

**Aus dem Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der
Zahnheilkunde**

der Universität Würzburg

Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. Jürgen Groll

**Analyse der Expression osteogener Markerproteine in
humanen mesenchymalen Stromazellen nach Kultur auf
elektrogesponnenen Scaffolds**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Alexander Maier

aus Aalen

Würzburg, November 2017



Referent: Prof. Dr. Jürgen Groll

Korreferent: Prof. Dr.Dr. Alexander Kübler

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2019

Der Promovend ist Zahnarzt

Meiner Familie

in Liebe und Dankbarkeit

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Knochengewebe	1
1.2	Humane mesenchymale Stammzellen	2
1.3	Melt electrospinning writing als Methode zur Produktion von Scaffolds	7
1.4	Proteinexpressionsanalyse mittels SDS-PAGE und Western Blot	11
1.5	Zielsetzung.....	12
2	Materialien und Methoden	13
2.1	Materialien.....	13
2.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	14
2.1.3	Geräte.....	16
2.1.4	Puffer und Lösungen	18
2.1.5	Zellkulturmedien	19
2.1.6	Zell- und Proteinlysate	20
2.1.7	Antikörper	22
2.1.8	Computerprogramme.....	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Isolierung der hBMSCs.....	24
2.2.2	Herstellung der PCL MEW Faser Scaffolds und ihre Geometrie	25
2.2.3	Zellkultur	25
2.2.4	Proteinisolierung und Probenvorbereitung.....	26
2.2.4.1	Proteinisolierung hBMSCs	26

2.2.4.2	Totalzelllysate MG63.....	27
2.2.5	SDS-PAGE	28
2.2.6	Western Blot	30
2.2.7	Inkubation mit den Antikörpern	31
2.2.8	Filmexposition und Filmentwicklung	32
2.2.9	Stripping	32
2.2.10	Ergebnisauswertung	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Etablierung der Versuchsprotokolle für den Nachweis verschiedener osteogener Markerproteine mittels Western Blot	35
3.1.1	β -Tubulin (Tub)	36
3.1.2	Alkalische Phosphatase (ALPL).....	37
3.1.3	Bone Sialoprotein (BSP).....	38
3.1.4	Kollagen Typ I (Col I).....	39
3.1.5	Osteopontin (SPP1, secreted phosphoprotein 1).....	41
3.2	Differenzierungsverhalten von hBMSCs auf PCL Faser Scaffolds	42
3.2.1	β -Tubulin.....	42
3.2.2	Alkalische Phosphatase.....	44
3.2.3	Bone Sialoprotein	49
3.2.4	Kollagen Typ I.....	54
3.2.5	Osteopontin	59
4	Diskussion	66
4.1	Nachweis der osteogenen Markerproteine und Antikörperfunktionalität.....	66
4.2	Einfluss auf die Differenzierung der hBMSCs nach Kultivierung auf Scaffolds mit unterschiedlichen Maschenweiten und Monolayern	69

4.2.1	Spenderabhängiges Differenzierungspotential	75
4.2.2	Abhängigkeit der Differenzierung von der Herkunft der hBMSCs	76
5	Zusammenfassung	78
6	Literaturverzeichnis.....	80
7	Abbildungsverzeichnis	89
8	Tabellenverzeichnis	92
9	Anhang	94

Abkürzungen

%	Prozent
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
ALPL	gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BSP	Bone Sialoprotein
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
Col I	Kollagen Typ I
ddH ₂ O	Reinstwasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	enhanced chemiluminescence
ES	Electrospinning mit Polymerlösung
FCS	Fötale Kälberserum
G	Gauge
g	Gramm
h	Stunde
hBMSCs	Humane mesenchymale Stromazellen aus trabekulären Knochengewebe
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen
hFOB	Humane fötale Osteoblasten
hMSCs	Humane mesenchymale Stammzellen
kDa	Kilodalton
M	Molarität
mA	Milliampere
MEW	Melt electrospinning writing
MG	Humane Osteosarkomzellen

mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OCN	Osteocalcin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCL	Poly- ϵ -Caprolacton
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> , negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde
SPP1	Osteopontin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tub	β -Tubulin
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Knochengewebe

Das menschliche Skelett besteht aus über 200 verschiedenen Knochen. Als Ursprungs- und Ansatzpunkt der Muskulatur sind sie ein wichtiger Bestandteil des Bewegungsapparats. Gleichzeitig bieten sie den im Körperinneren liegenden Organen Schutz, erfüllen wichtige Aufgaben im Stoffwechsel, der Blutbildung und dienen als Speicherort für lebensnotwendige Mineralien und Zellen [1]. Eine ihrer Hauptfunktionen ist aber die Halte- und Stützfunktion sowie Formgebung des gesamten Körpers. Zahlreiche pathologische und physiologische Einflüsse wirken allerdings im Laufe des Lebens auf die Knochen ein und beeinflussen deren Struktur und Stabilität. Neben einfachen Knochenbrüchen können auch altersbedingte Veränderungen wie Osteoporose [2-4] oder degenerative Erkrankungen wie Tumorleiden [5-7] die Knochenstruktur verändern. Zwar ist der Knochen in der Lage sich an veränderte Beanspruchungen anzupassen, jedoch geschieht dies nur langsam und wird durch die verschiedensten Faktoren beeinflusst [8, 9].

Knochen bestehen aus einer harten Hülle, der sogenannten Kompakta und dem gitternetzartigen Inneren, der Spongiosa. Beide Strukturen werden von Osteoblasten gebildet, die aus hMSCs hervorgehen [10]. Osteoblasten sind für die Synthese von Kollagen und die Mineralisation mit Calcium-Phosphat-Präzipitaten sowie die Sezernierung der extrazellulären Matrix verantwortlich. Kollagenfibrillen, die hauptsächlich aus Kollagen Typ I und Hydroxylapatit-Kristallen bestehen, tragen zur Biegefestigkeit des Knochengewebes bei [11]. Neu gebildete Matrix wird immer auf schon vorhandenem Knochen sezerniert, somit dient er den Osteoblasten als Leitschiene für den weiteren Aufbau des Knochens [12]. Neben den Osteoblasten gibt es weitere Zelltypen im Knochengewebe, z.B. Osteozyten zu denen Osteoblasten differenzieren, die sich selbst durch die Mineralisation der Extrazellulärmatrix eingemauert haben. Osteoklasten, die sich aus dem

hämatopoietischen System heraus entwickeln, sind für den geregelten Abbau des Knochens verantwortlich. Sie sezernieren Säure und lysosomale Enzyme, um die Knochenmatrix aufzulösen und sind somit ein wichtiger Bestandteil beim stetigen physiologischen Knochenumbau [3, 12-14].

Kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen Auf- und Abbau des Knochens, sind oftmals Verlust der Knochenhartschubstanz oder eine verringerte Stabilität des Hartgewebes die Folgen [3, 15, 16].

Die verlorene Knochenstanz muss in vielen Fällen ersetzt werden.

1.2 Humane mesenchymale Stammzellen

Am Anfang der Entwicklung des menschlichen Körpers steht eine totipotente Zygote. Sie kann sich in jeden möglichen Zelltyp differenzieren, so dass aus ihr ein neues Individuum entstehen kann. Im Stadium des Blastozysts sind die embryonalen Stammzellen pluripotent. Sie sind nicht mehr fähig ein neues Individuum zu bilden, sind aber Vorläufer für viele verschiedene Zelltypen. In der weiteren menschlichen Entwicklung kommt es daraufhin zur Bildung von drei Keimblättern, dem Entoderm, Mesoderm und Ektoderm. Aus dem Entoderm gehen Organe des Verdauungstrakts, die Leber, das Pankreas, die Schilddrüse mit Thymus, Atmungsorgane, die Harnblase und -röhre hervor. Aus dem Mesoderm bilden sich unter anderem die Knochen und Muskeln, Bindegewebe, das Herz und die Nieren sowie die Nebennieren, aus dem Ektoderm die Haut, das Nervensystem, alle Sinnesorgane und die Zähne. Bei adulten Stammzellen spricht man von multipotenten Zellen, die sich nur noch in bestimmte Zelltypen differenzieren können. Mesenchymale Stammzellen differenzieren somit nur zu Zellen des Mesoderms [17].

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs) kommen im menschlichen Organismus in verschiedenen Geweben vor, wie z.B. im Knochenmarkstroma [18-21], in Fettgewebe [22, 23], in der Synovia [24], in Skelettmuskeln [25, 26] und im perivaskulären Gewebe der Nabelschnur [27, 28]. Das Vorkommen in diesen Geweben hat den Hintergrund, dass die multipotenten hMSCs sich zu Zellen des Gewebes differenzieren, aus dem sie stammen [29]. hMSCs

besitzen somit die Eigenschaft sich zu speziellen Zellen des Knochen- [30, 31], Knorpel- [32], Sehnen- [33, 34], Muskel- [35, 36] und Fettgewebes [19, 37] zu differenzieren. Außerdem sind sie bei der Entwicklung spezieller Zellen des Stromas für das blutbildende Gewebe beteiligt [19]. Neben den bereits beschriebenen Eigenschaften besitzen hMSCs über die gesamte Lebenszeit des Individuums eine hohe Proliferationsrate [30, 38].

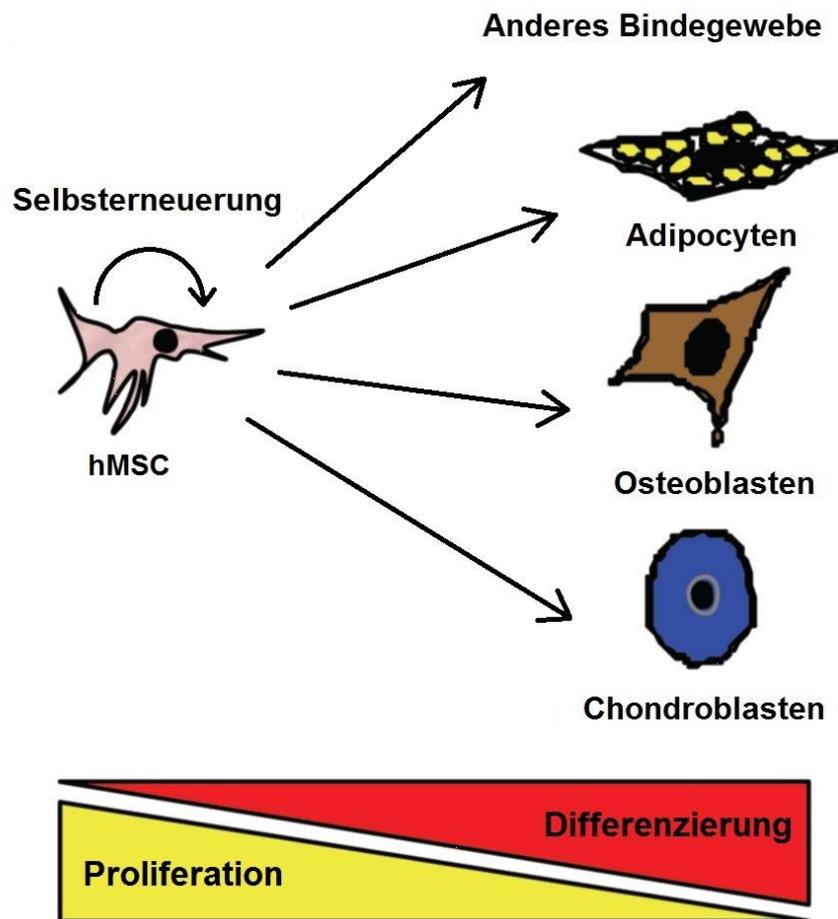


Abbildung 1.1: Differenzierung und Proliferation von hMSCs

Dargestellt sind die möglichen Differenzierungswege mesenchymaler Stammzellen (hMSCs). Neben der Proliferation zur Selbsterneuerung der hMSCs sind die drei Hauptdifferenzierungslinien zu Zellen des Fett- (Adipocyten), Knochen- (Osteoblasten) und Knorpelgewebes (Chondroblasten) zu sehen. Die im Text zusätzlich erwähnten Zelltypen wurden unter „Anderes Bindegewebe“ zusammengefasst. Unten ist der Zusammenhang einer hohen Proliferationsrate bei relativ undifferenzierten Zellen bis hin zu ausdifferenzierten Zellen, die nicht mehr proliferieren, gezeigt. Nach Baksh et al. [29]

Für die Forschung isolierte hMSC Kulturen enthalten jedoch nicht ausschließlich hMSCs. Die Isolation der Zellen erfolgt aus den Hüftköpfen

humaner Spender durch Plastikadhärenz [18, 39, 40]. Es befinden sich somit auch Zellen nachgeschalteter Differenzierungsstufen in den isolierten Proben. Es ist davon auszugehen, dass vor allem Differenzierungsstadien vorliegen, die sich in die Richtung des Herkunftsgewebes entwickelt haben [41]. Die für diese Arbeit verwendeten primären Zellen aus dem trabekulären Knochengewebe werden daher im Folgenden als humane mesenchymale Stromazellen aus trabekulären Knochen (human bone-derived mesenchymal stromal cells, hBMSCs) bezeichnet.

Friedenstein und seine Kollegen waren Vorreiter auf dem Gebiet einer *in vitro* Kultivierung der hBMSCs. Sie fanden heraus, dass die isolierten Stromazellen auf starren Oberflächen adhäreren, bei geeigneter Kultivierung weiter proliferationsfähig bleiben und als Progenitorzellen für die Osteogenese dienen können [39, 42]. Durch die zügige Adhäsion der hBMSCs auf der glatten Trägeroberfläche lassen sie sich schnell und einfach von anderen Zellen wie Erythrozyten trennen [43]. Die Dichte der ausgesäten Zellen auf einem Zellträger spielt ebenfalls eine Rolle. Eine zu hohe Dichte bei der Kultivierung der hBMSCs hemmt ihr Wachstum. Eine geringere Dichte beeinflusst die Wachstumsrate der hBMSCs positiv. Sie lässt sich durch Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren wie TGF (Transforming growth factor) weiter steigern [38, 44]. Mit der Isolierung der Zellen aus menschlichem Gewebe beschäftigten sich unter anderem Haynesworth et al. [45] und Nöth et al. [46]. Eine schonende Methode zur Zellisolierung ist Voraussetzung für jegliche *in vitro* Kultivierung der hBMSCs.

Pittenger et al. [47], Prockop et al. [19] und Muraglia et al. [48] konnten eine erfolgreiche Differenzierung der isolierten hBMSCs in die in Abbildung 1.1 gezeigten drei Hauptzelllinien zeigen. Dabei war zu beobachten, dass die hBMSCs bei *in vitro* Kultivierung mit einfachem Nährmedium proliferieren oder in ihrer G0 Phase verharren bis sie durch äußere Reize zur Differenzierung stimuliert werden [49]. Je häufiger die Stromazellen sich jedoch sowohl *in vitro* wie *in vivo* replizieren, desto weniger potent werden sie. Wie in Abbildung 1.2 gezeigt, werden anfangs multipotente hBMSCs zu tri- oder bipotenten Stromazellen. Eine Differenzierung in die adipogene und chondrogene Richtung

wird aufgrund ihrer Herkunft aus trabekulären Knochengewebe unwahrscheinlicher. Es kommt zu einer Anhäufung osteogener Vorläuferzellen [48].

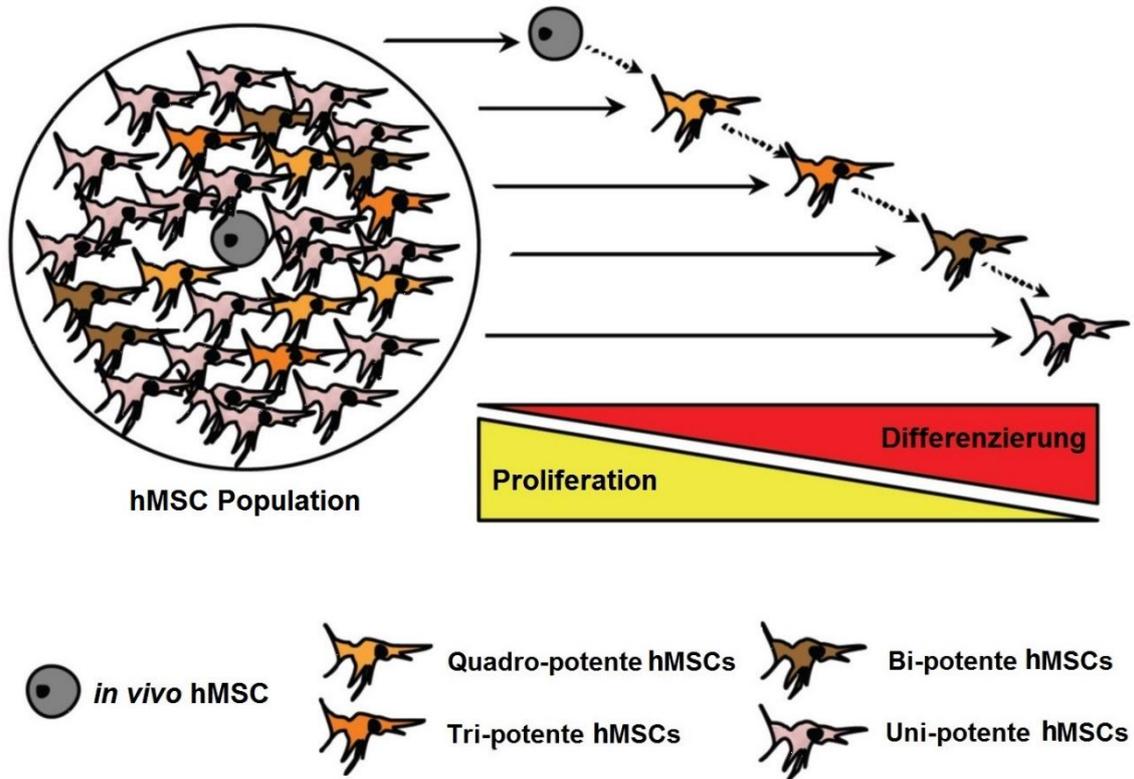


Abbildung 1.2: Differenzierung hMSCs in vivo

Dargestellt ist die gesamte Population unterschiedlich potenter hMSCs *in vivo*. Im Lauf der Zeit verlieren die hMSCs ihre Eigenschaft sich in verschiedene Zelltypen differenzieren zu können. Die meisten Zellen sind unipotente Stammzellen die sich zumeist in osteogene Vorläuferzellen aufgrund ihrer Herkunft aus trabekulären Knochengewebe differenzieren. Je weniger potent die Zellen sind, desto geringer ist ihre Proliferationsrate. Nach Baksh et al. [29]

Der Start der Differenzierung der Stromazellen *in vitro* ist abhängig von der Zugabe von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Bestandteilen der Extrazellulärmatrix, wodurch eine gezielte Aktivierung und Deaktivierung von Transkriptionsfaktoren ausgelöst wird. Die Mikrostruktur der extrazellulären Umgebung nimmt diesbezüglich ebenfalls Einfluss auf die Zellen [50, 51]. Bei der Osteogenese werden die Transkriptionsfaktoren Cbfa1/Runx2, Msx2, Dlx5 und Osx aktiviert [52]. Hierbei kommt es anschließend zu einer erhöhten Expression von Markerproteinen wie Osteopontin (secreted phosphoprotein 1, SPP1), Kollagen Typ I (Col I), Alkalische Phosphatase (ALPL), Bone Sialoprotein (BSP) und Osteocalcin (OCN) [10, 53]. Die

Expression der Proteine kann in verschiedenen Bereichen der Kulturschale oder im 3D Scaffold unterschiedlich stark ausgeprägt sein. So kann es zum Beispiel im Zentrum zu einer stark erhöhten Proteinbildung kommen während es in der Peripherie zu einer nur gering erhöhten Expression kommt [54]. Während des gesamten Zeitraums der Kultivierung kommt es bei den Markerproteinen zu Änderungen in der Expressionsrate, wobei jedes Protein einen anderen Expressionsverlauf aufweist [29]. Die Entwicklung von hBMSCs zu Osteoblasten wird in drei Hauptstufen eingeteilt. Mit der Proliferation der Progenitorzellen beginnt die Differenzierung der hBMSCs. Anschließend erfolgt die Differenzierung der Progenitorzellen zu Osteoblasten und damit die Bildung, Entwicklung und die Reifung der extrazellulären Matrix. Danach mineralisiert die gebildete extrazelluläre Matrix (siehe Abbildung 1.3). Bei jedem dieser Differenzierungsstadien in der Osteoblastogenese sind unterschiedliche Strukturproteine, die für ein Differenzierungsstadium charakteristisch sind, beteiligt [55, 56]. SPP1 wird schon in der frühen Differenzierungsphase zur unreifen Osteoprogenitorzelle gebildet und bleibt während der gesamten Proliferations- und Differenzierungsphase gleichmäßig stark exprimiert. Seine Anwesenheit ist Voraussetzung für die Aktivierung der Transkription und Expression anderer Markerproteine. Bei der Reifung der Osteoprogenitorzellen und im Präosteoblastenstadium wird die Bildung von Col I erhöht. Es beginnt die Phase der Bildung von extrazellulärer Matrix. In der gleichen Zeit wird die Expression von ALPL aktiviert. Der Höhepunkt der ALPL Bildung liegt um den neunten Tag der Kultivierung nach Zugabe der Differenzierungszusätze. Bei fortschreitender Mineralisation wird die Transkription und Expression dieses Proteins jedoch wieder gehemmt und es kommt zu einer Abnahme des Proteingehaltes von ALPL. Eine erhöhte ALPL Konzentration ist allerdings erforderlich um mit dem beginnenden Osteoblastenstadium BSP zu exprimieren. *In vitro* unterstützt BSP ab ca. dem 17. Tag die Matrixmineralisation. Der späteste Proteinmarker Osteocalcin wird zu Beginn des Osteozytenstadiums gebildet und fällt damit ebenfalls in die Phase der Matrixmineralisation. Ab Tag 45 kann die verstärkte Expression von OCN nachgewiesen werden [10, 57-60].

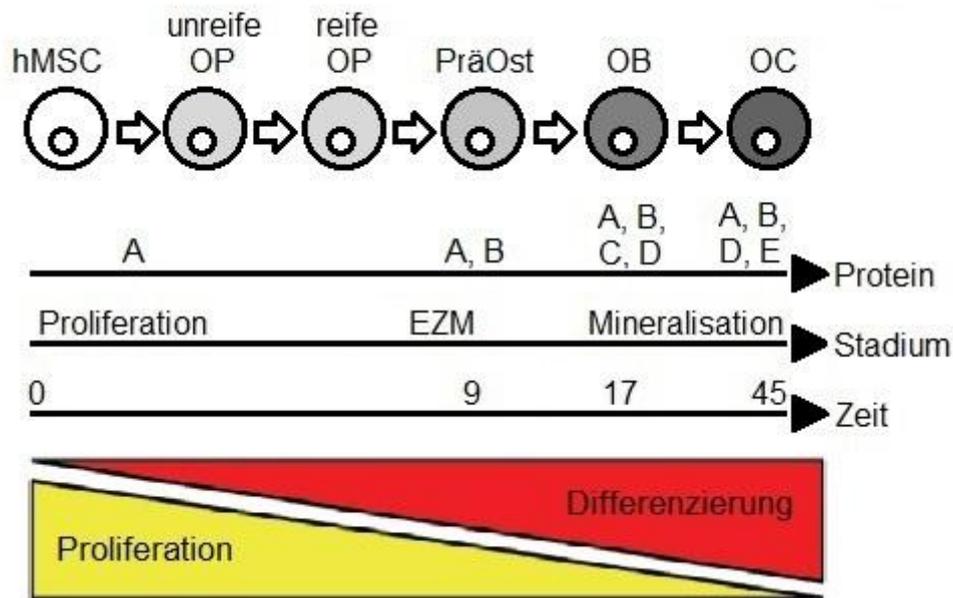


Abbildung 1.3: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten in vitro

Schon bei beginnender Differenzierung der hMSCs wird SPP1 exprimiert. Die Anwesenheit von SPP1 ist Voraussetzung für die Expression von Col I und ALPL. Die Expression von ALPL erreicht um den 9. Tag seinen Höhepunkt. Bei fortschreitender Mineralisation der Matrix wird die Expression von ALPL reduziert. Dafür werden andere Transkriptionsfaktoren aktiviert, die um den 17. Tag vermehrt BSP exprimieren. Der am spätesten exprimierte Proteinmarker, OCN, wird um den 45. Tag gebildet.

Humane mesenchymale Stammzelle (hMSC), Osteoprogenitorzelle (OP), Präosteoblast (PräOst), Osteoblast (OB), Osteocyt (OC); Proteine: SPP1 (A), Col I (B), ALPL (C), BSP (D), OCN (E); Bildung extrazellulärer Matrix (EZM); Zeit in Tagen; nach Madras et al. [10]

Die oben beschriebenen Eigenschaften der hMSCs bieten ein breites Spektrum für den Einsatz in der regenerativen Medizin. Sie sind geeignet für den Aufbau und Ersatz von Knochengewebe [32, 61, 62], Knorpel [63] und Sehnen [33]. Weitere Möglichkeiten bieten sich dadurch zum Beispiel in der Therapie von *Osteogenesis imperfecta* [64, 65] oder der Regeneration bei Erkrankungen des blutbildenden Stromas [66].

1.3 Melt electrospinning writing als Methode zur Produktion von Scaffolds

Zellen benötigen geeignete Zellträger um *in vitro* kultiviert zu werden. Hierfür eignen sich unter anderem Scaffolds, die im Tissue Engineering schon seit längerem Verwendung finden. Sie bieten Zellen ein dreidimensionales Gerüst für die Kultivierung. Solche Scaffolds werden sowohl aus metallischen,

keramischen als auch polymeren Materialien in unterschiedlichen Methoden hergestellt und weisen damit unterschiedliche Eigenschaften auf [67-70]. In der vorliegenden Arbeit stehen Scaffolds aus Polymeren im Blickpunkt.

Zwei Methoden werden hauptsächlich zur Produktion von Scaffolds mit Polymeren als Ausgangsmaterial angewandt. Wie in Abbildung 1.4 dargestellt wird neben dem Electrospinning mit Polymerlösungen (ES) die Melt electrospinning writing (MEW) Methode zur Herstellung von polymeren Scaffolds verwendet [71].

Das MEW bietet zur Analyse des Differenzierungsverhaltens von hBMSCs auf Scaffolds mit bestimmten Geometrien einige Vorteile als Zellträger im Vergleich zu Scaffolds, die mittels ES hergestellt wurden. Die Fasern werden bei der Herstellung exakt aufeinander platziert, deshalb sind die Maschengrößen der Scaffolds identisch und können durch Veränderung der Parameter auf eine bestimmte Größe eingestellt werden. Durch die Verwendung der Polymerschmelze ergeben sich im Gegensatz zur Verwendung von Polymerlösungen keine Verunreinigungen durch Lösungsmittel, die ebenfalls Einfluss auf das Differenzierungsverhalten haben könnten. Das verwendete Polymer Poly- ϵ -Caprolacton (PCL) ist biologisch verträglich und abbaubar und eignet sich aufgrund dessen für die Anwendung in Zellkulturen [67, 69, 72].

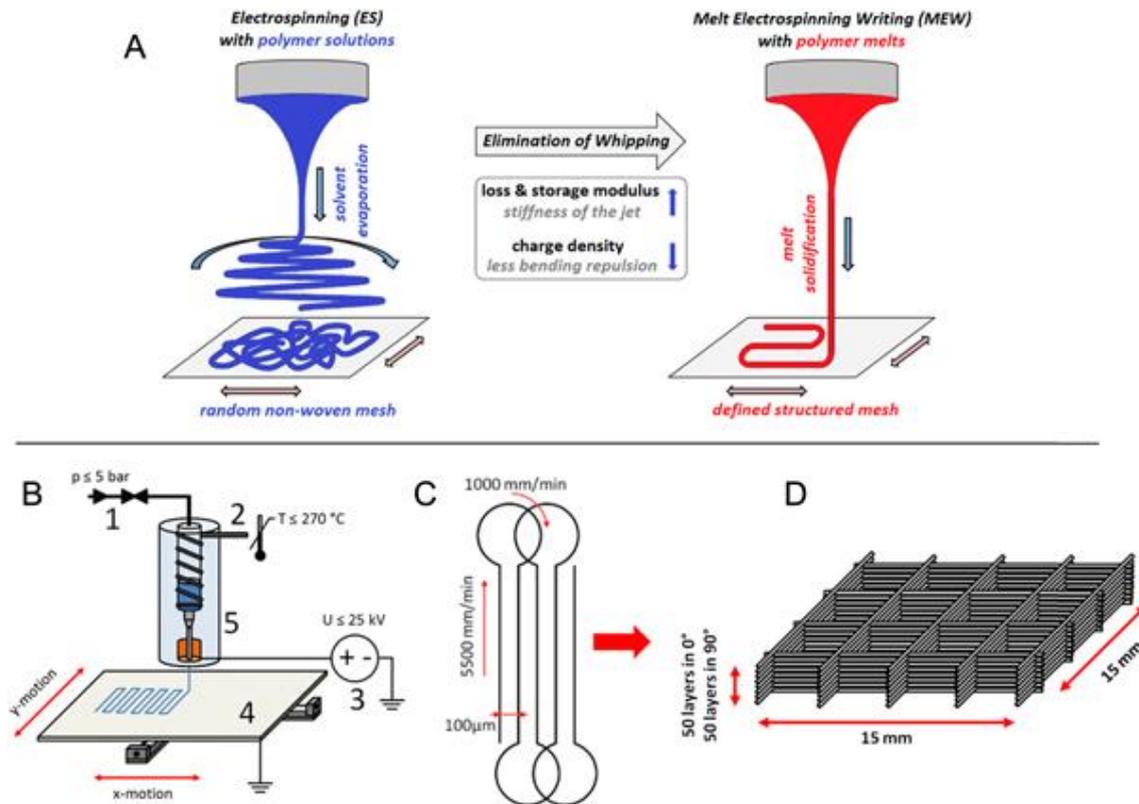


Abbildung 1.4: Melt electrospinning writing

Electrospinning aus einer Polymerlösung (ES) und Melt electrospinning writing (MEW) sind nebeneinander dargestellt (A). Bei dem MEW (B) wird das Polymer über den druckgesteuerten Zufuhrrohr (1) eingeleitet und mit dem Elektroheizsystem (2) geschmolzen. Durch die Nadelspitze der Polymerspritze (5) gelangt die Polymerschmelze auf den computergesteuerten Kollektor (4), der in seiner x- und y-Achse verschiebbar ist. Auf dem Kollektor kühlt die Polymerschmelze ab und erstarrt. Die Polymerspritze ist an eine Hochspannungsquelle (3) angeschlossen. Der Abstand zwischen der Nadelspitze und dem geerdeten Kollektor bleibt während dem Herstellungsprozess konstant. Schematisch ist der Bewegungsablauf des Kollektors bei der Herstellung einer Faserschicht dargestellt (C). Die Faserschichten werden abwechselnd in 0°- und 90°-Richtung exakt aufeinandergelegt und ergeben das dreidimensionale Gerüst (D). Nach Hochleitner et al. [71]

Die verschiedenen oben beschriebenen einstellbaren Parameter beeinflussen wie in Abbildung 1.5 dargestellt die Geometrie und Qualität der Fasern und der Scaffolds. Während bei dem ES aus Polymerlösungen Faserdurchmesser im Nanometerbereich erreicht werden können, befinden sich die Faserdurchmesser beim MEW zwischen 250 nm und mehreren hundert Mikrometern. Ein wichtiger Parameter ist der Druck mit dem das Polymer der Spritze zugeführt wird und die angelegte Spannung. Sie beeinflusst die Heiztemperatur der Polymerspritze und der Nadelspitze und damit die Viskosität der Polymerschmelze vor ihrem Austritt. Der Faserdurchmesser wird durch den Nadeldurchmesser, den Druck und die Geschwindigkeit beeinflusst.

Das genaue Ablegen der Fasern übereinander wird durch den Durchmesser der Nadelspitze und den Abstand der Nadel zur Kollektoroberfläche gesteuert. Das Molekulargewicht des Polymers nimmt ebenfalls Einfluss auf die Eigenschaften der Fasern [73-75].

