Wasser gelöst. Danach wurde EDTA 0,155 g und NaCl 0,90 g hinzugegeben und auf einem pH von 7,4-7,6 eingestellt.

Die hergestellte 10X Lösung wurde sterilfiltriert (0,22 µm Filter) und bei -20°C gelagert. Bei Bedarf wurde eine 1:10 Verdünnung (1X) durch Zugabe von PBS-TC (1X) hergestellt.

2.10.11. Waschpuffer

Für die Bereitung des Waschpuffers wurde Tween 20 zu PBS ohne Calcium und Magnesium hinzupipettiert. Die finale Konzentration an Tween 20 betrug 0,05%.

2.11. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse und die graphische Darstellung der erhaltenen Daten erfolgte mittels „Prism 5.0“. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM ausgedrückt.

Für die Beurteilung der statistischen Signifikanz fanden t-Test, „One-way Anova“ mit anschließendem „Tukey Post-hoc“ Test, sowie „Two-way Anova“ mit anschließendem „Bonferroni Post-hoc“ Test Anwendung. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant erachtet.

2.12. Reagenzien, Material, Geräte

Tabelle 4: Reagenzien

Substanzname	Hersteller	Chargennummer
Albumin, bovine, Fraction V; 96 – 99% Albumin [Cohn Fraction V, JACS, 68, 459 (1946)]	Sigma-Aldrich	Lot#28F-0982
Alizarin Red S	Sigma-Aldrich	Lot#030M1776
Ammoniumhydroxidlösung 25%	Sigma-Adrich	
L-Ascorbinsäure	Merck GmbH,	Lot#841F971227
CASYton	Roche Diagnostics	Lot#11686500
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega	Lot#0000027201
Cetylpyridiniumchlorid	Sigma-Aldrich	Lot#069K0338
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich	Lot#99H3655
Dispase II from Bacillus polymyxa grade II	Boehringer Mannheim	Lot#85568720-73
Essigsäure, 100 % (Eisessig)	Sigma-Aldrich	Lot#K17216063
Ethanol		
Fetal Calf serum, FCS	Gibco Life Technologies Bio Whittaker	Lot#41Q4031K Lot#5SB0004
Flüssiger Stickstoff	TU Wien	
Formaldehydlösung, 37 %, Ph. Eur	Roth	Lot#460163407
Gelatin from bovine skin, 225 g Bloom, Type B	Sigma-Aldrich	Lot#051M0012V
Gelatin from porcine skin, 300 g Bloom, Type A	Sigma-Aldrich	Lot#SLBB0914V
Gelatin from porcine skin, 90 - 110 g Bloom, Type A	Sigma-Aldrich	Lot#BCBF3362V
Gelatin bovine for analysis, granular, Type B	ACROS organics	Lot#A0313412
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich	Lot#SLBB5458V
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Merck	Lot#A531473438

Kaliumchlorid zur Analyse	Merck	Lot#K33076636428
Kollagenase from Clostridium histolyticum, Typ 1	Sigma-Aldrich	Lot#95H6843
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich	Lot#43H0301
α -MEM + Ribonucleosides + Deoxyribonucleosides	Gibco Life Technologies	Lot#1126817 Lot#1178507
di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	Merck	Lot#K33351980
Natriumhydroxid	Merck	
Penicillin/Streptomycin-Lösung, 10000 μ g/ml	Biochrom AG	Lot#330 FF
Salzsäure	Merck	
SigmaFast™ BCIP®/NBT tablet	Sigma-Aldrich	Lot#SLBD5142V
Sirius Red/Fast Green Collagen Staining Kit	Chondrex, Inc.	Lot#022813
Trypsin (1:250) Pulver	Gibco Life Technologies	Lot#3052676
Tween® 20 Polyoxyethylen(20)sorbitan-monolaurat	Sigma Aldrich	Lot# 71K0085

Tabelle 5: Material

Name	Hersteller
24-Well Zellkulturplatten	Iwaki® Cell biology Nunc Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA Greiner® Bio-One International AG, Österreich
24-Well Suspensionskulturplatten	Greiner® Bio-One International AG, Österreich
96-Well Zellkulturplatten	Greiner® Bio-One International AG, Österreich
Einwegspritzen 5 ml/10 ml	Becton Dickinson
Faltenfilter (d= 110 mm)	Schleicher&Schuell GmbH
Reaktionsgefäße „Eppendorf“ 1,5 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Reaktionsgefäße „Eppendorf“ 2 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner® Bio-One International AG, Österreich
Messpipetten, Glas	Brand, Deutschland
Mikropipetten	Labsystems Finnpipette

Mr. Frosty® Freezing Container	Thermo Fisher Scientific wissenschaftliche Geräte GmbH, Österreich
Petrischalen (d = 10 cm) tissue culture treated	Iwaki® Cell biology
Pipettenspitzen	VWR International, Österreich Greiner® Bio-One International AG, Österreich
Sterile Einweg-Kunststoffpipetten	Costar® Corning Life Sciences, MA, USA
Sterilfilter Millex®GV 0,22 µm	Millipore
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Greiner® Bio-One International AG, Österreich
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Greiner® Bio-One International AG, Österreich

Tabelle 6: Geräte

Name	Hersteller
Analysenwaagen	MC 210 P, Sartorius GFL 3032, Sartorius
Autoklav	TOMY SX-300E High pressure steam sterilizer
CASY Zellzähler	Schärfe Systems, Deutschland
Digitalkamera für Mikroskop	D 5100, Nikon, Japan
Eismaschine	AF103, Scotsman Ice Systems, USA
Infinite 200 Pro Microplate Reader	Tecan/ Seriennummer: 1010001524
Inkubator	HERA cell 240, Kendro
Multiskan MS	Labsystems Typ 352/ Seriennummer: 352007578
Lichtmikroskop	TMS, Nikon, Japan
Magnetrührer	Ikamag RCT, Janke & Kunkel, Deutschland
pH-Meter	713 Metrohm, Schweiz
Pipetboy Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann
Scanner Epson Perfection 1200PHOTO	Epson
Schüttelinkubator	GFL 2032, Heraeus instruments, Deutschland
Sterilwerkbank (Laminar Air Flow)	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Deutschland
Schüttler Swip	Edmund Bühler Typ KL-2

	Seriennummer: 3320IE0518
Vortex	AG Vortex Genie, Bender
Wasserbad	GFL 1086, Aigner
Zentrifuge	Z323 K, Hermle

3. Resultate

3.1. Austestung isolierter Osteoblastenfractionen auf Mineralisationsfähigkeit

Die bei der Isolierung gewonnenen primären Zellen sind nicht alle zu 100% der Osteoblastenlinie angehörig. Die erhaltene Zellpopulation kann auch Fibroblasten oder andere Zelltypen enthalten (Bakker und Klein-Nulend, 2012) . Zur Bewertung der Fähigkeit extrazelluläre Matrix zu mineralisieren, wurden die getrennt isolierten Fraktionen mit osteogenen Differenzierungsmedien mit unterschiedlichem Gehalt an β -Glycerophosphat versetzt. Die mineralisierte Matrix wurde am Tag 14 mittels Alizarin Red S gefärbt. Die Quantifizierung des gebunden Farbstoffes erfolgte nach einem Extraktionsverfahren.

Sowohl bei der Übersicht der gefärbten Kulturen (Abbildung 17B), als auch bei der quantitativen Auswertung (Abbildung 18, Tabelle 7) ist ersichtlich, dass es bei Fraktion II, unabhängig von der Zusammensetzung des Mineralisationsmediums, keinen signifikanten Anstieg an Matrixmineralisation gab. Im Gegensatz dazu resultierte bei der Fraktion III in allen Gruppen mit osteogenen Differenzierungsmedien Mineralisation. Besonders deutlich war dies beim Differenzierungsmedium mit Vit. C (50 $\mu\text{g/ml}$) und β -GP (5 mM) zu beobachten. Ein signifikanter Anstieg an Mineralisation bei Fraktion III ($p < 0,001$) ergab sich auch bei einer β -GP Konzentration von 10 mM.

Bei Fraktion IV konnte ebenfalls die Bildung von „bone nodules“ in allen Gruppen mit Mineralisationsmedium beobachtet werden. Im Vergleich zur Fraktion III konnten die isolierten Zellen von Fraktion IV, wie in Abbildung 17B erkennbar ist, nur in geringerem Ausmaß extrazelluläre Matrix mineralisieren. Die quantitative Auswertung zeigte einen signifikanten Anstieg mineralisierter Matrix ($p < 0,05$) in den Gruppen, bei denen dem Kulturmedium, neben Vit. C (50 $\mu\text{g/ml}$), β -Glycerophosphat in einer Konzentration von 5 mM bzw. 10 mM zugesetzt wurde.

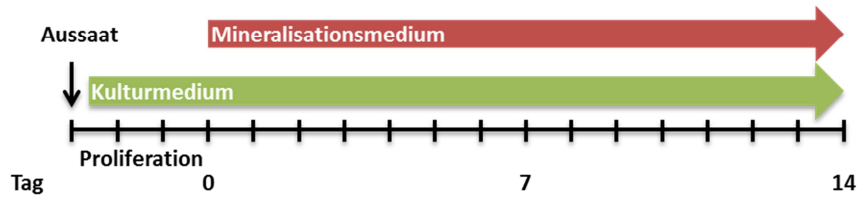
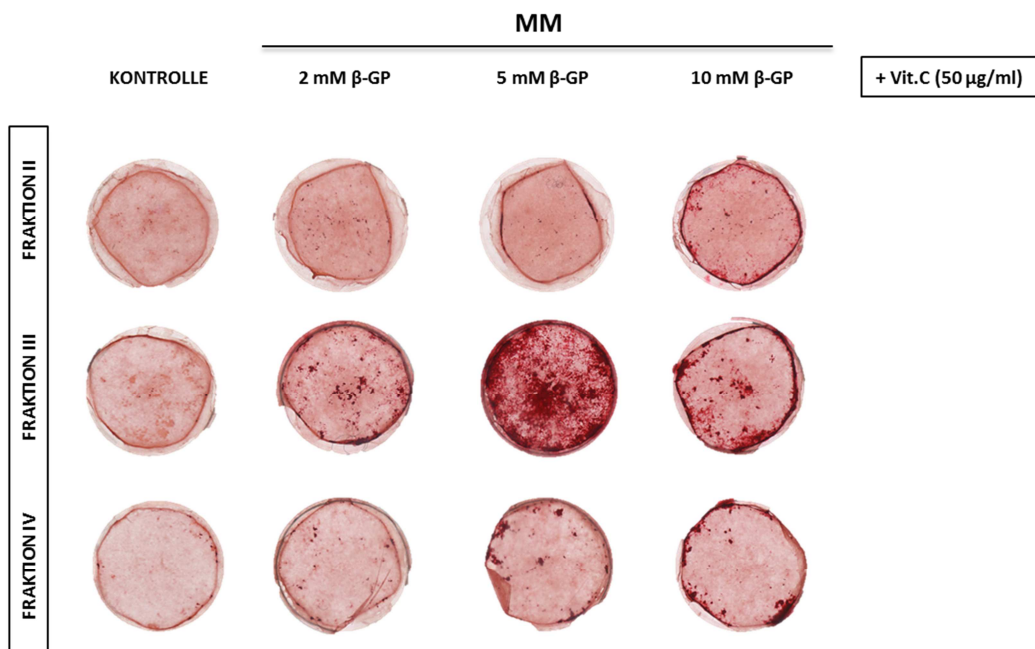
A**B**

Abbildung 17: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues (A) und Abbildungen repräsentativer Alizarin Red S gefärbter Kulturen der OB-Fraktionen (II-IV) am Tag 14 (B). Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + der jeweils angegeben Konzentration an β -GP (mM)

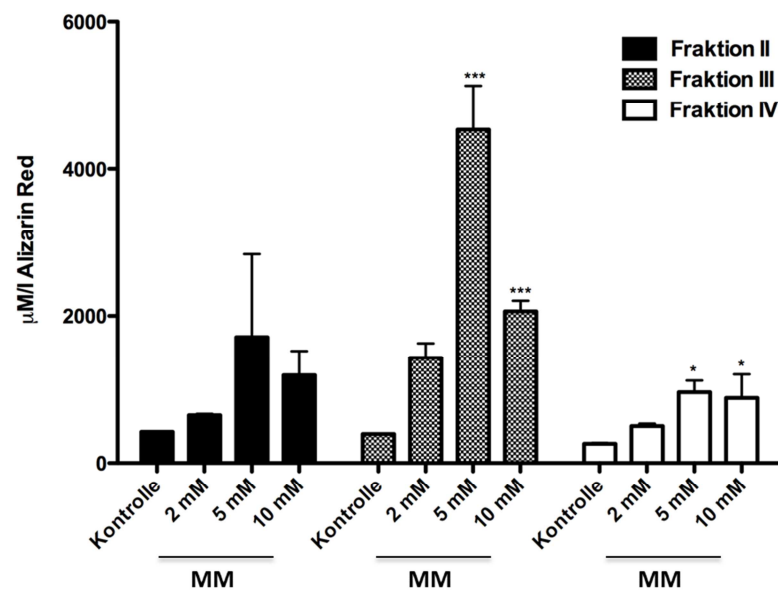


Abbildung 18: Wirkung von verschiedenen β -GP Konzentrationen auf die Mineralisationsfähigkeit von OB. Quantitative Resultate der Alizarin Red S Färbung der OB-Fraktionen II- IV angegeben in $\mu\text{M/l}$ (Mittelwert \pm SEM; $n=3$). Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 $\mu\text{g/ml}$) + der jeweils angegeben Konzentration an β -GP (mM);* $p < 0,05$ vs. Kontrolle bzw. *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle der jeweiligen Fraktion

Fraktion II	$\mu\text{M/l}$ Alizarin Red S
Kontrolle	423,0 \pm 7,81
2 mM	648,8 \pm 18,90
5 mM	1771,0 \pm 1130,00
10 mM	1193,0 \pm 330,00

Fraktion III	$\mu\text{M/l}$ Alizarin Red S
Kontrolle	393,6 \pm 1,32
2 mM β -GP	1428,0 \pm 199,80
5 mM β -GP	4531,0 \pm 601,10
10 mM β -GP	2068,0 \pm 144,30

Fraktion IV	$\mu\text{M/l}$ Alizarin Red S
Kontrolle	263,7 \pm 12,00
2 mM β -GP	503,1 \pm 33,54
5 mM β -GP	961,5 \pm 159,40
10 mM β -GP	883,1 \pm 320,10

Tabelle 7: Quantitative Ergebnisse der Alizarin Red S Färbung angegeben in $\mu\text{M/l}$ gebundenem Farbstoff (Mittelwert \pm SEM; $n=3$).

