

**Steuerung des Wachstums und
der Differenzierung von Zellen durch Kooperation
regioselektiv-derivatisierter Polysaccharide mit
Wachstumsfaktoren**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Herrn Diplom-Biologen Dieter Peschel
Geb. am 01.08.1965 in Halle

Gutachter

- 1: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Groth
- 2: Prof. Dr. rer. nat. Steffen Fischer
- 3: Prof. Dr. rer. nat. Barbara Nebe

Halle/Saale, 27.01.2012

Hilf mir, grade zu steh'n,
Hilf mir, die Wahrheit zu seh'n,
Hilf mir, mich gegen den Strom zu dreh'n,
Hilf mir, den schweren, den graden Weg zu geh'n!

Reinhard Mey aus „Hilf mir“

Meiner Familie und Herrn Prof. Groth.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	1
1.	Einleitung	4
1.1.	Rolle von Glykanen im Organismus	5
1.1.1.	Struktur und biologische Funktionen	5
1.1.2.	Funktion von Glykosaminoglykanen	7
1.2.	Struktur und Funktion von Wachstumsfaktoren	12
1.2.1.	Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (FGF-2)	12
1.2.2.	Bone Morphogenic Protein 2 (BMP-2)	15
1.3.	Einbindung von GAGs und GAG analogen Verbindungen in dreidimensionale Strukturen zur Knochenregeneration	17
1.4.	Regulierung der Aktivität von Wachstumsfaktoren durch exogen applizierte Glykosaminoglykane	18
1.5.	Regulierung der Aktivität von Wachstumsfaktoren durch exogen applizierte GAG-analoge Verbindungen	19
1.6.	Chitosan und Cellulose als Ausgangsmaterialien für GAG-Analoga	21
1.6.1.	Cellulose	21
1.6.2.	Chitosan	22
2.	Ziel der Arbeiten	24
3.	Material und Methoden	25
3.1.	Synthese derivatisierter Cellulosen	25
3.1.1.	Sulfatierung von Cellulose	25
3.1.2.	Einführung von Carboxylgruppen in Cellulose-Sulfat	26
3.1.3.	Carboxymethylierung von Cellulose-Sulfat	26
3.2.	Sulfatierung von Chitosan	27
3.3.	Charakterisierung der Reaktionsprodukte	28
3.4.	Molmassenbestimmung	29
3.5.	Untersuchung der Bindungsaffinität	30
3.6.	Bestimmung der proteolytischen Stabilität von FGF-2	31
3.6.1.	Proteolytischer Verdau	31

3.6.2.	Inhibierung von Trypsin durch Polysaccharide	31
3.7.	Zellen und Zellkultivierung	32
3.7.1.	Zellen	32
3.7.2.	Passagieren von Zellen	33
3.8.	Zelluläre Assays zur Bestimmung von Zytotoxizität, Proliferation und Differenzierung	33
3.8.1.	Toxizitätsstudien	33
3.8.2.	Bestimmung der Proliferation	34
3.8.3.	Quantifizierung der Alkalischen Phosphatase Aktivität	34
3.8.4.	Bestimmung des Gesamt Protein-Gehaltes	35
3.8.5.	Histochemische Darstellung der ALP-Aktivität	36
3.8.6.	Quantifizierung der Mineralisierung	36
3.8.7.	Histochemische Charakterisierung der Mineralisierung	37
3.8.8.	Lebend-Zellfärbung	37
3.9.	Nachweis osteogener Marker-Gene mit RT-PCR	38
4.	Ergebnisse	40
	Teil I: Chemie	40
4.1.	Derivatisierung von Cellulosen	40
4.1.1.	Synthese von Cellulose-Sulfaten	40
4.1.2.	Carboxylierung von Cellulose-Sulfaten	42
4.1.3.	Carboxymethylierung von Cellulose-Sulfaten	43
4.2.	Synthese von Chitosan-Sulfaten	45
4.2.1.	Homogene Sulfatierung	45
4.2.2.	Nicht-homogene Sulfatierung von Chitosan	46
4.3.	Molmassenbestimmung	47
	Teil II: Biologie / Biochemie	49
4.4.	Toxizitätsstudien der Cellulose-Derivate	49
4.5.	Kooperative Wirkung von Cellulose-Derivaten mit FGF-2	50
4.5.1.	Bindungsaffinität	50
4.5.2.	Beeinflussung der FGF-2-induzierten Proliferation durch Cellulose-Sulfate	51
4.5.2.1.	Einsatz der Derivate in einer Konzentration von 1 mg/ml	52

4.5.2.2.	Verwendung der Derivate im Konzentrationsbereich von 1 µg/ml bis 1 mg/ml	52
4.5.3.	Schutz von FGF-2 durch Cellulose-Derivate vor proteolytischem Abbau	54
4.5.4.	Direkte Beeinflussung der Proliferation durch Cellulose-Derivate ohne Zugabe von FGF-2	57
4.6.	Kooperative Wirkung von derivatisierten Polysacchariden mit BMP-2	59
4.6.1.	Bindungsaffinität	59
4.6.2.	Untersuchung der BMP-2-induzierten Alkalischen Phosphatase Aktivität von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC)	60
4.6.3.	Beeinflussung der BMP-2-induzierten osteogenen Differenzierung von multipotenten C3H/10T1/2 Mauszellen durch derivatisierte Polysaccharide	61
4.6.3.1.	Verifizierung der Alkalischen Phosphatase Aktivität durch BMP-2 und osteogene Induktoren	61
4.6.3.2.	Beeinflussung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität von C3H/10T1/2 Mauszellen durch GAG-analoge Verbindungen	62
4.6.3.3.	Beeinflussung der BMP-2-induzierten Mineralisierung durch Cellulose-Derivate	65
4.6.3.4.	Einfluss von Konzentrationen unter 10 µg/ml derivatisierter Polysaccharide auf die BMP-2-induzierte ALP-Aktivität	66
4.6.4.	Beeinflussung der BMP-2-induzierten osteogenen Differenzierung von C2C12 Mausmyoblasten durch derivatisierte Polysaccharide	68
4.6.4.1.	Verifizierung der optimalen BMP-2 Konzentration	68
4.6.4.2.	Beeinflussung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität durch derivatisierte Polysaccharide	69
4.6.4.3.	Beeinflussung der BMP-2-induzierten Expression osteogener Markergene durch derivatisierte Polysaccharide	72
4.6.4.4.	Beeinflussung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität durch weitere Chitosan-Sulfate	74
4.6.4.5.	Morphologische Untersuchung der osteogenen Differenzierung durch geringe BMP-2 Konzentrationen	75
5.	Diskussion	79
6.	Zusammenfassung	99
7.	Literaturverzeichnis	103
	Publikationen und Erklärung.....	118

Verzeichnis der Abkürzungen

AGU	Anhydro-Glucose-Einheiten
ALP	Alkalische Phosphatase
α MEM	Alpha-Medium
AMP	Amino-2-Methyl-1-Propanol
BAPNA	N- α -Benzoyl-DL-Arginin-p-Nitroanilin Hydrochlorid
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BME	Basal Eagle-Medium mit Earle's Salzen
BMP	Bone morphogenic protein
BSA	Albumin aus Rinderserum
CaCl ₂	Kalziumchlorid
C2.5A	Cellulose-2.5-Acetat
cDNS	Komplementäre Deoxyribonukleinsäure
CHS	Chitosan-Sulfat
CP/MAS	Cross Polarization Magic Angle Spinning
cm ⁻¹	Reziproke Wellenlänge
CO ₂	Kohlendioxid
CS	Cellulose-Sulfat
cw-Nd-YAG	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser mit kontinuierlicher Wellenlänge
DMAc	Dimethylacetamid
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Deoxyribonukleinsäure
DS	Degree of substitution = Substitutionsgrad
dsDNS	Doppelstrang-Deoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetales Rinderserum
FDA	Fluoreszin-Diacetat
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor

FOP	Fibrodysplasia ossificans progressiva
GAG	Glykosaminoglykan
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HCl	Salzsäure
HS	Heparan-Sulfat
HSPG	Heparan-Sulfat-Proteoglykan
Hz	Hertz
IPA	Isopropylalkohol
ITS	Insulin-Transferrin-Selen
mA	Milliamper
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MHz	Mega-Hertz
mM	Millimolar
mPas	Millipascalsekunde
ms	Millisekunde
MSC	Multipotente mesenchymale Stammzellen
NaBr	Natriumbromid
NaOCl	Natriumhypochlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitro-Blau-Trazoliumchlorid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OH	Hydroxyl-Gruppe
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
pH	Dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PLGA	Poly-Milch-Glykolsäure
PLLA	Poly-L-Milchsäure
ppm	Parts per million
PSF	Penicillin-Streptomycin-Fungizon
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute = Umdrehungszahl
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkription Polymerase-Ketten-Reaktion
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumlaurylsulfat

TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-Oxyl Radikal
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TST	Tris-Saline-Tween
UV/VIS	Spektroskopie mittels ultraviolettem und sichtbarem Licht
V	Volt
Wnt	Wingless-Gen von <i>Drosophila melanogaster</i>

1. Einleitung

Der Ersatz geschädigter oder verlorengegangener Körperteile hat in der heutigen Zeit zur Entwicklung einer Vielzahl hochentwickelter Implantate und künstlicher Organe geführt. So werden im Bereich des Schädels- und des Stützapparates Implantate aus Titan, rostfreiem Stahl, Kobalt-Chrom-Legierungen, Keramik oder Polymeren wie Polytetrafluorethylen (PTFE) eingesetzt. Diese werden mit biologischen Materialien wie z.B. Hydroxylapatit (Bestandteil des Knochens) überzogen, um eine bessere Verankerung und Einheilung im Empfängerorganismus zu gewährleisten. Bei einem Teil der Implantate besteht jedoch die Gefahr der Korrosion, was vor allem bei Nickel und Kobalt zu nicht vorhersehbaren pathophysiologischen Wechselwirkungen im Organismus führen kann [1]. Im Bereich der „künstlichen Organe“ wurde eine Vielzahl extrakorporaler Geräte entwickelt, an welche der Patient jedoch im Bett liegend angeschlossen werden muss. Selbst das von der Firma Cardio West entwickelte, implantierbare Herz ist ein pneumatisches System mit einer externen Konsole, das den Patienten lebenslang an das Krankenhaus bindet [2,3]. Diese Probleme lassen den Wunsch nach einem biologischen Gewebe- und Organersatz verständlich werden. So können heute schon Defekte mit Hilfe von neu gezüchteten Geweben aus Leber-, Haut-, Knochen-, Knorpel-, Herz- oder gar Nervenzellen ersetzt werden [4, 5, 6, 7, 8, 9].

Die technische Herangehensweise bei der Gewebezüchtung ist dabei für die verschiedenen Gewebe prinzipiell gleich. So werden durch das gezielte Einbringen von Wachstumsfaktoren, Vitaminen und Hormonen in eine Zellkultur aus organspezifischen primären Zellen, Vorläuferzellen, multipotenten Stammzellen aus adulten Geweben, oder embryonalen Stammzellen, diese zur Vermehrung und Ausdifferenzierung in die gewünschten Gewebstypen induziert [10].

Ein entscheidender Schritt bei der Herstellung von Gewebe- oder Organteilen ist die Ausbildung von dreidimensionalen Strukturen. Breite Anwendung finden dabei z.B. Hydrogele, welche neben stark wasseraufnahmefähigen (synthetischen) Polymeren wie Polyethylenglykol [11] oder Polysacchariden wie Alginat [12] auch aus Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM), wie Collagen, Laminin, Fibronectin, oder Bestandteilen des Blutes wie Fibrin bestehen [13]. Dreidimensionale Stützgerüste, sogenannte „Scaffolds“ (z.B. Schwämme) mit ihren definierten Porengrößen, dienen sowohl der mechanischen Stabilität, als auch dem vorhersagbaren Einwachsen von Zellen in diese Strukturen. Sie zeichnen sich darüber hinaus durch einen langsameren Abbau als Hydrogele aus. Als „Kern“ der Scaffolds dienen häufig biologisch

abbaubare Polymere wie Poly-L-Milchsäure (PLLA) oder Poly-Milch-Glykolsäure (PLGA), aber auch Proteine der extrazellulären Matrix [14,15]. Durch das Einbringen von Glykosaminoglykanen oder GAG-Analoga in Hydrogele oder Scaffolds, ähneln diese stark der natürlichen extrazellulären Matrix und erlauben das Einbinden von Wachstumsfaktoren. Glykosaminoglykane wie Heparin und Polysaccharide wie Chitosan [16,17] finden hierbei breite Anwendung. Aber auch Chondroitin-Sulfat oder Hyaluronsäure finden eine immer größere Beachtung als Bestandteil dreidimensionaler Strukturen [18]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die definierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus diesen Systemen zu einem zeitlich und räumlich gesteuertem Wachstum und Ausdifferenzierung der eingebrachten Zellen führte. [19,20].

Eine Einbindung von GAG-analogen Verbindungen mit, für unterschiedliche Wachstumsfaktoren spezifischen Derivatisierungsmustern, die zu einer optimalen Funktion der Wachstumsfaktoren führen, fand jedoch bisher noch keine Anwendung.

1.1. Rolle von Glykanen im Organismus

Die Übertragung zellulärer Signale erfolgt durch eine Vielzahl von Hormonen und Proteinen, wie z.B. Cytokinen und Wachstumsfaktoren, sowie den entsprechenden Rezeptoren und intrazellulären Signalübertragungsproteinen. Bei der Feinregulation der Signalvermittlung spielt jedoch eine weitere Klasse von Molekülen eine entscheidende Rolle, die Glykane. Das sind Kohlenhydratketten, die an Proteine oder Lipide gebunden vielfältige Funktionen im Organismus übernehmen [21]. Durch die große strukturelle Komplexität und den Umstand, dass ihre Struktur nicht aus der DNA vorhergesagt und von vielen anderen Faktoren beeinflusst werden kann, tragen sie zur enormen biologischen Komplexität der Regulation biologischer Systeme bei. Glykane sind in diversen Formen auf jeder Zelle oder als eigenständige Strukturen in der extrazellulären Matrix zu finden und vermitteln so verschiedene Prozesse wie Zell-Molekül-, Zell-Matrix- oder Zell-Zell Interaktionen [22].

1.1.1. Struktur und biologische Funktionen

Glykane sind aus Monosacchariden aufgebaut und haben die Formel $C_x(H_2O)_n$, wobei n zwischen 3 und 9 liegen kann. Biologisch relevante Glykane bestehen aus Pentosen ($n=5$) oder Hexosen ($n=6$). Alle Monosaccharide besitzen dabei asymmetrische C-Atome, deren Anzahl gleich der Anzahl der CHOH-Gruppen ist. Diese bewirken die Ausbildung von Stereoisomeren,

deren Anzahl durch 2^k beschrieben ist (k : Anzahl der asymmetrischen C-Atome steht. Für eine Hexose resultieren somit 16 mögliche isomere Formen [21]. Die Bildung von Polysacchariden aus Monosacchariden wird über die Ausbildung von glykosidischen Bindungen realisiert. Dabei reagiert das anomere C-Atoms eines Monosaccharides (bei Glukose C-1) mit einer Hydroxyl-Gruppe des benachbarten Monosaccharides, wobei ein Acetal entsteht. Die Konfiguration dieser Bindung ist stabil und kann in zwei Formen (α und β) vorliegen. Jedoch besitzen diese glykosidischen Bindungen einen hohen Grad an Flexibilität, da die Torsionswinkel Ψ , ϕ und ω variabel sind. Eine Spaltung der glykosidischen Bindung ist in verdünnten Säuren möglich [21].

Die Vielfältigkeit der Glykane resultiert nicht nur aus der Zusammensetzung verschiedener Monomere und deren Stereoisomere sowie der Art der glykosidischen Bindung, sondern auch aus der Art, dem Grad und der Anordnung der Substituenten. In einer Hexose sind nach der Ausbildung der glykosidischen Bindung noch drei Hydroxylgruppen für funktionelle Gruppen frei. In natürlichen Glykanen sind sehr häufig Phosphat-, Carboxyl- und Sulfat-Gruppen zu finden. Diese Substituenten werden neben anderen Substituenten wie Methyl- oder Carboxymethyl-Gruppen, häufig in unsubstituierte Polysaccharide wie Dextran oder Cellulose eingefügt. Viele natürliche Polysaccharide tragen auch N-Acetamino-Gruppen wie Glucose-N-Acetamid oder in seltenen Fällen auch nur Amino-Gruppen, wie z.B. Chitosan [21].

Glykane liegen fast ausschließlich an Proteine gebunden vor und weisen eine große Diversität auf. So bestehen Mucine, welche Hauptbestandteile der Schleimhautabsonderungen sind, aus N-Acetylgalaktosamin (GalNAc), das an Hydroxyl-Gruppen von Serin oder Threonin gekoppelt ist. Sie liegen hochmolekular und gelbildend oder niedermolekular und monomer vor [21]. Glykosphingolipide dagegen sind ubiquitär verbreitete Bestandteile der Zellmembran (Bakterien bis Mensch) und sind aus verschiedenen, an Lipide gebunden Zuckern aufgebaut. Glykosphingolipide bilden Cluster in der Zellmembran. Untersuchungen weisen darauf hin, dass sie an der Weiterleitung von extrazellulären Signalen beteiligt sind [21].

Bei Glykosylphosphatidylinositol-Ankern bilden Oligosaccharide einen in der Zellmembran verankerten, frei beweglichen „Arm“ an den Proteine oder Peptide gebunden sind. Als typische Vertreter sind hydrolytische Enzyme, Adhäsionsmoleküle, regulierende Enzyme des Komplementsystems, Rezeptoren oder auch Hüllproteine von Protozoen zu nennen. [21]. Sialinsäuren sind ein Oberbegriff für N-und O-Derivate der Neuraminsäure. N-Acetylneuraminsäure z.B. ist Bestandteil von Aminosackern, welche bei Zell-Zell Interaktionen eine wichtige Rolle spielen, aber auch Proteine vor proteolytischem Abbau

schützen. In Form von Glykoproteinen und Glykolipiden kommen sie auch in Drüsensekreten oder der Zellmembran vor [21].

1.1.2. Funktion von Glykosaminoglykanen

Die Gruppe der Glykosaminoglykane (GAG) umschließt eine Vielzahl von an Proteinen gekoppelten Glykanen, die in der extrazellulären Matrix sowie auf jeder Zelloberfläche zu finden sind. Neben Aminogruppen tragen vor allem anionische Substituenten wie Sulfat- oder Carboxylgruppen, welche sich sowohl hinsichtlich der Anordnung als auch dem Grad der Substitution unterscheiden, zur großen Heterogenität des Zucker-Anteils bei. Chondroitinsulfat ist z.B. aus β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften, sulfatierten D-Glukuronyl- β -(1 \rightarrow 3)-N-Acetylgalaktosamin-Disacchariden aufgebaut. Keratansulfat dagegen besteht aus sulfatierten β -(1 \rightarrow 3)-glykosidisch verknüpften D-Galaktose- β -(1 \rightarrow 4)-N-Acetylglucosamin-Disacchariden (Abb. 1) [23].

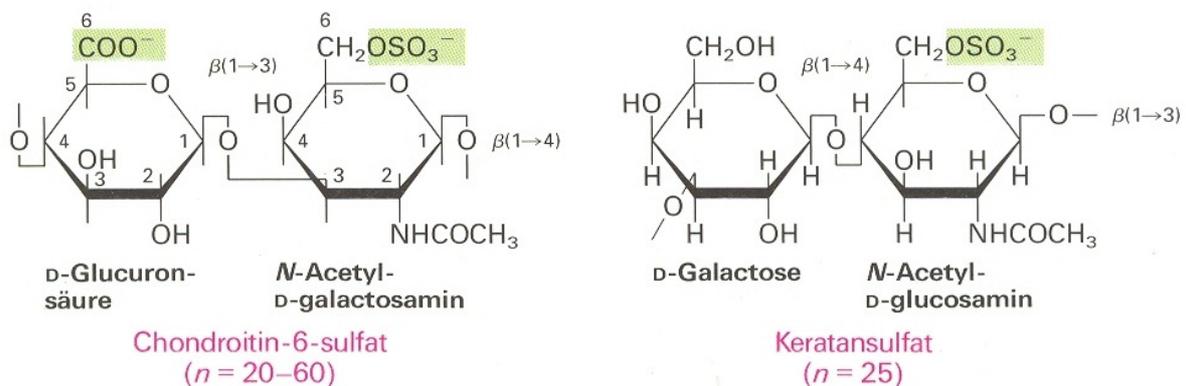


Abb. 1: Strukturformel von Chondroitin-6-Sulfat und Keratansulfat.
aus Darnell et al. *Molekulare Zellbiologie. De Gruyter: New York, 1994* [23]

Chondroitinsulfat und Keratansulfat tragen als typische Glykane des Knorpels zu einem großen Teil zu dessen Elastizität bei. Zahlreiche Chondroitin- und Keratansulfat-Ketten sind dabei kovalent an Core-Proteine gekoppelt, welche wiederum nicht-kovalent an Hyaluronsäure-Moleküle gebunden sind. Diese Strukturen bilden insgesamt eines elastischen Netzwerkes aus Proteinen und Zuckern (Abb. 2). Der bekannteste Vertreter dieser sogenannten interstitiellen Proteoglykane ist Aggrecan. Das Molekulargewicht eines Aggrecan-Monomers, (Core-Protein mit daran gebundenen Glykosaminoglykanen) beträgt dabei durchschnittlich 2×10^6 Dalton [23]. Chondroitinsulfat besitzt darüber hinaus aber nicht nur „mechanische“ Funktionen, sondern

spielt auch eine Rolle bei der Weiterleitung von Signalen durch regulatorische Proteine. Gebunden an die Glykan, Dekorin und Biglykan wurde es auf Osteoblasten gefunden. Dort beeinflusst es, abhängig von seiner Dichte auf der Zellmembran, die Hydroxylapatit-Bildung. In vitro wurde darüber hinaus gezeigt, dass übersulfatiertes Chondroitinsulfat sowohl mit als auch ohne Anwesenheit von BMP-4 zu verstärkter Proliferation und osteogener Differenzierung von MC3T3 E1 Zellen führte [24]. Für das im Knorpel vorkommende, und Chondroitinsulfat tragende Perlecan sind Einflüsse in der Embryonalentwicklung und Chondrogenese nachgewiesen worden [23].

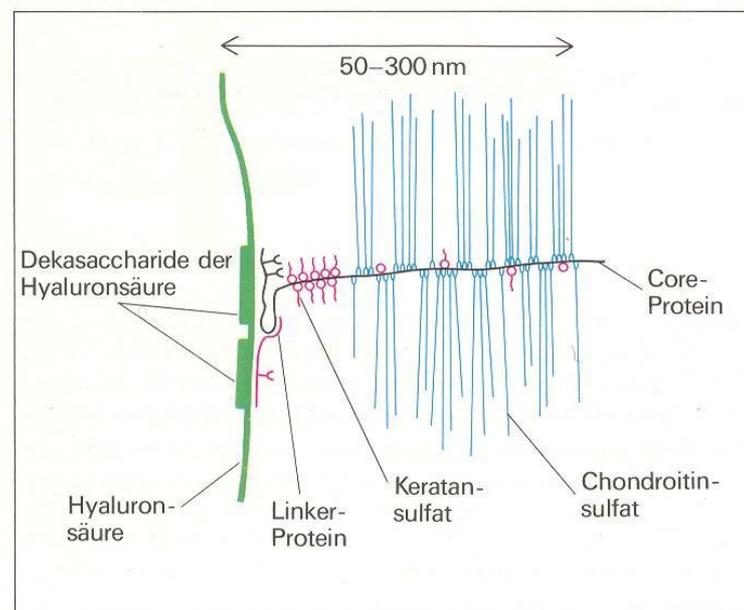


Abb. 2: Strukturdetails eines Proteoglykan-Monomers aus dem Knorpel.
aus Darnell et al. *Molekulare Zellbiologie*. De Gruyter: New York, 1994 [23]

Die Glykosaminoglykane mit der größten strukturellen Diversität und den vielfältigsten biologischen Funktionen sind aber Heparine und Heparan-Sulfate (HS). Heparin ist aufgrund seiner großen Anzahl an Sulfat- und Carboxylgruppen das Glykosaminoglykan mit der höchsten Dichte an negativen Ladungen. Es besteht aus Disaccharid-Untereinheiten, bei denen entweder D-Glukuronsäure (zu 10%) β -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch, oder L-Iduronsäure (zu 90%) α -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch mit einem N-Acetyl-D-Glukosamin verknüpft ist. Die Bindung zwischen den verschiedenen Disacchariden ist α -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch. Die typische Grundstruktur ist dabei das trisulfatierte Disaccharid (Abb. 3) [25]. Dabei können die Sulfatgruppen an der 2-O-Position der Iduron- bzw. Glukuronsäure, sowie an 3-O- und 6-O-Position des Glukosamins positioniert sein. Die Aminogruppe des Glukosaminrests kann dagegen durch eine Acetyl- oder Sulfatgruppe

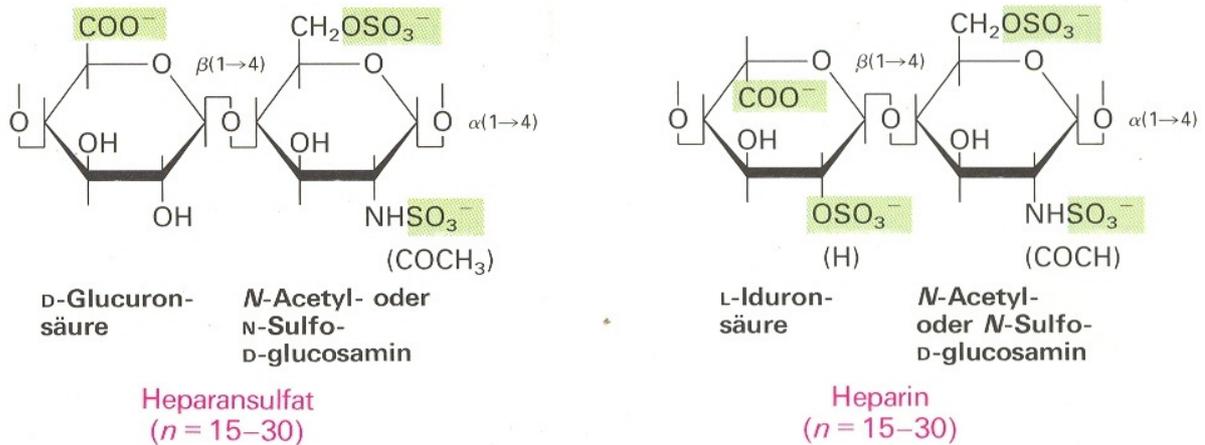


Abb. 3: Strukturformel von Heparan-Sulfat und Heparin. [aus Molecular cell biology; aus Darnell et al. *Molekulare Zellbiologie*. De Gruyter: New York, 1994 [23]

substituiert oder frei sein. Die durchschnittliche Molmasse eines Heparin-Moleküls beträgt ca. 15 kDa [23,25].

Im Gegensatz dazu hat Heparan-Sulfat eine durchschnittlich größere Molmasse (ca. 30 kDa), und trägt prinzipiell weniger Sulfatgruppen. Heparan-Sulfat-Ketten enthalten Domänen mit ausgedehnten Sequenzen niedriger oder aber hoher Sulfatierung. Oft ist nur eine Sulfatgruppe pro Disaccharid zu finden. Aber auch Heparin weist Inhomogenitäten im Sulfatierungsgrad auf, welche aber wesentlich geringer als bei Heparan-Sulfat ausgeprägt sind [25]. Neben der unterschiedlichen Dichte der Substituenten ist die molekulare Variabilität und Flexibilität bei beiden Glykosaminoglykanen auch auf Konformationsänderungen von Monosaccharid-Einheiten zurückzuführen. Eine Umwandlung des L-Iduronsäure-Restes von der ⁴C₁- in die ¹C₄-Sesselformen oder in die ²S₀ (schiefes Boot) ist dabei möglich [26]. Da die Energiebarriere zur Umwandlung der Sesselform in die Bootsform relativ gering ist, kann es bei der Bindung an Proteine aufgrund der Bevorzugung energetisch günstiger elektrostatischer Wechselwirkungen zur konformativen Umwandlung in eine der beiden Formen kommen. Die D-Glukosamin und D-Glukuronsäurereste nehmen dagegen meist die bevorzugte ⁴C₁-Konfiguration ein [27].

Die Synthese von Heparin findet hauptsächlich in Mastzellen und basophilen Granulozyten statt. Heparin übernimmt dabei eine Vielzahl von Funktionen in der Regulierung zellulärer Prozesse. So bindet es z.B. Histamin und Serglycin in den sekretorischen Vesikeln (Abb. 4a) und ist an der Verteilung und Aktivität ausgeschütteter Proteasen beteiligt [28]. Exozytierte Heparin-Proteoglykane inhibieren dagegen die Thrombozyten-Collagen Interaktion und die Bindung des Von-Willebrand-Faktors an Thrombozyten [29]. Des Weiteren binden Heparine an LDL-Partikel

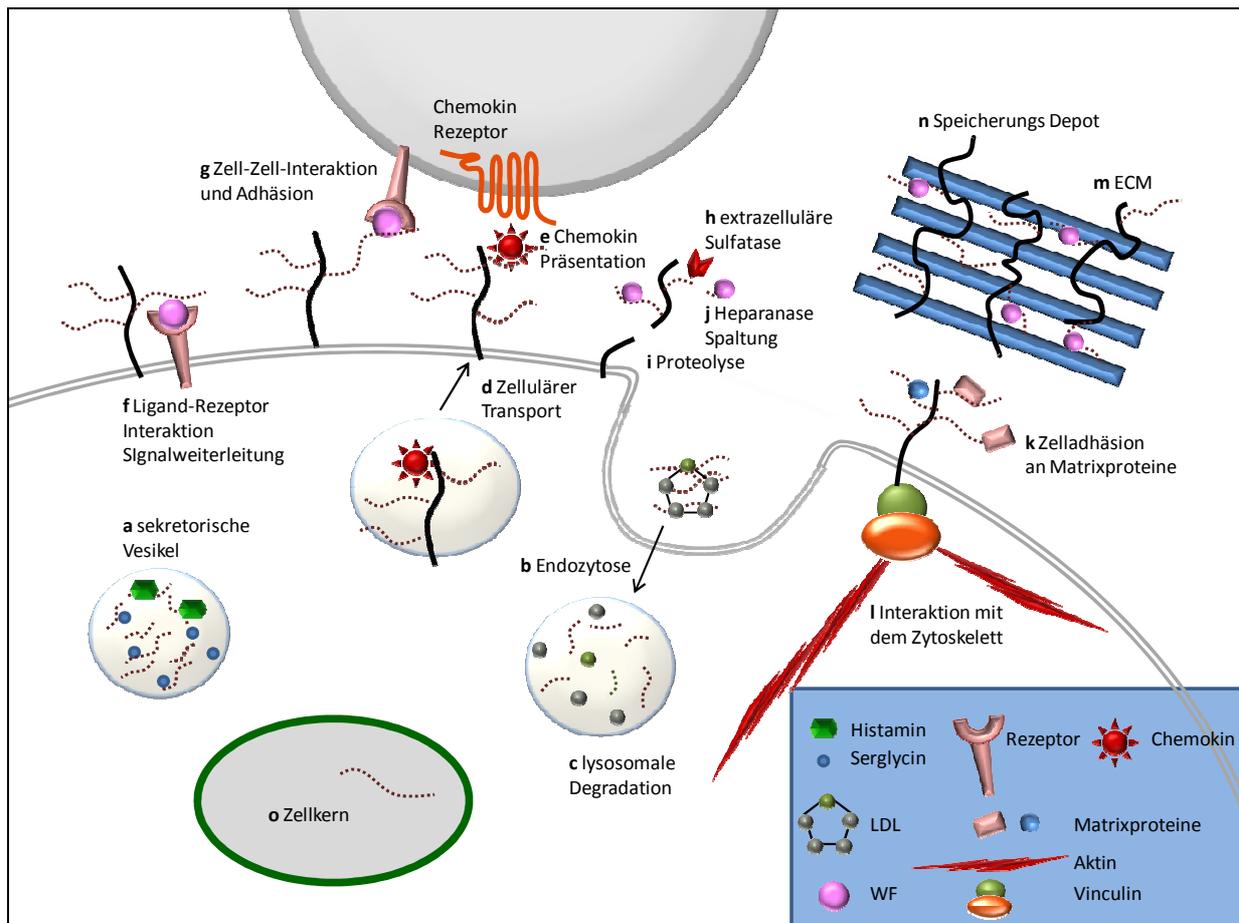


Abb. 4: Funktionen von Heparin und Heparan-Sulfat Proteoglykanen in der Zellphysiologie nach *Bishop et al.* [22].

und bewirken eine endozytische Aufnahme und den Abbau dieser in Makrophagen (Abb.4 b,c) [30]. Die wohl bekannteste Eigenschaft von Heparin ist die Bindung an Antithrombin III, weshalb es in breiter Anwendung zur Hemmung der Blutgerinnung genutzt wird [28]. Heparan-Sulfat-Proteoglykane (HSPG) sind dagegen auf der Oberfläche vieler Zellen und in der extrazellulären Matrix lokalisiert. Die bekanntesten Vertreter Zellmembran-lokalisierter HSPG sind Syndecan, Glypican. Als weiterer bekannter Vertreter ist das Zelloberflächenprotein CD44 zu nennen [31]. Die Mitglieder der Syndecan-Familie besitzen sowohl eine Membranspannende als auch cytoplasmatische Domäne. So tragen Syndecan-1 und -3 Chondroitin-Sulfat-Ketten proximal zur Membran, jedoch Heparan-Sulfat-Ketten am distalen Teil. Die Syndecan-2 und -4 tragen ausschließlich Heparan-Sulfate. Syndecane übertragen über die cytoplasmatische Domäne Signale von der extrazellulären Umgebung in das Innere der Zelle. Die Bindung eines Liganden an die HS-Ketten führt zur Oligomerisierung der Syndecane, welche die Aktivierung von Kinasen im Cytoplasma bewirken [21]. Vielfältige Funktionen der

HSPG sind auch mit der Regulierung der Funktion von Chemokinen und Wachstumsfaktoren sowie der Interaktion zwischen Zelloberfläche, ECM und Zytoskelett verbunden. So transportieren HSPG Chemokine aus der Zelle (Abb. 4d) und präsentieren sie auf der Zelloberfläche (Abb. 4e). Als Co-Rezeptoren tragen sie zur Bindung von Wachstumsfaktoren den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen auf der gleichen (Abb. 4f) oder einer benachbarten Zelle bei und führen so zur Zell-Zell-Adhäsion (Abb. 4g) [32]. Dabei können die Heparan-Sulfat-Ketten, wie für den Wachstumsfaktor FGF-2 beschrieben, direkt in die Formierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes eingebunden sein [33]. HSPG können Wachstumsfaktoren darüber hinaus außerhalb der Zelle speichern und damit als „Reservoir“ dienen. Die Freisetzung der gebundenen Wachstumsfaktoren erfolgt durch eine Veränderung des Sulfatierungsgrades durch lokal exprimierte Sulfatasen (Abb. 4h) [34], durch Proteolyse der Core-Proteine (Abb. 4i) oder durch Heparanase-Spaltung der HS-Ketten (Abb. 4j). HSPG vermitteln auch die Anhaftung der Zellen zur ECM (Abb. 4k) und bilden Brücken zum Zytoskelett aus (Abb. 4l). Sekretierte HSPGs dienen auch als Strukturkomponenten der ECM (Abb. 4m), wo sie ebenfalls Wachstumsfaktoren für eine spätere Freisetzung speichern (Abb. 4n). Auch wurden HS-Ketten im Zellkern gefunden, deren genaue Funktion ist jedoch noch unklar (Abb. 4o) [22].

Die Familie der Glypikane ist dagegen über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker an die Zellmembran gekoppelt und besitzt keine zytoplasmatische Domäne. Glypikane tragen ausschließlich Heparan-Sulfat und haben im Gegensatz zu den langgestreckten Syndecanen aufgrund vieler Cystein-Reste eine globuläre Struktur. Die HS-Ketten der Glypikane binden eine große Anzahl von für die Entwicklung und Morphogenese des Organismus wichtigen Faktoren wie Cytokine und Wachstumsfaktoren [21]. So reguliert das Glypican *dally* die Verteilung und die zelluläre Antwort auf das zur BMP-Familie gehörende Morphogen *Decapentaplegic (Dpp)* während der Entwicklung der Flügel der Fruchtfliege *Drosophila*. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung an das Regulatorprotein *dally* die Halbwertszeit von *Dpp* verlängert. [35]. Eine Überexpression von Glypicanen spielt auch häufig auch eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren. Eine Unterdrückung der Expression von Glypican 1 führte dabei interessanterweise zu einer reduzierten Reaktion auf Heparin bindende Wachstumsfaktoren [36]. Neben Wachstumsfaktoren und Chemokinen sind eine Vielzahl anderer Heparin- oder Heparan-Sulfat bindender Proteine bekannt. Im Folgenden sei eine kleine Auswahl getroffen die keinen Anspruch an Vollständigkeit stellt: IL-8, Apo E (Lipid-Transport), HIV1 gp120 (Vireneintritt), Malaria CS-Protein (Anheften von Sporozysten an Leberzellen) [23].

Die Bindung von Heparin oder Heparan-Sulfat erfolgt an Heparin-Bindungsstellen von Wachstumsfaktoren. Dies sind meist „Taschen“ mit einem hohen Anteil positiv geladener Aminosäuren wie Lysin oder Arginin und liegen im Allgemeinen an der Außenseite der Proteine. Obwohl bestimmte Struktur motive für die Bindung von Heparin vorhanden sind, stimmen die Sequenzen für die Bindesequenzen bei einer Vielzahl von Heparin-bindenden Proteinen nicht überein. Vielmehr ist entscheidend, welche Aminosäuren im gefalteten Zustand in relativer Nachbarschaft zueinander liegen. Da die meisten basischen Reste auf entgegengesetzten Seiten der Sekundärstruktur angeordnet sind, nimmt man an, dass sich Heparin um seine Bindungsdomäne windet, um mit den positiv geladenen Resten in Wechselwirkung zu treten. Dieses „Knäulen“ führt letztlich zu Konformationsänderungen des Heparin-bindenden Proteins [25].

1.2. Struktur und Funktion von Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren steuern die Teilung und Differenzierung von Zellen in vielfältiger Weise. Sie werden in der Regel entsprechend ihrer charakteristischen Wirkung im Organismus benannt. Oftmals erfolgt die Zelldifferenzierung als ein Zusammenspiel oder ein antagonistisches Gegenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren, wie bei der Ausbildung und Differenzierung der Keimblätter [37]. Im Folgenden sollen die in der Arbeit verwendeten Wachstumsfaktoren bezüglich ihrer Struktur, Signalübermittlung und Funktion im Organismus näher beschrieben werden.

1.2.1. Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (FGF-2)

FGF-2 gehört zu der mehr als 20 Mitglieder umfassenden Fibroblasten Wachstumsfaktoren-Familie, und ist gleichzeitig einer der in seiner biologischen Funktion und molekularen Struktur am besten untersuchten Wachstumsfaktoren [38,39,40]. FGF-2 ist ein 17,2 kDa großes Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 9,6 [41]. Es sind bislang vier Rezeptor-Familien identifiziert worden (FGFR1 bis FGFR4) [42]. Die Rezeptoren sind aus drei Domänen aufgebaut: a) einer cytoplasmatischen Tyrosin-Kinase Domäne, b) einer transmembranen Domäne und c) einer extrazellulären Liganden-Bindungs Domäne. Für FGF-2 wurde gezeigt, dass die Bindung des Wachstumsfaktors an den FGFR1 Rezeptor, sowie die Einleitung des resultierenden FGF-Signalwegs, nur durch die Bildung eines ternären Komplexes aus FGF-2, und dem FGFR1-Rezeptors möglich ist [43]. In einer Röntgen Kristall-Struktur Analyse wurde

schließlich nachgewiesen, dass zwei Heparin Decasaccharide an der Bildung eines ternären FGF2:Heparan-Sulfat:FGFR1 Komplexes beteiligt sind (Abb. 5) [33]. Die Bindung von Heparan-Sulfat zu FGF-2 wird dabei über 16 Wasserstoffbrücken realisiert, wobei nur zwei über 6-*O*-Sulfat Gruppen (zu den Aminosäuren Lys135 und Thr121) ausgebildet werden.

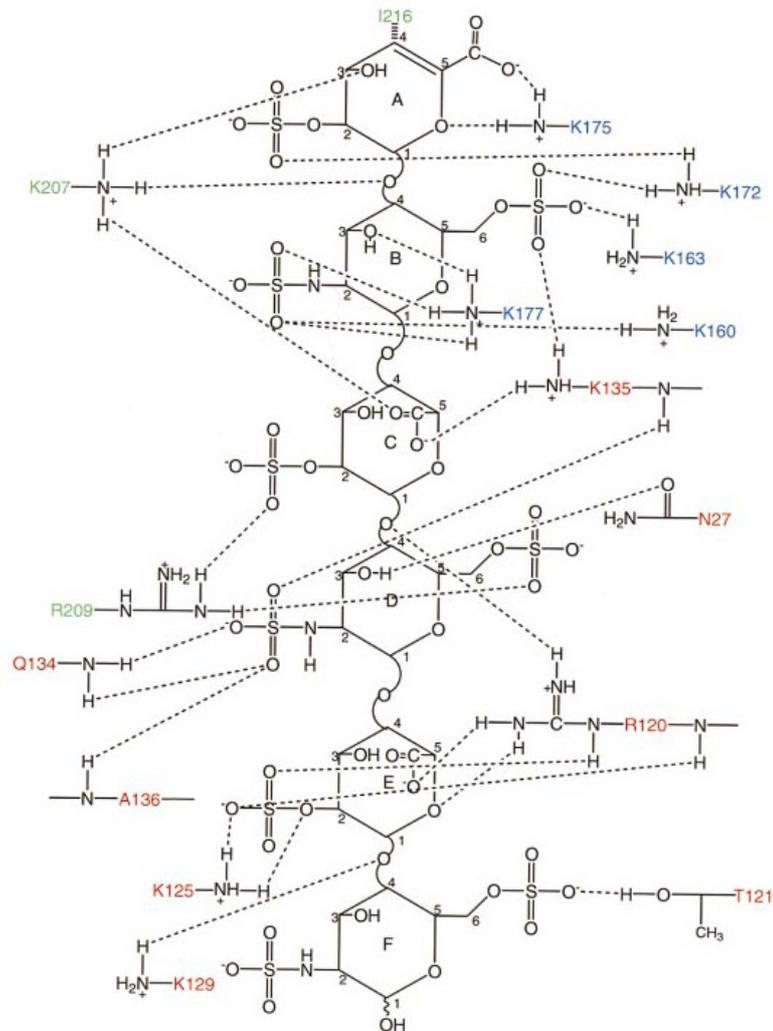


Abb. 5: Interaktion zwischen Heparin, FGF-2 und FGFR1 Rezeptor.
aus *Schlessinger et al.* [33]

Jeweils vier Wasserstoffbrücken sind über 2-*O*- und 2-*N*-Sulfatgruppen und zwei zu Carboxylgruppen ausgebildet. Der Rest der Wasserstoffbrückenbindungen wird über Sauerstoffatome der glykosidischen Bindung und des Ringsauerstoffes, sowie über eine Hydroxylgruppe realisiert. Von den 9 Wasserstoffbrücken, die an der Bindung von Heparan Sulfat an den primären FGFR-Rezeptor beteiligt sind, werden zwei über 6-*O*-, zwei über 2-*N*-, eine über 2-*O*-Sulfat, sowie über eine Carboxylgruppe realisiert. Die übrigen

Wasserstoffbrückenbindungen werden über den Ringsauerstoff und eine Hydroxylgruppe ausgebildet [33]. Es wurde gezeigt, dass 6-*O*-desulfatiertes Heparin zwar an FGF-2 bindet, aber keine Formierung des FGF-2:FGFR1 Komplexes ermöglicht [44].

Die intrazelluläre Signalübertragung von FGF-2 wird über verschiedene Signaltransduktions-Kaskaden realisiert. Die Nutzung des Proteinkinase-C-Signalweges spielt dabei eine zentrale Rolle bei der Zellteilung, Mitose, Differenzierung und dem Stoffwechsel der Zellen [45]. Die Tyrosin-Kinase des FGFR1 Rezeptors bindet und aktiviert dabei zunächst die Phospholipase C [46], welche Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat zu Inosit-1,4,5-trisphosphat und 1,2-Diacylglycerin spaltet. Letzteres aktiviert zusammen mit Ca^{2+} die Proteinkinase C [23]. Diese führt dann unter anderem zum Anstieg der Expression der G1-Phase Cykline, welche die Einleitung des Zellzyklus unterstützen [47]. Die zweite Möglichkeit der Signalübertragung wird über die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) realisiert. Die FGFR1-Tyrosin-Kinase bindet und aktiviert über ein Adapter-Protein die GTPase Ras, wobei diese einen Austausch von GDP gegen GTP bewirkt. Aktiviertes Ras-GTP bindet nun das Effektorprotein Raf-Kinase, welches zu einer Phosphorylierung von ERK führt. Dieses dringt letztendlich in den Zellkern ein und induziert eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, welche Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben oder Apoptose einleiten [48, 23].

FGF-2 trägt in vielfältiger Weise zur Proliferation und Differenzierung verschiedener Gewebe bei. Seine Name stammt ursprünglich von seiner Fähigkeit, Fibroblasten zur Proliferation anzuregen [49] und von Fibroblasten exprimiert zu werden [50]. Aber auch eine Vielzahl anderer Zelltypen, wie Endothelzellen oder Stromazellen des Knochenmarks exprimieren FGF-2 [51,52]. Sehr häufig beschriebene Effekte dieses Wachstumsfaktors sind die Induktion endothelialer Zellproliferation und Zellmigration [53] sowie die Stimulation der Bildung verschiedener Blutzelltypen wie Erythrozyten, Granulozyten und Makrophagen [54]. Weitere Gewebe, die durch FGF-2 in ihrer Teilung und Differenzierung beeinflusst werden, sind die Lunge [55], das zentrale Nervensystem [56], die Augen [57], die Muskeln [58] und die Haut [59]. Eine wichtige Rolle kommt FGF-2 auch während der Wundheilung zu [60]. Darüber hinaus wurde auch gezeigt, dass es auch zu einer erhöhten Proliferation von Osteoblasten führt [61].

Der Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren kommt eine große Bedeutung in der Embryonalentwicklung zu. FGF-2 spielt dabei eine wichtige Rolle für die Selbst-Erneuerung, das Überleben und die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen [62]. So bewirkt es z.B. die Induktion und die Aufrechterhaltung des Mesoderms während der Gastrulation in *Xenopus* [63]. Die spätere Entwicklung des Kleinhirns [64] und der Darmrohr-

Anlage im Endoderm werden ebenfalls durch FGF-Wachstumsfaktoren reguliert. Oft führt ein Zusammenspiel mit anderen Wachstumsfaktoren wie Wnt [65] oder BMP [66] erst zur Ausprägung der entsprechenden Entwicklungsmerkmale.