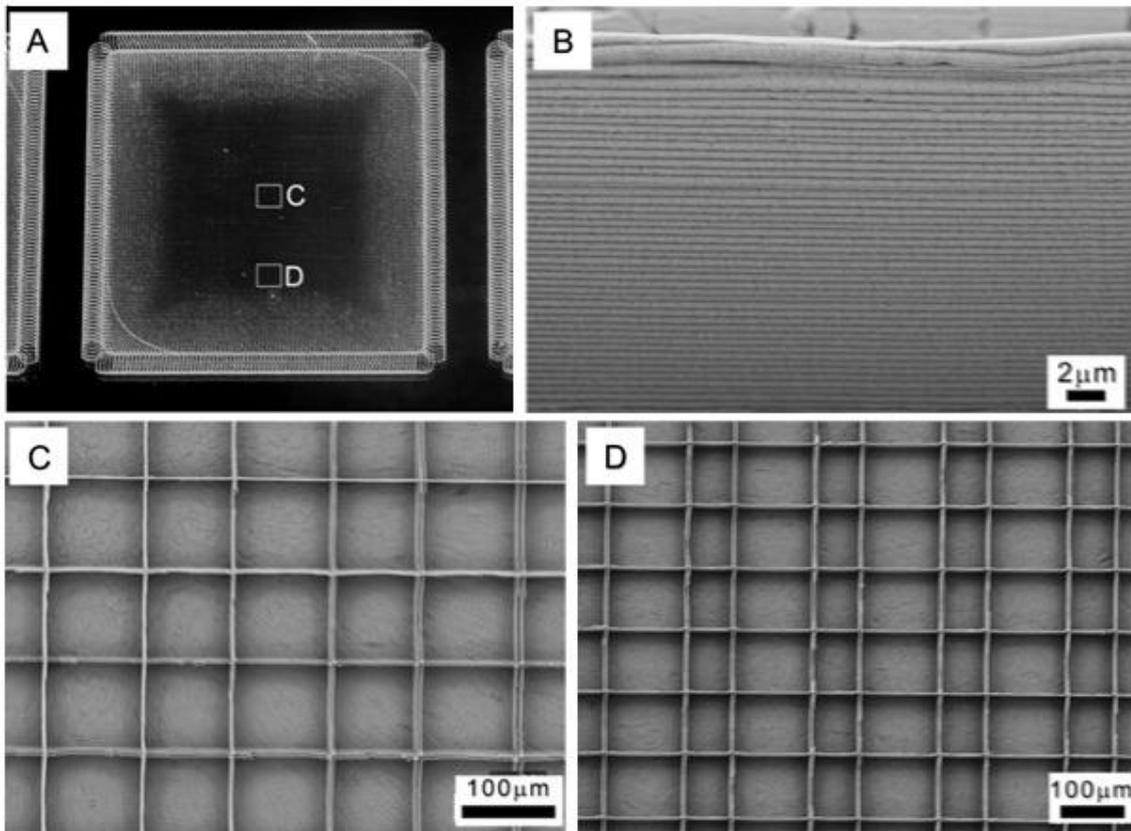


Abbildung 1.5: Durch die MEW Methode hergestelltes Scaffold

Das unter optimalen Einstellungen der verschiedenen Parameter hergestellte Scaffold (A) zeigt in seinem Zentrum eine exakt übereinander gelagerte Anordnung der Fasern (C). In der Peripherie liegen die Fasern nicht direkt übereinander. In dem Bereich nach der Wendezone kommt es zu seitlichen Versetzungen der Fasern (D). Es entsteht ein opakes Aussehen der Fasern. Umrahmt wird das Scaffold von den Wendekreisen die bei einem Richtungswechsel um 180° entstehen. Durch das MEW Verfahren lassen sich bis zu 50 Faserschichten übereinanderlegen (B). Nach Hochleitner et al. [71]

Für eine erfolgreiche Kultivierung der hBMSCs auf den Scaffolds ist die Maschengröße ein entscheidendes Kriterium. Die Struktur sollte wie in trabekulärem Knochengewebe als Leitstruktur für die Zellen fungieren. Ab einer Maschengröße von ungefähr 20-45 µm ist mit Adhäsion und Wachstum der Zellen zu rechnen [76].

Für eine biomedizinische Verwendung ist die exakte Reproduzierbarkeit der Scaffold-Struktur entscheidend [73, 74, 77].

Für alle verwendeten Abbildungen, die nicht selber angefertigt wurden (Abbildung 1.1 bis Abbildung 1.5), wurde die Genehmigung zur Verwendung in dieser Arbeit vom Inhaber des Copyrights eingeholt (siehe Anhang Seite 115f).

1.4 Proteinexpressionsanalyse mittels SDS-PAGE und Western Blot

Eine Differenzierung von Zellen kann man durch verschiedene Methoden nachweisen. Die Analyse der Expression von spezifischen Proteinen stellt eine anerkannte Methode dar. In den Zellen wird zuerst ein bestimmter Abschnitt auf der DNA für ein spezifisches Protein abgelesen und in RNA umgeschrieben. Außerhalb des Zellkerns kann diese mRNA (messenger RNA) in ein Protein translatiert werden [78]. Beide Ebenen können durch unterschiedliche Analysemethoden voneinander unabhängig untersucht werden. Um RNA nachzuweisen wird die Polymerasekettenreaktion (PCR) angewandt. Da jedoch nicht jede mRNA in einer Zelle auch zu einem Protein umgeschrieben wird, ist es notwendig die tatsächlich exprimierten Proteine durch eine weitere Methode wie den Western Blot nachzuweisen [79].

Eine Methode um Proteingemische aufzutrennen ist die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Proteingemische enthalten Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten, die aufgrund der individuellen Aminosäurezusammensetzung unterschiedliche Ladungen aufweisen. Durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol werden die Proteine denaturiert. Gleichzeitig wird die Eigenladung der Proteine durch die Anlagerung der SDS-Gruppen überdeckt, so dass alle Proteine negativ geladen sind und nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden können [80].

Polyacrylamidgele eignen sich hervorragend als „Sieb“ für diese Aufgabe. Durch eine angelegte Spannung wandern die negativ geladenen Proteine zum positiven Pol auf der entgegengesetzten Seite des Gels. Kleine Proteine wandern in der selben Zeit weiter durch das Gel als größere Proteine [81].

Um die aufgetrennten Proteine identifizieren zu können, sind jedoch weitere Analyseschritte notwendig. Ein Verfahren ist der Western Blot [82]. Die Proteine werden aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran elektrophoretisch transferiert und darauf immobilisiert. Durch die Inkubation der Membran in verschiedenen Antikörperlösungen binden die Primärantikörper von Interesse nur an ihrem spezifischen Antigen, also einem bestimmten Protein auf der Membran. Bei der weiteren Inkubation bindet ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper spezifisch an dem Primärantikörper. Durch Zugabe eines Substrats, das durch das gekoppelte Enzym umgesetzt wird und erst dann luminesziert, kann ein Röntgenfilm belichtet werden. Die Schwärzung des Film ist proportional zu der Menge gebundener Antikörper und somit zu der vorhandenen Proteinmenge und wird zur Auswertung der Proteinexpression verwendet [82].

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Studie war es, den möglichen Einfluss der Mikrostruktur der extrazellulären Umgebung auf das osteogene Differenzierungsverhalten von hBMSCs und die damit verbundene Expression von spezifischen Markerproteinen zu erforschen. Hierfür wurden Scaffolds aus Poly- ϵ -Caprolacton (PCL) mit quadratischen Maschen von 30 μm , 60 μm und 90 μm mit Hilfe des Melt electrospinning writing Verfahrens zur Verfügung gestellt. In Zellkulturen mit hBMSCs, die aus den Hüftköpfen adulter Spender isoliert wurden, wurde das Differenzierungsverhalten auf den verschiedenen Scaffolds in An- und Abwesenheit osteoinduktiver Faktoren über einen Zeitraum von sechs Wochen untersucht. Die aus diesen Proben gewonnen Proteine wurden für die Durchführung der hier vorliegenden Dissertation ebenfalls zur Verfügung gestellt um die Expression der Osteoblastenmarker auf Proteinebene untersuchen zu können.

Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot durch den quantitativen Nachweis der Expression osteogener Markerproteine.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1: Liste mit den für die Versuche benötigten Verbrauchsmaterialien und deren Lieferanten

Verbrauchsmaterialien	Lieferant
12-Well-Platten, nicht behandelt	Corning Inc., Union City, USA
6-Well-Platten	Nalgene Nunc Int., Penfield, USA
Aluminiumfolie	Melitta, Minden, Deutschland
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Corp., Buckinghamshire, UK
Bechergläser	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen (20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Polypropylen Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Frischhaltefolie	Melitta, Minden, Deutschland
Gefrierbeutel	Fipp Handelsmarken GmbH, Hamburg, Deutschland
Glasflaschen	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Glaskolben und -zylinder	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Glasküvetten	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Latexhandschuhe	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland

Nitrozellulose Protran BA 85	GE Healthcare Corp., Buckinghamshire, UK
Pasteurpipette, Glas	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Pinzette	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Skalpell	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Spatel	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Stabpipette Cellstar (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Greiner Bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Blottingpapier Whatman	GE Healthcare Corp., Buckinghamshire, UK
Wägeschale	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Zellophanfolie	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.2: Liste mit den für die Versuche verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie deren Lieferanten

Chemikalien und Reagenzien	Lieferant
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim,

Coomassie brillant blue	Deutschland Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Developer A G153	AGFA Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
DL-Norleucin	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Essigsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Ethanol	Walter CMP GmbH, Kiel, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Glycin	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Milchpulver	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
peqGOLD TriFast Kit	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
p-Hydroxycumarinsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim,

Precision Plus Protein™ Standards	Deutschland Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Rapid Fixer B G354 UP100H	AGFA Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
SDS (Dodecylsulfate-Na-salt)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
TEMED	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Trizma Base	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Tween-20	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland

2.1.3 Geräte

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Geräte und deren Lieferanten

Geräte	Lieferant
Bi-Destillierapparat	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Brutschrank HERAcell 150 CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Filmentwickler Cawomat 2000 IR	Cawo Solutions, Schrobenhausen, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr Mediline GmbH, Leingarten, Deutschland
Magnetrührer CombiMag RET	IKA Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Magnetrührer RCTbasic	IKA Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Mikroskop Leitz DM IL Typ 090- 131.001	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Multifuge X3R Centrifuge	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland

pH-Meter inoLab Multi Level 1	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Mikroliterpipetten (2.5 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotary Mixer	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Saugpumpe KnF Lab Laboport	KnF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Sterilbank LabGard Class II	IBS INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TransBlot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Ultraschallhomogenisator	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland
Vortex REAX 1R.	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Waage SBA 32	Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Wippschüttler Rocker-Shaker PMR-100	Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK
Zellzähler Casy Model TT	Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Schweiz
Zentrifuge Mikro20 Typ 2004	Hettich-Zentrifugen GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge MiniStar silverline	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde bidestilliertes Wasser aus dem laboreigenen Bi-Destillierapparat verwendet.

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Zur RNA- Proteinextraktion	75 % Ethanol 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95 % Ethanol 1 % SDS
Trenngel und Sammelgel	30 % Acrylamide/Bis Solution, 37,5:1
Trenngelpuffer	1,5 M Trizma Base 0,4 % SDS pH auf 8,8 eingestellt
Sammelgelpuffer	0,5 M Trizma Base 0,4 % SDS pH auf 6,8 eingestellt
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % Ammoniumpersulfat
Elektrophoresepuffer	25 mM Trizma Base 192 mM Glycin 0,1 % SDS pH auf 8,3 eingestellt
Färbelösung	0,1 % Coomassie brillant blue 20 % Methanol 7,5 % Essigsäure Lösung filtriert
Entfärbelösung	20 % Methanol 7,5 % Essigsäure
Probenpuffer nach Lämmli [83]	62,5 mM Trizma Base 10 % Glycerin 2 % SDS (Dodecylsulfate-Na-salt) pH auf 6,8 eingestellt 5 % β -Mercaptoethanol

TBS	140 mM Natriumchlorid 10 mM Trizma Base, pH 7,4
TBST	TBS, pH 8,0 + 0,05 % Tween-20
Graphitblotpuffer 1	25 mM Trizma Base, pH 10,4 20 % Methanol
Graphitblotpuffer 2	300 mM Trizma Base, pH 10,4 20 % Methanol
Graphitblotpuffer 3	25 mM Trizma Base, pH 9,4 40 mM DL-Norleucin 20 % Methanol Zum Ansetzen Trizma Base in ddH ₂ O gelöst, pH auf 9,4 eingestellt; Norleucin in Methanol gerührt und dann in Trizma Base gelöst
Absättigungslösung	5 % Milchpulver in TBST
ECL Lösung, Solution A (SA)	200 mL 0,1 M Tris-HCl, pH 8,6 50 mg Luminol
ECL Lösung, Solution B (SB)	11 mg p-Hydroxycumarinsäure In 10 mL DMSO gelöst
Stripping-Puffer	10 mL 20 % SDS (Dodecylsulfate-Na-salt) 62,5 ml 100 mM Trizma Base pH 6,7 780 µL β-Mercaptoethanol mit destillierten Wasser auf 100 mL aufgefüllt

2.1.5 Zellkulturmedien

Tabelle 2.5: Liste der zur Zellkultur verwendeten Medien und Medienzusätze sowie deren Lieferanten

Medien und Medienzusätze	Lieferant
0,05 % Trypsin-EDTA (1X)	Life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

DMEM(1X) + GlutaMAX TM -I + 4,5 g/L D-Glucose, - Pyruvat	Life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMEM/F-12 (1:1) (1X) + GlutaMAX TM -I F-12 Nährstoffmix (Ham)	Life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fötiales Kälberserum	Life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (10000 Units/mL Pen, 10000 µg/mL Strep)	Life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
L-Ascorbinsäure 2-Phosphat	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
β-Glycerophosphat Disodiumsalzhydrat	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland

2.1.6 Zell- und Proteinlysate

Zur Etablierung der Versuchsprotokolle für den Nachweis verschiedener osteogener Markerproteine mittels SDS-PAGE und Western Blot wurden Zelllysate von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293T) von externen Firmen (siehe Tabelle 2.6) kommerziell erworben und verwendet, in denen die nachzuweisenden Proteine ALPL, BSP und SPP1 transient überexprimiert wurden und somit als Positivkontrollen dienten [84]. Für den Nachweis von Col I diente eine bovine Kollagen-Typ-I-Lösung als Positivkontrolle. Von den Positivkontrollproben sowie einem Zelllysate, das die entsprechenden Proteine nicht enthielt und als Negativkontrolle fungierte, wurden je 5 µL Probe in 5 µL Probenpuffer gelöst. Für die Überprüfung des Col I Antikörpers wurde 1 µL der Col I Proteinlösung in 19 µL Probenpuffer gelöst.

Tabelle 2.6: Liste der verwendeten Positivkontrollen für die Antikörper ALPL, BSP, Col I, SPP1 und die Negativkontrolle sowie deren Lieferanten

Positiv- bzw. Negativkontrolle	Lieferant
ALPL	HEK293T over-expression lysate lyophilized in RIPA buffer, OriGene Technologies Inc., Rockville, USA
BSP	HEK293T over-expression lysate of integrin-binding sialoprotein (IBSP) lyophilized in RIPA buffer, OriGene Technologies Inc., Rockville, USA
SPP1	HEK293T over-expression lysate of secreted phosphoprotein 1 (SPP1) lyophilized in RIPA buffer, transcript variant 1, OriGene Technologies Inc., Rockville, USA
Col I	Typ I collagen from calf hides 5 mg/mL; SYMATESE, Chaponost, Frankreich
Neg	HEK293T vector transfected lysate control lyophilized in RIPA buffer, OriGene Technologies Inc., Rockville, USA

Die zur Verfügung gestellte humane Osteosarkom Zelllinie (MG 63, ATCC/LGC, Manassas, USA), die aus Osteosarkomen gewonnen wurde, diente zur Herstellung von Totalzelllysaten, die zusammen mit den kommerziell erworbenen HEK293T Zelllysaten sowie der Kollagenlösung zur Etablierung der Protokolle für die SDS-PAGE und für den Western Blot verwendet wurden.

Lysate aus humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen aus trabekulärem Knochen (hBMSCs) (Orthopädische Klinik des König-Ludwig-Hauses, Würzburg) wurden zur Verfügung gestellt, um das osteogene Differenzierungsverhalten auf melt-elektrogesponnenen Scaffolds aus PCL [72]

mittels Analyse verschiedener Markerproteine durch SDS-PAGE und Western Blot zu untersuchen.

2.1.7 Antikörper

Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Primärantikörper, ihrer Antigene, Lieferanten und das Molekulargewicht des jeweiligen Antikörpers.

Antikörper	Lieferant	Molekulargewicht
Alkalische Phosphatase (ALPL): Rabbit monoclonal antibody against ALPL (clone EPR4477)	OriGene Technologies Inc., Rockville, USA	57 kDa
Bone Sialoprotein (BSP): Mouse Anti-Bone Sialoprotein Monoclonal Antibody	CHEMICON International, Billerica, USA	70-80 kDa
Kollagen Typ I (Col I): Goat Anti-Collagen Type I Affinity Purified Polyclonal Antibody	Millipore Corporation, Temecula, USA	100-120 kDa
Osteopontin (SPP1): Rat Anti-Human Osteopontin Monoclonal Antibody	CHEMICON International, Billerica, USA	40 kDa
β -Tubulin (Tub): Monoclonal Anti- β -Tubulin, antibody produced in Mouse	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland	55 kDa

Tabelle 2.8: Liste der verwendeten Sekundärantikörper und deren Lieferanten

Antikörper	Lieferant
Anti-Goat: HRP-Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) Conjugate (ZyMax™ Grade)	Invitrogen Corporation, Camarillo, USA

Anti-Mouse: Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG + IgM (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA
Anti-Rabbit: Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA
Anti-Rat: Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG + IgM (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA

2.1.8 Computerprogramme

Tabelle 2.9: Liste der verwendeten Softwareprogramme und deren Entwickler

Programm	Entwickler
EndNote X8	Thomson Reuters, New York, USA
ImageJ 1.48v	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corp., Albuquerque, USA
Microsoft Word 2013	Microsoft Corp., Albuquerque, USA
Paint Version 6.1	Microsoft Corp., Albuquerque, USA
Windows Live Fotogalerie 2011	Microsoft Corp., Albuquerque, USA

2.2 Methoden

Die Isolierung und Kultivierung der hBMSCs sowie die Herstellung der MEW Scaffolds (2.2.1 bis 2.2.3) waren nicht Bestandteil dieser Arbeit. Diese Methoden sind jedoch für das Verständnis des gesamten Versuchsablaufs sowie für die Auswertung und Diskussion der Ergebnisse essentiell und werden daher ebenfalls beschrieben.

2.2.1 Isolierung der hBMSCs

Humane multipotente mesenchymale Stromazellen wurden aus der Spongiosa von Hüftköpfen adulter Spender durch Mitarbeiter der Orthopädischen Klinik des König-Ludwig-Hauses in Würzburg isoliert. Die Hüftköpfe wurden männlichen und weiblichen Patienten im Alter zwischen 55 und 65 Jahren aufgrund des notwendigen Einsatzes einer Endoprothese entnommen. Über den Einsatz des entnommenen Gewebes in der Forschung wurden die Spender vor dem Eingriff mündlich wie auch schriftlich aufgeklärt und ihre Einverständniserklärung wurde eingeholt. Die Verwendung dieses humanen Gewebes wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt. Die Isolierung der hBMSCs erfolgte über Plastikadhärenz nach den modifizierten Protokoll von Haynesworth et al. [45]. Aus dem entnommenen Knochengewebe wurde zur Isolierung der hBMSCs nur die Spongiosa verwendet. Diese wurde in DMEM/F-12-Ham's Medium aufgenommen und kräftig von Hand geschüttelt. Die Suspension wurde anschließend 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Die hBMSCs befinden sich nach dem Zentrifugieren im Zellüberstand. Sie wurden aus der Spongiosa herausgewaschen. Daher werden die Überstände gesammelt und daraus die Zellen anschließend abzentrifugiert. Nach sich mehrmalig wiederholenden Wasch- und Zentrifugationsschritten in diesem Medium sowie Herausfiltern noch vorhandener kleiner Knochenfragmente, wurde das Medium abgenommen und die hBMSCs in Wachstumsmedium (DMEM/F-12-Ham's / 10% FCS / 100U/mL Antibiotikum / 50µg/mL Ascorbinsäure) resuspendiert. Es wurden ca. 8×10^8 – 1×10^9 Zellen pro 175 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Die hBMSCs wurden bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert. Zwei Tage nach der Aussaat wurden nicht-adhärenzte Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Das Medium wurde alle 3-4 Tage erneuert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 90 – 100 % wurden die hBMSCs zur Aussaat auf den MEW Faser Scaffolds verwendet.

2.2.2 Herstellung der PCL MEW Faser Scaffolds und ihre Geometrie

Die Trägergerüste (Scaffolds) für die 3D-Zellkultur wurden mittels Melt electrospinning writing (MEW) aus Poly- ϵ -Caprolacton (PCL) hergestellt [72].

Mit der Melt electrospinning writing Methode wurden Fasern mit einem Durchmesser von 3 – 4 μm produziert. Es entstand im 2-dimensionalen Raum eine Gitternetzstruktur. Mehrere dieser Gitter übereinander ergaben die endgültige 3D-Struktur der Scaffolds. Der Abstand zwischen den einzelnen Fasern konnte gezielt variiert werden [73]. Für die Versuchsreihen wurden 121 mm^2 (11 mm x 11 mm) große Faser-Scaffolds mit Maschengrößen von 30 μm , 60 μm und 90 μm produziert. Ein Scaffold bestand aus 40 einzelnen Faserlagen. Es wurde somit eine Scaffoldhöhe von 120 μm erreicht (siehe Abbildung 1.5).

2.2.3 Zellkultur

Die vom König-Ludwig-Haus gelieferten hBMSCs wurden zuerst mit PBS und anschließend mit PBS/EDTA gewaschen. Um die Zellen vom Untergrund zu lösen, wurden sie 5 min bei 37° C mit 0.05% Trypsin-EDTA inkubiert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von Wachstumsmedium (DMEM/F-12-Ham's (1:1) (1X)+GlutaMAX™-I Nährstoffmix), Penicillin (10000 Units/mL), Streptomycin (10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Strep), 10% fötales Kälberserum und L-Ascorbinsäure 2-Phosphat (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inaktiviert. Nach der Zentrifugation (5 min, 1000 rpm, RT) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in frischem Medium suspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch ein Zellsieb (70 μm) vereinzelt.

Zur Aussaat der hBMSCs auf den Monolayern musste die Zellzahl bestimmt werden. Auf einer 6-well Platte wurden pro well 6,0 x 10⁵ Zellen in 3 mL Medium ausgesät. Nachdem die hBMSCs nach ein bis zwei Tagen konfluent wurden, erfolgte die Zugabe des Kontrollmediums (DMEM (1X)+GlutaMAX™-I + 4.5 g/L D-Glucose, -Pyruvat; Penicillin (10000 Units/m), Streptomycin (10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 10% fötales Kälberserum) bzw. des osteogenen Differenzierungsmedium (DMEM (1X)+GlutaMAX™-I + 4.5 g/L D-Glucose,

-Pyruvat; Penicillin (10000 Units/mL), Streptomycin (10000 µg/mL), 10% Fötale Kälberserum, 50µg/mL L-Ascorbinsäure 2-Phosphat; beta-Glycerophosphat Disodiumsalzhydrat, Dexamethason). Die Zugabe der unterschiedlichen Medien kennzeichnete den Tag 0. Es wurde alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel vollzogen und an den Tagen 7, 14, 21, 28, 35 und 42 die RNA und Proteine isoliert. Für die Monolayer Proben wurde ebenfalls an Tag 0 isoliert. Diese Probe dient als Referenzprobe

Bevor die hBMSCs auf den Scaffolds ausgesät werden konnten, mussten die Faserstücke 30 min in 70%-igen Ethanol sterilisiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen werden, um das Ethanol wieder vollständig zu entfernen. Die Scaffolds wurden in 12-well Platten mit einem Ring aus Polystyrol auf dem Boden der Kavität fixiert und bis zur Besiedlung mit hBMSCs mit PBS bedeckt. Pro well wurden $2,4 \times 10^5$ Zellen in 0,5 mL Wachstumsmedium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde auf die adhärenierten Zellen 1 mL Wachstumsmedium gegeben. 72 Stunden nach der Zellaussaat wurden die Faser Scaffolds vom Boden der Wellplatte angehoben und auf die Polystyrolringe gelegt um zu verhindern, dass die Zellen auf dem Boden der well Platte adhärenieren. Erst nach Erreichen der Konfluenz wurde das Wachstumsmedium durch das Kontroll- bzw. osteogene Differenzierungsmedium ersetzt. Wie bei den Monolayerproben kennzeichnete dieser Wechsel den Tag 0 der Versuchsreihe. Der Medienwechsel erfolgte ebenfalls alle zwei bis drei Tage und die RNA- und Proteinisolierung wurde an den Tagen 7, 14, 21, 28, 35 und 42 durchgeführt.

2.2.4 Proteinisolierung und Probenvorbereitung

2.2.4.1 Proteinisolierung hBMSCs

Die Extraktion des Gesamtproteingehaltes aus hBMSCs erfolgte durch eine Einschnitt-Flüssigphasen-Separation nach der Guanidinisothiocyanat/Phenol Methode mit dem peqGOLD TriFast™ Reagenz nach Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 mL peqGOLD TriFast je 3,5 cm-Zellkulturschale lysiert und in 2 mL Reaktionsgefäße überführt. Nach der Zugabe von 0,2 mL Chloroform pro 1 mL TriFast Reagenz wurden die Proben

15 sek durchmischt und 10 min bei RT inkubiert. Während der anschließenden Zentrifugation (5 min, 12000 rpm, RT) erfolgte die Auftrennung in drei Phasen. Die oberste wässrige Phase enthielt die RNA, während sich die DNA und die Proteine in der unteren Phenol-Chloroform-Phase und in der Interphase anreicherten. Die wässrige Phase wurde abgenommen und für die Extraktion der RNA verwendet.

Aus der Phenol-Chloroform-Phase und der Interphase wurden durch Zugabe von 1,5 mL Isopropanol die Proteine präzipitiert und anschließend für 10 min bei 12000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Proteinpellet dreimal mit 2 mL 0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95 % Ethanol gewaschen. Hierfür wurde das Pellet jeweils 20 min bei RT inkubiert und anschließend für 5 min bei 7500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Proteinpellet in 2 mL 100 % Ethanol auf dem Vortex resuspendiert, 20 min bei RT inkubiert und wiederum für 5 min bei 7500 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die Proben wurden bis zu ihrer Verwendung in 100 % Ethanol bei -20 °C gelagert.

Zur Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE wurde der Überstand abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Danach wurden die Proteine in 120 µL Probenpuffer nach Lämmli [83] gelöst. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurden die Proben 20 sek sonifiziert und abschließend für 5 min bei 95 °C erhitzt. Beide Schritte dienen der Denaturierung und Linearisierung der Proteine. Um die gelöste Proteinmenge im Puffer konstant zu halten, wurden die Proben aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung in der SDS-PAGE bei -20 °C gelagert.

2.2.4.2 Totalzelllysate MG63

Die Kultivierung und Isolation der Totalzelllysate aus humanen Osteosarkomzellen (MG63) waren nicht Bestandteil dieser Arbeit, werden hier jedoch zum Verständnis erläutert.

Die MG63 Zellen (ATCC No.CRL-1427, Rockville, MD, USA) wurden in DMEM (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany) mit 10 % FCS (Invitrogen) und 100 U/mL Penicillin, 100 mg/mL Streptomycin (Invitrogen) bei 37 °C in

wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Für die Proteinproben wurden die Zellen in 6 well Platten kultiviert und nach 5 Tagen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Lämmli Probenpuffer abgeschabt. Diese Suspension wurde abpipettiert und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. In das well wurde erneut 1 mL Probenpuffer gegeben und nochmals geschabt und die Suspension mit der vorherigen im selben Röhrchen gepoolt. Die Proteine wurden dann über Nacht in 6 Volumen Aceton (-20 °C) im Gefrierschrank gefällt und anschließend bei 4500 rpm und 4 °C pelletiert. Das Aceton wurde verworfen, das Pellet getrocknet und in 150 µL Probenpuffer aufgenommen, resuspendiert und mit Phosphataseinhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland; 1:50) gelöst. Danach erfolgte ebenfalls das Sonifizieren und 5-minütiges Kochen bei 95 °C. Nach einer weiteren kurzen Zentrifugation wurden die Proben bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.5 SDS-PAGE

Proteingemische können mit der SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt werden. Die Eigenladungen der Proteine werden durch das anionische Tensid Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) überdeckt. Dadurch stoßen sich die linearisierten Proteine gegenseitig ab und lassen sich proportional zu ihrer Molekülmasse auftrennen. Proteine mit kleinem Molekulargewicht wandern während der Elektrophorese durch das Gel weiter als Proteine größeren Molekulargewichts [80].

Vor dem Gießen der Gele wurden die Glasplatten mit 2 % SDS gereinigt, mit ddH₂O gespült, getrocknet und zusammengesetzt. Die Platten wurden erst in den Halterahmen (Fa. Biorad) eingespannt, so dass beide Glasplatten am unteren Rand bündig abschlossen. Dann wurde der Halterahmen in dem Gießstand befestigt. Die Glasplatten standen dabei auf einer Unterlage aus Moosgummi um die Gießhohlform von unten abzudichten. Anschließend wurden die einzelnen Gelkomponenten des 10 %igen Trenngels nacheinander zusammengegeben (siehe Tabelle 2.10) und jeweils gut durchmischt. Nach der Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin

(TEMED), die als Radikalstarter bzw. als Katalysator für die Polymerisierungsreaktion dienen, wurde das Gel zügig in den Hohlraum zwischen die beiden Glasplatten gegossen und mit ddH₂O überschichtet, um Luftblasenbildung zu vermeiden und eine glatte Oberfläche zu gewährleisten.

Tabelle 2.10: Trenn- und Sammelgelzusammensetzung

	10 % Trenngel [mL]	4 % Sammelgel [mL]
30 % Acrylamide/Bis solution (37,5:1)	3,30	0,67
Trenngelpuffer	2,50	–
Sammelgelpuffer	–	1,25
ddH ₂ O	4,15	3,1
10 % APS (Ammoniumpersulfat)	0,05	0,05
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	0,01	0,01
Bromphenolblau	–	0,005

Nach ca. 20 min wurde das Wasser abgegossen und Reste mit Whatman Filterpapier entfernt. Das 4 % Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und im noch flüssigen Zustand wurde ein Kamm zwischen die Glasplatten in das Sammelgel geschoben. Zur besseren Abgrenzung der Gele voneinander und zur Markierung der Lauffront wurden dem Sammelgel 5 µL Bromphenolblau zugegeben. Um die vollständige Polymerisation der Gele zu gewährleisten, wurden diese stets einen Tag vor der Durchführung der Elektrophorese gegossen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

In einem Versuchsdurchlauf konnten ein bis vier Gele gleichzeitig eingesetzt werden.

Vor der Verwendung des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt. Nach dem Einspannen des Gels in die Mini-PROTEAN Tetra Cell Elektrophoresekammer (Fa. Biorad) wurde diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Geltaschen wurden durch mehrmaliges Spülen mit dem Puffer von Gelresten befreit. Als nächster Schritt folgte die Beladung der Geltaschen mit jeweils 10 μL der für die SDS-PAGE vorbereiteten Proteinproben (siehe Abschnitt 2.2.4). Pro Gel wurde je eine Tasche mit 3 μL Precision Plus Protein Standard beladen und nicht benötigte Geltaschen wurden mit 3 μL Bromphenolblau im Probenpuffer befüllt. Anschließend erfolgte die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 200 V. Die Laufzeit variierte in Abhängigkeit von der Anzahl der Gele zwischen 45 und 60 min. Der Elektrophoresevorgang wurde beendet, sobald die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

2.2.6 Western Blot

Der Western Blot wurde nach Kyhse-Andersen [82] durchgeführt. Nach Beendigung der SDS-PAGE wurden die Glasplatten entfernt und das Gel 15 min in Graphitblotpuffer 3 inkubiert. Pro Gel wurden 10 Blätter Whatman Filterpapier und eine Nitrozellulosemembran der Gelgröße (ca. 5,5 cm x 8,5 cm) entsprechend zugeschnitten. Danach wurde der Blotstapel in der Blotkassette aufgebaut (siehe Tabelle 2.11).

Tabelle 2.11: Aufbau des Blotstapels für den Western Blot

Anzahl	Lage	in
	Kathode	
5	Whatman Filterpapier	Graphitblotpuffer 3
1	Polyacrylamidgel	Graphitblotpuffer 3
1	Nitrozellulose	Graphitblotpuffer 1
2	Whatman Filterpapier	Graphitblotpuffer 1
3	Whatman Filterpapier	Graphitblotpuffer 2
	Anode	

Während des Aufbaus des Blotstapels wurden nach jeder Lage Whatman Filterpapier Luftblasen entfernt, um einen vollständigen Transfer der Proteine

aus dem Gel auf die Membran zu gewährleisten. Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte bei einer konstanten Spannung von 25 V für 30 min. Die Stromstärke wurde dementsprechend angepasst.

Nach Ablauf des Blotvorgangs wurde das Gel für 2 h in Coomassie blue gefärbt und anschließend in der Entfärbelösung entfärbt. Die entfärbten Gele wurden zwischen Cellphanfolie luftgetrocknet und archiviert.

Die Übertragung der Proteine während des Blottingprozesses wurde durch unspezifische Färbung der Proteine auf der Nitrozellulose in Ponceau S (Fa. Sigma-Aldrich) für 2 min überprüft und nach anschließendem Waschen mit bidestilliertem Wasser photographisch festgehalten.

2.2.7 Inkubation mit den Antikörpern

Damit keine Antikörper an freie Stellen der Nitrozellulose binden konnten, wurde die Nitrozellulose für 1 h bei Raumtemperatur (RT) in Absättigungslösung (5 % Milchpulver in TBST) auf dem Wippschüttler geblockt und anschließend dreimal 5 min bei RT in TBST gewaschen.

Darauf folgte die Inkubation der Nitrozellulose in 10 mL Primärantikörperlösung bei 4 °C auf einem Wippschüttler über Nacht. Die primären Antikörper wurden im Verhältnis 1:1000 in TBST verdünnt eingesetzt. Nach Zugabe von 0,2 %igem Natriumazid, konnten die primären Antikörper bei -20 °C gelagert und mehrmals zur Inkubation von Nitrozellulose verwendet werden. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal 5 min bei RT in TBST gewaschen, um Reste des Primärantikörpers zu entfernen.

Anschließend folgte die Inkubation in 15 mL Sekundärantikörperlösung pro Membran für 1 h bei RT auf dem Wippschüttler. Die sekundären Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:5000 in TBST eingesetzt und verfügten über ein an den Antikörper angekoppeltes Enzym, das für die Reaktion der Chemilumineszenz verantwortlich war. Im Gegensatz zu den primären Antikörpern wurden die Sekundärantikörperlösungen nur einmalig verwendet.