3.2. Bestimmung von knochenspezifischen Markern primärer Maus-Osteoblasten

3.2.1. Aktivität der Alkalische Phosphatase

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase zu verschiedenen Zeitpunkten der Osteoblasten-Differenzierung wurde mittels einer Färbemethode (SigmaFast™ BCIP/NBT) detektiert. Maus-Osteoblasten wurden mit und ohne Zugabe von Vit. C (50 µg/ml) und β-GP (5 mM) kultiviert. Die Fixierung und Färbung der Kulturen erfolgte am Tag 1, Tag 4, Tag 7 und Tag 10. Als Negativkontrolle wurden NIH3T3 Zellen, eine Fibroblasten-Zelllinie, verwendet.

Bei den NIH3T3 Zellen konnte während des gesamten Zeitverlaufs keine aktive Alkalische Phosphatase nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist bei optischer Betrachtung der gefärbten Osteoblastenkulturen und deren mikroskopischen Aufnahmen ein Anstieg an Alkalischer Phosphatase Aktivität im Laufe des Differenzierungsprozesses zu verzeichnen. Zu einer Steigerung der ALP-Aktivität kam es sowohl bei den Osteoblasten ohne Mineralisationsmedium (OB KM), als auch bei jenen mit Mineralisationsmedium (MM). Beim Vergleich dieser beiden Gruppen ist zu beobachten, dass durch Zusatz von osteogenem Differenzierungsmedium ein deutlich schnellerer Anstieg der ALP-Aktivität erfolgte als bei Osteoblasten ohne Mineralisationsmedium. Besonders deutlich war dieser Effekt am Tag 4 (Abbildung 19A und B) zu beobachten.

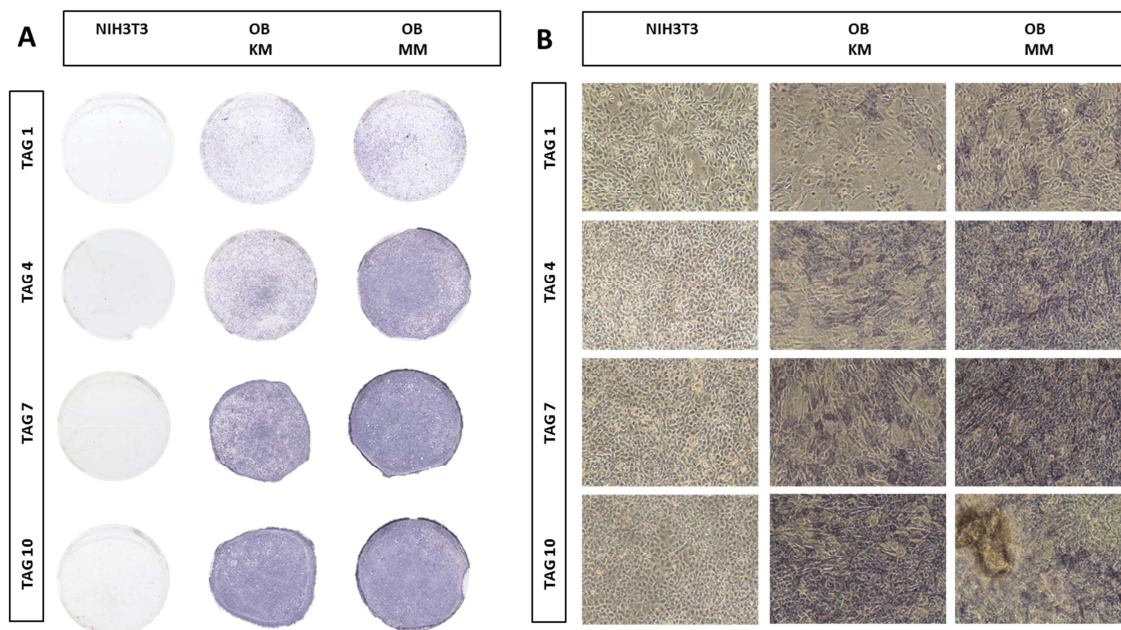


Abbildung 19: Zeitverlauf der Alkalischen Phosphatase Aktivität primärer Osteoblasten. (A) Übersicht repräsentativer Aufnahmen gefärbter Kulturen. (B) Mikroskopische Detailaufnahmen (Originalvergrößerung x 10). KM = Kontrolle, α-MEM + 10% FCS hi; MM = α-MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 µg/ml) + β-GP (5 mM)

	Relative Farbintensität*			
	TAG 1	TAG 4	TAG 7	TAG 10
<i>NIH3T3</i>	-	-	-	-
<i>OB KM</i>	+	++	++	+++
<i>OB MM</i>	++	+++	+++	+++

Tabelle 8: Beurteilung der relativen Farbintensität der Alkalischen Phosphatase Färbung .

*Die relative Farbintensität wurde optisch bewertet (n=3); +++ stark positive Färbung; ++ positive Färbung; + schwach positive Färbung; - keine Färbung

3.2.2. Mineralisation von extrazellulärer Matrix

Calciumeinlagerungen in extrazellulärer Matrix wurden mittels Alizarin Red S Färbung visualisiert. Nach anschließender Extraktion des gebundenen Farbstoffes wurde dieser photometrisch quantifiziert. Primäre Osteoblasten wurden zur Initialisierung von Mineralisation unter Zugabe von Vit. C (50 µg/ml) und β-GP (5 mM) kultiviert Als Kontrolle dienten Osteoblasten, welche nur in Kulturmedium (α-MEM + 10% FCS hi) kultiviert wurden. Die Fixierung und Färbung der Kulturen erfolgte am Tag 14 und Tag 21.

Der Zusatz von osteogenem Differenzierungsmedium führte zu einem deutlichen Anstieg von Mineralisation am Tag 14 und Tag 21, welche optisch durch eine Rotfärbung, infolge einer Chelatkomplexbildung mit Calcium, sichtbar ist (Abbildung 20A und B).

Die semiquantitative Konzentrationsbestimmung mittels Extraktion ergab einen signifikanten Anstieg ($p < 0,001$) an Mineralisation sowohl am Tag 14, als auch am Tag 21. Die Konzentration an gebundenem Alizarin Red S, gemessen in $\mu\text{M/l}$, zeigte von Tag 14 auf Tag 21 nahezu eine Verdoppelung (Tabelle 9).

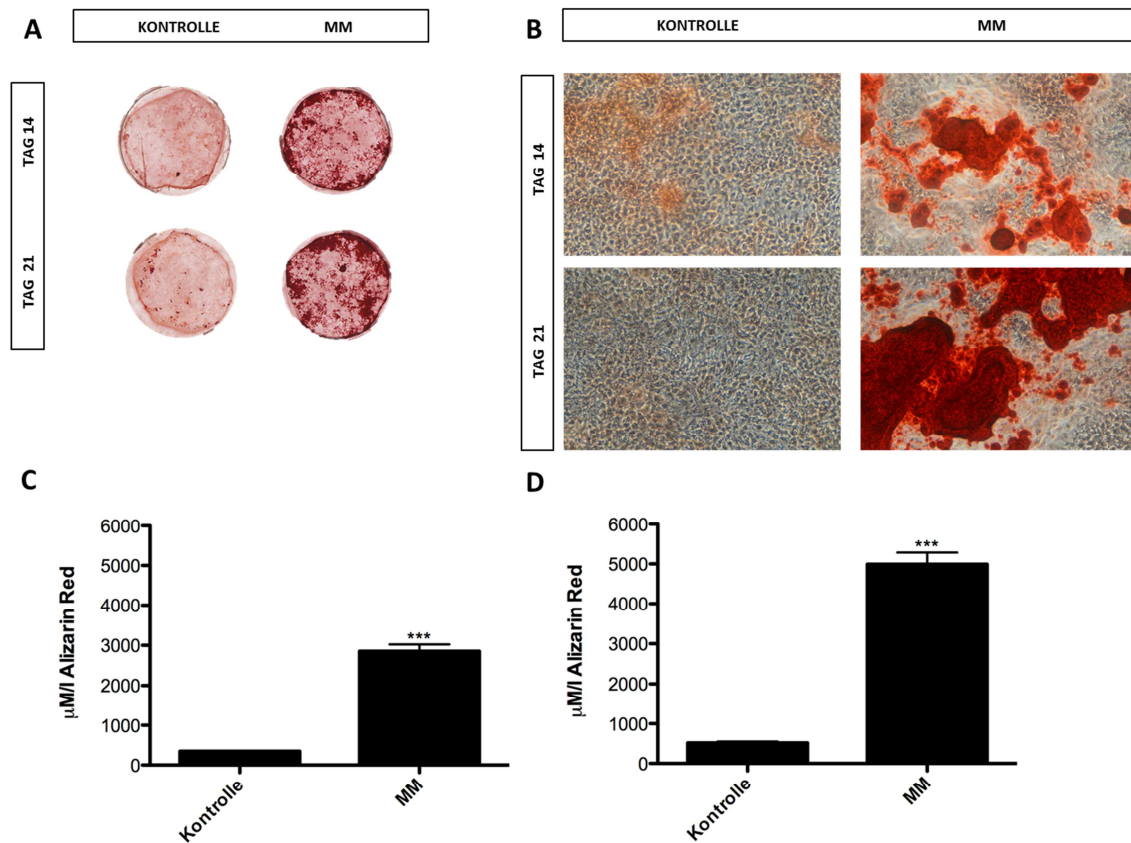


Abbildung 20: Alizarin Red S Färbung von Maus-Osteoblasten einschließlich Quantifizierung des gebundenen Farbstoffes nach Extraktionsverfahren am Tag 14 und Tag 21. (A) Calciumeinlagerungen visualisiert durch Alizarin Red S Färbung. (B) Mikroskopische Detailaufnahmen Alizarin Red S gefärbter Kulturen (Originalvergrößerung x 10). Graphische Darstellung der Konzentration an gebundenem Farbstoff am (C) Tag 14 und (D) Tag 21 ($\mu\text{M/l}$ Alizarin Red S, Mittelwert \pm SEM, $n=4$). Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 $\mu\text{g/ml}$) + β -GP (5 mM); *** $p < 0,001$

	Kontrolle	MM
Tag 14	346,8 ± 12,25	2852,0 ± 171,40
Tag 21	515,6 ± 37,37	4994,0 ± 293,30

Tabelle 9: Quantitative Ergebnisse der Alizarin Red S Färbung angegeben in $\mu\text{M/l}$ gebundenem Farbstoff (Mittelwert \pm SEM, n=4).

3.2.3. Sekretion von Kollagen und nicht-kollagenen Proteinen

Zur Bestimmung der Kollagen- und Proteinsynthese (nicht-kollagene Proteine) wurden primäre Osteoblasten mit und ohne Mineralisationsmedium kultiviert, an verschiedenen Zeitpunkten fixiert und mit Sirius Red/Fast Green gefärbt. Für eine Quantifizierung wurden die Farbstoffe extrahiert und die Absorption bei 540 nm und 605 nm gemessen.

Bei der Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium kam es zu einem Anstieg der Kollagensynthese im Vergleich zur Kontrolle, siehe Abbildung 5A und Abbildung 6A. Während am Tag 3, in Bezugnahme auf die erhaltenen quantitativen Ergebnisse (Tabelle 10), noch kein Unterschied zu sehen war, zeigte sich ab Tag 9 ein signifikanter Anstieg ($p < 0,001$) der Kollagensynthese. Die Kollagenproduktion stieg besonders zwischen Tag 3 und Tag 9 an und erreichte ein Plateau ab Tag 12.