Nicht zuletzt soll erwähnt werden, dass FGF-2 auch an der Ausbildung von Krankheitsbildern beteiligt ist. Bei der Paget'schen Knochenkrankheit führt eine Überexpression von FGF-2 in Knochenmark-Preosteoblasten zur Induktion des Rezeptor-Aktivator für den Kernfaktor-Kappa-B-Ligand (RANKL). Dieser leitet die Osteoclastogenese ein und führt zur Knochenresorption [67]. Auch bei aktiven metastatischen Tumoren wird oft eine Überexpression von FGF-2 beobachtet, was zu verstärkter Angiogenese und damit Blutversorgung des Tumors führt. FGF-2 wird deshalb auch als Indikator für die Tumor-Diagnostik genutzt [68].

1.2.2. Bone Morphogenic Protein 2 (BMP-2)

Die zur TGF-Superfamilie gehörenden 14 Mitglieder der „Bone morphogenic proteins“ (BMPs) sind durch vielfältige Funktionen während der Differenzierung und Ausbildung des Knochens bekannt. So bewirken sie einerseits eine direkte Osteogenese, andererseits auch eine endochondrale Osteogenese, was die Infiltration mesenchymaler Zellen, Knorpelbildung, Vaskularisierung und Knochenbildung einschließt. Nicht alle BMPs haben dabei gleiche Effekte. So zeigten BMP-2, -6 und -7 ähnliche konzentrationsabhängige osteogene Aktivitäten. BMP-5 hingegen bedarf höherer Dosen, BMP-3 scheint möglicherweise sogar ein negativer Regulator der Knochenbildung zu sein [69]. Die Wirkung der verschiedenen BMP's hängt dabei auch vom Zelltyp ab. So zeigten z.B. BMP-2, -6 und -9 eine osteogene Wirkung auf multipotente embryonale Maus-Fibroblasten, BMP-2, -4, -6 und -9 bewirken eine osteogene Differenzierung von C2C12 Myoblasten aus der Maus. TE-85 Osteoblasten wurden hingegen durch alle Mitglieder zur weiteren osteogenen Differenzierung angeregt [70]. Verschiedene BMPs führten auch bei multipotenten mesenchymalen Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark zu starker osteogener Differenzierung. Dabei wurde jedoch mit humanen MSC eine wesentlich geringere BMP-induzierte Knochenbildung gegenüber MSC aus Ratten und Mäusen nachgewiesen [71].

BMP-2 ist aber nicht nur ein Stimulator der Osteogenese, sondern bewirkt auch die Aktivierung von Osteoclasten, was zu verstärkter Knochenresorption führt [72]. Um die Aktivität von BMP-2 bei derartigen Krankheitsbildern zu regulieren ist die Anwendung von Glykosaminoglykanen oder GAG-analogen Verbindungen ein vielversprechendes Instrument.

Die Familie der BMPs hat, ähnlich der FGF-Familie, vielfältige Funktionen in der Embryonalentwicklung. BMP-4 bewirkt z.B. die Ventralisierung des Mesoderms und unterdrückt die Bildung des Nervengewebes in Vertebraten. Die Gegenspieler Noggin und Chordin wirken dem entgegen und führen zu einer Dorsalisierung des Mesoderms sowie zur Ausprägung neuraler Entwicklung [73]. Immer mehr Informationen deuten darauf hin, dass BMPs auch bei der Entwicklung der Haarfollikel, Lunge, Leber, Haut und der Zähne eine Rolle spielen [74].

BMP-2 ist ein 26 kDa großes Homodimer, bestehend aus zwei, je 115 Aminosäuren umfassenden Untereinheiten und einem isoelektrischen Punkt von 8,21 haben [75]. BMP Zelloberflächen-Rezeptoren besitzen, ähnlich den FGF-Rezeptoren, eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine intrazelluläre Domäne. BMP-2 bindet dabei zunächst an die extrazelluläre Domäne des BMP-Rezeptors Ia, erst dann ist der niedrig affine Activin-Rezeptor II in der Lage an den Komplex anzudocken. Durch das Andocken erfährt der ActRII Rezeptor eine Konformationsänderung, welche wiederum eine Phosphorylierung und Aktivierung des BMP-Ia Rezeptors bewirkt [76]. Die intrazelluläre Signalübertragung erfolgt über SMAD Proteine, die in drei Klassen eingeteilt sind: Rezeptor-regulierte (R-Smads), allgemeine (C-Smads), sowie inhibitorische (I-Smads). Die R-Smads 1, 5 und 8 werden durch den Typ Ia Rezeptor phosphoryliert, dissoziieren vom Rezeptor und binden an Smad4. Dieser Komplex tritt nun in den Zellkern ein und löst dort eine Vielzahl von Differenzierungsprozessen aus [77]. Durch Fehlregulation von BMP-Signalwegen kann es jedoch auch zu einer Reihe von Krankheitsbildern kommen. Eines der bekanntesten ist die Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), bei welcher eine Mutation im ActRII-Rezeptor sowohl zu Ligand-gebundener Überreaktion, als auch zu Ligand-unabhängiger BMP-Signalübertragung durch Smad oder p38 (MAPK) führt. Dies zieht eine fortschreitende ektopische Verknöcherung mit sich [78,79].

Wie die Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren sind auch BMPs Heparin-bindende Wachstumsfaktoren. Die Involvierung von Heparin oder Heparan-Sulfat in den BMP:BMPR-Komplex wurde bisher jedoch noch nicht, wie für FGF-2 beschrieben, in einer Kristall-Strukturanalyse nachgewiesen. BMP-2 weist aber am N-terminalen Ende eine Bindedomäne für Heparin auf [80]. Darüber hinaus ist aus vielen Studien bekannt, dass die Abwesenheit oder die Überexpression von Zelloberflächen-GAG zu veränderter Wirkung der BMPs führen. So führte der Abbau der zelleigenen GAGs oder die Beseitigung der Sulfatgruppen durch Chlorat zu einer Unterdrückung der Smad-Phosphorylierung durch BMP-7 [81].

1.3. Einbindung von GAGs und GAG-analogen Verbindungen in dreidimensionale Strukturen zur Knochenregeneration

Zum Verständnis des folgenden Abschnitts soll hier zunächst kurz die Zusammensetzung des Knochens erläutert werden. Die Knochenmatrix besteht zu 35% aus organischen und zu 65% aus anorganischen Bestandteilen. Zu den anorganischen Bestandteilen ist an erster Stelle Hydroxylapatit $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$ zu nennen, das wesentlich zur mechanischen Stabilität des Knochens beiträgt. Des Weiteren machen Magnesium, Kalium, Chlor, Eisen und Karbonat wesentliche Bestandteile des mineralischen Teils aus. Der organische Anteil besteht zu 90% aus Typ I-Kollagen und zu 10% aus nicht-kollagenartigen Proteinen. Darunter sind mit abnehmender Abundanz Osteonectin, Osteocalcin, Bone-Sialoprotein, Osteopontin, Phosphoproteine, Glykoproteine, Proteoglykane sowie weitere Proteine, die überwiegend von Knochenzellen synthetisiert werden [82]. Osteocalcin spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Knochenmineralisierung [83] und wird schon kurze Zeit nach der Induktion osteogener Differenzierung (2-3 Tage) ausgeprägt [84,85]. Die Expression des Bone-Sialoproteins erfolgt dagegen erst nach längerer Inkubationsdauer von 2 Wochen [86]. Auch die Mineralisierung (Einbau von Hydroxylapatid in die ECM) ist ein langwieriger Prozess, der frühestens nach einer Woche, in der Regel aber erst nach drei oder mehr Wochen nachgewiesen wird [85,87,84]. Eine entscheidende Rolle bei der Mineralisierung spielt die alkalische Phosphatase, welche in Vesikeln der ECM angereichert wird und im Beisein von Kalziumsalzen und Phosphatester Kalziumphosphat präzipitiert [88]. Da die Expression dieses Enzyms schon nach kurzer Zeit erfolgt und die Aktivität leicht in 96 Loch-Platten gemessen werden kann, wird es oft als erster Marker osteogener Differenzierung genutzt [89,90]. In vielen Studien werden zusätzlich zu BMP-2 die osteogenen Induktoren Ascorbinsäure-2-Phosphat, β -Glycerophosphat und Dexamethason eingesetzt [87,91]. β -Glycerophosphat ist dabei Phosphat-Quelle für Hydroxylapatit [92]. Ascorbinsäure hat, neben seiner Wirkung als Anti-Oxidants, eine Funktion als Coenzym zur Reduktion von Prolin und Lysin zu Hydroxyprolin bzw. Hydroxylysin. Diese beiden Aminosäuren tragen wesentlich zur Fibrillisierung von Kollagen bei [93]. Dexamethason ist ein entzündungshemmendes Glucokortikoid-Hormon, das in humanen mesenchymalen Stammzellen und anderen Zellen zur Verstärkung der osteogenen Differenzierung führt [94].

Auf dem Gebiet der Knochen-Regeneration werden große Anstrengungen unternommen, dreidimensionale Strukturen zu entwickeln die sowohl eine optimale *in vitro* Ausbildung von Knochengewebe als auch eine *in vivo* Regeneration von Knochendefekten realisieren. Wie auch zur Züchtung anderer Gewebe werden Stützgerüste aus organisch abbaubaren Polymeren, wie PLLA oder Epsilon-Caprolacton/Tricalcium Phosphat eingesetzt. Oft werden

dabei Collagen oder Fibrin integriert, welche aufgrund spezifischer Bindesequenzen für Integrine eine bessere Adhäsion von Zellen bewirken. Die zusätzliche Einbindung von BMP-2 in die Stützgerüste führte zur vollständigen Heilung eines Knochendefekts in Ratten, ohne BMP-2 wurde signifikant weniger Knochenbildung nachgewiesen [95]. Die Nutzung von Glykosaminoglykanen in Stützgerüsten führt darüber hinaus zu einer langanhaltenden und kontrollierten Freisetzung, und damit zu verstärkter Aktivität von BMP-2. So wurde gezeigt, dass BMP-2 geladene, Heparin-konjugierte PLGA Stützgerüste *in vitro* für mindestens 14 Tage, im Gegensatz zu nur drei Tagen ohne Heparin, zu erhöhter Alkalischer Phosphatase (ALP) Aktivität führten. *In vivo* wurde dies durch 9 fach stärkere Knochenbildung und signifikant höheren Kalzium-Gehalt durch Heparin-Einbindung bestätigt [96]. Breite Anwendung finden auch Heparin-konjugierte Nanopartikel, die ebenfalls zu verzögerter Freisetzung von BMP-2, und damit verbundener verstärkter osteogener Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen führten [97]. Als weiteres Glykosaminoglykan findet Chondroitin-Sulfat Anwendung zum kontrollierten Freisetzen von BMPs [98]. Neben Glykosaminoglykanen werden aber auch natürliche Polysaccharide für diese Anwendung genutzt. Dabei wird vor allem Chitosan in der regenerativen Medizin und Knochenregeneration eingesetzt. [99,100]. So wird es z.B. in Form von Chitosan-Mikro-Kugeln, die in Hydroxyapatid/Collagen/PLLA Stützstrukturen eingebettet sind, zur zeitlich kontrollierten Freisetzung von BMP-2 verwendet [101].

1.4. Regulierung der Aktivität von Wachstumsfaktoren durch exogen applizierte Glykosaminoglykane

Im Bereich der Gewebezüchtung und der medizinischen Forschung gibt es verschiedene Ansätze, durch die Zugabe exogener GAG die Wirkung von Wachstumsfaktoren zu beeinflussen. Wenige Ergebnisse liegen bisher jedoch über die Wirkung unterschiedlich derivatisierter GAGs und GAG-analoger Verbindungen auf die Aktivität von Mitgliedern der BMP-Familie vor. Das Anliegen der Nutzung exogen applizierter GAGs ist einerseits die Verbesserung der Interaktion des Wachstumsfaktors mit seinem Rezeptor, andererseits aber auch eine längere Halbwertszeit der Wachstumsfaktoren. Im Fall von Krankheitsbildern ist es dagegen oftmals erwünscht die Wirkung der Wachstumsfaktoren zu unterdrücken, um z.B. Prozessen wie der Angiogenese in Karzinomen entgegenzuwirken [102].

Eine wichtige Einflußgröße der Wirkung von GAGs ist, neben dem Derivatisierungsmuster, auch die Molekülgröße. Übereinstimmend mit Kristallstruktur-Analysen des FGF:Heparan-Sulfat:FGFR-Komplexes, in welchem zwei HS-Decasaccharide in den Bindungstaschen

eingeschlossen sind [33] wurde gezeigt, dass nur Deca- und Dodecasaccharide, jedoch keine kleineren Oligosaccharide die Aktivität von FGF-2 in HSPG-freien Zellen erhöhen. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass der Grad der 6-*O*-Sulfatierung, bei ansonsten konstanter 2-*N*- und 2-*O*-Sulfatierung, entscheidend für die Aktivität von FGF-2 ist. Niedrige 6-*O*-Sulfatierung unterdrückte die Proliferation, ansteigende 6-*O*-Sulfatierung führte zu einem graduellen Ansteigen der FGF-2-induzierten mitogenen Aktivität. [103]. Die Bindung von FGF-2 an einen immobilisierten FGFR1-Rezeptor wurde durch Heparin aus Schweinedarm, welches einen hohen Sulfatierungsgrad aufweist, nicht aber durch Heparan-Sulfate aus der Aorta des Rindes (geringer Sulfatierungsgrad), verstärkt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass N/O-desulfatiertes Heparin nahezu keine Bindung, N-acetyliertes Heparin eine relative geringe Bindung, aber übersulfatiertes, N-acetyliertes Heparin die gleiche Bindung wie natürliches Heparin aufweist [104]. Demgegenüber zeigten andere Studien, dass exogen appliziertes Heparin die Bindung von FGF-2 an Proteoglykane der Zelloberfläche und an den FGF-Rezeptor sowie die mitogene Aktivität von Endothelzellen konzentrationsabhängig unterdrückt, dabei aber gleichzeitig den Abbau von FGF-2 durch Proteasen verhindert. Hier zeigte unfraktioniertes Heparin von 13 kDa eine höhere Aktivität als niedermolekulares Heparin (4 bzw. 2 kDa). [105].

Für BMP-7 wurde nachgewiesen, dass nur intaktes, nicht aber 2-*N*-, 2-*O*-, 6-*O*-desulfatiertes Heparin mit hoher Affinität an den Wachstumsfaktor bindet aber gleichzeitig die für den BMP Signalweg erforderliche Phosphorylierung von Smad in ROS 17/2.8 Osteoblasten mit einer Konzentration von 10 µg/ml unterdrückt [81]. An C2C12 Myoblasten wurde dagegen nachgewiesen, dass Heparin in niedrigen Mengen bis 2 µg/ml die BMP-2-induzierte Alkalische Phosphatase Aktivität erhöht, höhere Dosen bis 2 mg/ml aber wieder zu einer Unterdrückung der osteogenen Differenzierung führten [106]. Neben einer möglichen Beeinflussung der Formierung des Wachstumsfaktor:Rezeptor Komplexes haben vielfältige Studien gezeigt, dass die Anwesenheit von Heparin zu einem Schutz vor proteolytischer Aktivität, Säure und Hitze führt und damit eine wesentlich verlängerte Halbwertszeit der Wachstumsfaktoren bewirkt [107,108].

1.5. Regulierung der Aktivität von Wachstumsfaktoren durch exogen applizierte GAG-analoge Verbindungen

Die Nutzung natürlicher GAGs wie Heparin oder Chondroitin-Sulfat ist mit einer Reihe von Nachteilen verbunden. Neben aufwendiger Extraktion aus Organen, was neben ökonomischen auch ethische Fragen aufwirft, muss darüber hinaus mit Infektionen und immunologischen

Reaktionen bei deren Anwendung im Patienten gerechnet werden. Ein wesentlicher Nachteil von natürlichen GAG ist auch, dass sie sich in Abhängigkeit von ihrer biologischen Herkunft (Spezies, Organ) hinsichtlich des Substitutionsmusters stark unterscheiden. Selbst zwischen unterschiedlichen Chargen gleicher Herkunft können Heterogenitäten auftreten [25]. Es ist darüber hinaus bekannt, dass die Langzeit Anwendung von Heparin zu verzögerter Knochenheilung und gesteigertem Risiko von Osteoporose führt. [109,110]. Deshalb wurde nach Möglichkeiten gesucht, Moleküle zu synthetisieren, die einerseits weniger variabel in der biologischen Wirkung, andererseits aber spezifische Substitutionsmuster hinsichtlich der Interaktion mit Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren aufweisen. In verschiedene Ausgangsmaterialien wurden deshalb Substituenten in verschiedene Positionen und mit unterschiedlichem Substitutionsgrad (DS) eingebracht, wobei häufig Sulfat-Gruppen eingesetzt wurden.

GAG-analoge Substanzen werden in der medizinischen Grundlagenforschung häufig zur Unterdrückung der Aktivität von Wachstumsfaktoren eingesetzt. Ziel ist es dabei, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen zu inhibieren, welche z.B. an der Entstehung und Ausbreitung von krankhaftem Gewebe (Tumorstadium) beteiligt sind. So wurde gezeigt, dass sulfatierte Polymere wie Poly-4-Styrenesulfonat oder Poly-Vinylsulfonat zu einer Unterdrückung der Bindung von FGF-2 an seinen Rezeptor und an Zelloberflächen HSPG führen, was mit der Inhibierung endothelialer Zellproliferation (Angiogenese) verbunden war. 10 ng/ml der Substanzen bewirkten eine leichte Inhibierung der beschriebenen Effekte, 100 µg/ml führten zu einer vollständigen Unterdrückung der Zellproliferation [111]. In der Mehrzahl wurden jedoch natürlich vorkommende Polysaccharide zur Synthese von GAG-analogen Substanzen genutzt. Das K5 Polysaccharide von *Escherichia coli*, welches die gleiche Struktur wie der Heparin-Vorläufer N-Acetyl-Heparosan aufweist, wurde an 2-O, 3-O, 2-N- oder 6-O-Position sulfatiert. Höhere Sulfatierungsgrade, aber nicht zwingend die höchsten, führten mit 10 µg/ml zur Unterdrückung der Bindung von FGF-2 an den FGFR Rezeptor und mit 1 bis 300 µg/ml zur Unterdrückung der mitogenen Aktivität in fötalen Endothel-Zellen. Dabei korrelierten die beschriebenen Effekte mit der Bindungsstärke der sulfatierten Polysaccharide an FGF-2 [102].

In der Gewebezüchtung dagegen ist es erwünscht eine Verstärkung der Wirkung von Wachstumsfaktoren und damit eine Verstärkung der Zellteilung oder Differenzierung zu erzielen. In Untersuchungen mit 3T3-L1 Fibroblasten führten sulfatierte Dextrane und sulfatiertes (1-6)- α -D-Mannopyranan in Konzentration von 1 - 40 µg/ml, zu einer Verstärkung der FGF-1 induzierten mitogenen Aktivität. Diese erhöhte sich dabei mit ansteigendem Sulfatierungsgrad und überstieg die von nativem Heparin. [112]. Auch sulfatierte Polymere führten mit dem

gleichen Zelltyp zu einer Beeinflussung der mitogenen Aktivität. In Konzentrationen von 1 – 40 µg/ml verstärkte Poly-Vinylsulfat die Proliferation, Poly-Acrylsäure und Poly-Styrenesulfat führten zur Unterdrückung, Carboxymethyl-Cellulose hatte dagegen keinen Einfluss auf die FGF-induzierte Proliferation [113]. Verschiedene Untersuchungen zeigten aber auch, dass GAG-analoge Verbindungen, abhängig von der Konzentration, sowohl zu einer Verstärkung als auch Unterdrückung der Wirkung von Wachstumsfaktoren führen können. An C2C12 Mausmyoblasten wurde nachgewiesen, dass 2-O/6-O- und 6-O-sulfatiertes, nicht aber ausschließlich 2-O-sulfatiertes Chitosan zu einer Verstärkung der BMP-2-induzierten osteogenen Aktivität in Konzentrationen zwischen 0,3 bis 10 µg/ml führte. Höhere Konzentrationen bewirkten jedoch eine Unterdrückung der osteogenen Aktivität. [85]. Aber nicht nur sulfatierte Polysaccharide, sondern auch carboxymethyliertes Dextran mit einem hohen Anteil an Benzylamid-Gruppen führte zu erhöhter BMP-2-induzierter osteogener Aktivität, welche wiederum die von nativem Heparin überstieg [114]. Ähnlich natürlichen Glykosaminoglykanen, wurde mit GAG-analogen Verbindungen ein Schutz der Wachstumsfaktoren vor proteolytischem Abbau nachgewiesen [114,115].

1.6. Chitosan und Cellulose als Ausgangsmaterialien für GAG-Analoga

Cellulose und der Ausgangsstoff für Chitosan, Chitin, gehören zu den am häufigsten in der Natur vorkommenden Polysacchariden. Als Hauptbestandteil der Zellwand von Pflanzen (Cellulose), sowie Pilzen und des Exoskeletts von Arthropoden (Chitin) weisen beide sehr hohe Molekulargewichte auf. Beide sind unverzweigt und aus aus β -1,4 glykosidisch verbundenen D-Glykose-Einheiten aufgebaut, Chitin trägt im Unterschied zu Cellulose eine N-Acetyl-Gruppe in C₂-Position. In der vorliegenden Arbeit wurden Cellulose und Chitosan chemisch modifiziert und auf ihre kooperative Wirkung mit Wachstumsfaktoren untersucht. An dieser Stelle soll deshalb kurz auf chemische Eigenschaften sowie Anwendungen in Forschung und Industrie eingegangen werden.

1.6.1. Cellulose

Cellulose liegt kristallin vor und ist in Wasser sowie anorganischen und organischen Säuren wie Salzsäure, Essigsäure oder Glutharsäure kaum löslich. In organischen Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (DMF), Dimethylacetamid (DMAc) oder Dimethylsuloxid (DMSO) liegt Cellulose dagegen im gequollenen Zustand vor. Chemische Reaktionen der Cellulose laufen

deshalb unter quasi-homogenen Bedingungen ab [116]. Cellulose wird häufig als Material für Filter [117] oder Membranen zur Hämodialyse [118] eingesetzt. Derivate wie Cellulose-Acetat oder Nitrocellulose finden breite Anwendung in der Herstellung enzymatischer Membranen und Reaktoren, oder zur Bindung von Proteinen und DNS [119,120]. Auch als Bestandteil dreidimensionaler Stützgerüste wurde Cellulose schon zusammen mit Chitosan und Hydroxylapatit in der Knochenregeneration eingesetzt [121,122]. Cellulose-Sulfat (CS) zeichnet sich gegenüber nativer Cellulose durch eine wesentlich höhere Löslichkeit in Wasser sowie eine bessere enzymatische Abbaubarkeit aus [123,124]. CS finden breite Anwendung in der Biotechnologie und Pharmazie, wie z.B. bei der Verkapselung von Enzymen und Zellen [125,126] sowie als Inhibitor von HI-Viren [127]. Carboxymethyl- und Carboxyl-Cellulose dagegen spielen eine wichtige Rolle in der Papier-, Kosmetik- und Pharma-Industrie [128]. Für die Herstellung von Stützgerüsten oder als Zusatz zu Zellkulturen wurden substituierte Cellulosen bisher jedoch noch nicht eingesetzt. Cellulose-Derivate, welche sowohl Sulfat- als auch Carboxymethyl- oder Carboxyl-Gruppen tragen, wurden bereits synthetisiert [129] finden aber bislang noch keine Anwendung in der biomedizinischen Forschung oder Industrie.

1.6.2. Chitosan

Chitosan wird durch Deacetylierung von Chitin erzeugt. Liegen im Gesamtmolekül mehr als 50% deacetylierte Monomere vor, spricht man von Chitosan. Für Synthesezwecke werden meist Chitosane mit einem Deacetylierungsgrad von mehr als 95% eingesetzt. Die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln ist durch die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminogruppen und Hydroxylgruppen sehr gering [130]. In organischen Säuren wie Dichloressigsäure oder Ameisensäure kann Chitosan jedoch vollständig gelöst werden. Eine weitere Verdünnung in organischen Lösungsmitteln wie DMF ist dann möglich [131].

Chitosan zeichnet sich besonders durch antimikrobiologische Aktivität, gute Biokompatibilität und niedrige Toxizität aus. Das führte zu seiner Anwendung in vielen Gebieten der Lebensmittel-, biomedizinischen sowie pharmazeutischen Industrie. [132,133,134]. Chitosan-Sulfate dagegen zeigen antikoagulante, antivirale und antioxidative Eigenschaften und finden deshalb ähnliche Anwendung wie Cellulose-Sulfate [135,136,137]. Chitosan findet darüber hinaus, wie schon in vorherigen Kapiteln beschrieben, breite Anwendung bei der Herstellung von dreidimensionalen Stützgerüsten [138], sowie Mikro- oder Nanostrukturen für die

Gewebezüchtung [139]. Chitosan-Sulfate oder gar Chitosane mit Mischfunktionalisierung (Sulfat-, Carboxymethyl- oder Carboxyl-Gruppen) wurden bislang nicht zur Herstellung dreidimensionalen Stützgerüste verwendet. Erste Untersuchungen zur Beeinflussung der BMP-2-induzierten osteogenen Aktivität durch regioselektiv sulfatierte Chitosane [85] oder dem Schutz und der Freisetzung von FGF-2 durch carboxymethylierte/sulfatierte Chitosane liegen vor [140]. Die unterschiedliche Wirkung der Derivate resultierte dabei lediglich aus der unterschiedlichen regioselektiven Anordnung der Substituenten, aber nicht aus dem Grad der Substitution an den einzelnen Positionen.

2. Ziel der Arbeiten

Auf der Zelloberfläche und in der extrazellulären Matrix lokalisierte Glykosaminoglykane übernehmen vielfältige Funktionen in der Regulierung von Aktivität, Halbwertszeit und räumlicher Verteilung von Wachstumsfaktoren. Sie werden deshalb in der Gewebezüchtung eingesetzt, um die Aktivität von Wachstumsfaktoren zu steuern. Entscheidenden Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen beiden Molekülen hat das Substitutionsmuster der Glykosaminoglykane. Durch die gezielte, regioselektive Substitution von Cellulose und Chitosan mit Sulfat-, Carboxyl- und Carboxymethyl-Gruppen sollen Glykosaminoglykan-analoge Verbindungen hergestellt werden, die optimale Derivatisierungsmuster für die Beeinflussung der Aktivität von Wachstumsfaktoren besitzen.

Die Effekte der synthetisierten Verbindungen auf die Aktivität von Wachstumsfaktoren sollen in einem *in vitro* System, im Vergleich zu natürlichen Glykosaminoglykanen wie Heparin untersucht werden.

Neben der physikochemischen Interaktion zwischen Polysaccharid und Wachstumsfaktor, sollen vor allem zelluläre Prozesse wie Vitalität, Proliferation und Differenzierung für die Beurteilung der Wirksamkeit der synthetisierten Derivate herangezogen werden. Die Effekte der zu untersuchenden Polysaccharide hängen dabei auch entscheidend von der Konzentration ab, die Verbindungen werden deshalb über einen breiten Konzentrationsbereich untersucht.

Ziel ist es letztendlich Zusammenhänge zwischen Derivatisierungsmuster, Konzentration und Molekülgröße der synthetisierten Derivate auf die Aktivität verschiedener Wachstumsfaktoren zu untersuchen, um weitere Einblicke in die Funktion von glykosaminoglykan-analogen Verbindungen in der Vermittlung und Steuerung von inter- und intrazellulären Signalen zu erlangen.

3. Material und Methoden

3.1. Synthese derivatisierter Cellulosen

Zunächst erfolgte die Sulfatierung, anschließend Carboxylierung bzw. Carboxymethylierung. Die Reaktionsschemata der einzelnen Syntheseschritte sind in Abbildung 6 dargestellt.

Ausgangsmaterialien

- Native Cellulose (AC), zu 97.0% bestehend aus Alpha-Cellulose mit einem Polymerisationsgrad (DP) von 1180 (Buckeye Technologies Inc., Memphis, USA).
- Mikrokristalline Cellulose (MCC), durch Säurehydrolyse chemisch abgebaute Cellulose mit einem DP von 275-277 (J. Rettenmaier & Söhne GmbH Rosenberg, Deutschland).
- bestrahlte Cellulose (IC) mit einem DP von 113, ein Material, das durch Elektronenbestrahlung in der Molmasse verringert wurde.
- Cellulose-2.5-Acetat (C2.5A) mit einem Substitutionsgrad von 2.5 der Acetat-Gruppen (M&G Gruppe, Verbania-Pallanza, Italien).

Alle Ausgangsmaterialien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

3.1.1. Sulfatierung von Cellulose

A) Acetosulfatierung: 10 g Cellulose wurde in 500 ml entwässertem Dimethylformamid (DMF) bei Raumtemperatur für 14 h gequollen (quasi-homogen). Chlorschwefelsäure oder Schwefelsäure und Essigsäureanhydrid wurden in Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylacetamid (DMAc) gelöst. Dieses Gemisch wurde der Cellulose-Suspension tropfenweise unter starkem Rühren für 15 min zugegeben. Nach Erwärmen auf 50°C für 5 h wurde auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt und in einer gesättigten Lösung von entwässertem Natriumacetat in Ethanol gefällt. Nach Waschen des Präzipitates mit 4% Natriumacetat/Ethanol wurde mit 1 M NaOH/Ethanol für 15 h deacetyliert. Der pH-Wert wurde mit Essigsäure/Ethanol (50/50, w/w) auf 8.0 eingestellt. Nach Waschen mit Ethanol wurde das Produkt zentrifugiert, in Wasser gelöst, filtriert, in deionisiertem Wasser dialysiert und lyophilisiert. Die Reaktionsparameter Molverhältnis von Sulfatierungsmittel bzw. Acetylierungsmittel zu Anhydro-Glucose-Einheiten (AGU), Temperatur und Reaktionsdauer wurden variiert.

B) Direkte Sulfatierung: Cellulose wurde für 14 h in DMF suspendiert (quasi-homogen). C2.5A wurde in DMF gelöst (homogen). Nach tropfenweiser Zugabe von Chlorschwefelsäure in verschiedenen Konzentrationen (siehe Ergebnisse) in die Suspension bzw. Lösung (C2.5A) für 15 min wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur (RT) für verschiedene Zeiten inkubiert. Nach Fällung in einer gesättigten Lösung von entwässertem Natriumacetat (in Ethanol), waschen mit 4% Natriumacetat/Ethanol und Deacetylierung mit 1 M NaOH/Ethanol erfolgten alle anderen Schritte analog zur Acetosulfatierung.

3.1.2. Einführung von Carboxylgruppen in Cellulose-Sulfat

Die Carboxylierung erfolgte homogen durch Oxidation freier OH-Gruppen an zuvor synthetisierten Cellulose-Sulfaten mit einem 6-*O*-Sulfatierungsgrad (DS_{S6}) < 1. Dazu wurde 1 g CS in 60 ml Wasser gelöst. Die Oxidationsreagenzien, bestehend aus 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-Oxyl Radikal (TEMPO), NaBr und NaOCl wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Ergebnisse) unter Rühren in Wasser vollständig gelöst. Das Oxidationsreagenz wurde langsam zur CS-Lösung gegeben und der pH-Wert mit NaOCl auf 10,5 eingestellt. Die Reaktion wurde für 4 h durchgeführt und der pH-Wert von 10,5 mit 0,5 M NaOH konstant gehalten. Nach Stoppen der Reaktion mit 5 ml Methanol wurde der pH-Wert mit 0,5 M HCl auf 7,5 eingestellt. Das Reaktionsprodukt wurde mit 300 ml Ethanol gefällt und zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 80% Ethanol gewaschen, in Wasser gelöst, filtriert, dialysiert und lyophilisiert.

3.1.3. Carboxymethylierung von Cellulose-Sulfat

Die Carboxymethylierung erfolgte an CS mit einem Sulfatierungsgrad an 6-*O*-Position (DS_{S6}) < 1. Die Carboxymethylierung erfolgt in 2-*O*-, 3-*O*- und nicht sulfatierte 6-*O*-Position. Zur Reaktion wurden 1.5 g CS in 75 ml Isopropanol (20 g/l) oder 175 ml Dimethylsulfoxid (8,6 g/l) unter Rühren für 0,5 h suspendiert (quasi-homogen). Nach tropfenweiser Zugabe von 22 ml 3,75 M NaOH wurde die Lösung für 3 h gerührt. Dann wurden 3,85 g Chloressigsäure in fester Form zugegeben und die Temperatur wurde für 5 h bei 55°C konstant gehalten. Nach abkühlen auf RT wurde das Reaktionsgemisch in 5 Volumen Ethanol (83,3 %) unter Rühren für 0,5 h präzipitiert. Nach Zentrifugieren wurde das Präzipitat in Wasser gelöst und der pH-Wert mit 50% Essigsäure auf 7,5 eingestellt. Danach wurde nochmals präzipitiert, zentrifugiert und 3 x in 80% Ethanol gewaschen, sowie in Wasser gelöst, filtriert, dialysiert und lyophilisiert.

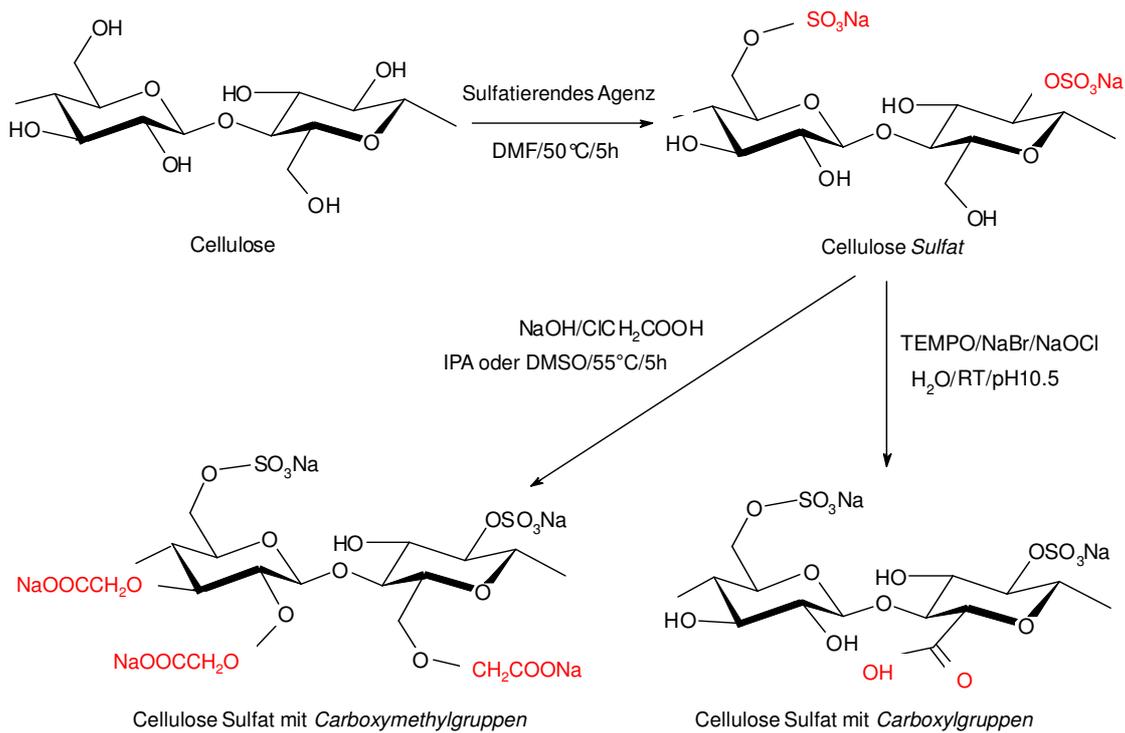


Abbildung 6: Synthese-Wege zur Herstellung von Cellulose-Sulfat, carboxylierten und carboxymethylierten CS

3.2. Sulfatierung von Chitosan

Materialien

Chitosan mit einer Viskosität von 145 mPas und einem Deazatylierungsgrad von 95.7% wurde von Heppe Medical Chitosan GmbH (Halle, Deutschland) erworben.

Homogene Sulfatierung von Chitosan

Es wurde 1 g Chitosan in verschiedenen Mengen Ameisensäure (siehe Ergebnisse) für 3 h bei RT gelöst. Nach Zugabe von 156 ml DMF wurde für 2h gerührt. Chlorschwefelsäure in DMF wurde tropfenweise über 30 min zugegeben und für 3 h bei 50°C inkubiert. Für die Acetosulfatierung wurde Chlorschwefelsäure und Essigsäureanhydrid in verschiedenen Konzentrationen und Verhältnissen in DMF zugegeben. Nach Abkühlen auf RT, wurde die Lösung in 600 ml einer gesättigten alkalischen Lösung von wasserfreiem Natriumacetat dekantiert. Das Präzipitat wurde nach Waschen in Ethanol/Wasser (8/2, v/v) und

Deformylierung mit 1 M NaOH/Ethanol in Wasser gelöst. Nach Einstellen des pH Wertes auf 7,5 wurde gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert.

Nicht-homogene Sulfatierung von Chitosan

1 g Chitosan wurde in 1% Essigsäure suspendiert, danach wurden 100 ml Methanol zugegeben. Nach weiterer Zugabe von 100 ml 4% Natriumhydrogencarbonat wurde die Lösung für 2 h gerührt. Nach Waschen in Methanol und DMF wurde das aktivierte Chitosan in 50 ml DMF dispergiert. Für die direkte Sulfatierung wurde Chlorschwefelsäure in DMF in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und bei 50°C für 3 h inkubiert. Das entstandene Chitosan-Sulfat wurde durch Präzipitierung in 250 ml einer gesättigten alkalischen Lösung von wasserfreiem Natriumacetat gewonnen, anschließend in Wasser gelöst, auf pH 7.5 eingestellt, gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert.

3.3. Charakterisierung der Reaktionsprodukte

NMR-Spektroskopie

Für alle NMR-Analysen wurden die Proben in D₂O gelöst. Die ¹³C-NMR Spektren wurden bei RT mit einem Bruker DFX 400 Spektrometer (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Deutschland) bei einer Frequenz von 100.13 MHz, 30° Pulslänge, 0.3 s Aquirierungszeit und einer Relaxationsverzögerung von 3 s aufgenommen. Es wurden zwischen 5.000 und 20.000 Scans akkumuliert.

Für die ¹H NMR wurden die Spektren mit einem Bruker Advance III 600 Spektrometer (Bruker Optik GmbH) bei RT bei einer Frequenz von 600 MHz, 2.6 s Aquirierungszeit und einer Bandbreite von 12335 Hz durchgeführt. Es wurden 16 Scans akkumuliert.

Festphasen CP/MAS ¹⁵N NMR wurde mit einem Bruker Avance 400 WB Spektrometer (Bruker Optik GmbH) bei RT mit einer Kontaktzeit von 2 ms, einer Aquirierungszeit von 20 ms und einer Durchlaufbreite von 20325 Hz durchgeführt. Es wurden 80000 Scans akkumuliert.

Elementaranalyse

Der Schwefelgehalt wurde mit einem Elementar-Analyse-Gerät Eltra CS 500 der Firma Neuss (Deutschland) gemessen. Der Gehalt an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff wurden mit dem Elementar Analyse Gerät Vario-El (Elementar, Hanau, Deutschland) determiniert. Der Gesamt DS_S wurde nach folgender Formel berechnet: Total DS_S = (S%/32)/(N%/14).

Raman-Spektroskopie

Die Fourier-Transformierten-Raman-Spektren aller Proben wurden mit einem Bruker MultiRam-Spektrometer (Bruker Optik GmbH) mit einer Flüssig-Stickstoff gekühlten Ge-Diode als Detektor aufgenommen. Ein cw-Nd-YAG-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 1064 nm wurde als Lichtquelle zur Erzeugung der Raman-Streuung verwendet. Die Spektren wurden über eine Bandbreite von 3500-100 cm⁻¹ mit einer Spektralauflösung von 3 cm⁻¹ aufgenommen. Jede Probe wurde bei einer Laserleistung von 100 mW und einer Auflösung von 3 cm⁻¹ zweimal mit je 400 Scans gemessen. Aus beiden Messungen wurde ein mittleres Spektrum ermittelt, welches für die qualitative und quantitative Auswertung mit der Spektroskopiesoftware OPUS Ver. 6.5 (Bruker Optik GmbH) im Wellenzahlbereich von 3070 – 2670 cm⁻¹ genutzt wurde.

3.4. Molmassenbestimmung

Die Molmassenbestimmung wurde mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) mit einer PSS Suprema 3000 Einheit und 100 Å Säulen (Polymer Standard Service GmbH, Mainz, Deutschland) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem 410 Brechungsindex-Detektor (Waters Corporation, Milford, MA, USA), wobei 0.1 mol/l NaCl als mobile Phase eingesetzt wurde. Die Säulen wurden mit Pullulan-Standarverbindungen kalibriert (Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz) und die Analyse der Daten erfolgte mit einer Empower Pro-Software (Waters Corporation, MA, USA). Das mittlere Molekulargewicht wurde nach folgenden Formeln ermittelt.

$$\text{Zahlenmittel: } M_n = \sum_{i=1}^f N_i M_i / \sum_{i=1}^f N_i$$

$$\text{Gewichtsmittel: } M_w = \sum_{i=1}^f N_i M_i^2 / \sum_{i=1}^f N_i M_i$$

Die mittlere Anzahl der Monosaccharid-Einheiten ergab sich aus: $DP_n = M_n / MO$ (Molmasse der mittleren Monosaccharid-Einheit).

N und M stehen für die Größe unterschiedlicher Molfraktionen, f für die Anzahl der Moleküle der einzelnen Molfraktionen.

3.5. Untersuchung der Bindungsaffinität

Es wurden je Probe 25 ng der Wachstumsfaktoren FGF-2 oder BMP-2 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit 50 µl Heparin-Agarose-Mikropartikeln (Fluka, Saint Louis, USA) und 70 µl Phosphat-gepufferte Saline (PBS) pH 7,4 für 30 min bei Raumtemperatur und 200 rpm inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 6000 rpm für 1 min und zweimaligem Waschen mit PBS, wurde mit PBS auf das ursprüngliche Volumen der Heparin-Agarose-Mikropartikel aufgefüllt. Zu je 50 µl Heparin-Agarose-Mikropartikeln wurden 50 µl der derivatisierten Cellulosen bzw. Heparin zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml sowie 20 µl PBS zugegeben. Dann wurde wiederum für 30 min bei RT und 200 rpm inkubiert, wobei das kompetitive Ablösen der Wachstumsfaktoren von den Heparin-Agarose-Mikropartikeln durch die zugegebenen Polysaccharide erfolgte. Nach Zentrifugieren bei 6000 rpm für 1 min wurde der Überstand (Polysaccharide + freigesetzter Wachstumsfaktor) auf Kavitäten einer Slot-Blot Apparatur (Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt und durch Anlegen eines Vakuums auf eine Cellulosenitrat-Membran (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) übertragen.

Nach Blocken der Membran mit 2.5% Milchpulver in 20 mM Tris Buffer, 8,8 g NaCl und 0,05% Tween 20 (TST) wurde der primäre Antikörper in TST für 1h bei RT und 20 rpm appliziert. Die folgenden primären Antikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt:

Maus-Anti-FGF2 (Sigma, Saint Louis, USA) : 1:300,

Maus-Anti-BMP-2 (R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt, Deutschland): 1:1000.

Nach 3 maligem Waschen mit TST wurde die Membran mit Peroxidase gekoppeltem sekundärem Maus-Antikörper (Jackson Immuno Research, Suffolk, USA) in einer Verdünnung von 1:3000 in TST für 1h bei RT und 20 rpm inkubiert. Nach 3 maligem Waschen in TST wurde die Membran für 5 min in ECL Plus Chemiluminescens-Reagenz (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) inkubiert. Nach Entfernen des Reagenz wurde die Chemilumineszens mit einer CCD Kamera (Diana 2, Raytest, Straubenhardt, Deutschland), in Abhängigkeit des verwendeten primären Antikörpers, für 10-30 min detektiert. Die densitometrische Quantifizierung der Signale erfolgte mit ImageJ Software

(<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>). Die Experimente wurden in zwei unabhängigen Blots mit jeweils zwei Datenpunkten pro Polysaccharid durchgeführt, und Mittelwerte sowie Standardabweichungen bestimmt.

3.6. Bestimmung der proteolytischen Stabilität von FGF-2

3.6.1. Proteolytischer Verdau

Es wurden 4,5 µl FGF-2 Lösung (50 µg/ml in PBS pH 7.4, Invitrogen) mit 4,5 µl ansteigender Konzentrationen der derivatisierten Cellulosen bzw. Heparin in PBS pH 7.4 und 4,5 µl frisch hergestellter Trypsin-Lösung (10 µg/ml in Tris-HCl pH 7.5) für 16 h bei 37°C inkubiert. FGF-2 ohne Polysaccharide und mit Trypsin sowie FGF-2 ohne Polysaccharide und ohne Trypsin und wurden als Negativ- bzw. Positiv-Kontrollen verwendet. Die Proben wurden mit 4,5 µl Probenpuffer (0,375 M Tris-HCl pH 6,8; 12% SDS; 60% Glycerol; 0,015 % Bromphenol-Blau und 1% β-Mercaptoethanol) gemischt und auf ein 14 % igen Polyacrylamid-SDS-Glycin-Gel (Serva, Heidelberg, Deutschland) aufgetragen. Zunächst wurden die Proben für 10 min bei einer Stromstärke von 10 mA und anschließend für 90 min bei 20 mA und 125 V in Laemmli-Puffer (25 mM Tris-HCl pH 8,8; 192 mM Glycin; 0,1% SDS) in einer vertikalen Gel-Kammer (NOVEX, Mannheim, Deutschland) aufgetrennt. Die Protein-Banden wurden durch Silber-Färbung (Serva) nach den Angaben des Herstellers visualisiert. Nach Aufnahme des Gels in einem Gel-Imager (Intas, Göttingen, Deutschland) wurden die Banden mittels Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>) densitometrisch ausgewertet.

3.6.2. Inhibierung von Trypsin durch Polysaccharide

Zur Untersuchung, ob die Trypsin-Reaktion durch die Polysaccharide inhibiert wird, wurde N-α-Benzoyl-DL-Arginin-p-Nitroanilin Hydrochlorid (BAPNA) verwendet. Durch Abspaltung von p-Nitroanilin durch Trypsin erfolgt ein Farbumschlag. Es wurden 500 µl BAPNA (100 µg/ml in 20 mM CaCl₂) mit 250 µl ansteigenden Konzentrationen der Polysaccharide in PBS pH 7,4 und 250 µl Trypsin (10 µg/ml in Tris-HCl pH 7.5) für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 385 nm im UV/VIS Spectrophotometer (Specord 200, Analytik Jena, Deutschland) quantifiziert. Eine Hemmung von Trypsin durch die Polysaccharide führte zu einer verringerten Absorption bei 385 nm.

3.7. Zellen und Zellkultivierung

3.7.1. Zellen

In den biologischen Untersuchungen wurden Zell-Linien und primäre Zellen verwendet. Alle Zellen wurden adhärent mit Flüssig-Nährmedien der Firma Biochrom AG (Berlin, Deutschland) bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert.

Zell-Linien:

3T3-L1 Maus Fibroblasten sind ein Unterstamm von 3T3 Fibroblasten (Swiss albino), welche ursprünglich aus einem Maus-Embryo im Jahr 1962 isoliert wurde. 3T3-L1 Fibroblasten wurden über die Firma ATTC (Produkt Nr.: CRL-1427, American Type of Culture Collection, Manassas, VA, USA) bezogen. Die Zellen differenzieren bei Konfluenz in preadipöse oder adipöse Zellen aus. Die Kultivierung erfolgte in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM), 10% fetalem Rinderserum (FBS), 2 mM L-Gluthamin (Biochrom) und 1% Penicillin-Streptomycin-Fungizone (PSF, Promocell, Heidelberg, Deutschland).