Um freie Sekundärantikörper von den Membranen zu entfernen, erfolgten drei Waschschrte in TBST für 10 min bei RT auf dem Wippschüttler.

2.2.8 Filmexposition und Filmentwicklung

Die Peroxidase-gekoppelten Antikörper, die spezifisch an ihr Antigen gebunden haben, konnten durch Zugabe von ECL-Lösung (enhanced chemiluminescence), Exposition auf Röntgenfilm und anschließender Filmentwicklung sichtbar gemacht werden [82, 85]. Die ECL-Lösung wurde erst kurz vor der Verwendung aus den Komponenten Lösung A (0,1 M Tris-HCl pH 8,6, Luminol), Lösung B (p-Hydroxycumarinsäure, DMSO) und 30%-igem H_2O_2 hergestellt. Die Membran wurde für 2 min bei RT und unter Schwenken in der ECL-Lösung inkubiert. Die benetzte Nitrozellulose wurde nach gründlichem Abtropfen blasen- und faltenfrei in Frischhaltefolie verpackt und in die Filmkassette eingelegt.

In der Dunkelkammer wurde der unbelichtete Röntgenfilm auf die Nitrozellulosemembran gelegt und die sichtbaren Banden des Protein Standards auf dem Film markiert. Nach einer bis fünf Sekunden Belichtungszeit wurde der Film entwickelt. Eine Überentwicklung des Films musste vermieden werden, da überbelichtete Banden nicht für die densitometrische Auswertung verwendet werden konnten. War der Film bereits bei einer Belichtungszeit von 1 sek überbelichtet, wurde 10 min abgewartet und ein neuer Film belichtet und entwickelt.

2.2.9 Stripping

Zur anschließenden Inkubation der Nitrozellulose mit einem weiteren Primärantikörper, konnten die bereits gebundenen Antikörper wieder von der Membran abgelöst werden. Hierfür wurde die Nitrozellulose dreimal für 5 min bei RT in TBST gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Nitrozellulose für 30 min bei 50 °C in Stripping-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.4) und erneutem dreimaligen Waschen in TBST für jeweils 10 min. Danach konnte wieder mit der Absättigung der Membran in 5% Milchpulver in TBST und den darauffolgenden Inkubationsschritten mit den Antikörpern begonnen werden [86].

2.2.10 Ergebnisauswertung

Die entwickelten Röntgenfilme der Western Blot Analysen wurden im Durchlicht abfotografiert und anschließend mit Image J quantitativ densitometrisch ausgewertet. Dafür wurden die Bilder in digitaler Form verarbeitet. Die Fläche um die geschwärzten Banden wurde markiert. Die Schwärzung der Bande wurde als Kurve dargestellt. Dabei entsprach die Höhe der Kurve der Schwärzung und die Breite der Kurve der Breite der Bande. Die gesamte Fläche unter der erstellten Kurve wurde durch eine eingefügte Basislinie abgeschlossen und der Flächeninhalt berechnet. Alle Flächeninhalte wurden auf den Wert an Tag 0 normiert. Diese relative Densität der Proben wurde auf die relative Schwärzung der entsprechenden Proben des Haushaltsproteins β -Tubulin der gleichen hBMSC-Reihe normiert und für die Darstellung in den Diagrammen verwendet.

Das exakte Molekulargewicht der detektierten Banden wurde ebenfalls ermittelt. Die Banden des aufgetrennten Markers wurden ihren passenden Molekulargewichten zugeordnet und ihre zurückgelegte Laufstrecke ausgemessen. Diese Werte wurden auf halblogarithmischem Papier aufgetragen, so dass die Molekulargewichtsskala in Kilodalton (kDa) auf der y-Achse und die zurückgelegte Laufstrecke in Pixel auf der x-Achse lag (Abbildung 2). Mit Hilfe dieser Punkte wurde eine Kalibriergerade bestimmt mit der sich nach Ausmessung der Laufstrecke der gesuchten Bande, deren Molekulargewicht bestimmen ließ.

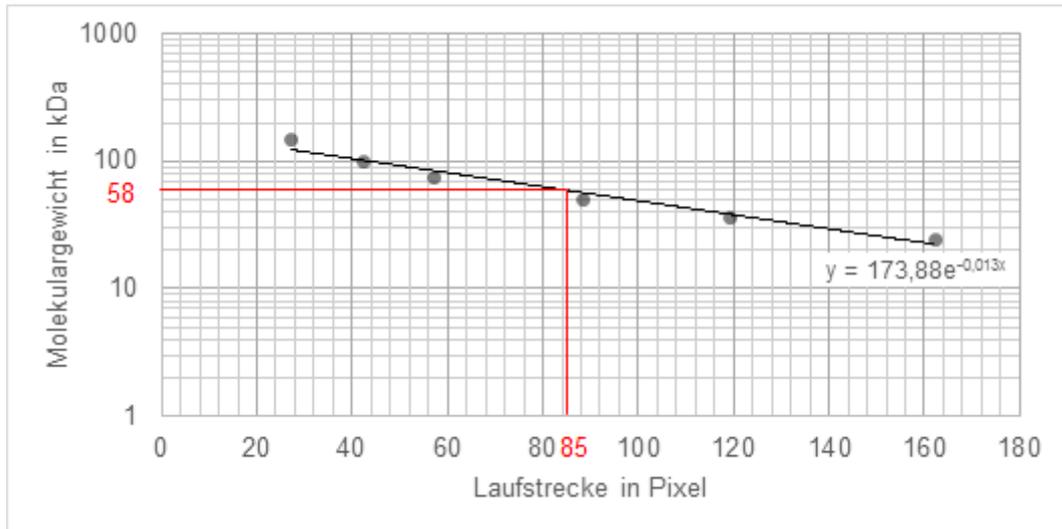


Abbildung 2: Bestimmung des Molekulargewichts der detektierten Banden

Beispielhafte Bestimmung des Molekulargewichts der detektierten Banden des Western Blots für den Nachweis von Tubulin in den hBMSCs 1060 (Abbildung 3.6). Das Molekulargewicht ist in Kilodalton (kDa) und die Laufstrecke in Pixel angegeben. Anhand der markierten Punkte wurde eine Kalibriergerade erstellt und deren Funktion ermittelt. Die Banden wurden nach einer Laufstrecke von 85 Pixeln detektiert und liegen damit bei 58 kDa.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Versuchsprotokolle für den Nachweis verschiedener osteogener Markerproteine mittels Western Blot

Zur Etablierung der Versuchsprotokolle zur Durchführung der SDS-PAGE, des Western Blots, der Inkubation mit den Antikörpern sowie der Filmexposition wurden Kontrollversuche für die osteogenen Markerproteine Alkalische Phosphatase (ALPL), Tubulin (Tub), Osteopontin (SPP1), Bone Sialoprotein (BSP) und Kollagen Typ I (Col I) durchgeführt. Hierfür war es notwendig die im Methodenteil unter 2.2.5 (SDS-PAGE) bis 2.2.8 (Filmexposition und Filmentwicklung) beschriebenen Protokolle zuerst an kommerziellen Positiv- und Negativkontrollen zu testen. Anschließend wurden die Protokolle an Zelllysaten aus humanen Osteosarkomzellen (MG63) getestet. Die MG63 Zellen exprimieren alle nachzuweisenden Markerproteine [87, 88]. Nicht nur die Protokollabfolge, sondern ebenfalls die spezifische Bindung der Antikörper an ihr Antigen konnte somit unter standardisierten Bedingungen überprüft werden. In allen dargestellten Western Blot Abbildungen ist die zu detektierende Hauptbande durch eine Umrahmung hervorgehoben.

Um die Ergebnisse der Western Blots besser miteinander vergleichen zu können, werden diese densitometrisch vermessen und die Auswertungen in Diagrammen dargestellt. Mit dem Computerprogramm Image J wird der Schwärzungsgrad der detektierten Banden der Western Blots in einer Kurve dargestellt, der der Dichte des Signals auf dem Röntgenfilm entspricht. Dabei entspricht die Höhe des Peaks der Intensität der geschwärzten Bande und die Ausdehnung entlang der x-Achse ihrer Breite. Um auszuschließen, dass der Hintergrund Einfluss auf die Ergebnisse hat, wird manuell eine Basislinie gezogen um den Peak nach unten hin abzugrenzen. Die so entstandene Fläche (area under the curve, AUC) kann somit berechnet werden. Diese Vorgehensweise wurde für jeden Tag an dem eine Probe isoliert wurde, durchgeführt. Der Flächeninhalt wird in Pixeln angegeben. Alle AUCs der Proben eines Antikörpers zusammen entsprechen 100% der geschwärzten

Fläche und jede einzelne Bande kann somit prozentual dazu berechnet werden. Anschließend erfolgte die Normierung jeder einzelnen Probe auf Tubulin von Tag 0 der Monolayer Kontrollmedium Probe.

3.1.1 β -Tubulin (Tub)

Tubuline sind Proteine, die in Zellen vor allem in den Mikrotubuli vorkommen und in verschiedene Isoformen eingeteilt werden können. Tubulin wird in einer konstanten Expressionsrate in Zellen gebildet und eignet sich dadurch als Haushaltsprotein [89, 90]. β -Tubulin (Tub) wird deshalb in der vorliegenden Dissertation als Referenzprotein verwendet, um Unregelmäßigkeiten bei der Beladung ausgleichen zu können. Es dient als Beladungsreferenz zur Normierung der anderen Proteine, die mittels Western Blots nachgewiesen werden. Der Anti- β -Tubulin Antikörper wird ausschließlich an der MG63 Totalzelllysatsprobe (MG) etabliert. Das β -Tubulin besitzt laut Literatur ein Molekulargewicht von 55 kDa [90].

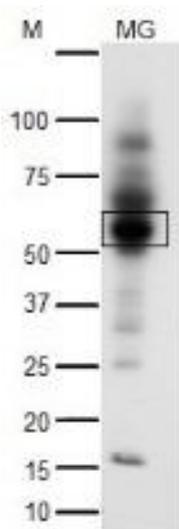


Abbildung 3.1: Western Blot Analyse zum Nachweis von Tubulin in einem MG63 Totalzelllysats

Das MG63 Totalzelllysats (MG) wurde mit dem Anti- β -Tubulin Antikörper inkubiert. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in Kilodalton (kDa) angegeben. Die markante Bande, die sich bei 58 kDa zeigt, repräsentiert β -Tubulin.

Der Western Blot zeigt, dass mehrere große Proteine durch den Anti- β -Tubulin Antikörper detektiert werden. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, dominiert

jedoch eine markante Bande, die bei 58 kDa liegt und damit β -Tubulin repräsentiert.

3.1.2 Alkalische Phosphatase (ALPL)

Die Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das im menschlichen Körper unter anderem in der Knochenentwicklung bei Dephosphorylierungsreaktionen eine wichtige Rolle spielt und in verschiedene Isoenzyme eingeteilt wird. In dieser Dissertation wird die gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase (tissue-nonspecific alkaline phosphatase, ALPL) detektiert. Sie wird in Osteoblasten verstärkt exprimiert, besitzt ein Molekulargewicht von 57 kDa und liegt damit nahe dem Molekulargewicht von β -Tubulin [91].

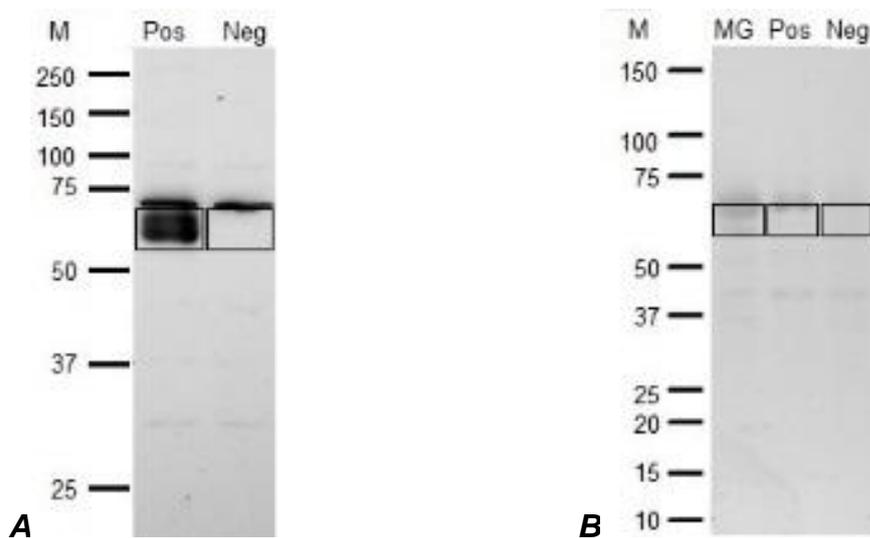


Abbildung 3.2: Western Blot Analyse zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase in der Positivkontrolle, Negativkontrolle und einem MG63 Totalzelllysate

Die Positivkontrollen (Pos, **A**, **B**), Negativkontrollen (Neg, **A**, **B**) und das MG63 Totalzelllysate (MG, **B**) wurden mit dem Anti-ALPL Antikörper inkubiert. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die markante Bande liegt als Doppelbande in den Positivkontrollen und der MG63 Probe bei 56 und 63 kDa und repräsentiert die Alkalische Phosphatase.

Abbildung 3.2 A zeigt das Ergebnis des Blots nach Auftrag von Positiv- und Negativkontrolle. Bei der Positivkontrolle ist eine Bande bei 71 kDa und zwei darauffolgende Banden, die bei 63 und 56 kDa verlaufen, zu erkennen. Bei der Negativkontrolle befindet sich die Bande bei 71 kDa auf der Laufspur. ALPL, das spezifisch von diesem Antikörper erkannt wird, läuft in Form einer Doppelbande bei 63 und 56 kDa.

Die markanten Banden in Abbildung 3.2 B befinden sich alle bei 50 kDa und 75 kDa und erscheinen nicht so intensiv belichtet wie in Abbildung 3.2 A. Eine Bande ist bei 60 kDa bei der MG63 Probe zu erkennen sowie eine zweite Bande, die bei 56 kDa verläuft. In der Positivkontrolle zeigen sich zwei Banden auf der gleichen Höhe wie bei dem MG63 Zelllysat. In der Negativkontrolle erkennt man eine einzige Bande, die bei der 65 kDa Marke verläuft. Diese Bande ist auch bei der MG63 Probe und der Positivkontrolle detektiert.

3.1.3 Bone Sialoprotein (BSP)

Bone Sialoprotein spielt eine wichtige Rolle im Mineralisierungsprozess der Extrazellulärmatrix (EZM) und eignet sich auf Grund dessen als Markerprotein für die Differenzierung der hBMSCs [60]. Es weist ein Molekulargewicht zwischen 70 und 80 kDa auf [92].

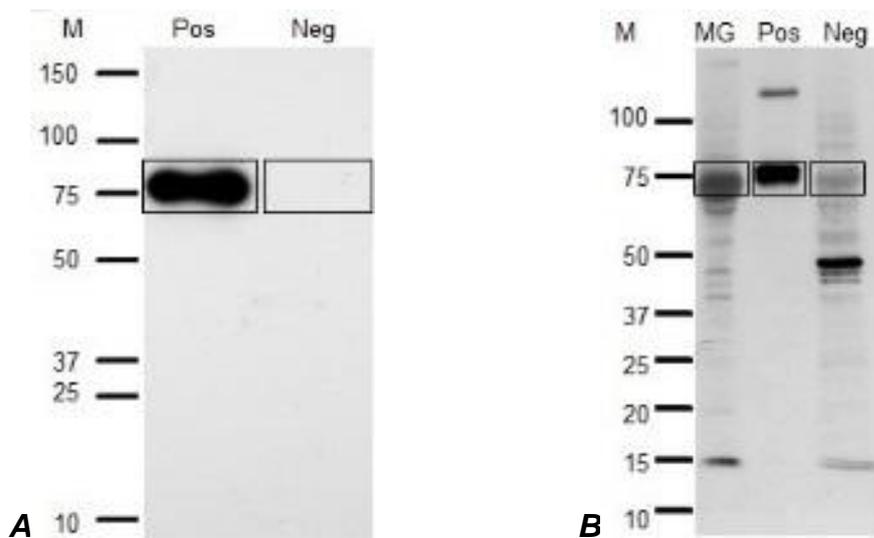


Abbildung 3.3: Western Blot Analyse zum Nachweis von Bone Sialoprotein in der Positivkontrolle, Negativkontrolle und einem MG63 Totalzelllysat

Die Positivkontrollen (Pos, A, B), Negativkontrollen (Neg, A, B) und das MG63 Totalzelllysat (MG B) wurden mit dem Anti-BSP Antikörper inkubiert. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die markante Bande liegt in den Positivkontrollen und der MG63 Probe bei 78 bzw. 72 kDa und repräsentiert das Bone Sialoprotein.

In der Positivkontrolle ist ein starkes Signal bei 78 kDa detektiert (Abbildung 3.3 A). Die Negativkontrolle zeigt keine Reaktion mit dem Antikörper. Die detektierte Bande entspricht eindeutig dem Molekulargewicht des Markerproteins.

In Abbildung 3.3 B befindet sich im MG63 Zelllysate eine dunkelgrau gefärbte Bande auf der Höhe von 72 kDa. Außerdem einige schwache, unspezifische Banden, die über die gesamte Spur verteilt sind. Die Positivkontrolle weist das gleiche Ergebnis auf wie die Positivkontrolle in Abbildung 3.3 A, eine eindeutige, einzelne Bande auf der Höhe von 77 kDa. In der Negativkontrolle sind viele schwache Nebenbanden detektiert. Nur eine signalstarke Bande befindet sich bei 44 kDa und liegt damit deutlich unter den signalstärksten Banden der Positivkontrollen.

3.1.4 Kollagen Typ I (Col I)

Kollagen Typ I stellt den Großteil der Proteinmatrix in Knochengewebe dar. Es besteht aus zwei α 1-Ketten und einer α 2-Kette. Die Osteoblasten sezernieren das gebildete Kollagen Typ I, aus dem im weiteren Entwicklungsverlauf extrazelluläre Fibrillen gebildet werden. Kollagen Typ I besitzt ein Molekulargewicht von 100 bis 130 kDa [11].

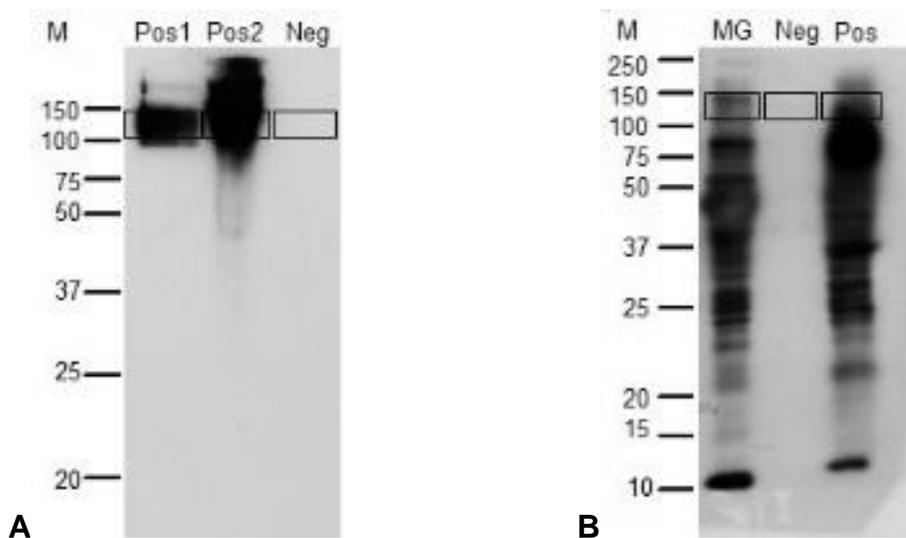


Abbildung 3.4: Western Blot Analyse zum Nachweis von Kollagen Typ I in der Positivkontrolle, Negativkontrolle und einem MG63 Totalzelllysate

Die Positivkontrollen (Pos, A, B), Negativkontrollen (Neg, A, B) und das MG63 Totalzelllysate (MG, B) wurden mit dem Anti-Col I Antikörper inkubiert. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die markanten Banden in den Positivkontrollen und der MG63 Probe liegen bei 130 und 113 kDa bzw. bei 125 und 118 kDa und repräsentieren Kollagen Typ I.

Abbildung 3.4 A zeigt zwei Spuren Kollagen Typ I Positivkontrollen verschiedener Proteinkonzentrationen (Pos1 und Pos2). Bei der ersten

Positivkontrolle wurde eine Proteinkonzentration von 5mg/mL (Pos1) aufgetragen und bei der zweiten Positivkontrolle wurde die Proteinkonzentration unverdünnt eingesetzt (Pos2). Ein deutlicher Unterschied in der Intensität der Signale ist erkennbar. Bei der geringer konzentrierten Kontrollprobe befinden sich mindestens zwei Banden in unmittelbarer Nähe zueinander, so dass der Eindruck entsteht es handelt sich nur um eine einzelne Bande. Die Schwärzung liegt bei der 130 kDa und 113 kDa Markierung. In der Positivkontrolle rechts daneben ist eine ausgedehnte Schwärzung des Films zu erkennen. Der Bereich beginnt oberhalb der 150 kDa und läuft auf Höhe der 100 kDa aus. Die Negativkontrolle weist keine Banden auf. Es handelt sich bei den detektierten Banden der Positivkontrolle somit um das Markerprotein Kollagen Typ I.

Damit sich die Spuren der Positivkontrollen bei starker Belichtung nicht überschneiden, wurde in Abbildung 3.4 B die Positivkontrolle mit der geringeren Proteinkonzentration (Pos1) auf der rechten Spur aufgetragen. Es zeigt sich ein Bild mit mehr Nebenbanden als bei der Positivkontrolle in Abbildung 3.4 A. Zwei Banden werden bei 125 kDa und 118 kDa detektiert und repräsentieren Kollagen Typ I. Auf der restlichen Spur werden einige unspezifische Nebenbanden detektiert. Im unteren Drittel der Spur ist eine prominente Bande von 12 kDa sichtbar. Diese Bande tritt ebenfalls auf der MG63 Spur auf. Die gesamte Belichtung dieser Positivkontrolle (Pos1) und der MG63 Probe ähnelt in der Auftrennung der Belichtung der reinen Positivkontrolle, nur in einen niedrigeren Molekulargewichtsbereich verschoben. Neben vielen Nebenbanden sticht eine markante Bande auf einer Höhe von 93 kDa hervor. Unmittelbar unterhalb dieser Bande befindet sich eine zweite, schwächere Bande. Die gesamte Laufstrecke der Negativkontrolle in Abbildung 3.4 B ist frei von geschwärzten Bereichen, die auf detektierte Proteine hinweisen könnten.

3.1.5 Osteopontin (SPP1, secreted phosphoprotein 1)

Osteopontin wird in der frühen Phase der Differenzierung von Osteoblasten gebildet, in die Extrazellulärmatrix sezerniert und ist dort wichtiger Bestandteil der Mineralisation [10]. Es besitzt mit 35 kDa das geringste Molekulargewicht der zu detektierenden Markerproteine.

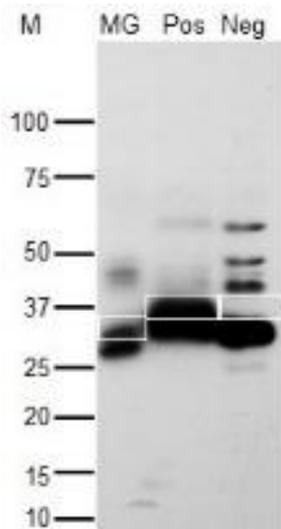


Abbildung 3.5: Western Blot Analyse zum Nachweis von Osteopontin in der Positivkontrolle, Negativkontrolle und einem MG63 Totalzelllysat

Das MG63 Totalzelllysat (MG, links), die Positivkontrolle (Pos, Mitte) und die Negativkontrolle (Neg, rechts) wurden mit dem Anti-SPP1 Antikörper inkubiert. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die markanteste Bande liegt bei der Positivkontrolle bei 37 kDa und repräsentiert Osteopontin.

Die Spur MG in Abbildung 3.5, in der das MG63 Zelllysat aufgetrennt wurde, zeigt zwei Banden bei 33 kDa und 30 kDa. Die Positivkontrolle ist auf der zweiten Spur aufgetrennt. Zwei sich überlappende Banden sind zu erkennen. Sie besitzen ein Molekulargewicht von 37 kDa bzw. ca. 34 kDa. Die Negativkontrolle zeigt unspezifische Bindungen des Antikörpers. Das markanteste Signal liegt bei 31 kDa. Die Positivkontrolle zeigt ein markantes zusätzliches Signal bei 37 kDa. Da diese Bande auf der selben Höhe läuft wie die untere Bande in der Positivkontrolle, ist davon auszugehen, dass jeweils die höhere Bande (33 kDa in MG63, 37 kDa in Pos) Osteopontin repräsentiert. Außerdem sind mehrere unspezifische Signale zwischen 60 kDa und 40 kDa bei der Negativkontrolle zu sehen. Auch wenn die detektierten Banden nicht auf der gleichen Höhe verlaufen, zeigen die Banden der Positivkontrolle und der MG63 Totalzelllysatprobe das Markerprotein Osteopontin.

3.2 Differenzierungsverhalten von hBMSCs auf PCL Faser Scaffolds

Die Analyse der Proteinexpression auf den PCL Faser Scaffolds und Monolayern erfolgte mittels Western Blot. Über einen Zeitraum von insgesamt sechs Wochen wurden, beginnend an Tag 0, jeweils im Abstand von sieben Tagen, Proteinproben isoliert. Die Kultivierung der Zellen sowie die Isolierung der Proteine wurden nicht selber durchgeführt, letztere wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Bei den hier dargestellten Western Blot Ergebnissen ist pro verwendetem Antikörper nur ein entwickelter Film exemplarisch gezeigt. Alle anderen Western Blot Abbildungen für die analysierten Proben mit den Maschengrößen von 30 μm und 90 μm befinden sich im Anhang dieser Arbeit (9. Anhang, Seite 94 ff). Die dargestellten Western Blots wurden mit Proteinproben aus den hBMSCs des Spenders 1060 (hBMSC 1060) durchgeführt. In einem weiteren Versuchsdurchgang wurden hBMSCs eines zweiten Spenders verwendet. Die Western Blot Abbildungen zu den Proteinproben des Spenders 1021 (hBMSC 1021) befinden sich ebenfalls im Anhang (9. Anhang, Seite 94 ff). Die Maschengröße der Scaffolds der dargestellten Western Blots beträgt 60 μm .

Die Proben an Tag 0 der Monolayerkultur mit Kontrollmedium dienen als Ausgangswert für das ursprüngliche Expressionslevel zu Beginn der Versuchsreihe.

Die zur Auswertung herangezogenen Banden sind in den entsprechenden Western Blot Abbildungen mit einem Rahmen markiert.

3.2.1 β -Tubulin

Der in Abbildung 3.6 dargestellte Western Blot resultiert aus der Inkubation der Nitrozellulose mit dem Anti- β -Tubulin Antikörper. Die detektierten Tubulin-Banden werden zur Normierung der anderen Western Blot Ergebnisse herangezogen. Da eine Nitrozellulose nacheinander mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert wurde, können durch die Normierung auf Tubulin

Unterschiede in der aufgetragenen Proteinmenge herausgerechnet und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet werden.

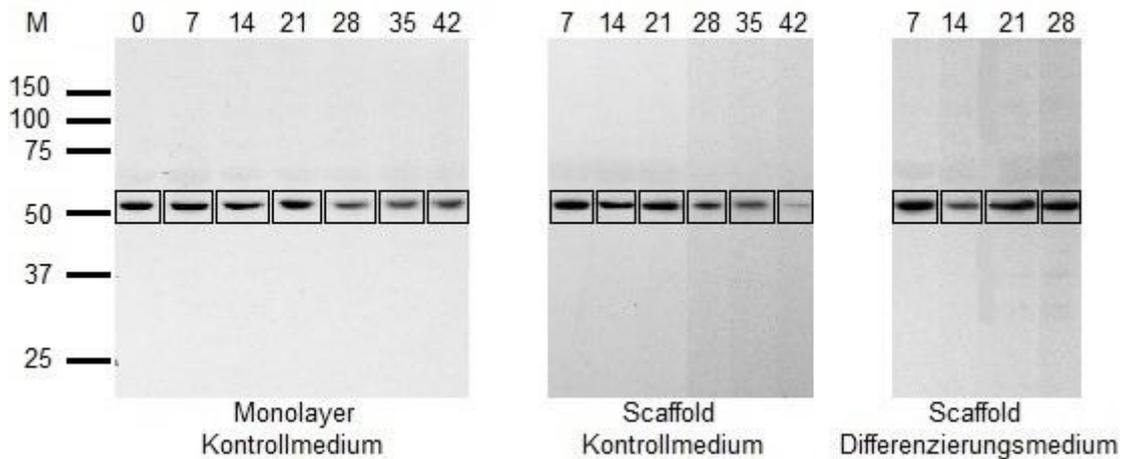


Abbildung 3.6: Western Blot Analyse zum Nachweis von Tubulin in hBMSCs (hBMSC 1060).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links) sowie auf PCL MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 60 μm in Kontrollmedium (Mitte) bzw. in osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 28 Tage. Die Molekulargewichtsskala (M) des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

Die Banden zeigen ein Molekulargewicht von 58 kDa und entsprechen damit dem Molekulargewicht des β -Tubulins. Bei den Monolayern mit Kontrollmedium sind die ersten vier Versuchstage von ihrer Intensität gleichwertig. Tag 28 bis Tag 42 erscheinen in ihrer Schwärzung schwächer. Die Banden der hBMSCs, die auf den MEW-Faser Scaffolds mit Kontrollmedium kultiviert wurden, sind gleichmäßig detektiert. Nur Tag 42 weist eine schwächere Intensität auf. Die Proben, die auf den Faser Scaffolds mit Differenzierungsmedium kultivierten Zellen, ergeben deutliche Banden. Oberhalb der detektierten Banden sind schwache unspezifische Banden erkennbar.

3.2.2 Alkalische Phosphatase

In der nachstehenden Abbildung 3.7 ist die Nitrozellulose für den Western Blot mit dem Anti-ALPL Antikörper inkubiert.

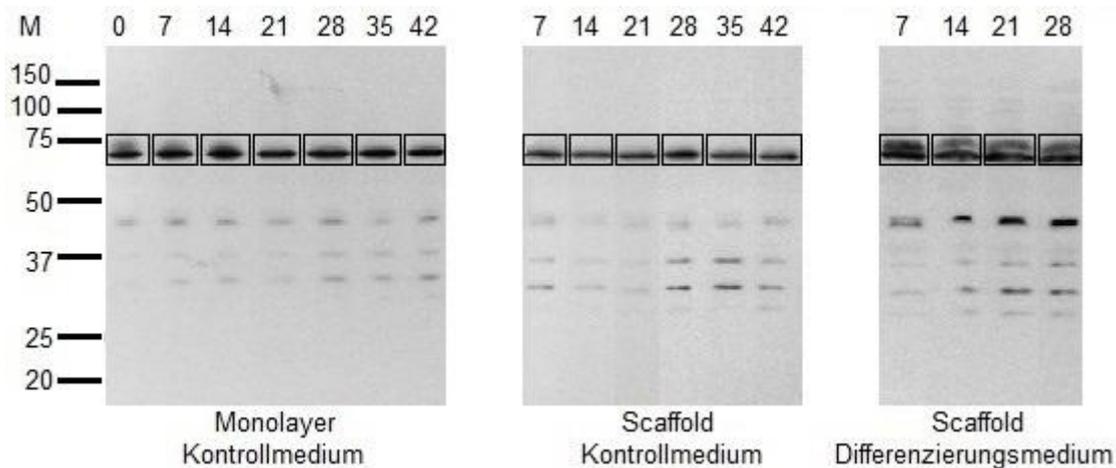


Abbildung 3.7: Western Blot Analyse zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase in hBMSCs (hBMSC 1060).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links) sowie auf PCL MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 60 μm in Kontrollmedium (Mitte) bzw. in osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 28 Tage. Die Molekulargewichtsskala (M) des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

Bei 62 kDa ist in allen Spuren die spezifische ALPL-Bande detektierbar. Bei einigen Spuren tritt eine zweite Bande bei 66 kDa auf. Bei den MEW-Faser Scaffolds mit Differenzierungsmedium sind diese Doppelbanden am stärksten ausgeprägt. Unterhalb der 50 kDa sind zwei bis drei unspezifische Nebenbanden pro Spur ersichtlich. Bei den Scaffolds mit Differenzierungsmedium sind die Nebenbanden an Tag 14, 21 und 28 stärker ausgeprägt.

Zuerst werden die Diagramme zu den Spenderzellen hBMSC 1060 gezeigt und darauffolgend die Diagramme zu den Spenderzellen hBMSC 1021.