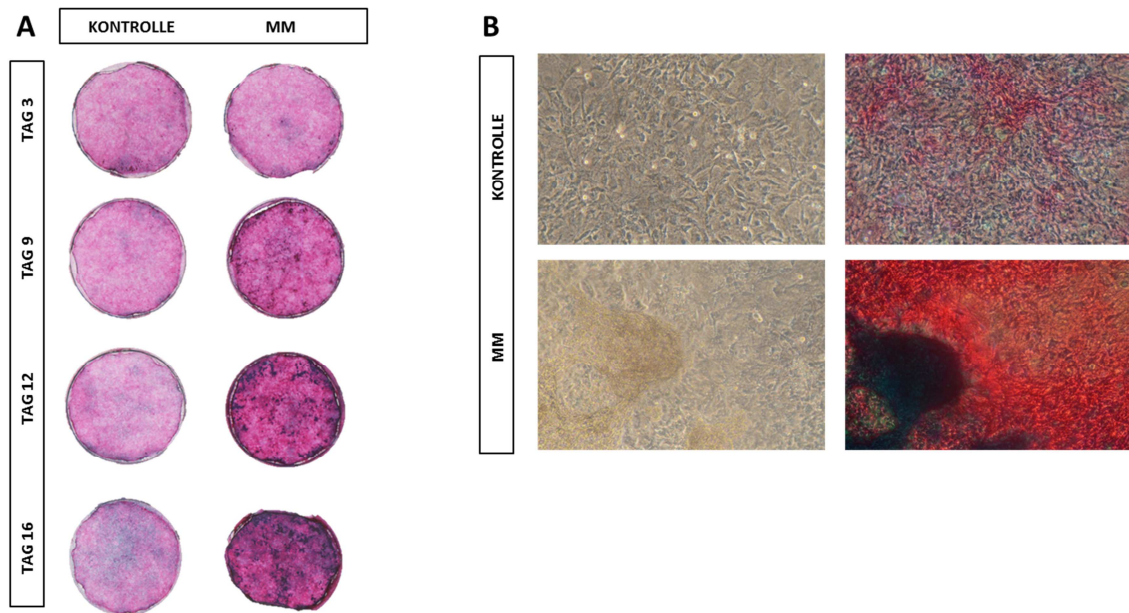


Abbildung 21: Kollagensynthese und Bildung von nicht-kollagenen Proteinen primärer Osteoblasten, dargestellt als Färbung mit Sirius Red und Fast Green. (A) Repräsentative Abbildungen gefärbter Kulturen an unterschiedlichen Zeitpunkten. (rosa-rot = Sirius Red, Kollagenfärbung, grün = Fast Green, nicht-kollagener Proteine) (B) Mikroskopische Detailaufnahmen der Sirius Red/Fast Green Färbung am Tag 16 (Originalvergrößerung x 10).
 Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + β -GP (5 mM)

Wie auch bei der Kollagensynthese, kam es bei der Bildung von nicht-kollagenen Proteinen zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,001$) ab Tag 9, welcher im Gegensatz zur Kollagensynthese keine Plateauphase erreichte (Abbildung 22B). Hier erfolgte vielmehr eine fortlaufende Steigerung ab Tag 9 bis zu Tag 16.

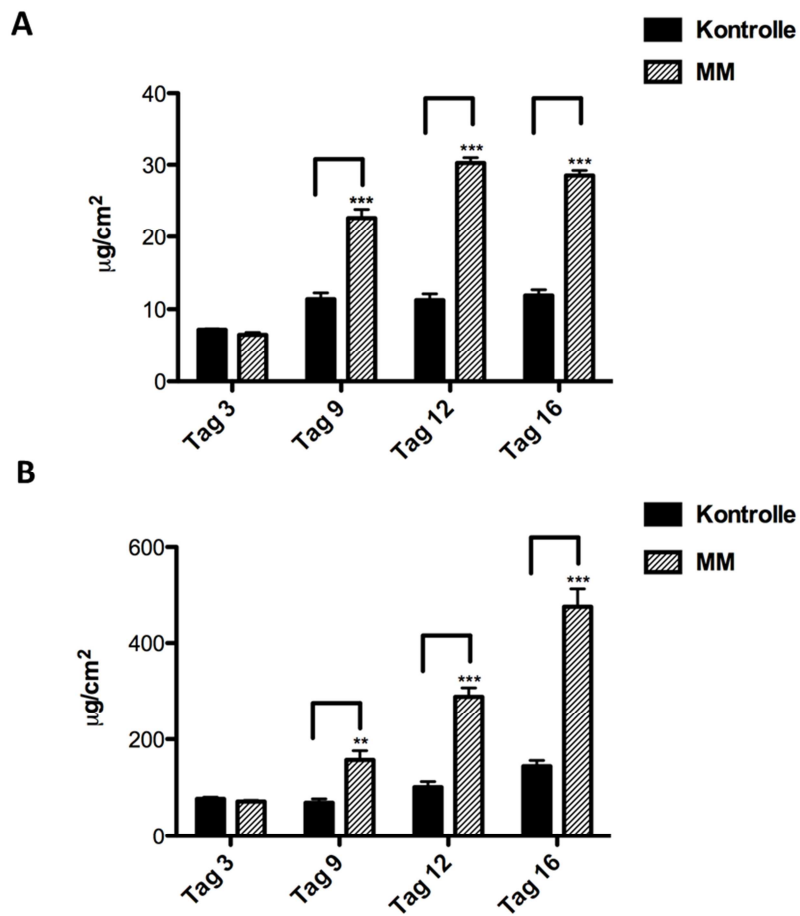


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Ergebnisse der spektrophotometrischen Bestimmung von der Kollagensekretion und der Bildung nicht-kollagener Proteine primärer Osteoblasten gemessen an verschiedenen Zeitpunkten. Graphische Übersicht der (A) Kollagensekretion und der (B) Bildung nicht-kollagener Proteine ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$; Mittelwert \pm SEM; n=4); Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + β -GP (5 mM); ** p<0,01; *** p<0,001

	Kontrolle	MM
Tag 3	7,17 \pm 0,15	6,48 \pm 0,35
Tag 9	11,38 \pm 0,88	22,61 \pm 1,20
Tag 12	11,26 \pm 0,86	30,24 \pm 0,74
Tag 16	11,90 \pm 0,80	28,51 \pm 0,71

Tabelle 10: Quantitative Ergebnisse der Kollagensynthese an verschiedenen Zeitpunkten berechnet in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Mittelwert \pm SEM; n=4).

	Kontrolle	MM
Tag 3	77,04 ± 3,61	71,64 ± 2,61
Tag 9	69,32 ± 8,09	157,07 ± 19,39
Tag 12	101,45 ± 11,53	288,65 ± 18,77
Tag 16	144,11 ± 12,09	475,19 ± 38,96

Tabelle 11: Quantitative Ergebnisse der Bildung von nicht-kollagenen Proteinen an verschiedenen Zeitpunkten berechnet in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Mittelwert \pm SEM; n=4).

3.3. Austestung von Biomaterialien

3.3.1. Effekt verschiedener Gelatinebeschichtungen auf die Differenzierung und Mineralisation von MC3T3-E1

3.3.1.1. Alkalische Phosphatase Aktivität von MC3T3-E1 Zellen auf Gelatinebeschichtungen

Um Beeinflussungen oder Veränderungen auf den Differenzierungsprozess zu untersuchen, wurden MC3T3-E1 Zellen auf Beschichtungen unterschiedlicher Typen von Gelatine mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Zellen mit aktiver Alkalischer Phosphatase wurden mittels Färbung (SigmaFast™ BCIP/NBT) an verschiedenen Zeitpunkten (Tag 3, Tag 7 und Tag 10) sichtbar gemacht.

Unabhängig vom Extraktionsverfahren und der Gelierkraft der Gelatine konnte an sämtlichen Zeitpunkten bei allen Beschichtungen aktive Alkalische Phosphatase beobachtet werden. Über den gesamten Zeitverlauf gab es sowohl innerhalb der verschiedenen Gelatinegruppen, als auch bei den Kontrollgruppen (BSA und Kontrolle auf TC-Oberfläche) nur sehr geringe oder keine Unterschiede in der Intensität des gebildeten blauen Farbstoffes (Abbildung 23).

Es konnte kein Unterschied in der Aktivität der Alkalischen Phosphatase zwischen den einzelnen Gelatintypen und der Kontrolle (TC-Oberfläche) beobachtet werden. Die Aktivität der ALP wurde weder inhibiert, noch deutlich erhöht.

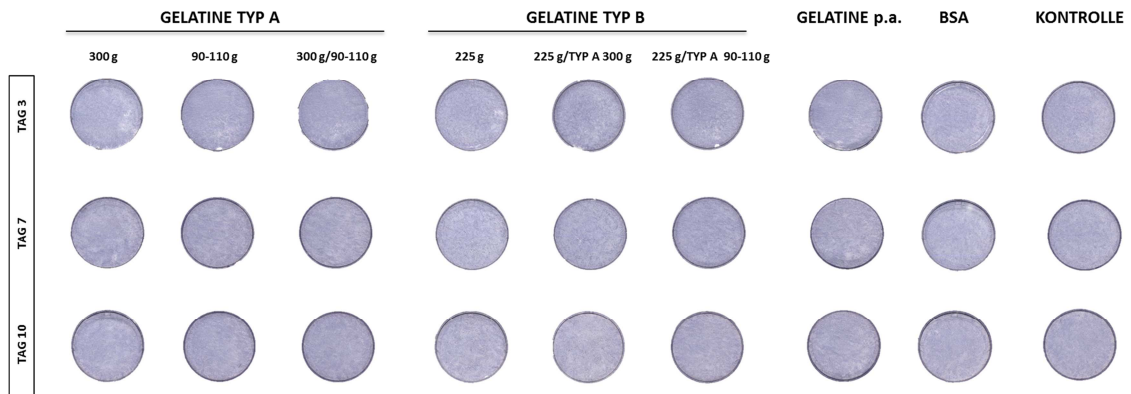


Abbildung 23: Alkalische Phosphatase Aktivität von MC3T3-E1 Zellen auf verschiedenen Gelatinebeschichtungen bestimmt an unterschiedlichen Zeitpunkten. Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + β -GP (5 mM)

3.3.1.2. Einflussnahme von Beschichtungen mit Gelatine auf die Matrixmineralisation von MC3T3-E1 Zellen

Für die Beurteilung des Einflusses von verschiedenen Gelatintypen auf die Matrixmineralisierung wurden MC3T3-E1 Zellen kultiviert und am Tag 21, nach Zusatz von Vitamin C (50 μ g/ml) und β -Glycerophosphat (10 mM), mittels Alizarin Red S gefärbt. Eine Quantifizierung erfolgte nach Extraktion des gebundenen Farbstoffes mit Cetylpyridiniumchlorid.

Sowohl bei Betrachtung der gefärbten Kulturen, als auch bei der graphischen Darstellung zeigt sich ein Anstieg an mineralisierter Matrix in allen Gelatinegruppen im Vergleich zur Kontrolle. Ein signifikanter Anstieg ($p < 0,001$) war vor allem bei der Gelatine Typ B und bei der 1:1 Mischung Gelatine Typ B/ Gelatine Typ A 300 g zu verzeichnen (Abbildung 24A und B).

Gewinnungsmethode und physikochemische Eigenschaften der Gelatine zeigten einen Einfluss auf die Fähigkeit extrazelluläre Matrix zu mineralisieren. Sämtliche Beschichtungen mit Gelatine Typ B, obgleich sie als alleinige Komponente oder in Form einer 50:50 Mischung mit Gelatine Typ A (300 g bzw. 90-110 g) verwendet wurde, begünstigten die Matrixmineralisation in einem höheren Ausmaß als bei der Verwendung von Gelatine Typ A (300g; 90-110g bzw. deren 50:50 Mischung). Signifikante Unterschiede ergaben sich in Anbetracht der Mineralisationsfähigkeit zwischen Gelatine Typ A 300 g vs. Gelatine Typ B ($p < 0,01$) bzw. Gelatine Typ B/A 300 g ($p < 0,001$) und zwischen Gelatine Typ A 90-110 g vs. Gelatine Typ B/A 300 g ($p < 0,05$). Beschichtungen aus einer 50:50 Mischung beider Gelatine Typ A Arten zeigten keine signifikanten Unterschied zu jenen, die aus Gelatine Typ B und aus einer 50:50 Mischung mit Gelatine Typ A (300 g bzw. 90-110 g) bestanden.

Neben der Gewinnungsmethode hatte auch die Gelierfähigkeit, angegeben in Bloom g, innerhalb der Experimenten-Gruppe der Gelatine Typ A Arten einen Einfluss auf die Matrixmineralisation. Gelatine Typ A 300 g, welche eine bessere Gelierfähigkeit besitzt, zeigte bezogen auf die erhaltenen quantitativen Daten eine geringere Mineralisationsrate als Gelatine Typ A 90-110 g oder deren Mischung. Die statistische Auswertung zeigte aber keine Signifikanz.

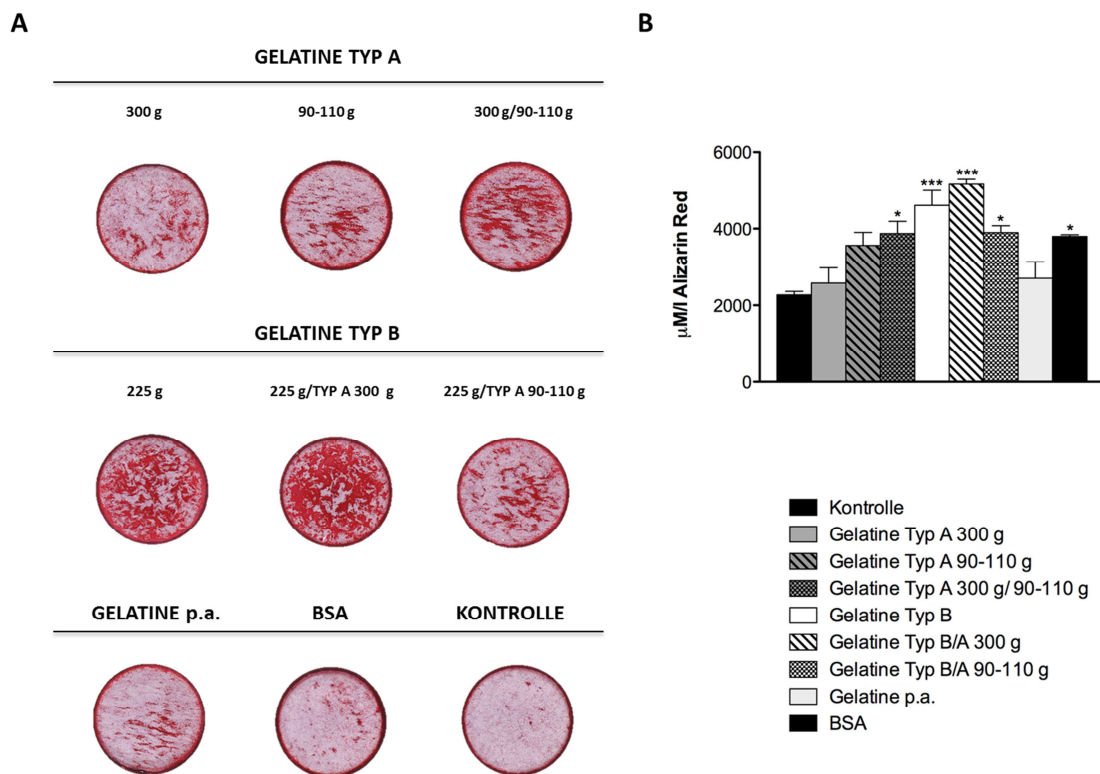


Abbildung 24: Mineralisationsfähigkeit von MC3T3-E1 Zellen, kultiviert auf verschiedenen Gelatinebeschichtungen am Tag 21. (A) Repräsentative Abbildungen der Alizarin Red S Färbung. (B) Ergebnis der Alizarin Red S Färbung, angegeben in $\mu\text{M/l}$ gebundenem Farbstoff ($n=3$). Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C ($50 \mu\text{g/ml}$) + β -GP (5 mM); * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle

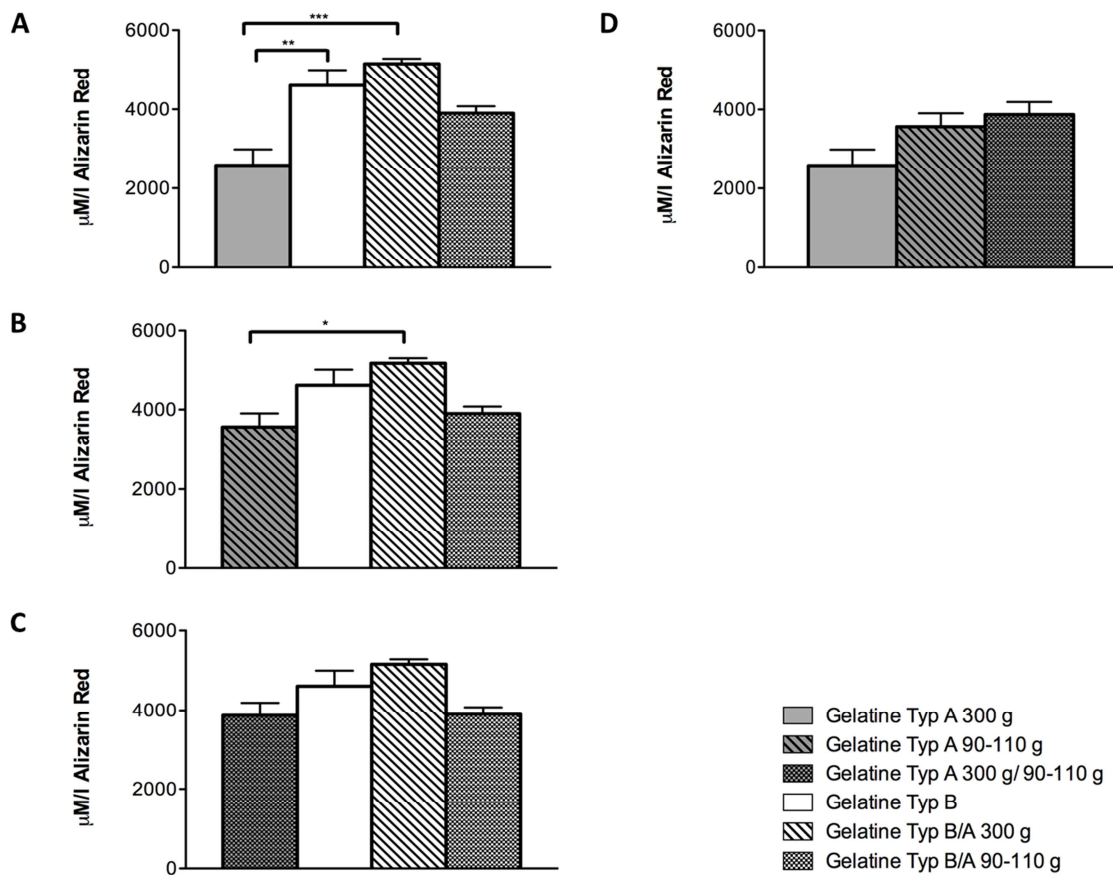


Abbildung 25: Darstellung quantitativer Ergebnisse der Alizarin Red S Färbung von MC3T3-E1 Zellen (A-D) auf Beschichtungen verschiedener Gelatintypen im Detail.

	μM/l Alizarin Red
<i>Kontrolle</i>	2272 ± 90,61
<i>Gelatine Typ A 300 g</i>	2577 ± 402,40
<i>Gelatine Typ A 90-110 g</i>	3561 ± 342,60
<i>Gelatine Typ A 300 g/ 90-110 g</i>	3873 ± 320,30
<i>Gelatine Typ B</i>	4610 ± 389,70
<i>Gelatine Typ B/A 300 g</i>	5156 ± 128,30
<i>Gelatine Typ B/A 90-110 g</i>	3899 ± 179,30
<i>Gelatine p.a.</i>	2704 ± 429,10
<i>BSA</i>	3800 ± 44,72

Tabelle 12: Quantitative Resultate der Alizarin Red S Färbung in μM/l gebundenem Farbstoff in tabellarischer Darstellung (Mittelwert ± SEM; n=3).

3.3.2. Einfluss von LCM3 und LCM6 auf die Zellviabilität , Proliferation, Differenzierung und Matrixmineralisation von Osteoblasten

3.3.2.1. Zellviabilität und Zellproliferation

Die Zellviabilität beziehungsweise die Zellproliferation primärer Osteoblasten wurde quantitativ mittels CellTiter96™ One Solution Reagent (MTS-Assay) 24 Stunden nach der Aussaat photometrisch bestimmt.

Bei Betrachtung durch das Mikroskop konnte bereits 24 Stunden nach der Aussaat ein konfluenten Zellschicht bei der Kontrolle auf einer TC-Oberfläche und bei dem Biomaterial LCM3 beobachtet werden. Das morphologische Aussehen der Osteoblasten dieser beiden Gruppen unterschied sich nicht voneinander (Abbildung 26). Durch den opaken Charakter der LCM6 war ein Beobachten der Zellmorphologie adhärirter Osteoblasten mittels Lichtmikroskop während der Kultur nicht möglich (Abbildung 26A).

Die photometrische Bestimmung und anschließende Auswertung (Abbildung 26B und C) ergaben eine signifikante Reduktion ($p < 0,001$) an metabolisch aktiven Osteoblasten, welche auf LCM3 und LCM6 kultiviert wurden. Dies entspricht einer prozentualen Abnahme der Zellviabilität bzw. Zellproliferation um 30,37% bei LCM3 und beim LCM6 Scaffold-Typ um 76,44%. Diese Reduktion ist auch in der schwächer werdenden Farbtintensität des Formazanproduktes in Abbildung 26 wiederzufinden.

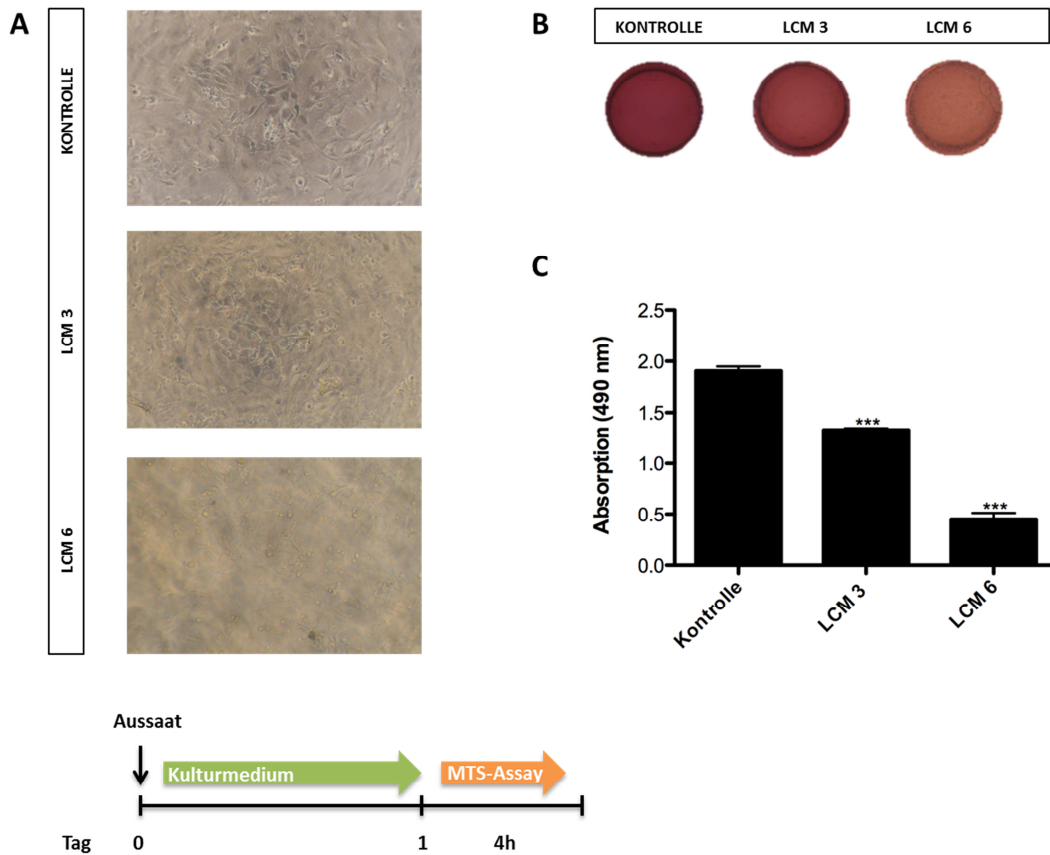


Abbildung 26: Einfluss der Zellproliferation primärer Maus-Osteoblasten kultiviert auf LCM3 und LCM6. (A) Morphologisches Aussehen der Osteoblasten auf den unterschiedlichen Materialien (Originalvergrößerung x 10). (B) Farbintensität des entstandenen Formazans nach 4 Stunden Inkubationzeit. (C) Graphische Darstellung der gemessenen Absorption des durch Zellmetabolismus gebildeten Formazans bei 490 nm (n=9). Kontrolle = Osteoblasten auf TC-Oberfläche; *** p < 0,001 vs. Kontrolle

	Absorption (490 nm)
Kontrolle	1,91 ± 0,05
LCM3	1,33 ± 0,02
LCM6	0,45 ± 0,06

Tabelle 13: Quantitatives Ergebnis des Zellviabilitäts- und Zellproliferations-Assays (Mittelwert ± SEM; n=9).

3.3.2.2. Alkalische Phosphatase Aktivität primärer Osteoblasten

Um den Einfluss der Biomaterialien auf den Differenzierungsprozess zu beschreiben, wurden Osteoblasten ohne und mit Mineralisationsmedium auf die entsprechenden Materialien (LCM3 und LCM6) kultiviert. Zellen mit aktiver Alkalischer Phosphatase wurden am Tag 4 der Kultur mittels BCIP®/NBT- Färbung sichtbar gemacht.

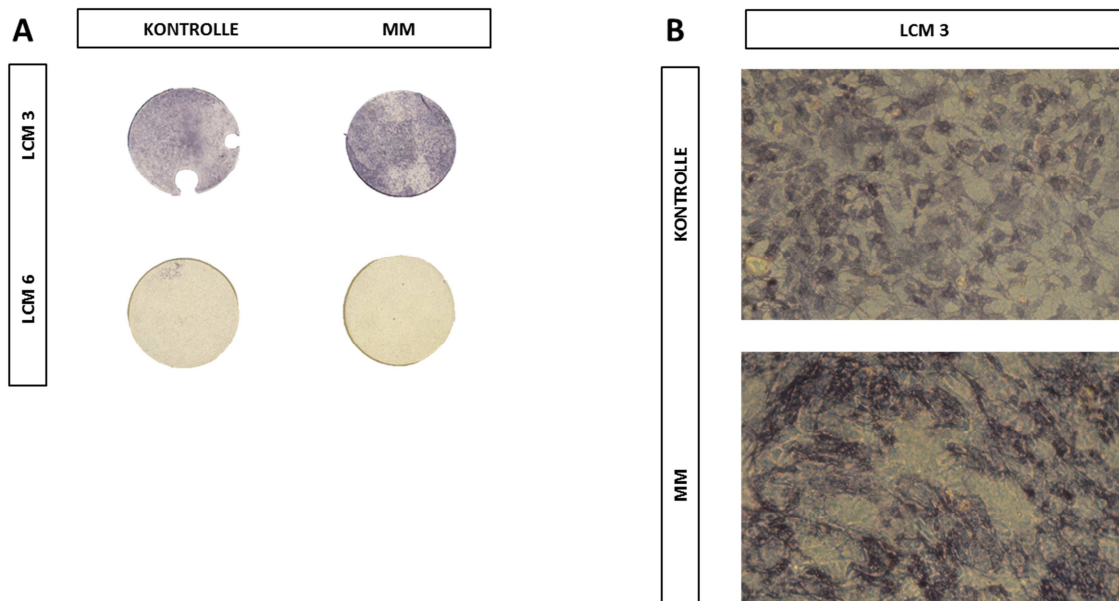


Abbildung 27: Effekt von LCM3 und LCM6 auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase. (A) Gefärbter Zelllayer von LCM3 und LCM6 am Tag 4. (B) Mikroskopische Detailaufnahmen von Osteoblasten auf LCM3 mit aktiver Alkalischer Phosphatase (Originalvergrößerung x 10). Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + β -GP (5 mM)

Primäre Osteoblasten, kultiviert auf LCM3, zeigten sowohl mit als auch ohne Zusatz von Differenzierungsmedium eine positive Färbung für Alkalische Phosphatase. Wie in Abbildung 27A und besonders bei der Abbildung 27B ersichtlich, kam es durch Zusatz von Mineralisationsmedium bei den Osteoblasten auf LCM3 zu einer deutlich stärkeren Färbung. Im Vergleich dazu kam es bei Osteoblasten auf dem Biomaterial LCM6 zu keiner Färbung (Abbildung 27A). Die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase primärer Osteoblasten war zum Zeitpunkt Tag 4, unabhängig von der Präsenz von Differenzierungsmedium, bei Kultivierung auf LCM6 vollständig inhibiert.