Die Maus-Myoblasten Zelllinie C2C12 ist ein Subklon, welcher vom Maus-Stamm C31+ abstammt. Neben seiner Eigenschaft in kurzer Zeit Muskelfasern zu bilden differenziert er unter dem Einfluss von BMP-2 in eine Osteoblasten-Linie. C2C12-Zellen wurden über die Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany, Produkt Nr.: ACC 565) bezogen. Die Kultivierung erfolgte in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM), 10% FBS, 2 mM L-Gluthamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alles von Biochrom).

Die mesenchymale und multipotente Zell-Linie C3H/10T1/2 (Klon 8) zeigt osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierung unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren, Hormone und Vitamine. Die Linie neigt zur Inhibierung der Zellteilung bei Post-Konfluenz. Die Zellen wurden 1972 von einer Linie C3H embryonaler Maus-Zellen isoliert und ebenfalls von der Firma ATTC erworben (Produkt Nr.: CCL-226). Die Zellen wurden in Basal Eagle-Medium mit Earle's Salzen (BME), 10% FBS, 2 mM L-Gluthamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom) kultiviert.

Primäre Zellen:

Aus dem Knochenmark isolierte, humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden über die Tulane University (Center of Gene Therapy, New Orleans, USA) bezogen. Diese Zellen können chondrogen, osteogen, adipogen oder zu Nervenzellen differenzieren [87]. Die Zellen sind groß, mit vielen Ausläufern versehen und haben eine geringe Teilungsrate. Die Anzucht erfolgte in Alpha-Medium (α MEM) mit 16,5% FBS, 2 mM L-Gluthamin und (Biochrom) und 1% PSF (Promocell).

3.7.2. Passagieren von Zellen

Nach Absaugen des Mediums wurden die adhärenenten, semikonfluenten Zellkulturen mit 10 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen des Puffers wurden die Zellen durch Zugabe von 1,5 ml 0,25% Trypsin/0,02% EDTA abgelöst. Dabei variierte die Inkubationszeit in Abhängigkeit vom Zelltyp (hMSC 12 min, Mausfibroblasten und Myoblasten 3-5 min). Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 6 ml Medium/10% FBS gestoppt. Die Zellen wurden zur weiteren Vermehrung in Zellkulturflaschen oder für Versuche in Loch-Platten ausgesät.

3.8. Zelluläre Assays zur Bestimmung von Zytotoxizität, Proliferation und Differenzierung

3.8.1. Toxizitätsstudien

Zur Bestimmung der Toxizität wurde die Lebensfähigkeit von 3T3-L1 Maus-Fibroblasten nach Inkubation mit den Cellulose-Derivaten mittels QBlue-Assay (BioChain, Hayward, USA) ermittelt. Der Assay basiert auf der Reduktion des Farbstoffes Resazurin zum hochfluoreszierenden Resorufin durch zelluläre Reduktasen. Die derivatisierten Polysaccharide und Heparin wurden dazu in DMEM ohne Zusatz von FBS gelöst. Zusätzlich wurde 1% Insulin-Transferrin-Selen A (ITS, Gibco, New York, USA) als Serum-Ersatz zugegeben. Insulin bewirkt die Glucose- und Aminosäure-Aufnahme in die Zellen. Darüber hinaus zeigt es durch Bindung an den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-Rezeptor mitogene Effekte. Transferrin gewährleistet die Eisen-Aufnahme in die Zellen und setzt die toxische Wirkung von Sauerstoff-Radikalen herab. Selen ist ein enzymatischer Cofaktor, welcher die Glutathion-Peroxidase aktiviert und damit ebenfalls zur Detoxifizierung von Sauerstoff-Radikalen beiträgt.

Die 3T3-L1 Fibroblasten wurden mit 40.000 Zellen/Kavität in 96 Loch-Platten in DMEM/10% FBS und 1% PSF ausgesät und für 48 h kultiviert (konfluentes Wachstum). Nach Waschen mit DMEM ohne FBS wurden je 200 µl der Polysaccharide in Konzentrationen von 10 µg bis 1000 µg/ml zugegeben. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurde die Vitalität der Zellen mit dem QBlue-Assay gemessen. Die Fluoreszenz-Intensität wurde nach Anregung bei 544 nm und Emission von 590 nm mit einem Plattenphotometer (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) gemessen. Es wurden 4 Kavitäten je Derivat und Verdünnungsstufe untersucht, von denen Mittelwert und Standardabweichung berechnet wurden.

3.8.2. Bestimmung der Proliferation

Dazu wurden 3T3-L1 Fibroblasten in einer Dichte von 10.000 Zellen/Kavität mit 50% Konfluenz in schwarze 96 Loch-Platten, in DMEM mit 10% FBS und 1% PSF ausgesät. Nach 24 h Kultivierung bei 37°C wurden die Zellen mit DMEM ohne Zusatz von FBS gewaschen. Dann wurden je 200 µl der derivatisierten Cellulosen bzw. Heparin in ansteigenden Konzentrationen ohne, oder mit 10 ng/ml FGF-2 in DMEM ohne FBS zugegeben und für 48 h bei 37°C inkubiert. Die Proliferation wurde anhand des Gesamt-DNS Gehaltes mit einem Quant-iT™ PicoGreen dsDNS Quantifizierungs-Assay ermittelt (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Die Fluoreszenz-Intensität wurde mit einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 520 nm im Plattenphotometer (Fluostar Optima) gemessen. Es wurden 5 Kavitäten je Derivat und Verdünnung bestimmt, von denen Mittelwert und Standardabweichung berechnet wurden.

3.8.3. Quantifizierung der Alkalischen Phosphatase Aktivität (ALP-Aktivität)

Die Quantifizierung der Alkalischen Phosphatase Aktivität wurde mit C3H/10T1/2 und C2C12 Maus-Zellen sowie hMSC aus dem Knochenmark durchgeführt. C3H/10T1/2 Zellen wurden zunächst mit einer Dichte von $3,6 \times 10^4$ Zellen/Kavität in 96 Loch-Platten ausgesät (konfluentes Wachstum). Nach 24 h wurden BMP-2 und ansteigende Konzentrationen der Polysaccharide in BME/10% FBS, mit oder ohne Zusatz von 50 µg/ml Ascorbinsäure-2-Phosphat, 10 mM β-Glycerophosphat und 0,1 µM Dexamethason zugegeben. In späteren Experimenten zur Untersuchung ausgewählter Derivate wurden $1,5 \times 10^3$ Zellen/ Kavität in 96 Loch-Platten ausgesät. Nach vier Tagen Kultivierung (semikonfluentes Wachstum) in BME/10% FBS wurde zu Medium/10% FBS mit BMP-2, ansteigenden Konzentrationen der Polysaccharide sowie

50 µg/ml Ascorbinsäure-2-Phosphat, 10 mM β-Glycerophosphat und 0,1 µM Dexamethason gewechselt. Das Medium wurde nach 3 Tagen erneuert und die ALP-Aktivität nach nochmals drei Tagen gemessen.

C2C12 Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^4 /Kavität in 96 Loch-Platten in DMEM/10% FBS ausgesät (semikonfluentes Wachstum). Nach 24 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und zu Medium mit 2% FBS, ansteigenden Konzentrationen der Polysaccharide sowie ohne als auch mit BMP-2 in unterschiedlichen Konzentrationen gewechselt. Die Messung der ALP-Aktivität erfolgte nach 72 h.

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden mit einer Zelldichte von 1×10^3 Zellen/Kavität in 96 Loch-Platten in Alpha-Medium mit 16,5% FBS ausgesät. Nach drei Tagen (semikonfluentes Wachstum) wurde zu Alpha-Medium mit 10% FBS mit verschiedenen BMP-Konzentrationen gewechselt. Nach drei Tagen Inkubation erfolgte die Quantifizierung der ALP-Aktivität.

Bestimmung ALP-Aktivität: nach einmaligem Waschen mit 200 µl PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 40 µl 0,5 % Triton 100 in destilliertem Wasser für 30 min (RT) bei 300 rpm lysiert. Dann wurden 20 µl des Lysates in eine neue 96 Loch-Platte überführt und 40 µl einer 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat-Lösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 0,5 M 2-Amino-2-Methyl-1-Propanol Puffer (AMP) pH = 10.3 zur Bestimmung der ALP-Aktivität zugesetzt. Aufgrund der hohen ALP-Expression wurde bei C2C12 Zellen schon nach 15 min, bei C3H10T1/2 Zellen und hMSC jedoch erst nach 90 min Inkubation bei 37°C die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm im Plattenphotometer (Fluostar Optima) gemessen.

3.8.4. Bestimmung des Gesamt Protein-Gehaltes

Die Quantifizierung des Gesamt Protein-Gehaltes diente als Marker zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen. Zu den restlichen 20 µl des Zell-Lysates der ALP-Aktivitäts Bestimmung wurden 80 µl Bichinoninsäure (BCA, Pierce, Rockford, USA) mit 0,08 %Cu(II)SO₄ gegeben und für 20 min (RT) inkubiert. Die zweiwertigen Kupfer-Ionen reagieren mit Proteinen zu einwertigen Ionen, welche an Bichinoninsäure binden und einen violetten Farbumschlag bewirken. Die Absorption wurde bei 550 nm im Plattenphotometer (Fluostar Optima) gemessen.

3.8.5. Histochemische Darstellung der ALP-Aktivität

C2C12 Myoblasten wurden mit einer Dichte von $1,12 \times 10^5$ Zellen/24 Lochplatten (semikonfluentes Wachstum) in DMEM/10% FBS ausgesät. Nach 24 h wurden BMP-2 und verschiedene Konzentrationen der Polysaccharide in DMEM mit 2% FBS zugegeben. Nach 72 h wurden die Kulturen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 % Glutaraldehyd für 15 min fixiert (RT). Nach Absaugen und Waschen mit PBS wurden je Kavität 0,5 ml einer 0,17 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und 0,33 mg/ml Nitro-Blau Tetrazoliumchlorid (NBT, beide Applichem, Darmstadt, Deutschland) in 0,375 M AMP-Puffer pH 10,3 zugegeben und für 1 h im Dunkeln inkubiert. BCIP wird dabei durch die Alkalische Phosphatase hydrolysiert, was zur Bildung von 5-Brom-4-chlor-Indolyl führt, welches wiederum durch NBT oxidiert wird und in dimerisierter Form den tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo ergibt. NBT selbst wird dabei zu NBT-Formazan reduziert, wobei eine insgesamt schwarz-violette Färbung entsteht. Nach Absaugen wurde die Reaktion mit 0,5 ml 20 mM EDTA gestoppt. Anschließend wurden mikroskopische Aufnahmen im Hellfeld mit 5 fach Objektiv (Axiovert 100, Zeiss, Jena, Deutschland) angefertigt.

3.8.6. Quantifizierung der Mineralisierung

Die Quantifizierung des Ca^{2+} -Gehaltes beruht auf dem Herauslösen der Ca^{2+} -Ionen aus der mineralisierten Matrix durch HCl und anschließende Quantifizierung mittels o-Cresolphthalein-Complexon. o-Cresolphthalein-3',3''-bis-Methylenimin-di-Essigsäure ist ein EDTA-artiger Chelatbildner, welcher bei Bindung zweiwertiger Kationen einen Farbumschlag zu violett zeigt.

Embryonale C3H/10T1/2 Mauszellen wurden mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Kavität in 24-Loch-Platten (konfluentes Wachstum) in BME/10% FBS ausgesät. Nach 24 h wurde BMP-2 und verschiedene Konzentrationen der Polysaccharide bzw. Heparin in DMEM/10% FBS, mit 10 mM β -Glycerophosphat und 50 μM Ascorbinsäure-2-Phosphat zugegeben. Die Zellen wurden für 21 Tage kultiviert (jeden zweiten Tag erfolgte ein Wechsel des Mediums). Dann wurde das Medium abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 0,25 ml 0,6 N HCl wurde für 12 h bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und je 0,25 ml einer 0,16 mM o-Cresolphthalein-Complexon Lösung in 1,586 M AMP-Puffer pH 10,7 zugegeben. Die Absorption wurde bei 570 nm im Plattenphotometer (Fluostar Optima) bestimmt. Es wurden 3 Kavitäten je Derivat und Verdünnung untersucht von welchen Mittelwert und Standardabweichung berechnet wurden.

3.8.7. Histochemische Charakterisierung der Mineralisierung

Das in der extrazellären Matrix gebundene Ca^{2+} kann durch Alizarinrot sichtbar gemacht werden. Dieser rote Farbstoff besitzt neben zwei Hydroxylgruppen an einem der beiden Benzolringe auch eine Sulfatgruppe. Das Alizarin-Rot bindet dann über die Sulfat-Gruppe an die positiv geladenen Ionen Ca^{2+} -Ionen der ECM. Es kommt dadurch zu starker Rot-Färbung von Regionen mit hoher Ca^{2+} -Einlagerung.

Embryonale C3H/10T1/2 Mauseellen wurden mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen/Kavität in 12 Loch-Platten (konfluentes Wachstum) in BME/10% FBS ausgesät. Nach 24 h wurde zu DMEM/10% FBS mit verschiedenen Konzentrationen der Polysaccharide und BMP-2 gewechselt. Die histochemische Auswertung erfolgte nach 21 Tagen, wobei das Medium aller zwei Tage gewechselt wurde. Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd (Roti-Histofix, Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 15 min fixiert (RT). Nach nochmaligem Waschen mit PBS wurden je Kavität 0,5 ml 2% Alizarinrot S in destilliertem Wasser (pH 4,1 – 4,3) zugegeben und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser. Nach Zugabe von 1 ml Wasser wurden mikroskopische Aufnahmen (Axiovert 100, Zeiss, Jena, Deutschland) im Hellfeld mit 10 fach Objektiv angefertigt.

3.8.8. Lebend-Zellfärbung

Der Nachweis lebender Zellen erfolgt durch Aufnahme von Fluoreszein-Diacetat in lebende Zellen, und anschließender Spaltung dieser Substanz durch intrazelluläre Esterasen. Dadurch entsteht ein fluoreszierendes Produkt, das in der Zelle akkumuliert und fluorimetrisch nachgewiesen werden kann. Nach Absaugen des Mediums wurde 1 ml Fluoreszein-Diacetat (5 mg/ml in Aceton) auf die Zellen gegeben. Nach 5 min Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurden Aufnahmen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Jena, Deutschland) bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 520 nm angefertigt.

3.9. Nachweis osteogener Marker-Gene mit RT-PCR

Die Untersuchung der Gen-Expression wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR (Reverse-Transkription Polymerase-Ketten-Reaktion) durchgeführt. Dazu wurden C2C12 Zellen mit einer Dichte von $9,2 \times 10^4$ in 12 Loch-Platten in DMEM/10% FBS ausgesät.

Nach 12 h wurde zu DMEM mit 2% FBS, 200 ng/ml BMP-2 und verschiedenen Konzentrationen der Polysaccharide gewechselt. Nach 48 h (ca. 80% Konfluenz) wurde die Gesamt-RNA mit Trizol RNS/DNS/Protein Isolations-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach den Anleitungen des Herstellers isoliert. Die RNA Konzentration wurde durch den Quotienten der Absorptionswerte $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ im UV/Vis-Spektrometer (Specord 200, Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) bestimmt.

Die komplementäre DNS (cDNS) wurde aus 1,2 µg RNA mit RevertAid™ M-MuIV Reverser Transkriptase (Fermentas, ST.Leon-Rot, Deutschland) und OligoT Primern bei 42°C für 1 h und 70°C für 10 min synthetisiert. Die Amplifizierung der zu untersuchenden Gene erfolgte durch PCR mit TaqDNS Polymerase (Fermentas, ST.Leon-Rot, Deutschland) im Thermo-Cycler (DNS Engine, MJ Research, Waltham, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt: Zyklus 1: 95°C für 3 min, danach 30-40 sich wiederholende Zyklen mit 95°C für 30s, 56°C für 30 s und 72°C für 1 min. Abschließende Inkubation bei 72°C für 7 min und Herunterkühlen auf 4 °C.

Oligonukleotid-Primer für die in Tabelle 1 aufgeführten Gene wurden verwendet. Mit Ausnahme von Bone Sialoprotein und Runx2 (40 Zyklen) wurde die PCR mit 30 Zyklen durchgeführt. Die Proben wurden nach Abschluß der Reaktion auf ein 1 % iges Agarose-Gel mit 2 µl 1% igem Ethidiumbromid aufgetragen und bei 80 V und 40 mA für 1 h aufgetrennt. Die DNS-Banden wurden mit einem Gel-Imager (Intas, Göttingen, Deutschland) visualisiert und mit ImageJ Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>) densitometrisch ausgewertet. Es wurden 3 Kavitäten je Derivat und Verdünnung untersucht von welchen Mittelwert und Standardabweichung berechnet wurden.

Gen-Bezeichnung	Vorwärts-Primer (3'-5')	Rückwärts-Primer (3'-5')
Glycerinaldehyd-Dehydrogenase	GCACAGTCAAGGCCGAGAATG G	CAGTGGATGCAGGGATGATGTTCT
Osteocalcin	GCCCTGGCTGCGCTCTGTCTC	GATGCGTTTGTAGGCGGTCTTCA
Bone Sialoprotein	TACCGGCCACGCTACTTTCTTT	CCTCCTCTGCTTCGGCTTCTTCTC
Collagen Ia1	GATGGGTCCCCGAGGTCTGC	TTGGCACCAGTGTCTCCTTTGTTG
Runx2	TCCCCCTTCCTCTTCCCTTATCTC	TGGCTCCTCCCTTCTCAACCTCTA
Noggin	GCGAGATCAAAGGGCTGGAGTTC	TGGTTGGAGGTGGTGGGGGTAGG
Osterix	CTGGGGAAAGGAGGCACAAAGAA	AGGGGAGCAAAGTCAGATGGGTAA

Tabelle 1: Sequenz der für die RT-PCR genutzten Oligonukleotid-Primer.

4. Ergebnisse

Teil I: Chemie

4.1. Derivatisierung von Cellulosen

Die Herstellung von Cellulose-Derivaten wurde über Sulfatierung, Oxidation und Carboxymethylierung von Cellulose durchgeführt. Für eine Sulfatierung mit abgestuftem Sulfatierungsgrad (DS_S) in 6-*O*- und 2-*O*-Position wurden verschiedene Synthesewege genutzt. In Produkten mit einem Gesamt $DS_S < 1$ wurden im zweiten Syntheseschritt Carboxylgruppen bzw. Carboxymethylgruppen eingeführt.

Die Bezeichnung der Reaktionsprodukte erfolgte entsprechend des maßgeblichen Substituenten und dessen Gesamt Derivatisierungsgrad. Ausschließlich sulfatierte Cellulosen wurden mit CS-X, carboxylierte Cellulose-Sulfate mit CO-X, und carboxymethylierte Cellulose-Sulfate mit CM-X bezeichnet. Hat ein carboxymethyliertes Cellulose-Sulfat einen Carboxymethylierungsgrad von 1,47 und einen Gesamt-Derivatisierungsgrad von 1,78, heißt es CM-1.47.

4.1.1. Synthese von Cellulose-Sulfaten

Cellulose-Sulfate mit abgestuftem Sulfatierungsgrad in 2-*O*- und 6-*O*-Position konnten synthetisiert werden. Die Verteilung und der Grad der Substitution wurden mit ^{13}C -NMR ermittelt (Abb. 7b-d). Eine Sulfatierung an C_6 -Position war durch eine Verschiebung von 60 ppm (**C6**) zu 66.4 ppm (parts per million) (**C6_S**) zu erkennen, zunehmende Peak-Flächen weisen auf eine ansteigende Sulfatierung der Derivate an C_6 hin. Die Sulfatierung an C_2 -Position ist durch eine Verschiebung von 74.7 ppm (**C2**) nach 80.8 ppm (**C2_S**) sichtbar. Das unsubstituierte C_3 -Signal war bei 73.9 ppm (**C3**) zu finden. Obwohl eine leichte Zunahme der Peakfläche bei 82 ppm (**C3_S**) zu sehen war, nahm die Intensität des C_3 -Signals bei 73.9 ppm nicht ab. Der Anstieg bei 82 ppm ist deshalb auf eine breite Ausdehnung des **C2_S** Peaks zurückzuführen (Abb. 7d), folglich liegt keine C_3 -Sulfatierung vor. Signale für Acetylgruppen wurden nicht gefunden. Für Heparin (Abb. 7a) war die Sulfatierung an C_6 ebenfalls durch eine Verschiebung von 60 zu 66.4 ppm erkennbar. Die Signale für substituiertes und unsubstituiertes C_2 ergaben einen gemeinsamen Peak bei 58 ppm. Deshalb wurde die Anwesenheit von Sulfatgruppen in C_2 beider Wiederholungseinheiten durch eine Verlagerung des C_1 Signals von 102.5 ppm (**C1**) nach 99.8 und 97.2 ppm (**C1_S**) verifiziert. Eine Zuordnung der Signale zur 2-*O*- oder 2-*N*-Position war

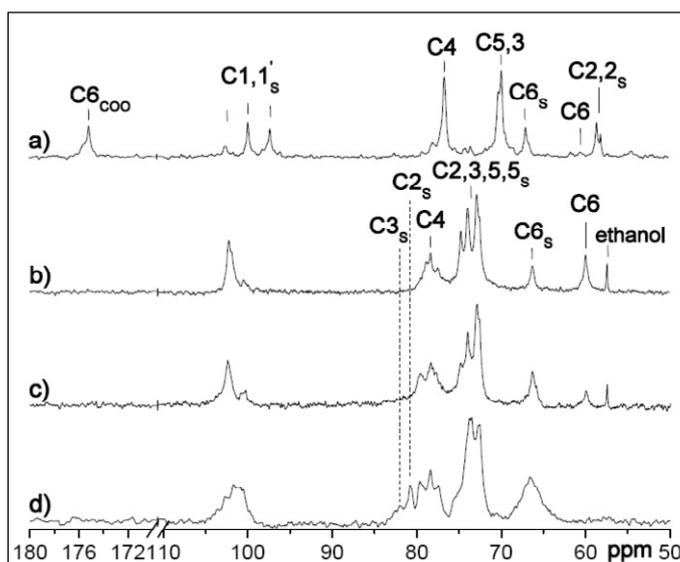


Abbildung 7. ^{13}C -NMR Spektrum (180-50 ppm) in D_2O bei RT a) Heparin, b) CS-0.37, c) CS-0.92, d) CS-1.80.

Tabelle 2: Synthese von CS mit Chlorschwefelsäure oder Schwefelsäure als sulfatierendes Agens unter verschiedenen Reaktionsbedingungen.

Proben	Ausgangs- material	Molares Verhältnis ^a	Temperatur ^b (°C)	DS_s (^{13}C -NMR) ^c			
				DS_{S6}	DS_{S2}	DS_{S3}	Total
CS-0.31	C2.5A	2,35 / 0	RT	0.24	0.07	0	0.31
CS-0.37	AC	0.85 / 8	60	0.33	0.04	0	0.37
CS-0.39	IC	0.85 / 8	70	0.36	0.03	0	0.39
CS-0.40	MCC	0.85 / 8	70	0.38	0.02	0	0.40
CS-0.43	MCC	0.55 / 8	50	0.38	0.05	0	0.43
CS-0.58	IC	0.85 / 8	50	0.52	0.06	0	0.58
CS-0.66	AC	0.85 / 8	40	0.60	0.06	0	0.66
CS-0.92	AC	3 / 8	50	0.77	0.15	0	0.92
CS-0.97	MCC	3 / 8	50	0.73	0.24	0	0.97
CS-1.57	MCC	3 / 8	50	1	0.57	0	1.57
CS-1.69	MCC	3 / 8	50	1	0.69	0	1.69
CS-1.80	MCC	4.5 / 0	RT	1	0.80	n.d.	1.80
CS-1.94	MCC	13 / 0	RT	1	0.94	n.d.	1.94

^a Molares Verhältnis in mol sulfatierendes Agens/Acetylierendes Agens pro mol Anhydro-Glucosamine-Einheit. (AGU). Schwefelsäure für CS-1.57 und CS-1.69, Chlorschwefelsäure für die anderen Derivate.

^b Alle Proben bei RT wurden mit direkter Sulfatierung hergestellt. Die Reaktionsdauer betrug 5 h. Für CS-1.57, CS-1.80 und CS-1.94 jeweils 6, 6 bzw. 3 h.

^c DS Werte der Sulfat Gruppen an Kohlenstoff C_6 , C_2 und C_3 , mit ^{13}C -NMR kalkuliert.

hierbei jedoch nicht möglich [141]. Der Peak bei 175 ppm (C_{6COO}) repräsentiert die Anwesenheit von Carboxylgruppen an C_6 (Abb. 7a).

Wie in Tabelle 2 zu sehen, erfolgte die Sulfatierung regioselektiv bevorzugt an C_6 -Position und wurde anhand der integrierten Peak Flächen der ^{13}C -NMR berechnet [142]. CS mit einem DS_{S_6} von 1,0 zeigten auch eine stark ansteigende Substitution in der C_2 -Position bis hin zu einer nahezu vollständigen C_2 -Sulfatierung für das Derivat CS-1.94 (Tab.2).

Die Einstellung des Sulfatierungsgrades konnte durch die Reaktionsbedingungen gesteuert werden. Sehr niedrige DS_S -Werte wurden unter Verwendung von Cellulose-2.5-Acetat erreicht, (Tab. 2), da keine Substitution der Acetylgruppen durch Chlorschwefelsäure möglich ist. Niedrigere Reaktions-Temperaturen und ansteigende Mengen an Chlorschwefelsäure führten prinzipiell zu ansteigendem Sulfatierungsgrad (Proben CS-37 bis CS-0.97). Im Fall von CS-0.37 führte das hohe Molekulargewicht (bei gleichzeitig niedrigerer Temperatur) von nativer Cellulose zu niedrigerem DS_S . Eine weitere Erhöhung der Sulfatierung wurde durch Verwendung von Schwefelsäure (Proben CS-1.57 und CS-1.69) erreicht, was zu vollständiger Sulfatierung an C_6 -Position führte. Der höchste DS_S wurde nach direkter Sulfatierung, allerdings auch mit stark ansteigendem Gehalt an sulfatierendem Agens erzielt (CS-1.94). Da alle Derivate wasserlöslich waren, konnten sie für weitere homogene Syntheseschritte genutzt werden.

4.1.2. Carboxylierung von Cellulose-Sulfaten

Die Einführung von Carboxyl-Gruppen erfolgte an Cellulose-Sulfaten mit einem DS_{S_6} von 0,33 bis 0,73 über eine Oxidation der primären Hydroxylgruppe mit 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-Oxyl Radikal (TEMPO) [143]. Es entstanden damit Cellulose-Derivate mit SO_3^-/COO^- Mischfunktionalisierung an C_6 -Position, sowie SO_3^- Funktionalisierung an C_2 -Position, was prinzipiell der Anordnung in Heparin entspricht. Für das oxidierte Cellulose-Sulfat CO-0.67 war im ^{13}C -NMR-Spektrum das Vorhandensein von Carboxylgruppen durch einen Peak bei 175.5 ppm (C_{6COO}) zu erkennen (Abb. 8b). Das Ausgangssignal für unsubstituiertes C_6 bei 60 ppm (C_6) ist im Vergleich zum Cellulose-Sulfat CS-0.37 (Abb. 8a) verschwunden. Das zeigt, dass eine 100% ige Substitution an C_6 durch Carboxyl- und Sulfatgruppen für dieses Derivat vorliegt. In Tabelle 3 sind die integrierten Peak Flächen der ^{13}C -NMR für die Carboxyl- und Sulfatgruppen aufgeführt. Im Fall niedrig sulfatierter Cellulosen führten ansteigende Konzentrationen der oxidierenden Agentien zu einer Erhöhung des DS_{COO} Wertes bis zu 0.67 (vollständige Substitution der C_6 -Position). Höher sulfatierte CS konnten selbst durch höhere Menge an oxidierendem Agens nicht vollständig an C_6 -Position oxidiert werden (CO-0.11).

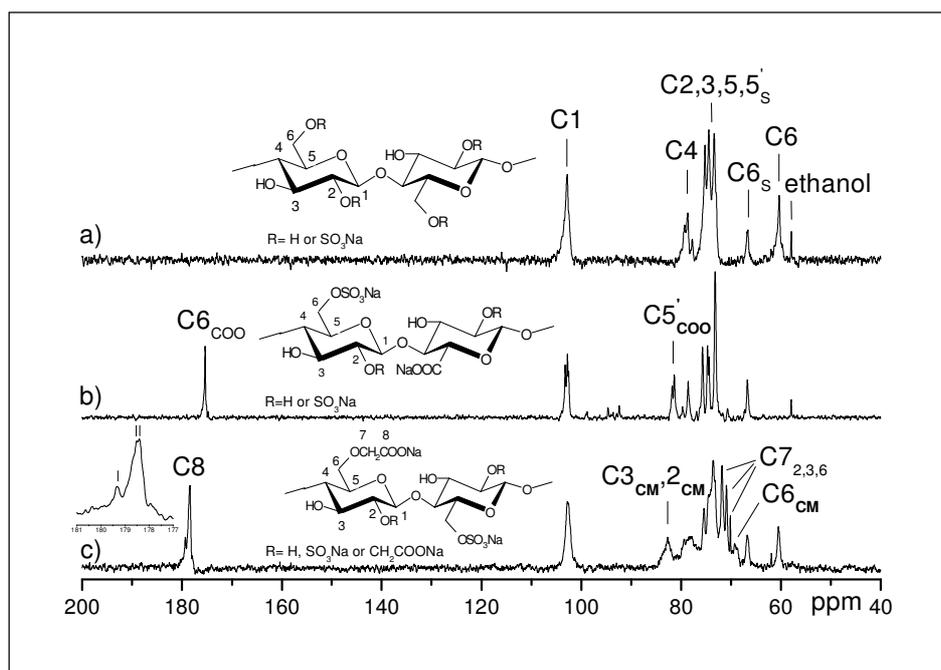


Abbildung 8. ^{13}C -NMR Spektren (200-40 ppm) von CS und CS mit Carboxyl- oder Carboxymethyl-Gruppen in D_2O bei RT: a) CS-0.37, b) CO-0.67 und c) CM-1.01.

Tabelle 3: Oxidation von CS mit TEMPO/NaBr/NaOCl bei RT und pH 10.5 in Wasser.

Proben	Ausgangs material	Molares Verhältnis (mol pro mol primäre OH-Groups)			Reaktions dauer (h)	DS (^{13}C -NMR)		
		TEMPO	NaBr	NaClO		DS _{S6} ^a	DS _{S2} ^a	DS _{COO} ^b
Heparin						0.43	0.83	0.54
CO-0.11	CS-0.97	0.05	1.5	8	1	0.73	0.24	0.11
CO-0.31	CS-0.39	0.0275	0.85	4	2	0.36	0.04	0.31
CO-0.67	CS-0.37	0.1	3	16	3	0.33	0.04	0.67

^a DS Werte der Sulfat-Gruppen an C₆ oder C₂, mit ^{13}C -NMR kalkuliert.

^b DS Werte der Carboxyl-Gruppen an C₆, mit ^{13}C -NMR kalkuliert.

4.1.3. Carboxymethylierung von Cellulose-Sulfaten

Die Carboxymethylierung mit Chloressigsäure erfolgte an C₂-, C₃- und C₆-Position zuvor sulfatierter Cellulosen. Im ^{13}C -NMR-Spektrum entsprachen neue Signale bei 82.7 (C₃_{CM}/ C₂_{CM}) und 69.3 ppm (C₆_{CM}) den Carboxymethyl-Gruppen an den entsprechenden Positionen (Abb. 8c). Zusätzliche Signale für die eingeführten Methylen-Gruppen sind bei 71.8, 70.9 und 70.2 ppm (C₇_{2,3,6}) zu erkennen (Abb. 8c). Aufgrund der kaum getrennten Signale wurden die DS_{CM} Werte mit Hilfe der ^1H -NMR Spektren kalkuliert (Abb. 9). Mehrere Signale für die 2-O-Substitution

resultieren dabei aus unterschiedlichen Isomer-Formen der Glukose-Untereinheit. In Tabelle 4 ist zu sehen, dass eine graduell ansteigende Carboxymethylierung aller drei Positionen mit einem maximalen Gesamt- DS_{CM} von 1,47 erreicht wurde. Die einzelnen Positionen zeigten eine Reaktivität in der Reihenfolge $C_6 > C_2 \gg C_3$. In Isopropanol (IPA) wurde bevorzugt an C_6 - und C_2 -Position substituiert, wobei die Anwendung einer erhöhten Menge IPA zu ansteigender Carboxymethylierung führte (Tab. 4). Die Verwendung von DMSO war dagegen nachteilig, da hohe Mengen, zusammen mit höherer NaOH- und Chloressigsäure-Konzentration, nicht zu einer höheren Substitution als in IPA führten (Tab. 4).

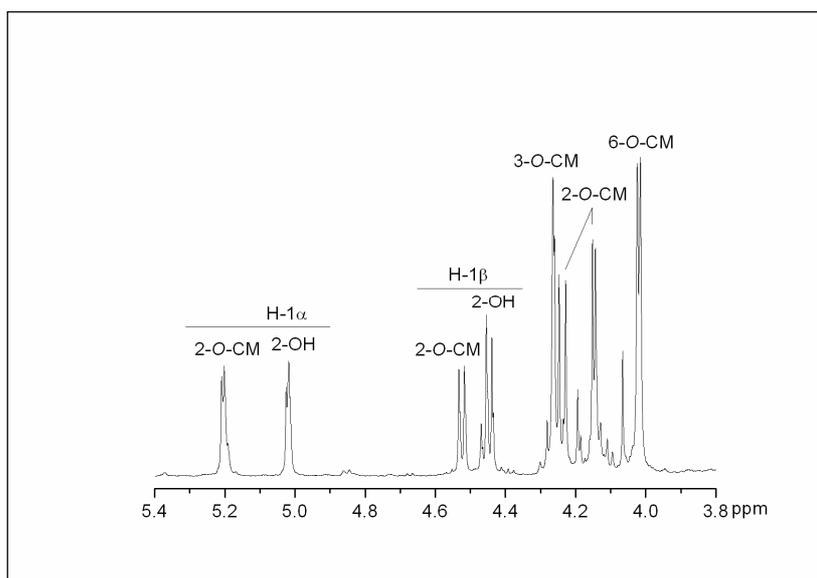


Abbildung 9: ^1H -NMR Spektrum (5.4-3.8 ppm) von CM-1.47 in D_2O bei RT.

Tabelle 4: Carboxymethylierung von CS mit Chloressigsäure und NaOH bei 55°C für 5 h.

Probennr.	Ausgangs- material	Molares Verhältnis (mol pro mol freier OH-Gruppen der CS)		Lösungsmittel und Menge (ml)	DS_{CM} ($^1\text{H-NMR}$) ^a		
		NaOH	ClCH_2COOH		DS_{CM2}	DS_{CM3}	DS_{CM6}
CM-1.01	CS-0.40	4	2	IPA 75	0.30	0.25	0.46
CM-1.09	CS-0.31	4	2	IPA 75	0.36	0.20	0.53
CM-1.25	CS-0.43	6	3	DMSO 175	0.41	0.37	0.47
CM-1.47	CS-0.31	4	2	IPA 150	0.54	0.26	0.67

^a DS Werte der Carboxymethyl-Gruppen an C_2 , C_3 und C_6 , mit ^{13}C -NMR kalkuliert.

4.2. Synthese von Chitosan-Sulfaten

Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit von Chitosan in organischen Lösungsmitteln wurde dieses im ersten Reaktionsschritt in organischen Säuren gelöst. Um eine klare Zuordnung der Probenbezeichnungen zu den erzielten Sulfatierungsgraden in C₂- und C₆-Position zu erhalten wurde im Probenname zunächst der Gesamt- und dann der C₆-Sulfatierungsgrad genannt. Bei einem DS_S von 1,48 und einem DS_{S6} von 0,83 lautet die Probenbezeichnung CHS-1.48-0.83.

4.2.1. Homogene Sulfatierung

Zur homogenen Sulfatierung wurde Chitosan in Ameisensäure gelöst. Die Charakterisierung der Proben erfolgte durch mehrere Methoden. Im ¹³C-NMR Spektrum (Abb. 10) ist die sulfatierte C₆-Position durch Erscheinen eines Peaks bei 67 ppm zu erkennen (C_{6s}). Die Signale von C₃ und C_{3s} erschienen in einem gemeinsamen Peak bei 78,3 ppm, die Bestimmung des Sulfatierungsgrades an C₃ erfolgte deshalb durch Subtraktion des Sulfatierungsgrades an C₆-Position von dem durch Elementar-Analyse ermittelten Gesamt Schwefel-Gehalt. Da in C₂-Position dagegen kein Peak für eine Sulfatierung zu erkennen war, lag folglich auch keine C₂-Sulfatierung vor. In der ¹⁵N-NMR wurde ebenfalls nur ein Peak identifiziert, welcher die nicht sulfatierte Aminogruppe repräsentiert (Abb. 11). Es liegt demnach auch keine Sulfatierung der 2-N-Position vor, was auf eine 100% ige Formylierung der Aminogruppe durch Ameisensäure zurückzuführen ist.

Da die Anzahl der synthetisierten und charakterisierten Proben einen wesentlich größeren Umfang annahm, als in Tabelle 5 dargestellt, sind nur Proben aufgeführt, die auch in späteren biologischen Untersuchungen genutzt wurden. Der Einfluss der wichtigsten Versuchsparameter auf die Position und den Grad der Sulfatierung soll hier nur kurz beschrieben werden. So hatte die Menge an Ameisensäure entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse. Ohne Ameisensäure erfolgte keine Sulfatierung (Tab. 5, CHS0), was die Notwendigkeit des Lösens in dieser organischen Säure verdeutlicht. Höhere Mengen an Ameisensäure führten dementsprechend zu ansteigenden Sulfatierungsgraden. Auch die Reaktionstemperatur beeinflusste den Substitutionsgrad. So konnte bei Raumtemperatur eine vollständige Sulfatierung an C₆-Position erreicht werden (Tab. 5, CHS1.29-1.00). Die Anwendung von 50°C dagegen bewirkte niedrigere Sulfatierungsgrade an dieser Position. Erwähnenswert ist noch, dass im ¹³C-NMR Spektrum (Abb. 10) keine Signale für Formylgruppen zu finden waren, was auf eine vollständige Deformylierung nach der Synthese hinweist.

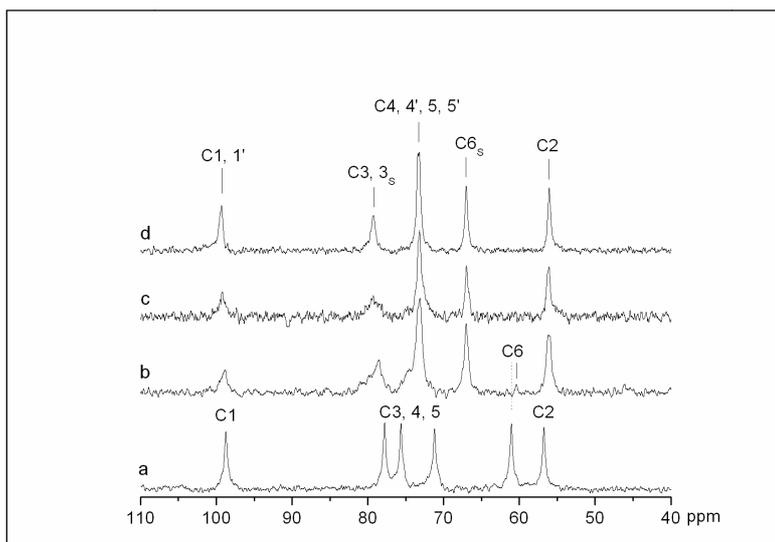


Abbildung 10. ^{13}C -NMR Spektrum (110–40 ppm) von (a) Chitosan bei RT, (b) CHS1.59-0.93, (c) CHS1.58-1.00 und (d) CHS1.59-1.00 in D_2O .

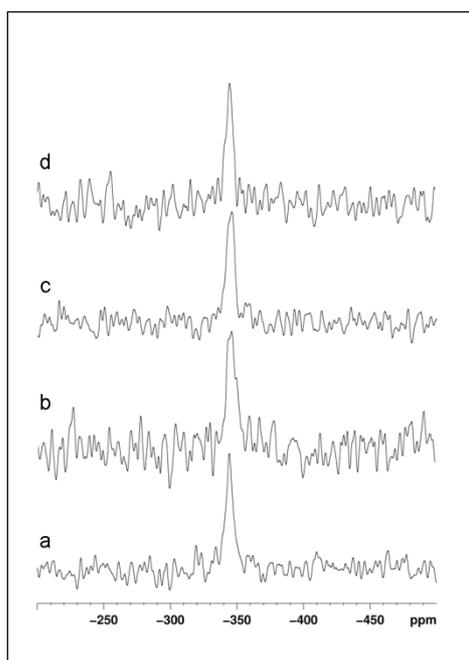


Abbildung 11. Festphasen CP/MAS ^{15}N -NMR Spektren (200–500 ppm mit ^{15}N -Nitromethan als externer Standard) von (a) CHS-1.67-1.00, (b) CHS-1.58-1.00, (c) CHS-1.61-1.00 und (d) CHS-1.48-1.00.

4.2.2. Nicht-homogene Sulfatierung von Chitosan

Bei der nicht-homogenen Sulfatierung wurde Chitosan in Essigsäure suspendiert. Dabei erfolgte keine Funktionalisierung der Substituenten durch Acetylgruppen. Wie in Tabelle 5 zu sehen, waren dabei fast alle Produkte vollständig an C₆-Position sulfatiert (Tab. 5). Eine Erhöhung der

Tabelle 5. Homogene und nicht-homogene Sulfatierung von Chitosan mit Chloressigsäure.

Proben	Menge FA ^a /Lösungs Dauer	Molares Verhältnis ^b	Temperatur (°C) Reaktions Dauer (h)	DS _{S6} ^b	DS _{S2+3} ^b	Total
CHS1.10-0.85	10 ml / 1 h	6 dS	50 / 5	0.85	0.25	1.10
CHS1.29-1.00	20 ml / 1 h	6 dS	RT / 5	1	0.29	1.29
CHS1.35-0.87	20 ml / 3 h	13 dS	50 / 3	0.87	0.48	1.35
CHS1.48-0.85	20 ml / 3 h	6 dS	50 / 1	0.85	0.63	1.48
CHS1.59-0.78	20 ml / 3 h	6 aS	50 / 3	0.78	0.81	1.59
CHS0		6 dS	50 / 5	0	0	0
CHS1.59-1.00		6 dS	70 / 3	1	0.59	1.59
CHS1.77-1.00		13 dS	50 / 3	1	0.77	1.77

^a Ameisensäure (FA) wurde nur zur homogenen Sulfatierung eingesetzt.

^b Molares Verhältnis in mol Chlorschwefelsäure pro mol AGU.

^c DS_{S6}: DS_S an 6-O-Position mit ¹³C-NMR kalkuliert, Gesamt DS_S entspricht Schwefel-Gehalt aus Elementaranalyse; DS_{2+3S}: DS_S an 2-N- und 3-O-Position, entspricht der Differenz zwischen Gesamt DS_S und DS_{S6}; dS direkte Sulfatierung, aS Acetosulfatierung.

Temperatur von 50° auf 70°C führte, im Gegensatz zur homogenen Sulfatierung, nicht zu verminderter Sulfatierung der C₆-Position, sondern zu einer Verringerung des Gesamt-Sulfatierungsgrades. Die Nutzung höherer Mengen an Chlorschwefelsäure führte zu einer Steigerung des Gesamt-DS_S (Tab. 5). Wie bei der homogenen Synthese konnte im ¹⁵N-NMR Spektrum keine 2-N-Sulfatierung verifiziert werden (Abb. 11).

4.3. Molmassenbestimmung

Das Molekulargewicht von Glykosaminoglykanen und GAG-analogen Verbindungen hat Einfluss auf die Wechselwirkung mit Wachstumsfaktoren [144]. Bei der Berechnung des Gewichtsmittels (M_w) geht das Quadrat der Molekulargewichte in die Berechnung ein (siehe Material und Methoden), weshalb Fraktionen mit sehr hohem oder geringem Molekulargewicht, aber geringer Abundanz unproportional stark ins Gewicht fallen. Da bei den von uns synthetisierten Derivaten Fraktionen mit sehr hohem Molekulargewicht aber geringer Abundanz vorhanden waren, berechneten wir stattdessen das Zahlenmittel (M_n) [144]. Tabelle 6 zeigt die M_w -, M_n -, MO- und DP_n-Werte einer Vielzahl, der in den späteren biologischen Untersuchungen genutzten Derivate, sowie Heparin. Ein auffällig kleines Molekulargewicht unter 20 kDa

wurde dabei für die hochsulfatierte Cellulose CS-1.94, die niedrig sulfatierte Cellulose CS-0.39 sowie das carboxylierte Derivat CO-0.31 festgestellt.

Tabelle 6: Bestimmung des Molekulargewichtes von Cellulose- und Chitosan-Derivaten mit GPC (in Dalton).

Probe	M_w^a	M_n^b	MO^c	DP_n^d
Heparin	16.660	15.150	264	57
CS-0.37	151.857	58.986	204	288
CO-0.67	35.626	25.088	223	112
CS-0.39	33.418	21.046	204	103
CO-0.31	27.255	19.440	216	90
CS-0.92	93.699	30.474	251	121
CS-0.97	95.349	46.865	257	182
CS-1.57	77.747	37.549	315	119
CS-1.69	220.517	55.704	336	166
CS-1.80	115.880	57.266	358	160
CS-1.94	32.442	19.972	381	52
CM-1.47	255.807	77.595	313	247
CHS1.25-0.80	516.774	126.871	289	438
CHS1.77-1-00	620.512	146.014	343	426

^a Gewichtsmittel, ^b Zahlenmittel, ^c Molmasse der mittleren Monosaccharid-Einheit, ^d Anzahl der Monosaccharid-Einheiten.

Teil II: Biologie / Biochemie

Der Hauptteil der biologisch/biochemischen Untersuchungen wurde mit Cellulose-Derivaten durchgeführt, da Chitosan-Sulfate erst im letzten Teil des Untersuchungszeitraumes zur Verfügung standen. Als Indikator für die Wirksamkeit der von uns synthetisierten Derivate diente jeweils ein Vergleich mit nativem Heparin als Kontrolle.

4.4. Toxizitätsstudien der Cellulose-Derivate

Die Bestimmung der Zytotoxizität ist ein wichtiger Parameter zur Abschätzung der biologischen Anwendbarkeit von Substanzen [145]. Wir untersuchten deshalb 27 Cellulose-Derivate mit unterschiedlichem Derivatisierungsgrad, wobei niedrig sulfatierte Derivate mit einer $DS_s > 0,92$ nur durch eine kleine Auswahl repräsentativer Proben dargestellt sind. In Abbildung 12 und 13 sind nur drei Konzentrationen des gesamten untersuchten Konzentrationsbereiches von 10 ng/ml – 1 mg/ml dargestellt. Für die ausschließlich sulfatierten Cellulosen (Abb. 12) konnten sowohl leichte Steigerungen als auch ein teilweise signifikanter Rückgang der Lebensfähigkeit festgestellt werden, der jedoch völlig unabhängig von der Konzentration und vom Derivatisierungsgrad der Derivate war. Die carboxylierten und carboxymethylierten CS führten zu keiner signifikanten Beeinflussung der Lebensfähigkeit (Abb. 13).