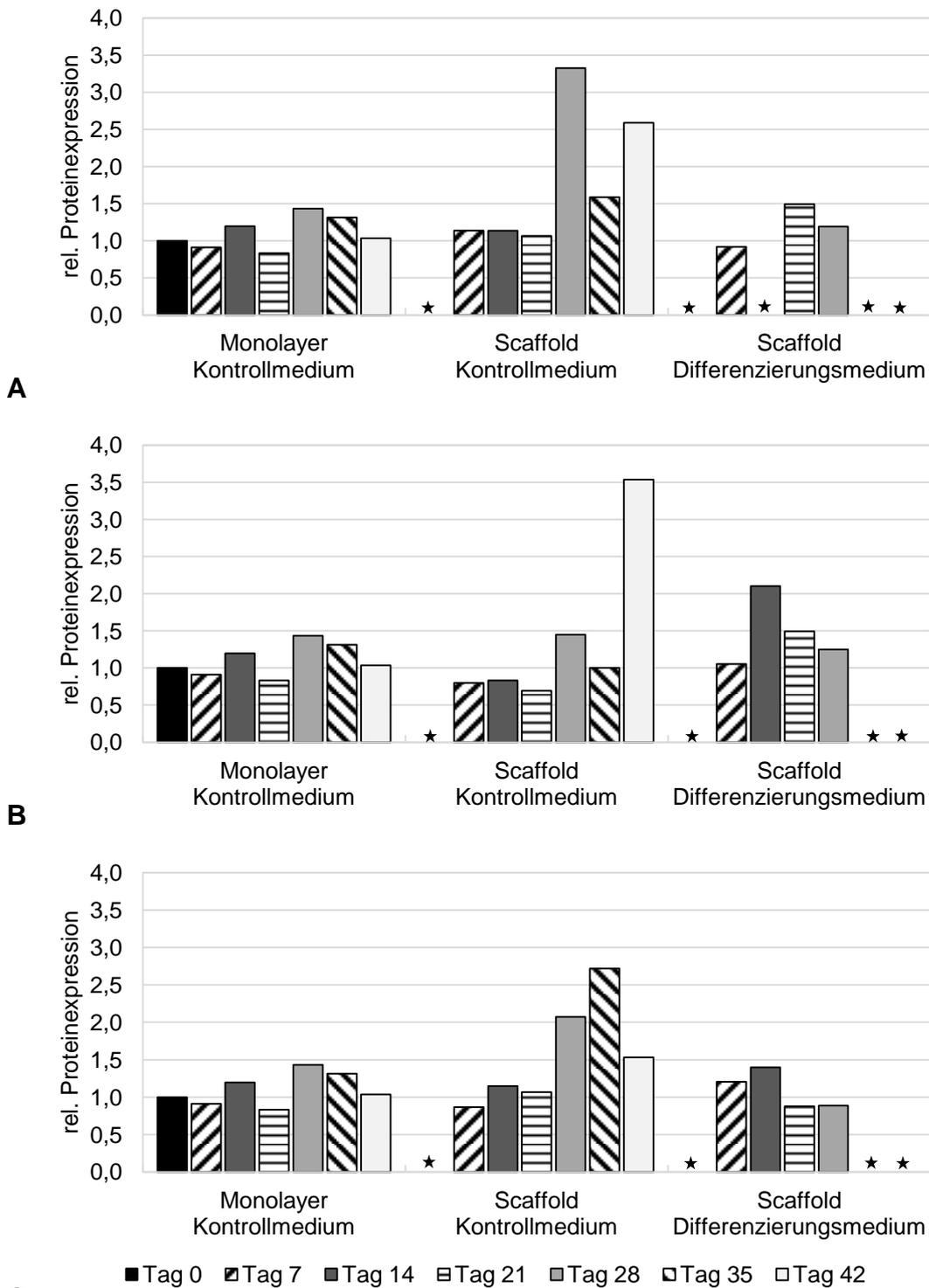


Abbildung 3.8: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase in hBMSCs (hBMSC 1060)

Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte als Monolayer in Kontrollmedium sowie auf MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschengröße von 30 µm (A), 60 µm (B) und 90 µm (C) sowohl in Kontrollmedium als auch in osteogenem Differenzierungsmedium. * Daten nicht vorhanden

Die Proteinexpression der hBMSCs 1060 sind in Abbildung 3.8 A-C dargestellt. Beginnend mit den Monolayerproben links, die in Kontrollmedium kultiviert wurden, sind mittig die hBMSCs auf den MEW-Faser Scaffolds in Kontrollmedium und rechts daneben in Differenzierungsmedium aufgeführt. In Abbildung 3.8 A sind die Scaffolds mit 30 μm Maschengröße gezeigt. Die relative Proteinexpression bei den Monolayerproben entspricht der, der Scaffoldproben in Differenzierungsmedium. An Tag 28 und 42 zeigt sich bei den Scaffoldproben in Kontrollmedium die Expression leicht erhöht. Ein ähnliches Ergebnis ist auf den Scaffoldproben mit 60 μm Maschengröße zu beobachten (Abbildung 3.8 B). Dabei ist bei den Scaffoldproben mit 60 μm Maschengröße, die in Kontrollmedium kultiviert wurden nur an Tag 42 eine ca. 3,5-fache Erhöhung der ALPL Expression im Vergleich zu den anderen Werten sichtbar. Dieselbe Tendenz wiederholt sich in Abbildung 3.8 C. Die hier analysierten hBMSCs, die auf Scaffolds mit der Maschengröße 90 μm kultiviert und mit Kontrollmedium versorgt wurden, zeigen an Tag 28 und 35 eine zwei- bis zweieinhalbfach erhöhte Proteinexpression. Die relative Proteinexpression der Monolayerproben, Scaffoldproben in Differenzierungsmedium und den restlichen Tagen der Scaffoldproben in Kontrollmedium ist in etwa gleich.

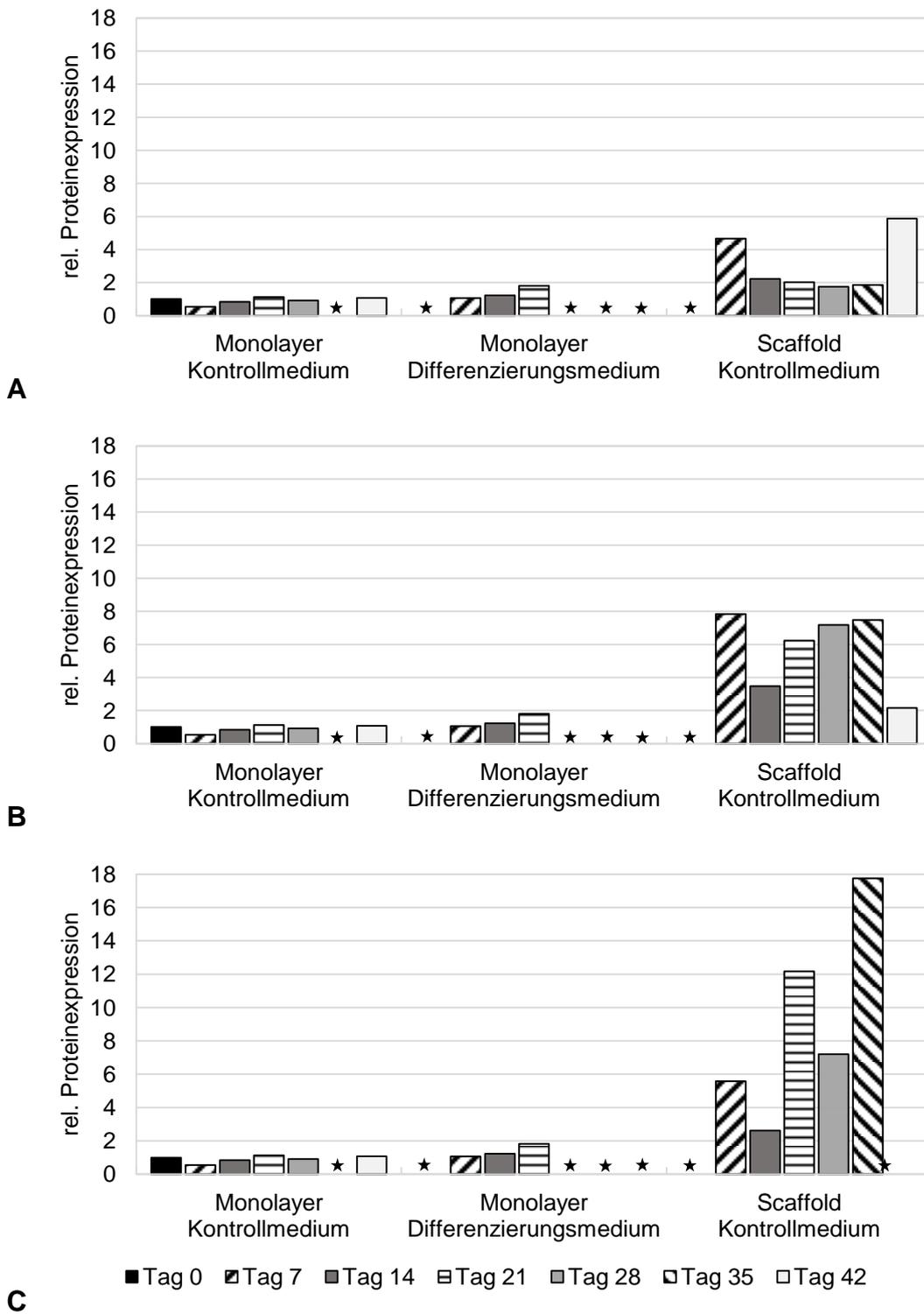


Abbildung 3.9: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase in hBMSCs (hBMSC 1021)

Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte als Monolayer sowohl in Kontrollmedium als auch in osteogenem Differenzierungsmedium. Weiterhin wurden hBMSCs auf MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschengröße von 30 µm (A), 60 µm (B) und 90 µm (C) in Kontrollmedium kultiviert. * Daten nicht vorhanden

Abbildung 3.9 zeigt die quantitative Auswertung der relativen Proteinexpression von ALPL der hBMSCs 1021. Links sind die Ergebnisse der Monolayerproben, die mit Kontrollmedium kultiviert wurden, dargestellt. In der Mitte befinden sich die Proben der Monolayerkulturen mit Differenzierungsmedium und rechts die Kulturen auf den MEW-Faser Scaffolds mit Kontrollmedium. Die relative Proteinexpression der hBMSCs in Abbildung 3.9 A ist bei den Monolayerproben in Kontrollmedium bei allen Versuchstagen in etwa bei eins. Dieselbe Ausprägung ist bei den Monolayerproben in Differenzierungsmedium zu erkennen. Bei den mit Kontrollmedium versorgten und auf den 30 μm Scaffolds kultivierten hBMSCs besteht an Tag 7 und an Tag 42 eine verstärkte Proteinexpression von ALPL. Bei den hBMSCs, die auf den Scaffolds mit einer Maschengröße von 60 μm kultiviert wurden, zeigt sich in Abbildung 3.9 B an allen Versuchstagen eine erhöhte ALPL Produktion im Vergleich zu den Monolayerproben. An Tag 42 ist sie doppelt erhöht. Am stärksten tritt sie an Tag 7 auf und ist damit um mehr als acht Mal höher als bei den Monolayerproben. In Abbildung 3.9 C haben die Maschen der Scaffolds mit Kontrollmedium eine Größe von 90 μm . Die hierauf kultivierten hBMSCs zeigen ebenfalls eine stark gesteigerte Expression. Mit Ausnahme von Tag 14 sind alle anderen Versuchstage um ein Sieben- bis Sechszehnfaches erhöht. An Tag 35 zeigt die relative Proteinexpression einen achtzehnfach erhöhten Wert im Vergleich zu den Werten der entsprechenden Monolayerproben. Generell ist die relative ALPL Expression bei den mit Kontrollmedium und auf Scaffolds kultivierten hBMSCs 1060 geringer als bei den hBMSCs 1021.

3.2.3 Bone Sialoprotein

Abbildung 3.10 zeigt den Western Blot nach Inkubation mit dem Anti-BSP Antikörper.

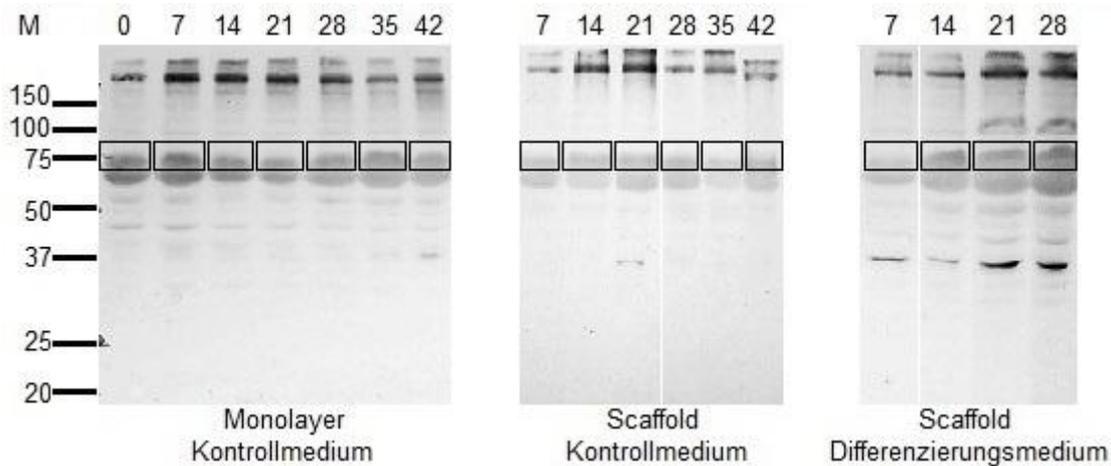


Abbildung 3.10: Western Blot Analyse zum Nachweis von Bone Sialoprotein in hBMSCs (hBMSC 1060).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links) sowie auf PCL MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 60 μm in Kontrollmedium (Mitte) bzw. in osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 28 Tage. Die Molekulargewichtsskala (M) des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

Die signalstärksten Banden liegen oberhalb der 150 kDa Markierung. Diese Banden tauchen ebenfalls bei der Positivkontrolle auf. Die Bande, die mit dem Molekulargewicht von BSP korrespondiert, befindet sich bei 76 kDa. Es sind zwei Banden sichtbar, die klar voneinander abgegrenzt sind, wobei die obere der beiden dominiert. Die untere Bande liegt bei 63 kDa. In dem darunterliegenden Bereich sind weitere Nebenbanden erkennbar. Bei den Proben von Tag 21 und Tag 28, die mit Differenzierungsmedium auf Scaffolds kultivierten hBMSCs, zeigen sich stärkere Nebenbanden unterhalb von 37 kDa.

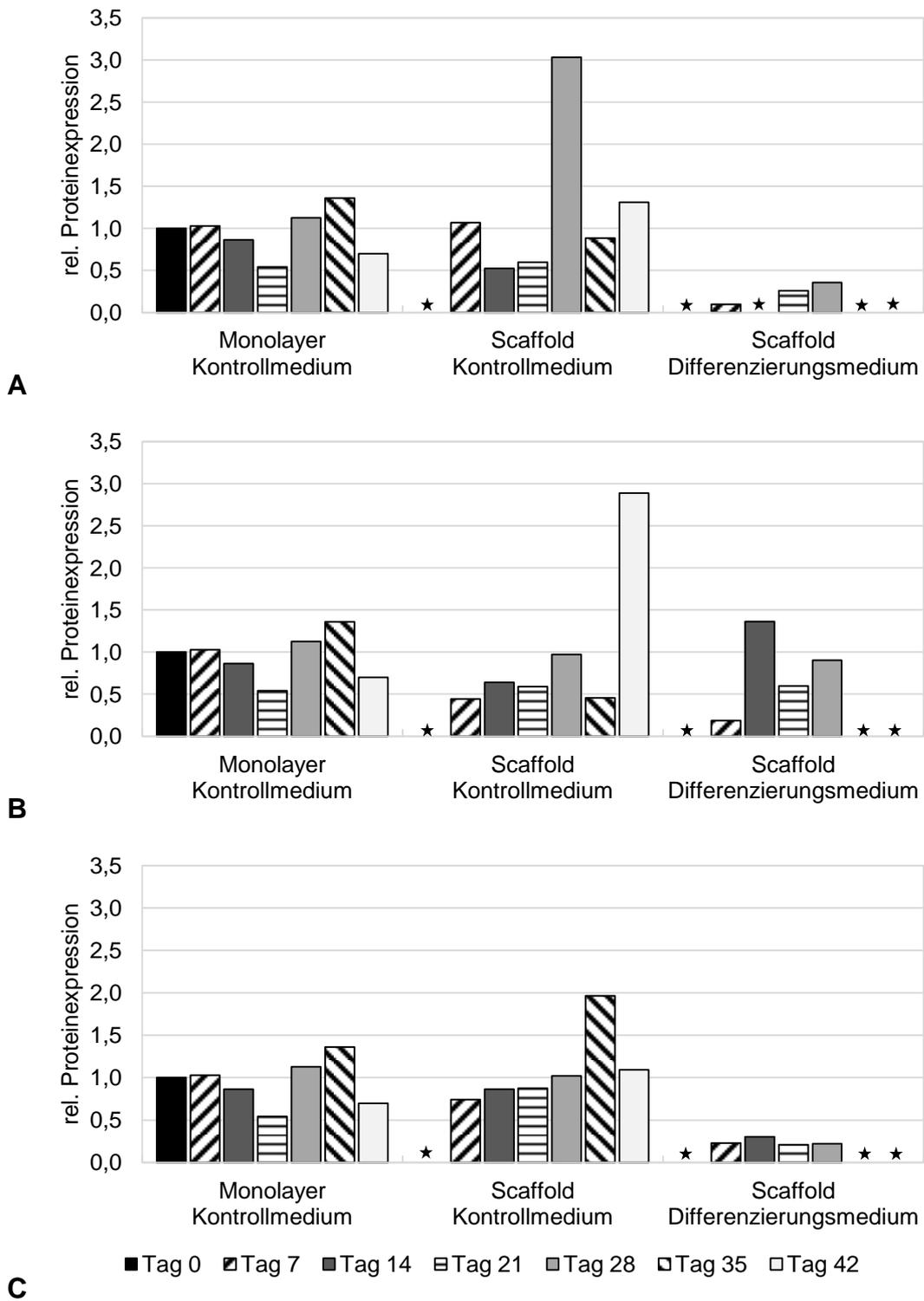


Abbildung 3.11: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Bone Sialoprotein in hBMSCs (hBMSC 1060)

Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte als Monolayer in Kontrollmedium sowie auf MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschengröße von 30 µm (A), 60 µm (B) und 90 µm (C) sowohl in Kontrollmedium als auch in osteogenem Differenzierungsmedium. ★ Daten nicht vorhanden

Die Ergebnisse der Analyse der hBMSCs 1060 sind in Abbildung 3.11 A-C dargestellt. Bei den Monolayerkulturen in Kontrollmedium zeigt sich an allen Tagen eine gleichbleibende Expression. Die Scaffoldproben mit einer Maschengröße von 30 μm (Abbildung 3.11 A) sind in ihren Werten mit denen der Monolayerkulturen vergleichbar. Nur an Tag 28 liegt eine Verdreifachung der relativen Expression von BSP vor. Auffällig niedrig sind die Werte hingegen bei den hBMSCs, die auf Scaffolds in Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Die BSP Expression ist hier um die Hälfte niedriger als die der hBMSCs auf Scaffolds in Kontrollmedium.

Die mit Differenzierungsmedium versorgten hBMSCs auf Scaffolds mit einer Maschengröße von 60 μm (Abbildung 3.11 B) zeigen ebenfalls eine verringerte Expression, die in diesem Fall schwächer ausgeprägt ist. Ausschließlich die Zellen von Tag 7 zeigen eine deutlich geringere BSP Expression im Vergleich zu den anderen Proben. Die Proben der Tage 14 bis 28 sind in ihrer BSP Produktion mit den Proben der Scaffolds in Kontrollmedium vergleichbar. Tag 42 der Scaffoldproben in Kontrollmedium ist der einzige Tag an dem ein Anstieg der Expression der Zellen um mehr als das Doppelte zu beobachten ist. In Abbildung 3.11 C finden sich die Ergebnisse der hBMSCs, kultiviert auf den 90 μm Scaffolds. Die Monolayerkulturen in Kontrollmedium und die Scaffoldkulturen in Kontrollmedium zeigen in etwa die gleiche BSP Expression. Tag 35 liegt bei den Scaffoldproben leicht über dem mittleren Schnitt der anderen Tage. Wie bei den 30 μm Scaffolds ist die relative BSP Expression der hBMSCs auf den Scaffolds in Differenzierungsmedium deutlich herunterreguliert. Von Tag 7 bis Tag 28 liegen die Werte bei dem 0,25-fachen Expressionslevel.

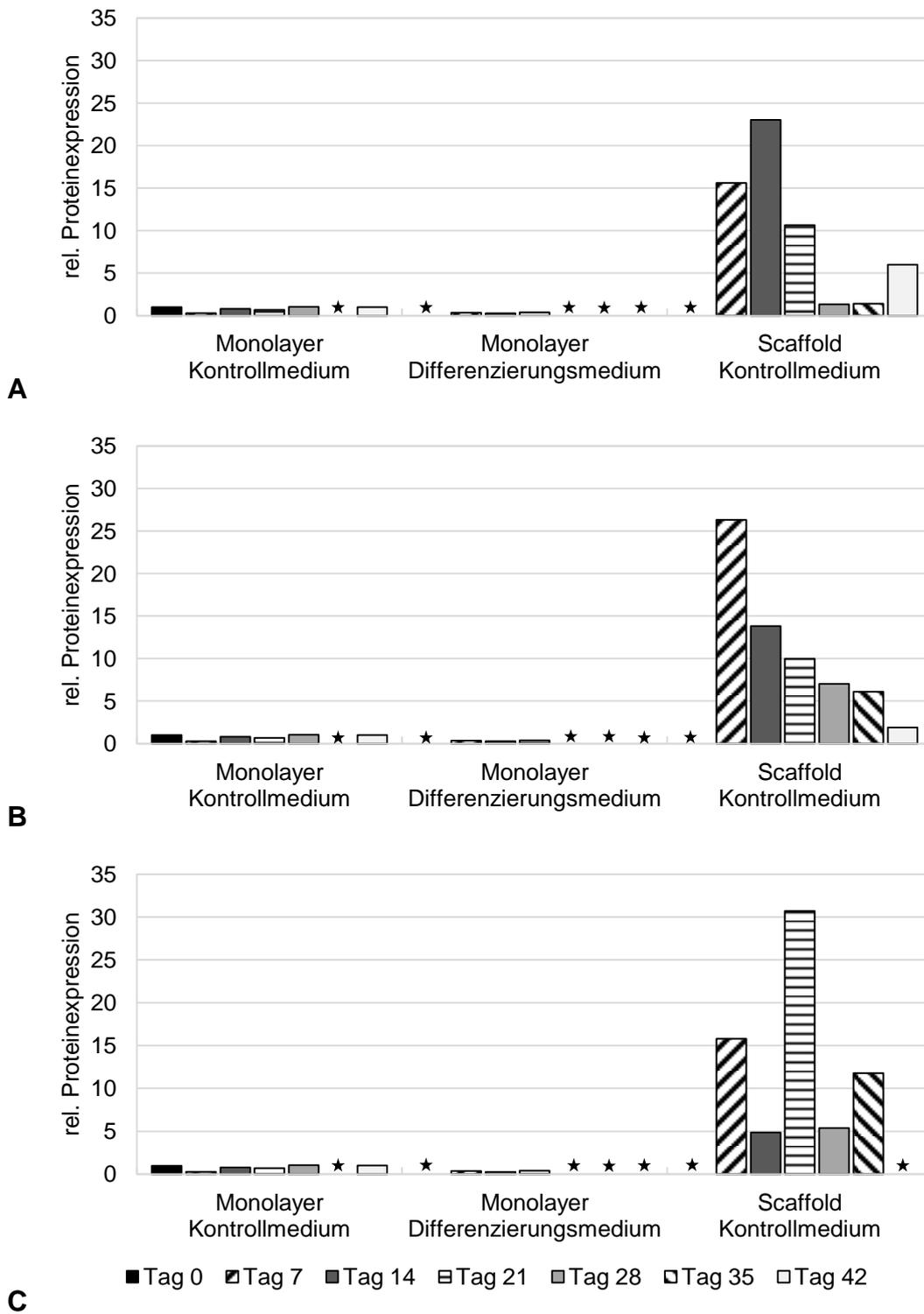


Abbildung 3.12: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Bone Sialoprotein in hBMSCs (hBMSC 1021)

Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte als Monolayer sowohl in Kontrollmedium als auch in osteogenem Differenzierungsmedium. Weiterhin wurden hBMSCs auf MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschengröße von 30 μm (A), 60 μm (B) und 90 μm (C) in Kontrollmedium kultiviert.
 * Daten nicht vorhanden

Abbildung 3.12 A-C zeigt die Ergebnisse der hBMSCs 1021 Proben. Die Proben von Zellen in Monolayerkulturen in Kontrollmedium zeigen durchweg eine einfache Expression von BSP. Auch die Monolayerkulturen der in Differenzierungsmedium kultivierten hBMSCs zeigen keine verstärkte Expression der Markerproteine durch die osteogenen Stimuli im verwendeten Medium. Bei den hBMSCs, die auf den Scaffolds mit einer Maschengröße von 30 μm (Abbildung 3.12 A) und in Kontrollmedium kultiviert wurden, zeigt sich an den Tagen 7, 14 und 21 eine sehr viel höhere relative Proteinexpression als an den Tagen 28 und 35. An Tag 14 ist ein dreiundzwanzigmal erhöhter Wert, an Tag 7 eine sechszehnfach und an Tag 21 eine elffach erhöhte BSP Expression zu beobachten. An Tag 42 erscheint die Expression im Vergleich zu den Monolayerproben um das Sechsfache erhöht. Bei den Scaffoldproben mit einer Maschengröße von 60 μm (Abbildung 3.12 B) ist eine ähnliche Erhöhung zu erkennen. Hier dominiert eindeutig Tag 7 mit einem über sechsundzwanzigfach erhöhten Wert gegenüber den Werten der Monolayerkulturen. An den Tagen 14 bis 42 ist eine stetig geringer werdende Expression von BSP zu beobachten. Die Werte der auf den 90 μm Scaffolds und in Kontrollmedium kultivierten hBMSCs (Abbildung 3.12 C) zeigen eine deutlich höhere Expression von BSP. An Tag 21 ist die höchste relative Expression der hBMSCs 1021 Scaffoldproben in Kontrollmedium zu beobachten. An den Tagen 7 und 35 ist eine Verdopplung der Hochregulierung der BSP Expression zu erkennen. Im Vergleich der hBMSC 1060 und der hBMSC 1021 erkennt man generell eine höhere Expression von BSP bei den hBMSCs 1021. Das gilt aber nur für die Kontrollen von hBMSCs auf Scaffolds. Die Kontrollen im Monolayer sind von den Werten her vergleichbar.

3.2.4 Kollagen Typ I

Der in Abbildung 3.13 dargestellte Western Blot zeigt den Nachweis von Kollagen Typ I in hBMSCs 1060.

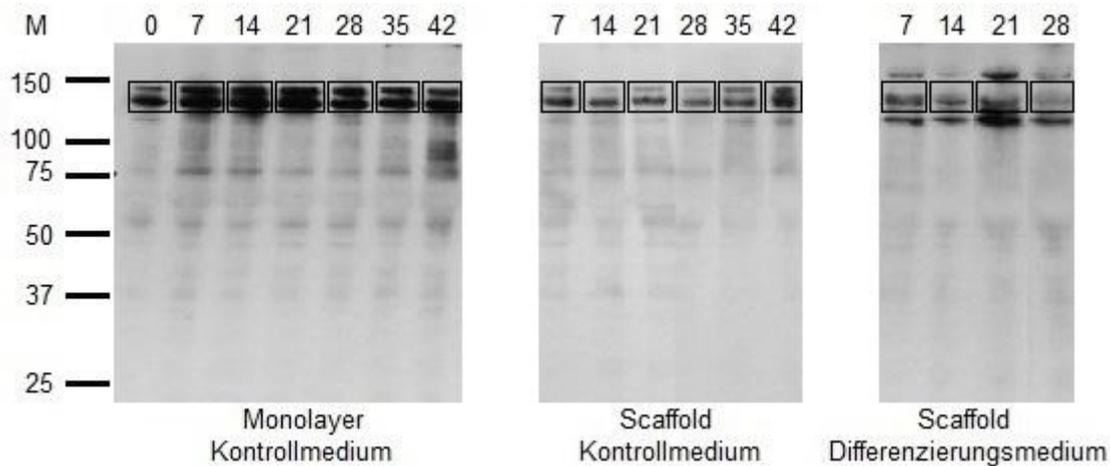


Abbildung 3.13: Western Blot Analyse zum Nachweis von Kollagen Typ I in hBMSCs (hBMSC 1060).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links) sowie auf PCL MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 60 μm in Kontrollmedium (Mitte) bzw. in osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 28 Tage. Die Molekulargewichtsskala (M) des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

Der Western Blot weist bei den in Monolayerkulturen und auf den Scaffolds in Kontrollmedium kultivierten hBMSCs zwei eindeutige Hauptbanden auf Höhe von 140 kDa und 126 kDa auf. Bei den Scaffoldproben in Differenzierungsmedium verlaufen die Banden anders als bei den Proben in Kontrollmedium. Beide Banden liegen deutlich unterhalb der 150 kDa Markierung. Dafür erscheint eine dritte Bande bei 151 kDa. Besonders an Tag 21 ist diese Bande stark ausgeprägt. Alle Spuren weisen in ihrem Verlauf mehrere Nebenbanden auf.

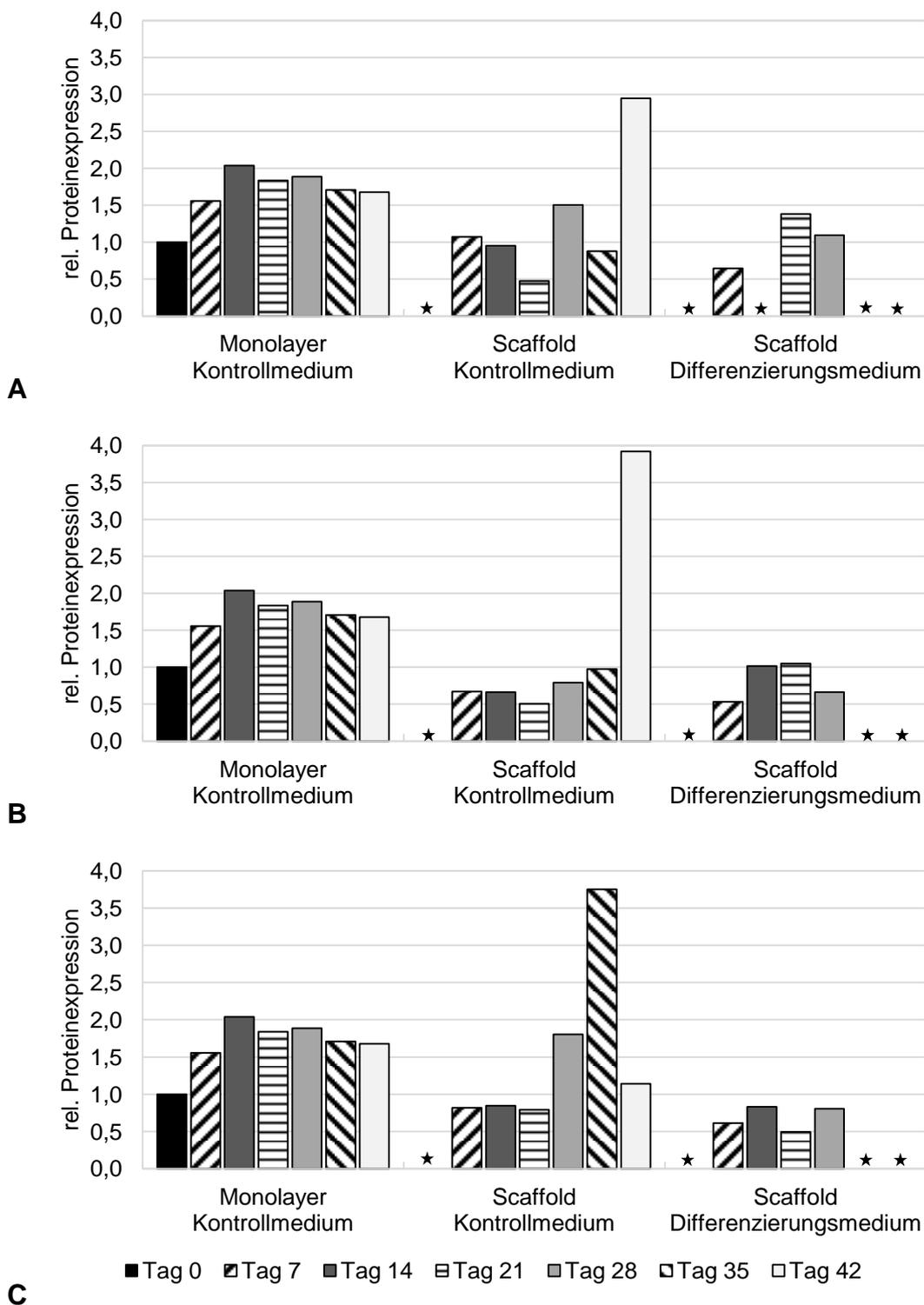


Abbildung 3.14: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Kollagen Typ I in hBMSCs (hBMSC 1060)

Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte als Monolayer in Kontrollmedium sowie auf MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschengröße von 30 µm (A), 60 µm (B) und 90 µm (C) sowohl in Kontrollmedium als auch in osteogenem Differenzierungsmedium. ★ Daten nicht vorhanden

In Abbildung 3.14 A haben die Scaffolds, auf denen die Kulturen für die Proben angesetzt wurden, eine Maschengröße von 30 μm . Die Monolayerkulturen wurden in Kontrollmedium angesetzt und zeigen an allen Messtagen eine erhöhte Expression von Col I. Die Col I Expression bei den Scaffoldproben in Kontrollmedium erscheint an Tag 42 dreimal erhöht als an Tag 0, ansonsten ist an den anderen Tagen eine geringe Expression zu verzeichnen. Bei den Scaffoldproben in Differenzierungsmedium liegt die Col I Expression zwischen dem ein- und zweifachen Wert von Tag 0. Bei den Zellkulturen, die auf den 60 μm Scaffolds kultiviert wurden (Abbildung 3.14 B), ist die gleiche Tendenz wie bei den Proben der Kulturen auf den 30 μm Scaffolds zu erkennen. Neben den um die Hälfte niedrigeren Werten an Tag 7 bis 35 ist nur an Tag 42 der Wert, der auf den Scaffolds in Kontrollmedium kultivierten hBMSCs um das Vierfache erhöht. Wie zuvor ist die Col I Expression der Scaffoldproben in Differenzierungsmedium im Vergleich zu den Monolayerkulturen an den Tagen 7 und 28 um die Hälfte herunterreguliert, an den Tagen 14 und 21 gleich wie an Tag 0. Die Ergebnisse der Proben der Kulturen, die auf den Scaffolds mit 90 μm Maschengröße kultiviert wurden, bestätigen die vorherigen Tendenzen. In den in Kontrollmedium und auf Scaffolds kultivierten hBMSCs ist an Tag 35 eine knapp doppelt erhöhte Col I Expression wie bei den Monolayerkulturen erkennbar. An Tag 28 ist die Expression mit der Expression der Monolayerkulturen vergleichbar. Der Wert an Tag 42 weist eine gering erhöhte Expression im Vergleich zu dem Wert von Tag 0 auf. Die Werte an den Tagen 7 bis 21 liegen deutlich darunter. Die relative Col I Expression der Scaffoldproben, die in Differenzierungsmedium kultiviert wurden, ist ebenfalls herunterreguliert und liegt unterhalb der anderen Messergebnisse.