	Relative Farbintensität*	
	Kontrolle	MM
<i>LCM3</i>	++	+++
<i>LCM6</i>	-	-

Tabelle 14: Beurteilung der relativen Farbintensität der Alkalischen Phosphatase Färbung Maus-Osteoblasten auf LCM3 und LCM6. *Die relative Farbintensität wurde optisch bewertet (n=3); +++ stark positive Färbung; ++ positive Färbung; + schwach positive Färbung; - keine Färbung

3.3.2.3. Matrixmineralisation

Für die Beurteilung, inwieweit die Fähigkeit extrazelluläre Matrix zu mineralisieren durch die Materialien LCM3 und LCM6 beeinflusst wird, wurden Osteoblasten mit und ohne Mineralisationsmedium kultiviert. Die Alizarin Red S Färbung erfolgte am Tag 14 und Tag 21 der Kultur für LCM3. Für Osteoblasten, welche auf LCM6 kultiviert wurden, erfolgte die Färbung nur am Tag 21.

Mineralisation extrazellulärer Matrix primärer Osteoblasten konnte auf LCM3 sowohl am Tag 14, als auch am Tag 21 (Abbildung 28), unter Kultivierung mit Differenzierungsmedium, beobachtet werden. Die quantitative Auswertung ergab einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) am Tag 21, im Vergleich zur Kontrolle ohne Mineralisationsmedium.

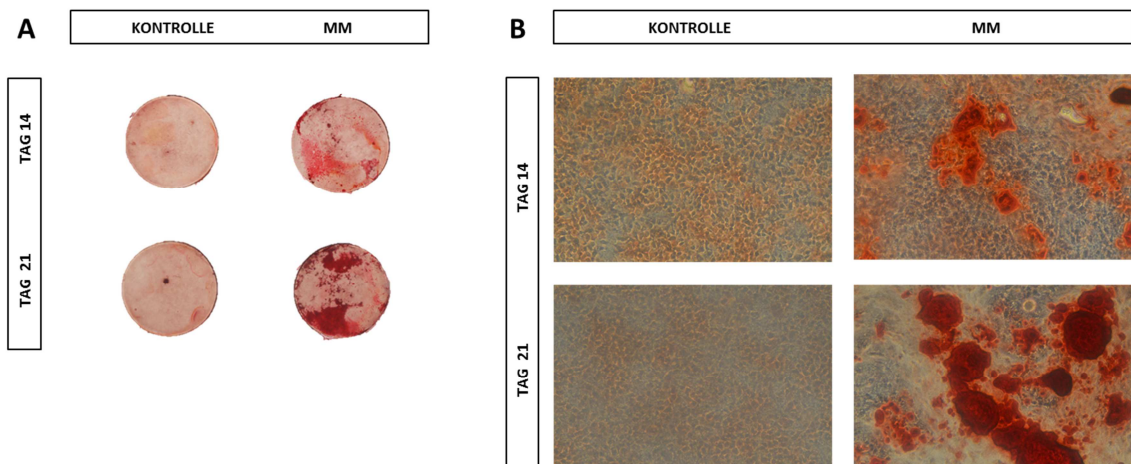


Abbildung 28: Alizarin Red S Färbung primärer Osteoblasten auf LCM3 am Tag 14 und Tag 21. (A) Darstellung der gefärbten Kultur. (B) Mikroskopische Detailaufnahmen der Alizarin Red S gefärbten Kultur (Originalvergrößerung x 10). Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + β -GP (5 mM)

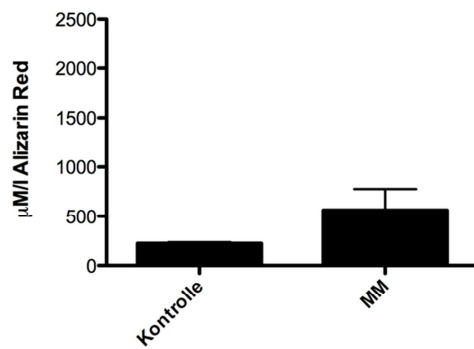
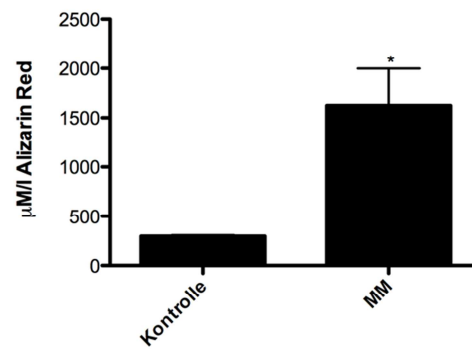
A**B**

Abbildung 29: Graphische Darstellung der Konzentrationsbestimmung des gebundenen Farbstoffes mittels Extraktionsverfahren am (A) Tag 14 und (B) Tag 21 (n= 4); * p<0,05

	Kontrolle	MM
Tag 14	224,0 ± 11,73	560,4 ± 215,20
Tag 21	296,8 ± 9,73	1624,0 ± 375,20

Tabelle 15: Quantitatives Resultat der Alizarin Red S Färbung in µM/l gebundenem Farbstoff in tabellarischer Darstellung (Mittelwert ± SEM; n=4).

Über einen Zeitraum von 21 Tagen, unter Beigabe von osteogenem Differenzierungsmedium, konnte auch auf LCM6 eine Steigerung an Matrixmineralisation durch Osteoblasten im Vergleich zur Kontrolle, wenn auch statistisch nicht signifikant, beobachtet werden (Abbildung 30).

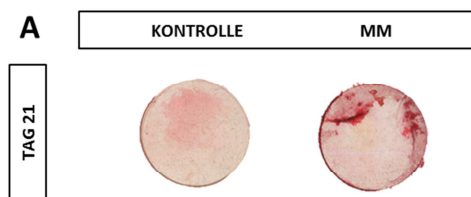
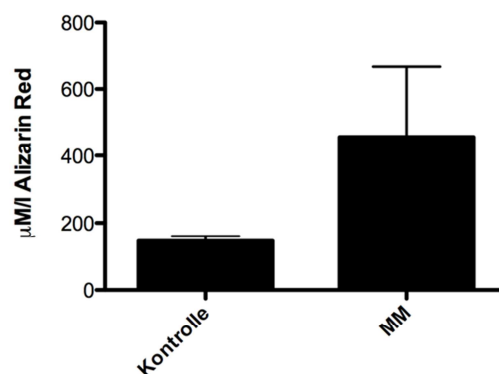
A**B**

Abbildung 30: Alizarin Red S Färbung primärer Osteoblasten auf LCM6 am Tag 21. (A) Darstellung der gefärbten Kultur. (B) Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung in µM/l Alizarin Red S (n = 3); Kontrolle= α-MEM + 10% FCS hi; MM = α-MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 µg/ml) + β-GP (5 mM)

	Kontrolle	MM
Tag 21	145,9 ± 14,26	456,0 ± 211,00

Tabelle 16: Quantitatives Resultat der Alizarin Red S Färbung in $\mu\text{M/l}$ gebundenem Farbstoff in tabellarischer Darstellung (Mittelwert \pm SEM; n=3).

4. Zusammenfassung

4.1. Einfluss von verschiedenen Gelatintypen auf die Alkalische Phosphatase Aktivität und Mineralisation von MC3T3-E1 Zellen

Weder das Verfahren zur Gewinnung der Gelatine, noch Unterschiede in physikochemische Parameter wie isoelektrischer Punkt oder Gelierfähigkeit hatten einen Einfluss auf die Alkalische Phosphatase Aktivität MC3T3-E1 Zellen über den getesteten Zeitraum. Aktive Alkalische Phosphatase konnte in sämtlichen Gruppen mittels Färbemethode detektiert werden.

Die Fähigkeit extrazelluläre Matrix zu mineralisieren wurde jedoch bei allen Gelatinegruppen gefördert. Physikochemische Parameter und Gewinnungsmethode der Gelatine bewirkten deutliche Unterschiede in der Matrixmineralisation. Sämtliche Beschichtungen, die als Einzelkomponente Gelatine Typ B enthielten oder in einer Mischung mit Gelatine Typ B gefertigt wurden, führten im Vergleich zu den anderen Gelatinebeschichtungen zu einer höheren Matrixmineralisation.

	Alkalische Phosphatase Aktivität	Mineralisation
	Relative Farbintensität*	μM/l Alizarin Red
	am Tag 3, 7 und 10	
<i>Gelatine Typ A 300g</i>	+++	↑
<i>Gelatine Typ A 90-110 g</i>	+++	↑↑
<i>Gelatine Typ A 300 g/ 90-110 g</i>	+++	↑↑
<i>Gelatine Typ B</i>	+++	↑↑↑
<i>Gelatine Typ B/A 300 g</i>	+++	↑↑↑
<i>Gelatine Typ B/A 90-110 g</i>	+++	↑↑
<i>Gelatine p.a.</i>	+++	↑
<i>BSA</i>	+++	↑↑

Tabelle 17: Auswirkung von Beschichtungen verschiedener Gelatintypen auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase und die Mineralisation von MC3T3-E1; * Die relative Farbintensität wurde optisch bewertet (n =3); +++ stark positive Färbung; ↑↑↑: Anstieg der Mineralisation um mehr als 100% vs. Kontrolle; ↑↑: Anstieg der Mineralisation um mehr als 50% vs. Kontrolle; ↑: Anstieg der Mineralisation um mehr als 10% vs. Kontrolle (Kontrolle= 2272 μM/l; n=3)

4.2. Effekt der Biomaterialien LCM3 und 6 auf die Proliferation, Differenzierung und Matrixmineralisation von primären Osteoblasten

Bei Gegenüberstellung beider Ausgangsmaterialien als Scaffoldmaterial hinsichtlich ihres Effektes auf Zellviabilität und –proliferation, Osteoblastendifferenzierung und Mineralisation extrazellulärer Matrix, zeigte sich in sämtlichen Experimenten, dass LCM6 einen deutlich stärkeren Einfluss auf zelluläre Prozesse ausübt als LCM3. Primären Maus-Osteoblasten konnten auf dem Materialtyp LCM3 adhären, proliferieren, differenzieren und schließlich synthetisierte Matrix mineralisieren. In den *in vitro* Experimenten resultierte für diese Gruppe, trotz verminderter Anzahl an metabolisch aktiven Zellen, eine positive Färbung für das Enzym Alkalische Phosphatase und für die Matrixmineralisation. Im Gegensatz dazu kam es beim Biomaterial LCM6 neben der starken Reduktion in Proliferation und Viabilität zu einer Hemmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase und zu einem nur sehr geringen Anstieg an mineralisierter Matrix über 21 Tage.

Die Materialzusammensetzung, vor allem das Verhältnis der Einzelkomponenten zueinander (Lactid, Caprolacton und Methacrylat) und die damit verbundenen Eigenschaften, nehmen laut den erhaltenen Ergebnissen Einfluss auf Proliferation, den Differenzierungsprozess und auf die Matrixmineralisationsfähigkeit. Im Falle des Biomaterial LCM6 erwiesen sich eine Erhöhung des Lactid-Anteils und ein verringerter Prozentsatz an Methacrylat als nicht günstig für die getesteten Zellfunktionsparameter.

		Zellviabilität Zellproliferation	Alkalische Phosphatase Aktivität	Mineralisation
		Absorption (490nm)	Relative Farbintensität* am Tag 4	Alizarin Red Tag 21
LCM3	Kontrolle	↓↓	++	-
	MM		+++	+++
LCM6	Kontrolle	↓↓↓	-	-
	MM		-	+

Tabelle 18: Einfluss von LCM3 und LCM6 auf Proliferation, Zellviabilität, Differenzierung und Matrixmineralisation; * Die relative Farbintensität wurde durch visuelle Betrachtung bewertet (n =3); ↓↓↓ starke Reduktion der Zellviabilität/-proliferation; ↓↓ moderate Reduktion der Zellviabilität/-proliferation; +++ stark positive Färbung; ++ positive Färbung; + schwach positive Färbung; - keine Färbung

5. Diskussion und Conclusio

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war einerseits die erfolgreiche Isolierung und Charakterisierung von primären Maus-Osteoblasten und andererseits die Untersuchung von durch Biomaterialien ausgelösten Effekten auf die Differenzierung und Mineralisationsfähigkeit von knochenbildenden Zellen. Zwei verschiedene Biomaterialien wurden ausgetestet: Neben einem synthetischen Biomaterial („LCM“) wurden auch verschiedene Gelatinetypen, als potentieller organischer Ausgangsstoff, für ein neues Scaffoldmaterial charakterisiert.

Die Osteoblasten-Isolierung aus Calvarien neugeborener Mäusen ermöglicht den Zugang zu einem primären Zelltyp für die Durchführung von in vitro Experimenten. Zu Beginn zeigte sich die Schwierigkeit matrixmineralisierende Osteoblasten zu gewinnen. Trotz Stimulation der Zellen mit Vitamin C und der Zugabe einer Phosphatquelle zeigte sich nach 14-tägiger Kultivierung keine Mineralisation. In Anbetracht dieser Tatsache eignete sich diese Zellpopulation nicht für Experimente, die den Einfluss auf die Differenzierung von Osteoblasten in Anwesenheit eines Biomaterials beschreiben sollen.

Durch gezielte Modifizierung des bestehenden Protokolls konnten schlussendlich Maus-Osteoblasten gewonnen werden, welche Alkalische Phosphatase exprimierten, extrazelluläre Matrix und kollagene Proteine sezernierten und zur Mineralisation befähigt waren.