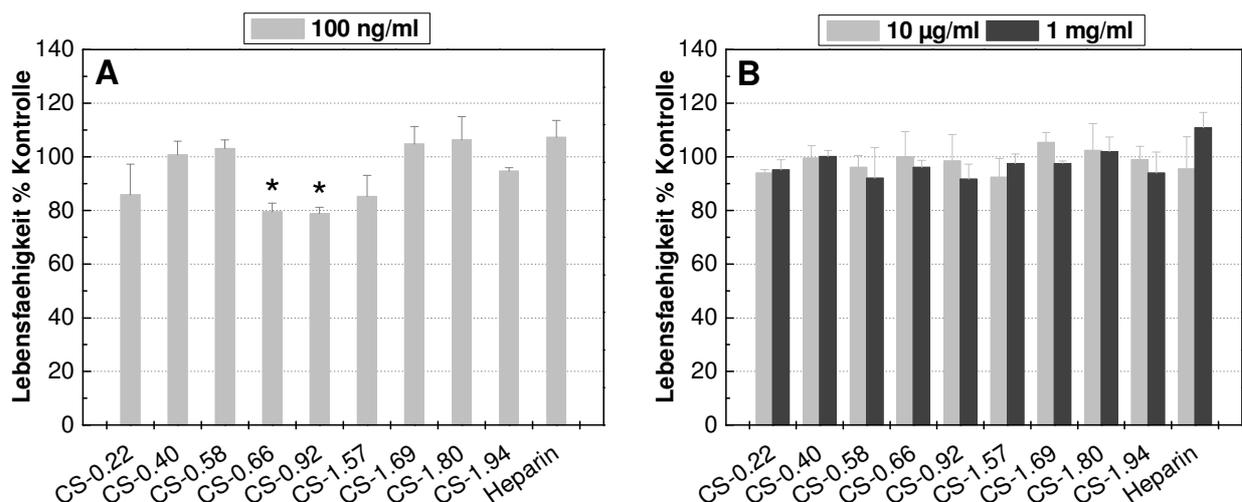


Abbildung 12: Untersuchung der Zytotoxizität der sulfatierten Cellulosen auf 3T3-L1 Fibroblasten mit MTT Assay. 3T3-L1 Fibroblasten wurden für 24 h mit ansteigenden Konzentrationen der Polysaccharide inkubiert. A) 100 µg/ml der Derivate, B) 10 und 1000 µg/ml der Derivate. Die Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 4$). Der Signifikanztest gegen die Kontrolle wurde mit dem Student's Test ermittelt: * $p < 0,002$, verglichen zur Kontrolle ohne Polysaccharid.

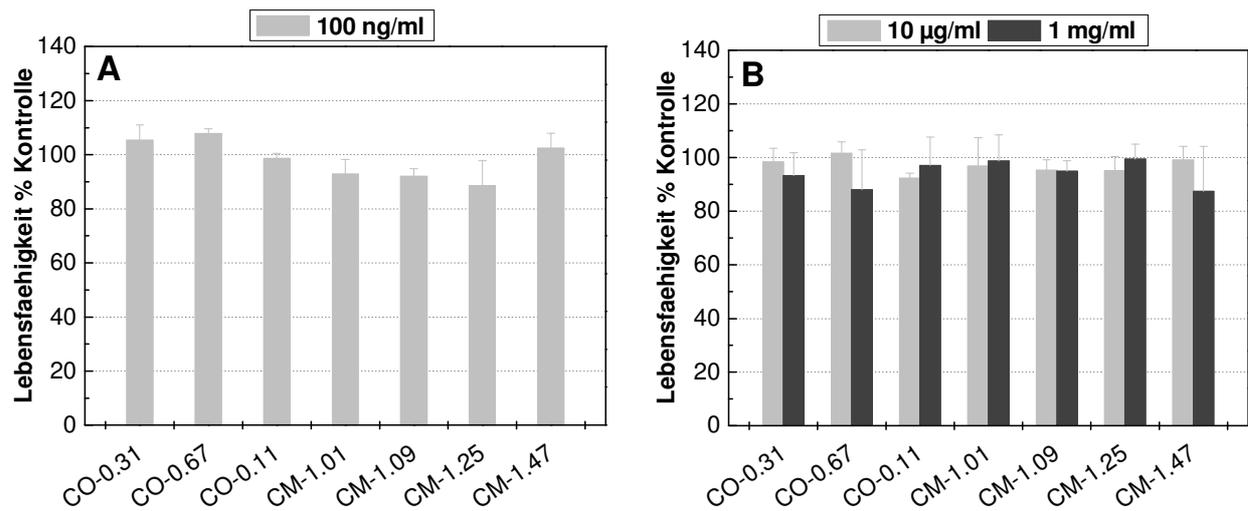


Abbildung 13: Untersuchung der Zytotoxizität der carboxylierten und carboxymethylierten CS auf 3T3-L1 Fibroblasten mit MTT Assay. 3T3-L1 Fibroblasten wurden für 24 h mit ansteigenden Konzentrationen der Polysaccharide inkubiert. A) 100 µg/ml der Derivate, B) 10 und 1000 µg/ml der Derivate. Die Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 4).

4.5. Kooperative Wirkung von Cellulose-Derivaten mit FGF-2

4.5.1. Bindungsaffinität

Als wichtiger Parameter der Interaktion zwischen GAG-analogen Verbindungen und Wachstumsfaktoren wurde die Bindungsaffinität mittels eines kompetitiven Versuchsansatzes ermittelt (siehe Material und Methoden). Wie in Abbildung 14 zu sehen, zeigten niedrig sulfatierte Cellulosen mit einem DS_S bis 0,92 keine signifikante Bindung zum Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF-2). Erst für CS-Moleküle mit einem DS_S von 1,57 und mehr konnte prinzipiell eine, mit deren Derivatisierungsgrad ansteigende Bindung an FGF-2 von bis zu 61%, verglichen mit Heparin aus Schweinedarm, nachgewiesen werden. So wurde im Vergleich von CS-1.94 gegenüber CS-1.57 ein signifikanter Anstieg der Bindungsaffinität von 40 % ($p < 0,02$) verifiziert. Abbildung 15 zeigt, dass alle carboxylierten und zwei der carboxymethylierten CS keine Bindung zu FGF-2 aufwiesen. Für zwei der carboxymethylierten Derivate, CM-1.09 und CM-1.47 war eine Bindung von ca. 20%, verglichen zu Heparin, zu verzeichnen.

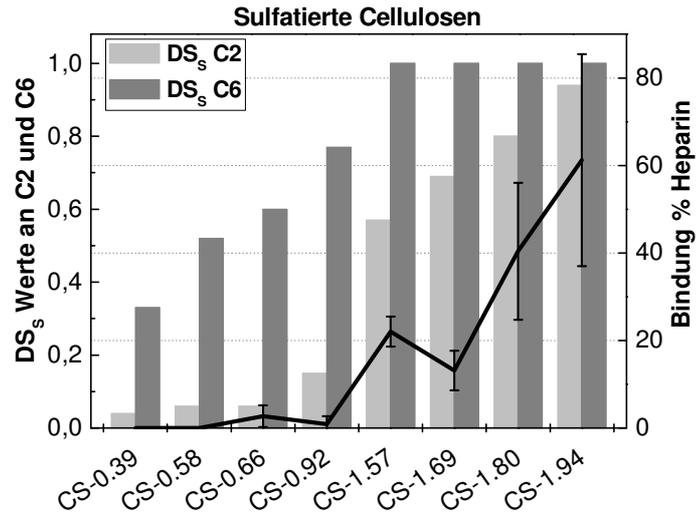


Abbildung 14: Bindungsaffinität der sulfatierten Cellulosen an FGF-2 im Verhältnis zum Derivatisierungsgrad. FGF-2 wurde durch die Derivate kompetitiv von Heparin-Agarose-Mikropartikeln freigesetzt und im Dot-Blot quantifiziert. Bindung ist gegen den Sulfatierungsgrad in C₂- und C₆-Position aufgetragen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 4).

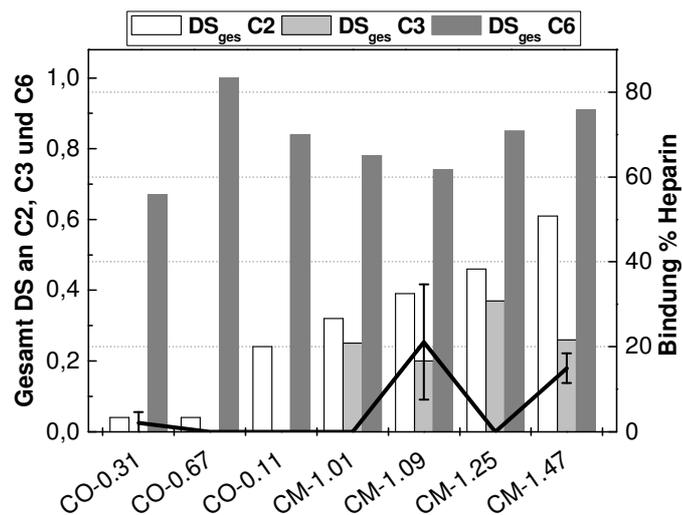


Abbildung 15: Bindungsaffinität der carboxylierten und carboxymethylierten CS Cellulosen an FGF-2 im Verhältnis zum Derivatisierungsgrad. FGF-2 wurde durch die Derivate kompetitiv von Heparin-Agarose-Mikropartikeln freigesetzt und im Dot-Blot quantifiziert. Die Bindung ist gegen den Gesamt-Derivatisierungsgrad (Carboxymethyl- + Sulfatgruppen) in C₂-, C₃- und C₆-Position aufgetragen. Werte repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichung.

4.5.2. Beeinflussung der FGF-2-induzierten Proliferation durch Cellulose-Derivate

Zur Untersuchung der Beeinflussung einer FGF-2-induzierten Proliferation durch die synthetisierten Cellulose-Derivate, wurde eine Zellkultur aus embryonalen Mausfibroblasten (Zelllinie 3T3-L1) genutzt, welche in Untersuchungen der Beeinflussung der FGF-2-induzierten mitogenen Aktivität mit Heparin und heparinoiden Substanzen von anderen Autoren verwendet wurde [112,113].

4.5.2.1. Einsatz der Derivate in einer Konzentration von 1 mg/ml

Zunächst wurden alle 27 synthetisierten Cellulose-Derivate in einer Konzentration von 1 mg/ml untersucht. Dabei wurde FGF-2 in Übereinstimmung mit anderen Studien in einer Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt [112,113]. Die Ergebnisse in Abbildung 16A zeigen, dass alle niedrig sulfatierten Cellulosen mit einem Gesamt-Sulfatierungsgrad bis zu 0,58 die Proliferation der Zellen inhibierten. Ab einem Sulfatierungsgrad von 0,66 war eine Stimulierung der FGF-2-induzierten Proliferation zu verzeichnen. Mit steigendem Gesamt-Sulfatierungsgrad erhöhte sich demnach auch die mitogene Wirkung der CS. Für das am höchsten sulfatierte Derivat CS-1.94 wurde eine Proliferation von 160%, verglichen mit 10 ng/ml FGF-2 allein, gemessen. Zwei der drei carboxylierten Derivate (CO-0.31 und CO-0.11) zeigten eine leichte Erhöhung der Proliferation. CO-0.67, mit einem Carboxylierungsgrad von 0,67 führte dagegen zur Unterdrückung der Zellteilung (Abb. 16B). Unter den carboxymethylierten CS bewirkte nur das Derivat mit der höchsten Bindung (CM-1.09) eine leichte Verstärkung der FGF-2-induzierten Proliferationsrate (Abb. 16B).

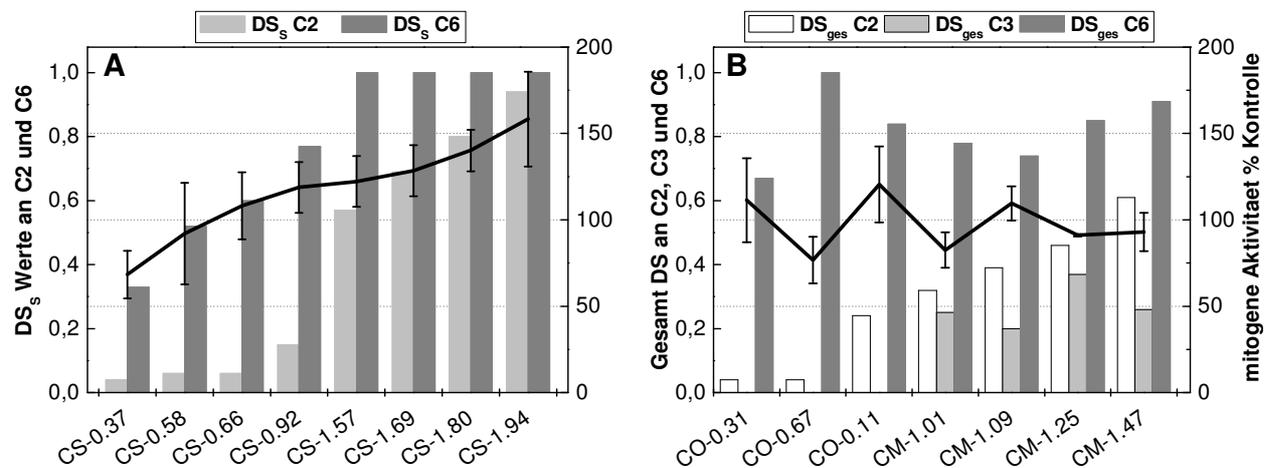


Abbildung 16: Vergleich der Proliferationsraten nach Supplementierung mit FGF-2 und jeweils 1 mg/ml unterschiedlicher Cellulose-Derivate in Abhängigkeit vom Derivatisierungsgrad. 3T3-L1 Fibroblasten wurden für 48 h mit 1 mg/ml der Derivate und 10 ng/ml FGF-2 inkubiert. Die Proliferation wurde anhand des DNS-Gehaltes mit Pico Green bestimmt. (A) sulfatierte Cellulosen, (B) carboxy(methyl)ierte CS. Die Werte repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung (n = 5).

4.5.2.2. Verwendung der Derivate im Konzentrationsbereich von 1 µg/ml bis 1 mg/ml

Nicht nur die Art, die Position und der Grad der Derivatisierung, sondern auch die Konzentration der GAG-analogen Verbindungen ist ein wichtiger Faktor für die Beeinflussung der Aktivität von Wachstumsfaktoren [112]. Wir untersuchten deshalb Konzentrationen zwischen 1 µg/ml

bis 1 mg/ml der Derivate, wobei schon Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/ml}$ und weniger in Studien anderer Autoren zur Beeinflussung der Aktivität von FGF-2 führten [113,102]. In den eigenen Untersuchungen wurden nur sulfatierte Cellulosen mit einer Steigerung der Proliferation von 120 % im Versuch mit 1 mg/ml, sowie, mit Ausnahme des hochcarboxylierten Derivates CO-0.67 (Hemmung der Proliferation bei 1 mg/ml), alle carboxylierten und carboxymethylierten Cellulosen einbezogen. In Abbildung 17 ist eine starke Konzentrationsabhängigkeit der Proliferation von den untersuchten Proben zu erkennen. Mit 1 mg/ml zeigten alle Cellulose-Sulfate eine mit Heparin vergleichbare Proliferation zwischen 160 bis 195% (relativiert zur Kontrolle mit FGF-2 allein). Von 500 bis herunter zu 1 $\mu\text{g/ml}$ war prinzipiell eine stufenweise konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferation von niedrig zu höher sulfatierten Derivaten zu beobachten (Abb. 17A/B)

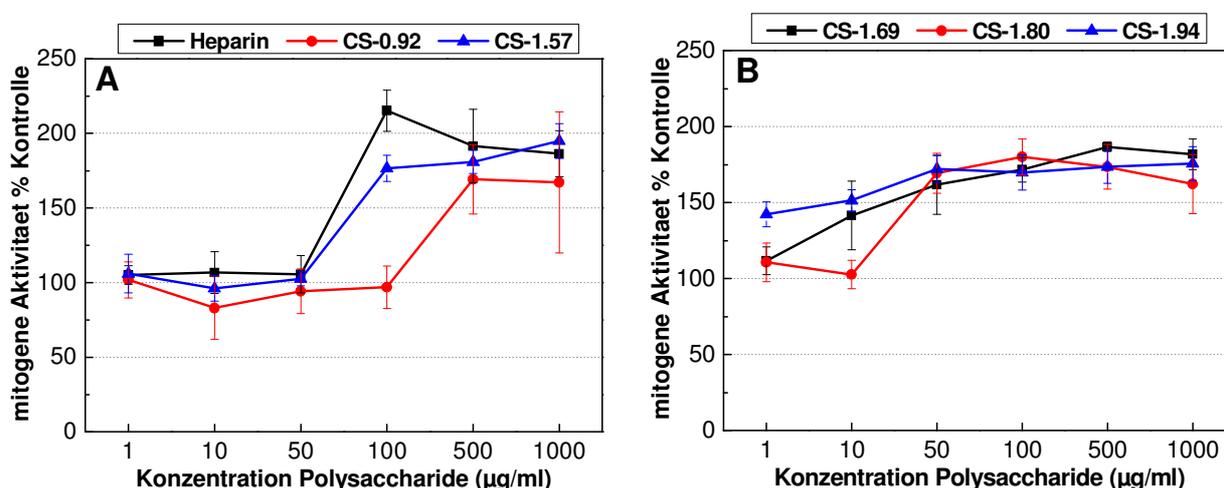


Abbildung 17: Vergleich der Proliferation in Abhängigkeit von der Konzentration und der Art zugesetzter Cellulose-Sulfate. 3T3-L1 Fibroblasten wurden für 48h mit 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1 mg/ml der Derivate und jeweils 10 ng/ml FGF-2 inkubiert. Die Proliferation wurde anhand des DNS-Gehaltes mit Pico Green bestimmt. (A) Heparin und mittelsulfatierte CS, (B) hochsulfatierte CS. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 5$).

Tabelle 7: Vergleich der zu einer signifikanten Proliferationssteigerung führenden ED50-Werte sulfatierter Cellulosen im Vergleich zu 10 ng/ml FGF-2 allein.

Proben	ED50 ^a	% Proliferation ^b
Heparin	73,73	157,59
CS-0.92	303,10	134,61
CS-1.57	80,39	147,45
CS-1.69	13,73	143,32
CS-1.80	32,40	139,99
CS-1.94	< 1 $\mu\text{g/ml}$	137,85

^a effektive Dosis für 50% Aktivität in $\mu\text{g/ml}$, ^b Proliferation bei entsprechendem ED50-Wert.

Das heißt, mit steigendem Sulfatierungsgrad reichten immer geringere Mengen der Cellulosesulfate aus, um eine Erhöhung der Proliferation zu bewirken (Abb. 17). Die ED50-Werte in Tabelle 7 verdeutlichen dies. Eine Ausnahme stellt CS-1.80 dar, das bei 10 µg/ml einen höheren ED50-Wert CS-1.69 aufwies. Natives Heparin bewirkte zwar mit 215% eine signifikant höhere Proliferation bei 100 µg/ml als alle Cellulose-Derivate ($p < 0,01$), mit einer Konzentration unter 100 µg/ml war jedoch keine Steigerung zur Kontrolle erkennbar. Bei den carboxylierten CS wurde nur mit 1 mg/ml eine Steigerung der Proliferation bis zu 149% für CO-0.11 beobachtet (Abb. 18A). Auch die carboxymethylierten CS führten, mit Ausnahme von CM-1.25, nur nach Einsatz der maximalen Konzentration von 1 mg/ml zu einer Steigerung der Proliferation. CM-1.47 zeigte über den gesamten Konzentrationsbereich keine Steigerung der FGF-2-induzierten Proliferation (Abb. 18B). In Konzentrationen unter 100 µg/ml führten alle carboxy(methyl)ierten Derivate zu einer leichten Unterdrückung der mitogenen Aktivität.

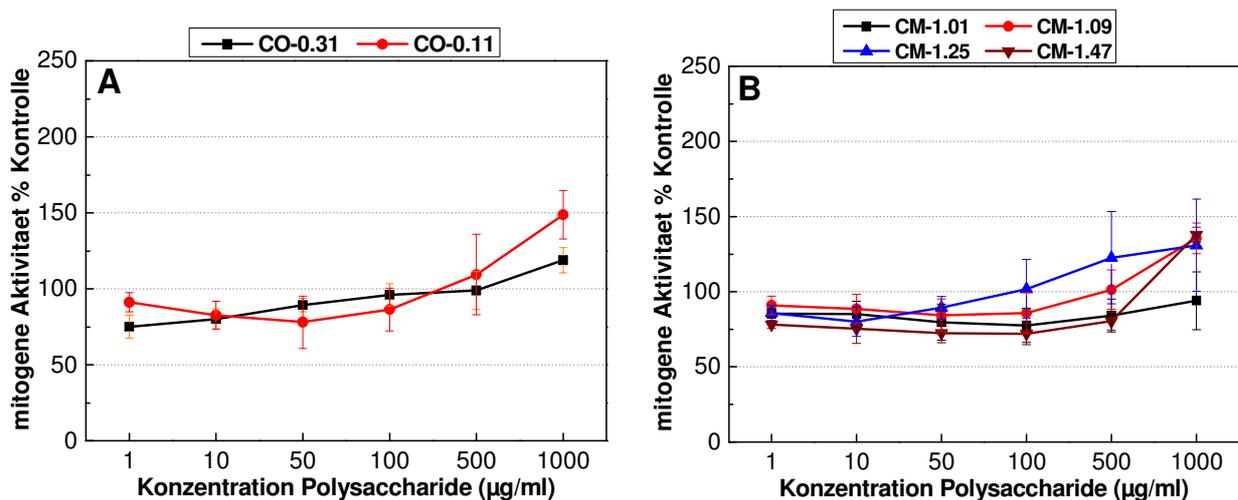


Abbildung 18: Vergleich der Proliferation in Abhängigkeit von der Konzentration an eingesetzten carboxylierten und carboxymethylierten CS. 3T3-L1 Fibroblasten wurden hierzu für 48h mit 1 µg/ml bis 1 mg/ml der Derivate und 10 ng/ml FGF-2 inkubiert. Die Proliferation wurde anhand des DNS-Gehaltes mit Pico Green bestimmt. Die Werte sind relativiert zur Kontrolle mit FGF-2. (A) carboxylierte CS, (B) carboxymethylierte CS. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 5$).

4.5.3. Schutz von FGF-2 durch Cellulose-Derivate vor proteolytischem Abbau

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob die mitogene Wirkung von Derivaten auf eine erhöhte Stabilität gegenüber Proteasen, und damit auf eine längere Halbwertszeit des Wachstumsfaktors FGF-2 zurückzuführen ist. Zudem könnte ein geringerer Abbau von FGF-2 auch aus einer Hemmung von Proteasen durch die GAG-analogen Verbindungen resultieren. Es wurde deshalb zunächst der Einfluss ansteigender Polysaccharidmengen auf die Trypsin-abhängige Spaltung von N- α -Benzoyl-DL-Arginin-p-Nitroanilin Hydrochlorid (siehe Material

und Methoden) analysiert, wobei Trypsin als Modell-Protease eingesetzt wurde. Um die Ergebnisse mit den vorangegangenen Zellteilungsexperimenten vergleichbar zu machen, wurden in allen Versuchsansätzen möglichst die gleichen Konzentrationen an Polysacchariden (1–500 $\mu\text{g/ml}$), eine Inkubationstemperatur von 37°C und eine Langzeitinkubation von 16 h angewendet. Mit Ausnahme der hochsulfatierten Cellulose CS-1.94 führte keine der untersuchten Proben bis zu einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ zu einer Trypsin-Hemmung (Abb. 19A). Demnach ist eine geringe Hemmung von Trypsin nur bei sehr hohen Konzentrationen über 100 $\mu\text{g/ml}$ an Cellulose-Derivaten oder bei sehr hohem Sulfatierungsgrad der Derivate zu erwarten.

In den Experimenten zur proteolytischen Stabilität von FGF-2 untersuchten wir Heparin und repräsentative Derivate aus vorangegangenen Experimenten. Das hochsulfatierte CS-1.94 und Heparin führten bis zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zu einem vollständigen Proteolyse-Schutz (Daten nicht gezeigt) und wurden deshalb auch in Konzentration unter 1 $\mu\text{g/ml}$ untersucht. Hierbei wurden ebenfalls kaum Unterschiede zwischen beiden Polysacchariden festgestellt (Abb. 19B und 20).

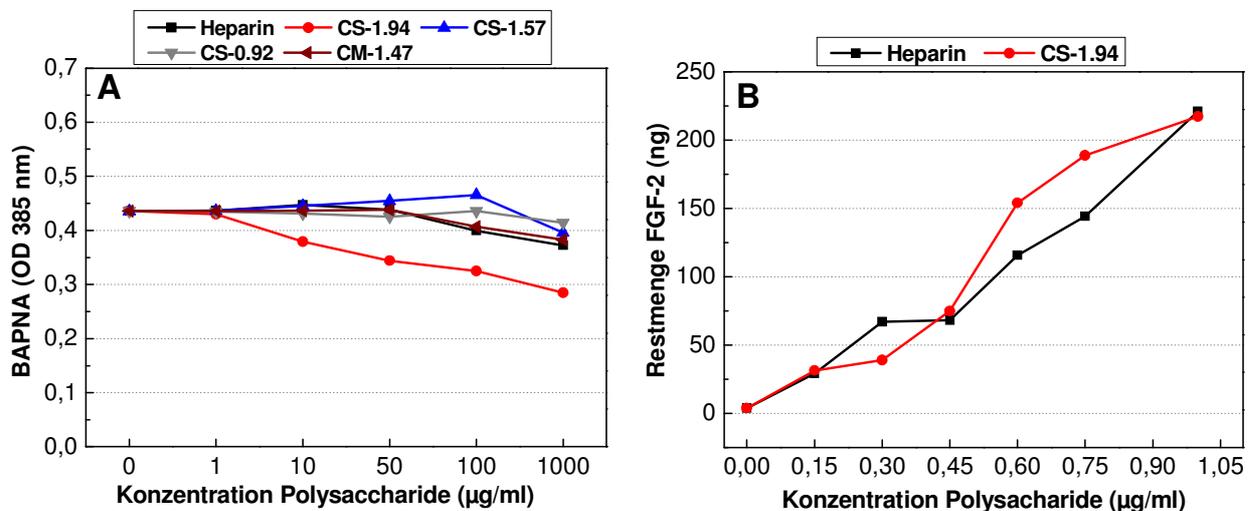


Abbildung 19: Vergleich der Wirkung von Cellulose-Derivaten auf die Trypsin-Aktivität und den Schutz von FGF-2 vor proteolytischem Abbau. A) Beeinträchtigung der Trypsin-Aktivität durch ansteigende Konzentrationen von Cellulose-Derivaten im BAPNA-Assay, B) Trypsin-Assay von FGF-2 mit Heparin und CS-1.94 mit Konzentrationen von 0,15 bis 1 $\mu\text{g/ml}$. Hierzu wurden 225 ng FGF-2 mit 10 mg/ml Trypsin und den genannten Polysacchariden für 16 h bei 37°C inkubiert.

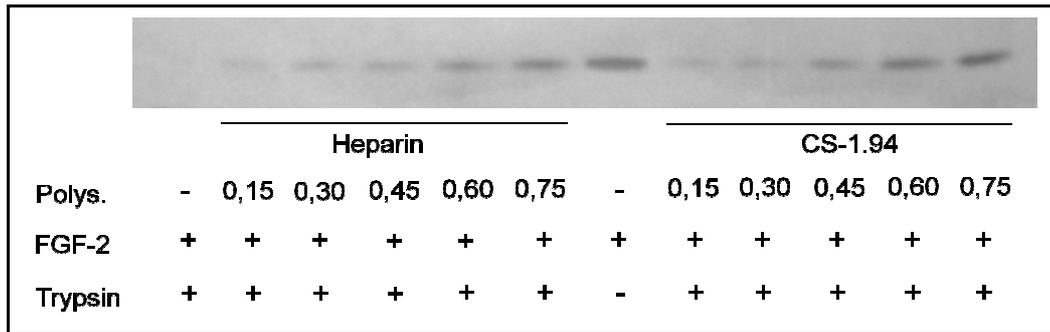


Abbildung 20: Vergleich der Schutzwirkung von Heparin und CS-1.94 auf FGF-2 vor proteolytischem Abbau durch Trypsin. Ansteigende Konzentrationen zwischen 0,15 und 0,75 $\mu\text{g/ml}$ führten nach 16 h jeweils zu einer ansteigenden Schutzwirkung auf 225 ng/ml FGF-2. Ohne jeglichen Zusatz eines Polysaccharids wurde FGF-2 vollständig abgebaut.

Wie in Abbildung 21A zu sehen, zeigten die drei anderen sulfatierten Cellulosen einen vom Sulfatierungsgrad und von der Konzentration abhängigen proteolytischen Schutz von FGF-2 (Abb. 21A). Das Derivat CS-0.37, mit sehr niedrigem Sulfatierungsgrad, zeigte dabei selbst in hohen Konzentrationen keinen Schutz vor Proteolyse. Die beiden carboxymethylierten Derivate CM-1.09 und CM-1.47 schützten dagegen schon in geringeren Mengen als die ausschließlich sulfatierte Cellulose CS-1.57 vor proteolytischem Abbau (Abb. 21B). Des Weiteren zeigten die Graphen des proteolytischen Abbaus von CS-0.92 und CO-0.11 starke Ähnlichkeit (Abb. 21 A/B). Beide Derivate haben einen ähnlichen DS_S , CO-0.11 aber zusätzlich einen DS_COO -Wert von 0,11.

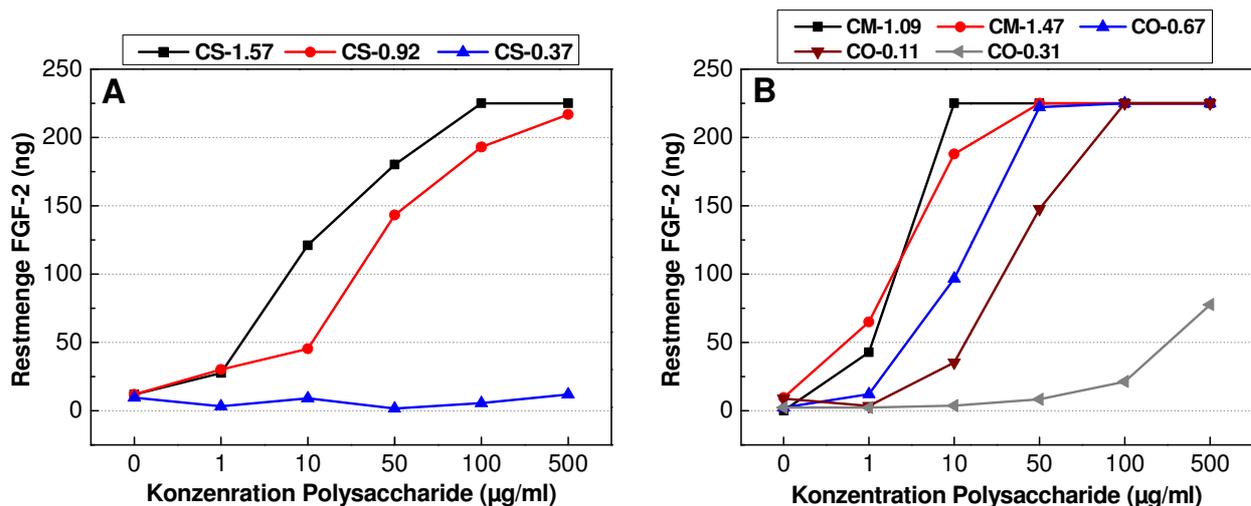


Abbildung 21: Vergleich der Schutzwirkung diverser Cellulose-Derivate auf FGF-2 vor proteolytischem Abbau durch Einsatz ansteigender Konzentrationen der Cellulose-Derivate. Hierzu wurden jeweils 225 ng FGF-2 mit den Cellulose-Derivaten in einer Konzentration von 1-500 $\mu\text{g/ml}$ und jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin für 16 h bei 37°C inkubiert. A) sulfatierte Cellulosen, B) carboxy(methyl)ierte CS.

4.5.4. Direkte Beeinflussung der Proliferation durch Cellulose-Derivate ohne Zugabe von FGF-2

Glykosaminoglykane wie Heparin oder Heparan-Sulfat haben nicht nur vielfältige Funktionen in der Vermittlung und Feinregulation von Signal-Proteinen, sondern können auch selbst in die Steuerung zellulärer Mechanismen eingreifen. Die Vermittlung der Signale kann z.B. durch Heparin-spezifische Oberflächenrezeptoren realisiert werden [146]. Deshalb untersuchten wir die Wirkung diverser Cellulose-Derivate auf die Proliferation von 3T3-L1 Fibroblasten in einem Konzentrationsbereich von 1 µg/ml bis 1 mg/ml, ohne Zugabe von FGF-2. In Abbildung 22 sieht man deutlich, dass sich die Kurvenverläufe ohne FGF-2 grundsätzlich von denen mit Zugabe des Wachstumsfaktors unterscheiden. Auch konnte keine einfache Abhängigkeit der Proliferation der 3T3-L1 Fibroblasten vom Sulfatierungsgrad der Cellulose-Derivate festgestellt werden. Die höchste Proliferation zeigten die mittelsulfatierten Cellulosen CS-1.57 und CS-1.69, speziell im unteren Konzentrationsbereich, bis 50 µg/ml. Mit CS-1.57 wurde eine maximale Proliferation von 222%, verglichen zur Kontrolle ohne Wachstumsfaktor erreicht. Bezogen auf die Kontrolle mit 10 ng/ml FGF-2 waren dies 196%, was der maximalen Proliferation der Cellulose-Derivate nach Zugabe von FGF-2 entsprach. Ein höherer Sulfatierungsgrad der Cellulosen (CS-1.80, CS-1.94) führte dagegen in niedrigen Konzentrationen von 1 bis 50 µg/ml zu einer Unterdrückung der mitogenen Aktivität. Dagegen wurde ab 100 µg/ml eine Erhöhung der Proliferation beobachtet. CS-1.94 erzeugte über den gesamten Konzentrationsbereich nur geringe Änderungen der mitogenen Aktivität (Abb. 22 A).

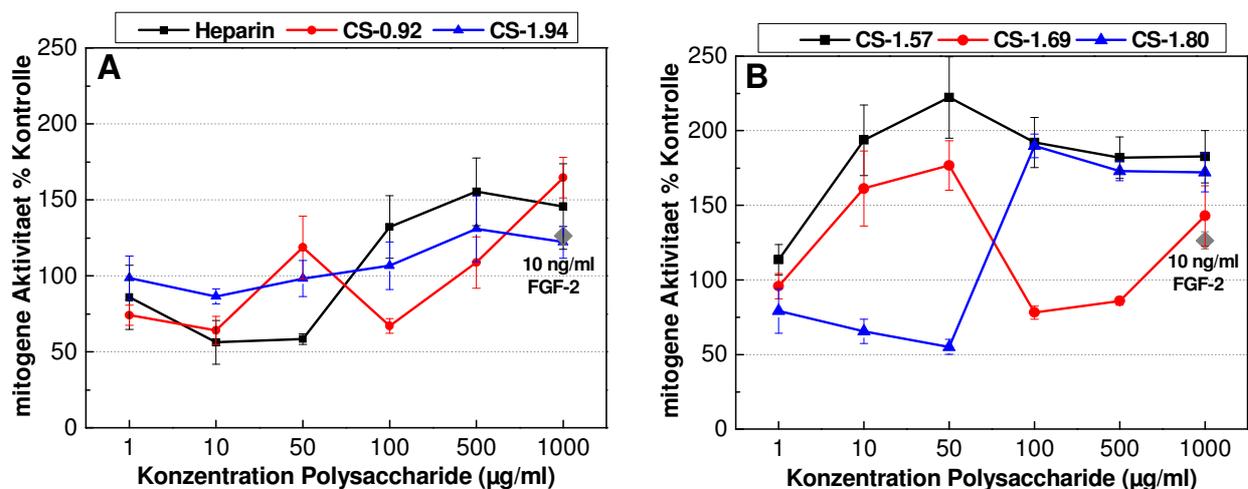


Abbildung 22: Vergleich der Proliferation in Abhängigkeit von der Konzentration an eingesetzten Cellulose-Sulfaten ohne Zusatz des Wachstumsfaktors FGF-2. Hierzu wurden 3T3-L1 Fibroblasten für 48 h mit jeweils ansteigenden Konzentrationen an Polysacchariden inkubiert. Die Proliferation wurde anhand des DNS-Gehaltes mit Pico Green bestimmt. Die Werte sind relativiert zur Kontrolle ohne FGF-2. (A) Heparin und wenig mitogene CS, (B) hoch mitogene CS. Die Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 5$).

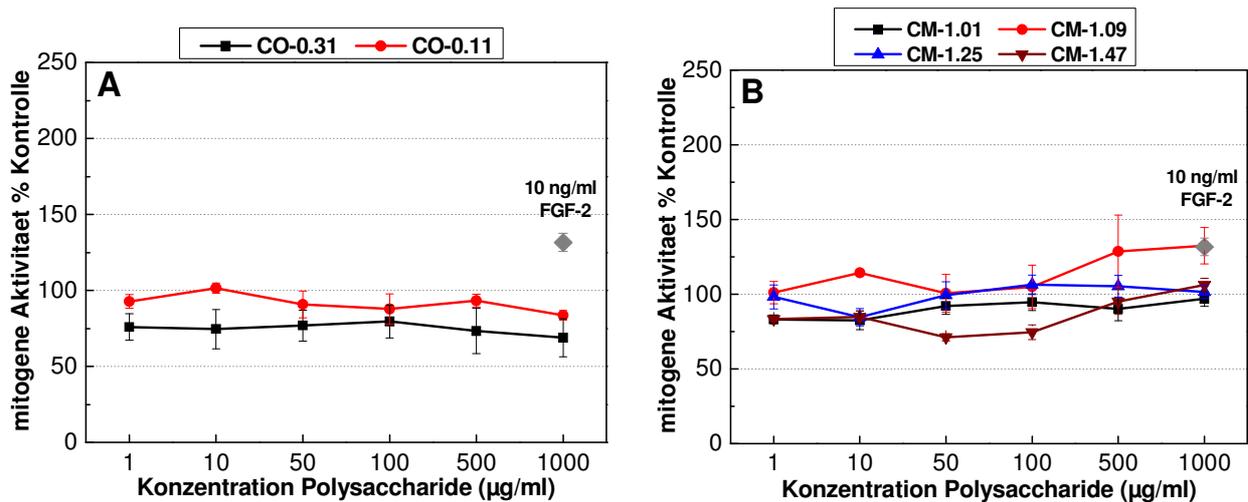


Abbildung 23: Vergleich der Proliferation in Abhängigkeit von der Konzentration an eingesetzten carboxy(methyl)ierten CS ohne Zusatz des Wachstumsfaktors FGF-2. Hierzu wurden 3T3-L1 Fibroblasten für 48 h mit ansteigenden Konzentrationen an Polysacchariden inkubiert. Die Proliferation wurde anhand des DNS-Gehaltes mit Pico Green bestimmt. Die Werte sind relativ zur Kontrolle ohne FGF-2. (A) carboxylierte CS, (B) carboxymethylierte CS. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 5$).

Vergleicht man den Kurvenverlauf für Heparin und CS-1.80 (Abb. 22A/B), so kann eine Ähnlichkeit gefunden werden. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, bewirkten mit der Ausnahme von CM-1.09, alle carboxylierten und carboxymethylierten Cellulosen keine Steigerung, sondern teilweise einen leichten Rückgang der Zellteilung.

4.6. Kooperative Wirkung von derivatisierten Polysacchariden mit BMP-2

Zur Untersuchung des Einflusses der derivatisierten Polysaccharide auf die BMP-2-induzierte osteogene Differenzierung von Zellen mit multipotentem Differenzierungspotential, wurden verschiedene Zelltypen mit GAG-analogen Verbindungen und Heparin inkubiert. In diese Untersuchungen wurden auch sulfatierte Chitosane einbezogen.

4.6.1. Bindungsaffinität

Aufgrund der geringen Löslichkeit der Chitosansulfate in wässrigen Systemen konnte die zum Versuchsansatz notwendige, hohe Konzentration von 10 mg/ml für diese Verbindungen nicht hergestellt werden, so dass in dieser Arbeit ausschließlich Bindungsaffinitäten von Cellulose-Sulfaten vorliegen. Die Ergebnisse wurden, vergleichbar zu den Experimenten mit FGF-2, relativ zur Bindungsaffinität von Heparin an BMP-2 dargestellt. Die Untersuchungen ergaben, dass erst ein Gesamt-Sulfatierungsgrad von mehr als 0,92 zu einer signifikanten Bindung an BMP-2 führte (Abb. 24A). Cellulose-Sulfate mit einem DS_{S6} von 1,0 aber nur mittlerer Sulfatierung in 2-*O*-Position (CS-1.57, CS-1.69) zeigten dabei mit bis zu 120 % (relativiert zur Bindungsaffinität von Heparin) die höchste Bindung an BMP-2. Ein weiter ansteigender Sulfatierungsgrad (CS-1.80, CS-1.94) führte dagegen zu signifikant abnehmender Bindung (Abb. 24A). Unter den carboxy- und carboxymethylierten CS waren die höchsten Bindungsaffinitäten mit den Derivaten CM-1.09 und CM-1.47 zu verzeichnen (60 % relativiert zur Bindungsaffinität von Heparin) (Abb. 24B). Diese beiden Derivate zeigten auch die höchste Bindungsaffinität an FGF-2. Die carboxylierten Derivate CO-0.31 und CO-0.67 zeigten eine Bindungsaffinität von 10% (relativiert zu Heparin), CO-0.11 von immerhin 5 %. Diese drei Werte waren damit alle höher als die Bindungsaffinitäten an FGF-2 (Abb. 24B).

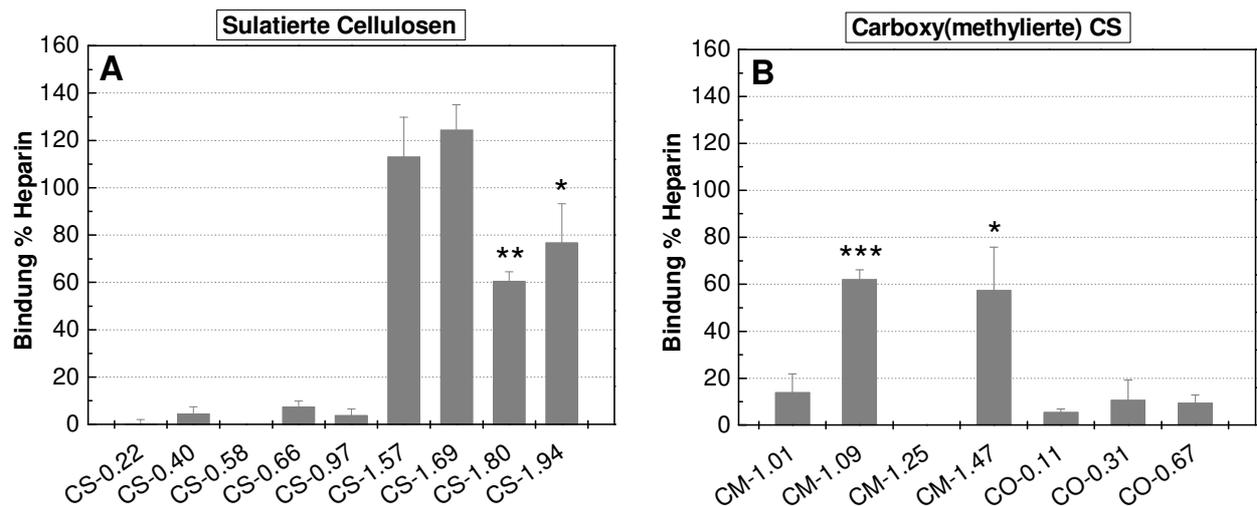


Abbildung 24: Vergleich der Bindungsaffinitäten der sulfatierten und carboxy(methyl)ierten Cellulosen an BMP-2. BMP-2 wurde durch die Derivate kompetitiv von Heparin-Agarose-Mikropartikeln freigesetzt und im Dot-Blot quantifiziert. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung. (n = 4). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-Test ermittelt: *p < 0,05, **p < 0,001, ***p < 0,0001, für sulfatierte Cellulosen bezogen auf CS-1.57, für carboxy(methyl)ierte CS bezogen auf CM-1.01.

4.6.2. Untersuchung der BMP-2-induzierten Alkalischen Phosphatase Aktivität von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC)

Multipotente mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark haben die Fähigkeit in Chondrocyten, Adipocyten, Endothelzellen, Nervenzellen und Osteoblasten zu differenzieren [147]. Sie sind ein vielversprechendes Instrument in der Gewebezüchtung und werden zur Regeneration des Knochens genutzt [148,149]. Zunächst wurde untersucht in welchen Mengen der Wachstumsfaktor BMP-2 zu einer Beeinflussung der Alkalischen Phosphatase Aktivität (ALP-Aktivität) dieser Zellen führt. In einem parallelen Versuch wurde verifiziert, ob die Zugabe der osteogenen Induktoren Ascorbinsäure-2-Phosphat, β -Glycerophosphat und Dexamethason eine Verstärkung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität bewirken [150].

Die Ergebnisse in Abbildung 25A zeigen, dass ansteigende BMP-2 Konzentrationen in hMSC aus der fünften Passage nicht zu einem Anstieg der ALP-Aktivität führten. Durch die Zugabe der osteogenen Induktoren kam es zwar zu einer Verdopplung der ALP-Aktivität, ansteigende BMP-2 Konzentrationen bewirkten aber auch hier keine signifikante Verstärkung der ALP-Aktivität (Abb. 25A). Da es aufgrund der hohen Passagenzahl möglicherweise zum Verlust des osteogenen Differenzierungspotentials der hMSC gekommen war, untersuchten wir hMSC aus der zweiten Passage, in welchen aufgrund der niedrigen Passagenzahl die Fähigkeit zur Differenzierung vorhanden sein sollte [151]. Ansteigende BMP-2 Konzentrationen führten hier sowohl mit als auch ohne zusätzliche osteogene Induktoren zu einem leichten Rückgang der

ALP-Aktivität (Abb. 25B). Aus diesem Grunde wurden hMSC nicht in den weiterführenden Untersuchungen eingesetzt.