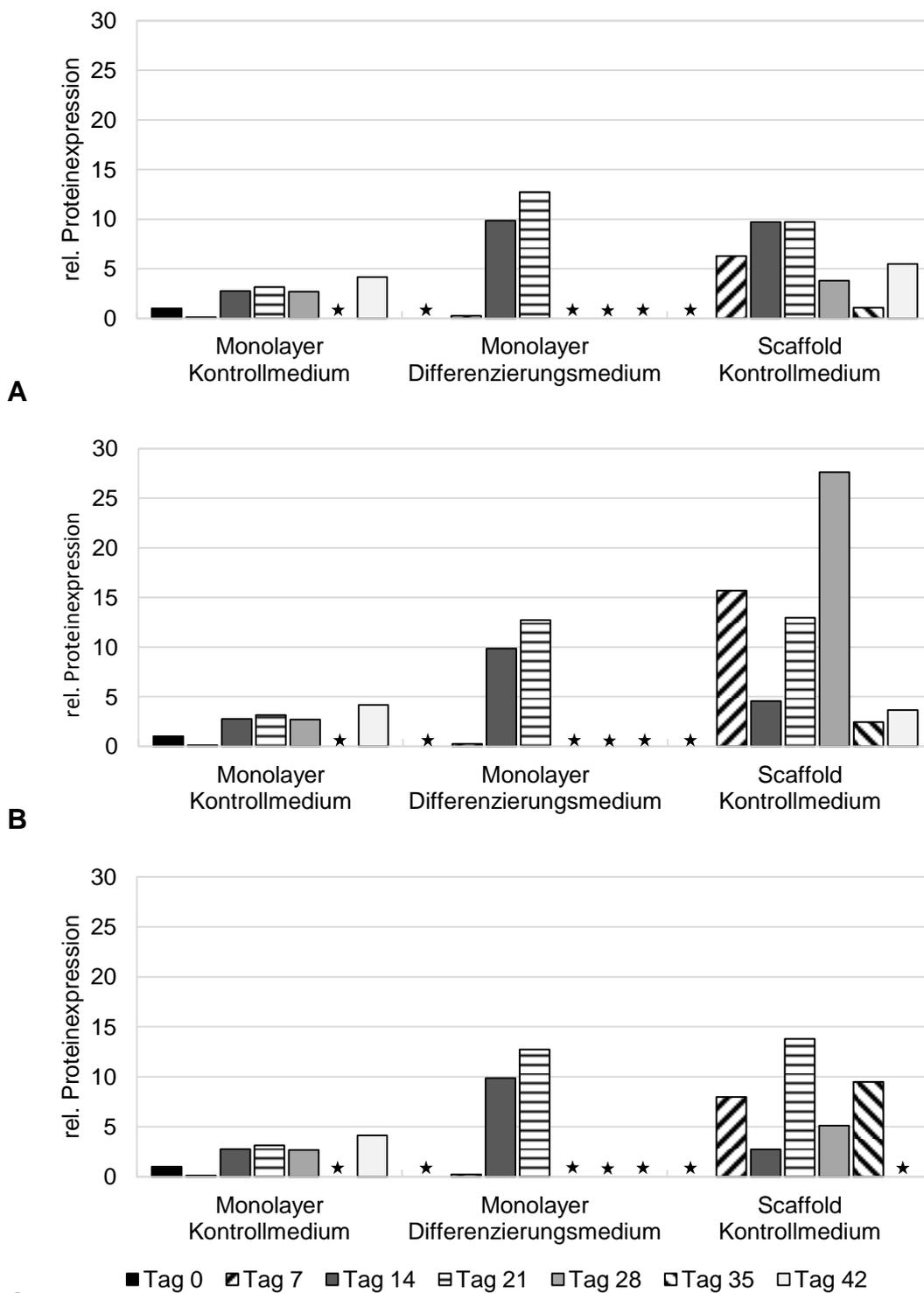


Abbildung 3.15: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Kollagen Typ I in hBMSCs (hBMSC 1021)

Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte als Monolayer sowohl in Kontrollmedium als auch in osteogenem Differenzierungsmedium. Weiterhin wurden hBMSCs auf MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschengröße von 30 µm (A), 60 µm (B) und 90 µm (C) in Kontrollmedium kultiviert. *Daten nicht vorhanden

Abbildung 3.15 A-C zeigt die Auswertung der relativen Expression von Col I in hBMSCs 1021. Die Proben der in Kontrollmedium und als Monolayer kultivierten hBMSCs weisen in Abbildung 3.15 A eine drei- bis vierfach erhöhte Col I Expression im Vergleich zu Tag 0 auf. An Tag 7 konnte nur eine geringe Menge an Col I detektiert werden. Auch der Wert von Tag 7 der Monolayerkulturen in Differenzierungsmedium weist eine minimale Col I Expression auf. An den Tagen 14 und 21 hingegen sind die Werte um das Zehn- bis Dreizehnfache erhöht. Die MEW-Faser Scaffolds besitzen eine Maschengröße von 30 μm . Die hierauf kultivierten hBMSCs zeigen eine Hochregulierung der Col I Expression. Die Werte an den Tagen 7, 14 und 21 sind niedriger als an Tag 21 der Monolayerkulturen in Differenzierungsmedium, aber deutlich höher als die Werte der Monolayerkulturen in Kontrollmedium. Die Expression an Tag 14 und 21 ist doppelt so stark ausgeprägt wie die an den Tagen 28 und 35. Eine erhöhte Col I Expression ist ebenfalls an Tag 7 und 42 zu erkennen. Die Monolayerkulturen in Kontrollmedium (Abbildung 3.15 B) sind in ihrer relativen Col I Expression im Vergleich zu den Monolayerkulturen in Differenzierungsmedium und den Scaffoldproben in Kontrollmedium deutlich niedriger. Tag 14 und Tag 21 der Monolayerkulturen in Differenzierungsmedium zeigen eine gesteigerte Bildung von Col I um das Zehn- bis Dreizehnfache. Dies wird bei den Scaffoldproben übertroffen. An Tag 28 erreicht die relative Col I Expression ihr Maximum um den siebenundzwanzig Mal erhöhten Wert im Vergleich zu dem Wert von Tag 0. Auch an den Tagen 7 und 21 lassen sich deutlich gesteigerte Expressionen beobachten. In Abbildung 3.15 C haben die Scaffolds, auf denen die hBMSCs kultiviert wurden, eine Maschengröße von 90 μm . Die Col I Bildung ist an den Tagen 7, 21 und 35 zwei bis drei Mal, gegenüber den Proben der anderen Versuchstage, erhöht. Bei den in Differenzierungsmedium, auf Monolayern kultivierten hBMSCs ist an Tag 14 und 21 das gleiche Resultat zu beobachten. Die Monolayerkulturen in Kontrollmedium sind auch hier die Proben mit der geringsten Col I Expression. Wie bei den vorangegangenen Proteinen ist die relative Proteinexpression von Col I der hBMSCs 1060 deutlich geringer ausgeprägt als bei den hBMSCs 1021.

3.2.5 Osteopontin

In Abbildung 3.16 ist der Western Blot zum Nachweis der SPP1 (secreted phosphoprotein 1) Expression in hBMSCs 1060 dargestellt.

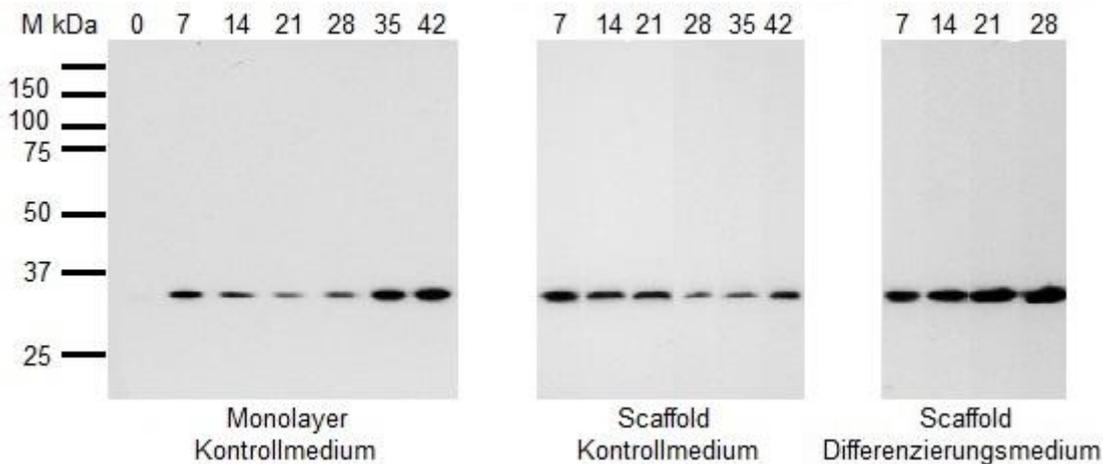


Abbildung 3.16: Western Blot Analyse zum Nachweis von Osteopontin in hBMSCs (hBMSC 1060).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links) sowie auf PCL MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 60 μm in Kontrollmedium (Mitte) bzw. in osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 28 Tage. Die Molekulargewichtsskala (M) des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

Auf der gesamten Nitrozellulosemembran wurde auf jeder Laufspur nur eine Bande detektiert. Diese Bande liegt bei 34 kDa. Auffällig ist die schwache Bande an Tag 0. Bei den Monolayerkulturen, die in Kontrollmedium kultiviert wurden, nimmt die Signalstärke von Tag 7 bis Tag 21 stetig ab. Ab Tag 28 bis Tag 42 nimmt sie jedoch wieder enorm zu. Bei den mit Kontrollmedium kultivierten Scaffoldproben ist die Bande von Tag 7 am intensivsten und im Verlauf der Versuchsreihe nimmt die Intensität ab. Nur Tag 42 weist wiederum eine verstärkte Schwärzung auf. Bei den Scaffoldproben in Differenzierungsmedium ergeben sich, im Vergleich zu den anderen Banden, die stärksten Signale. Ihre Intensität nimmt von Tag 7 stetig zu und erreicht an Tag 28 ihr Maximum. Der Anti-Osteopontin Antikörper weist im Vergleich zu den anderen verwendeten Antikörpern keine Kreuzreaktionen auf. Daraus resultierend sind keine Nebenbanden detektiert worden.

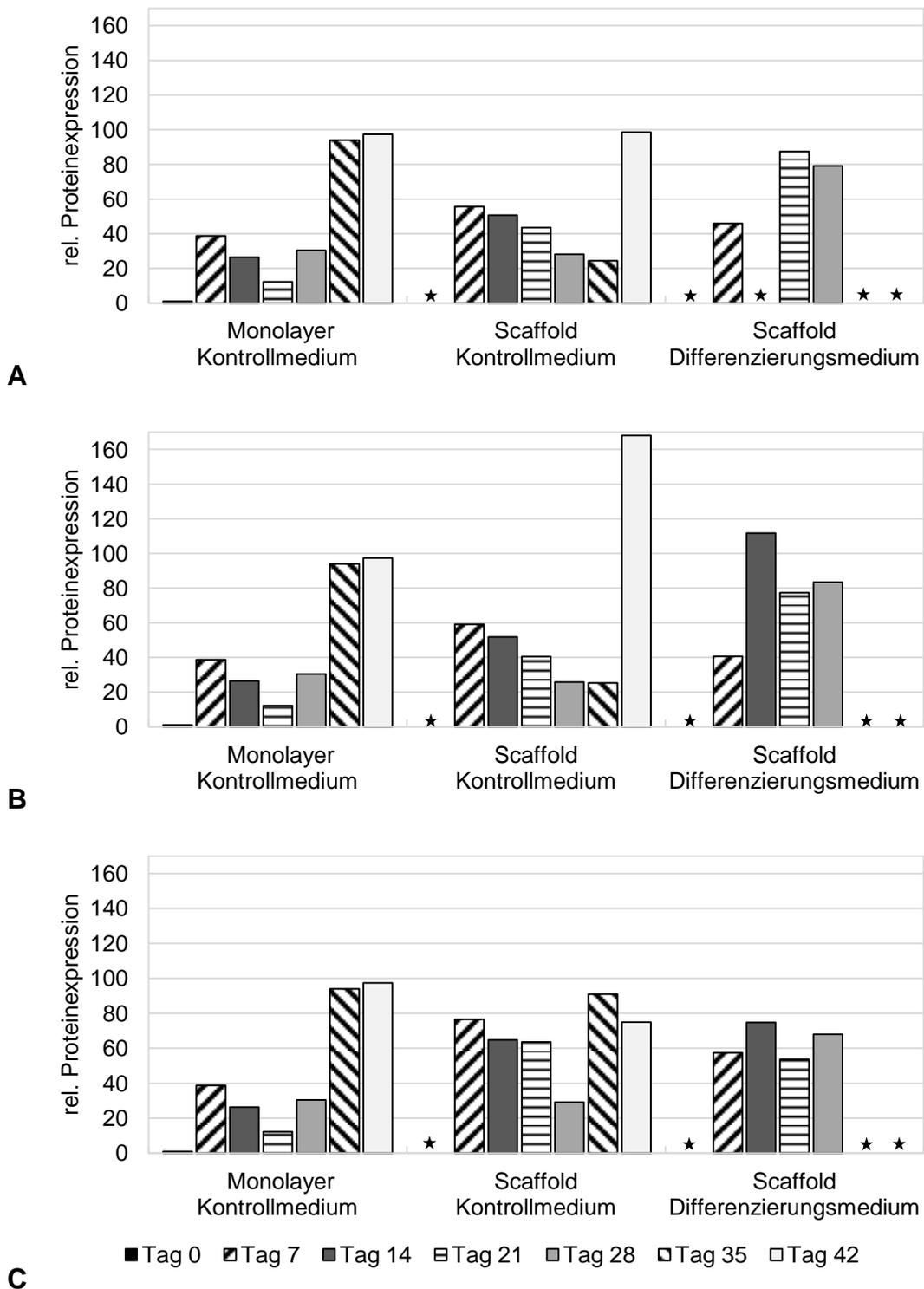


Abbildung 3.17: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Osteopontin in hBMSCs (hBMSC 1060)

Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte als Monolayer in Kontrollmedium sowie auf MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschengröße von 30 µm (A), 60 µm (B) und 90 µm (C) sowohl in Kontrollmedium als auch in osteogenem Differenzierungsmedium. ★ Daten nicht vorhanden

Die Ergebnisse der Analyse für die hBMSCs 1060 und SPP1 sind in Abbildung 3.17 A-C gezeigt. In Abbildung 3.17 A sind die hBMSCs, die als Monolayer und in Kontrollmedium kultiviert wurden sowie die Zellen auf Scaffolds mit 30 µm Maschenweite, dargestellt und zeigen von Tag 7 an eine gesteigerte SPP1 Expression, die das Zehn- bis Hundertfache im Vergleich zu Tag 0 übersteigen. An Tag 35 und 42 weisen die Proben eine ungefähr doppelt erhöhte SPP1 Menge auf wie an den vorherigen Messtagen. In Abbildung 3.17 B zeigt die Expression an Tag 7 der Scaffoldproben in Kontrollmedium eine eineinhalbfach höhere relative SPP1 Expression wie Tag 7 der Monolayerkulturen. Die folgenden SPP1 Expressionen fallen kontinuierlich bis Tag 35 ab. An Tag 42 ist die gleiche relative SPP1 Expression wie bei den Monolayerkulturen des gleichen Zeitpunkts zu beobachten. Während an Tag 7 bei den hBMSCs, die auf Scaffolds in Differenzierungsmedium kultiviert wurden, die Expressionsrate niedriger ist als an Tag 7 der Scaffoldproben in Kontrollmedium, liegen die an den Tagen 21 und 28 gemessenen Werte leicht unter dem von Tag 42 der in Kontrollmedium versorgten Scaffoldkulturen. Ein identisches Bild zeigt sich bei den Proben, die auf Scaffolds mit einer Maschengröße von 60 µm kultiviert wurden (Abbildung 3.17 B). An Tag 42 liegt der Wert der Scaffoldproben in Kontrollmedium über 160, während der Wert an den Tagen 28 und 35 nur bei 35 liegt. Bei den in Differenzierungsmedium versorgten und auf Scaffolds kultivierten hBMSCs sticht der Messwert an Tag 14 besonders hervor, aber auch an Tag 21 und 28 zeigen sich deutlich gesteigerte SPP1 Expressionen gegenüber den ersten fünf Zeitpunkten bei den Monolayerkulturen. In Abbildung 3.17 C besitzen die Scaffolds, auf denen die hBMSCs kultiviert wurden, eine Maschengröße von 90 µm. Es zeigt sich eine gesteigerte SPP1 Expression an den Tagen 7 bis 28 im Vergleich zu den entsprechenden Zeitpunkten der Monolayerproben. Die Werte an Tag 35 sind bei der Monolayerkultur in Kontrollmedium und der Scaffoldkultur in Kontrollmedium annähernd gleich hoch. An Tag 42 der Scaffoldproben in Kontrollmedium erscheint der gemessene Wert nicht so hoch wie bei der korrespondierenden Monolayerprobe. Die relative Expression von SPP1 der hBMSCs, die auf

Scaffolds in Differenzierungsmedium kultiviert wurden, ist doppelt erhöht wie die an den zum gleichen Zeitpunkt genommenen Monolayerproben.

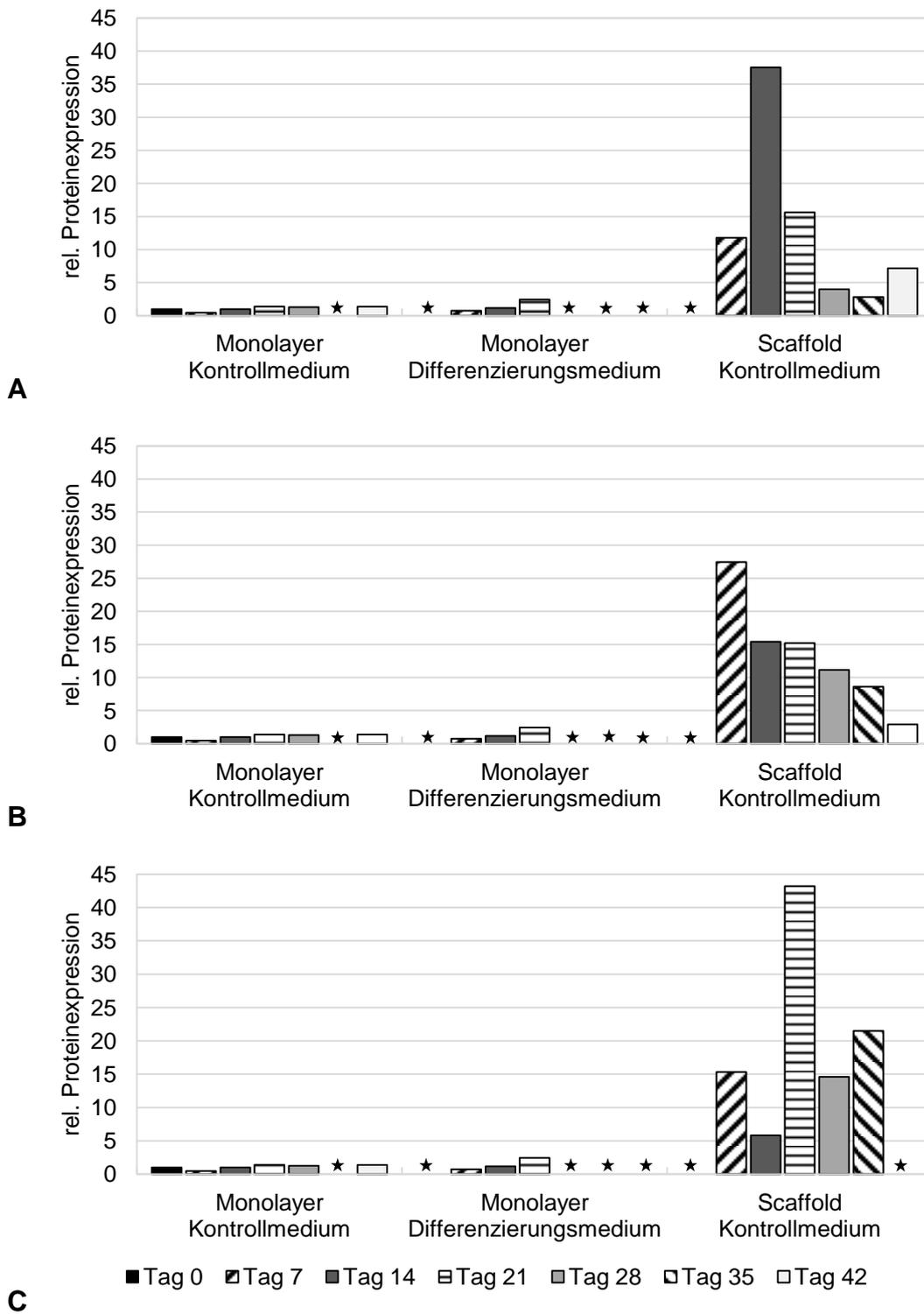


Abbildung 3.18: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Osteopontin in hBMSCs (hBMSC 1021)

Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte als Monolayer sowohl in Kontrollmedium als auch in osteogenem Differenzierungsmedium. Weiterhin wurden hBMSCs auf MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschengröße von 30 µm (A), 60 µm (B) und 90 µm (C) in Kontrollmedium kultiviert. *Daten nicht vorhanden

In Abbildung 3.18 sind die Ergebnisse der Analyse der Expression von SPP1 der Zellkulturproben des Spenders hBMSC 1021 dargestellt. Die Monolayerkulturen, die in Kontrollmedium kultiviert wurden, weisen eine geringe SPP1 Expression auf. Bei den Monolayerkulturen, die in Differenzierungsmedium kultiviert wurden, steigt die Expression von SPP1 von Tag 7 bis 21 an und erreicht den dreifachen Wert im Vergleich zu Tag 0. Die Werte der Scaffoldproben (30 µm Maschengröße) in Abbildung 3.18 A sind an allen Tagen in ihrer SPP1 Expression um ein Vielfaches gesteigert. Der Wert an Tag 14 übersteigt die vorherigen Werte der Monolayerkulturen. Er liegt bei 37. An den Tagen 7 und 21 sind mit dem Zwölf- bis Sechszehnfachen deutlich höhere Werte zu beobachten als an den Tagen 28 bis 42. Aber auch an den letzten drei Versuchstagen zeigt sich eine verstärkte SPP1 Expression der hBMSCs im Vergleich zu den Monolayerkulturen. Die Expression von SPP1 ist auf den Scaffolds mit 60 µm Maschenweite stark ausgeprägt (Abbildung 3.18 B). An Tag 7 zeigt sich die höchste Expression an SPP1, die das 27-fache im Vergleich zu den Monolayerkulturen erreicht. Die relative Expression von SPP1 an den übrigen Messtagen der Scaffoldproben in Kontrollmedium nimmt von Messtag zu Messtag stetig ab. Tag 42 zeigt jedoch immer noch eine erhöhte Produktion gegenüber den Werten der Monolayerkulturen. Auch bei den Scaffolds mit einer Maschengröße von 90 µm (Abbildung 3.18 C) ist eine stark erhöhte SPP1 Bildung der hBMSCs zu erkennen. Am stärksten tritt diese am Tag 21 auf und ist zu diesem Zeitpunkt um das über 40-fache höher als die vergleichbaren Monolayerkulturen. An den Tagen 7, 28 und 35 wird dieser Wert zwar nicht erreicht, jedoch ist immer noch eine deutlich höhere SPP1 Expression zu beobachten. Selbst an dem Messtag mit der geringsten SPP1 Expression (Tag 14) der Scaffoldproben liegt der gemessene Wert mehr als drei Mal höher als der, der Monolayerkulturen.

Es ist zu beobachten, dass die Diskrepanz zwischen Monolayer- und Scaffoldkulturen bei den hBMSCs deutlich ausfällt. Im Gegensatz zu den anderen betrachteten Proteinen, sind die Expressionswerte der hBMSC 1060 sehr viel höher als die der hBMSC 1021.

4 Diskussion

4.1 Nachweis der osteogenen Markerproteine und Antikörperfunktionalität

Für die Expressionsanalyse osteogener Markerproteine in mesenchymalen Stromazellen (hBMSCs) wurden zu Beginn der Arbeit die Versuchsprotokolle für die Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und den Western Blot etabliert. Die Funktionalität der Antikörper für den Nachweis der osteogenen Markerproteine Alkalische Phosphatase (ALPL), Bone Sialoprotein (BSP), Kollagen Typ I (Col I) und Osteopontin (secreted phosphoprotein 1, SPP1) wurde anhand von, mit den Antikörpern mitgelieferten, Positiv- und Negativkontrollen sowie an kultivierten Totalzelllysaten einer Osteosarkomzelllinie (MG63), verifiziert. Die spezifische Bindung des Anti- β -Tubulin Antikörpers wurde anhand der MG63-Totalzelllysatprobe wie die der anderen Antikörper ebenfalls überprüft.

Bevor auf die einzelnen Markerproteine eingegangen wird, ist das Auftreten natürlicher Schwankungen bei Proteinen zu erwähnen. Aufgetretene Unterschiede im Laufverhalten der Proteine und damit, die von der Literatur geringfügig abweichenden Ergebnisse für das Molekulargewicht, können als Ursache dafür angebracht werden. Das gleiche Protein aus unterschiedlichen Zelllinien kann ein anders Laufverhalten zeigen, dies kann mit einer unterschiedlichen Proteinmodifikation z:B. durch Zuckerreste etc. zu tun haben. Die Werte in der Literatur sind meist errechnet und neben der Anzahl und Art der Aminosäuren im Gel spielen noch andere Faktoren eine Rolle, so dass die Methode nicht ungenau ist, sondern es zu natürlich auftretenden Schwankungen kommen kann. Eine weitere Diskrepanz bei den ermittelten Molekulargewichten entstand durch die Berechnung. Wie im Methodenteil (2.2.10 Ergebnisauswertung) beschrieben, wurden anhand der Laufweiten der Molekulargewichtsmarker Ausgleichsgeraden erstellt. Dadurch entstandene Abweichungen zwischen den errechneten und in den Abbildungen dargestellten Molekulargewichten sollten ebenfalls bei der Analyse berücksichtigt werden.

Der β -Tubulin Antikörper detektierte sein Antigen in der MG63 Zelllysatsprobe als eindeutige Bande bei 58 kDa (Abbildung 3.1). Starke Banden sind ein Zeichen von einer Überladung der Proteinkonzentration bei der SDS-PAGE.

Das Versuchsprotokoll war ebenfalls bei dem Anti-ALPL Antikörper anwendbar (Abbildung 3.2). Die vom Hersteller des Antikörpers mitgelieferte Positivkontrolle und das Ergebnis des MG63-Zelllysats zeigten die gleichen Doppelbanden zwischen 56 kDa und 63 kDa. In der Negativkontrolle hingegen wurde nur eine einzelne Bande detektiert, die mit 71 kDa für ALPL ein zu hohes Molekulargewicht aufwies. Die Doppelbanden sind durch die vorliegende Form der ALPL zu erklären. Sie liegt in reaktiver und kürzerer Form (untere Bande) oder in ihrer nicht reaktiven und längeren, phosphorylierten Form (obere Bande) vor [93, 94].

Das Versuchsprotokoll konnte auch für den Anti-BSP Antikörper (Abbildung 3.3) bestätigt werden, da auch hier eine Bande in der Positivkontrolle mit dem Antikörper detektiert werden konnte. Die detektierte Bande lag auf der prognostizierten Höhe von 78 kDa. Die Negativkontrolle wies auf beiden Nitrozellulosemembranen keine Banden auf, die dem Molekulargewicht von BSP entsprachen. Die aufgetrennte MG63-Probe zeigte ein ähnliches Bild wie die Positivkontrolle, jedoch erschien die gesamte Auftrennung nach unten verschoben. Dieser Effekt beruht möglicherweise auf der Tatsache, dass die Positivkontrolle und das MG63-Totalzelllysat jeweils in unterschiedlichen Probenpuffern gelöst wurden. Die Positivkontrolle wurde in dem vom Hersteller mitgelieferten Radioimmunoprecipitation assay Puffer (RIPA) gelöst, der einen pH-Wert von 7,6 aufwies, wohingegen das MG63-Zelllysat in Probenpuffer nach Lämmli mit einem pH-Wert von 6,8 gelöst wurde [80]. Der verwendete Probenpuffer nach Lämmli war damit saurer, so dass die Proben in den unterschiedlichen Puffern ein von einander abweichendes Laufverhalten zeigten.

Bei dem Anti-Kollagen Typ I Antikörper wurden starke Banden detektiert (Abbildung 3.4). Dies lag zum einen an der Belichtungszeit und zum Anderen an der verwendeten Menge an gelöstem Kollagen in den Proben. Diese lag bei der ersten Positivkontrolle bei 5mg/mL. Bei der zweiten Positivkontrolle wurde

die Probe unverdünnt eingesetzt. Zur Optimierung der Ergebnisse wäre eine Verkürzung der Belichtungszeit auf ein Minimum (1 Sekunde) und eine geringere Beladung der Spur mit Protein notwendig. Die Positivkontrolle, bei der weniger Protein gelöst wurde, zeigte zwei Banden, die zwischen 100 kDa und 150 kDa lagen. Die Bandengröße von 100 kDa bis 130 kDa entsprach damit dem zu erwartendem Molekulargewicht. In der Spur der aufgetrennten MG63-Probe ist wie bei den anderen Antikörpern das Laufverhalten durch den verwendeten Lämmli Puffer verändert zum Vergleich mit der in RIPA Puffer gelösten Positivprobe während der SDS-PAGE [80]. Zudem wurden einige Nebenbanden detektiert. Kollagen Typ I liegt als Tripelhelix vor. Jede dieser Helices besteht aus zwei α 1-Ketten und einer α 2-Kette [11]. Der Antikörper kann laut Hersteller in weniger als 10% der Fälle Kreuzreaktionen mit den Kollagentypen II-VI zeigen, die als Banden bei der Entwicklung sichtbar werden können. Zudem liegt Kollagen oftmals in einer Propeptidform vor, die vor eventuellen Abspaltungsreaktionen ein höheres Molekulargewicht besitzt [95].

Das Molekulargewicht von Osteopontin beträgt 35 kDa. Nach Auftrag der Positivkontrolle zeigten sich im Western Blot zwei eng beieinander liegende Banden in der Höhe von 34 kDa und 37 kDa (Abbildung 3.5). Im Vergleich zur Positivkontrolle wurde bei der Negativkontrolle nur eine Bande unterhalb von 35 kDa detektiert. Daraus ist zu schließen, dass die obere Bande der Positivkontrolle das positive Ergebnis für den SPP1 Antikörper zeigte. Verifiziert wurde dies durch die MG63 Totalzelllysatsprobe, bei der ebenfalls eine Doppelbande auftrat. Die MG63 Zellprobe wurde in Lämmli-Puffer resuspendiert, wohingegen die Positiv- und Negativkontrolle im mitgelieferten RIPA-Puffer verdünnt wurden. Durch die Resuspendierung in unterschiedlichen Puffern kann es zu Unterschieden im Laufverhalten kommen. Das gleiche Protein kann aufgrund des Puffers unterschiedlich weit im Verhältnis zum Proteinmarker aufgetrennt werden. Der Laufunterschied ist, wie oben beschrieben, durch den verwendeten RIPA Puffer bei der Positivkontrolle und den Lämmli-Puffer bei der MG63 Proteinprobe bei allen Markerproteinen zu erklären.

Alle Analysen zur Etablierung der Protokolle waren in den Vorversuchen positiv. Damit verifizierten sie die Anwendung der Versuchsmethoden für die hier verwendeten Antikörper um eine osteogene Differenzierung von hBMSCs auf verschiedenen Gerüsten mit unterschiedlichen Maschengrößen analysieren zu können.

4.2 Einfluss auf die Differenzierung der hBMSCs nach Kultivierung auf Scaffolds mit unterschiedlichen Maschenweiten und Monolayern

Zur Analyse der Expression der osteogenen Markerproteine in mesenchymalen Stromazellen (hBMSCs), nach Kultivierung auf Scaffolds mit unterschiedlichen Maschengrößen, wurden die in den Vorversuchen etablierten Protokolle für die Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und den Western Blot zur Analyse der hBMSCs, angewandt. Bei den hBMSCs handelt es sich um diejenigen, die auf den Scaffolds und als Monolayer in einem Kontroll- und einem Differenzierungsmedium kultiviert wurden. Die Proben der beiden Spender 1060 (hBMSC 1060) und 1021 (hBMSC 1021) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Expression der osteogenen Markerproteine Alkalische Phosphatase (ALPL), Bone Sialoprotein (BSP), Kollagen Typ I (Col I) und Osteopontin (secreted phosphoprotein 1, SPP1) hin analysiert. Diese Proteine werden bei einer osteogenen Differenzierung der hBMSCs verstärkt exprimiert [55].