Die Modifikation im Isolierungsprozess bestand darin, die Überstände der einzelnen Enzyminkubationsschritte nicht gesammelt weiterzuverarbeiten, sondern jeden Überstand als einzelne Fraktion anzusehen. Die später gewonnenen Fraktionen (Fraktion III und Fraktion IV) wiesen verstärkt Charakteristika von differenzierten Osteoblasten auf (Bakker und Klein-Nulend, 2012).

Die Austestung der verschiedenen Osteoblastenfraktionen mit Differenzierungsmedien unterschiedlicher β -Glycerophosphat Konzentration ergab, dass bei Fraktion III mit einem Zusatz von Vit. C (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und β -GP (5 mM) die stärkste Mineralisation resultierte. Die in der Literatur beschriebene unspezifische Mineralisation, bedingt durch den Zusatz einer hohen Konzentration an β -GP, wurde hier nicht beobachtet. Im Gegenteil, bei sämtlichen Fraktionen kam es bei Zugabe von β -GP (10 mM) zu einer verminderten Entstehung von mineralisierter Matrix (Orriss et al., 2012). Die gewonnene Zellpopulation von Fraktion III wurde als primärer Zelltyp für in vitro Differenzierungs- und Mineralisationsexperimente herangezogen.

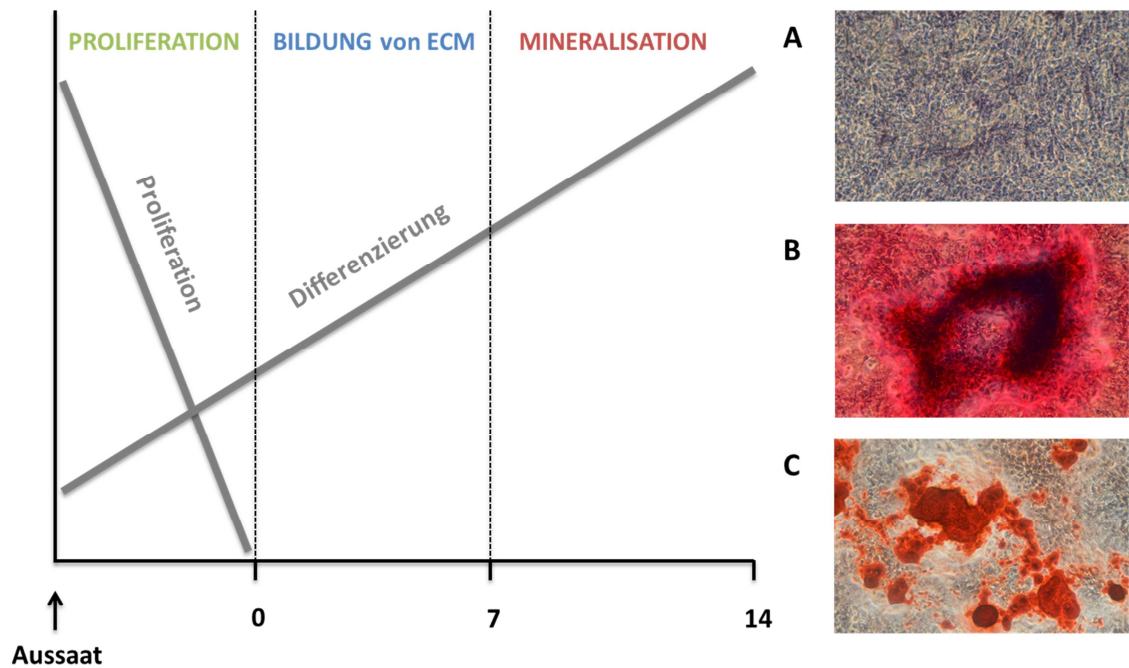


Abbildung 31: Graphische Darstellung des Differenzierungsprozesses und repräsentative mikroskopische Detailaufnahmen primärer Maus-Osteoblasten Fraktion III (Originalvergrößerung x 10) von unterschiedlichen Färbemethoden. (A) Alkalische Phosphatase Färbung; (B) Sirius Red und Fast Green Färbung; (C) Alizarin Red S Färbung.

Der zweite Teil der Diplomarbeit bestand in der Charakterisierung von zwei Biomaterialien. Eines dieser zwei Ausgangsstoffe stellt das Makromolekül Gelatine dar. Eigenschaften, wie biologische Abbaubarkeit, Bioverträglichkeit und geringe Immunogenität, machen Gelatine besonders geeignet für Design und Entwicklung von neuen Materialien, sei dies für pharmazeutische und biomedizinische Anwendungsgebiete, als auch in der Lebensmittelindustrie (Farris et al., 2010). Die Vielzahl an vorhandenen Gelatintypen mit variablen Spezifikationen eröffnete die Fragestellung, inwieweit Herstellungsmethode und Gelierfähigkeit einflussnehmend auf den Differenzierungsprozess und die Mineralisationsfähigkeit von Osteoblasten sind. Zur Untersuchung dieser Parameter wurden Gewebekulturplatten mit verschiedenen Gelatinekompositionen beschichtet. Bedingt durch die Wasserlöslichkeit von Gelatine, liegt diese bei einer Temperatur über 37°C als kolloidale Lösung vor (Pezron et al., 1991). Aus diesem Grund kann erwartet werden, dass sich die Beschichtungen mit den verschiedenen Gelatintypen während der Inkubation in Kulturmedium wieder verflüssigen. Eine quantitative Bestimmung, wieviel von der Beschichtung während der gesamten Kultivierungszeit verblieb bzw. wieviel im Zuge der

regelmäßigen Medienwechsel entfernt wurde, wurde nicht durchgeführt. Trotz dieser Gegebenheit beeinflusste die Anwesenheit von Gelatine die Fähigkeit von MC3T3-E1 Zellen, extrazelluläre Matrix zu mineralisieren. Sämtliche Beschichtungen mit Gelatine zeigten einen Anstieg an Matrixmineralisation im Vergleich zur Kontrolle. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase blieb jedoch unbeeinflusst. Einflüsse der Gewinnungsmethode von Gelatine zeigten sich besonders bei Gelatine Typ B. Die Bildung von „bone nodules“ konnte bei Beschichtungen mit Gelatine Typ B bereits sehr früh (Tag 7) in der Kultur beobachtet werden. Sämtliche Beschichtungen mit Gelatine Typ B, entweder als alleinige Komponente oder in Form einer 50:50 Mischung, zeigten am Tag 21 eine deutlich höhere Einlagerung von Mineral.

Der zu Grunde liegende biochemische Mechanismus, auf welche Weise Gelatine nun einen stimulierenden Effekt auf die Differenzierung ausübt, ist Ziel weiterer Untersuchungen. Folgende Überlegung liefert aber einen möglichen Ansatzpunkt.

Adhäriert wachsende Zellen können hinsichtlich ihrer Zelladhäsion und Differenzierung nicht nur durch Oberflächen wie Glas oder physikalisch behandelte Zellkulturplatten beeinflusst werden, sondern auch durch Proteine (Hidalgo-Bastida und Cartmell, 2010).

Proteine der extrazellulären Matrix sind hierbei von besonderem Interesse. Sie sind nicht nur ein Bestandteil der zellulären Mikroumgebung, sondern spielen auch eine Rolle in Prozessen wie Zelladhäsion, Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose. Extrazelluläre Matrixproteine regulieren die Osteoblastendifferenzierung über einen Integrin-vermittelten Signaltransduktionsweg (ERK/MAPK Signalweg)(Mathews et al., 2012) .

Osteoblasten sind zur Expression von verschiedenen Integrinen befähigt, welche mit extrazellulären Matrixproteinen interagieren können (Gronthos et al., 2001). Mathews et al. zeigte mit Beschichtungen verschiedener Proteine der extrazellulären Matrix wie Kollagen Typ 1, Fibronectin, Laminin und Vitronectin unterschiedliche Effekte auf Differenzierung und Matrixmineralisation auf. Eine besonders hohe Mineralisation resultierte mit einer Beschichtung aus Kollagen Typ 1. Unterschiede in der Integrinbindung und der nachfolgenden Signaltransduktion können eine mögliche Ursache für die Unterschiede in der Mineralisation sein (Mathews et al., 2012).

Durch die strukturelle Ähnlichkeit von Kollagen und Gelatine, könnte diese eventuell auf ähnlicher Weise einflussnehmend auf die Osteoblastendifferenzierung sein. Kollagen Typ 1 interagiert mit Integrinen vom Typ $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$. Der Einsatz eines gegen die

β 1-Subeinheit gerichteten Antikörpers könnte durch Blockade dieser Integrinrezeptoren neue Erkenntnisse über die Wirkungsweise von Gelatine bringen.

Die Austestung der verschiedenen Gelatinetypen als Beschichtungen diene im Hinblick auf die Entwicklung eines neuen Biomaterials dazu, einen Überblick über deren Effekte auf die Differenzierung und Mineralisationsfähigkeit zu gewinnen. In dieser Arbeit wurde zur Herstellung einer Beschichtung mit 5% kolloidalen Gelatinelösungen gearbeitet. Für eine Langzeitapplikation im Körper als Biomaterial lässt sich Gelatine jedoch in dieser Form nicht anwenden. Durch den niedrigen Schmelzpunkt ist Gelatine bei einer Körpertemperatur von 37°C bereits löslich und daher nicht stabil (Van Den Bulcke et al., 2000). Um limitierenden Eigenschaften wie geringe thermische und mechanische Stabilität zu beseitigen, können verschiedene Ansätze gewählt werden. Die chemische Verknüpfung der einzelnen Gelatinemoleküle stellt die am meisten verwendete Technik dar. Reaktive Moleküle können als sogenannte „cross-linking agents“ zur Modifizierung von Amino-, Carboxyl- oder auch Hydroxygruppen der Gelatine herangezogen werden. Zur Anwendung kommen hier sowohl Chemikalien wie zum Beispiel Glutaraldehyd, Carbodiimid und Diisocyanat, als auch natürlich vorkommende Moleküle wie Genipin, ein Iridoidglykosid aus Gardenienfrüchten (Farris et al., 2010). Neben der chemischen Verknüpfung besteht auch die Möglichkeit der Photopolymerisation. Diese Reaktion wird durch einen Photoinitiator ermöglicht. Freie Radikale des Photoinitiators, welche durch Bestrahlung mit UV-Licht gebildet werden, attackieren Vinylgruppen modifizierter Makromoleküle und lassen kovalente Bindungen innerhalb von Sekunden bis Minuten entstehen (Mironi-Harpaz et al., 2012). Die Erarbeitung eines geeigneten „cross-linking“ Mechanismus sowie das Verhalten von Osteoblasten und Osteoklasten auf dieses Material stellen geplante Experimente dar.

Um Effekte des synthetischen Biomaterials „LCM“ auf knochenbildende Zellen aufzuzeigen, wurden nicht nur knochenspezifische Parameter wie Alkalische Phosphatase Aktivität und Matrixmineralisation bestimmt, sondern auch Zellviabilität bzw. Zellproliferation.

Die Zellviabilität bzw. die Zellproliferation primärer Maus-Osteoblasten wurde bei der Kultivierung auf den synthetischen Ausgangsmaterialien LCM3 und LCM6 in beiden Fällen signifikant ($p < 0,001$) reduziert. Die kolorimetrische Bestimmung mittels CellTiter96™ One Solution Reagent stellt eine schnelle Methode dar, um zum Beispiel toxische Einflüsse von Substraten oder Materialien auf Zellen zu beschreiben. Diese Methode ist aber nicht in der

Lage, zwischen einer Reduktion in der metabolischen Aktivität, proliferativ aktiven Zellen und der Anzahl an Zellen zu unterscheiden (Williams et al., 2005). Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, ob eventuell nicht weitaus mehr Zellen auf dem Biomaterial adhärert haben, die aber durch gehemmte metabolische Aktivität nicht detektiert werden konnten. Sowohl bei der Kontrollgruppe, als auch beim Biomaterial LCM3 konnte bei mikroskopischer Betrachtung ein konfluenten Zellschicht bereits 24h nach Aussaat der Zellen beobachtet werden. Obwohl optisch kein Unterschied zu erkennen war, zeigten die quantitativen Ergebnisse der Absorptionsmessung zwischen diesen 2 Gruppen einen deutlichen Unterschied. Die Zellviabilität bzw. Zellproliferation gemessen an der metabolischen Aktivität war bei Kultivierung auf LCM3 signifikant ($p < 0,001$) reduziert. Im Falle von LCM6 konnte durch den opaken Charakter des Materials kein Zellschicht mittels Mikroskop beobachtet werden. Um Resultate zur Korrelation zwischen der Zellzahl und metabolischer Aktivität zu erhalten, kann zukünftig parallel eine Zellzahlbestimmung angedacht werden, welche der Zellzahl eine Aktivität gegenüberstellt und damit eine genauere Aussage liefert.

Nichtsdestotrotz konnten sich primäre Maus-Osteoblasten auf LCM3 differenzieren und waren fähig, synthetisierte Matrix zu mineralisieren. Die Resultate der Alkalischen Phosphatase Aktivität und der Matrixmineralisation bei Kultivierung primärer Zellen auf LCM6 sind jedoch widersprüchlich. Die Alkalische Phosphatase Aktivität stellt einen Marker für die Differenzierung von Osteoblasten dar. Eine Aktivität dieses Enzyms konnte aber in keinem dafür durchgeführten Experiment auf LCM6 gezeigt werden. Während die Alkalische Phosphatase vollständig inhibiert wurde, kam es dennoch zu einer positiven Färbung für Alizarin Red S.