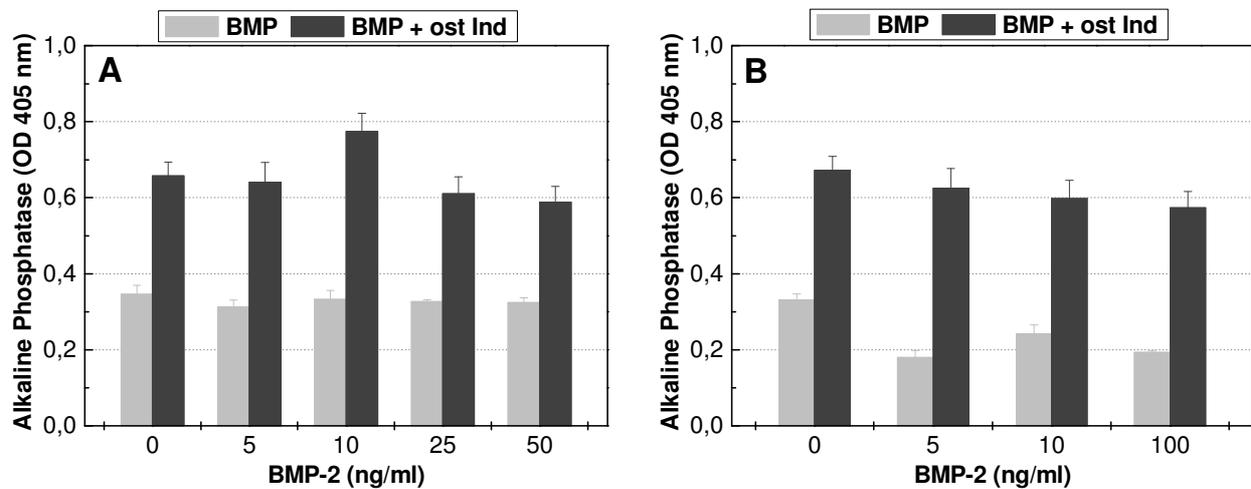


Abbildung 25: Effekt ansteigender BMP-2 Konzentrationen auf die ALP-Aktivität von hMSC. Hierzu wurden die Zellen für 3 Tage ohne oder mit osteogenen Induktoren und ansteigenden Konzentrationen von BMP-2 kultiviert. (A) Zellen aus der 5. Passage, (B) Zellen aus der 2. Passage. Die ALP-Aktivität wurde mit dem Substrat p-Nitrophenylphosphat gemessen. Die Werte repräsentieren den Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 5$).

4.6.3. Beeinflussung der BMP-2-induzierten osteogenen Differenzierung von multipotenten C3H/10T1/2 Mauszellen durch derivatisierte Polysaccharide

4.6.3.1. Verifizierung der Alkalischen Phosphatase Aktivität durch BMP-2 und osteogene Induktoren

Die murine Zelllinie C3H/10T1/2 kann durch den Wachstumsfaktor BMP-2, als auch andere Induktoren eine osteogene Differenzierung erfahren [89]. Zur Untersuchung des Einflusses von BMP-2 und osteogener Induktoren führten wir Versuche durch, wie zuvor in Kapitel 4.6.2. beschrieben. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, führten BMP-2-Konzentrationen bis 100 ng/ml ohne zusätzliche Induktoren zu einem leichten Absinken der ALP-Aktivität. Durch Zugabe der osteogenen Induktoren war jedoch eine signifikante Erhöhung der ALP-Werte mit ansteigenden BMP-2-Konzentrationen zu beobachten, welche mit 50 und 100 ng/ml BMP-2 zu einer 2,5 fachen Verstärkung des ALP-Wertes (verglichen zur Kontrolle ohne BMP-2) führte. Für die weiteren Experimente mit C3H/10T1/2 Zellen wurden deshalb 50 ng/ml BMP-2 und die osteogenen Induktoren Ascorbinsäure-2-Phosphat, β -Glycerophosphat und Dexamethason eingesetzt.

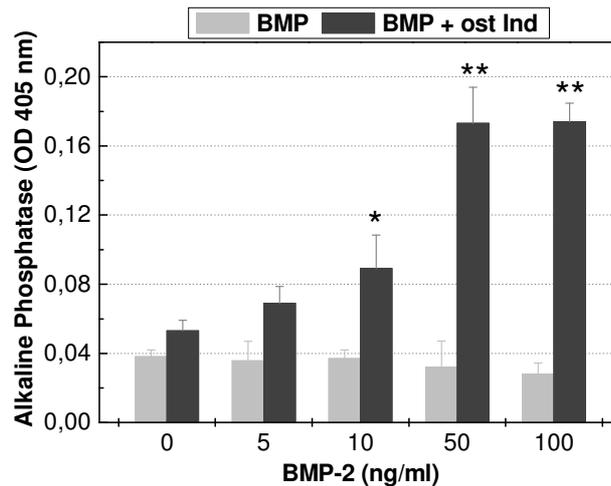


Abbildung 26: Effekt ansteigender BMP-2 Konzentrationen auf die ALP-Aktivität von C3H/10T1/2 Mausfibroblasten aus der 5. Passage. Hierzu wurden Zellen für 3 Tage ohne oder mit osteogene Induktoren und ansteigenden Konzentrationen von BMP-2 kultiviert. Die ALP-Aktivität wurde mit dem Substrat p-Nitrophenylphosphat gemessen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 5$). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-Test ermittelt: * $p < 0,01$, ** $P < 0,0001$, verglichen zur Kontrolle ohne BMP-2.

4.6.3.2. Beeinflussung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität von C3H/10T1/2

Mauszellen durch GAG-analoge Verbindungen

Um eine Vergleichbarkeit dieser Versuche mit denen der Beeinflussung der FGF-2-induzierten Proliferation durch die GAG-analogen Verbindungen zu erreichen, wurden die synthetisierten Derivate in Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ bis 1 mg/ml eingesetzt. Da in den Versuchen mit FGF-2 die gering sulfatierten Cellulosen und die carboxylierten/carboxymethylierten CS kaum zu einer Verstärkung der FGF-2-induzierten Proliferation führten, wurde in den Versuchen mit BMP-2 nur eine kleine Auswahl dieser Derivate untersucht. Neben der ALP-Aktivität wurde als zweiter Parameter der Gesamt Protein-Gehalt verifiziert, der prinzipiell ein Maß der Zahl lebender Zellen ist und deshalb einen Indikator für die Lebensfähigkeit der Zellen darstellt. Die ALP-Aktivität wurde zum Protein-Gehalt relativiert, um die Ergebnisse unabhängig von möglichen toxischen Einflüssen der Derivate darzustellen. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, bewirkten alle sulfatierten Cellulosen einen Rückgang der ALP-Aktivität im untersuchten Konzentrationsbereich. Speziell die beiden am höchsten sulfatierten Derivate, führten schon mit 10 $\mu\text{g/ml}$ zu einem signifikanten Rückgang der ALP-Aktivität gegenüber dem Wert der Kontrolle ohne Polysaccharid (CS-1.94 $p < 0,001$ / CS-1.80 $p < 0,002$, Abb. 27B). Für die sulfatierte Cellulose CS-1.57 wurde eine signifikante Abnahme der ALP-Aktivität aber selbst nicht mit 1 mg/ml beobachtet (Abb. 27B).

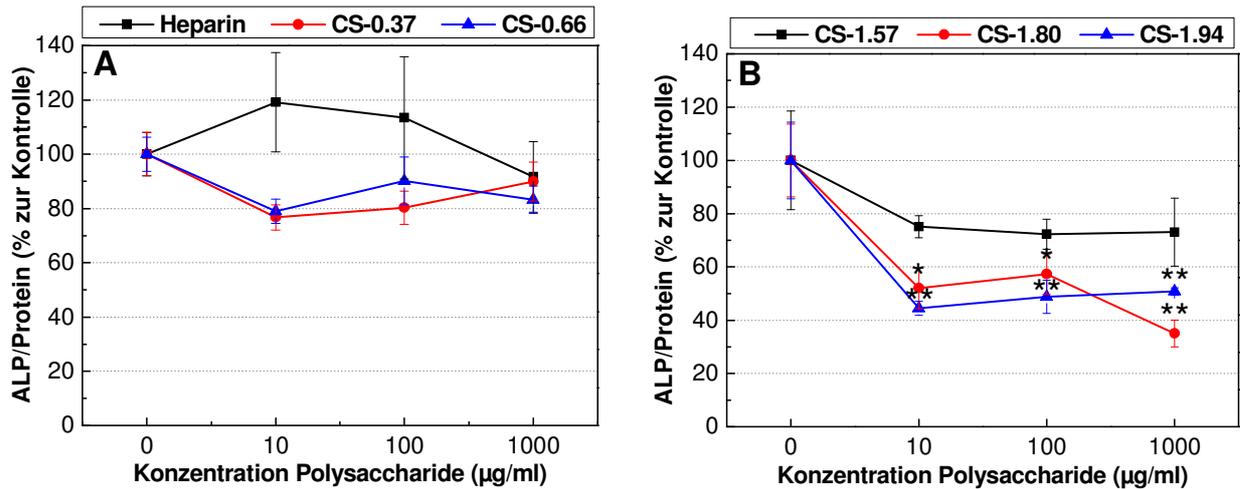


Abbildung 27: Vergleich der Effekte sulfatierter Polysaccharide auf die BMP-2-induzierte ALP-Aktivität. Hierzu wurden die C3H/10T1/2 Zellen für drei Tage mit osteogenen Induktoren, 50 ng/ml BMP und ansteigenden Konzentrationen der Polysaccharide inkubiert. Die ALP-Aktivität wurde mit dem Substrat p-Nitrophenylphosphat gemessen. Die ALP-Werte wurden gegen den Protein-Gehalt gerechnet. (A) niedrig sulfatierte CS und Heparin, (B) hochsulfatierte CS. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 4$). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-Test ermittelt: * $p < 0.002$, ** $P < 0,001$, verglichen zur Kontrolle ohne Polysaccharid.

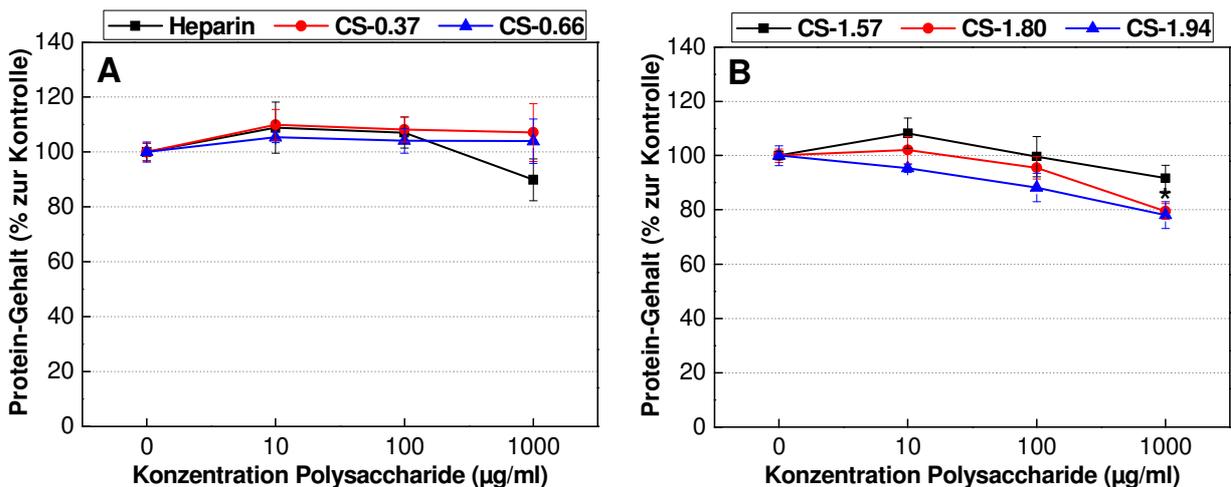


Abbildung 28: Vergleich der Effekte sulfatierter Polysaccharide auf den Gesamt-Protein Gehalt. Hierzu wurden die C3H/10T1/2 Zellen für drei Tage mit osteogenen Induktoren, 50 ng/ml BMP und ansteigenden Konzentrationen der Polysaccharide inkubiert. Der Protein-Gehalt wurde nach Lyse der Zellen mit BCA und Cu(II)SO_4 bestimmt. (A) Heparin und niedrig sulfatierte CS, (B) hochsulfatierte CS, Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 4$). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-Test ermittelt: * $p < 0.002$, verglichen zur Kontrolle ohne Polysaccharid.

Im Gegensatz dazu führte Heparin zu einer leichten, wenn auch nicht signifikanten Steigerung der ALP-Aktivität mit 10 und 100 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 27A). Abbildung 28A zeigt dagegen, dass niedrig sulfatierte Cellulosen keinen negativen Einfluss auf den Gesamt-Protein Gehalt hatten, hochsulfatierte CS bewirkten jedoch mit 1 mg/ml einen signifikanten Rückgang der Lebensfähigkeit (Abb. 28B).

Nach Zugabe der carboxylierten/carboxymethylierten Derivate CO-0.67 und CM-1.25 wurde mit 1 mg/ml ein signifikanter Anstieg der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität auf bis zu 156 %, verglichen zur Kontrolle ohne Polysaccharid, beobachtet (Abb. 29A). Da dieser starke Anstieg im Gegensatz zu den Effekten der carboxylierten/carboxymethylierten CS auf die FGF-2-induzierte Proliferation stand, wurde untersucht, ob es sich in diesem Fall um einen methodischen Fehler handelt. Nach Zugabe von 1/10 der für die ALP-Versuche eingesetzten Menge der carboxylierten/carboxymethylierten CS (in den entsprechenden Verdünnungsstufen) zur p-Nitrophenylphosphat-Lösung (siehe Material und Methoden: ALP-Aktivität) kam es konzentrationsabhängig zu einer Steigerung der Absorptionswerte bei 405 nm (Daten nicht gezeigt), welcher bei ausschließlich sulfatierten Cellulosen jedoch nicht festgestellt wurde. Nach Durchführung des gleichen Kontrollversuchs für den BCA-Assay (Protein-Bestimmung) zeigte sich auch hier ein leichter Anstieg der Messwerte bei 550 nm für die carboxylierten/carboxymethylierten CS, was auch den leichten Anstieg des Protein-Gehalts in Abbildung 29B erklärt. Da die Kavitäten der 96 Loch-Platten in der Experimenten der ALP-Aktivität vor der Zugabe von p-Nitrophenylphosphat nicht gewaschen wurden, resultierten die hohen ALP-Werte wahrscheinlich aus geringen Rückständen der Polysaccharide in den Kavitäten. In allen weiteren Experimenten wurden die Kavitäten deshalb vor Lyse der Zellen mit 200 μ l PBS gewaschen.

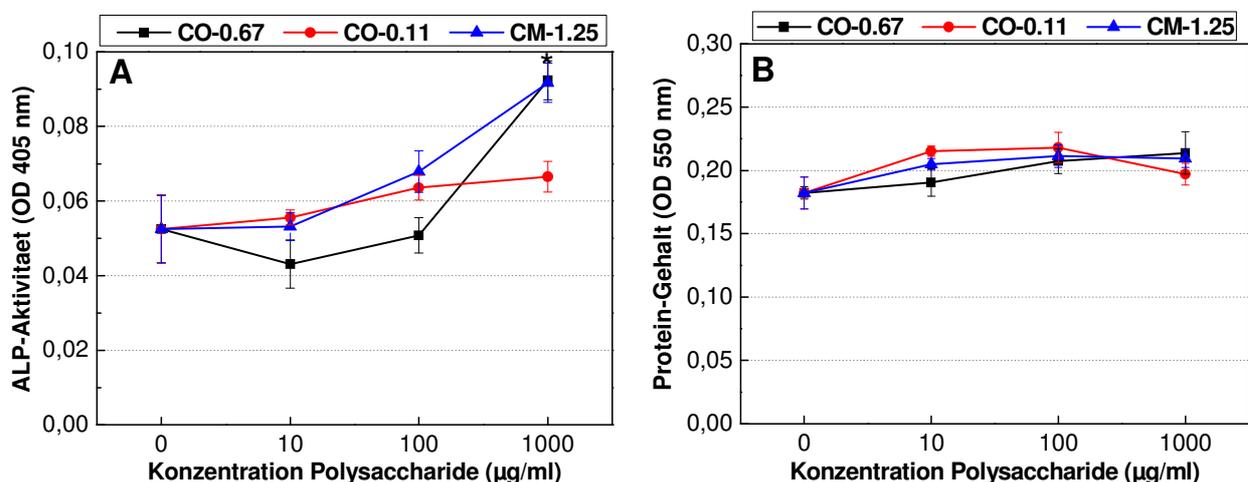


Abbildung 29: Konzentrationsabhängiger Effekt carboxy(methy)lierter Polysaccharide auf die BMP-2-induzierte ALP-Aktivität und den Protein-Gehalt. C3H/10T1/2 Zellen wurden für drei Tage mit osteogenen Induktoren, 50 ng/ml BMP und ansteigenden Konzentrationen der Polysaccharide inkubiert. (A) ALP-Aktivität/Protein-Gehalt, (B) Protein Gehalt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 4). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-Test ermittelt: *p < 0.02, verglichen zur Kontrolle ohne Polysaccharid.

4.6.3.3. Beeinflussung der BMP-2-induzierten Mineralisierung durch Cellulose-Derivate

Als weiterer wichtiger Parameter osteogener Differenzierung wurde die Mineralisierung nach drei Wochen Inkubation mit osteogenen Induktoren, 50 ng/ml BMP-2 und 10 µg bzw. 1 mg/ml Heparin, den Cellulose-Sulfaten CS-0.66 und CS-1.94 sowie der carboxymethylierten Cellulose CM-1.25 untersucht. Wie in Abbildung 30A zu erkennen führte BMP-2 dabei zu einer Verdopplung der Mineralisierung gegenüber Medium mit osteogenen Induktoren allein. Dieser Wert (OI + BMP) wurde 100% gesetzt und als Kontrolle genutzt.

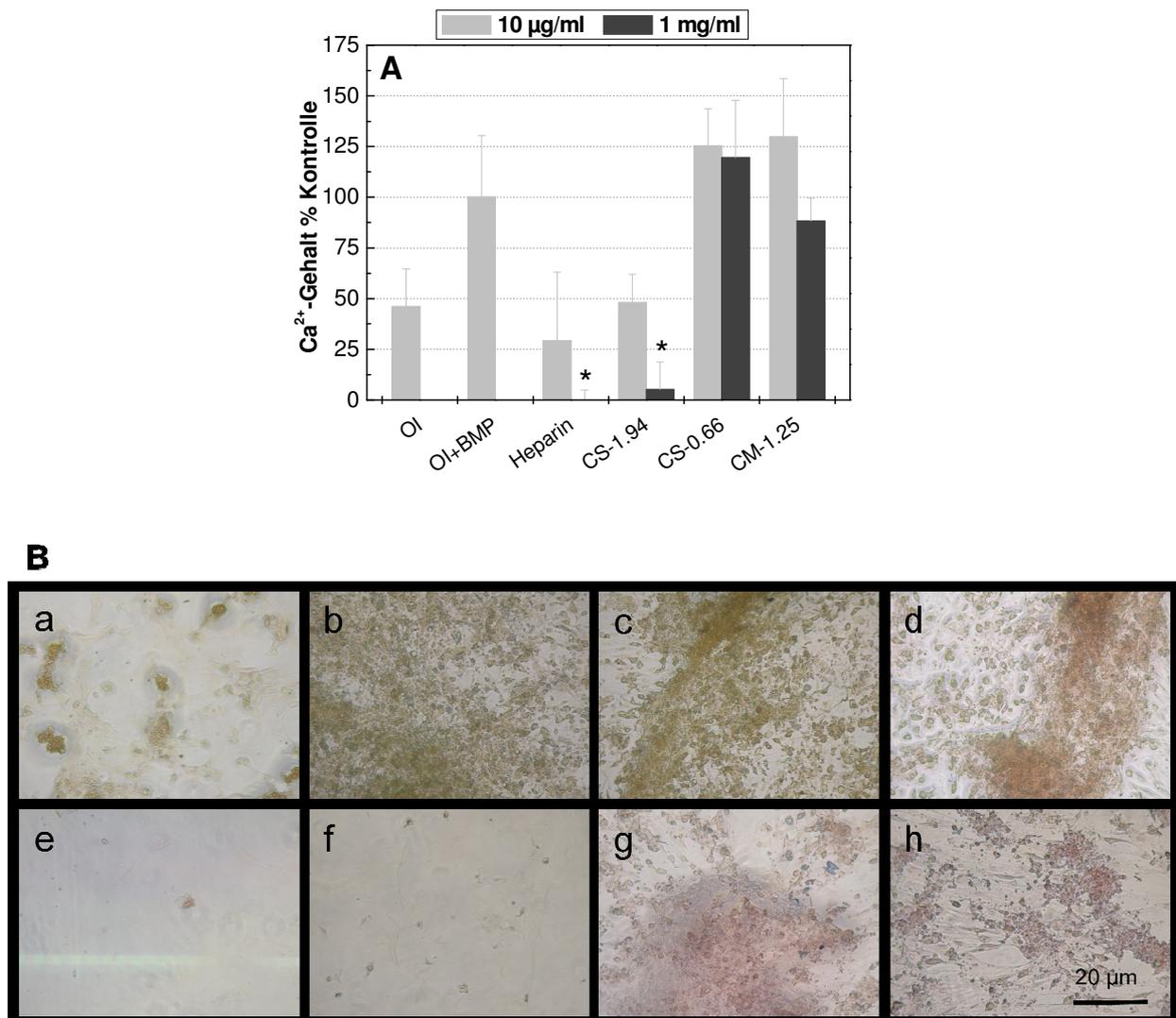


Abbildung 30: Vergleich der Wirkung GAG-analoger Verbindungen auf die nach Langzeitinkubation erfolgte Ca²⁺-Einlagerung in C3H/10T1/2 embryonale Mausfibroblasten. Die Zellen wurden dazu für 3 Wochen mit osteogenen Induktoren, 50 ng/ml BMP-2 sowie 10 bzw. 1000 µg/ml Heparin und derivatisierten Cellulosen inkubiert. A) Quantifizierung des Ca²⁺-Gehaltes mit o-Cresolphthalein-Komplex im im Plattenphotometer, OI: osteogene Induktoren, Werte repräsentieren Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-t-Test ermittelt: *p < 0.01, verglichen zur Kontrolle mit osteogenen Induktoren und 50 ng/ml BMP-2 allein. B) Hellfeld-Aufnahmen nach Alizarin-Rot Färbung calcifizierter ECM, K: Kontrolle; a, b, c, d: 10 µg/ml modifizierte Cellulose; e, f, g, h: 1 mg/ml modifizierte Cellulose; a, e: Heparin PIM; b, f: CS-1.94; c, g: CS-0.66; d, h: CM-1.25.

Wie in Abbildung 30B zu erkennen ist, führte Heparin schon in einer Konzentration von 10 µg/ml zum Absterben der Zellen, wodurch auch nahezu keine Ca²⁺-Einlagerung detektierbar war (Abb. 30A). Ähnlich Heparin, bewirkte auch die hochsulfatierte Cellulose CS-1.94 schon mit 10 µg/ml eine Unterdrückung der BMP-2-induzierten Mineralisierung, jedoch war die geringe Mineralisierung nur bei 1 mg/ml auf ein Absterben der Zellen zurückzuführen (Abb. 30B f). Die niedrig sulfatierte Cellulose CS-0.66 führte in Konzentrationen von 10 µg/ml und 1 mg/ml zu leichter, wenn auch nicht signifikanter Erhöhung der Ca²⁺-Einlagerung, was auch für 10 µg/ml des carboxymethylierten Derivates CM-1.25 zu sehen war (Abb.30A). Der leichte Rückgang mit 1 mg/ml des Derivates CM-1.25 war wiederum auf eine leichte Beeinflussung der Vitalität der Zellen zurückzuführen (Abb. 30B h).

4.6.3.4. Einfluss von Konzentrationen unter 10 µg/ml derivatisierter Polysaccharide auf die BMP-2-induzierte ALP-Aktivität

Aufgrund der Unterdrückung der ALP-Aktivität durch die GAG-analogen Verbindungen im Konzentrationsbereich von 10 µg/ml bis 1 mg/ml, wurden in den folgenden Versuchen Konzentrationen von 10 µg/ml und weniger eingesetzt. Dazu wurde der Einfluss von zwei hochsulfatierten Cellulosen (CS-1.94, CS-1.57) untersucht, da in Anbetracht der Ergebnisse zur FGF-2-induzierten Proliferation Cellulose-Sulfate mit einem Gesamt-Sulfatierungsgrad unter 1,00, kaum eine signifikante Erhöhung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität zu erwarten war. Von den carboxylierten/carboxymethylierten CS wurde CM-1.47 aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität an BMP-2 ausgewählt. Zusätzlich wurde die Wirkung eines hochsulfatierten Chitosans (CHS1.77-1.00) sowie Heparin untersucht. Wie in Abbildung 31A zu sehen, führten alle hochsulfatierten Polysaccharide in Konzentrationen zwischen 0,075 – 0,6 µg/ml zu einer Verstärkung der ALP-Aktivität, die mit 0,15 und 0,3 µg/ml für alle drei Derivate signifikant war ($p < 0,05$). Konzentrationen von 1,2 µg/ml bis 10 µg/ml der sulfatierten Derivate CS-1.94 und CHS1.77-1.00, nicht aber CS-1.57, bewirkten dagegen einen stark signifikanten Rückgang der ALP-Aktivität, unter den Wert der Kontrolle ($p < 0,001$) (Abb. 31A). Heparin führte, ähnlich CS-1.57, zu einer Steigerung der ALP-Aktivität über den gesamten Konzentrationsbereich (Abb. 31B), die in einigen Konzentrationen signifikant war, aber unter den Maximalwerten der sulfatierten Cellulosen lag. Die carboxymethylierte Cellulose CM-1.47 bewirkte keine signifikante Veränderung BMP-2-induzierten ALP-Aktivität. (Abb. 31B).

Ähnlich den Versuchen mit 10 µg/ml – 1mg/ml führten die hochsulfatierten Derivate CS-1.94 und CHS1.77-1.00 auch in diesem niedrigen Konzentrationsbereich zu einer

konzentrationsabhängigen Verringerung der Lebensfähigkeit, die mit 2,5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ stark signifikant war (Abb. 32A). Heparin bewirkte in Konzentrationen von 0,6 $\mu\text{g/ml}$ und höher einen signifikanten Rückgang der Protein-Werte, CM-1.47 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Lebensfähigkeit (Abb. 32B).

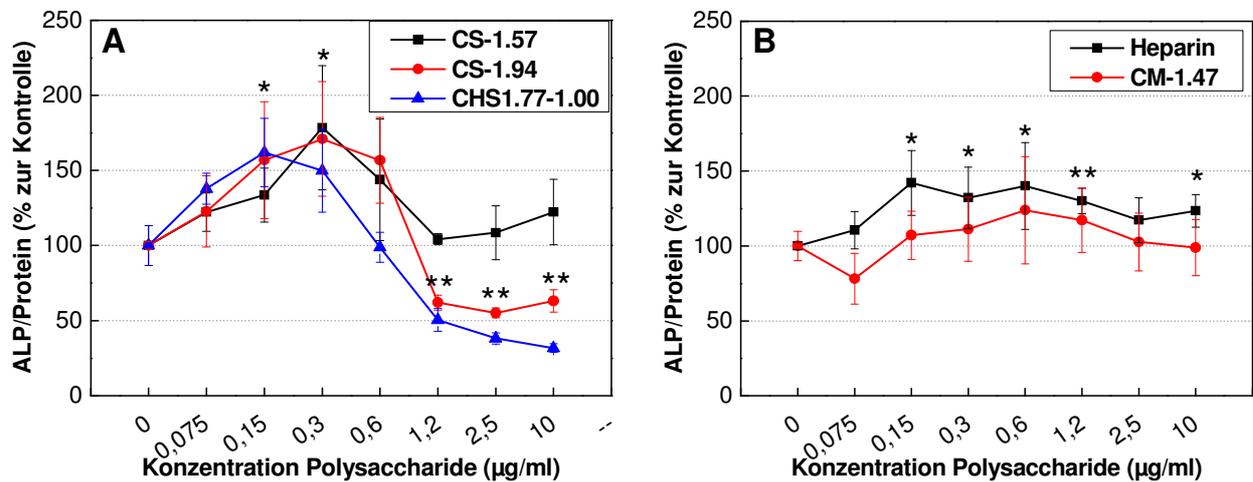


Abbildung 31: Effekt geringer Konzentrationen derivatisierter Polysaccharide auf die BMP-2-induzierte ALP-Aktivität. Die C3H/10T1/2 Zellen wurden für drei Tage mit osteogenen Induktoren, 50 ng/ml BMP und ansteigenden Konzentrationen der Polysaccharide inkubiert. (A) hochsulfatierte Polysaccharide, (B) Heparin und carboxymethylierte CS. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 4$). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-Test ermittelt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, verglichen zur Kontrolle ohne Polysaccharid.

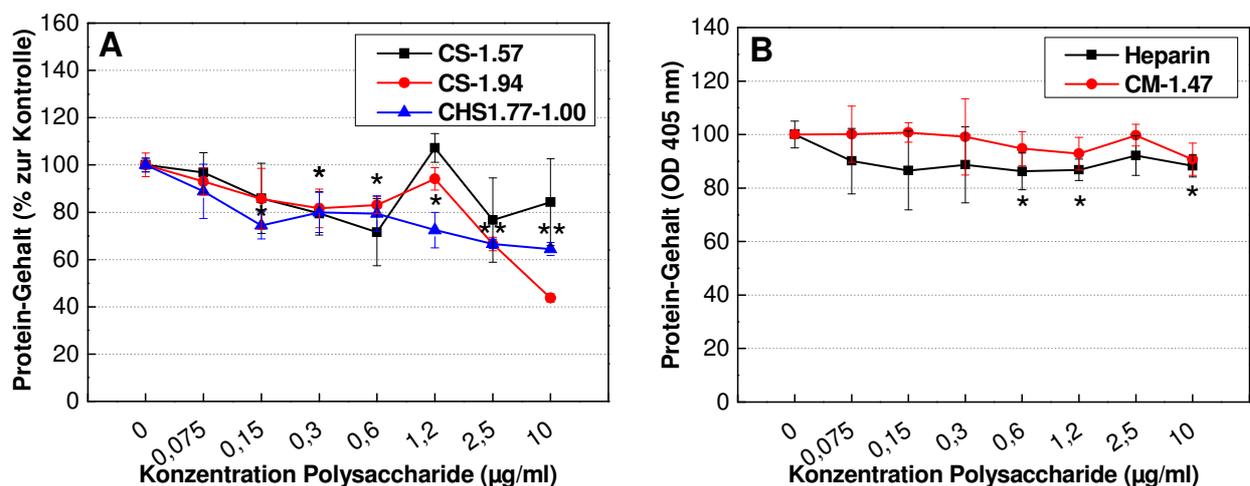


Abbildung 32: Effekt geringer Konzentrationen derivatisierter Polysaccharide auf den Protein-Gehalt. Die C3H/10T1/2 Zellen wurden für drei Tage mit osteogenen Induktoren, 50 ng/ml BMP und ansteigenden Konzentrationen der Polysaccharide inkubiert. (A) hochsulfatierte Polysaccharide, (B) Heparin und carboxymethylierte CS. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 4$). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-Test ermittelt: * $p < 0,01$, ** $p < 0,0001$, verglichen zur Kontrolle ohne Polysaccharid.

4.6.4. Beeinflussung der BMP-2-induzierten osteogenen Differenzierung von C2C12 Mausmyoblasten durch derivatisierte Polysaccharide

Aufgrund der nur relativ geringen Verstärkung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität durch die derivatisierten Polysaccharide und der geringen Unterschiede zwischen den einzelnen Polysacchariden mit C3H/10T1/2 Mauszellen, nutzten wir C2C12 Mausmyoblasten. Diese Zelllinie zeigt auch ohne Zusatz osteogener Induktoren eine starke BMP-2-induzierte osteogene Differenzierung. [152,85].

4.6.4.1. Verifizierung der optimalen BMP-2 Konzentration

Zunächst wurde verifiziert, welche Konzentration des Wachstumsfaktors BMP-2 zu signifikanter Steigerung der ALP-Aktivität führen und gleichzeitig eine maximale Steigerung der ALP-Aktivität durch GAG-analoge Verbindungen erlauben. Dazu wurden BMP-2 Konzentrationen von 50 bis 400 ng/ml eingesetzt. In einer parallelen Versuchsreihe wurde der Einfluss von 0,6 µg/ml des Chitosan-Sulfates CHS1.77-1.00 auf die BMP-2-induzierte ALP-Aktivität untersucht (Abb. 33). Mit 0,6 µg/ml zeigten hochsulfatierte Chitosan-Sulfate in einer Studie von Zhou eine maximale Steigerung der ALP-Aktivität bei einer BMP-2 Konzentration von 400 ng/ml [85]. In den eigenen Untersuchungen wurde die mit Abstand höchste ALP-Aktivität, ohne Zusatz des Chitosan Sulfates, mit 400 ng/ml BMP-2 beobachtet, die größte Steigerung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität durch CHS-1.77-1.00 wurde jedoch bei 200 ng/ml BMP-2 erreicht. Signifikant war die Steigerung der ALP-Aktivität durch das sulfatierte Chitosan auch mit 100 ng/ml des Wachstumsfaktors (Abb. 33).

Mit BMP-2 Konzentrationen von 100 und 200 ng/ml erhöhte sich auch der Gesamt Protein-Gehalt signifikant, mit 50 und 400 ng/ml wurde weder eine Erhöhung noch ein Absinken beobachtet (Abb. 33B). Eine weitere Zugabe von CHS1.77-1.00 bewirkte bei BMP-2 Konzentrationen von 0 und 50 ng/ml eine leichte Erhöhung der Anzahl lebender Zellen. Interessanterweise führte der Zusatz des sulfatierten Chitosans zu höheren BMP-2-Konzentrationen aber zum Absinken der Zahl lebender Zellen, die mit 400 ng/ml BMP-2 signifikant unter dem Wert der Kontrolle ohne BMP-2 und ohne CHS1.77-1.00 lag. Aufgrund der größten Steigerung der ALP-Aktivität mit 200 ng/ml BMP-2 durch CHS1.77-1.00 und einer nur geringfügigen Beeinflussung der Lebensfähigkeit durch Zugabe von CHS1.77-1.00 bei dieser Konzentration, nutzten wir 200 ng/ml BMP-2 für die weiteren Experimente.

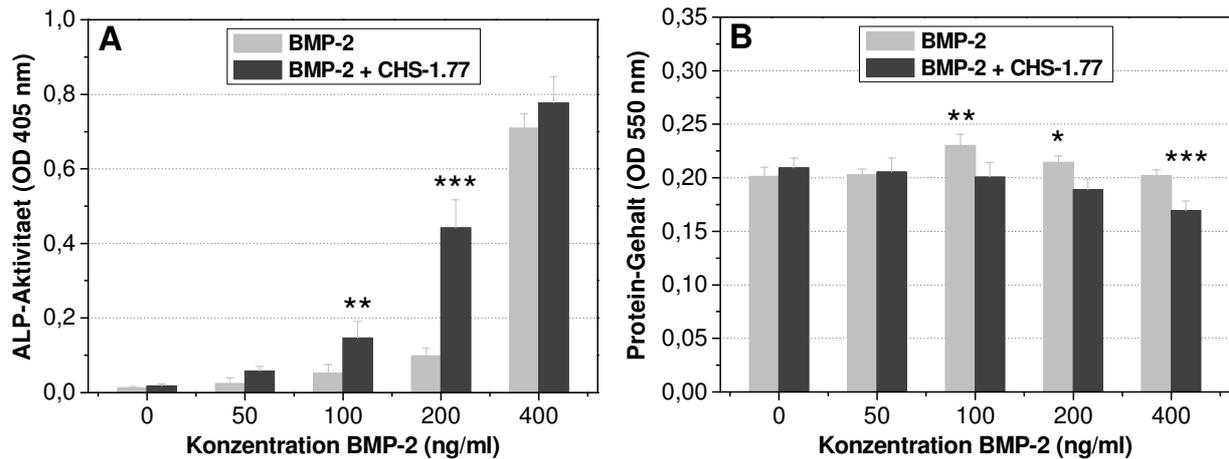


Figure 33: Effekt ansteigender BMP-2 Konzentrationen auf die ALP-Aktivität und Protein-Gehalt. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentration BMP-2 und entweder ohne oder mit 0,6 µg/ml CHS1.77-1.00 für drei Tage kultiviert. (A) ALP-Aktivität, (B) Protein-Gehalt. Die Werte zeigen Mittelwert und ± Standardabweichung (n = 8). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-Test ermittelt *p < 0.01, **p < 0.001, ***P < 0,0001. Für ALP: Vergleich zwischen Aktivität mit und ohne CHS1.77-1.00, bezogen auf die unterschiedlichen BMP-2 Konzentrationen, Protein Gehalt: verglichen zur Kontrolle ohne BMP-2 / ohne CHS1.77-1.00.

4.6.4.2. Beeinflussung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität durch derivatisierte Polysaccharide

Ähnlich den Untersuchungen mit C3H/10T1/2 Mausezellen wurden mit C2C12 Mausemyoblasten Konzentrationen der GAG-analogen Verbindungen unter 10 µg/ml eingesetzt. Aufgrund der Verwendung einer vierfach höheren BMP-2-Konzentration in den Experimenten mit C2C12 Myoblasten gegenüber C3H/10T1/2 Zellen, wurde auch die niedrigste Polysaccharid-Konzentration auf einen Wert von 0,325 µg/ml angehoben. Es wurden die gleichen Derivate wie in den Untersuchungen der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität durch geringe Konzentrationen der Polysaccharide mit C3H/10T1/2 Mausezellen untersucht. Zusätzlich wurde die Wirkung des Derivates mit dem höchsten Carboxylierungsgrad (CO-0.67) verifiziert. Wie in Abbildung 34A zu sehen, bewirkte das Chitosan-Sulfat CHS1.77-1.00 in Konzentrationen von 2,5 und 5 µg/ml die mit Abstand höchste Steigerung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität aller untersuchten Polysaccharide bei diesen Konzentrationen (14 fache Steigerung gegenüber Kontrolle mit BMP-2 allein). Die sulfatierten Cellulosen CS-1.57 und CS-1.94 führten bei 2,5 und 5 µg/ml zu signifikant niedrigerer ALP-Aktivität. CS-1.57 bewirkte mit zunehmenden Konzentrationen aber eine weitere Erhöhung der ALP-Aktivität, die mit 10 µg/ml auf das 10 fache der Kontrolle anstieg, und damit den gleichen Wert wie CHS1.77-1. bei dieser Konzentration erreichte (Abb. 34A). Die ALP-Aktivität für die am höchsten sulfatierte Cellulose CS-1.94 fiel mit Konzentrationen über 2,5 µg/ml wieder ab und sank mit 10 µg/ml auf

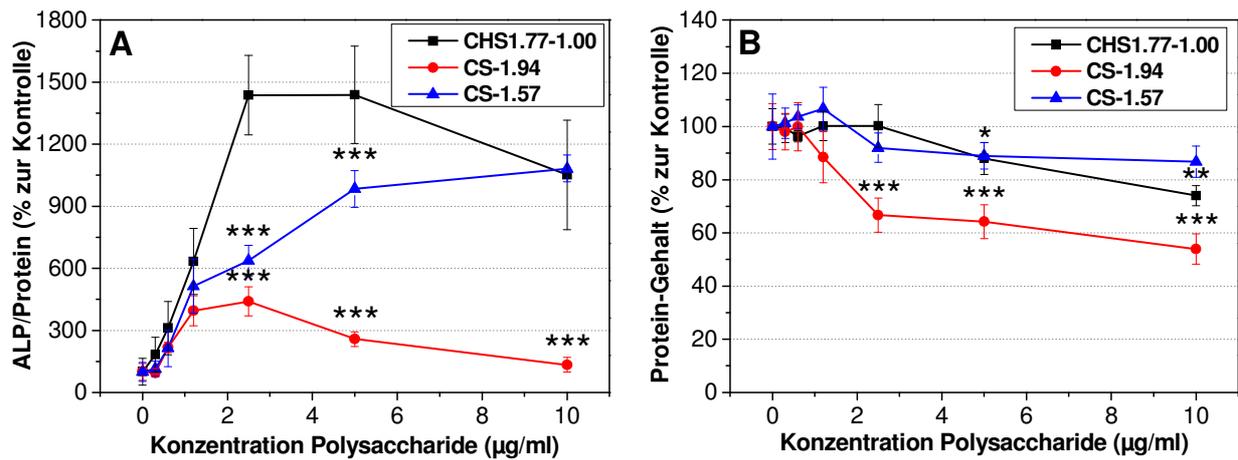


Abbildung 34: Konzentrationsabhängiger Effekt sulfatierter Polysaccharide auf die BMP-2-induzierte ALP-Aktivität und den Protein-Gehalt. Die Zellen wurden für drei Tage mit 200 ng/ml BMP und ansteigenden Konzentrationen der Polysaccharide inkubiert. (A) ALP-Aktivität/Protein-Gehalt, (B) Protein-Gehalt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 6$). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-Test ermittelt: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, für ALP/BCA: verglichen zu CHS1.77-1.00 bei der jeweiligen Konzentration, für Protein-Gehalt: verglichen zur Kontrolle ohne Polysaccharid.

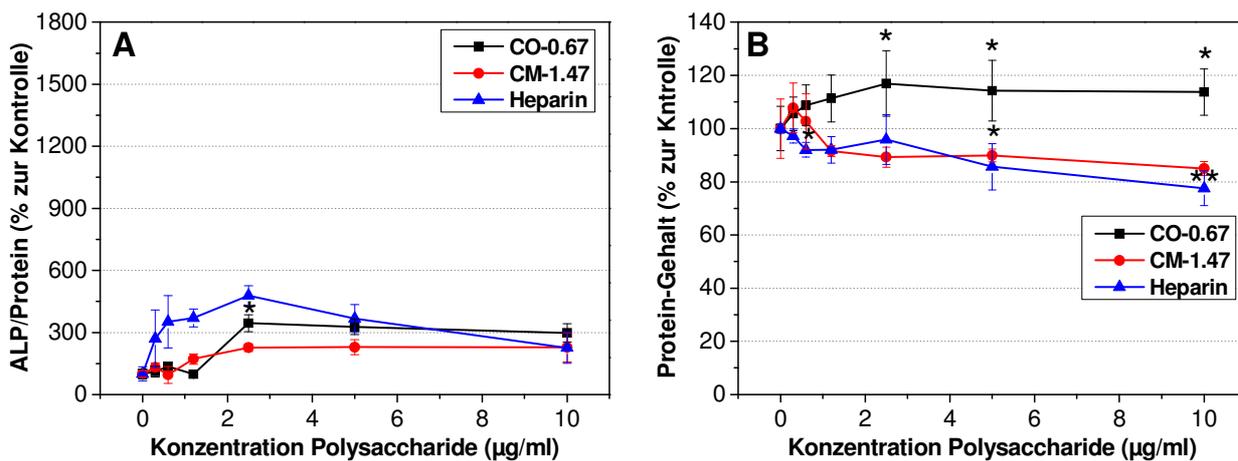


Abbildung 35: Konzentrationsabhängiger Effekt carboxy(methyl)ierter Polysaccharide auf die BMP-2-induzierte ALP-Aktivität und den Protein-Gehalt. Die Zellen wurden für drei Tage mit 200 ng/ml BMP und ansteigenden Konzentrationen der Polysaccharide inkubiert. (A) ALP-Aktivität/Protein-Gehalt, (B) Protein-Gehalt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 6$). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's-Test ermittelt: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, für ALP/BCA: CO-0.67 zu CM-1.47 bei der gleichen Konzentration, für Protein-Gehalt: verglichen zur Kontrolle ohne Polysaccharid.

den Wert der Kontrolle mit BMP-2 allein (Abb. 34A). Heparin führte zu annähernd gleicher Steigerung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität wie CS-1.94 bei 2,5 µg/ml. (Abb. 35A). Darüber hinaus führte CS-1.94 mit Konzentrationen $> 1,2$ µg/ml zu einem bis zu 46% igen Rückgang des Gesamt-Protein-Gehaltes. Auch CHS1.77-1.00 bewirkte eine signifikante Abnahme der Anzahl lebender Zellen mit 5 und 10 µg/ml, für CS-1.57 war dagegen kein signifikanter Rückgang zu verzeichnen (Abb. 34B).

Die carboxylierte Cellulose CO-0.67 zeigte mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ eine 3,5 fache Steigerung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität, wobei dieser Wert signifikant höher war als für die carboxymethylierte Cellulose CM-1.47 ($p < 0,01$) (Abb. 35A). CO-0.67 führte darüber hinaus, im Gegensatz zu allen anderen Polysacchariden, zu einer Erhöhung des Gesamt-Protein-Gehalts über den gesamten Konzentrationsbereich, der mit 2,5 – 10 $\mu\text{g/ml}$ signifikant war. Heparin bewirkte dagegen teilweise einen signifikanten Rückgang der Anzahl lebender Zellen (Abb. 35B).

Neben der Quantifizierung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität mittels p-Nitrophenylphosphat im 96-Lochplattenformat, wurde die Expression der Alkalischen Phosphatase auch durch histochemische Färbung der Zellen mit 5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid (NBT) dargestellt. In Abbildung 36 ist zu sehen, dass die sulfatierte Cellulose CS-1.57 bei einer Konzentration von 2.5 $\mu\text{g/ml}$ bereits eine starke Violett-Färbung zeigte, die mit 10 $\mu\text{g/ml}$ noch intensiver ausgeprägt war. Das Chitosansulfat CHS1.77-1.00 führte mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ zu sichtbar stärkerer Färbung als CS-1.57 bei der gleichen Konzentration, mit 10 $\mu\text{g/ml}$ nahm die ALP-Färbung jedoch wieder ab. Für CO-0.67 konnte ebenfalls eine Verstärkung der Tetrazolium-Färbung beobachtet werden, wenn auch in geringerer Intensität als für die beiden hochsulfatierten Cellulosen. Die Ergebnisse bestätigen prinzipiell die vorherigen quantitativen Untersuchungen zur ALP-Aktivität in 96-Loch-Platten.

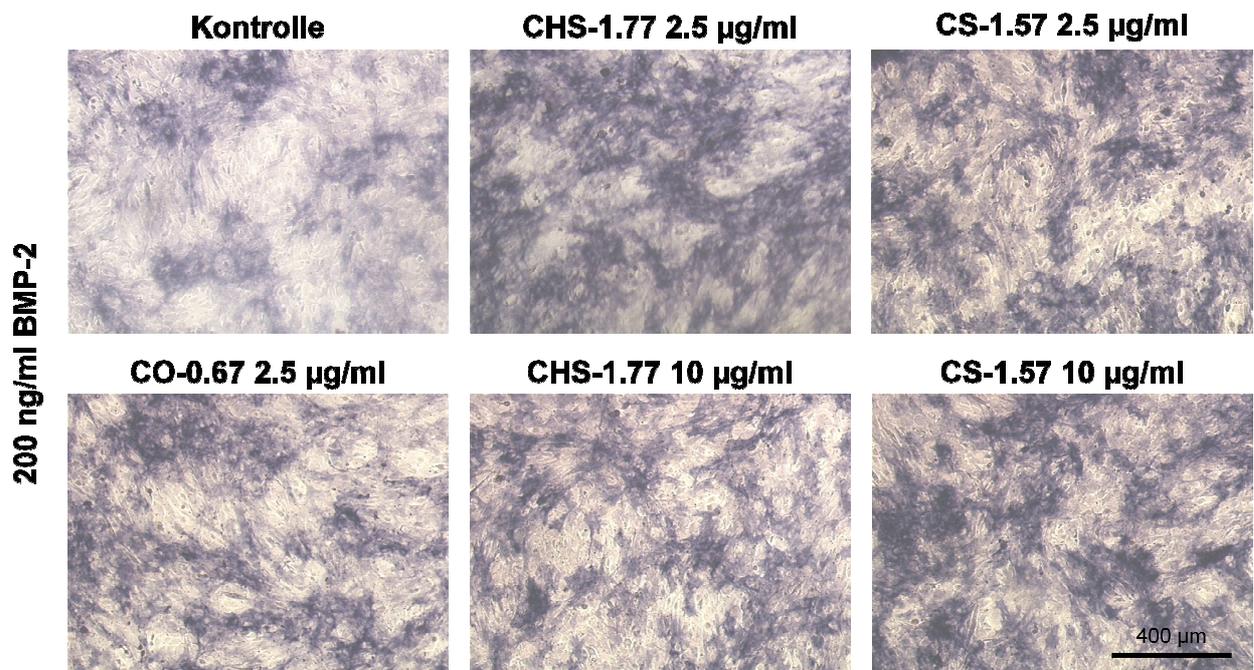


Abbildung 36: Histochemische Darstellung der ALP-Aktivität. Die Zellen wurden für drei Tage mit 200 ng/ml BMP und 2.5 oder 10 $\mu\text{g/ml}$ CHS1.77-1.00, CS-1.57 und 2,5 $\mu\text{g/ml}$ CO-0.67 inkubiert. Die ALP-Aktivität wurde nach Fixierung durch Glutaraldehyd mit BCIP und NBT visualisiert.