Die Ergebnisse der Positivkontrollen konnten mit den Ergebnissen der Scaffoldproben und Monolayerproben der passenden Antikörper verglichen werden und eine mögliche osteogene Differenzierung der hBMSCs aufgrund der Kultivierung auf Scaffolds mit unterschiedlichen Maschenweiten analysiert werden [53, 96-98].

Das Protein β -Tubulin (Tub) diene als Haushaltsprotein, da es in allen Zellen, unabhängig von Art und Stadium der Differenzierung, gebildet wird. Die Beladungsreferenz des β -Tubulin wurde zur Normierung, der mit anderen Antikörpern inkubierten Proben, verwendet. Voraussetzung ist jedoch, dass

man die Nitrozellulosemembranen strippt, so dass die selbe Probe mit den verschiedenen Antikörpern getestet werden kann [90].

Der β -Tubulin Antikörper wurde an einer Osteosarkomzelllinie (MG63) etabliert (Abbildung 3.1). Es wurden neben einer Hauptbande bei 58 kDa mehrere unspezifische Nebenbanden detektiert, bei denen es sich um Degradationsprodukte des β -Tubulins handeln konnte. Diese Nebenbanden wurden nach der Inkubation der hBMSCs Proben auf Monolayern in Kontrollmedium, Scaffolds in Kontrollmedium und Scaffolds in Differenzierungsmedium mit dem β -Tubulin Antikörper allerdings nicht detektiert (Abbildung 3.6). Die detektierten Banden lagen bei 58 kDa und repräsentieren damit β -Tubulin.

Die Analyse der Expression von Alkalischer Phosphatase der hBMSCs (Abbildung 3.7) zeigte zwei detektierte Banden in Höhe von 62 kDa und 66 kDa. Dieses Ergebnis zeigte ebenfalls die kommerziell erworbene Positivkontrolle für ALPL in Abbildung 3.2. Besonders deutlich ließ sich die detektierte Doppelbande bei den Scaffolds in Differenzierungsmedium erkennen. Es handelte sich also auch hierbei um die detektierte Alkalische Phosphatase. Bei den hBMSCs des Spenders 1021 (hBMSC 1021) war festzustellen, dass die Maschenweite der Scaffolds Einfluss auf die ALPL-Expression der Zellen nimmt. Bei den Scaffolds und den Monolayern wurde dasselbe Kontrollmedium verwendet. Die hBMSCs, die in Kontrollmedium kultiviert wurden, zeigten eine gesteigerte ALPL-Expression, wenn sie auf Scaffolds ausgesät worden waren im Vergleich zu denen, die als Monolayer kultiviert wurden. Daraus ließ sich schließen, dass nicht das verwendete Medium, sondern die Maschenweite, auf der die Zellen wuchsen, Einfluss auf die ALPL-Expression nahm. Im Gegensatz dazu zeigten die Monolayerproben, die mit Differenzierungsmedium versorgt wurden, eine nur minimal erhöhte Expression an ALPL bei der Differenzierung der Zellen. Bei den Proben des Spenders 1021 sind nach der Kultur im Differenzierungsmedium die Marker nicht so angestiegen wie erwartet. Die größte ALPL-Expression wurde bei den Scaffoldproben mit einer Maschenweite von 90 μm registriert. Von Tag 7 bis Tag 35 war ein stetiger Anstieg der ALPL-Expression sichtbar. Die 60 μm Scaffoldproben zeigten besonders an den

Tagen 7, 21, 28 und 35 eine erhöhte ALPL-Expression. Im Vergleich nahmen die 30 µm Scaffolds am wenigsten Einfluss auf die ALPL-Expression. ALPL wird früh in der osteogenen Differenzierung gebildet. Es ist einerseits für den Anstieg der lokalen, anorganischen Phosphatkonzentration, die als Mineralisationspromotor dient und andererseits für die Senkung der extrazellulären Pyrophosphatkonzentration, die als Inhibitor der Mineralisation fungiert, verantwortlich [99-101]. Die steigende ALPL-Expression in den hBMSC 1021 spricht somit für eine osteogene Differenzierung aufgrund der Geometrie der Scaffolds. Die hBMSCs des Spenders 1060 (hBMSC 1060) hingegen zeigten bei den Scaffolds aller Maschengrößen in Kontrollmedium eine gering gesteigerte ALPL-Expression im Vergleich zu den hBMSC 1021. Im Vergleich zu den Monolayerproben mit Kontrollmedium war an den Tagen 28 bis 42 ein leichter Anstieg ersichtlich. Aber auch die mit Differenzierungsmedium auf Scaffolds kultivierten hBMSCs produzierten nicht mehr oder weniger ALPL. Bei dem ersten analysierten osteogenen Markerprotein ALPL war bereits eine Variabilität zwischen den Spendern zu erkennen, die in den anschließenden Kapiteln genauer diskutiert wird.

Der Blot unter Verwendung der hBMSCs des Spenders 1021 mit dem Anti-Bone Sialoprotein Antikörper (Abbildung 3.10) zeigte ein anderes Laufverhalten als die dazugehörige Positivkontrolle (Abbildung 3.3). Es befanden sich zwei Banden in dem für das Bone Sialoprotein (BSP) relevanten Bereich. Eine Bande lag bei 76 kDa und die andere Bande bei 63 kDa. Da 63 kDa weit unterhalb des erwarteten Molekulargewichts von 70-80 kDa für BSP lag, ist davon auszugehen, dass es sich entweder um ein Degradationsprodukt oder eine Kreuzreaktion des Anti-BSP Antikörpers mit dem Protein Albumin, wie vom Hersteller des Anti-BSP Antikörpers angegeben, handelte. Dies könnten mögliche Ursachen für das Auftreten der Nebenbande sein. Es konnte sich ebenfalls um Fragmente von BSP handeln, wie es Kobayashi *et al.* [102] in Tierversuchen mit Ratten feststellte. Die hBMSC 1021 wiesen eine deutliche BSP-Expression bei den Scaffolds in Kontrollmedium, im Vergleich zu den Monolayerproben in Kontroll- und Differenzierungsmedium, auf. Unabhängig von den Maschenweiten der Scaffolds war eine um bis zu

dreiigfach erhöhte BSP Menge in den Proben mit Kontrollmedium vorhanden. Bei den 60 μm Gerüsten war besonders zu Beginn der Versuchsreihe an Tag 7 der erhöhte Spiegel an BSP signifikant und lag bei ca. 26. Er nahm im Verlauf bis zu Tag 42 stetig ab. Auch bei den 30 μm und 90 μm Scaffolds lag die maximal erreichte Expression an BSP in der ersten Hälfte des Versuchszeitraums und zwar bei 23 und 30. Die in Kontrollmedium kultivierten Monolayerproben zeigten keine gesteigerte Expression und auch nach Einsatz von Differenzierungsmedium bei den Monolayern waren keine Anzeichen für eine eintretende Expressionserhöhung von BSP erkennbar. Der signifikante Anstieg der Proteinexpression war somit auf die Geometrie der Scaffolds zurückzuführen. Wie zuvor zeigte sich bei der Analyse der hBMSCs des Spenders 1060 ein abweichendes Ergebnis. Die auf Monolayern und in Kontrollmedium kultivierten hBMSC 1060 verzeichneten keinen Anstieg der BSP-Expression. Die hBMSC 1060, die auf Scaffolds mit Kontrollmedium versorgt wurden, zeigten eine gesteigerte Expression an Tag 28 der 30 μm , Tag 42 der 60 μm und Tag 35 der 90 μm Scaffolds. An allen anderen Tagen wurde kein Anstieg sondern eher eine Abnahme der BSP-Expression beobachtet. Einen negativen Einfluss auf die Expression der hBMSCs war bei den in Differenzierungsmedium und auf Scaffolds kultivierten Zellen zu sehen. Alle Scaffoldproben wiesen eine verringerte BSP-Expression auf. Mögliche natürliche Schwankungen der relativen Proteinexpression sowie Schwankungen, die durch die Messungenauigkeit der Methoden entstanden, sollten immer in Betracht gezogen werden. BSP wird in der Osteogenese zu Beginn und in der Mitte der Differenzierung gebildet. Am Ende der Differenzierung spielt es keine entscheidende Rolle mehr [9, 10, 60].

Der Western Blot der hBMSCs, die auf die Expression von Kollagen Typ I (Col I) hin analysiert wurden (Abbildung 3.13), zeigte die erwarteten Doppelbanden auf Höhe von 140 kDa und 126 kDa bei den hBMSCs auf Monolayern und Scaffolds in Kontrollmedium. Bei den hBMSCs, die auf den Scaffolds in Differenzierungsmedium kultiviert wurden, erschien eine dritte Bande auf Höhe von 151 kDa und somit oberhalb der beiden Hauptbanden. Durch die voranschreitende Differenzierung der Zellen und mit den damit

einhergehenden verschiedenen Stufen der Prozessierung des Prokollagens waren Nebenbanden bei der Detektion von Kollagen Typ I nicht auszuschließen [103]. Bei den hBMSCs des Patienten 1021 war ein positiver Effekt der Maschenweite von 60 μm der Scaffolds auf die Expression der Zellen zu beobachten. Die in Kontrollmedium kultivierten hBMSC 1021 exprimierten auf den Scaffolds mehr Col I als auf den Monolayern. Bei den Monolayerproben war zwar ein minimaler Anstieg in der Expression auf das bis zu Vierfache zu erkennen, dieser lag aber weit unter der Expression der hBMSC 1021 auf den Scaffolds, die knapp das Zehnfache erreichte. Das dreidimensionale Substrat auf dem die Zellen kultiviert wurden spielte damit auch bei Kollagen Typ I eine Rolle bei der Expression von Col I. Besonders bei einer Maschengröße von 60 μm war ein positiver Effekt zu erkennen. An Tag 28 wurde eine 25-fach erhöhte Expression beobachtet. Bei einer Maschenweite von 90 μm und 30 μm war ebenfalls der positive Einfluss der Scaffolds um das bis zu 14-fache auf die Col I Expression der Zellen zu sehen. Die Monolayerkulturen in Differenzierungsmedium steigerten ihre Col I-Expression an den Tagen 14 und 21 im Vergleich zu den in Kontrollmedium kultivierten Zellen um ein Zehnfaches an Tag 14 und um ein 13-faches an Tag 21. Der späte Anstieg der Col I-Expression entspricht den erwarteten Prognosen der Literaturstellen, die besagen, dass Col I erst bei der Reifung der Osteoprogenitorzellen und im Präosteoblastenstadium verstärkt exprimiert wird [51, 57, 59]. Wie bei den Auswertungen der anderen Markerproteine ergab sich bei den hBMSCs des Spenders 1060 ein veränderter Einfluss der Scaffolds auf die Stromazellen. Die Scaffoldstruktur erhöhte die Expression von Col I der hBMSC 1060 nur gering bei der Verwendung von Kontrollmedium. Scaffolds mit 30 μm und 60 μm Maschengröße förderten die Expression von Col I der hBMSCs an Tag 42, Scaffolds mit einer Maschengröße von 90 μm förderten die Expression an Tag 35. Die Messwerte lagen mit einer vierfach erhöhten Expression aber unterhalb der erzielten Werte des Spenders 1021. In den Monolayerkulturen mit Kontrollmedium war eine minimal gesteigerte Expression zu beobachten. Dieser Anstieg könnte jedoch einer Schwankung der Expressionsrate oder der Messungengenauigkeit des Western Blots zuordenbar sein. Ein entgegengesetztes

Bild stellte sich bei den Scaffolds in Differenzierungsmedium dar. Bei den hBMSCs auf Scaffolds mit 30 μm Maschenweite konnte noch keine Beeinflussung in der Expression festgestellt werden, jedoch bei einer Maschengröße von 60 μm und 90 μm . Es stellte sich vor allem an Tag 7 eine reduzierte Col I-Expression dar. Die Scaffoldstruktur und bzw. oder das Differenzierungsmedium sind dafür verantwortlich, dass die Zellen weniger Col I produzierten. Nach Betrachtung der Ergebnisse stellte sich auch bei der Analyse der Col I Expression eine spenderabhängige Variabilität in der Expression der osteogenen Markerproteine heraus.

Osteopontin wird früh in der osteogenen Differenzierung gebildet und in die Extrazellulärmatrix sezerniert [104]. Der Western Blot der hBMSCs (Abbildung 3.16) zeigte eindeutige Banden bei 34 kDa. Die detektierten Banden repräsentieren Osteopontin (SPP1, secreted phosphoprotein1) und es wurden keine Nebenbanden wie bei der Positivkontrolle detektiert (Abbildung 3.5). Die hBMSC 1021, die auf den Scaffolds in Kontrollmedium kultiviert wurden, wiesen in ihrer Expression von SPP1 eine signifikante Erhöhung auf. Auf den 30 μm und 90 μm Scaffolds erreichte die maximale Expressionsrate ein 40-faches von der mit demselben Medium versorgten Zellen in den Monolayerkulturen. Ein Anstieg der SPP1 Expression um das über 25-fache war an Tag 7 bei den 60 μm Scaffolds zu erkennen. Auf Scaffolds in Kontrollmedium kultivierte hBMSCs des Spenders 1060 zeigten einen Anstieg der SPP1-Expression um das bis zu 160-fache an Tag 42 der Scaffolds mit 60 μm Maschenweite. Bei allen drei Maschenweiten war die Expression erhöht. Bei den Monolayern in Kontrollmedium zeigten sich im Vergleich dazu ebenfalls erhöhte Expressionsraten von SPP1. An Tag 35 und 42 lagen diese bei einem bis zu 100-fach erhöhten Wert. Bei den Scaffolds in Differenzierungsmedium zeigten sich bei allen Maschengrößen ebenfalls um bis zu 100-fach erhöhte Werte in der SPP1 Expression. Dadurch relativierte sich in diesem Fall die Annahme, dass allein durch die Maschenweite der Scaffolds eine Expressionserhöhung von SPP1 der Stammzellen eingeleitet werden konnte. Es konnte ebenfalls eine spenderabhängige Variabilität in der Expressionsrate des osteogenen

Markerproteins SPP1 festgestellt werden, jedoch zeigten sich die Werte der beiden Spender dieses Mal gleichermaßen erhöht.

Die Aussagen in dieser Arbeit stützen sich auf Western Blots von zwei verschiedenen Spendern, die teilweise große Unterschiede bei der Expression der einzelnen osteogenen Markerproteine aufwiesen. Die gesteigerte Expression an osteogenen Markerproteinen ist ein Indikator für die Differenzierung der hBMSCs durch den Einfluss der Scaffoldstruktur und bei den einzelnen Markerproteinen auch durch eine bestimmte Maschengröße. Dieser sollte jedoch durch weitere Methoden und eine größere Anzahl an Spenderproben verifiziert werden.

4.2.1 Spenderabhängiges Differenzierungspotential

Neben den getesteten Scaffolds mit den unterschiedlichen Maschenweiten gibt es noch weitere Einflussfaktoren auf die Proteinexpression der mesenchymalen Stromazellen (hBMSCs). Die Ergebnisse der hBMSCs des Spenders 1021 wiesen im Vergleich zu den hBMSCs des Spenders 1060 bei allen nachgewiesenen Markerproteinen Unterschiede im Expressionsmuster auf und waren höher als bei den anderen Spenderproben. Die hBMSC 1021 stammten von einem männlichen Spender, der zum Zeitpunkt der Entnahme 59 Jahre alt war. Die hBMSC 1060 hingegen stammten von einer Spenderin mit 62 Jahren. Beide Spender befanden sich somit in einem fortgeschrittenen Lebensalter und unterschieden sich in ihrem Geschlecht. Aufgrund des Alters ist davon auszugehen, dass sich die Spenderin in der Postmenopause befand, das heißt der gesamte endokrine Hormonhaushalt hatte sich diesbezüglich umgestellt. Für die Osteogenese bedeutet dies eine verringerte Neubildung an Knochen bzw. potentiell einen Rückgang der Knochensubstanz. Das Verhältnis zwischen Osteoblasten und Osteoklasten kommt aus dem Gleichgewicht, indem bei dem Remodellieren mehr Knochen durch die Osteoklasten abgebaut wird als durch die Osteoblasten neu gebildet [105]. Über eventuell vorliegende Allgemeinerkrankungen oder aktuelle Leiden der Patienten war nichts bekannt. Es war ebenfalls nicht bekannt, ob die Spender vor der Zellspende regelmäßig Medikamente einnahmen, rauchten und in welchem körperlichen

Allgemeinzustand sie waren. Jeder einzelne dieser Parameter könnte eine negative Rolle und damit eine Hemmung bei der Differenzierung der entnommenen Zellen spielen [106]. Waren die Spender in ihrer Mobilität eingeschränkt, kann dies ebenfalls negative Auswirkungen auf den Ausgangszustand der Zellen haben, da der mechanische Reiz auf die Zellen einen weiteren Differenzierungsstimulus darstellt [104, 107]. Eine mechanische Reizung war in der Zellkultur nicht vorhanden. Auch Tsuji *et al.* [108] und Bergman *et al.* [109] stellten in Tierversuchen fest, dass *in vitro* kultivierte MSCs von älteren Versuchstieren weniger ALPL und knochenähnliche Substanzen bildeten als die von jüngeren Tieren. Ältere Spendertiere wiesen weniger MSCs mit osteogenem Differenzierungspotential auf [109]. Bertram *et al.* [110] fanden bei ihren Versuchen heraus, dass Zellen von jüngeren Spendern besser für die Zellkultivierung geeignet waren als Zellen von Spendern, die das 60. Lebensjahr überschritten hatten. Diese Zellen wiesen ein eingeschränktes Differenzierungspotential auf [111]. Unter Berücksichtigung dieses Wissenstandes, kann auch bei den Spendern in der vorliegenden Arbeit von einem spenderspezifischen, individuellen Potential der hBMSCs für eine osteogene Differenzierung ausgegangen werden. Bei den hBMSCs des männlichen Spenders (hBMSCs 1021) war ein Anstieg in der Expression der osteogenen Markerproteine stärker ausgeprägt als bei den hBMSCs des Spenders 1060, der weiblich war. Die geringe Anzahl an unterschiedlichen Spendern muss, wie im vorangegangenen Kapitel, ebenfalls bei der Betrachtung der Ergebnisse beachtet werden und sollte bei einer wiederholten Versuchsdurchführung erhöht werden.

4.2.2 Abhängigkeit der Differenzierung von der Herkunft der hBMSCs

Wie bereits im Methodenteil beschrieben, wurden die hBMSCs aus dem Knochenmark des Hüftkopfs humaner Spender isoliert. Die Stromazellen hatten somit einen osteogenen Herkunftsort. Die isolierten Zellen besitzen jedoch ein heterogenes Differenzierungspotential und entwickeln sich zu Progenitorzellen, auf die eine determinierte Differenzierungskaskade folgt [40, 47, 112]. Dabei ist die Proliferation und Differenzierung der hBMSCs weitestgehend von ihrem

Ursprungsgewebe unabhängig, kann aber durch lokale Einflüsse, wie zum Beispiel das osteogene Differenzierungsmedium in dieser Arbeit, bewusst reguliert werden [47, 113]. Eine osteogene Differenzierung kann durch weitere Einflüsse, wie die Zelldichte und die mechanische Beanspruchung der Zellkultur, induziert werden [31, 40, 57, 114]. Auch wenn die isolierten hBMSCs noch in keine Richtung differenzierten, ist davon auszugehen, dass ein Teil der Zellen kein heterogenes Differenzierungsverhalten mehr aufwiesen und sie zu diesem Zeitpunkt schon als determinierte, osteogene Progenitorzellen vorlagen [112, 113]. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die Zellkulturen in der vorliegenden Arbeit nur mit osteogenen Markerproteinen analysiert wurden. In nachfolgenden Versuchen sollten daher zum Vergleich mesenchymale Stromazellen aus einem anderen Herkunftsgewebes zur Analyse verwendet werden.

Nach der Analyse der Zellkulturen wurde festgestellt, dass die Geometrie der Scaffolds Einfluss auf die Differenzierung der hBMSCs nehmen kann. Die Ergebnisse sind allerdings spenderabhängig und bedürfen somit auch zur besseren Begutachtung dieses Aspekts einer weiteren Verifizierung mit einer größeren Anzahl an unterschiedlichen Spendern. Des Weiteren sollte der Herkunftsort der hBMSCs variiert werden und zusätzliche, nicht osteogene Markerproteine zur Analyse in Erwägung gezogen werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Differenzierungsverhalten von humanen mesenchymalen Stromazellen aus trabekulärem Knochengewebe (hBMSC) in Abhängigkeit von der Maschenweite eines Scaffolds analysiert. Hierfür wurden hBMSCs von zwei verschiedenen Spendern (1021 und 1060) auf verschiedenen Oberflächen und in unterschiedlichen Medien über den Zeitraum von 42 Tagen hinweg kultiviert. Die hBMSCs wurden einerseits als Monolayer in Zellkulturschalen in Kontroll- und in Differenzierungsmedium kultiviert, andererseits wurden 3D PCL Scaffolds aus Melt elektro-gesponnenen Fasern (MEW-Faser Scaffolds) als Zellträger verwendet, die sich durch ihre Maschengröße unterschieden. Auf MEW-Faser Scaffolds mit 30 µm, 60 µm und 90 µm Maschenweite wurden die hBMSCs ebenfalls entweder in Kontroll- oder Differenzierungsmedium über 42 Tage kultiviert. In regelmäßigen Zeitabständen von jeweils 7 Tagen wurden Proben isoliert, die die DNA sowie die Proteine der Zellen beinhalteten. Die Proteine wurden extrahiert und mittels SDS-PAGE der Größe ihres Molekulargewichts aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Hierzu wurden die osteogenen Markerproteine Alkalische Phosphatase, Bone Sialoprotein, Kollagen Typ I und Osteopontin, die ein Indiz auf eine osteogene Differenzierung bieten, herangezogen. Als Haushaltsprotein zur Normierung der Ergebnisse wurde β -Tubulin verwendet.

Betrachtet man die Ergebnisse der Expression der Markerproteine, so kann darauf geschlossen werden, dass die Maschengrößen der Scaffolds Einfluss auf die Differenzierung nahmen. Die hBMSC 1021 zeigten eine gesteigerte Expression von ALPL, BSP, Col I und SPP1 bei den Scaffolds mit Kontrollmedium. Bei ALPL und BSP zeigten sich nach Kultivierung auf Scaffolds mit 60 µm und vor allem bei 90 µm Maschenweite erhöhte Expressionen, bei Col I vor allem bei den 60 µm Scaffolds und bei SPP1 bei allen Maschengrößen. Die hBMSC 1060 zeigten hingegen keine bis geringe Steigerung der relativen Expression von osteogenen Markerproteinen. Nur bei SPP1 war die Expression, nach Analyse des Western Blots, relativ gleichermaßen gesteigert wie bei den hBMSC1021. Im Vergleich zu den auf

Monolayern und mit Kontrollmedium kultivierten hBMSCs war ein Anstieg der relativen Expression ebenfalls zu erkennen.

Durch eine größere Anzahl an Spendern verschiedenen Alters und Geschlechts ließen sich individuelle Unterschiede zwischen den Spendern besser feststellen und die erhobenen Daten verifizieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Martin, T.J., *Drug and hormone effects on calcium release from bone*. Pharmacol Ther, 1983. **21**(2): p. 209-228.
2. Tella, S.H. and J.C. Gallagher, *Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. **142**: p. 155-170.
3. Charles, J.F. and A.O. Aliprantis, *Osteoclasts: more than 'bone eaters'*. Trends Mol Med, 2014. **20**(8): p. 449-459.
4. Martin I. , S.D., Dozin B., *Madame Curie Bioscience Database*. Landes Bioscience , Austin, TX, 2005, 2005: p. 165.
5. Briganti, A., et al., *Predicting the risk of bone metastasis in prostate cancer*. Cancer Treat Rev, 2014. **40**(1): p. 3-11.
6. Erdogan, B. and I. Cicin, *Medical treatment of breast cancer bone metastasis: from bisphosphonates to targeted drugs*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(4): p. 1503-1510.
7. Hess, K.R., et al., *Metastatic patterns in adenocarcinoma*. Cancer, 2006. **106**(7): p. 1624-1633.
8. Porras, A.G., S.D. Holland and B.J. Gertz, *Pharmacokinetics of alendronate*. Clin Pharmacokinet, 1999. **36**(5): p. 315-328.
9. Rodan, G.A. and T.J. Martin, *Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis*. Calcif Tissue Int, 1981. **33**(4): p. 349-351.
10. Madras, N., et al., *Modeling stem cell development by retrospective analysis of gene expression profiles in single progenitor-derived colonies*. Stem Cells, 2002. **20**(3): p. 230-240.
11. Kuhn, K., *Structural and functional domains of collagen: a comparison of the protein with its gene*. Coll Relat Res, 1984. **4**(4): p. 309-322.
12. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. Vol. 3. 2009: Georg Thieme Verlag. 637.
13. Sims, N.A. and T.J. Martin, *Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit*. Bonekey Rep, 2014. **3**: p. 481.
14. Kular, J., et al., *An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level*. Clin Biochem, 2012. **45**(12): p. 863-873.

15. Silience, D.O., A. Senn and D.M. Danks, *Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta*. J Med Genet, 1979. **16**(2): p. 101-116.
16. Bellido, T., et al., *Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor*. J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2886-2895.
17. Schrode, N., et al., *Anatomy of a blastocyst: cell behaviors driving cell fate choice and morphogenesis in the early mouse embryo*. Genesis, 2013. **51**(4): p. 219-233.
18. Haynesworth, S.E., M.A. Baber and A.I. Caplan, *Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies*. Bone, 1992. **13**(1): p. 69-80.
19. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science, 1997. **276**(5309): p. 71-74.
20. Simmons, P.J. and B. Torok-Storb, *Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1*. Blood, 1991. **78**(1): p. 55-62.
21. Reyes M. , L.T., Lenvik T. , Aguiar D. , Koodie L. , Verfaillie C.M., *Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells*. Blood, 2001. **113**(10): p. 2370.
22. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. Tissue Eng, 2001. **7**(2): p. 211-228.
23. Gronthos, S., et al., *Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells*. J Cell Physiol, 2001. **189**(1): p. 54-63.
24. De Bari, C., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(8): p. 1928-1942.
25. Hawke, T.J. and D.J. Garry, *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology*. J Appl Physiol (1985), 2001. **91**(2): p. 534-551.
26. Seale, P., A. Asakura and M.A. Rudnicki, *The potential of muscle stem cells*. Dev Cell, 2001. **1**(3): p. 333-342.
27. Sarugaser, R., et al., *Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors*. Stem Cells, 2005. **23**(2): p. 220-229.
28. Erices, A., P. Conget and J.J. Minguell, *Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood*. Br J Haematol, 2000. **109**(1): p. 235-242.

29. Baksh, D., L. Song and R.S. Tuan, *Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy*. J Cell Mol Med, 2004. **8**(3): p. 301-316.
30. Bruder, S.P., N. Jaiswal and S.E. Haynesworth, *Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation*. J Cell Biochem, 1997. **64**(2): p. 278-294.
31. Bruder, S.P., et al., *Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1998. **16**(2): p. 155-162.
32. Kadiyala, S., et al., *Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro*. Cell Transplant, 1997. **6**(2): p. 125-134.
33. Young, R.G., et al., *Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair*. J Orthop Res, 1998. **16**(4): p. 406-413.
34. Awad, H.A., et al., *Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon*. Tissue Eng, 1999. **5**(3): p. 267-277.
35. Ferrari, G., et al., *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. Science, 1998. **279**(5356): p. 1528-1530.
36. Galmiche, M.C., et al., *Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway*. Blood, 1993. **82**(1): p. 66-76.
37. Dennis, J.E., et al., *A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse*. J Bone Miner Res, 1999. **14**(5): p. 700-709.
38. Colter, D.C., et al., *Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3213-3218.
39. Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, II and K.V. Petrakova, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. J Embryol Exp Morphol, 1966. **16**(3): p. 381-390.
40. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-650.
41. Horwitz, E.M., et al., *Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2005. **7**(5): p. 393-395.
42. Friedenstein, A.J., *Osteogenetic activity of transplanted transitional epithelium*. Acta Anat (Basel), 1961. **45**: p. 31-59.

43. Bianco, P., et al., *Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications*. Stem Cells, 2001. **19**(3): p. 180-192.
44. Castro-Malaspina, H., et al., *Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny*. Blood, 1980. **56**(2): p. 289-301.
45. Haynesworth, S.E., et al., *Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow*. Bone, 1992. **13**(1): p. 81-88.
46. Noth, U., et al., *In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells*. Tissue Eng, 2002. **8**(1): p. 131-144.
47. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-147.
48. Muraglia, A., R. Cancedda and R. Quarto, *Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 7)**: p. 1161-1166.
49. Song, L. and R.S. Tuan, *Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow*. Faseb j, 2004. **18**(9): p. 980-982.
50. Doi, M., A. Nagano and Y. Nakamura, *Molecular cloning and characterization of a novel gene, EMILIN-5, and its possible involvement in skeletal development*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(4): p. 888-893.
51. Qi, H., et al., *Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3305-3310.
52. Komori, T., *Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 189-195.
53. Harada, S. and G.A. Rodan, *Control of osteoblast function and regulation of bone mass*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 349-355.
54. Friedenstein, A.J., et al., *Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges*. Exp Hematol, 1982. **10**(2): p. 217-227.
55. Stein, G.S., et al., *Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation*. Physiol Rev, 1996. **76**(2): p. 593-629.

56. Aubin, J.E., *Advances in the osteoblast lineage*. Biochem Cell Biol, 1998. **76**(6): p. 899-910.
57. Malaval, L., et al., *Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro*. J Cell Biochem, 1999. **74**(4): p. 616-627.
58. Aubin, J.E., *Molecular fingerprinting of osteoblast differentiation: from primitive osteoprogenitor to mature osteoblast*, Tokyo: International Bone and Calcium Institute Incorporation. KronenbergHM, eds. The Molecular and Cell Biology of Bone, 1996: p. 54-59.
59. Majors, A.K., et al., *Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation*. J Orthop Res, 1997. **15**(4): p. 546-557.
60. Bianco, P., et al., *Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition*. J Histochem Cytochem, 1993. **41**(2): p. 183-191.
61. Richards, M., et al., *Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction*. J Orthop Res, 1999. **17**(6): p. 900-908.
62. Petite, H., et al., *Tissue-engineered bone regeneration*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(9): p. 959-963.
63. Johnstone, B. and J.U. Yoo, *Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair*. Clin Orthop Relat Res, 1999(367 Suppl): p. S156-162.
64. Horwitz, E.M., et al., *Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(13): p. 8932-8937.
65. Raghunath, M., et al., *Genetic counselling on brittle grounds: recurring osteogenesis imperfecta due to parental mosaicism for a dominant mutation*. Eur J Pediatr, 1995. **154**(2): p. 123-129.
66. Koc, O.N., et al., *Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy*. J Clin Oncol, 2000. **18**(2): p. 307-316.
67. Chen, F., et al., *Additive Manufacturing of a Photo-Cross-Linkable Polymer via Direct Melt Electrospinning Writing for Producing High Strength Structures*. Biomacromolecules, 2016. **17**(1): p. 208-214.

68. Muerza-Cascante, M.L., et al., *Melt electrospinning and its technologization in tissue engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2015. **21**(2): p. 187-202.
69. Hutmacher, D.W. and S. Cool, *Concepts of scaffold-based tissue engineering—the rationale to use solid free-form fabrication techniques*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2007. **11**(4): p. 654-669.
70. Jazayeri, H.E., et al., *A current overview of materials and strategies for potential use in maxillofacial tissue regeneration*. Materials Science and Engineering: C, 2017. **70**, Part **1**: p. 913-929.
71. Hochleitner, G., et al., *Additive manufacturing of scaffolds with sub-micron filaments via melt electrospinning writing*. Biofabrication, 2015. **7**(3): p. 035002.
72. Brown, T.D., et al., *Melt electrospinning of poly(epsilon-caprolactone) scaffolds: phenomenological observations associated with collection and direct writing*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014. **45**: p. 698-708.
73. Brown, T.D., P.D. Dalton and D.W. Hutmacher, *Direct writing by way of melt electrospinning*. Adv Mater, 2011. **23**(47): p. 5651-5657.
74. Brown, T.D., et al., *Design and Fabrication of Tubular Scaffolds via Direct Writing in a Melt Electrospinning Mode*. Biointerphases, 2012. **7**(1): p. 13.
75. Hutmacher, D.W. and P.D. Dalton, *Melt electrospinning*. Chem Asian J, 2011. **6**(1): p. 44-56.
76. Pham, Q.P., U. Sharma and A.G. Mikos, *Electrospun poly(epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration*. Biomacromolecules, 2006. **7**(10): p. 2796-2805.
77. Kim, S.J., et al., *Fabrication and characterization of 3-dimensional PLGA nanofiber/microfiber composite scaffolds*. Polymer, 2010. **51**(6): p. 1320-1327.
78. Schueren, F. and S. Thoms, *Functional Translational Readthrough: A Systems Biology Perspective*. PLoS Genet, 2016. **12**(8): p. e1006196.
79. Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4354.
80. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.