Ein möglicher Grund, der ausschlaggebend für die unterschiedlichen Ergebnisse sein kann, ist eine Inhomogenität in der Materialherstellung. Während der Kultivierung von LCM6 konnten mikroskopisch Veränderungen im Aussehen beobachtet werden. Das Material veränderte sich dahingehend, so dass es zu einer vermehrten Luftblasenbildung kam. Die Ursache dafür können bereits stattfindende Abbauprozesse des Materials sein. Zusätzlich konnte auch eine Änderung im pH-Wert des Mediums beobachtet werden. Das Freiwerden von sauren Komponenten aus dem Biomaterial bedingte vermutlich den Farbumschlag des Indikators Phenolrot im Medium in Richtung gelb.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass es sich bei der positiven Färbung für Calcium mit Alizarin Red S um eine „unspezifische“ Färbung handelt. Alizarin Red S bindet Calcium im Form eines

Chelatkomplexes. Dieser Farbstoff ist aber nicht in der Lage zu unterscheiden, ob das Calcium nun in Matrix eingelagert ist oder nicht. Es spiegelt nur die Präsenz von Calcium wieder. Eine Möglichkeit, um eventuell falsch positive Ergebnisse bei weiteren Experimenten auszuschließen, besteht in der zusätzlichen Anwendung einer weiteren Färbetechnik. Die Von Kossa Färbung basiert auf der Substitution von phosphatgebundenem Calcium durch Silberionen, welche zu metallischem Silber reduziert werden (Rungby et al., 1993). Die resultierende schwarze Färbung stellt somit nur jenes Calcium dar, welches an eine anionische Komponente (Phosphat) gebunden ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von Gelatine sich positiv auf die Differenzierung und Mineralisationsfähigkeit von Osteoblasten auswirkt. Für den Einsatz im Bereich "bone tissue regeneration" ist jedoch nicht nur die Funktion der Osteoblasten von Bedeutung, sondern auch jene der Osteoklasten. Das Ziel wäre, ein ausgewogenes Verhältnis von knochenbildenden und knochenresorbierenden Zellen zu schaffen. Die gewonnenen Erkenntnisse aus dieser Arbeit werden nun für die Synthese eines UV-polymerisierbaren Gelatine-Hydrogels herangezogen. Erfolgreiche Ergebnisse zur Herstellung dieses Hydrogels können bereits aufgezeigt werden. Dieser Stabilisierungsmechanismus ermöglicht nun das Arbeiten in vitro und auch in vivo.

Bezogen auf die Ergebnisse der getesteten synthetischen Materialien, sollten bei LCM6 noch Materialoptimierungen vorgenommen werden. Änderungen in der Polymerkomposition haben im Falle von LCM6 für schnelle Veränderungsprozesse im Material und für suboptimale Eigenschaften für Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Mineralisation primärer Osteoblasten gesorgt. Der synthetische Biomaterialausgangsstoff LCM3 zeigte dahingegen gute Eigenschaften für Knochenneubildung in vitro. Bereits laufende "in vivo" Untersuchungen sollen Aufschluss auf die Wirkung und auf das Potential dieser synthetischen Biomaterialien

6. Abstract

Bone loss causing from trauma, surgical tumor removal or reconstructive surgeries requires the usage of bone graft substitutes. Current treatments as autologous or allogenic bone grafts, allografts with demineralized matrix or osteogenic proteins are limited available. Therefore the design of biomaterials with osteogenic, osteoinductive and osteoconductive properties become more and more interesting.

In the present diploma thesis work, the effect of potential biomaterials for bone grafting was tested on osteoblast proliferation and differentiation. Two polymers were investigated. One polymer was the macromolecule gelatin and the other one was a synthetic copolymer (LCM) Mouse calvarial derived osteoblasts or MC3T3-E1 cells were cultured on various gelatine coatings or on different photopolymerized LCM discs. Cells were directed to osteoblast lineage by growing them in differentiation media containing ascorbic acid (50µg/ml) and β-glycerophosphate (5mM). To determine effects on osteoblast proliferation, differentiation and mineralization, assays were performed for cell viability and proliferation (MTS-assay), alkaline phosphatase (ALP) activity and mineralized matrix was visualised with alizarin red.

Independent from the extraction method or gel strength of the tested gelatin coatings, osteoblasts attached on the pre-coated surfaces and showed ALP activity in all groups. There was no significant difference observed between the different investigated gelatin types according to ALP activity. But mineralized matrix production was enhanced in the presence of gelatin compared to the control on tissue culture plastic.

Osteoblast attachment and proliferation was also observed by culturing cells on different synthetic polymer-compositions (LCM3 and LCM6). Even if a reduction in the metabolic activity of osteoblasts on LCM3 and LCM6 was monitored, LCM3, but not LCM6, supported alkaline phosphatase expression and matrix mineralization.

In conclusion, both biomaterials showed supporting effects on osteoblast differentiation in vitro. In the process of bone healing, both, osteoblast and osteoclast play a major role. Therefore further experiments have to be established to determine effects on osteoclast development as well as to determine the potency of these materials for in vivo bone formation.

7. Lebenslauf

Carina Kampleitner

Persönliche Daten

Carina Kampleitner
Eglseestraße 23
A-3121 Weyersdorf
Geboren am 08.08.1988 in St. Pölten
Ledig
Staatsangehörigkeit: Österreich

Schul- und Berufsausbildung

1994 bis 1998 Volksschule in Karlstetten
1998 bis 2002 Hauptschule in Karlstetten
2002 bis 2003 Dreijährige Schule für Sozialberufe in St. Pölten
2003 bis 2007 Oberstufenrealgymnasium mit Instrumentalunterricht in Krems
an der Donau
Reifeprüfung am 6. Juni 2007
2007 bis 2015 Diplomstudium der Pharmazie

Berufserfahrung/Praktika

07/2008	Praktikum Apotheke Mag. Renate Leeb, Prinzersdorf
09/2009-08/2010	Apotheke Mag. pharm. Renate Leeb, Prinzersdorf
09/2010-08/2013	Millennium Apotheke Mag. pharm. Doris Figl, Wien

Poster

September 2013 Bone Research Society/British Orthopaedic Research Society
Joint Meeting; Oxford, Großbritannien
OB activity and OC resorption ability affected by gelatin composition.
Carina Kampleitner, Verena Kimla, Kanthi Lewis, Oskar Hoffmann

Mai 2014

European Calcified Tissue Society

Annual Meeting, Prag, Tschechien

Development and characterization of novel biodegradable scaffold materials.

Tristan Fowler, **Carina Kampleitner**, Leander Poczka, Andrea Markus, Christian Dullin, Gerhard Hildebrand, Frauke Alves, Klaus Liefeth, Oskar Hoffmann

September 2014

American Society of Bone and Mineral Research

Annual Meeting, Houston, USA

Pre-Clinical Screening of Novel Two-Photon Photopolymerized Biomaterials for Bone Implantation.

Tristan Fowler, **Carina Kampleitner**, Leander Poczka, Andrea Markus, Christian Dullin, Gerhard Hildebrand, Frauke Alves, Klaus Liefeth, Oskar Hoffmann

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Graphische Darstellung des “bone remodeling”-Zyklus und die dabei beteiligten	9
Abbildung 2: Illustration der verschiedenen Stadien der Osteoblasten-Differenzierung (Bellido et al., 2014).	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Osteoklasten-Differenzierung (Bellido et al., 2014).	13
Abbildung 4: Graphische Darstellung der temporalen Aktivität essentieller Zelltypen (A) und dem Vorhandensein von biologischen Faktoren (B) während der Knochenheilung (Ai-Aqi et al., 2008).	14
Abbildung 5: Primärstruktur der Gelatin (Suarasan et al., 2013).	17
Abbildung 6: Abbaubare synthetische Polymere und deren Applikation (Treiser et al., 2013).	18
Abbildung 7: Chemische Struktur von Polycaprolacton (PCL) und Polymilchsäure (PLA) (Treiser et al., 2013).	19
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsplans und Versuchsaufbaues.	20
Abbildung 9: Darstellung des Kultivierungsschemas zur Initialisierung von Differenzierung und der Fähigkeit zur Matrixmineralisation. Knochenspezifische Parameter wurden während eines Kultivierungszeitraumes von maximal 21 Tagen bestimmt. Kulturmedium= α -MEM + 10% FCS hi; Mineralisationsmedium = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + β -GP (5 mM bzw. 10 mM).	23
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Herstellung der Gelatinebeschichtungen.	25
Abbildung 11: Alkalische Phosphatase Färbung primärer Maus-Osteoblasten. Repräsentative Aufnahmen einer 4 Tage alten Kultur (links= ungefärbt; rechts= positive Färbung für ALP; Originalvergrößerung x 10).	27
Abbildung 12: Chemische Struktur von Alizarin Red S und Darstellung des Chelatkomplexes mit Calcium (Smith and Hafer, 2010)	28
Abbildung 13: Alizarin Red S Färbung primärer Maus-Osteoblasten. Repräsentative mikroskopische Bilder einer 21 Tage alten Kultur (links= ungefärbt; rechts= gefärbt mit Alizarin Red S; Originalvergrößerung x 10).	28
Abbildung 14: Alizarin Red S Standardkurve zur Berechnung der Konzentrationen in μ M/l.	29
Abbildung 15: Sirius Red und Fast Green Färbung primärer Maus-Osteoblasten. Mikroskopische Detailaufnahmen einer 16 Tage alten Kultur. Dargestellt links die ungefärbte	

Kultur im Gegensatz dazu rechts: (A) Anfärbung von Kollagen (rosa-rot= Sirius Red) und (B) Färbung von nicht-kollagenen Proteinen (grün= Fast Green; Originalvergrößerung x 10).	30
Abbildung 16: Chemische Struktur des MTS-Reagenzes und des gebildeten Formazanproduktes (Promega Corporation, 2012).	31
Abbildung 17: Schematische Darstellung des Versuchaufbaues (A) und Abbildungen repräsentativer Alizarin Red S gefärbter Kulturen der OB-Fractionen (II-IV) am Tag 14 (B). Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + der jeweils angegeben Konzentration an β -GP (mM)	40
Abbildung 18: Wirkung von verschiedenen β -GP Konzentrationen auf die Mineralisationsfähigkeit von OB. Quantitative Resultate der Alizarin Red S Färbung der OB-Fractionen II- IV angegeben in μ M/l (Mittelwert \pm SEM; n=3). Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + der jeweils angegeben Konzentration an β -GP (mM);* p<0,05 vs. Kontrolle bzw. *** p<0,001 vs. Kontrolle der jeweiligen Fraktion	41
Abbildung 19: Zeitverlauf der Alkalischen Phosphatase Aktivität primärer Osteoblasten. (A) Übersicht repräsentativer Aufnahmen gefärbter Kulturen. (B) Mikroskopische Detailaufnahmen (Originalvergrößerung x 10). KM = Kontrolle, α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + β -GP (5 mM)	43
Abbildung 20: Alizarin Red S Färbung von Maus-Osteoblasten einschließlich Quantifizierung des gebunden Farbstoffes nach Extraktionsverfahren am Tag 14 und Tag 21. (A) Calciumeinlagerungen visualisiert durch Alizarin Red S Färbung. (B) Mikroskopische Detailaufnahmen Alizarin Red S gefärbter Kulturen (Originalvergrößerung x 10). Graphische Darstellung der Konzentration an gebundenem Farbstoff am (C) Tag 14 und (D) Tag 21 (μ M/l Alizarin Red S, Mittelwert \pm SEM, n=4). Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + β -GP (5 mM); *** p<0,001	44
Abbildung 21: Kollagensynthese und Bildung von nicht-kollagenen Proteinen primärer Osteoblasten, dargestellt als Färbung mit Sirius Red und Fast Green. (A) Repräsentative Abbildungen gefärbter Kulturen an unterschiedlichen Zeitpunkten. (rosa-rot = Sirius Red, Kollagenfärbung, grün = Fast Green, nicht-kollagener Proteine) (B) Mikroskopische Detailaufnahmen der Sirius Red/Fast Green Färbung am Tag 16 (Originalvergrößerung x 10). 46	
Abbildung 22: Graphische Darstellung der Ergebnisse der spektrophotometrischen Bestimmung von der Kollagensekretion und der Bildung nicht-kollagener Proteine primärer Osteoblasten gemessen an verschiedenen Zeitpunkten. Graphische Übersicht der (A) Kollagensekretion und der (B) Bildung nicht-kollagener Proteine (μ g/cm ² ; Mittelwert \pm SEM;	

n=4); Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + β -GP (5 mM); ** p<0,01; *** p<0,001.....	47
Abbildung 23: Alkalische Phosphatase Aktivität von MC3T3-E1 Zellen auf verschiedenen Gelatinebeschichtungen bestimmt an unterschiedlichen Zeitpunkten. Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + β -GP (5 mM)	49
Abbildung 24: Mineralisationsfähigkeit von MC3T3-E1 Zellen, kultiviert auf verschiedenen Gelatinebeschichtungen am Tag 21. (A) Repräsentative Abbildungen der Alizarin Red S Färbung. (B) Ergebnis der Alizarin Red S Färbung, angegeben in μ M/l gebundenem Farbstoff (n=3). Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + β -GP (5 mM); * p<0,05 vs. Kontrolle; *** p<0,001 vs. Kontrolle.....	50
Abbildung 25: Darstellung quantitativer Ergebnisse der Alizarin Red S Färbung von MC3T3-E1 Zellen (A-D) auf Beschichtungen verschiedener Gelatintypen im Detail.....	51
Abbildung 26: Einfluss der Zellproliferation primärer Maus-Osteoblasten kultiviert auf LCM3 und LCM6. (A) Morphologisches Aussehen der Osteoblasten auf den unterschiedlichen Materialien (Originalvergrößerung x 10). (B) Farbintensität des entstandenen Formazans nach 4 Stunden Inkubationzeit. (C) Graphische Darstellung der gemessenen Absorption des durch Zellmetabolismus gebildeten Formazans bei 490 nm (n=9). Kontrolle = Osteoblasten auf TC-Oberfläche; *** p < 0,001 vs. Kontrolle.....	53
Abbildung 27: Effekt von LCM3 und LCM6 auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase. (A) Gefärbter Zelllayer von LCM3 und LCM6 am Tag 4. (B) Mikroskopische Detailaufnahmen von Osteoblasten auf LCM3 mit aktiver Alkalischer Phosphatase (Originalvergrößerung x 10). Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + β -GP (5 mM)	54
Abbildung 28: Alizarin Red S Färbung primärer Osteoblasten auf LCM3 am Tag 14 und Tag 21. (A) Darstellung der gefärbten Kultur. (B) Mikroskopische Detailaufnahmen der Alizarin Red S gefärbten Kultur (Originalvergrößerung x 10). Kontrolle = α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + β -GP (5 mM)	55
Abbildung 29: Graphische Darstellung der Konzentrationsbestimmung des gebunden Farbstoffes mittels Extraktionsverfahren am (A) Tag 14 und (B) Tag 21 (n= 4); * p<0,05.....	56
Abbildung 30: Alizarin Red S Färbung primärer Osteoblasten auf LCM6 am Tag 21. (A) Darstellung der gefärbten Kultur. (B) Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung in μ M/l Alizarin Red S (n = 3); Kontrolle= α -MEM + 10% FCS hi; MM = α -MEM + 10% FCS hi + Vit. C (50 μ g/ml) + β -GP (5 mM).....	56