4.6.4.3. Beeinflussung der BMP-2-induzierten Expression osteogener Markergene durch derivatisierte Polysaccharide

Die Untersuchungen wurden mit den Derivaten CHS1.77-1.00 und CS-1.57 in Konzentrationen durchgeführt, welche in den Untersuchungen zur ALP-Aktivität ansteigende Wirkung zeigten, die carboxylierte Cellulose CO-0.67 wurde in der Konzentration maximaler Verstärkung der ALP-Aktivität eingesetzt. Dabei wurden sowohl Gene untersucht, die direkt für die Expression von Proteinen kodieren, welche für den Aufbau und die Entwicklung des Knochens relevant sind, als auch Gene die für Proteine kodieren, welche die Expression der zuvor erwähnten Gene regulieren (Regulatorproteine, Transkriptionsfaktoren). Die Ergebnisse zeigten, dass nicht alle Gene im Untersuchungs-Zeitraum von 48 h exprimiert wurden. So war die Expression von Bone Sialoprotein nach Zugabe von BMP-2 nicht nachzuweisen (hier nicht gezeigt). Die Expression des BMP-Antagonisten Noggin und des osteogenen Transkriptionsfaktors Osterix wurden dagegen durch BMP-2-Zugabe induziert. Eine weitere signifikante Steigerung der Expression durch die Polysaccharide wurde dabei beobachtet (Abb. 37A,B,C). Die Polysaccharide allein, ohne Zugabe von BMP-2, führten dagegen nicht zu einer Expression von Noggin und Osterix (Daten nicht gezeigt). Die größte Steigerung der Expression dieser Gene wurde mit 10 µg/ml CS-1.57 mit 2,3 facher Erhöhung für Osterix bzw. 2,6 facher Erhöhung für Noggin verifiziert. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen der ALP-Aktivität, in denen 10 µg/ml CS-1.57 zu stärkerer osteogener Differenzierung als 2,5 µg/ml dieses Derivates führen. Das sulfatierte Chitosan CHS1.77-1.00, welches mit 2,5 µg/ml zur höchsten ALP-Expression aller Polysaccharide führte, zeigte eine geringere BMP-2-induzierte Expression von Osterix und Noggin als CS-1.57 bei einer Konzentration von 10 µg/ml (Abb. 37B,C). Die geringste Verstärkung der Genexpression wurde mit 2,5 µg/ml CS-1.57 und 2,5 µg/ml CO-0.67 beobachtet (Abb. 37B,C), was ebenfalls in Übereinstimmung mit den Experimenten der ALP-Aktivität steht.

Die Expression von Runx2 war, im Gegensatz zu Osterix und Noggin, auch ohne BMP-2-Zugabe detektierbar. Durch die Gegenwart von BMP-2 wurde die Expression noch verdoppelt (hier nicht gezeigt). Die weitere Zugabe der Derivate führte jedoch wieder zu einem signifikanten Rückgang der Genexpression (Abb. 37D). Die stärkste Beeinflussung der Runx2-Expression (Rückgang) wurde dabei wiederum mit 10 µg/ml CS-1.57 beobachtet.

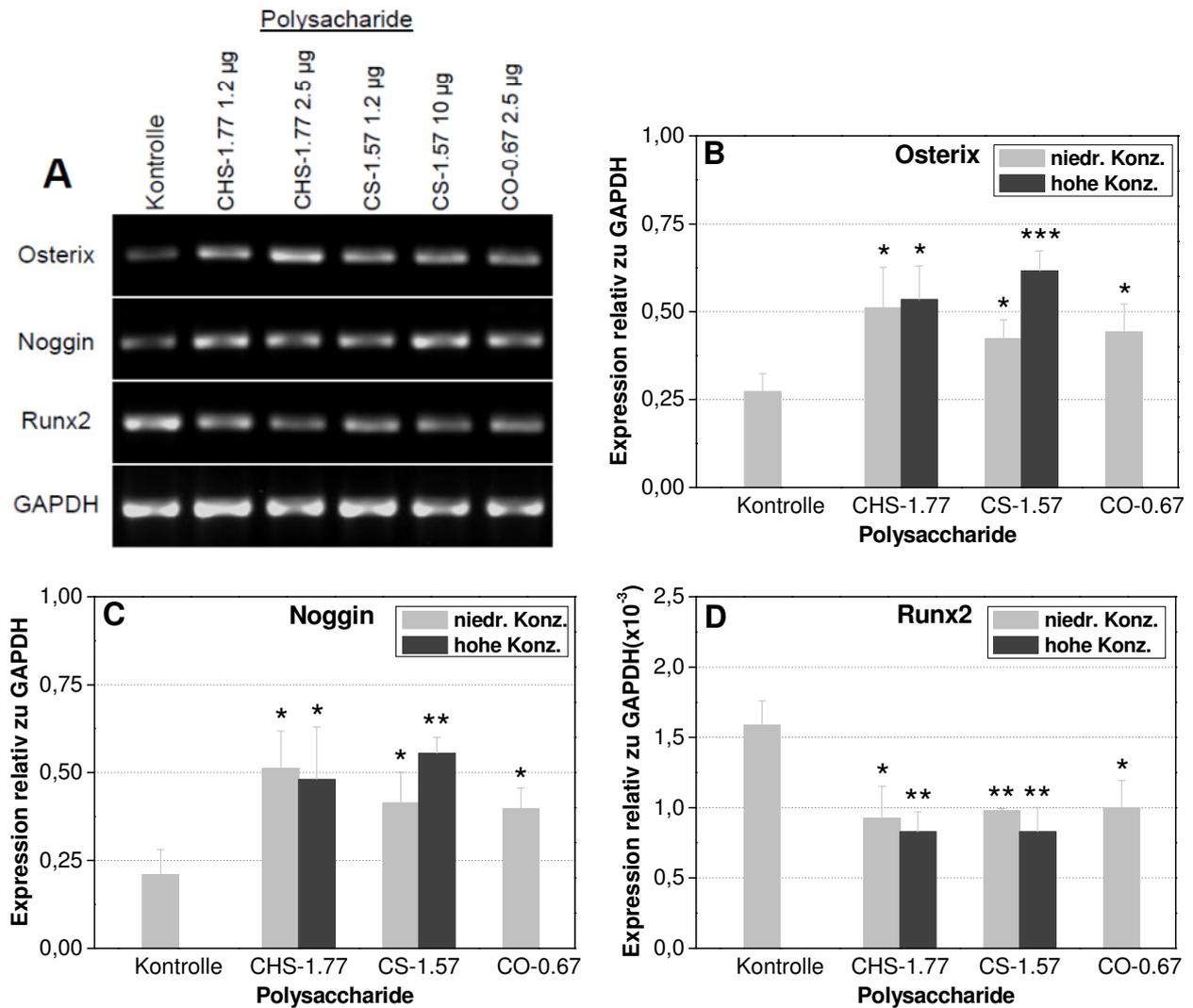


Abbildung 37: Effekt unterschiedlicher Polysaccharide auf die BMP-2-induzierte osteogene Genexpression. Die Zellen wurden mit 1,2 und 2,5 µg/ml CHS1.77-1.00, 1,2 und 10 µg CS-1.57, 2,5 µg/ml CO-0.67 und 200 ng/ml BMP-2 inkubiert. Die Gesamt mRNA wurden nach 48 h isoliert und eine reverse Transkription der RNS wurde mit Primern für Osterix, Noggin und Runx2 durchgeführt. Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) wurde als interne Kontrolle genutzt. (A) Respräsentative Gel-Bilder aus drei Experimenten. Integrierte optische Dichte mit Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3) von (B) Osterix, (C) Noggin, (D) Runx2. Die Signifikanz wurde mit dem Student's-Test ermittelt: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,002, verglichen zur Kontrolle mit BMP-2 allein.

Für Collagen Ia war, ähnlich Runx2, auch ohne die Zugabe von BMP-2 eine Genexpression zu beobachten, die durch Zugabe von BMP-2 auf das Zweifache anstieg (Daten nicht gezeigt). Auch hier führte die zusätzliche Applikation der Derivate in allen Konzentrationen zu einem Rückgang der Expression dieses Gens (Abb. 38A). Die Expression von Osteocalcin war, wie für die Gene Osterix und Noggin, nach alleiniger Zugabe der Derivate, aber ohne Zugabe BMP-2, nicht detektierbar. Mit BMP-2 wurde das Gen exprimiert, die Zugabe der Derivate führte zu einem leichten Anstieg für CS-1.57 und CO-0.67, mit 2,5 µg/ml CHS1.77-1.00 war jedoch ein signifikanter Rückgang der Expression zu verzeichnen (Abb. 38B).

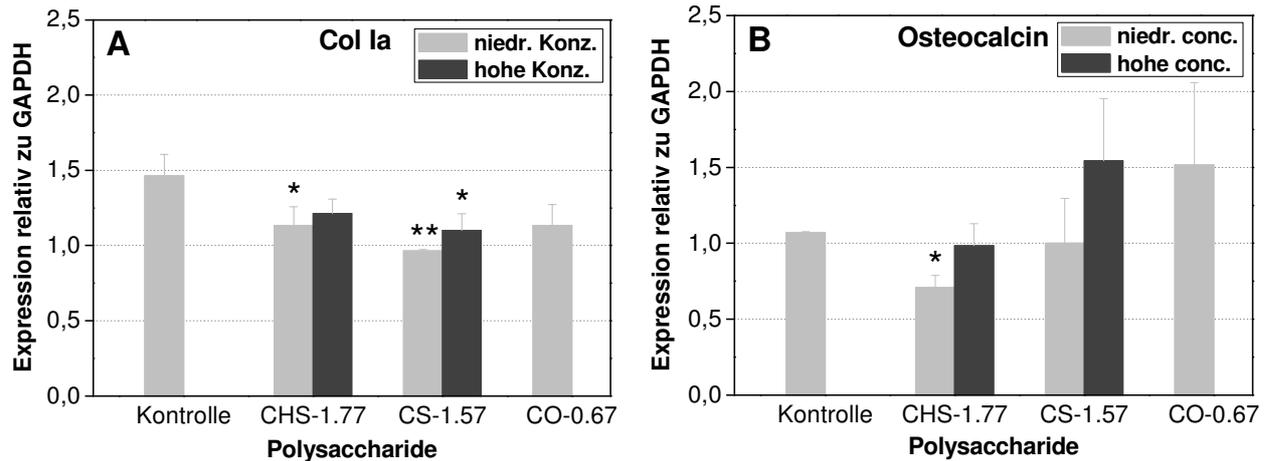


Abbildung 38: Effekt unterschiedlicher Polysaccharide auf die BMP-2-induzierte Genexpression von Osteocalcin und Collagen Ia. Der Versuch wurde analog der Versuchsbeschreibung in Abbildung 37 durchgeführt. Es wurden Primer für Osteocalcin und Col Ia verwendet. Integrierte optische Dichte mit Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 3$) von (A) Osteocalcin, (B) Collagen Ia. Die Signifikanz wurde mit dem Student's-Test ermittelt: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, verglichen zur Kontrolle mit BMP-2 allein.

4.6.4.4. Beeinflussung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität durch weitere Chitosan-Sulfate

Aufgrund der Tatsache, dass erst am Ende des Untersuchungszeitraumes weitere Chitosan-Sulfate im Ergebnis der Synthese zur Verfügung standen, wurden diese in einem separaten Experiment auf ihren Einfluss auf die BMP-2-induzierte ALP-Aktivität untersucht. In diesen Experimenten wurden zwei Chitosan-Sulfate mit 100 % iger 6-*O*-Sulfatierung und ein Derivat mit nur 78 % iger 6-*O*-Sulfatierung verglichen. Wie in Abbildung 39A zu sehen ist, wurde die höchste BMP-2-induzierte ALP-Aktivität mit dem Derivat CHS-1.59-1.00 bei 0,6 $\mu\text{g/ml}$ erreicht, wobei eine 10 fache Steigerung gegenüber der Kontrolle ohne Polysaccharid verifiziert wurde. Das Derivat mit dem höchsten Sulfatierungsgrad, CHS1.77-1.00, führte dagegen zu signifikant niedrigerer ALP-Aktivität bei der gleichen Konzentration ($p < 0,02$). CHS-1.59-0.78, mit einem 6-*O*-Sulfatierungsgrad von nur 0,78 bewirkte die mit Abstand geringste Verstärkung der BMP-2 induzierten ALP-Aktivität über den gesamten Konzentrationsbereich (statistisch signifikant niedriger als CHS-1.59-1.00, Abb. 39A). Vergleicht man den Gesamt-Protein Gehalt der Derivate waren im Konzentrationsbereich zwischen 2,5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ kaum Unterschiede zu erkennen, wobei die Anzahl lebender Zellen aber bei allen Derivaten signifikant reduziert wurde (Abb. 39B). Bei einer Konzentration von 1,2 $\mu\text{g/ml}$ führte das am höchsten sulfatierte Derivat CHS1.77-1.00 zu stärkerer Reduzierung des Protein-Gehaltes als die beiden anderen Chitosan-Sulfate, was aber nicht signifikant war.

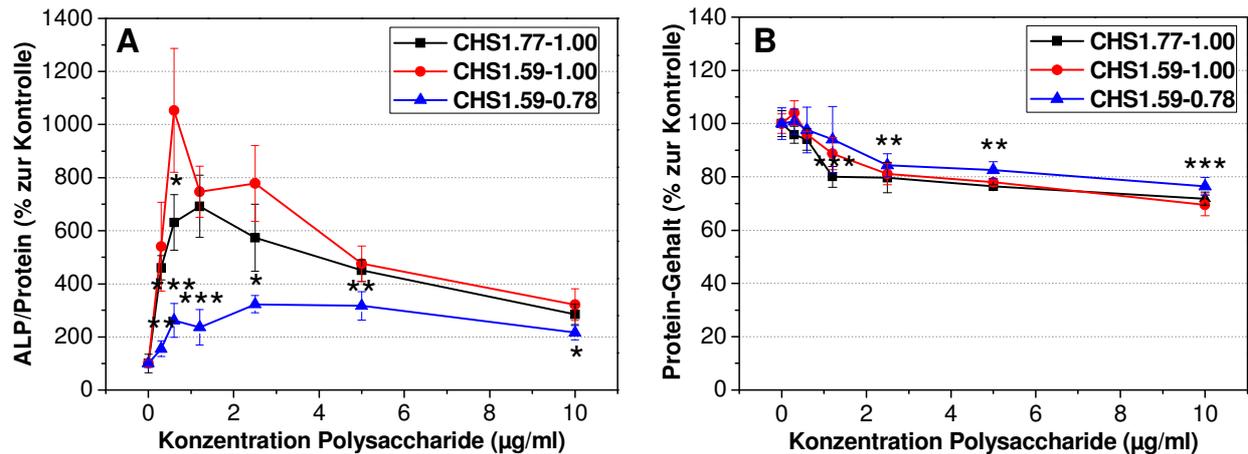


Abbildung 39: Konzentrationsabhängiger Effekt sulfatierter Chitosane auf die BMP-2-induzierte ALP-Aktivität. Die Zellen wurden für drei Tage mit 100 ng/ml BMP und ansteigenden Konzentrationen der Chitosan-Sulfate inkubiert. Die erste Zahl nach CHS stellt den Gesamt-Sulfatierungsgrad dar, die zweite Zahl den Sulfatierungsgrad an 3-O-Position. (A) ALP-Aktivität/Protein-Gehalt, (B) Protein-Gehalt. Die ALP-Aktivität wurde mit dem Substrat p-Nitrophenylphosphat gemessen. Der Protein-Gehalt wurde mit BCA + Cu(II)SO₄ bestimmt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 6). Die Signifikanz wurde mit dem Student's-Test ermittelt: *p < 0.02, **p < 0.01, ***p < 0.001, ALP/Protein: verglichen zu CHS1.59-1.00 bei der jeweiligen Konzentration, Protein-Gehalt: verglichen zur Kontrolle mit BMP-2 allein.

4.6.4.5. Morphologische Untersuchung der osteogenen Differenzierung durch geringe BMP-2 Konzentrationen

Da das Ziel der Untersuchungen nicht nur darin bestand, die Beeinflussung der osteogenen Aktivität von BMP-2 durch die GAG-analogen Verbindungen in Kurzzeitstudien, sondern auch über einen längeren Zeitraum zu verifizieren, wurden zusätzlich Langzeitstudien durchgeführt. In diesen Untersuchungen sollte, analog zu den Versuchen mit C3H/10T1/2 Zellen, die Mineralisierung der C2C12 Myoblasten untersucht werden. Dabei wurden BMP-2 Konzentrationen von 10 bis 150 ng/ml verwendet, um mögliche negative Einflüsse höherer BMP-2 Konzentrationen zu vermeiden. Zur Verstärkung der BMP-2-induzierten, osteogenen Aktivität wurde das Cellulose-Sulfat CS-1.57 ebenfalls in einer niedrigen Konzentration von 2,5 µg/ml eingesetzt, um mögliche toxische Einflüsse zu vermeiden. In den Untersuchungen wurde beobachtet, dass C2C12 Myoblasten ohne Zusatz von BMP-2 und CS-1.57 nach kurzer Zeit eine starke myogene Differenzierung zeigten (Ausbildung von Muskelfasern). Nach vier Tagen wurde, abhängig von der BMP-2-Konzentration und der Zugabe von CS-1.57, eine Unterdrückung der Ausbildung von Muskelfasern, und damit eine verstärkte osteogene Differenzierung beobachtet (Abb. 40). Mit 10 ng/ml BMP-2 war keine erkennbare Veränderung der Morphologie zu sehen, durch Zugabe von CS-1.57 kam es jedoch zu einer leichten Unterdrückung der Muskelfaserbildung. Mit 25 ng/ml BMP-2 war eine starke Reduktion der

Faserausbildung zu beobachten, durch Zugabe von CS-1.57 waren faserartige Strukturen nahezu vollständig verschwunden (Abb. 40). Mit 50 ng/ml BMP-2 allein erfolgte offensichtlich schon eine vollständige Unterdrückung der myogenen Zellmorphologie, was durch pflasterartige Zellen erkennbar war. Eine weitere Zugabe von CS-1.57 und höhere BMP-2 Konzentrationen führten zu keiner sichtbaren Veränderung mehr (Abb. 40). Eine längere Inkubationszeit (ab 6 Tagen) führte jedoch, wie in Abbildung 41 a,d erkennbar, zum Ablösen und starken Zusammenziehen der Zellen bei Konzentrationen über 25 ng/ml BMP. Dieses Phänomen wurde zu späteren Zeitpunkten auch bei geringeren BMP-2 Konzentrationen beobachtet. Es konnte durch Fluoreszein-Diacetat-Färbung jedoch nachgewiesen werden, dass die von der Unterlage abgelösten Zellen selbst nach 11 Tagen noch lebensfähig waren (Abb. 41 b,c,e,f), was darauf hinweist, dass das Ablösen nicht durch ein Absterben der Zellen hervorgerufen wurde. Aufgrund des frühen Ablösens der Zellen konnten keine Mineralisierungsstudien durchgeführt werden.

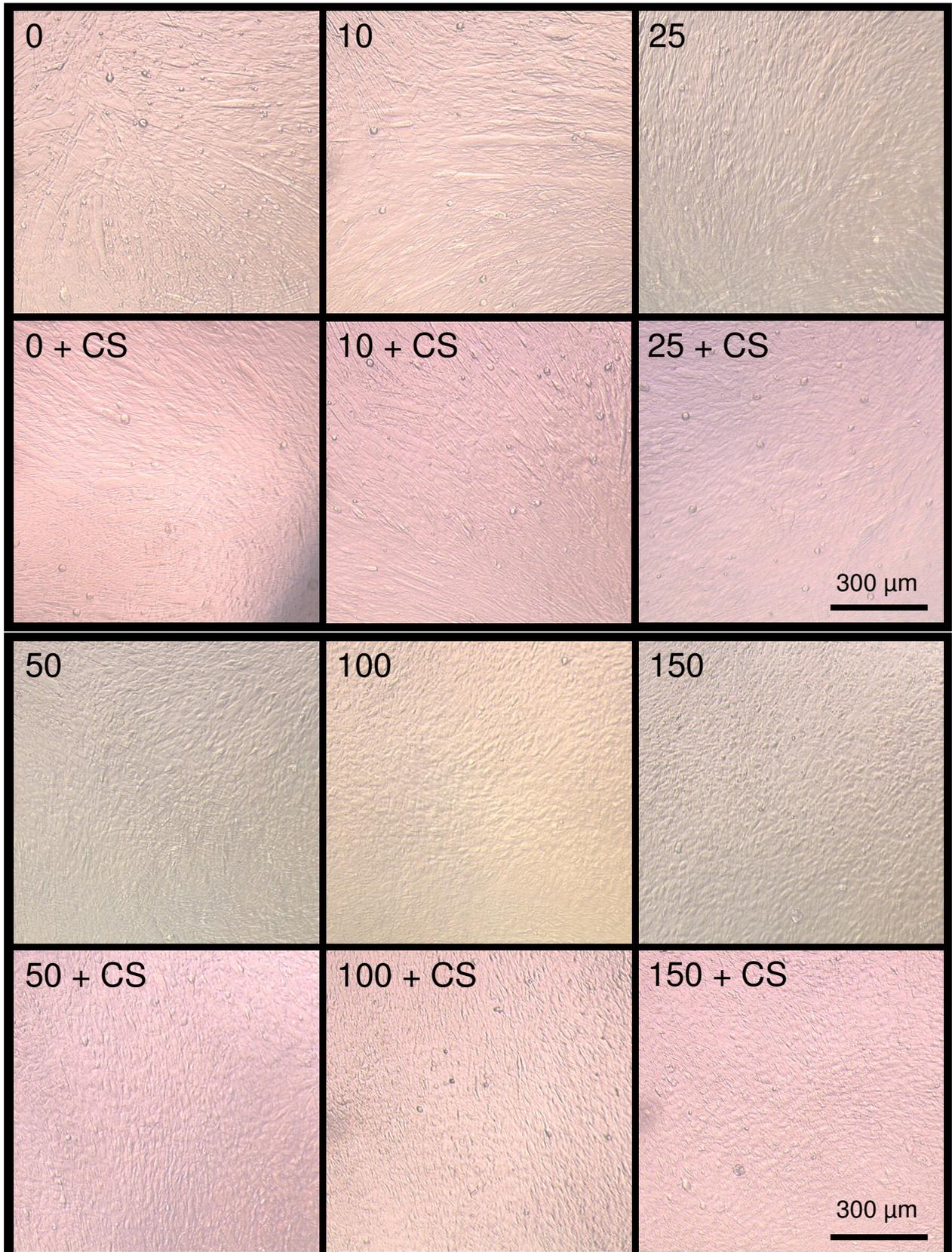


Abbildung 40: Untersuchung des Effekts ansteigender BMP-2 Konzentrationen und CS-1.57 auf die Unterdrückung der myogenen Differenzierung von C2C12 Myoblasten. Zellen wurden 0, 10, 25, 50, 100 und 150 ng/ml BMP-2 mit oder ohne Zusatz von 2,5 µg/ml CS-1.57 für 4 Tage inkubiert. Die Mengenangaben entsprechen BMP-2 Konzentrationen in ng/ml, CS = Zusatz des von CS-1.57. Alle Aufnahmen wurden mit Axiovert 100 (Zeiss, Jena, Deutschland) und 10 fach Objektiv im Hellfeld angefertigt.

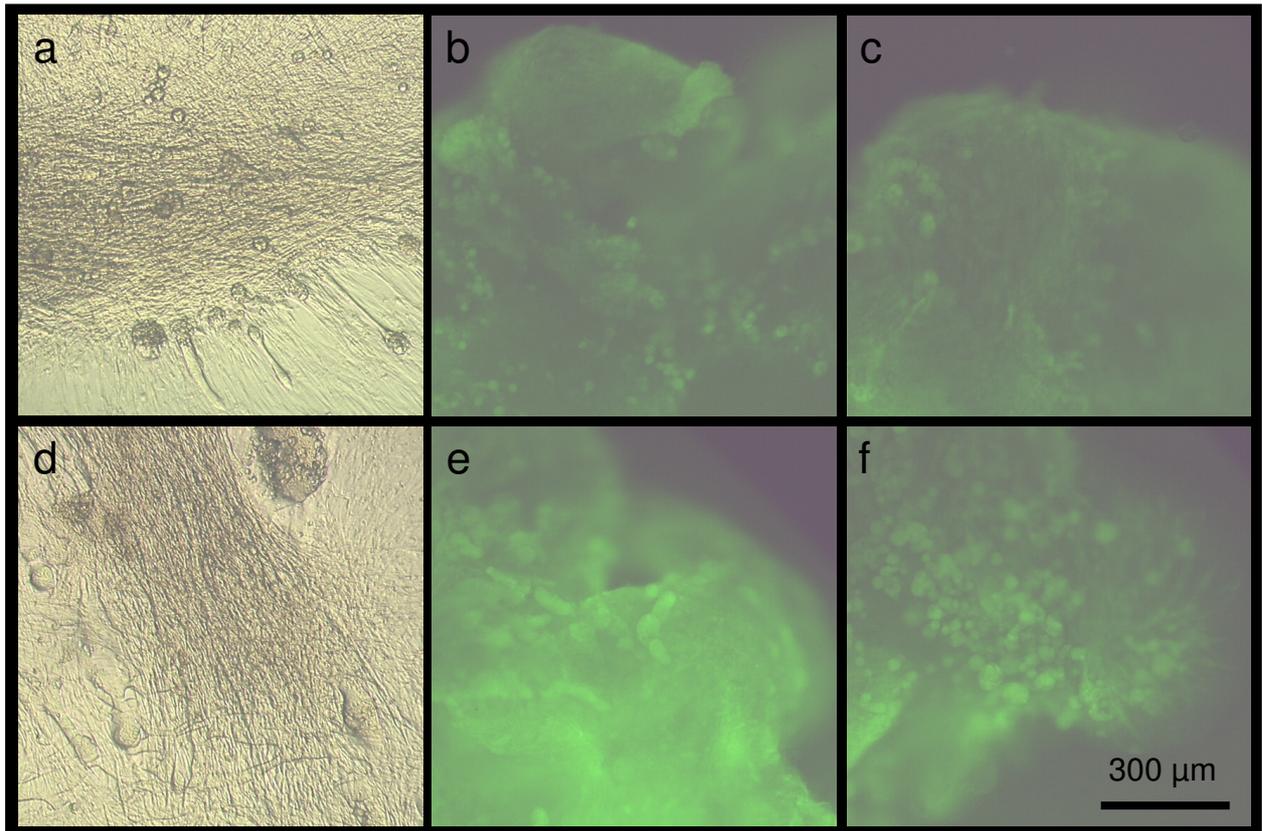


Abbildung 41: Kontraktion und Ablösen der C2C12 Myoblasten durch BMP-2 und CS-1.57 nach längerer Inkubationsdauer. (a, d) Hellfeld-Aufnahmen sich ablösender oder stark zusammenziehender Zellschichten nach 9 Tagen, (a) 25 ng/ml BMP-2, (d) 10 ng/ml BMP-2, (b, c, e, f) Fluoreszenz-Aufnahmen mit FDA-gefärbten und abgelösten Zellen nach 11 Tagen, (b) 25 ng/ml BMP-2, (c) 25 ng/ml BMP-2 + 2,5 µg/ml CS-1.57, (e) 10 ng/ml BMP-2, (f) 10 ng/ml BMP-2 + 2,5 µg/ml CS-1.57. Alle Aufnahmen mit Axiovert 100 (Zeiss, Jena, Deutschland) 10 fach Objektiv: a und d im Hellfeld; b,c,e,f mit Fluoreszenz-Filtern: Anregung 485 nm, Emmission 520 nm.

5. Diskussion

Zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, Migration oder Apoptose werden durch eine Vielzahl extra- und intrazellulärer Regulationsmechanismen gesteuert. Dabei sind neben Signaltransduktions-Kaskaden, bei welchen die Signale durch Proteine oder Ionen übertragen werden, Moleküle der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix wie Glykane und spezifische Matrixproteine beteiligt. Alle Moleküle unterliegen dabei einem ständigen Umbau und damit verbunden einer Veränderung ihres Aktivitätstatus. So können Signalproteine, wie Wachstumsfaktoren, durch Bindung an andere Proteine oder Glykosaminoglykane inaktiviert oder aktiviert werden. Bei den Glykosaminoglykanen ist dabei das Substitutionsmuster von besonderer Relevanz für die Bindung zu den Wachstumsfaktoren. Darüber hinaus hat auch die Dichte der Zelloberflächen-Glykosaminoglykane entscheidenden Einfluss auf die Steuerung der Aktivität und die Einleitung der Signalübertragung durch Wachstumsfaktoren. Diese Eigenschaften ausnutzend, werden deshalb in der Gewebezüchtung Glykosaminoglykane oder glykosaminoglykan-analoge Verbindungen, welche in Stützstrukturen eingebunden oder exogen appliziert werden, genutzt, um Einfluss auf die Funktion von Wachstumsfaktoren und damit auf das zelluläre Verhalten zu nehmen. Ziel der Forschung ist es, GAG-analoge Verbindungen mit einem für den jeweiligen Wachstumsfaktor optimalen Substitutionsmuster zu synthetisieren, welches eine hohe Aktivität des Wachstumsfaktors gewährleistet und der Effektivität natürlicher GAG überlegen ist. Mehr noch, die neu synthetisierten Polysaccharide sollten eine geringe Zytotoxizität aufweisen, biologisch nur schwer abbaubar sein und möglicherweise nicht zur Beeinflussung anderer zellulärer Ereignisse führen, wie es von natürlichen Glykosaminoglykanen bekannt ist. Darüber hinaus ist es das Ziel, biologische Testsysteme zu nutzen oder zu entwickeln die eine möglichst sensitive Unterscheidung der synthetisierten Glykosaminoglykan-Analoga gewährleisten und verschiedene biologische Parameter berücksichtigen.

Um im Rahmen der Grundlagenforschung die Wirkung von unterschiedlich substituierten GAG-Analoga auf Wachstumsfaktoren zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Synthesemethoden auf zwei Polysaccharide angewendet. Als Ausgangsmoleküle für die Synthese wurden Cellulose und Chitosan genutzt, welche sich in der Grundstruktur prinzipiell von Zelloberflächen-Glykosaminoglykanen unterscheiden. Darüber existieren für diese beiden Polysaccharide etablierte Synthesewege für das Erzeugen von Sulfat-, Carboxyl- und Carboxymethyl-Gruppen tragenden Derivaten [153,154,155,131,156]. Sulfatierte Chitosane

wurden in bislang nur einer Studie zur Verstärkung der Aktivität von Wachstumsfaktoren eingesetzt [85]. Für Cellulose-Derivate liegen derartige Untersuchungen in der Literatur bislang überhaupt nicht vor.

Die ^{13}C -NMR der synthetisierten GAG-analogen Verbindungen ergab erste Informationen über die Verteilung und die Quantität der Substituenten. Die Ergebnisse zeigten, dass Cellulose regioselektiv bevorzugt in 6-*O*-Position jedoch gar nicht in 3-*O*-Position sulfatiert wurde. Als Ursache dafür kann die sehr gute sterische Zugänglichkeit und die höhere Reaktivität der 6-*O*-Position und die schlechtere Zugänglichkeit und Reaktivität der 3-*O*-Position in quasi-homogenen Verhältnissen angesehen werden [153]. Die homogene Sulfatierung von Chitosan führte hingegen prinzipiell nicht zu regioselektiv bevorzugter 6-*O*-Sulfatierung, was durch eine Desulfatierung der C₆-Position bei erhöhten Temperaturen [133] und durch die partielle Formylierung der primären Hydroxylgruppen durch Ameisensäure, welche einer Sulfatierung nicht mehr zugänglich sind, hervorgerufen wurde [133]. Die nicht-homogene Sulfatierung von Chitosan wiederum führte prinzipiell zu vollständiger 6-*O*-Sulfatierung, was auf eine gesteigerte Reaktivität der primären Hydroxyl-Gruppen durch die Aktivierung mit Essigsäure zurückzuführen war [157]. Im Gegensatz zu den Cellulose-Sulfaten lag bei den Chitosan-Sulfaten eine Sulfatierung der 3-*O*-Position vor, was auf eine bessere Zugänglichkeit dieser Position bei Chitosan zurückzuführen ist [157]. Demgegenüber war das völlige Fehlen der Sulfatierung an 2-*N*-Position auf die vollständige Formylierung durch Ameisensäure dieser Position zurückzuführen [133]. Das Substitutionsmuster der Chitosan-Sulfate unterscheidet sich deshalb prinzipiell von dem der Cellulose-Derivate.

Um Ähnlichkeit zu nativem Heparin oder Heparan-Sulfat zu erreichen, wurden Carboxylgruppen in niedrig sulfatierte Cellulose-Sulfate eingebracht. Dabei führte die vorherige Sulfatierung zur, für die TEMPO-Oxidation notwendigen Löslichkeit. Cellulose liegt ansonsten in kristallinem Zustand mit eingeschränkter Zugänglichkeit der primären Hydroxyl-Gruppen vor [154,158]. Die Reaktionsprodukte wiesen nach der Oxidation eine 6-*O*-SO₃⁻/COO⁻ Mischfunktionalisierung mit zum Teil vollständiger Substitution dieser Position auf, was eine starke Ähnlichkeit zu Heparin an dieser Position zeigte. Die 2-*O*-Sulfatierung der carboxylierten Cellulose-Sulfate von maximal 0,24 war jedoch im Gegensatz zu Heparin (DS_{S2} 0,84) sehr gering. Betrachtet man Heparin, so beträgt der durchschnittliche Sulfatierungsgrad eines Dissaccharides 2,7, der Carboxylierungsgrad 1,0. Die am häufigsten vorkommende Struktureinheit ist dabei das trisulfatierte Disaccharid [25]. Obwohl es Abschnitte mit geringerem Anteil an 6-*O*- oder 2-*O*/*N*-Sulfatgruppen gibt [25] haben Strukturanalysen von Disacchariden, welche an Isoformen von FGF oder an den FGFR4-Rezeptor binden, gezeigt, dass der Anteil an 2-*O*/*N*-Sulfonatgruppen

immer größer als der Anteil von 6-*O*-Sulfatgruppen ist [105,159,160]. Die in den eigenen Studien synthetisierten Cellulose-Derivate zeigten jedoch höhere 6-*O*- als 2-*O*-Sulfatierung und hatten folglich im Sulfatierungsmuster nur eine geringe Übereinstimmung mit Heparin-Abschnitten, speziell nicht mit solchen, die mit FGF-Wachstumsfaktoren und Rezeptoren interagieren.

Um zu untersuchen, ob das Einbringen einer zusätzlichen funktionellen Gruppe zwischen C-Atom und Hydroxyl-Gruppe zu einer höheren Beweglichkeit der Hydroxylgruppen und damit besseren Interaktion mit dem Wachstumsfaktor führt, wurden niedrig sulfatierte Cellulosen mit Carboxymethylgruppen funktionalisiert. Diese konnten in alle Positionen in der Reihenfolge C₆>C₂>>C₃ eingebracht werden, wobei in Isopropanol bevorzugt in C₆ und C₂ substituiert wurde [161]. Dabei konnten ähnliche Gesamt-Derivatisierungsgrade wie bei den hochsulfatierten Cellulosen erreicht werden, jedoch lag bei den carboxymethylierten Derivaten auch 3-*O*-Derivatisierung vor. In Studien von Leali mit sulfatierten Polysacchariden führte eine 3-*O*-Derivatisierung zusätzlich zur 2-*O*-Derivatisierung zu erhöhter biologischer Aktivität [102].

Als wichtiger Parameter des Einflusses von GAG-analogen Verbindungen auf die Aktivität von Wachstumsfaktoren wurde das Molekulargewicht der synthetisierten Derivate verifiziert. Dabei war dieses von allen untersuchten Substanzen mit mehr als 19 kDa größer als das durchschnittliche Molekulargewicht von Heparin (5 bis 40 kDa, durchschnittliches Molekulargewicht: 15 kDa). Das Molekulargewicht der meisten eigenen Derivate lag im Bereich von Heparan-Sulfat (5 bis 50 kDa, durchschnittliche Molmasse von 30 kDa) [25]. Die Anzahl der Monosaccharid-Einheiten (DP_n-Wert) war dabei höher als die von Heparin-Oligosacchariden, welche für die Bindung von FGF-1 an seinem Rezeptor oder an den FGFR4-Rezeptor als Mindestgröße für eine optimale Funktion ermittelt wurden [162]. Die synthetisierten Derivate waren demnach für Untersuchungen der Wechselwirkung mit Wachstumsfaktoren geeignet. Das erstaunlich geringe Molekulargewicht von CS-1.94 war auf eine Fragmentierung der Cellulose zurückzuführen, welche höchstwahrscheinlich durch den sehr hohen Anteil an Schwefelsäure im Verhältnis zu Essigsäure-Anhydrid (13 / 0) hervorgerufen wurde. Das niedrigmolekulare, carboxylierte Derivat CO-0.31 wurde dagegen aus der niedrig sulfatierten Cellulose CS-0.39 synthetisiert. Diese wurde wiederum aus niedermolekularer, bestrahlter Cellulose hergestellt. Die sulfatierten Chitosane wiesen dagegen wesentlich höhere M_n-Werte auf, was auf ein wesentlich höheres Molekulargewicht des Rohmaterials zurückzuführen sein sollte. Genaue Angaben über das Molekulargewicht der Chitosane wurden vom Hersteller nicht angegeben.

Erste Einblicke in die biologische Anwendbarkeit der GAG-analogen Verbindungen wurden mit der Bestimmung der Zytotoxizität gewonnen. Dazu wurde die Lebensfähigkeit von 3T3-L1 Fibroblasten unter dem Einfluss der GAG-analogen Verbindungen verifiziert. Da die Bestimmung der Vitalität durch den Gesamt-Gehalt an intrazellulären Reduktasen bestimmt wurde, korrelierte dieser Wert auch indirekt mit der Zellzahl. Es ist aber bekannt, dass natürliche GAG direkten Einfluss auf Signaltransduktionswege oder Mitoseereignisse haben, und damit die Zellteilungsrate beeinflussen können [146,163]. Deshalb wurde mit konfluenten Zellen gearbeitet, in welchen die Zellteilung durch Kontaktinhibierung unterdrückt ist [164]. Die Toxizitäts-Untersuchungen zeigten, dass für die meisten Derivate keine oder nur eine geringe Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit von 3T3-L1 Fibroblasten vorlag. Im Gegensatz dazu führten Polystyrensulfonat oder Polyvinylsulfonat in Studien von Hatanaka et al., schon in Konzentrationen von 1 µg/ml, und selbst in Anwesenheit von FGF-2, zu einem starken Rückgang der Lebensfähigkeit [113]. Das war möglicherweise auf die Verwendung von sulfatierten synthetischen Polymeren im Gegensatz zu den von uns verwendeten Polysacchariden zurückzuführen. Auch das relativ niedrige Molekulargewicht der von uns synthetisierten Cellulosen könnte zu geringerer Toxizität geführt haben. In Studien von Kunou war Dextran Sulfat mit einem Gesamt-DS_S von 2,3 aber einem M_n von 150 kDa toxisch, ein M_n von 11 kDa, bei gleichem Gesamt-DS_S, zeigte dagegen keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit [112].

Als weiterer wichtiger Parameter GAG-analoger Verbindungen, der noch keine direkte Aussage über die biologische Wirksamkeit der Derivate zulässt, wurde die Bindungsaffinität untersucht. Diese ist ein entscheidendes Kriterium in der Interaktion zwischen GAG-Analoga und Wachstumsfaktoren, und korreliert oft mit der in vitro gemessenen Beeinflussung der biologischen Aktivität von Wachstumsfaktoren. [102]. In den eigenen Untersuchungen war eine signifikante Bindung der derivatisierten Cellulosen an den Wachstumsfaktor FGF-2 zu verzeichnen. Allerdings war diese erst mit einem DS_{S6} von 1,00 sichtbar. Ein ansteigender Sulfatierungsgrad in 2-O-Position bewirkte dabei eine weitere Zunahme der Bindungsaffinität. Es konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden, ob eine Zunahme der 6-O-Sulfatierung zu einer Steigerung der Bindung führte, da durch die regioselektiv bevorzugte 6-O-Sulfatierung im niederen Sulfatierungs-Bereich nahezu ausschließliche 6-O-Sulfatierung vorlag. Mit diesen niedrig sulfatierten Derivaten war aber keine signifikante Bindung zu FGF-2 zu beobachten. Es kann hier deshalb keine Schlussfolgerung zum Einfluss der 6-O-Sulfatierung auf die Bindungsaffinität gezogen werden. In den späteren eigenen Untersuchungen zur FGF-2-induzierten Proliferation wurde jedoch schon durch das Derivat CS-0.92 eine Steigerung der Proliferation gegenüber CS-0.66 zu verifiziert, wobei die DS_{S2} der beiden Derivate mit 0,06

(CS-0.66) bzw. 0,15 (CS-0.92) sehr gering gegenüber dem DS_{S_6} dieser Derivate war, was auf einen Einfluss ansteigender 6-*O*-Sulfatierung auf die FGF-2-induzierte mitogene Aktivität schließen läßt. Untersuchungen anderer Autoren zeigten aber auch, dass bei der Bindung von Heparin an FGF-2 nur ein sehr geringer Teil, oder überhaupt keine der Wasserstoffbrückenbindungen über 6-*O*-Sulfatgruppen realisiert werden [33,165]. Dabei wiesen jedoch die bindenden Heparin-Abschnitte jeder Monosaccharid-Einheit eine Sulfatierung der 2-*O*- bzw. 2-*N*-Position auf, was bei unseren Derivaten erst bei sehr hohem Sulfatierungsgrad der Fall war. Es ist deshalb, aufgrund der geringen 2-*O*-Sulfatierung der eigenen Derivate anzunehmen, dass auch die 6-*O*-Sulfatgruppen an der Bindung an FGF-2 beteiligt sind. Auch die geringere Bindung der hochsulfatierten Cellulosen im Gegensatz zu Heparin, welches einen wesentlich geringeren DS_{S_6} als die eigenen Derivate aufweist, führt zu der Schlussfolgerung, dass die eigenen Derivate über andere Substituenten als Heparin an FGF-2 binden. Als Ursache dafür kann die unterschiedliche glykosidische Bindung von Cellulose und Heparin angesehen werden, welche Einfluss auf die dreidimensionale Anordnung der Substituenten bei der Bindung an Proteine hat. Darüber hinaus lässt die konformative Beweglichkeit des L-Iduronsäure-Restes von Heparin (zwei Sesselformen als auch schiefes Boot), [25], einen größeren Spielraum bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen der Sulfat- und Carboxyl-Gruppen zu.

Die geringe Bindung der carboxylierten Cellulose-Sulfate war aufgrund der geringen Gesamt-Derivatisierungsgrade zwischen 0,71 und 1,08 nicht überraschend, zumal Carboxylgruppen nur zwei, Sulfatgruppen aber vier Möglichkeiten zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen aufweisen [33]. Auch die geringe Bindung von CM-1.01 und CM-1.25, (Gesamt-DS 1,35 bzw. 1,65), war auf die geringeren Bindungsmöglichkeiten der Carboxymethylgruppen zurückzuführen. Für die Derivate, CM-1.09 und CM-1.47 (Gesamt DS 1,33 bzw. 1,78) wurde eine Bindung von ca. 20%, relativiert zu Heparin, beobachtet. Da beide Derivate aus acetylierter Cellulose synthetisiert wurden (siehe Tab. 1 und 3), könnten verbleibende Acetylgruppen zur Bindung beigetragen haben. Da jedoch am Ende der Synthese in der ^{13}C NMR keine Signale für Acetylgruppen gefunden wurden, ist die Interpretation dieser Ergebnisse schwierig.

Bei den ausschließlich sulfatierten Cellulosen korrelierte die Proliferation prinzipiell mit der Bindungsaffinität, das heißt eine ansteigende Sulfatierung resultierte auch in stärkerer FGF-2-induzierter mitogener Aktivität. Der Grund, dass auch Derivate mit einem Gesamt DS_S unter 1,57, welche keine signifikante Bindungsaffinität zeigten, zu einer Erhöhung der Proliferation führten könnte darin zu sehen sein, dass diese Derivate im Kompetitionsassay keinen Wachstumsfaktor in „Konkurrenz zu Heparin“ binden konnten, im zellulären Assay wohl aber

eine Bindung zu FGF-2 vorliegt, was sich in der Erhöhung der Aktivität von FGF-2 zeigte. Ähnlich unseren Ergebnissen konnte auch Kunou et al. eine Steigerung der FGF-1 induzierten Proliferation durch ein Dextran-Sulfat mit einem Gesamt-DS_S von nur 0,98 nachweisen [112].

Bei den von uns synthetisierten carboxylierten CS zeigte sich bezüglich der Korrelation zwischen Carboxylierungsgrad und FGF-2-induzierter mitogener Aktivität, dass ein niedrigerer DS_{COO} (CO-0.31) zu höherer mitogener Aktivität als ein maximaler Carboxylierungsgrad (CO-0.67) von Derivaten mit annähernd gleichem DS_S führt. Das lässt schlußfolgern, dass eine geringe Carboxylierung zur Erhöhung, ein hoher Carboxylierungsgrad aber zur Unterdrückung der FGF-2-induzierten mitogenen Aktivität führt. Die carboxymethylierten CS zeigten demgegenüber, trotz hohem Gesamt-Derivatisierungsgrad und teilweise signifikanter Bindung, nahezu keine Beeinflussung der FGF-2-induzierten Proliferation. Das bedeutet, dass hoch carboxymethylierte CS nicht zu ähnlicher biologischer Aktivität wie hochsulfatierte Cellulosen führen. Studien von Hatanaka et al. bestätigten dies, da hoch carboxymethylierte Cellulosen auch in deren Untersuchungen keine Steigerung der FGF-2-induzierten Proliferation mit dem gleichen Zelltyp zur Folge hatten [113].