81. Thomas, J.O. and R.D. Kornberg, *An octamer of histones in chromatin and free in solution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(7): p. 2626-2630.
82. Kyhse-Andersen, J., *Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose*. J Biochem Biophys Methods, 1984. **10**(3-4): p. 203-209.
83. Karlsson, J.O., et al., *A method for protein assay in Laemmli buffer*. Anal Biochem, 1994. **219**(1): p. 144-146.
84. Pear, W.S., et al., *Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8392-8396.
85. Alegria-Schaffer, A., *Western blotting using chemiluminescent substrates*. Methods Enzymol, 2014. **541**: p. 251-259.
86. Kaufmann, S.H. and J.H. Shaper, *Erasure of western blots after autoradiography or chemiluminescent detection*. Appl Biochem Biotechnol, 1993. **38**(3): p. 243-255.
87. Billiau, A., et al., *Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63*. Antimicrob Agents Chemother, 1977. **12**(1): p. 11-15.
88. Yee, A., et al., *Biochemical characterization of the human cyclin-dependent protein kinase activating kinase. Identification of p35 as a novel regulatory subunit*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 471-477.
89. Sullivan, K.F., *Structure and utilization of tubulin isotypes*. Annual review of cell biology, 1988. **4**: p. 687-716.
90. MacRae, T.H. and C.M. Langdon, *Tubulin synthesis, structure, and function: what are the relationships?* Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire, 1989. **67**(11-12): p. 770-790.
91. Garcia, A.F., et al., *Effects of GPI-anchored TNAP on the dynamic structure of model membranes*. Phys Chem Chem Phys, 2015. **17**(39): p. 26295-26301.
92. Nebe, J.B., et al., *Osteoblast response to biomimetically altered titanium surfaces*. Acta Biomater, 2008. **4**(6): p. 1985-1995.
93. Krugelis, E.J., *Intracellular alkaline phosphatase activity*. Genetics, 1946. **31**: p. 221.
94. Holtz, K.M. and E.R. Kantrowitz, *The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis*. FEBS Lett, 1999. **462**(1-2): p. 7-11.

95. Pollmann, D., et al., *The amino-terminal propeptide (PINP) of type I collagen is a clinically valid indicator of bone turnover and extent of metastatic spread in osseous metastatic breast cancer*. *Anticancer Res*, 2007. **27**(4a): p. 1853-1862.
96. Bryers, J.D., C.M. Giachelli and B.D. Ratner, *Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts*. *Biotechnol Bioeng*, 2012. **109**(8): p. 1898-1911.
97. Galperin, A., et al., *Integrated bi-layered scaffold for osteochondral tissue engineering*. *Adv Healthc Mater*, 2013. **2**(6): p. 872-883.
98. Murphy, W.L., T.C. McDevitt and A.J. Engler, *Materials as stem cell regulators*. *Nat Mater*, 2014. **13**(6): p. 547-557.
99. Holtz, K.M., B. Stec and E.R. Kantrowitz, *A model of the transition state in the alkaline phosphatase reaction*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(13): p. 8351-8354.
100. Addison, W.N., et al., *Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(21): p. 15872-15883.
101. Harmey, D., et al., *Elevated skeletal osteopontin levels contribute to the hypophosphatasia phenotype in Akp2(-/-) mice*. *J Bone Miner Res*, 2006. **21**(9): p. 1377-1386.
102. Kobayashi, D., et al., *Time-dependent expression of bone sialoprotein fragments in osteogenesis induced by bone morphogenetic protein*. *J Biochem*, 1996. **119**(3): p. 475-481.
103. Rifas, L., et al., *Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human osteoblast-like cells: differentiation is associated with repression of metalloproteinase biosynthesis*. *Endocrinology*, 1994. **134**(1): p. 213-221.
104. Friedl, G., et al., *Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain: transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2007. **15**(11): p. 1293-1300.
105. Barlet, J.P., et al., *[Animal models of post-menopausal osteoporosis]*. *Reprod Nutr Dev*, 1994. **34**(3): p. 221-236.
106. Muschler, G.F., et al., *Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors*. *J Orthop Res*, 2001. **19**(1): p. 117-125.

107. Tan, J., et al., *Decreased osteogenesis of adult mesenchymal stem cells by reactive oxygen species under cyclic stretch: a possible mechanism of age related osteoporosis*. Bone Research, 2015. **3**: p. 15003.
108. Tsuji, T., et al., *Effects of donor age on osteogenic cells of rat bone marrow in vitro*. Mech Ageing Dev, 1990. **51**(2): p. 121-132.
109. Bergman, R.J., et al., *Age-related changes in osteogenic stem cells in mice*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(5): p. 568-577.
110. Bertram, H., H. Mayer and H. Schliephake, *Effect of donor characteristics, technique of harvesting and in vitro processing on culturing of human marrow stroma cells for tissue engineered growth of bone*. Clin Oral Implants Res, 2005. **16**(5): p. 524-531.
111. Colter, D.C., I. Sekiya and D.J. Prockop, *Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7841-7845.
112. Johnstone, B., et al., *In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells*. Exp Cell Res, 1998. **238**(1): p. 265-272.
113. Bianchi, G., et al., *Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells*. Wound Repair Regen, 2001. **9**(6): p. 460-466.
114. Basso, N., P. Mirkopoulos and J.N. Heersche, *Osteoprogenitor viability in cell populations isolated from rat femora is not affected by 24 h storage at 4 degrees C*. Cryobiology, 2005. **50**(2): p. 211-215.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1: Differenzierung und Proliferation von hMSCs	3
Abbildung 1.2: Differenzierung hMSCs in vivo	5
Abbildung 1.3: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten in vitro	7
Abbildung 1.4: Melt electrospinning writing	9
Abbildung 1.5: Durch die MEW Methode hergestelltes Scaffold	10
Abbildung 3.1: Western Blot Analyse zum Nachweis von Tubulin in einem MG63 Totalzelllysate	36
Abbildung 3.2: Western Blot Analyse zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase in der Positivkontrolle, Negativkontrolle und einem MG63 Totalzelllysate	37
Abbildung 3.3: Western Blot Analyse zum Nachweis von Bone Sialoprotein in der Positivkontrolle, Negativkontrolle und einem MG63 Totalzelllysate	38
Abbildung 3.4: Western Blot Analyse zum Nachweis von Kollagen Typ I in der Positivkontrolle, Negativkontrolle und einem MG63 Totalzelllysate.....	39
Abbildung 3.5: Western Blot Analyse zum Nachweis von Osteopontin in der Positivkontrolle, Negativkontrolle und einem MG63 Totalzelllysate.....	41
Abbildung 3.6: Western Blot Analyse zum Nachweis von Tubulin in hBMSCs (hBMSC 1060).....	43
Abbildung 3.7: Western Blot Analyse zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase in hBMSCs (hBMSC 1060).....	44
Abbildung 3.8: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase in hBMSCs (hBMSC 1060).....	45

Abbildung 3.9: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase in hBMSCs (hBMSC 1021).....	47
Abbildung 3.10: Western Blot Analyse zum Nachweis von Bone Sialoprotein in hBMSCs (hBMSC 1060).	49
Abbildung 3.11: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Bone Sialoprotein in hBMSCs (hBMSC 1060)	50
Abbildung 3.12: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Bone Sialoprotein in hBMSCs (hBMSC 1021)	52
Abbildung 3.13: Western Blot Analyse zum Nachweis von Kollagen Typ I in hBMSCs (hBMSC 1060).....	54
Abbildung 3.14: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Kollagen Typ I in hBMSCs (hBMSC 1060).....	55
Abbildung 3.15: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Kollagen Typ I in hBMSCs (hBMSC 1021).....	57
Abbildung 3.16: Western Blot Analyse zum Nachweis von Osteopontin in hBMSCs (hBMSC 1060).....	59
Abbildung 3.17: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Osteopontin in hBMSCs (hBMSC 1060)	60
Abbildung 3.18: Quantitative Auswertung der Western Blot Analyse zum Nachweis von Osteopontin in hBMSCs (hBMSC 1021)	63
Abbildung 9.1: Western Blot Analyse zum Nachweis von Tubulin in hBMSCs (hBMSC 1021).....	94
Abbildung 9.2: Western Blot Analyse zum Nachweis von Tubulin in hBMSCs (hBMSC 1060).....	95
Abbildung 9.3: Western Blot Analyse zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase in hBMSCs (hBMSC 1021).	96
Abbildung 9.4: Western Blot Analyse zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase in hBMSCs (hBMSC 1060).	97

Abbildung 9.5: Western Blot Analyse zum Nachweis von Bone Sialoprotein in hBMSCs (hBMSC 1021).	98
Abbildung 9.6: Western Blot Analyse zum Nachweis von Bone Sialoprotein in hBMSCs (hBMSC 1060).	99
Abbildung 9.7: Western Blot Analyse zum Nachweis von Kollagen Typ I in hBMSCs (hBMSC 1021).	100
Abbildung 9.8: Western Blot Analyse zum Nachweis von Kollagen Typ I in hBMSCs (hBMSC 1060).	101
Abbildung 9.9: Western Blot Analyse zum Nachweis von Osteopontin in hBMSCs (hBMSC 1021).	102
Abbildung 9.10: Western Blot Analyse zum Nachweis von Osteopontin in hBMSCs (hBMSC 1060).	103

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Liste mit den für die Versuche benötigten Verbrauchsmaterialien und deren Lieferanten.....	13
Tabelle 2.2: Liste mit den für die Versuche verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie deren Lieferanten	14
Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Geräte und deren Lieferanten.....	16
Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen	18
Tabelle 2.5: Liste der zur Zellkultur verwendeten Medien und Medienzusätze sowie deren Lieferanten	19
Tabelle 2.6: Liste der verwendeten Positivkontrollen für die Antikörper ALPL, BSP, Col I, SPP1 und die Negativkontrolle sowie deren Lieferanten	21
Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Primärantikörper, ihrer Antigene, Lieferanten und das Molekulargewicht des jeweiligen Antikörpers.	22
Tabelle 2.8: Liste der verwendeten Sekundärantikörper und deren Lieferanten	22
Tabelle 2.9: Liste der verwendeten Softwareprogramme und deren Entwickler	23
Tabelle 2.10: Trenn- und Sammelgelzusammensetzung.....	29
Tabelle 2.11: Aufbau des Blotstapels für den Western Blot	30
Tabelle 9.1: Ergebnisse Tub hBMSC 1021	104
Tabelle 9.2: Ergebnisse ALPL hBMSC 1021	105
Tabelle 9.3: Ergebnisse BSP hBMSC 1021	106
Tabelle 9.4: Ergebnisse Col I hBMSC 1021	107
Tabelle 9.5: Ergebnisse SPP1 hBMSC 1021	108
Tabelle 9.6: Ergebnisse Tub hBMSC 1060	109

Tabelle 9.7:	Ergebnisse ALPL hBMSK 1060.....	110
Tabelle 9.8:	Ergebnisse BSP hBMSK 1060	111
Tabelle 9.9:	Ergebnisse Col I hBMSK 1060	112
Tabelle 9.10:	Ergebnisse SPP1 hBMSK 1060.....	113

9 Anhang

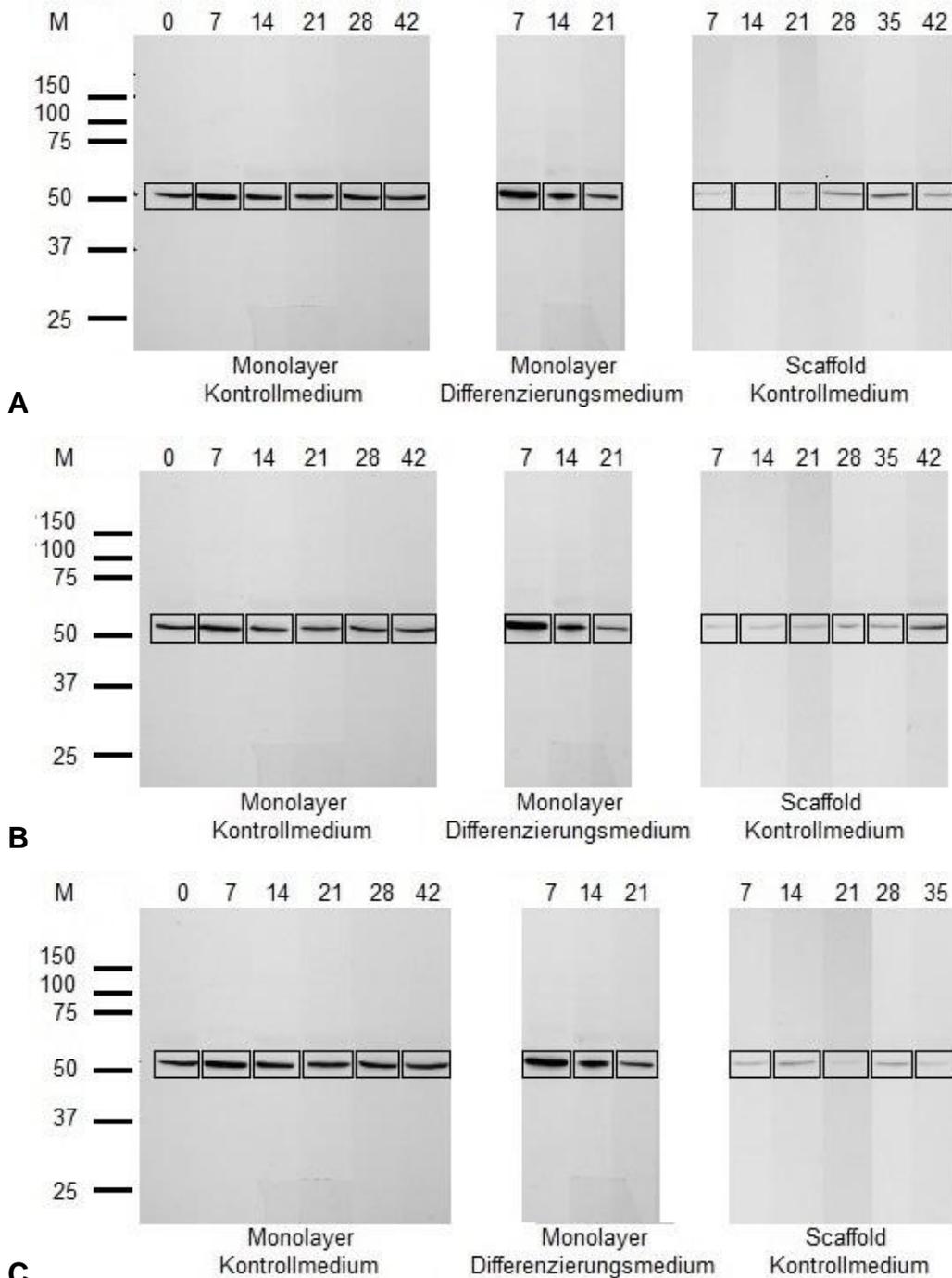


Abbildung 9.1: Western Blot Analyse zum Nachweis von Tubulin in hBMSCs (hBMSC 1021).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links), als Monolayer in osteogenem Differenzierungsmedium (Mitte) sowie auf MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 30 μm (A), 60 μm (B) und 90 μm (C) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 21 Tage. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

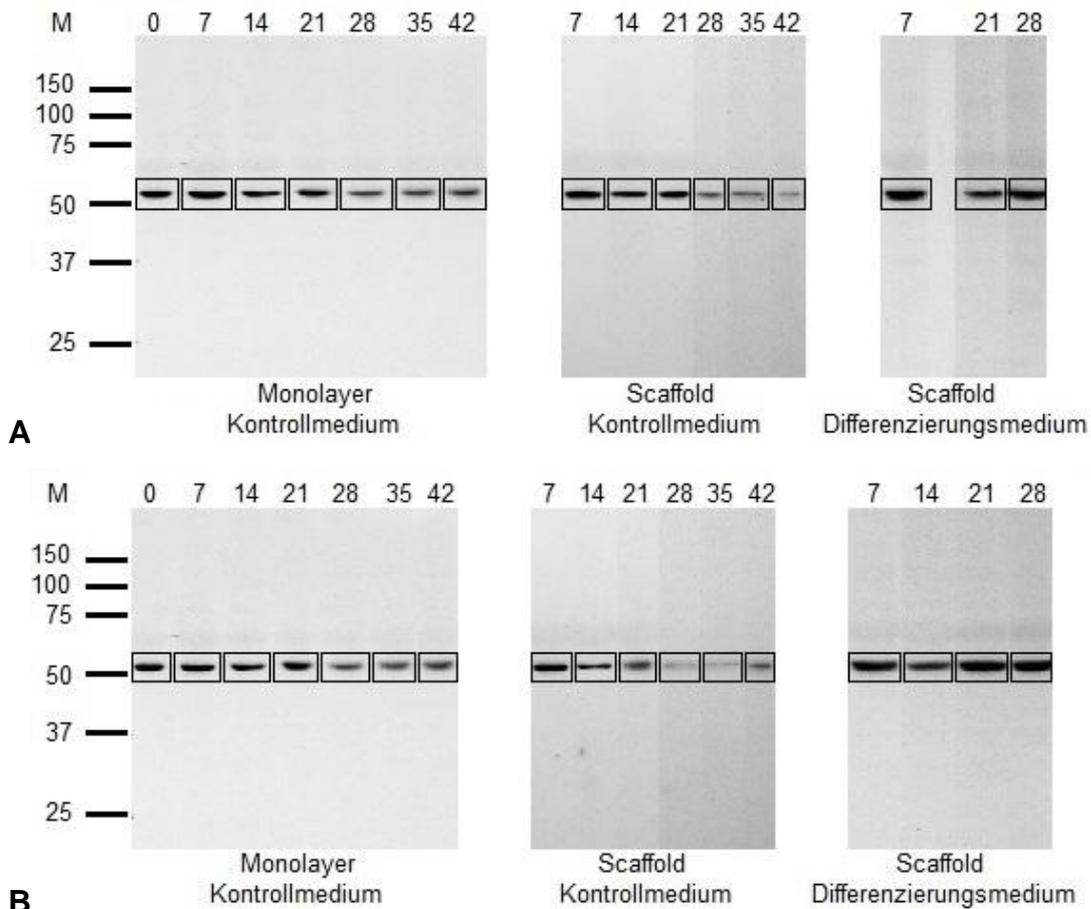


Abbildung 9.2: Western Blot Analyse zum Nachweis von Tubulin in hBMSCs (hBMSC 1060).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links) sowie auf PCL MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 30 µm (A) bzw. 90µm (B) in Kontrollmedium (Mitte) bzw. in osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 28 Tage. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

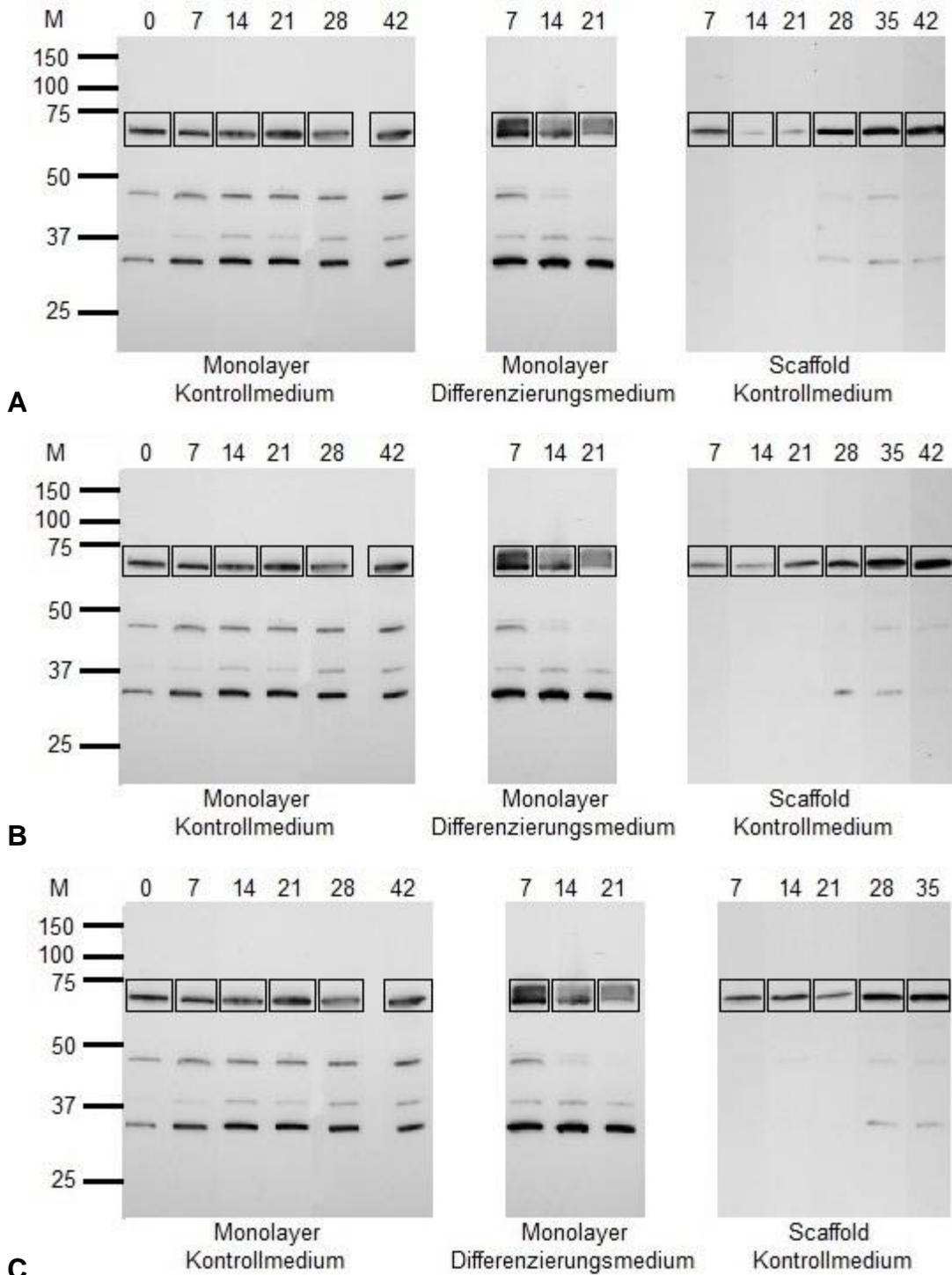


Abbildung 9.3: Western Blot Analyse zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase in hBMSCs (hBMSC 1021).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links), als Monolayer in osteogenem Differenzierungsmedium (Mitte) sowie auf MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 30 μm (A), 60 μm (B) und 90 μm (C) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 21 Tage. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

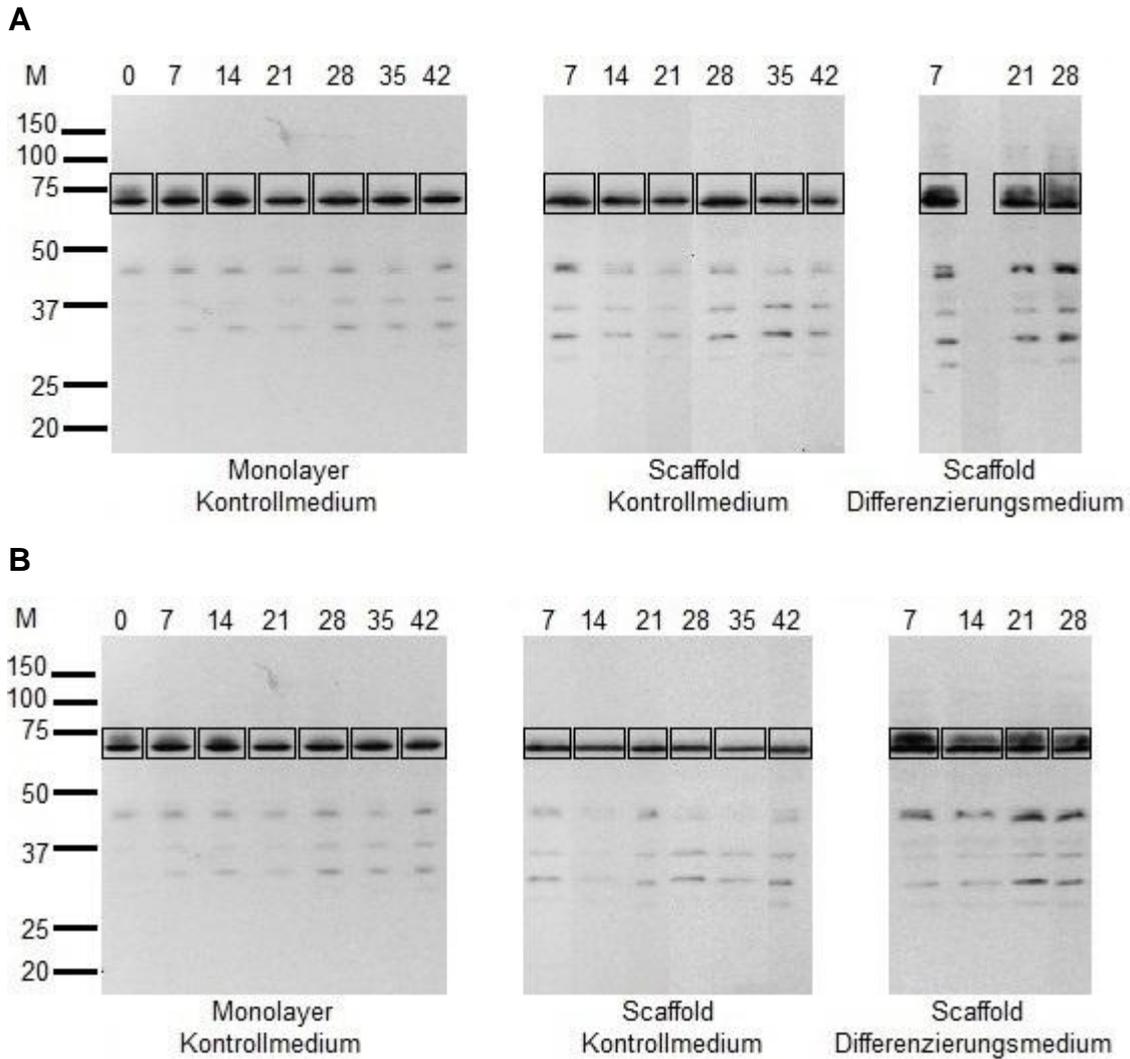


Abbildung 9.4: Western Blot Analyse zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase in hBMSCs (hBMSC 1060).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links) sowie auf PCL MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 30 μm (A) bzw. 90 μm (B) in Kontrollmedium (Mitte) bzw. in osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 28 Tage. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

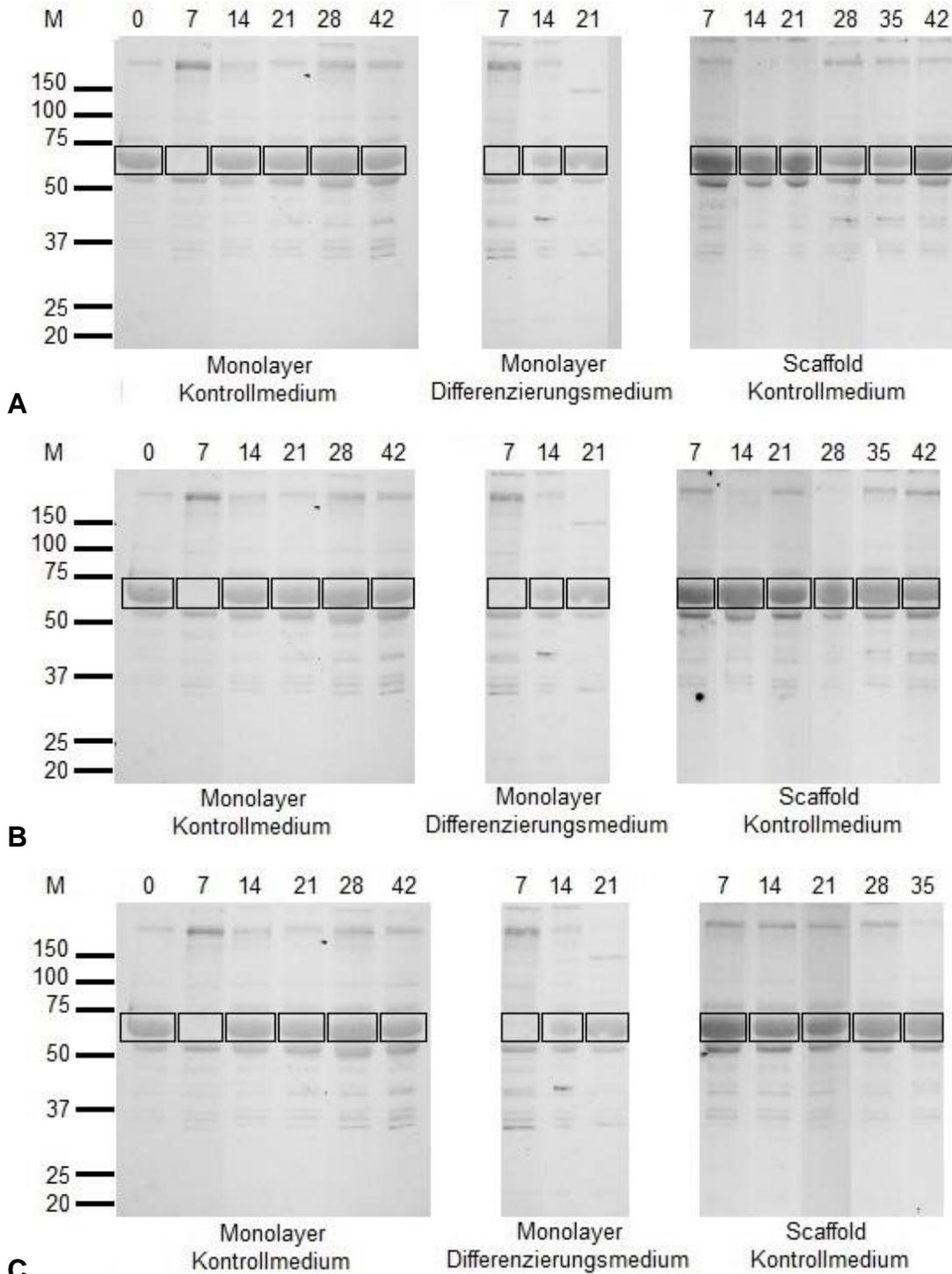


Abbildung 9.5: Western Blot Analyse zum Nachweis von Bone Sialoprotein in hBMSCs (hBMSC 1021).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links), als Monolayer in osteogenem Differenzierungsmedium (Mitte) sowie auf MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 30 μm (A), 60 μm (B) und 90 μm (C) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 21 Tage. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

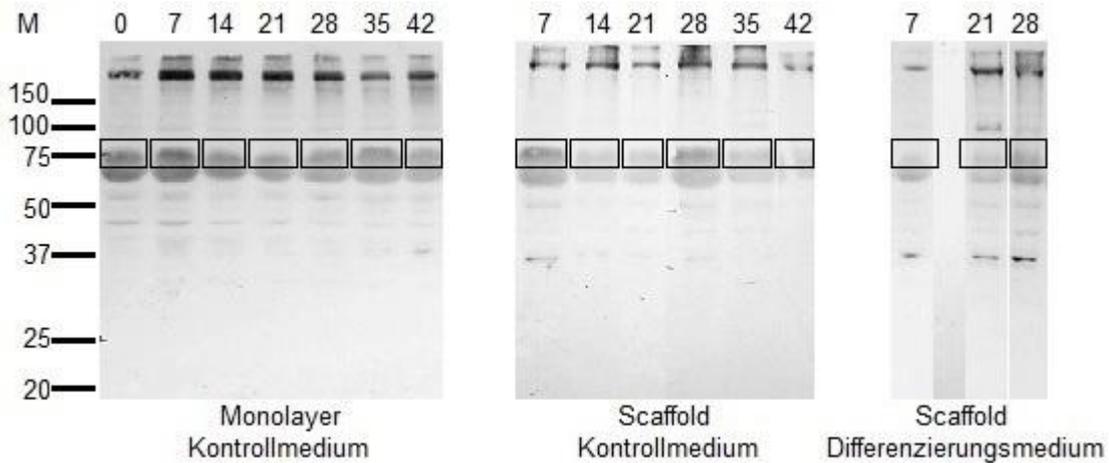
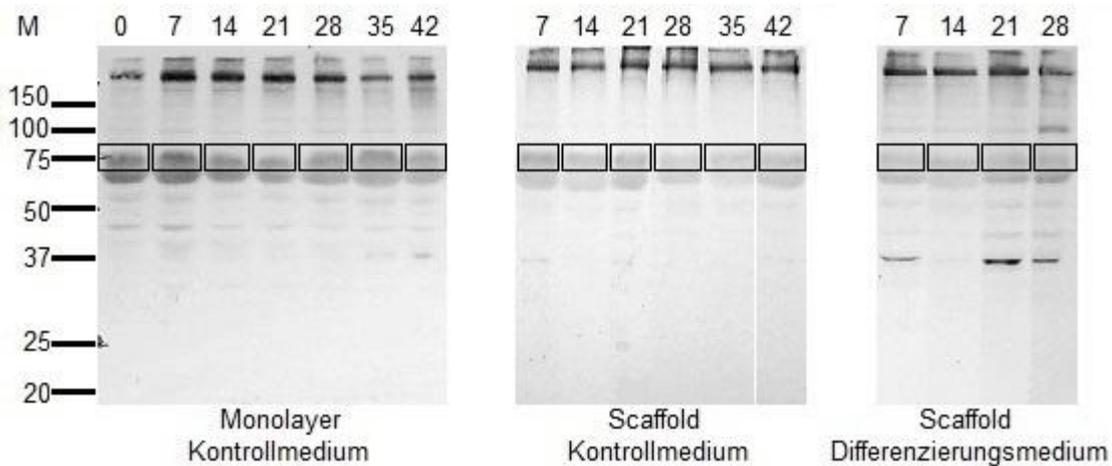
A**B**