Abbildung 31: Graphische Darstellung des Differenzierungsprozesses und repräsentative mikroskopische Detailaufnahmen primärer Maus-Osteoblasten Fraktion III (Originalvergrößerung x 10) von unterschiedlichen Färbemethoden. (A) Alkalische Phosphatase Färbung; (B) Sirius Red und Fast Green Färbung; (C) Alizarin Red S Färbung. 61

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kulturbedingungen für Osteoblastenkulturen zur Initialisierung von Matrixmineralisation.....	23
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Gelatinetypen einschließlich ihrer Spezifikationen.	24
Tabelle 3: Tabellarische Übersicht über die verhältnismäßige Zusammensetzung der einzelnen Materialtypen.	25
Tabelle 4: Reagenzien	35
Tabelle 5: Material.....	36
Tabelle 6: Geräte	37
Tabelle 7: Quantitative Ergebnisse der Alizarin Red S Färbung angegeben in $\mu\text{M}/\text{l}$ gebundenem Farbstoff (Mittelwert \pm SEM; n=3).	41
Tabelle 8: Beurteilung der relativen Farbintensität der Alkalischen Phosphatase Färbung	43
Tabelle 9: Quantitative Ergebnisse der Alizarin Red S Färbung angegeben in $\mu\text{M}/\text{l}$ gebundenem Farbstoff (Mittelwert \pm SEM, n=4).	45
Tabelle 10: Quantitative Ergebnisse der Kollagensynthese an verschiedenen Zeitpunkten berechnet in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Mittelwert \pm SEM; n=4).....	47
Tabelle 11: Quantitative Ergebnisse der Bildung von nicht-kollagenen Proteinen an verschiedenen Zeitpunkten berechnet in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Mittelwert \pm SEM; n=4).	48
Tabelle 12: Quantitative Resultate der Alizarin Red S Färbung in $\mu\text{M}/\text{l}$ gebundenem Farbstoff in tabellarischer Darstellung (Mittelwert \pm SEM; n=3).	51
Tabelle 13: Quantitatives Ergebnis des Zellviabilitäts- und Zellproliferations-Assays (Mittelwert \pm SEM; n=9).	53
Tabelle 14: Beurteilung der relativen Farbintensität der Alkalischen Phosphatase Färbung Maus-Osteoblasten auf LCM3 und LCM6.*Die relative Farbintensität wurde optisch bewertet (n=3); +++ stark positive Färbung; ++ positive Färbung; + schwach positive Färbung; - keine Färbung	55
Tabelle 15: Quantitatives Resultat der Alizarin Red S Färbung in $\mu\text{M}/\text{l}$ gebundenem Farbstoff in tabellarischer Darstellung (Mittelwert \pm SEM; n=4).	56
Tabelle 16: Quantitatives Resultat der Alizarin Red S Färbung in $\mu\text{M}/\text{l}$ gebundenem Farbstoff in tabellarischer Darstellung (Mittelwert \pm SEM; n=3).	57
Tabelle 17: Auswirkung von Beschichtungen verschiedener Gelatinetypen auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase und die Mineralisation von MC3T3-E1; * Die relative Farbintensität	

wurde optisch bewertet (n =3); +++ stark positive Färbung; ↑↑↑: Anstieg der Mineralisation um mehr als 100% vs. Kontrolle; ↑↑: Anstieg der Mineralisation um mehr als 50% vs. Kontrolle; ↑: Anstieg der Mineralisation um mehr als 10% vs. Kontrolle (Kontrolle= 2272 µM/l; n=3)..... 58

Tabelle 18: Einfluss von LCM3 und LCM6 auf Proliferation, Zellviabilität, Differenzierung und Matrixmineralisation; * Die relative Farbintensität wurde durch visuelle Betrachtung bewertet (n =3); ↓↓↓ starke Reduktion der Zellviabilität/-proliferation; ↓↓ moderate Reduktion der Zellviabilität/-proliferation; +++ stark positive Färbung; ++ positive Färbung; + schwach positive Färbung; - keine Färbung 59

10.Literaturverzeichnis

- Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA 2008 Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis. *Journal of Dental Research* **87**(2):107-118.
- Anderson G 2008 Colorimetric Alkaline Phosphatase and Peroxidase Substrate Detection Systems. Biofiles Sigma Aldrich.
- Aubin J, Liu F 1996 The osteoblast lineage. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G (eds.) *Principles of bone biology*. Academic Press, pp 51-68.
- Bakker AD, Klein-Nulend J 2012 Osteoblast Isolation from Murine Calvaria and Long Bones. In: Helfrich MH, Ralston SH (eds.) *Bone Research Protocol*, vol. 816. Humana Press, pp 19-29.
- Baroli B 2009 From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges. *Journal of pharmaceutical sciences* **98**(4):1317-1375.
- Bellido T, Plotkin LI, Bruzzaniti A 2014 Chapter 2 - Bone Cells. In: Allen DBBR (ed.) *Basic and Applied Bone Biology*. Academic Press, San Diego, pp 27-45.
- Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Roveri N, Rubini K 2002 Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* **23**(24):4827-4832.
- Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N 2001 Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials* **22**(8):763-768.
- Bose S, Bandyopadhyay A 2013 Introduction to Biomaterials. In: Bose S, Bandyopadhyay A (eds.) *Characterization of Biomaterials*. Elsevier.
- Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS 2012 In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European Cells and Materials* **24**:1-17.
- Farris S, Song J, Huang Q 2010 Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**(2):998-1003.
- Friedenstein A, Chailakhyan R, Gerasimov U 1987 Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Proliferation* **20**(3):263-272.
- Friedenstein A, Lalykina K 1970 Lymphoid cell populations are competent systems for induces osteogenesis. *Calcified Tissue Research* **4**(1):105-106.
- Gegenbauer C 1864 Über die Bildung des Knochengewebes. *Naturwissenschaften*.
- Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ 2004 An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry* **329**(1):77-84.
- Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE, Robey PG 2001 Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* **28**(2):174-181.
- Haug IJ, Draget KI, Smidsrød O 2004 Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids* **18**(2):203-213.
- Hidalgo-Bastida LA, Cartmell SH 2010 Mesenchymal stem cells, osteoblasts and extracellular matrix proteins: enhancing cell adhesion and differentiation for bone tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **16**(4):405-412.
- Hill P 1998 Bone remodelling. *British journal of orthodontics* **25**(2):101-107.
- Hollinger J, Wong ME 1996 The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* **82**(6):594-606.
- Ito A, Mase A, Takizawa Y, Shinkai M, Honda H, Hata K, Ueda M, Kobayashi T 2003 Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. *J Biosci Bioeng* **95**(2):196-199.
- Jähn K, Bonewald LF 2012 Chapter 1 - Bone Cell Biology: Osteoclasts, Osteoblasts, Osteocytes. In: Jüppner FHGM (ed.) *Pediatric Bone (Second Edition)*. Academic Press, San Diego, pp 1-8.
- Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu JK 2012 An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem* **45**(12):863-873.

- Kundu J, Pati F, Hun Jeong Y, Cho D-W 2013 Chapter 2 - Biomaterials for Biofabrication of 3D Tissue Scaffolds. In: Forgacs G, Sun W (eds.) Biofabrication. William Andrew Publishing, Boston, pp 23-46.
- Lam J, Nelson CA, Ross FP, Teitelbaum SL, Fremont DH 2001 Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *Journal of Clinical Investigation* **108**(7):971-979.
- Li Z, Kong K, Qi W 2006 Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **343**(2):345-350.
- Lian JB, Stein GS 2006 Chapter 14 - The Cells of Bone. In: Bilezikian MJSPRP (ed.) Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism (Second Edition). Academic Press, Burlington, pp 221-258.
- Long F 2012 Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**:27-38.
- Lou X, Chirila TV 1999 Swelling behavior and mechanical properties of chemically cross-linked gelatin gels for biomedical use. *J Biomater Appl* **14**(2):184-191.
- Majeska R 2001 Cell biology of bone. In: Cowin S (ed.) Bone Mechanics Handbook. CRC Press, pp 1-24.
- Malone JD, Teitelbaum SL, Griffin GL, Senior RM, Kahn AJ 1982 Recruitment of Osteoclast Precursors by Purified Bone-Matrix Constituents. *J Cell Biol* **92**(1):227-230.
- Marsell R, Einhorn TA 2011 The biology of fracture healing. *Injury* **42**(6):551-555.
- Mathews S, Bhonde R, Gupta PK, Totey S 2012 Extracellular matrix protein mediated regulation of the osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Differentiation* **84**(2):185-192.
- Mellis DJ, Itzstein C, Helfrich MH, Crockett JC 2011 The skeleton: a multi-functional complex organ. The role of key signalling pathways in osteoclast differentiation and in bone resorption. *J Endocrinol* **211**(2):131-143.
- Mironi-Harpaz I, Wang DY, Venkatraman S, Seliktar D 2012 Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: crosslinking efficiency versus cytotoxicity. *Acta biomaterialia* **8**(5):1838-1848.
- Nair LS, Laurencin CT 2007 Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* **32**(8-9):762-798.
- Orriss IR, Taylor SEB, Arnett TR 2012 Rat osteoblast cultures. In: Helfrich MH, Ralston SH (eds.) Bone Research Protocols, vol. 816. Humana Press, pp 31-41.
- Peck WA, Birge SJ, Jr., Fedak SA 1964 Bone Cells: Biochemical and Biological Studies after Enzymatic Isolation. *Science* **146**(3650):1476-1477.
- Pezron I, Djabourov M, Leblond J 1991 Conformation of gelatin chains in aqueous solutions: 1. A light and small-angle neutron scattering study. *Polymer* **32**(17):3201-3210.
- Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D 1999 Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**:143-147.
- Pritchard J 1952 A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat. *Journal of Anatomy* **86**:259-277.
- Ross-Murphy SB 1992 Structure and rheology of gelatin gels: recent progress. *Polymer* **33**(11):2622-2627.
- Rungby J, Kassem M, Eriksen EF, Danscher G 1993 The von Kossa reaction for calcium deposits: silver lactate staining increases sensitivity and reduces background. *Histochemical Journal* **25**:446-451.
- Samavedi S, Poindexter LK, Van Dyke M, Goldstein AS 2014 Chapter 7 - Synthetic Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. In: Stratta GOLSJ (ed.) Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation. Academic Press, Boston, pp 81-99.
- Shrivats AR, Alvarez P, Schutte L, Hollinger JO 2014 Bone Regeneration. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J (eds.) Principles of Tissue Engineering, Fourth Edition ed. Elsevier, pp 1201-1221.
- Smith S, Hafer LJ 2010 Pigments and Minerals. Special Stains Education Guide Dako.
- Suarasan S, Focsan M, Maniu D, Astilean S 2013 Gelatin-nanogold bioconjugates as effective plasmonic platforms for SERS detection and tagging. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **103**:475-481.
- Takahashi N, Udagawa N, Suda T 1999 A New Member of Tumor Necrosis Factor Ligand Family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, Regulates Osteoclast Differentiation and Function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **256**(3):449-455.
- Teitelbaum SL 2000 Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* **289**(5484):1504-1508.

- Treiser M, Abramson S, Langer R, Kohn J 2013 Chapter I.2.6 - Degradable and Resorbable Biomaterials. In: Lemons BDRSHJSE (ed.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp 179-195.
- Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P 2007 Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* **38 Suppl 1**:S11-25.
- Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T 1990 Origin of Osteoclasts - Mature Monocytes and Macrophages Are Capable of Differentiating into Osteoclasts under a Suitable Microenvironment Prepared by Bone Marrow-Derived Stromal Cells. *P Natl Acad Sci USA* **87(18)**:7260-7264.
- Vaananen HK, Horton M 1995 The Osteoclast Clear Zone Is a Specialized Cell-Extracellular Matrix Adhesion Structure. *J Cell Sci* **108**:2729-2732.
- Van Den Bulcke AI, Bagdanov B, De Rooze N, Schacht EH, Cornelissen M, Berghmans H 2000 Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules* (1):31-48.
- Weis A 1964 The macromolecular chemistry of gelatin. Academic Press
- Wainwright FW 1977 Physical tests for gelatin and gelatin products. In: Ward AG, Coutts A (eds.) The science and technology of gelatin. Academic Press, New York, pp 507-534.
- Williams CG, Malik AN, Kim TK, Manson PN, Elisseeff JH 2005 Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. *Biomaterials* **26(11)**:1211-1218.
- Yamamoto M, Ikada Y, Tabata Y 2001 Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **12(1)**:77-88.
- Zhang Z, Ortiz O, Goyal R, Kohn J 2014 13 - Biodegradable Polymers. In: Ebnesajjad KM (ed.) Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices. William Andrew Publishing, Oxford, pp 303-335.
- zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ 2003 In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* **71(1)**:18-27.