Ein tieferes Verständnis der Wirkung der GAG-analogen Verbindungen auf die FGF-2-induzierte Proliferation wurde durch die Verwendung eines Konzentrationsbereiches von 1 µg/ml bis 1 mg/ml erreicht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass mit steigendem Sulfatierungsgrad immer geringere Mengen der Derivate zur Verstärkung der FGF-2-induzierten mitogenen Aktivität ausreichten. Bemerkenswerterweise bewirkten dabei die hochsulfatierten Cellulosen in wesentlich geringeren Konzentrationen als Heparin eine Steigerung der Proliferation. Ein Einfluss des Molekulargewichtes war dabei auszuschließen, da dieses der hochsulfatierten Cellulose mit der höchsten mitogenen Aktivität (CS-1.94 - 19 kDa) und Heparin (17 kDa) nahezu gleich war. Unterschiede im Derivatisierungsgrad und -muster sowie in der glykosidischen Bindung sind deshalb als Ursachen anzusehen, da Heparin eine signifikant höhere Bindungsaffinität zu FGF-2 als alle sulfatierten Cellulosen hatte. Darüber hinaus schützte Heparin in den gleichen Mengen wie die hochsulfatierte Cellulose CS-1.94 den Wachstumsfaktor FGF-2 vor proteolytischem Abbau durch Trypsin. Ähnliche Diskrepanzen zwischen dem Schutz vor proteolytischem Abbau und der Beeinflussung der FGF-2-induzierten Proliferation wurden auch für die carboxylierten und carboxymethylierten Derivate beobachtet. Diese führten zwar zu gleichem und teilweise sogar besserem proteolytischem Schutz von FGF-2 als die hochsulfatierten Cellulosen, bewirkten aber nur in sehr hohen Konzentrationen eine Steigerung der FGF-2-induzierten mitogenen Aktivität.

Das führt zu der Annahme, dass die Unterschiede in der Steigerung der FGF2-induzierten Proliferation vorrangig auf die Formierung des FGF:Polysaccharid:FGFR Komplexes zurückzuführen sind. Studien von Rusnati et al. zeigten, dass 6-*O*-desulfatiertes Heparin seine Fähigkeit behielt an FGF-2 zu binden, dagegen aber nicht in der Lage war die Formierung des FGF:FGFR-Komplexes zu bewirken [44]. Arbeiten von Loo et al. bestätigten diese Ergebnisse - in Bindungsstudien von Heparin an den FGFR4-Rezeptor wurde gezeigt, dass sich bindende von nicht bindenden Heparin-Domänen durch einen höheren Gehalt an 6-*O*-Sulfatgruppen auszeichnen [160]. In den eigenen Studien führte im unteren Sulfatierungs-Bereich hauptsächlich eine ansteigende 6-*O*-Sulfatierung, im höheren Sulfatierungs-Bereich jedoch eine zunehmende 2-*O*-Sulfatierung (bei gleichbleibender 100 % iger 6-*O*-Sulfatierung) zu ansteigender FGF-2-induzierter Proliferation. Das deutet auf eine entscheidende Rolle der 2-*O*-Sulfatierung bei der Verstärkung der FGF-2-induzierten Proliferation bei den eigenen Derivaten hin. Die Diskrepanzen zwischen Schutz vor proteolytischem Abbau und mitogener Aktivität von Heparin und den carboxylierten/carboxymethylierten CS auf der einen Seite, und den ausschließlich sulfatierten Cellulosen auf der anderen Seite, lassen auf Unterschiede in der Formierung des FGF:Polysaccharid:FGFR Komplexes schließen. So könnten Carboxyl-Gruppen, wie in Heparin und den carboxylierten/carboxymethylierten Derivate, zwar zu einer Bindung an FGF-2 und damit Schutz vor Proteolyse beitragen, wirken sich aber möglicherweise nicht fördernd auf die Formierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes aus. Diese Aussage wird, neben den Ergebnissen von Heparin und den carboxylierten CS, auch durch die unterschiedlichen Effekte der ausschließlich sulfatierten Cellulose CS-0.92 und des carboxylierten Derivates CO-0.11 (hat ähnlichen DS_S wie CS-0.92 aber einen DS_{COO} von 0,11) bestätigt. Die Graphen des proteolytischen Verdaus beider Derivate zeigten starke Ähnlichkeit, für CS-0.92 war jedoch bei 500 $\mu\text{g/ml}$ eine wesentlich höhere Proliferation zu verzeichnen als mit CO-0.11. Auch Carboxymethyl-Gruppen scheinen die Komplexbildung von FGF-2 und dem FGFR-Rezeptor nicht zu fördern. Neben der geringeren Möglichkeit der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen könnte die zusätzliche Methyl-Gruppe eine sterische Behinderung bei der Formierung des Komplexes verursachen.

Glykosaminoglykane wie Heparin oder Heparan-Sulfat übernehmen nicht nur vielfältige Funktionen in der Feinregulierung von Signal-Proteinen, sondern können auch direkt, z.B. durch Heparin-spezifische Oberflächenrezeptoren oder die Beeinflussung von Signaltransduktions-Kaskaden, in die Regulation des zellulären Geschehens eingreifen [146]. Die Untersuchungen der mitogenen Wirkung der eigenen GAG-analogen Verbindungen ohne Zusatz von Wachstumsfaktor haben gezeigt, dass sich die mitogene Aktivität der Derivate grundsätzlich von

den Experimenten mit Zugabe von FGF-2 unterscheidet, und darüber hinaus nicht mit dem Sulfatierungsgrad korreliert. Carboxylierte und carboxymethylierte Derivate führten wiederum zu keiner oder nur geringfügiger Beeinflussung der Proliferation. Die überraschend hohe mitogene Aktivität der sulfatierten Cellulosen dagegen kann ihre Ursache in diversen zellulären Prozessen haben. Verschiedene Studien anderer Autoren zeigten, dass ansteigende Heparin-Konzentrationen zu erhöhter Abundanz des im extrazellulären Raum befindlichen FGF-2 und des FGFR1 Rezeptors, sowie Zell-assoziiertes Heparan-Sulfate führte. In den meisten Fällen kam es dabei jedoch zu einer Unterdrückung der Proliferation [166,167]. Eine vom Sulfatierungsgrad abhängige Wachstumsfaktor-Synthese in den eigenen Studien ist vorstellbar, jedoch führen die großen Unterschiede zwischen den Derivaten zu der Annahme, dass noch andere zelluläre Mechanismen beteiligt sind.

Es ist bekannt, dass Heparin über eine Bindung an die Zelloberfläche [168,169] in die Zellen internalisiert und zu Oligosacchariden abgebaut wird [170]. Das kann zu einer, vom Sulfatierungsgrad abhängigen Hemmung von RNA-Polymerasen [171] oder zu einer Bindung an Transkriptionsfaktoren führen [172], und damit eine Beeinflussung der Expression von Genen hervorrufen [173]. Eine negative Beeinflussung der Zellteilung durch Heparin und GAG-analoga Verbindungen kann auch durch die Inhibierung der Ca^{2+} Ausschüttung [146], Unterdrückung der MAPK-Kaskade [174] oder von Mitose-Prozessen verursacht werden [163,175]. Weitere Ursachen für eine Beeinflussung der Zellteilungsrate sind in extrazellulären Prozessen zu finden. Wachstumsfaktoren liegen als Reservoir in inaktiver Form an Matrix- oder Zelloberflächen Heparan-Sulfat-Proteoglykanen gebunden vor [176]. Die Zugabe von freiem Heparin bzw. GAG-analoga Verbindungen könnte zur Freisetzung der Wachstumsfaktoren, und damit zu einer Erhöhung der Konzentration freier Polysaccharid-Wachstumsfaktor Komplexe führen, welche an Zelloberflächen-Rezeptoren binden und eine Signaltransduktion einleiten können. Weiterhin wurde beschrieben, dass die Bindung von heparinoiden Substanzen an Matrix-Proteine wie Laminin [177], Fibronectin [178], Thrombospondin [179] oder Kollagen [180,181] zu einer Unterbindung der Fibroblasten-Adhäsion und damit verbundener Unterdrückung der Zellteilung führte [182]. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigten, dass spezifische Konzentrationen einzelner Derivate stimulierende, andere Konzentrationen inhibierende Effekte haben. Kumulative Effekte der beschriebenen Effekte können deshalb in Erwägung gezogen werden. Weiterführende Studien zur extrazellulären Bestimmung des Gehalts von Wachstumsfaktoren wie FGF-2 oder TGF-beta, oder der Untersuchung von, mit der Zellteilung verbundenen intrazellulären Prozessen, würden weiter zum Verständnis der Wirkung der GAG-analoga Verbindungen beitragen.

Das Potential der Beeinflussung der Aktivität von Wachstumsfaktoren durch die von uns synthetisierten Derivate wurde auch an einem der am meisten untersuchten Mitglieder der „Bone morphogenic proteins“ Familie, BMP-2, untersucht. Damit wurde gezeigt, dass auch die Wachstumsfaktor-induzierte Differenzierung von Zellen durch GAG-analoge Verbindungen beeinflusst werden kann. Prinzipiell unterschied sich die Wirkung der Derivate auf BMP-2 zu den Untersuchungen mit FGF-2, sowohl bezüglich der Effekte der einzelnen Polysaccharide als auch der zur Verstärkung der Aktivität des Wachstumsfaktors führenden Konzentrationen. Die Bindungsaffinitäten der Derivate an BMP-2 waren überraschenderweise, relativiert zu Heparin, insgesamt wesentlich höher als zu FGF-2. In Studien von Miyazaki et al. führte ein übersulfatiertes Chondroitinsulfat ebenfalls zu einer bis zu 20% stärkeren Bindung an BMP-2 als Heparin aus Schweinedarm, was auf eine höhere Bindungsaffinität von BMP-2 zu anderen Polysacchariden als Heparin hinweist [24]. Im Unterschied zu den Experimenten mit FGF-2, zeigten überraschenderweise Cellulose-Derivate mit mittlerem Sulfatierungsgrad in 2-*O*-Position (CS-1,57, CS-1,69) die höchste Bindungsaffinität zu BMP-2. Ein höherer Sulfatierungsgrad führte zu signifikant abnehmender Bindung, was bedeutet, dass ein sehr hoher DS_{S2} der GAG-analogen Verbindungen zu einer Abstoßung gegenüber BMP-2 führt. Auffallend war dabei, dass die beiden carboxymethylierten Derivate CM-1.09 und CM-1.47, ähnlich den Experimenten mit FGF-2, die höchste Bindung aller carboxylierten/carboxymethylierten Derivate aufwiesen. Das deutet auf mögliche, nicht beseitigte Acetylgruppen hin, die aufgrund der Hydroxylgruppe zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen beitragen können. Die höhere Bindungsaffinität aller carboxylierten und carboxymethylierten Derivate gegenüber der Bindung an FGF-2 könnte im Versuchsansatz begründet sein. Die Wachstumsfaktoren wurden durch die eigenen Derivate kompetitiv zu Heparin-Agarose-Mikropartikeln gebunden, eine niedrigere Bindung von BMP-2 an Heparin führte folglich zu einer relativ höheren Bindung der GAG-analogen Verbindungen an BMP-2.

Die Versuche zur Beeinflussung des osteogenen Differenzierungspotentials von BMP-2 auf multipotente humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) führten sowohl ohne als auch mit den osteogenen Induktoren Ascorbinsäure-2-Phosphat, β -Glycerophosphat und Dexamethason nicht zu einem Anstieg der ALP-Aktivität durch BMP-2. Ergebnisse aus der Literatur bestätigen die Erhöhung der ALP-Aktivität von hMSC durch die genannten osteogenen Induktoren. [183,86,87]. Diefenderfer et al. konnte in hMSC zwar eine Erhöhung der Expression osteogener Marker durch BMP-2, wie Noggin, Osteopontin oder Bone Sialoprotein nachweisen, die Expression der alkalischen Phosphatase blieb unter BMP-Einfluss jedoch unverändert [183]. Auch die Expression des Transkriptionsfaktors Msx-1 wurde durch BMP-2 erhöht,

Überexpression dieses Genes führte jedoch ebenfalls nicht zu ansteigender ALP-Aktivität [183]. Da die ALP-Aktivität als Screening-Marker für die Unterscheidung der Effekte der GAG-analogen Verbindungen genutzt werden sollte, konnten die hMSC nicht für die weiteren Untersuchungen eingesetzt werden.

Um den Einfluss der GAG-analogen Verbindungen und BMP-2 auf multipotente Zellen zu studieren, wurden deshalb multipotente embryonale C3H/10T1/2 Mauszellen mit der Fähigkeit zu adipogener, chondrogener und osteogener Differenzierung eingesetzt. Dabei führten BMP-2 Konzentrationen bis 100 ng/ml zu einer leichten, wenn auch nicht signifikanten Abnahme der ALP-Aktivität. Erst nach Zugabe der osteogenen Induktoren Ascorbinsäure-2-Phosphat, β -Glycerophosphat und Dexamethason kam es zu einem signifikanten Anstieg der ALP-Aktivität durch BMP-2 Konzentrationen von 50 und 100 ng/ml. Date et al. konnten einen Anstieg der ALP-Aktivität dieser Zelllinie ohne osteogene Induktoren erst mit BMP-2 Konzentrationen von 500 ng/ml nachweisen [84]. Suga et al. zeigten hingegen, dass unter Verwendung von L-Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Dimethylsulfoxid eine Erhöhung der ALP-Aktivität schon mit 40 ng/ml BMP-2 möglich war [89]. Die BMP-2-induzierte ALP-Aktivität in C3H/10T1/2 Mauszellen wird demnach, im Gegensatz zu hMSC, durch die Anwesenheit osteogener Induktoren wesentlich verstärkt. Da das Anliegen der eigenen Arbeit darin bestand möglichst geringe Mengen an Wachstumsfaktor zu verwenden, wurden die osteogenen Induktoren zur Verstärkung der Aktivität von BMP-2 mit dieser Zelllinie genutzt.

Die Zugabe der GAG-analogen Verbindungen führte in Konzentrationen von 10 μ g/ml bis 1 mg/ml, abhängig vom Sulfatierungsgrad, zur Unterdrückung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität. Die zunehmende Inhibierung korrelierte dabei prinzipiell mit der Bindungsaffinität. Die Ergebnisse unterscheiden sich damit von den Ergebnissen der FGF-2-induzierten Proliferation, in denen ein zunehmender Sulfatierungsgrad zu ansteigender Proliferation führte. In den Versuchen mit BMP-2 führten die derivatisierten Polysaccharide, in Abhängigkeit von der Bindungsaffinität, möglicherweise zu einem Binden und damit verbundener Immobilisierung von BMP-2, welches nun nicht mehr der Bindung an den BMPRI-Rezeptor zugänglich war. Eine Unterstützung der Ausbildung des Rezeptor-Ligand Komplexes durch die Derivate, wie für FGF-2 postuliert, erfolgte in dem verwendeten Konzentrationsbereich wahrscheinlich nicht [184]. Auch die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit zunehmender Konzentration, und abhängig vom Sulfatierungsgrad der Derivate unterdrückt. Im Unterschied zu den Toxizitätsstudien mit 3T3-L1 Fibroblasten wurden für die Experimente der ALP-Aktivität und des Protein-Gehaltes keine konfluenten Zellkulturen verwendet. In Toxizitätsstudien anderer Autoren wurde nachgewiesen, dass niedrige Zelldichten empfindlicher gegenüber der toxischen Wirkung von Substanzen

reagieren, was auf eine relative Verarmung der toxischen Substanz bei hohen Zelldichten zurückzuführen ist [185]. Dabei war ein starkes Schrumpfen von Zellen geringerer Dichte gegenüber höherer Dichte zu beobachten [186]. Fujita wies nach, dass das signifikant schnellere Absterben von corticalen Neuronen niedriger Dichte durch Nekrose, das Absterben Zellen hoher Dichte aber durch programmierten Zelltod (Apoptose) hervorgerufen wurde [187]. Nekrose ist die Folge der direkten Einwirkung von äußeren Einflüssen wie Hitze, Säuren, etc. was zur Denaturierung von Proteinen führen kann. Apoptose hingegen wird über Signaltransduktionswege eingeleitet, welche Todes-Rezeptoren, verschiedene Caspasen (spalten aspartathaltige Aminosäuresequenzen) und mitochondriales Cytochrom c reguliert werden [188], was damit auch vor allem für Langzeitversuche von größerer Bedeutung ist.

In den eigenen Langzeitversuchen mit multipotenten C3H/10T1/2 Mauszellen führten hochsulfatierte GAG-analoge Verbindungen und Heparin, vor allem in höheren Konzentrationen, zu einer starken Verringerung der Lebensfähigkeit und der BMP-2-induzierten Mineralisierung. Hausser und Brenner zeigten eine Förderung der Proliferation nach Kurzzeit-Inkubation (1 Tag) aber eine Hemmung nach 14 Tagen Inkubation mit Heparin-Konzentrationen von 5 µg/ml und höher. Wie in den eigenen Untersuchungen wurde auch dort eine Hemmung der Mineralisierung nach 15 Tagen mit 5 µg/ml und mehr beobachtet, was die Unterschiede zwischen Kurz- und Langzeitinkubation in den eigenen Experimenten bestätigt [184]. Gründe hierfür könnten auf der einen Seite der hohe Gehalt an Sulfatgruppen und eine damit verbundene toxische Wirkung der eigenen GAG-analogen Verbindungen sein, wie sie schon bei Kurzzeitinkubation, und abhängig vom Sulfatierungsgrad verifiziert wurde (siehe auch die Ergebnisse der Bestimmung des Proteingehaltes). Auf der anderen Seite können z.B. eine Beeinflussung der Weiterleitung von Signalen mit der Zellteilung verbundener Signaltransduktions-Kaskaden, oder Hemmung von Mitose-Prozessen, wie ausführlich für Heparin beschrieben [184,146,168], Ursachen für verringerte Zellzahlen nach Langzeitinkubation sein. Prozesse dieser Art könnten auch zu Heparin induzierter Osteoporose beitragen, welche sich in einer Reduktion der Osteoblastenzahl äußert [189]. Die bei den niedrig sulfatierten Derivaten beobachtete leichte Steigerung der Mineralisierung, könnte auf einen leichten Schutz des Wachstumsfaktors vor Proteolyse und einem langsamen Freisetzen bei Langzeitinkubation zurückzuführen sein.

In weiterführenden Untersuchungen mit der gleichen Zelllinie zeigte sich jedoch, dass geringe Konzentrationen der GAG-analogen Verbindungen zwischen 0,075 – 0,6 µg/ml prinzipiell zu einer Steigerung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität führen. Hochsulfatierte Polysaccharide bewirkten dabei eine größere Steigerung als carboxymethylierte Cellulosen und Heparin. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen mit FGF-2, in denen Carboxyl- und

Carboxymethyl-Gruppen weniger zur Verstärkung der Aktivität von Wachstumsfaktoren beitragen.

Da die Unterschiede in der Beeinflussung der ALP-Aktivität zwischen den einzelnen Derivaten mit C3H/10T1/2 Mauszellen aber nicht signifikant waren, wurde in den weiteren Untersuchungen die Maus Myoblasten Zelllinie C2C12 genutzt. Diese zeigt neben einer starken morphologischen Veränderung unter BMP-2-Einfluss eine sehr hohe Expression der Alkalischen Phosphatase, auch ohne Zusatz der osteogenen Induktoren Ascorbinsäure-2-Phosphat, β -Glycerophosphat und Dexamethason. Da in den Versuchen zur Wechselwirkung der GAG-analogen Verbindungen mit BMP-2 möglichst geringe Konzentrationen des Wachstumsfaktors eingesetzt werden sollten, wurde zunächst untersucht, bei welcher BMP-2 Konzentration eine signifikante Steigerung ALP-Aktivität erzielt werden kann. Die Ergebnisse zeigten, dass schon 50 ng/ml des Wachstumsfaktors zum Anstieg der Alkalischen Phosphatase Aktivität führten, ein weiterer, starker Anstieg wurde bis 400 ng/ml beobachtet. Die größte Verstärkung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität durch 0,6 μ g/ml des Chitosan-Sulfates CHS1.77-1.00 erfolgte jedoch bei mittleren BMP-2 Konzentrationen von 200 ng/ml. Auch in Versuchen von Jiao et al. mit C2C12 Zellen konnte mit 150 ng/ml BMP-2 durch Zugabe 2 μ g/ml Heparin die größte Steigerung der ALP-Aktivität beobachtet werden. Mit 50 ng/ml BMP-2 war die Steigerung durch Heparin geringer, mit 300 ng/ml konnte keine Erhöhung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität durch Heparin mehr beobachtet werden [106]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die ALP-Aktivität nur bei bestimmten BMP-2 Konzentrationen durch GAG-analoga Verbindungen verstärkt werden kann. Bei höheren BMP-2 Konzentrationen ist eine weitere Steigerung aufgrund der Sättigung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität nicht mehr möglich. Auch die eigenen mikroskopischen Untersuchungen zur morphologischen Veränderung der C2C12 Myoblasten bestätigten prinzipiell diese Ergebnisse. Bei einer Konzentration von 10 und 25 ng/ml BMP-2 war nach Zugabe von 2,5 μ g/ml der sulfatierten Cellulose CS-1.57 eine Verstärkung der osteogenen Differenzierung (Abschwächung der Ausprägung von Muskelzellen) zu erkennen, BMP-2 Konzentrationen von 50 ng/ml und mehr führten schon zu einer vollständigen Unterdrückung der myogenen Differenzierung, welche durch Zugabe von CS-1.57 nicht weiter gesteigert werden konnte.

Hohe BMP-2 Konzentrationen zeigten darüber hinaus einen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der C2C12 Zellen, welcher insbesondere durch Zugabe des sulfatierten Chitosans CHS1.77-1.00 signifikant verstärkt wurde. Dabei waren jedoch additive Effekte von BMP-2 und CHS-1.77-1.00 auszuschließen, da es sowohl mit 400 ng/ml BMP-2 allein als auch mit CHS1.77-1.00 allein nicht zu einem Rückgang der Anzahl lebender Zellen kam. Man

kann deshalb von einer Verstärkung der Aktivität von BMP-2 durch CHS-1.77, und einem damit verbundenen negativen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen ausgehen. Hinweise für einen negativen Einfluss von ansteigenden BMP-2 Konzentrationen auf die Lebensfähigkeit von Zellen sind in verschiedenen Studien zu finden. So führten in Ratten-Osteoblasten BMP-2 Konzentrationen bis 25 ng/ml zu ansteigenden, Konzentrationen bis 100 ng/ml aber wieder zu abnehmenden Zellzahlen [190]. In corticalen Zellen bewirkten 10 ng/ml BMP nur leicht beeinträchtigte Lebensfähigkeit, 100 ng/ml führten zum teilweisen Absterben der Zellen [191]. Ein negativer Einfluss von BMP-2 auf die Lebensfähigkeit von neuronalen Progenitor-Zellen kann durch Smad5-induzierte Apoptose [192], oder durch die Hemmung des Zellzyklus und Induktion der Apoptose durch das Neurotrophin-Rezeptor interagierende MAGE Homolog (NRAGE), einer Komponente des nicht canonicalen BMP-Signalweges in Nervenzellen, hervorgerufen werden [193]. Ähnliche, durch BMP-2 Signaltransduktions-Mechanismen hervorgerufene negative Effekte auf die Lebensfähigkeit sind für C2C12 Myoblasten nicht auszuschließen.

Die Ergebnisse der Beeinflussung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität von C2C12 Myoblasten durch die GAG-analogen Verbindungen korrelierten aber prinzipiell mit denen der multipotenten C3H/10T1/2 Mauszellen. Auch die Lebensfähigkeit der C2C12 Zellen nahm, wie bei C3H/10T1/2 Zellen, mit zunehmendem Sulfatierungsgrad ab, was die toxische Wirkung der Derivate auf nicht konfluente Zellen bestätigt. Mit C2C12 Zellen konnten gegenüber C3H/10T1/2 Zellen aber signifikante Unterschiede der Wirkung der einzelnen Derivate festgestellt werden. Ähnlich den Ergebnissen mit FGF-2 korrelierten die Ergebnisse dabei, zumindest für die ausschließlich sulfatierten Cellulose-Derivate, mit der Bindungsaffinität zu BMP-2. Die geringe Steigerung der ALP-Aktivität durch die hochsulfatierte Cellulose CS-1.94 könnte, neben der geringeren Bindungsaffinität, auch durch das geringe Molekulargewicht von nur 19 kDa hervorgerufen worden sein. Auch in Studien von Suga et al. führte ein niedrigeres Molekulargewicht von heparinoiden Substanzen zu geringerer BMP-2-induzierter ALP-Aktivität als ein höheres Molekulargewicht [89]. Auch die signifikant höhere Steigerung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität durch 2,5 µg/ml des hochsulfatierten Chitosan-Sulfats CHS1.77-1.00 gegenüber den hochsulfatierten Cellulosen, könnte auf das wesentlich höhere Molekulargewicht von 127 kDa (CHS1.77-1.00) gegenüber 37 kDa (CS-1.57) zurückzuführen sein. Auch Zhou et al. konnte eine leichte Steigerung der ALP Aktivität mit einer Erhöhung des Molekulargewichtsvon 29 auf 88 kDa nachweisen [85]. Die Unterschiede der ALP-Aktivität in den eigenen Studien waren jedoch wesentlich größer als in den Studien von Zhou et al., die signifikant höhere ALP-Aktivität durch das eigene Chitosan-Sulfat ist deshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit nur zu geringem Teil auf das höhere Molekulargewicht zurückzuführen.

Auch sollte die höhere ALP-Aktivität nicht auf den Sulfatierungsgrad von CHS1.77-1.00 zurückzuführen sein, da dieser zwischen dem der Cellulose-Derivate CS-1.57 und CS-1.94 lag. Der Grund ist wahrscheinlich in der prinzipiell unterschiedlichen Struktur der Cellulose- und Chitosan-Sulfate zu sehen. Chitosan trägt in C₂-Position eine Amino-Gruppe und ist, neben der C₆-Position, ausschließlich in C₃-Position sulfatiert. Die Cellulosen sind dagegen, neben der C₆-Position, ausschließlich in C₂-Position sulfatiert. In der Literatur sind Arbeiten über die Synthese von 2-*N*,6-*O*-sulfatierten Chitosanen [85] sowie 2,3-*O*- und 2,3,6-*O*-sulfatierten Cellulosen [194] zu finden. Von den zuletzt genannten sulfatierten Cellulosen wurden die Effekte auf Wachstumsfaktoren gesteuerte zelluläre Ereignisse wie Proliferation oder Differenzierung jedoch nicht untersucht. Darüber hinaus liegen auch keine Arbeiten über ausschließlich 3,6-*O*-sulfatierte Polysaccharide vor - vergleichende Studien der biologischen Aktivität von 3,6-*O*-sulfatierten und 2,6-*O*-sulfatierten Derivativen, wie in den eigenen Arbeiten beschrieben, können deshalb nicht herangezogen werden. In Arbeiten von Leali et al. wurde aber gezeigt, dass neben C₂-Sulfatgruppen auch C₃-Sulfatgruppen von Heparin-analogen Verbindungen zur Bindung an den Wachstumsfaktor FGF-2 beitragen [102]. Darüber hinaus wies Schlessinger nach, dass Carboxyl- und Hydroxylgruppen von Heparin an die Aminogruppen von FGF-2 binden [33]. Demnach ist es theoretisch auch möglich, dass die Aminogruppen von Chitosan Wasserstoffbrückenbindungen zu freien Carboxyl- oder Hydroxylgruppen des Proteins ausbilden. Die höhere Anzahl von Bindungsmöglichkeiten und die unterschiedliche Anordnung der Substituenten könnten so zu einer höheren Bindungsaffinität von Chitosan-Sulfaten an BMP-2, und damit höherer biologischer Aktivität geführt haben.

Die eigenen Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass die sulfatierten Derivate prinzipiell zu höherer BMP-2-induzierter ALP-Aktivität als Heparin führen, was die Ergebnisse mit C3H/10T1/2 Mauszellen als auch mit dem Wachstumsfaktor FGF-2 bestätigt. Das carboxylierte Cellulose-Sulfat CO-0.67 zeigte mit C2C12 Mausmyoblasten zwar eine etwas schwächere, zum Proteingehalt relativierte, Steigerung der ALP-Aktivität als Heparin, in Anbetracht des wesentlich höheren Sulfatierungsgrades und der drastisch höheren Bindungsaffinität von Heparin war die verstärkende Wirkung von CO-0.67 jedoch überraschend hoch. Darüber hinaus führte CO-0.67 zu einer Erhöhung der Lebensfähigkeit über den gesamten Konzentrationsbereich was darauf hinweist, dass Carboxyl-Gruppen in CO-0.67 zur Steigerung der Lebensfähigkeit führen. Diese Eigenschaft macht gering sulfatierte, aber hochcarboxylierte Cellulose-Derivate vor allem auch interessant für Langzeitanwendungen zur Verstärkung der Aktivität von BMP-2. Carboxymethylierte Cellulose, mit ähnlich geringem Sulfatierungsgrad, bewirkte dagegen einen Rückgang der Zahl lebender Zellen und darüber hinaus die geringste Verstärkung der

BMP-2-induzierten ALP-Aktivität. Dieses Ergebnis, zusammen mit den Untersuchungen der FGF-2-induzierten mitogenen Aktivität, machen carboxymethylierte Verbindungen wenig attraktiv zur Verstärkung der Aktivität von Wachstumsfaktoren. Die überlegene Wirkung der GAG-analogen Verbindungen auf die BMP-2-induzierte ALP-Aktivität gegenüber Heparin ist, ähnlich wie bei den Versuchen mit FGF-2, mit großer Wahrscheinlichkeit auf die unterschiedliche Polysaccharidstruktur (glykosidische Bindung) zurückzuführen. Auch in Studien von Zhou et al. zeigten hochsulfatierte Chitosane eine signifikant höhere Steigerung der ALP-Aktivität als Heparin [85].

Bezüglich der Verstärkung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität durch die GAG-analogen Verbindungen korrelierten die Ergebnisse nicht in jedem Fall mit der Bindungsaffinität. So führte CO-0.67, mit nur 10% Bindungsaffinität, zu doppelter ALP-Aktivität wie CM-1.47, mit 60 % Bindungsaffinität. Nimmt man an, dass die Acetylgruppen aller carboxymethylierten Verbindungen, wie in der ^{13}C -NMR gezeigt, nach der Reaktion beseitigt wurden, sind die Ursachen für die Diskrepanzen in Bindungsaffinität und biologischer Aktivität in anderen Phänomenen zu suchen. Wie für FGF-2 gezeigt wurde, können bestimmte Sulfatierungsmuster von Heparin entweder günstig für eine Bindung an den Wachstumsfaktor, oder aber an den FGFR-Rezeptor sein. [165,160]. Dementsprechend könnte das Derivat CM-1.47 zwar mit hoher Affinität an BMP-2 binden, aber möglicherweise der Interaktion mit dem BMPR-Rezeptor entgegen wirken. Obwohl bislang keine direkten Nachweise der Einbindung von Glykosaminoglykanen in die Formierung BMP-BMPR-Komplexes in Form von Kristallstruktur-Analysen in der Literatur vorliegen, können Hinweise für den Einfluss von Heparin und GAG-analoger Verbindungen auf die Aktivität von BMP und die Formierung des BMP-BMPR-Ia Komplexes gefunden werden.

Zum einen ist bekannt, dass die Vermittlung der Bindung von BMP-2 an den BMPR-Ia Rezeptor über die sogenannte „wrist“ Region erfolgt [195]. BMP-2 weist darüber hinaus auch eine Heparin-bindende Domäne auf, welche aber außerhalb der „wrist“ Domäne, am N-terminalen Ende des Proteins lokalisiert ist [80]. Die Zugabe eines, der Heparin-bindenden Domäne analogen Peptides, führte zur Erhöhung der Aktivität von BMP-2. Dabei wurde davon ausgegangen, dass das Peptid an Heparan-Sulfat-Proteoglykane der ECM bindet. Dadurch wird das Andocken an die HSPG, und die damit verbundene „Inaktivierung“ von BMP-2, verhindert. Dadurch ist BMP-2 einer Bindung an den Rezeptor zugänglich. Auch zugegebenes Heparin führte zum gleichen Effekt, da dieses an BMP-2 bindet und damit ebenfalls das Andocken des Wachstumsfaktors an die „inaktivierenden“ HSPGs der ECM verhinderte [80]. Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass die Beseitigung der Heparin-bindenden Domäne von BMP-2 zur Erhöhung,

sowie zu einer von der Heparin-Zugabe unabhängigen Aktivität von BMP-2 führte. Das bedeutet, dass diese Domäne nicht direkt für die Vermittlung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung, wohl aber zur Bindung an die HSPG notwendig ist [80]. Jiao et al. zeigte auch, dass HSPG einem hohen Umbau unterliegen und darüber hinaus die Internalisation von Wachstumsfaktoren wie BMP-2 bewirken. Eine Desulfatierung von HSPGs der ECM führte in seinen Untersuchungen dementsprechend zur Unterbindung der Internalisierung von BMP-2, und damit zum drastischen Anstieg der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität. Auch die Zugabe von 2 µg/ml Heparin zu Zellen mit intakten HSPGs führte zu einem Anstieg der ALP-Aktivität, wobei auch hier von einer Unterdrückung der Internalisierung ausgegangen wurde. Konzentrationen von 20 µg/ml und mehr führten jedoch zu einer Abnahme der ALP-Aktivität unter den Wert der Kontrolle [106]. Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch Studien von Zhou et al., wobei von ihm darüber hinaus beobachtet wurde, dass 1 µg/ml Chitosan-Sulfat zu erhöhter Bindung von BMP-2 an die Zelloberfläche der C2C12 Zellen führte, 10 µg/ml jedoch zu einer Abnahme unter den Wert der Kontrolle ohne Chitosan-Sulfat [85]. Es ist deshalb anzunehmen, dass höhere Polysaccharid Konzentrationen zu einer gegenseitigen Verdrängung der BMP-Heparin Komplexe von den Rezeptoren führen, oder dass BMP-2 durch die Polysaccharide auch an unspezifischen Stellen gebunden wird, so dass ein Binden an den BMPR-Ia Rezeptor nicht mehr möglich ist.

Interessanterweise wurde mit Quartz-Kristall-Mikrowaagen Analyse (QCM) gezeigt, dass Heparin sowohl an die BMPR- Ia und II Rezeptoren als auch an einen Komplex aus beiden Rezeptoren bindet. Umgekehrt wurde auch eine hochaffine Bindung der BMPR Ia und II Rezeptoren an einen Heparin-BMP-2 Komplex gezeigt. Auch konnte eine hochaffine Bindung von Heparin an den BMP-BMPR I Komplex nachgewiesen werden [196]. Obwohl die Heparin-Bindungsdomäne außerhalb der „wrist“ Domäne liegt, ist es deshalb vorstellbar, dass die frei beweglichen Enden der an die Heparin-Bindedomäne gekoppelten Polysaccharide an andere Domänen der BMPR-Rezeptoren binden, und damit zur Verstärkung der Rezeptor-Ligand Bindung beitragen. Damit wäre auch die Bindungsaffinität der Polysaccharide in zweierlei Hinsicht von Bedeutung. Einerseits für das kompetitive Freisetzen von BMP-2 von den HSPG der extrazellulären Matrix oder der Zelloberfläche, und andererseits für die eben beschriebene indirekte Bindung von BMP-2 an die BMPR-Rezeptoren. Auch die in den eigenen Arbeiten gefundenen Diskrepanzen zwischen der Bindungsaffinität zu BMP-2 und der Steigerung der ALP-Aktivität durch die GAG-analogen Verbindungen und Heparin wären damit erklärbar.

Die Versuche der Beeinflussung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität durch GAG-analoge Verbindungen zeigten weiterhin, dass das Cellulose-Sulfat CS-1.57, im Gegensatz zu allen

anderen synthetisierten Derivaten und Heparin, bis 10 µg/ml zu einem Anstieg der ALP-Aktivität führte. Eine Interpretation des Effektes von CS-1.57 ist insofern schwer, da es eine hohe Bindungsaffinität aufwies und deshalb einen ähnlichen Kurvenverlauf wie CHS1.77-1.00 oder CS-1.94 zeigen sollte. Weiterführende Arbeiten über die Bindung der Polysaccharide bzw. BMP-2 an die Zelloberfläche oder an den BMPRIa Rezeptor müßten hier durchgeführt werden, um detailliertere Informationen der zugrunde liegenden Mechanismen zu erhalten.

Eine weitere Vertiefung des Verständnisses der Wirkung der GAG-analogen Verbindungen auf die BMP-2-induzierte osteogene Differenzierung wurde durch die Untersuchung der Expression osteogener Marker-Gene erzielt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bestätigten prinzipiell die Ergebnisse zur ALP-Aktivität. Jedoch zeigte sich, dass die Induktion der Alkalischen Phosphatase nicht in jedem Fall repräsentativ für die Expression anderer Gene sein muss. Das zeigte sich zum einen in der vergleichsweise geringen Verstärkung der BMP-2-induzierten Expression der osteogenen Markergene durch 2,5 µg/ml des Chitosan-Sulfates CHS-1.77-1.00, verglichen zur hohen ALP-Aktivität des Derivates bei dieser Konzentration. Des Weiteren führte auch die carboxylierte Cellulose CO-0.67 zu signifikanter Veränderung der Genexpression, obwohl deren ALP-Aktivität wesentlich geringer als die von CHS-1.77-1.00 war. Diese Ergebnisse bestätigten weiterhin, dass das Konzept, sowohl Sulfat- als auch Carboxyl-Substituenten in das Cellulose Grundgerüst einzufügen, erfolgreich für die Verstärkung der biologischen Aktivität von BMP-2 eingesetzt werden kann. In Übereinstimmung mit den Experimenten der ALP-Aktivität wurde mit 10 µg/ml CS-1.57 eine größere Verstärkung der Expression osteogener Markergene als mit 2,5 µg/ml beobachtet, was bestätigt das dieses Derivat mit ansteigenden Konzentrationen bis 10 µg/ml eine zunehmende Verstärkung der BMP-2 Aktivität bewirkt.

Es wurde eine Vielzahl von osteogenen Markergenen untersucht. Dabei zeigte sich, dass nicht alle Gene exprimiert wurden oder dass die Expression durch die Anwesenheit der GAG-analogen Verbindungen verstärkt wurden. Das Bone Sialoprotein wurde nicht exprimiert, was in Übereinstimmung mit anderen Studien steht, in welchen dieses Protein erst nach Langzeitinkubation (14 Tage) nachweisbar war [87]. Die Expression von Osteocalcin wurde in den eigenen Untersuchungen durch Zugabe der GAG-analogen Verbindungen nicht signifikant verändert. In Versuchen von Boskey mit C2C12 Zellen wurde zwar eine signifikante Zunahme der BMP-2-induzierten Osteocalcin-Expression nach zwei Tagen durch ein Chitosan-Sulfat beobachtet [83], C3H/10T1/2 Zellen zeigten aber nach drei Tagen noch sehr schwache Expression von Osteocalcin im Vergleich zu längerer Inkubation [84]. So war die Dauer des

eigenen Versuches möglicherweise noch zu kurz war, um eine signifikante Beeinflussung der Expression dieses Gens durch die Polysaccharide zu beobachten.

Die Expression der untersuchten osteogenen Markergene unterliegt vielfältigen Regulationsmechanismen, welche z.B. durch den Sp1-Transkriptionsfaktor Osterix oder das Regulatorprotein osteogener Expression, Runx2 reguliert werden. Es ist beschrieben, dass die Expression von Osterix in C2C12 Zellen unter dem Einfluss von Runx2 stark, unter BMP-2-Einfluss jedoch nur moderat induziert wird. Runx2 wird dagegen fast nicht durch BMP-2 induziert. BMP-2 und Smad1/Smad4 Überexpression induzierten dagegen die Osterix Expression in Runx2 defizienten mesenchymalen Zellen. Das bedeutet, dass Osterix sowohl abhängig als auch unabhängig von Runx2 über BMP-2 reguliert wird [197]. In den eigenen Versuchen wurde eine gegensätzliche Regulation von Osterix und Runx2 durch die zugegebenen Derivate beobachtet, was auf eine von Runx2 unabhängige Expression von Osterix schließen lässt. Die Expression von Runx2 wurde durch die Zugabe von BMP-2 nur leicht erhöht, was auch den Ergebnissen der Literatur entspricht [197]. Durch die derivatisierten Polysaccharide wurde die Expression von Runx2 aber wieder herunterreguliert. Das lässt vermuten, dass die BMP-2-induzierte Runx2 Expression durch andere Regulationsmechanismen negativ beeinflusst wird, welche ihrerseits wiederum durch den Einfluss der GAG-analogen Verbindungen verstärkt werden könnten. Auch die Expression von Collagen Ia wurde durch die Zugabe der Polysaccharide in den eigenen Studien abgeschwächt. Matsubara et al. zeigten in C3H/10T1/2 Zellen, dass die Collagen Ia Synthese durch Überexpression von Runx2 stark anstieg. Die Unterdrückung der Expression von Osterix dagegen führte nicht zu verringerter Collagen Ia Expression. [197]. In den eigenen Experimenten kam es bei erhöhter Osterix-Expression aber abnehmender Runx2-Expression auch zu verringerter Collagen Ia Synthese. Das bedeutet, dass Collagen Ia wahrscheinlich abhängig von Runx2, aber unabhängig von Osterix synthetisiert wird.

Neben Chordin und Follistatin ist Noggin einer der am besten untersuchten Antagonisten von BMP-2 [198,199] und dafür bekannt, verschiedene BMPs zu binden und abzubauen, sowie die BMP-BMPRIa Formation zu inhibieren [200,201]. BMP-2 induziert dabei selbst die Expression von Noggin in C2C12 Zellen, und leitet so seine eigene Feinregulation durch einen negativen Feedback-Loop ein [202,203]. In den eigenen Studien steigerte BMP-2 und die derivatisierten Polysaccharide die Expression von Noggin, und führte gleichzeitig zur Erhöhung der Expression osteogener Markergene. Das bedeutet, dass Noggin nicht generell zur Unterdrückung BMP-2-induzierter Prozesse führt, sondern zur Feinregulation von BMP-2 beiträgt. Darüber hinaus ist bekannt, dass Noggin an Zelloberflächen Glykosaminoglykane bindet und dadurch inaktiviert

wird [204]. So könnten auch die eigenen GAG-anaolgen Verbindungen an Noggin gebunden und damit eine inhibitorische Interaktion von Noggin mit BMP-2 verhindert haben.

Durch die Untersuchung der Effekte weiterer sulfatierter Chitosane konnten tiefere Erkenntnisse über die Bedeutung des Gesamt-Sulfatierungsgrades und der regioselektiv bevorzugten Sulfatierung einzelner Positionen gewonnen werden. Zum einen bestätigten die Experimente, dass ein sehr hoher 2-*O*-Sulfatierungsgrad der Chitosan Sulfate, ähnlich den Untersuchungen mit den Cellulose-Sulfaten, zu abnehmender BMP-2-induzierter ALP-Aktivität führte. Zum anderen zeigte sich, dass ein höherer Sulfatierungsgrad in 6-*O*-Position, bei gleichem Gesamt-Sulfatierungsgrad (Vergleich CHS-1.59-1.00 mit CHS-1.59-0.78) zu signifikant höherer ALP-Aktivität führte. Ein hoher Sulfatierungsgrad in 6-*O*-Position war demnach entscheidend für die biologische Aktivität der Chitosan-Sulfate in unseren Studien. In Untersuchungen von Irie et al. wurde nachgewiesen, dass 6-*O*-desulfatiertes Heparin eine geringere Bindungsaffinität an BMP-7 als 2-*O*-desulfatiertes Heparin hat. [81]. Auch Studien von Zhou et al. bestätigten die eigenen Untersuchungen. Die Ergebnisse seiner Arbeit zeigten, dass ausschließlich 6-*O*-sulfatiertes Chitosan zu wesentlich höherer ALP-Aktivität als ausschließlich 2-*O*-sulfatiertes Chitosan führt [85]. Aufgrund der strikt regioselektiven 6-*O*-Sulfatierung der Cellulose-Sulfate in den eigenen Studien, liegen aber keine vergleichbaren Ergebnisse der Beeinflussung der FGF-2-induzierten mitogenen Aktivität durch sulfatierte Cellulosen mit konstantem Gesamt-Sulfatierungsgrad, aber variierender 6-*O*-Sulfatierung vor.

Wie im Ergebnis- und Diskussions-Teil zuvor beschrieben, unterschieden sich die Ergebnisse der Aktivität von FGF-2 und BMP-2 hinsichtlich der Konzentration der eingesetzten GAG-analogen Verbindungen um mehrere Größenordnungen. Diese Unterschiede sollen hier kurz diskutiert werden. In Studien von Leali et al. führten Konzentrationen von weniger als 1 µg/ml sulfatierter K5-Polysaccharide zu einer Unterdrückung der Bindung von FGF-2 an den FGFR1 Rezeptor, 10 µg/ml und weniger dieser Verbindungen führten zu verringerter Proliferation [102]. Die Unterdrückung der Bindung von FGF-2 an den FGFR1 Rezeptor war in diesen Studien wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die exogen applizierten GAG-analogen Verbindungen die, für die Formierung des FGF-2:Heparan-Sulfat:FGFR Komplexes notwendigen Zelloberflächen-HSPG vom Rezeptor-Ligand Komplex verdrängen, und damit zu einer relativen Verringerung der Signaltransduktion führten. Pye et al. konnte in seinen Studien dagegen nachweisen, dass die exogene Zugabe von hochsulfatierten Heparan-Sulfat Oligosacchariden zu erhöhter FGF-2-induzierter Proliferation führte. Die untersuchten Zellen in diesen Studien waren aber frei von Zelloberflächen-HSPG, so dass erst die exogen applizierten Oligosaccharide zur Formierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes führten [103]. Da die von uns

untersuchten 3T3-L1 Fibroblasten sowohl Heparan-Sulfat als auch Chondroitinsulfat aufweisen, deren Menge sich jedoch erst im reifen, Adipozyten-Stadium signifikant erhöht [205], war die Abundanz der Zelloberflächen-HSPG der 3T3-L1 Fibroblasten möglicherweise so gering, dass sie nicht ausreichten um eine Bindung aller FGF-2 Moleküle an den FGFR-1 Rezeptor zu vermitteln. Die exogene Zugabe der GAG-analogen Verbindungen führte demnach zur Erhöhung der Anzahl von aktiven FGF-2:Polysaccharid-FGFR-1 Komplexen, und damit zu verstärkter Signalübertragung. Auch die in den Untersuchungen zur BMP-2-induzierten osteogenen Aktivität genutzten C3H/10T1/2 und C2C12 Zellen weisen Zelloberflächen-HSPG auf [206,106]. Bei der Formierung des BMP-2:BMPRIa Komplexes an diesen Zellen sind die zelleigenen HSPG jedoch nicht direkt beteiligt. Die Zelloberflächen-HSPG führen vielmehr, wie zuvor beschrieben, zu einer Bindung und damit einhergehenden Inaktivierung durch z.B. Internalisierung von BMP-2. Die Zugabe geringer Mengen GAG-analoger Verbindungen führte hier wahrscheinlich zu einem „Freisetzen“ des Wachstumsfaktors von den „inaktivierenden“ Zelloberflächen-HSPG, und machte BMP-2 für die Bindung an den BMPRIa Rezeptor zugänglich. Höhere Mengen GAG-analoger Verbindungen wirkten sich, wie zuvor beschrieben, negativ auf die Formierung des BMP-2:BMPR-Komplexes aus.