Abbildung 9.6: Western Blot Analyse zum Nachweis von Bone Sialoprotein in hBMSCs (hBMSC 1060).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links) sowie auf PCL MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 30 μm (A) bzw. 90 μm (B) in Kontrollmedium (Mitte) bzw. in osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 28 Tage. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

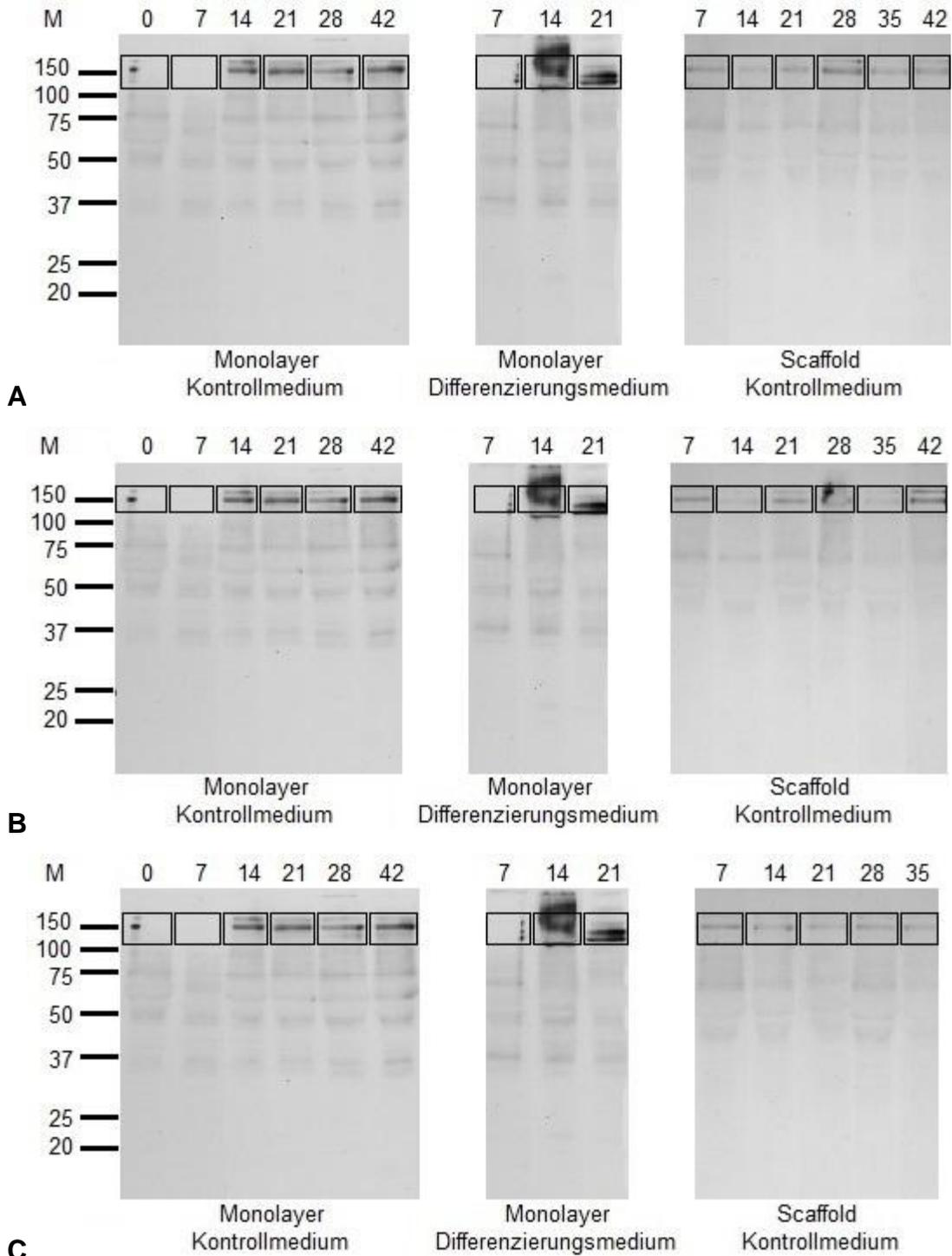


Abbildung 9.7: Western Blot Analyse zum Nachweis von Kollagen Typ I in hBMSCs (hBMSC 1021).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links), als Monolayer in osteogenem Differenzierungsmedium (Mitte) sowie auf MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 30 µm (A), 60 µm (B) und 90 µm (C) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 21 Tage. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

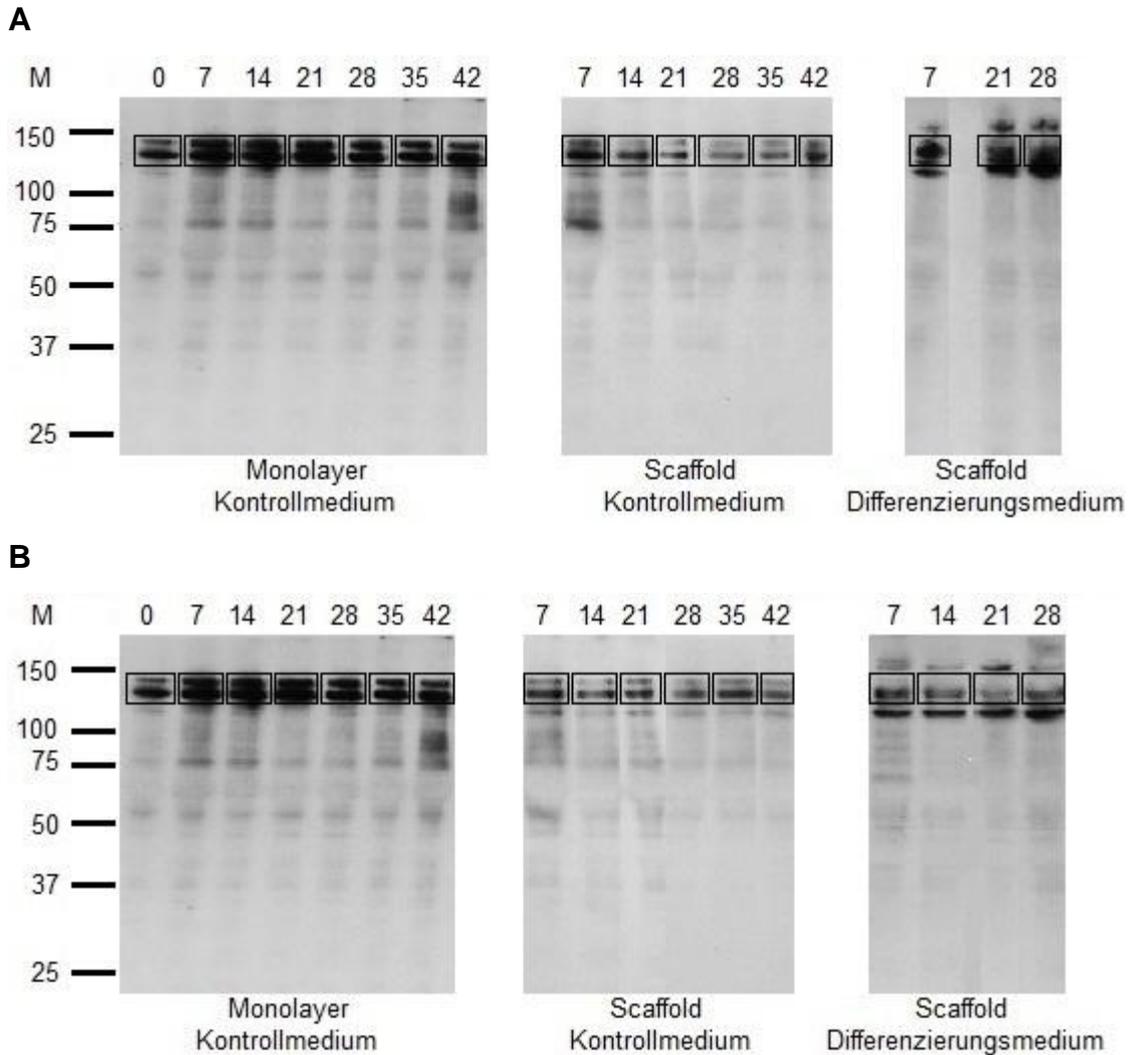


Abbildung 9.8: Western Blot Analyse zum Nachweis von Kollagen Typ I in hBMSCs (hBMSC 1060).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links) sowie auf PCL MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 30 µm (A) bzw. 90 µm (B) in Kontrollmedium (Mitte) bzw. in osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 28 Tage. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

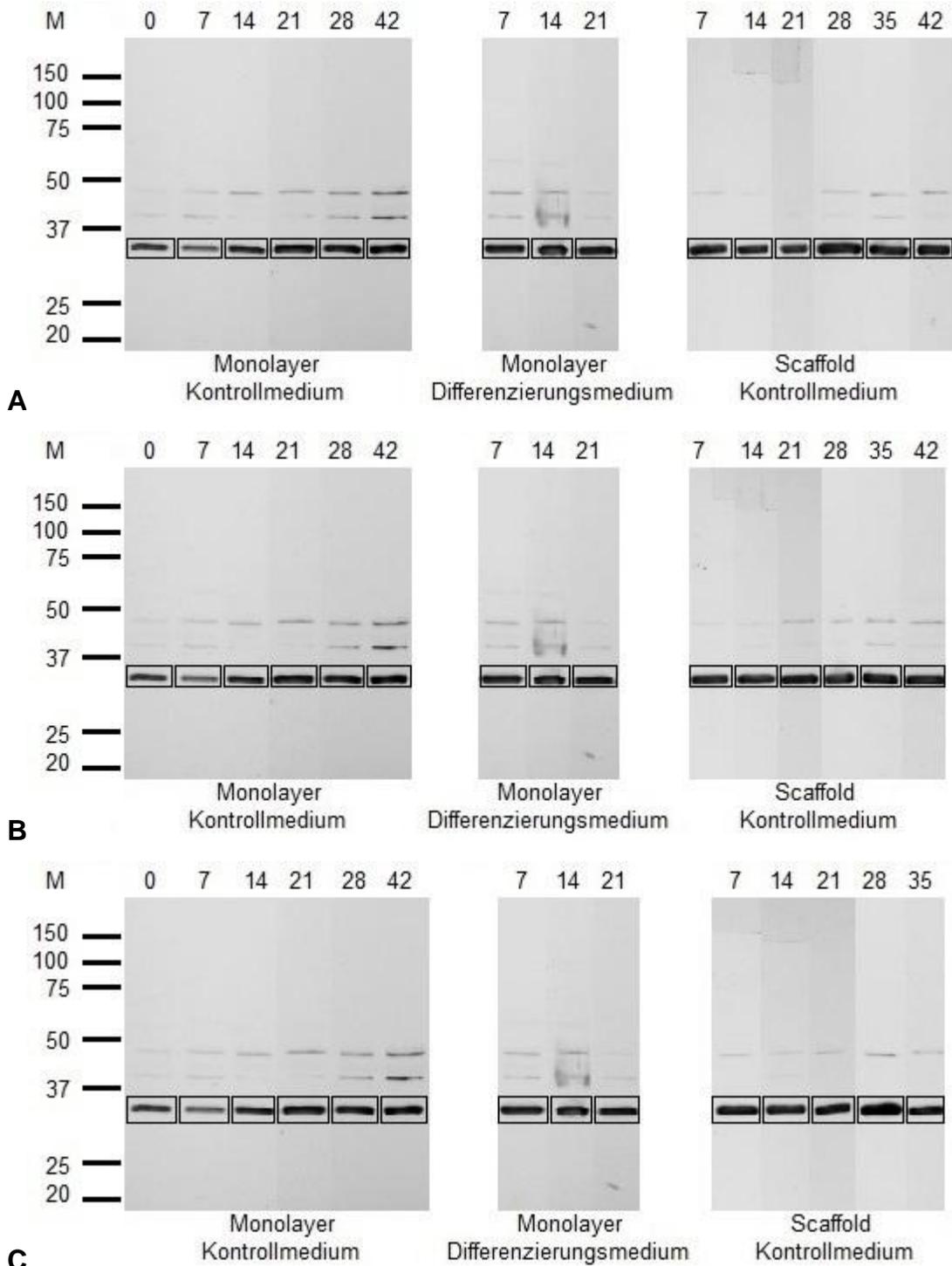


Abbildung 9.9: Western Blot Analyse zum Nachweis von Osteopontin in hBMSCs (hBMSC 1021).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links), als Monolayer in osteogenem Differenzierungsmedium (Mitte) sowie auf MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 30 μm (A), 60 μm (B) und 90 μm (C) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 21 Tage. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

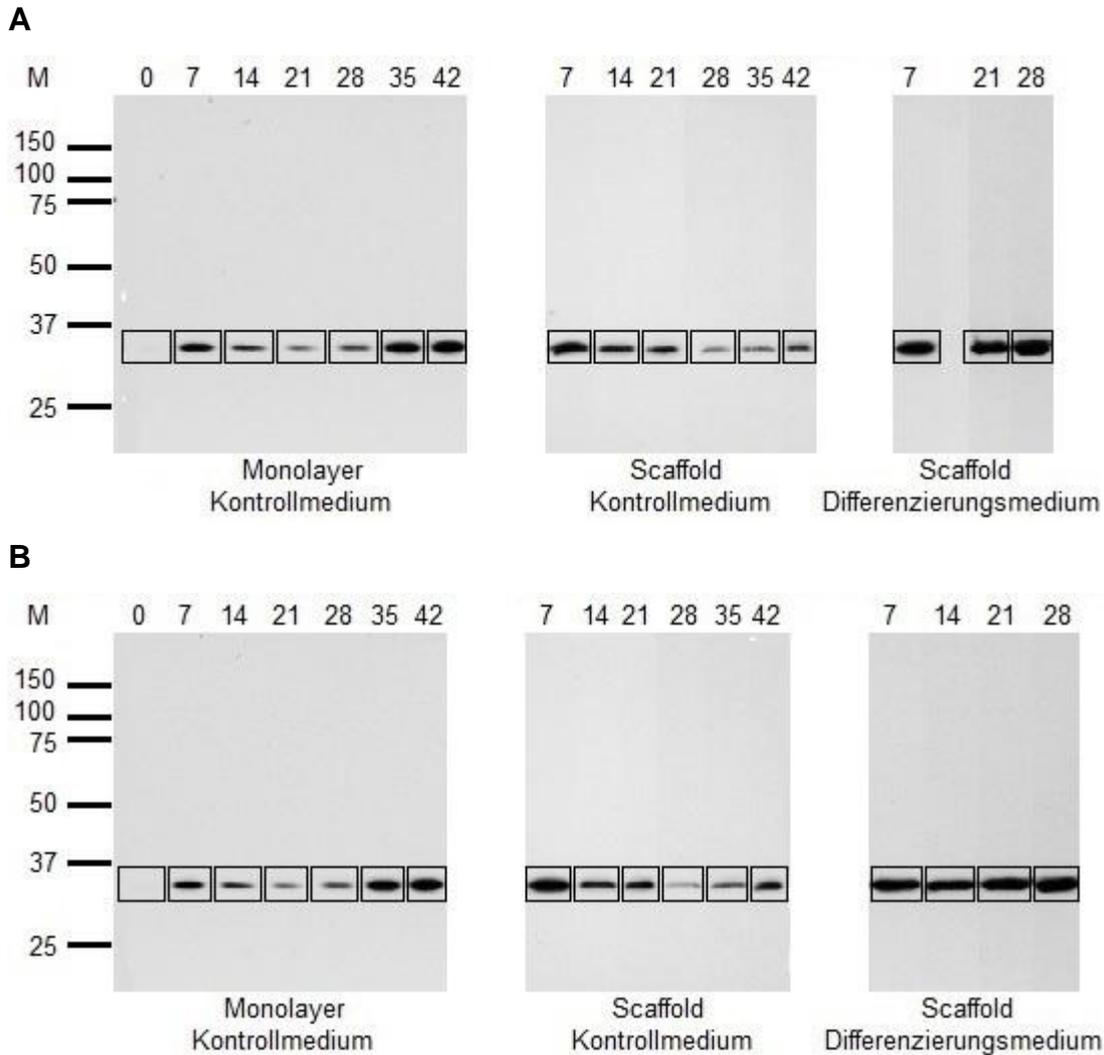


Abbildung 9.10: Western Blot Analyse zum Nachweis von Osteopontin in hBMSCs (hBMSC 1060).

Die hBMSCs wurden als Monolayer in Kontrollmedium (links) sowie auf PCL MEW-Faser Scaffolds mit einer Maschenweite von 30 μm (A) bzw. 90 μm (B) in Kontrollmedium (Mitte) bzw. in osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) kultiviert. Die Kultivierung der hBMSCs erfolgte in Kontrollmedium über einen Zeitraum von 42 Tagen und in osteogenem Differenzierungsmedium über 28 Tage. Die Molekulargewichtsskala des Proteinstandards ist in kDa angegeben. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Tage der Probengewinnung.

Tabelle 9.1: Ergebnisse Tub hBMS 1021

Probe	Größe (μm)	Kultur	relative Dichte
Tag 0		Monolayer Kontrollmedium	1,00
Tag 7		Monolayer Kontrollmedium	1,62
Tag 7		Monolayer Differenzierungsmedium	2,30
Tag 14		Monolayer Kontrollmedium	1,20
Tag 14		Monolayer Differenzierungsmedium	1,19
Tag 21		Monolayer Kontrollmedium	1,19
Tag 21		Monolayer Differenzierungsmedium	0,63
Tag 28		Monolayer Kontrollmedium	1,09
Tag 42		Monolayer Kontrollmedium	1,10
7.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,15
7.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,06
7.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,12
14.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,03
14.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,10
14.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,28
21.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,07
21.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,11
21.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,04
28.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,59
28.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,13
28.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,17
35.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,67
35.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,20
35.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,07
42.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,22
42.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,66
42.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,01

Tabelle 9.2: Ergebnisse ALPL hBMSC 1021

Probe	Größe (μm)	Kultur	relative Dichte
Tag 0		Monolayer Kontrollmedium	1,00
Tag 7		Monolayer Kontrollmedium	0,54
Tag 7		Monolayer Differenzierungsmedium	1,07
Tag 14		Monolayer Kontrollmedium	0,84
Tag 14		Monolayer Differenzierungsmedium	1,23
Tag 21		Monolayer Kontrollmedium	1,12
Tag 21		Monolayer Differenzierungsmedium	1,81
Tag 28		Monolayer Kontrollmedium	0,92
Tag 28		Monolayer Differenzierungsmedium	
Tag 35		Monolayer Kontrollmedium	
Tag 35		Monolayer Differenzierungsmedium	
Tag 42		Monolayer Kontrollmedium	1,08
Tag 42		Monolayer Differenzierungsmedium	
7.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	4,65
7.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	7,84
7.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	5,57
14.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	2,23
14.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	3,47
14.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	2,61
21.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	2,03
21.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	6,23
21.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	12,16
28.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,76
28.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	7,18
28.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	7,19
35.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,86
35.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	7,48
35.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	17,74
42.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	5,87
42.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	2,15
42.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	44,02

Tabelle 9.3: Ergebnisse BSP hBMSC 1021

Probe	Größe (μm)	Kultur	relative Dichte
Tag 0		Monolayer Kontrollmedium	1,00
Tag 7		Monolayer Kontrollmedium	0,28
Tag 7		Monolayer Differenzierungsmedium	0,36
Tag 14		Monolayer Kontrollmedium	0,80
Tag 14		Monolayer Differenzierungsmedium	0,27
Tag 21		Monolayer Kontrollmedium	0,69
Tag 21		Monolayer Differenzierungsmedium	0,40
Tag 28		Monolayer Kontrollmedium	1,04
Tag 28		Monolayer Differenzierungsmedium	
Tag 35		Monolayer Kontrollmedium	
Tag 35		Monolayer Differenzierungsmedium	
Tag 42		Monolayer Kontrollmedium	1,02
Tag 42		Monolayer Differenzierungsmedium	
7.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	15,61
7.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	26,31
7.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	15,78
14.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	23,03
14.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	13,82
14.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	4,85
21.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	10,62
21.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	9,99
21.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	30,69
28.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,33
28.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	7,02
28.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	5,37
35.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,39
35.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	6,09
35.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	11,79
42.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	5,99
42.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	1,88
42.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	78,48

Tabelle 9.4: Ergebnisse Col I hBMSC 1021

Probe	Größe (μm)	Kultur	relative Dichte
Tag 0		Monolayer Kontrollmedium	1,00
Tag 7		Monolayer Kontrollmedium	0,11
Tag 7		Monolayer Differenzierungsmedium	0,24
Tag 14		Monolayer Kontrollmedium	2,76
Tag 14		Monolayer Differenzierungsmedium	9,86
Tag 21		Monolayer Kontrollmedium	3,15
Tag 21		Monolayer Differenzierungsmedium	12,72
Tag 28		Monolayer Kontrollmedium	2,68
Tag 28		Monolayer Differenzierungsmedium	
Tag 35		Monolayer Kontrollmedium	
Tag 35		Monolayer Differenzierungsmedium	
Tag 42		Monolayer Kontrollmedium	4,15
Tag 42		Monolayer Differenzierungsmedium	
7.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	6,26
7.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	15,67
7.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	7,96
14.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	9,72
14.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	4,56
14.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	2,74
21.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	9,69
21.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	12,96
21.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	13,78
28.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	3,78
28.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	27,63
28.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	5,13
35.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,07
35.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	2,43
35.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	9,49
42.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	5,47
42.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	3,64
42.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	70,66

Tabelle 9.5: Ergebnisse SPP1 hBMSC 1021

Probe	Größe (μm)	Kultur	relative Dichte
Tag 0		Monolayer Kontrollmedium	1,00
Tag 7		Monolayer Kontrollmedium	0,46
Tag 7		Monolayer Differenzierungsmedium	0,74
Tag 14		Monolayer Kontrollmedium	1,01
Tag 14		Monolayer Differenzierungsmedium	1,17
Tag 21		Monolayer Kontrollmedium	1,38
Tag 21		Monolayer Differenzierungsmedium	2,46
Tag 28		Monolayer Kontrollmedium	1,28
Tag 28		Monolayer Differenzierungsmedium	
Tag 35		Monolayer Kontrollmedium	
Tag 35		Monolayer Differenzierungsmedium	
Tag 42		Monolayer Kontrollmedium	1,37
Tag 42		Monolayer Differenzierungsmedium	
7.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	11,79
7.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	27,45
7.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	15,31
14.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	37,55
14.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	15,41
14.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	5,84
21.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	15,60
21.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	15,20
21.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	43,17
28.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	4,01
28.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	11,14
28.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	14,60
35.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	2,82
35.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	8,61
35.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	21,45
42.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	7,18
42.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	2,90
42.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	324,45

Tabelle 9.6: Ergebnisse Tub hBMSC 1060

Probe	Größe (μm)	Kultur	relative Dichte
Tag 0		Monolayer Kontrollmedium	1,00
Tag 7		Monolayer Kontrollmedium	1,15
Tag 14		Monolayer Kontrollmedium	0,90
Tag 21		Monolayer Kontrollmedium	1,00
Tag 28		Monolayer Kontrollmedium	0,68
Tag 35		Monolayer Kontrollmedium	0,70
Tag 42		Monolayer Kontrollmedium	0,82
D 7.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	1,73
D 7.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	1,55
D 7.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	1,72
D 14.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	0,10
D 14.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	0,70
D 14.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	1,22
D 21.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	1,01
D 21.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	1,35
D 21.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	1,87
D 28.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	1,36
D 28.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	1,28
D 28.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	1,61
7.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,15
7.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	1,15
7.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	1,18
14.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,87
14.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,92
14.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,70
21.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,84
21.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	1,17
21.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,74
28.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,38
28.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,64
28.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,37
35.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,58
35.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,77
35.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,25
42.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,26
42.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,21
42.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,52

Tabelle 9.7: Ergebnisse ALPL hBMSC 1060

Probe	Größe (μm)	Kultur	relative Dichte
Tag 0		Monolayer Kontrollmedium	1,00
Tag 7		Monolayer Kontrollmedium	0,91
Tag 14		Monolayer Kontrollmedium	1,20
Tag 21		Monolayer Kontrollmedium	0,83
Tag 28		Monolayer Kontrollmedium	1,43
Tag 35		Monolayer Kontrollmedium	1,31
Tag 42		Monolayer Kontrollmedium	1,03
7.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,14
7.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,80
7.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,86
14.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,13
14.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,83
14.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	1,15
21.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,07
21.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,69
21.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	1,07
28.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	3,33
28.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	1,45
28.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	2,07
35.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,59
35.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	1,00
35.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	2,72
42.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	2,59
42.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	3,54
42.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	1,53
D 7.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	0,92
D 7.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	1,05
D 7.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	1,20
D 14.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	8,06
D 14.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	2,10
D 14.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	1,40
D 21.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	1,50
D 21.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	1,22
D 21.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	0,87
D 28.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	1,19
D 28.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	1,25
D 28.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	0,89

Tabelle 9.8: Ergebnisse BSP hBMSC 1060

Probe	Größe (μm)	Kultur	relative Dichte
Tag 0		Monolayer Kontrollmedium	1,00
Tag 7		Monolayer Kontrollmedium	1,03
Tag 14		Monolayer Kontrollmedium	0,86
Tag 21		Monolayer Kontrollmedium	0,54
Tag 28		Monolayer Kontrollmedium	1,17
Tag 35		Monolayer Kontrollmedium	1,36
Tag 42		Monolayer Kontrollmedium	0,70
7.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,07
7.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,44
7.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,74
14.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,53
14.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,64
14.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,87
21.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,60
21.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,59
21.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,88
28.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	3,03
28.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,97
28.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	1,02
35.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,88
35.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,46
35.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	1,96
42.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,31
42.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	2,89
42.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	1,09
D 7.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	0,10
D 7.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	0,18
D 7.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	0,23
D 14.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	0,90
D 14.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	1,36
D 14.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	0,30
D 21.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	0,26
D 21.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	0,60
D 21.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	0,21
D 28.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	0,36
D 28.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	0,90
D 28.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	0,22

Tabelle 9.9: Ergebnisse Col I hBMSC 1060

Probe	Größe (μm)	Kultur	relative Dichte
Tag 0		Monolayer Kontrollmedium	1,00
Tag 7		Monolayer Kontrollmedium	1,56
Tag 14		Monolayer Kontrollmedium	2,04
Tag 21		Monolayer Kontrollmedium	1,84
Tag 28		Monolayer Kontrollmedium	1,89
Tag 35		Monolayer Kontrollmedium	1,71
Tag 42		Monolayer Kontrollmedium	1,68
7.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,07
7.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,67
7.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,82
14.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,95
14.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,66
14.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,85
21.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,47
21.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,51
21.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	0,79
28.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	1,51
28.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,79
28.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	1,81
35.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	0,88
35.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	0,97
35.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	3,75
42.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	2,95
42.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	3,92
42.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	1,14
D 7.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	0,64
D 7.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	0,53
D 7.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	0,61
D 14.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	6,49
D 14.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	1,02
D 14.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	0,83
D 21.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	1,38
D 21.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	1,05
D 21.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	0,49
D 28.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	1,10
D 28.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	0,66
D 28.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	0,81

Tabelle 9.10: Ergebnisse SPP1 hBMSC 1060

Probe	Größe (μm)	Kultur	relative Dichte
Tag 0		Monolayer Kontrollmedium	1,00
Tag 7		Monolayer Kontrollmedium	38,67
Tag 14		Monolayer Kontrollmedium	26,39
Tag 21		Monolayer Kontrollmedium	12,26
Tag 28		Monolayer Kontrollmedium	30,38
Tag 35		Monolayer Kontrollmedium	93,91
Tag 42		Monolayer Kontrollmedium	97,35
7.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	55,68
7.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	59,09
7.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	76,52
14.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	50,63
14.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	51,76
14.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	64,86
21.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	43,46
21.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	40,54
21.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	63,52
28.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	28,27
28.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	25,72
28.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	29,14
35.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	24,38
35.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	25,30
35.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	90,89
42.1.1	30	Scaffold Kontrollmedium	98,57
42.2.1	60	Scaffold Kontrollmedium	168,11
42.3.1	90	Scaffold Kontrollmedium	74,91
D 7.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	45,97
D 7.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	40,63
D 7.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	57,38
D 14.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	421,93
D 14.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	111,71
D 14.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	74,78
D 21.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	87,45
D 21.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	77,36
D 21.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	53,59
D 28.1.1	30	Scaffold Differenzierungsmedium	79,12
D 28.2.1	60	Scaffold Differenzierungsmedium	83,35
D 28.3.1	90	Scaffold Differenzierungsmedium	67,94

Erteilte Copyrights

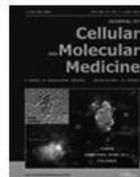
Für Abbildung 1.1: Differenzierung und Proliferation von hMSCs
und Abbildung 1.2: Differenzierung hMSCs in vivo

Thank you for your order with RightsLink / John Wiley and Sons

  Vollansicht 

Von: no-reply@copyright.com 

17.08.2017 um 18:11 Uhr 



Thank you for your order!

Dear Alexander Maier,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee: Alexander Maier
Order Date: Aug 17, 2017
Order Number: 4171430481995
Publication: Journal of Cellular and Molecular Medicine
Title: Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy
Type of Use: Dissertation/Thesis
Order Total: 0.00 EUR

View or print complete [details](#) of your order and the publisher's terms and conditions.

Für Abbildung 1.3: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten in vitro

Thank you for your order with RightsLink / John Wiley and Sons

Von: no-reply@copyright.com

17.08.2017 um 18:17 Uhr

Thank you for your order!

Dear Alexander Maier,

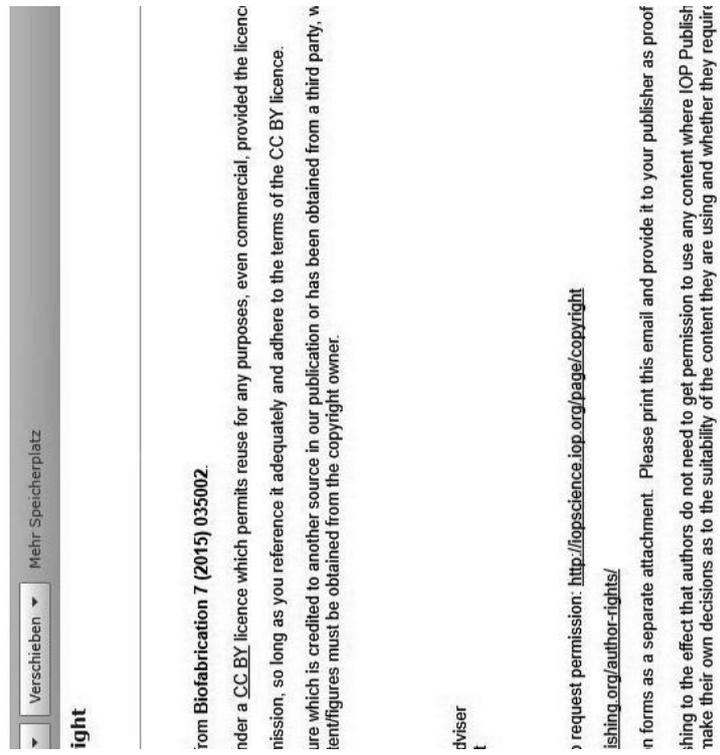
Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

Order Summary

Licensee:	Alexander Maier
Order Date:	Aug 17, 2017
Order Number:	4171430813037
Publication:	Stem Cells
Title:	Modeling Stem Cell Development by Retrospective Analysis of Gene Expression Profiles in Single Progenitor-Derived Colonies
Type of Use:	Dissertation/Thesis
Order Total:	0.00 EUR

View or print complete [details](#) of your order and the publisher's terms and conditions.

Für Abbildung 1.4: Melt electrospinning writing
und Abbildung 1.5: Durch die MEW Methode hergestelltes Scaffold



Danksagung

Herzlichen Dank...

Herrn Prof. Dr. Jürgen Groll für die freundliche Überlassung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler.

Frau Dr. Andrea Ewald für die Betreuung während der Erstellung der Arbeit.

Frau Kathrin Hahn für die Betreuung im Labor und die fachliche Unterstützung im praktischen wie auch schriftlichen Abschnitt dieser Arbeit.

Herrn Gernot Hochleitner für die Herstellung und Überlassung der PCL MEW Faser Scaffolds.

allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Funktionswerkstoffe für die fachliche Unterstützung, insbesondere Dr. Katrin Schlegelmilch, Sarah Bertlein, Isabell Biermann, Susanne Feineis, Ilona Zilkowski und Verena Schill.

der gesamten Abteilung für Molekulare Innere Medizin Würzburg unter Leitung von Prof. Dr. Harald Wajant für die kollegiale Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Röntgenfilmentwicklung.

der Fotoabteilung der Zahnklinik der Universität Würzburg für die Anfertigung der Fotoaufnahmen.

meiner Familie für die Liebe und Unterstützung, mit der ihr mich immer begleitet.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Alexander Maier
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung:

09.1995-07.1999 Kappelberg Grundschule Aalen-Hofen
09.1999-07.2008 Kopernikus Gymnasium Aalen-Wasseraffingen
Abitur 2008

Studium:

04.2009-06.2014 Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Studium
der Zahnheilkunde
Staatsexamen im Fach Zahnheilkunde 2014

Promotion:

07.2014-04.2015 Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und
der Zahnheilkunde Würzburg

Beruflicher Werdegang:

05.2015-12.2017 Vorbereitungsassistent und angestellter Zahnarzt in
der Zahnarztpraxis Dr. Wahler in Hammelburg
Seit 01.2018 angestellter Zahnarzt in der Zahnarztpraxis Dr.
Kindermann in Trailsdorf

Würzburg, den 11.07.2019