6. Zusammenfassung

Die in der vorgelegten Arbeit durchgeführten Untersuchungen gingen von der Erkenntnis aus, dass Glykosaminoglykane und Glykosaminoglykan-analoge Verbindungen die Funktion von Wachstumsfaktoren regulieren und damit Einfluss auf Wachstumsfaktoren-gesteuerte Proliferation und Differenzierung von Zellen haben. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Art und der Grad der Substitution, sowie die Konzentration der untersuchten Verbindungen Einfluss auf die Bindungsaffinität zum Wachstumsfaktor als auch auf die Interaktion der Wachstumsfaktoren mit den Zelloberflächen-Rezeptoren hat, was sich letztendlich auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen auswirken sollte.

Ausgehend von dieser Hypothese wurden GAG-analoge Verbindungen sowohl mit abgestuftem Sulfatierungsgrad als auch mit Mischfunktionalisierung (Sulfat- und Carboxyl- bzw. Carboxymethylgruppen) aus Cellulose und Chitosan synthetisiert. Diese wurden in biochemischen Analysen auf ihre Wechselwirkung mit zwei Wachstumsfaktoren untersucht. In *in vitro* Untersuchungen wurden zudem die Auswirkungen der GAG-analogen Verbindungen auf das Wachstumsfaktor-induzierte zelluläre Verhalten studiert. Dazu wurden Fibroblasten und verschiedene mesenchymale Zellen auf ihre Lebensfähigkeit, Proliferation sowie die Ausprägung osteogener Differenzierungsmarker wie die Alkalische Phosphatase, Mineralisierung und die Expression weiterer osteogener Marker-Gene studiert.

Die Arbeiten zeigten, dass mit den ausgewählten chemischen Synthesebedingungen graduell ansteigende Sulfatierungsgrade erreicht wurden. Für Cellulose erfolgte die Sulfatierung in C₂- und C₆-Position, wobei diese regioselektiv bevorzugt in C₆ stattfand. Chitosan wurde dagegen in C₃- und C₆-Position sulfatiert, wobei hier, abhängig von den Synthesebedingungen, entweder eine bevorzugte Sulfatierung in C₆ oder annähernd gleiche Sulfatierungsgrade in beiden Positionen erreicht wurden. Die Einführung von Carboxylgruppen in Cellulosen erfolgte ausschließlich in C₆-Position, wobei in dieser Position ähnliche Substitutionsmuster wie in Heparin erzielt wurden, durch die sehr geringe C₂-Sulfatierung wurde jedoch letztendlich keine vollständige Homologie zu hochsulfatiertem Heparin erreicht. Ähnlichkeiten zu niedrig sulfatierten Abschnitten von Heparin oder Heparan-Sulfaten wurden aber erreicht. Carboxymethylgruppen konnten in C₂-, C₃- und C₆-Position eingeführt werden, wobei dies in der Reihenfolge C₆> C₂>> C₃ erfolgte.

Eine toxische Wirkung der Cellulose-Derivate auf 3T3-L1 Fibroblasten wurde, mit wenigen Ausnahmen, nicht beobachtet. Mit C3H/10T1/2 und C2C12 Zellen wurde jedoch eine mit steigendem Sulfatierungsgrad und zunehmender Konzentration abhängige Abnahme der Lebensfähigkeit festgestellt. Eine Erhöhung der Zahl lebender Zellen wurde dagegen durch ein carboxyliertes Derivat hervorgerufen. Die Unterschiede zwischen den Zelllinien waren offensichtlich auf eine höhere Sensibilität der C3H/10T1/2 und C2C12 Zellen und geringere Zelldichten zurückzuführen.

Die Bindungsaffinität zu Wachstumsfaktoren, als wichtiger biochemischer Parameter der synthetisierten GAG-analogen Verbindungen, unterschied sich zwischen den beiden untersuchten Wachstumsfaktoren. Prinzipiell war mit BMP-2 eine im Verhältnis zu Heparin wesentlich höhere Bindungsaffinität als zu FGF-2 zu verzeichnen. Mit FGF-2 stieg diese mit ansteigendem Sulfatierungsgrad, im Fall von BMP-2 war jedoch mit einem DS_S höher 1,57 eine wieder abnehmende Bindungsaffinität zu verzeichnen. Carboxylierte Derivate zeigten prinzipiell die geringste Bindung, zwei carboxymethylierte Derivate führten unabhängig vom Derivatisierungsgrad zu signifikant höherer Bindung als der Rest der carboxylierten/carboxymethylierten Derivate.

Ausgehend von der Annahme, dass eine höhere Bindungsaffinität zu höherer biologischer Aktivität führt, stieg die durch FGF-2-induzierte Proliferation mit ansteigendem Sulfatierungsgrad der synthetisierten Cellulosen. Dabei korrelierte die Zunahme der Proliferation zunächst mit einem Anstieg der Sulfatierung in C₆-, und bei höheren Sulfatierungsgraden in C₂-Position. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass mit zunehmendem Sulfatierungsgrad stufenweise immer geringere Mengen des entsprechenden Polysaccharides für eine Proliferationssteigerung notwendig waren, die Wirkung von Heparin wurde dabei von drei der GAG-analogen Verbindungen bei weitem übertroffen. Die carboxylierten und carboxymethylierten Derivate führten dagegen unabhängig von der Bindungsaffinität nur in Konzentrationen über 500 µg/ml zu einer Steigerung der Proliferation. Für die carboxylierten Derivate wurde postuliert, dass ein ansteigender Carboxylierungsgrad zu einer Hemmung der Proliferation führt.

Der Schutz von FGF-2 vor proteolytischem Verdau durch die sulfatierten Derivate korrelierte ebenfalls mit dem Sulfatierungsgrad und der Steigerung der FGF-2-induzierten Proliferation. Jedoch wurden diesbezüglich auch Diskrepanzen beobachtet. Heparin führte, bei gleichem Schutz vor Proteolyse wie CS-1.94, zu einer wesentlich geringeren Konzentrations-abhängigen Steigerung der Proliferation. Auch das carboxylierte Derivate CO-0.67 und die

carboxymethylierten Derivate zeigten, bei gleichem oder stärkerem Schutz vor proteolytischem Verdau als ein Teil der hochsulfatierten Cellulosen, eine wesentlich geringere mitogene Wirkung. Es wurde deshalb postuliert, dass eine Förderung der Rezeptor-Ligand-Komplexbildung durch die hochsulfatierten, nicht aber carboxylierten und carboxymethylierten Derivate erfolgt.

Die GAG-analogen Verbindungen beeinflussten aber nicht nur die Aktivität von Wachstumsfaktoren, sondern bewirkten auch ohne Zugabe von FGF-2 eine Steigerung der Proliferation. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl starke Steigerungen als auch ein Rückgang der Proliferation durch Heparin und vor allem die GAG-analogen Verbindungen erfolgte. Eine auffällig geringe Wirkung, im Gegensatz zu den Ergebnissen mit FGF-2, wurde dabei mit der am höchsten sulfatierten Cellulose CS-1.94 beobachtet. Verschiedene Ereignisse wie die Beeinflussung der Aktivität von der Zelle selbst produzierter Wachstumsfaktoren, Beeinflussung der Genaktivität, negative Einflüsse auf mit der Zellteilung verbundene Prozesse oder der Hemmung der Fibroblasten-Adhäsion sind als Ursachen zu diskutieren. Carboxylierte und carboxymethylierte Derivate zeigten auch hier nur sehr geringe oder keine Steigerung der Proliferation, was die geringe biologische Wirkung, vor allem von Carboxymethylgruppen, bestätigt.

Zur Untersuchung der Beeinflussung der BMP-2-induzierten osteogenen Aktivität durch GAG-analoga Verbindungen wurde zunächst die Aktivität des Markers Alkalische Phosphatase untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit FGF-2 wurde die ALP-Aktivität in einem Konzentrationsbereich von 10 µg/ml bis 1 mg/ml, abhängig vom Sulfatierungsgrad und der Konzentration der synthetisierten Derivate, mit C3H/10T1/2 Zellen unterdrückt. Es wurde postuliert, dass BMP-2 in diesem Konzentrationsbereich durch die GAG-analogen Verbindungen immobilisiert und damit inaktiviert wurde. Die gewonnenen Kenntnisse spiegeln sich auch im Mineralisierungsvermögen der mesenchymalen Zelllinie wieder. Mit dem hochsulfatierten Cellulose-Derivat CS-1.94 wurde dementsprechend eine starke Unterdrückung der Mineralisierung beobachtet. Im Gegensatz zur Kurzzeitinkubtion (ALP-Aktivität) führte aber eine niedrig sulfatierte Cellulose zu einer leichten Erhöhung der Mineralisierung.

Konzentrationen unter 10 µg/ml führten dagegen zu einer Steigerung der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität bis zum 15 fachen des Kontrollwertes. Chitosan-Sulfat war dabei Cellulose-Sulfaten überlegen, was mit dem prinzipiellen Strukturunterschied zu begründen ist. Bei den Cellulose-Sulfaten führte CS-1.57 zur größten Steigerung der ALP Aktivität, was auch mit der hohen Bindungsaffinität korrelierte. Es wurde dabei die Hypothese aufgestellt, dass die Derivate

BMP-2 vom negativen Einfluss der zellulären HSPG freisetzen und so der Bindung zum Rezeptor zugänglich machen, oder sogar zu einer möglichen Unterstützung der Formierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes beitragen. Hinsichtlich der Bedeutung der Sulfatierungsposition konnte mit Chitosan-Sulfaten überzeugend nachgewiesen werden, dass eine geringere Sulfatierung in C₆-Position, bei ansonsten konstantem Gesamt-Sulfatierungsgrad, zu drastischer Abnahme der BMP-2-induzierten ALP-Aktivität führt.

Letztlich ließ die Untersuchung der Expression osteogener Markergene ein tieferes Verständnis der Regulation der osteogenen Differenzierungsvorgänge zu. Die Expression des BMP-2 Antagonisten Noggin und des Transkriptionsfaktors Osterix wurden durch die GAG-analogen Verbindungen verstärkt, die Synthese des Transkriptionsfaktor Runx2 und von Collagen I wurden dagegen durch die Derivate herunter reguliert. Eine Runx2 unabhängige osteogene Differenzierung in C2C12 Myoblasten wurde verifiziert. Die stärkste Beeinflussung der BMP-2-induzierten Expression osteogener Markergene wurde, im Gegensatz zu den Ergebnissen der ALP Aktivität, mit CS-1.57 beobachtet. Aber auch das carboxylierte Derivat CO-0.67 führte zu einer vergleichbaren Beeinflussung der Genaktivität wie die hochsulfatierten Derivate. Neben der Stimulierung der Lebensfähigkeit ist dieses Derivat deshalb als eine interessante Alternative zu hochsulfatierten Verbindungen anzusehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass viele strukturelle Merkmale der synthetisierten Cellulose- und Chitosan-Derivate Einfluss auf die Aktivität der Wachstumsfaktoren haben. Neben fördernden Einflüssen sind auch immer negative Eigenschaften wie z.B. die Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit zu beachten. In vielen Experimenten wurden natürlichem Heparin überlegene Eigenschaften verifiziert. Zum besseren Verständnis der zellulären Prozesse, vor allem der Interaktion zwischen Wachstumsfaktor, GAG-analoger Verbindung und zellulärem Rezeptor, sowie zur Abschätzung der Anwendbarkeit der synthetisierten Polysaccharide in Langzeitstudien, sind fortführende Untersuchungen notwendig.

7. Literaturverzeichnis

- (1) BD Ratner, AS Hoffmann, FJ Schoen, JE Lemons. Biomaterials Sciences. Elsevier Academic Press: San Diego, 2004.
- (2) Erich Wintermantel. Medizintechnik – Life Science Engineering: Interdisziplinarität, Biokompatibilität, Technologien, Implantate, Diagnostik, Werkstoffe, Business. Springer: Berlin, 2008.
- (3) H. Antretter, H. Hangler, D. Höfer, J. Margreiter, R. Margreiter, G. Laufer. Totaler und partieller Herzersatz – Trends und Entwicklungen. *J Kardiol* 2002; 9: 3–13.
- (4) Saadi T, Arish A, Carmel J, Bramnik Z, Nayshool O, Mironi-Harpaz I, et al. Hepatocyte Cell Line Function in a Biosynthetic Hydrogel Scaffold for Liver Tissue Engineering. *Liver Transplant* 2010;16(6):S122-S122.
- (5) Kamolz LP, Lumenta DB, Kitzinger HB, Frey M. Tissue engineering for cutaneous wounds: an overview of current standards and possibilities. *European Surgery-Acta Chirurgica Austriaca* 2008;40(1):19-26.
- (6) Mourino V, Boccaccini AR. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. *Journal of the Royal Society Interface* 2010;7(43):209-227.
- (7) McNickle AG, Provencher MT, Cole BJ. Overview of Existing Cartilage Repair Technology. *Sports Med Arthrosc* 2008;16(4):196-201.
- (8) Bursac N, Papadaki M, Cohen RJ, Schoen FJ, Eisenberg SR, Carrier R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies. *Am J Physiol* 1999; 277:H433–H444.
- (9) Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *J Biomed Sci* 2009;16:108.
- (10) WC Low, CM Verfaillie. Stem cells and regenerative medicine. World scientific: Singapore, 2008.
- (11) Zustiak SP, Durbal R, Leach JB. Influence of cell-adhesive peptide ligands on poly(ethylene glycol) hydrogel physical, mechanical and transport properties. *Acta Biomater* 2010;6(9):3404-3414.
- (12) Hunt NC, Smith AM, Gbureck U, Shelton RM, Grover LM. Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation. *Acta Biomater* 2010;6(9):3649-3656.
- (13) Zimmermann W-H, Cesnjevar R. Cardiac tissue engineering: implications for pediatric heart surgery. *Pediatric cardiology* 2009;30(5):716-723.
- (14) Cai N, Gong Y, Chian KS, Chan V, Liao K. Adhesion dynamics of porcine esophageal fibroblasts on extracellular matrix protein-functionalized poly(lactic acid). *Biomed Mater* 2008;3(1):015014.

- (15) Nitzsche H, Metz H, Lochmann A, Bernstein A, Hause G, Groth T, et al. Characterization of Scaffolds for Tissue Engineering by Benchtop-Magnetic Resonance Imaging. *Tissue Eng Part C-Me* 2009;15(3):513-521.
- (16) Llanos GR, Sefton MV. Heparin-poly(ethylene glycol)-poly(vinyl alcohol) hydrogel: preparation and assessment of thrombogenicity. *Biomaterials* 1992;13(7):421-424.
- (17) Martins AM, Alves CM, Kasper FK, Mikos AG, Reis RL. Responsive and in situ-forming chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications: an overview of the last decade. *J Mater Chem* 2010;20(9):1638-1645.
- (18) Wang W, Zhang M, Lu W, Zhang X, Ma D, Rong X, et al. Cross-linked collagen-chondroitin sulfate-hyaluronic acid imitating extracellular matrix as scaffold for dermal tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16(2):269-279.
- (19) Chen L, He ZQ, Chen B, Yang MJ, Zhao YN, Sun WJ, et al. Loading of VEGF to the heparin cross-linked demineralized bone matrix improves vascularization of the scaffold. *J Mater Sci-Mater M* 2010;21(1):309-317.
- (20) Lee JE, Kim KE, Kwon IC, Ahn HJ, Lee SH, Cho HC, et al. Effects of the controlled-released TGF-beta 1 from chitosan microspheres on chondrocytes cultured in a collagen/chitosan/glycosaminoglycan scaffold. *Biomaterials* 2004;25(18):4163-4173.
- (21) Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME: *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2009.
- (22) Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 2007;446(7139):1030-1037.
- (23) Darnell J, Lodish H, Baltimore D. *Molekulare Zellbiologie*. De Gruyter: New York, 1994.
- (24) Miyazaki T, Miyauchi S, Tawada A, Anada T, Matsuzaka S, Suzuki O. Oversulfated Chondroitin Sulfate-E Binds to BMP-4 and Enhances Osteoblast Differentiation. *Journal of Cellular Physiology* 2008;217(3):769-777.
- (25) Capila I Linhardt R J. Heparin-Protein Wechselwirkungen. *Angewandte Chemie* 2002;114:426-450.
- (26) Sanderson PN, Huckerby TN, Nieduszynski IA. Conformational Equilibria of Alpha-L-Iduronate Residues in Disaccharides Derived from Heparin. *Biochemical Journal* 1987;243(1):175-181.
- (27) Desai UR, Wang HM, Kelly TR, Linhardt RJ. Structure Elucidation of a Novel Acidic Tetrasaccharide and Hexasaccharide Derived from a Chemically Modified Heparin. *Carbohydrate Research* 1993;241:249-259.
- (28) Zehnder JL, Galli SJ. Cell biology - Mast-cell heparin demystified. *Nature* 1999;400(6746):714-715.
- (29) Lassila R, Lindstedt K, Kovanen P. Native Heparin Proteoglycans Exocytosed from Stimulated Mast-Cells Strongly Inhibit Platelet-Collagen Interaction and Binding of Von-Willebrand-Factor to Platelets. *Thromb Haemostasis* 1993;69(6):707-707.

- (30) Lindstedt KA, Kokkonen JO, Kovanen PT. Soluble Heparin Proteoglycans Released from Stimulated Mast-Cells Induce Uptake of Low-Density Lipoproteins by Macrophages Via Scavenger Receptor-Mediated Phagocytosis. *J Lipid Res* 1992;33(1):65-75.
- (31) Garg HG, Linhardt RG, Hales CA. *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*. Elsevier: San Diego, 2005.
- (32) Sakaguchi K, Yanagishita M, Takeuchi Y, Aurbach GD. Identification of Heparan-Sulfate Proteoglycan as a High-Affinity Receptor for Acidic Fibroblast Growth-Factor (Afgf) in a Parathyroid Cell-Line. *Journal of Biological Chemistry* 1991;266(11):7270-7278.
- (33) Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, et al. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Molecular Cell* 2000;6(3):743-750.
- (34) Xingbin A, Do AT, Lozynska O, Gullberg MK, Lindahl U, Emerson Jr CP. QSulf1 remodels the 6-O sulfation of cell surface heparin sulphate proteoglycans to promote Wnt signalling. *J Cell Biol* 2003;162:341-351.
- (35) Akiyama T, Kamimura K, Firkus C, Takeo S, Shimmi O, Nakato H. Dally regulates Dpp morphogen gradient formation by stabilizing Dpp on the cell surface. *Dev Biol* 2008;313(1):408-419.
- (36) Matsuda K, Maruyama H, Guo F, Kleeff J, Itakura J, Matsumoto Y, et al. Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells. *Cancer Research* 2001;61(14):5562-5569.
- (37) Hansson M, Olesen DR, Peterslund JML, Engberg N, Kahn M, Winzi M, et al. A late requirement for Wnt and FGF signaling during activin-induced formation of foregut endoderm from mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* 2009;330(2):286-304.
- (38) Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8(3):235-253.
- (39) Matthew A. Nugenta., Renato V. Iozzo, Fibroblast growth factor-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2000; 32:115-120.
- (40) Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 1997;18(1):26-45.
- (41) Macdonald ML, Rodriguez NM, Shah NJ, Hammond PT. Characterization of Tunable FGF-2 Releasing Polyelectrolyte Multilayers. *Biomacromolecules* 2010;11(8):2053-2059.
- (42) Walsch S, Jefferiss C, Steward K, Jordan GR, Screen J, Beresford JN. Expression of the Developmental Markers STRO-1 and Alkaline Phosphatase in Cultures of Human Marrow Stromal Cells: Regulation by Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 and Relationship to the Expression of FGF Receptors 1-4. *Bone* 2000; 27(2):185-195.
- (43) Spivakkroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, et al. Heparin-Induced Oligomerization of Fgf Molecules Is Responsible for Fgf Receptor Dimerization, Activation, and Cell-Proliferation. *Cell* 1994;79(6):1015-1024.

- (44) Rusnati M, Coltrini D, Caccia P, Dellera P, Zopetti G, Oreste P, et al. Distinct Role of 2-O-Sulfate, N-Sulfate, and 6-O-Sulfate Groups of Heparin in the Formation of the Ternary Complex with Basic Fibroblast Growth-Factor and Soluble Fgf Receptor-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994;203(1):450-458.
- (45) Gao QY, Tan J, Ma P, Ge J, Liu YQ, Sun XR, et al. PKC alpha affects cell cycle progression and proliferation in human RPE cells through the downregulation of p27(kip1). *Molecular Vision* 2009;15(283-88):2683-2695.
- (46) Klint P, Kanda S, Kloog Y, Claesson-Welsh L. Contribution of Src and Ras pathways in FGF-2 induced endothelial cell differentiation. *Oncogene* 1999;18(22):3354-3364.
- (47) Fima E, Shtutman M, Libros P, Missel A, Shahaf G, Kahana G, et al. PKC beta enhances cell cycle progression, the expression of G1 cyclins and p21 in MCF-7 cells. *Oncogene* 2001;20(46):6794-6804.
- (48) Klint P, Kanda S, Kloog Y, Claesson-Welsh L. Contribution of Src and Ras pathways in FGF-2 induced endothelial cell differentiation. *Oncogene* 1999;18(22):3354-33647.
- (49) Grazul-Bilska AT, Luthra G, Reynolds LP, Bilski JJ, Johnson ML, Adbullah SA, et al. Effects of basic fibroblast growth factor (FGF-2) on proliferation of human skin fibroblasts in type II diabetes mellitus. *Exp Clin Endocr Diab* 2002;110(4):176-181.
- (50) Vasko R, Koziolk M, Kurz B, Mueller GA, Strutz F. Hyperglycemia induces the expression of basic fibroblast growth factor (FGF-2) through activation of the protein kinase C beta-1 and p65 nf-kappa b in human renal fibroblasts. *Nephrol Dial Transpl* 2006;21:51-52.
- (51) Miguita L, Martinez EF, de Araujo NS, de Araujo VC. FGF-2, TGF beta-1, PDGF-A and respective receptors expression in pleomorphic adenoma myoepithelial cells: an in vivo and in vitro study. *J Appl Oral Sci* 2010;18(1):83-91.
- (52) Allouche M, Bikfalvi A. The role of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in hematopoiesis. *Prog Growth Factor Res* 1995;6(1):35-48.
- (53) Montesano R. Regulation of angiogenesis *in vitro*. *Eur J Clin Invest* 1992; 22:504-515.
- (54) Wilson EL, Rifkin DB, Kelly F, Hannocks MJ, Gabilove JL. Basic Fibroblast Growth-Factor Stimulates Myelopoiesis in Long-Term Human Bone-Marrow Cultures. *Blood* 1991;77(5):954-960.
- (55) Peters K, Werner S, Liao X, Wert S, Whitsett J, Williams L. Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung. *EMBO J* 1994;13(14):3296-3301.
- (56) Kalcheim C, Neufeld G. Expression of basic fibroblast growth factor in the nervous system of early avian embryos. *Development* 1990;109(1):203-15.
- (57) Schulz MW, Chamberlain CG, de Iongh RU, McAvoy JW. Acidic and basic FGF in ocular media and lens: implications for lens polarity and growth patterns. *Development* 1993;118(1):117-26.
- (58) Amaya E, Stein PA, Musci TJ, Kirschner MW. FGF signaling in the early development of mesoderm in *Xenopus*. *Development* 1993; 118, 477-487.

- (59) Werner S, Weinberg W, Liao X, Peters KG, Blessing M, Yuspa SH, Weiner RL, Williams LT. Targeted expression of a dominant-negative FGF receptor mutant in the epidermis of transgenic mice reveals a role of FGF in keratinocyte organization and differentiation. *EMBO J* 1993;12(7):2635-43.
- (60) Kurita Y, Tsuboi R, Ueki R, Rifkin DB, Ogawa H. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in wound healing sites of mouse skin. *Arch Dermatol Res* 1992;284(4):193-197.
- (61) Globus RK, Pattersonbuckendahl P, Gospodarowicz D. Regulation of Bovine Bone Cell-Proliferation by Fibroblast Growth-Factor and Transforming Growth Factor-Beta. *Endocrinology* 1988;123(1):98-105.
- (62) Eiselleova L, Matulka K, Kriz V, Kunova M, Schmidtova Z, Neradil J, et al. A Complex Role for FGF-2 in Self-Renewal, Survival, and Adhesion of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 2009;27(8):1847-1857.
- (63) LaBonne C, Whitman M. Mesoderm induction by activin requires FGF-mediated intracellular signals. *Development* 1994;120(2):463-72.
- (64) Yaguchi Y, Yu T, Ahmed MU, Berry M, Mason I, Basson MA. Fibroblast Growth Factor (FGF) Gene Expression in the Developing Cerebellum Suggests Multiple Roles for FGF Signaling During Cerebellar Morphogenesis and Development. *Developmental Dynamics* 2009;238(8):2058-2072.
- (65) Hansson M, Olesen DR, Peterslund JML, Engberg N, Kahn M, Winzi M, et al. A late requirement for Wnt and FGF signaling during activin-induced formation of foregut endoderm from mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology* 2009;330(2):286-304.
- (66) Steventon B, Mayor R. A temporal modulation of FGF, Wnt, BMP and Retinoic Acid signalling is required for neural crest induction. *Mech Develop* 2009;126:S110-S110.
- (67) Sundaram K, Senn J, Yuvaraj S, Rao DS, Reddy SV. FGF-2 Stimulation of RANK Ligand Expression in Paget's Disease of Bone. *Molecular Endocrinology* 2009;23(9):1445-1454.
- (68) Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Hayes DF, Folkman J. Elevated levels of an angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *JNCI J Natl Cancer Inst* 1996;86(5): 356-361.
- (69) Wozney JM. Overview of bone morphogenic proteins. *Spine* 2002;27(16S):S2-S8.
- (70) Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(8):1544-1552.
- (71) Osyczka AM, Diefenderfer DL, Bhargava G, Leboy PS. Different effects of BMP-2 on marrow stromal cells from human and rat bone. *Cells Tissues Organs* 2004;176(1-3):109-119.
- (72) Kanatani M, Sugimoto T, Kaji H, Kobayashi T, Nishiyama K, Fukase M, et al. Stimulatory Effect of Bone Morphogenetic Protein-2 on Osteoclast-Like Cell-Formation and Bone-Resorbing Activity. *Journal of Bone and Mineral Research* 1995;10(11):1681-1690.

(73) Fainsod A, Deissler K, Yelin R, Marom K, Epstein M, Pillemer G, et al. The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mechanisms of development* 1997;63(1):39-50.

(74) Reddi AH. BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(3):249-250.

(75) Laub M, Chatzinikolaidou M, Rumpf H, Jennissen HP. Modelling of protein-protein interactions of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) by 3D-rapid prototyping. *Materialwiss Werkst* 2002;33(12):729-737.

(76) Allendorph GP, Vale WW, Choe S. Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(20):7643-8.

(77) Wrana JL. Regulation of Smad activity. *Cell* 2000;100(2):189-192.

(78) Billings PC, Fiori JL, Bentwood JL, O'Connell MP, Jiao X, Nussbaum B, et al. Dysregulated BMP signaling and enhanced osteogenic differentiation of connective tissue progenitor cells from patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Journal of bone and mineral research* 2008;23(3):305-313.

(79) Feldman GJ, Billings PC, Patel RV, Caron RJ, Guenther C, Kingsley DM, et al. Over-expression of BMP4 and BMP5 in a child with axial skeletal malformations and heterotopic ossification: a new syndrome. *American journal of medical genetics Part A* 2007;143(7):699-706.

(80) Ruppert R, Hoffmann E, Sebald W. Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *European journal of biochemistry / FEBS* 1996;237(1):295-302.

(81) Irie A, Habuchi H, Kimata K, Sanai Y. Heparan sulfate is required for bone morphogenetic protein-7 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003;308(4):858-865.

(82) Gorski JP. Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9(2):201-23.

(83) Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* 1998;23(3):187-196.

(84) Date T, Doiguchi Y, Nobuta M, Shindo H. Bone morphogenetic protein-2 induces differentiation of multipotent C3H10T1/2 cells into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes in vivo and in vitro. *J Orthop Sci* 2004;9(5):503-508.

(85) Zhou HJ, Qian JC, Wang J, Yao WT, Liu CS, Chen JG, et al. Enhanced bioactivity of bone morphogenetic protein-2 with low dose of 2-N, 6-O-sulfated chitosan in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2009;30(9):1715-1724.

(86) HJ, Kim UJ, Vunjak-Novakovic G, Min BH, Kaplan DL. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials* 2005;26(21):4442-4452.

- (87) Li WJ, Tuli R, Huang XX, Laquerriere P, Tuan RS. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 2005;26(25):5158-5166.
- (88) Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res* 1999;13:38-48.
- (89) Suga K, Saitoh M, Fukushima S, Takahashi K, Nara H, Yasuda S, et al. Interleukin-11 induces osteoblast differentiation and acts synergistically with bone morphogenetic protein-2 in C3H10T/12 cells. *J Interf Cytok Res* 2001;21(9):695-707.
- (90) Miraoui H, Oudina K, Petite H, Tanimoto Y, Moriyama K, Marie PJ. Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Promotes Osteogenic Differentiation in Mesenchymal Cells via ERK1/2 and Protein Kinase C Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284(8):4897-4904.
- (91) Benoit DSW, Durney AR, Anseth KS. The effect of heparin-functionalized PEG hydrogels on three-dimensional human mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Biomaterials* 2007;28(1):66-77.
- (92) Azari F, Vali H, Guerquin-Kern JL, Wu TD, Croisy A, Sears SK, et al. Intracellular precipitation of hydroxyapatite mineral and implications for pathologic calcification. *J Struct Biol* 2008;162(3):468-479.
- (93) Stone N, Meister A. Function of Ascorbic Acid in Conversion of Proline to Collagen Hydroxyproline. *Nature* 1962;194:555-557.
- (94) Haasper C, Drescher M, Hesse E, Krettek C, Zeichen J, Jagodzinski M. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells (hBMSC) by cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone. *Z Orthop Unfall* 2008;146(5):636-64.
- (95) Sawyer AA, Song SJ, Susanto E, Chuan P, Lam CXF, Woodruff MA, et al. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials* 2009;30(13):2479-2488.
- (96) Jeon O, Song SJ, Kang SW, Putnam AJ, Kim BS. Enhancement of ectopic bone formation by bone morphogenetic protein-2 released from a heparin-conjugated poly(L-lactic-co-glycolic acid) scaffold. *Biomaterials* 2007;28(17):2763-2771.
- (97) Kim SE, Jeon O, Lee JB, Bae MS, Chun HJ, Moon SH, et al. Enhancement of ectopic bone formation by bone morphogenetic protein-2 delivery using heparin-conjugated PLGA nanoparticles with transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2008;15(6):771-777.
- (98) Stadlinger B, Pilling E, Huhle M, Mai R, Bierbaum S, Scharnweber D, et al. Evaluation of osseointegration of dental implants coated with collagen, chondroitin sulphate and BMP-4: an animal study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2008;37(1):54-59.
- (99) Jiang T, Kumbar SG, Nair LS, Laurencin CT. Biologically active chitosan systems for tissue engineering and regenerative medicine. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2008;8(4):354-364.

(100) Martins AM, Alves CM, Kasper FK, Mikos AG, Reis RL. Responsive and in situ-forming chitosan scaffolds for bone tissue engineering applications: an overview of the last decade. *J Mater Chem* 2010;20(9):1638-1645.

(101) Niu XF, Feng QL, Wang MB, Guo XD, Zheng QX. Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2. *Journal of Controlled Release* 2009;134(2):111-117.

(102) Leali D, Belleri M, Urbinati C, Coltrini D, Oreste P, Zoppetti G, et al. Fibroblast growth factor-2 antagonist activity and angiostatic capacity of sulfated *Escherichia coli* K5 polysaccharide derivatives. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276(41):37900-37908.

(103) Pye DA, Vives RR, Turnbull JE, Hyde P, Gallagher JT. Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273(36):22936-22942.

(104) Aviezer D, Levy E, Safran M, Svahn C, Buddecke E, Schmidt A, et al. Differential structural requirements of heparin and heparan sulfate proteoglycans that promote binding of basic fibroblast growth factor to its receptor. *The Journal of biological chemistry* 1994;269(1):114-121.

(105) Coltrini D, Rusnati M, Zoppetti G, Oreste P, Grazioli G, Naggi A, Presta M. Different effects of mucosal, bovine lung and chemically modified heparin on selected biological properties of basic fibroblast growth factor. *Biochem J* 1994;303:583-590.

(106) Jiao XY, Billings PC, O'Connell MP, Kaplan FS, Shore EM, Glaser DL. Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) modulate BMP2 osteogenic bioactivity in C2C12 cells. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282(2):1080-1086.

(107) Nimni ME. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials* 1997;18(18):1201-1225.

(108) Gospodarovicz D, Cheng J. Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J Cell Physiol* 1986;128:475-484.

(109) Street JT, McGrath M, O'Regan K, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. Thromboprophylaxis using a low molecular weight heparin delays fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 2000;(381):278-89.

(110) Nelson-Piercy C. Heparin-induced osteoporosis. *Scand J Rheumatol Suppl* 1998;107:68-71.

(111) Liekens S, Leali D, Neyts J, Esnouf R, Rusnati M, Dell'Era P, et al. Modulation of fibroblast growth factor-2 receptor binding, signaling, and mitogenic activity by heparin-mimicking polysulfonated compounds. *Molecular Pharmacology* 1999;56(1):204-213.

(112) Kunou M; Hatanaka K. Effects of heparin, dextran sulphate, and synthetic (16)- α -D-mannopyranan sulphate and acidic fibroblast growth factor on 3T3-L1 fibroblasts. *Carbohydr Polym* 1995;28(2):107-112.

(113) Hatanaka K, Ohtsuki T, Kunou M. Effects of synthetic polyanions on 3T3-L1 fibroblast proliferation stimulated by fibroblast growth factors. *Chem Lett* 1994;1407-1410.

- (114) Degat MC, Dubreucq G, Meunier A, Dahri-Correia L, Sedel L, Petite H, et al. Enhancement of the biological activity of BMP-2 by synthetic dextran derivatives. *J Biomed Mater Res A* 2009;88(1):174-183.
- (115) Bürgermeister J, Paper DH, Vogl H, Linhardt RJ, Franz G. LaPSvS1, a (1-3)- β -galactan sulfate and its effect on angiogenesis in vivo and in vitro. *Carbohydr Res* 2002;337:1459-1465.
- (116) Klemm D, Philipp B, Heinze T, Heinze U, Wagenknecht W. *Comprehensive cellulose chemistry*. 1st ed., vol. 2. Weinheim: Wiley; 1998.
- (117) Porsch B, Laga R, Horsky J, Konak C, Ulbrich K. Molecular weight and polydispersity of calf-thymus DNA: static light-scattering and size-exclusion chromatography with dual detection. *Biomacromolecules* 2009;10(11):3148-3150.
- (118) Abe Y, Mochizuki A. Hemodialysis Membrane Prepared from Cellulose/N-Methylmorpholine-N-oxide Solution. IV. *Journal of Applied Polymer Science* 2010;116(5):3040-3046.
- (119) Gulec HA, Topacli A, Topacli C, Albayrak N, Mutlu M. Modification of cellulose acetate membrane via low-pressure plasma polymerization for sugar separation applications: Part I. Membrane development and characterization. *Journal of Membrane Science* 2010;350(1-2):310-321.
- (120) Cretich M, Sadini V, Damin F, Pelliccia M, Sola L, Chiari M. Coating of nitrocellulose for colorimetric DNA microarrays. *Analytical Biochemistry* 2010;397(1):84-88.
- (121) Jiang L, Li Y, Wang X, Zhang L, Wen J, Gong M. Preparation and biological properties of a novel composite scaffold of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* 2008;74(3):680-684.
- (122) Fang B, Wan YZ, Tang TT, Gao C, Dai KR. Proliferation and Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells on Hydroxyapatite/Bacterial Cellulose Nanocomposite Scaffolds. *Tissue Engineering Part A* 2009;15(5):1091-1098.
- (123) Philipp B, Wagenknecht W. Cellulose sulphate half-ester. Synthesis, structure and properties. *Cell Chem Technol* 1983;17:443-459.
- (124) Saake B, Puls J, Wagenknecht W. Endoglucanase fragmentation of cellulose sulfates derived from different synthesis concepts. *Carbohydr Polym* 2002;48(1):7-14.
- (125) Vikartovská, A.; Bucko, M.; Mislovicová, D.; Pätoprstý, V.; Lacík, I.; Gemeiner, P. Improvement of the stability of glucose oxidase *via* encapsulation in sodium alginate-cellulose sulfate-poly(methylene-co-guanidine) capsules *Enzyme Microb Technol* 2007; 41(6-7):748-755.
- (126) Stadlbauer V, Stiegler PB, Schaffellner S, Hauser O, Halwachs G, Iberer F, Tscheliessnigg KH, Lackner C. Morphological and functional characterization of a pancreatic b-cell line microencapsulated in sodium cellulose sulfate/poly(diallyldimethylammonium chloride) Xenotransplantation 2006;13:337-343.
- (127) Van Damme L, Roshini Govinden MD, Mirembe FM, Taylor D. Lack of effectiveness of cellulose sulphate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *New Engl J Med* 2008;359:493-472.

- (128) Heinze T, Koschella A. Carboxymethyl ethers of cellulose and starch – A review. *Macromol Symp* 2005;223(1):13-29.
- (129) Schnaubelrauch M, Heinze T, Klemm D, Nehls I, Kötzt J. Investigation on synthesis and characterization of carboxy-groups containing cellulose sulfates. *Polymer Bulletin* 1991;27(2):147-153.
- (130) Huang RH, Du YM, Zheng LS, Liu H, Fan LH. A new approach to chemically modified chitosan sulfates and study of their influences on the inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growth. *React Funct Polym* 2004;59(1):41-51.
- (131) Xing RE, Liu S, Yu HH, Guo ZY, Li Z, Li PC. Preparation of high-molecular weight and high-sulfate content chitosans and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydr Polym* 2005;61(2):148-154.
- (132) Ouattara B, Simard RE, Piette G, Begin A, Holley RA. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology* 2000;62(1-2):139-148.
- (133) Muzzarelli RAA, Muzzarelli C. Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences. *Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use* 2005;186:151-209.
- (134) Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res-Dord* 1998;15(9):1326-1331.
- (135) Hirano S, Tanaka Y, Hasegawa M, Tobetto K, Nishioka A. Effect of Sulfated Derivatives of Chitosan on Some Blood Coagulant Factors. *Carbohydrate Research* 1985;137,205-215.
- (136) Nishimura S, Kai H, Shinada K, Yoshida T, Tokura S, Kurita K, et al. Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: specific anti-HIV-1 activity of novel chitin sulfates. *Carbohydrate Research* 1998;306(3):427-433.
- (137) Xing RE, Yu HH, Liu S, Zhang WW, Zhang QB, Li Z, et al. Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates in vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005;13(4):1387-1392.
- (138) Wang X, Yan Y, Lin F, Xiong Z, Wu R, Zhang R, et al. Preparation and characterization of a collagen/chitosan/heparin matrix for an implantable bioartificial liver. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 2005;16(9):1063-1080.
- (139) Niu XF, Feng QL, Wang MB, Guo XD, Zheng QX. Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2. *Journal of Controlled Release* 2009;134(2):111-117.
- (140) Ho YC, Wu SJ, Mi FL, Chiu YL, Yu SH, Panda N, et al. Thiol-modified chitosan sulfate nanoparticles for protection and release of basic fibroblast growth factor. *Bioconjugate Chem* 2010;21(1):28-38.
- (141) Rabenstein DL. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep* 2002;19(3):312-331.

- (142) Nehls I, Wagenknecht W, Philipp B, Stscherbina D. Characterization of cellulose and cellulose derivatives in solution by high resolution ^{13}C -NMR spectroscopy. *Prog Polym Sci* 1994;19:29-78.
- (143) T. Saito a, Y. Okita a, T.T. Nge b, J. Sugiyama b, A. Isogai. TEMPO-mediated oxidation of native cellulose: Microscopic analysis of fibrous fractions in the oxidized products. *Carbohydrate Polym* 2006;65:435–440.
- (144) Kunou M, Hatanaka K. The effect of growth factors on the cytotoxicity of sulphated polysaccharides. *Carbohyd Polym* 1997 Dec 31;34(4):335-342.
- (145) Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci* 2005;88(2):412-419.
- (146) Ghosh TK, Eis PS, Mullaney JM, Ebert CL, Gill DL. Competitive, reversible, and potent antagonism of inositol 1,4,5- trisphosphate-activated calcium release by heparin. *Journal of Biological Chemistry* 1988; 263:11075-11079.
- (147) Kassem M. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells* 2004;6(4):369-374.
- (148) Kim H, Kim HW, Suh H. Sustained release of ascorbate-2-phosphate and dexamethasone from porous PLGA scaffolds for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2003;24(25):4671-4679.
- (149) Neuss S, Stainforth R, Salber J, Schenck P, Bovi M, Knuchel R, et al. Long-Term Survival and Bipotent Terminal Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells (hMSC) in Combination With a Commercially Available Three-Dimensional Collagen Scaffold. *Cell Transplant* 2008;17(8):977-986.
- (150) Puetzer JL, Petite JN, Lobo EG. Comparative Review of Growth Factors for Induction of Three-Dimensional In Vitro Chondrogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from Bone Marrow and Adipose Tissue. *Tissue Eng Part B-Re* 2010;16(4):435-444.
- (151) Crisostomo PR, Wang M, Wairiuko GM, Morrell ED, Terrell AM, Seshadri P, et al. High passage number of stem cells adversely affects stem cell activation and myocardial protection. *Shock* 2006;26(6):575-580.
- (152) Zhao B, Katagiri T, Toyoda H, Takada T, Koike T, Takaoka K, R. Heparin enhances BMP activity by maintaining high levels of nuclear phosphorylated Smad1/5/8. *New Frontiers in Regenerative Medicine* 2007, Part I, 37-42.
- (153) Wagenknecht W, Nehls I, Phillip B. Studies on the regioselectivity of cellulose sulfation in an N_2O_4 -N,N-dimethylformamide-cellulose system. *Carbohydrate Research* 1993;240:245-252.
- (154) Saito T, Isogai A. TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. The effect of oxidation conditions on chemical and crystal structures of the water-insoluble fractions. *Biomacromolecules* 2004;5(5):1983-1989.
- (155) Stigsson V, Kloow G, Germgard U. The influence of the solvent system used during manufacturing of CMC. *Cellulose* 2006;13(6):705-712.

- (156) Baumann H, Richter A, Klemm D, Faust V. Concepts for preparation of novel regioselective modified cellulose derivatives sulfated, aminated, carboxylated and acetylated for hemocompatible ultrathin coatings on biomaterials. *Macromol Chem Phys* 2000;201(15):1950-1962.
- (157) Hasegawa M, Isogai A, Onabe F, Usuda M. Dissolving States of Cellulose and Chitosan in Trifluoroacetic Acid. *J Appl Polym* 1992;45(10):1857–1863.
- (158) Saito T, Isogai A. Ion-exchange behavior of carboxylate groups in fibrous cellulose oxidized by the TEMPO-mediated system. *Carbohydr Polym* 2005;61(2):183-190.
- (159) Pye DA, Vives RR, Hyde P, Gallagher JT. Regulation of FGF-1 mitogenic activity by heparan sulfate oligosaccharides is dependent on specific structural features: differential requirements for the modulation of FGF-1 and FGF-2. *Glycobiology* 2000;10(11):1183-1192.
- (160) Loo BM, Kreuger J, Jalkanen M, Lindahl U, Salmivirta M. Binding of heparin/heparan sulfate to fibroblast growth factor receptor 4. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276(20):16868-16876.
- (161) Stigsson V, Kloow G, Germgard U. The influence of the solvent system used during manufacturing of CMC. *Cellulose* 2006;13(6):705-712.
- (162) Aviezer D, Levy E, Safran M, Svahn C, Buddecke E, Schmidt A, et al. Differential Structural Requirements of Heparin and Heparan-Sulfate Proteoglycans That Promote Binding of Basic Fibroblast Growth-Factor to Its Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269(1):114-121.
- (163) Reilly CF, Kindyn MS, Brown KE, Rosenberg RD, Sonensheinn GE. Heparin prevents vascular smooth muscle cell progression through the G1 phase of the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry* 1989;12(25):6990-6995.
- (164) Liu FM, Jia LW, Thompson-Baine AM, Puglise JM, ter Beest MBA, Zegers MMP. Cadherins and Pak1 Control Contact Inhibition of Proliferation by Pak1-beta PIX-GIT Complex-Dependent Regulation of Cell-Matrix Signaling. *Molecular and Cellular Biology* 2010;30(8):1971-1983.
- (165) Faham S, Hileman RE, Fromm JR, Linhardt RJ, Rees DC. Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science* 1996;271(5252):1116-1120.
- (166) Carroll LA, Koch RJ. Heparin stimulates production of bFGF and TGF-beta 1 by human normal, keloid, and fetal dermal fibroblasts. *Med Sci Monit* 2003;9(3):BR97-108.
- (167) SkaletzRorowski A, Schmidt A, Breithardt G, Buddecke E. Heparin-induced overexpression of basic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor receptor, and cell-associated proteoglycan sulfate in cultured coronary smooth muscle cells. *Arterioscl Throm Vas* 1996;16(8):1063-1069.
- (168) Reilly CF, Fritze LMS, Rosenberg RD. Heparin Inhibition of Smooth-Muscle Cell-Proliferation - a Cellular Site of Action. *Journal of Cellular Physiology* 1986;129(1):11-19.
- (169) Vannucchi S, Pasquali F, Fiorelli G, Bianchini P, Ruggiero M. Effect of heparin on proliferation and signalling in BC3H-1 muscle cells. Evidence for specific binding sites. *FEBS Lett* 1990;263(1):137-141.

- (170) Vannucchi S, Pasquali F, Chiarugi V, Ruggiero M. Internalization and metabolism of endogenous heparin by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;140(1):294-301.
- (171) Schaffrath D, Stuhlsatz HW, Greiling H. Interactions of glycosaminoglycans with DNA and RNA synthesizing enzymes in vitro. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1976;357(4):499-508.
- (172) Gadgil H, Jarrett HW. Heparin elution of transcription factors from DNA-Sepharose columns. *J Chromatogr A* 1999;848(1-2):131-8.
- (173) Kitamura M, Maruyama N, Mitarai T, Nagasawa R, Yokoo T, Sakai O. Heparin selectively inhibits gene expression of matrix metalloproteinase transin in cultured mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203(2):1333-1338.
- (174) Miralem T, Wang A, Whiteside CI, Templeton DM. Heparin inhibits mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent c-fos induction in mesangial cells. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271(29):17100-17106.
- (175) Reilly CF, Fritze LM, Rosenberg RD. Heparin inhibition of smooth muscle cell proliferation: a cellular site of action. *J Cell Physiol* 1986;129(1):11-19.
- (176) Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as Modulators of Growth-Factor Activities. *Cell* 1991;64(5):867-869.
- (177) Sakashita S, Engvall E, Ruoslahti E. Basement-Membrane Glycoprotein Laminin Binds to Heparin. *Febs Letters* 1980;116(2):243-246.
- (178) Yamada KM, Kennedy DW, Kimata K, Pratt RM. Characterization of fibronectin interactions with glycosaminoglycans and identification of active proteolytic fragments. *The Journal of biological chemistry* 1980;255(13):6055-6063.
- (179) Lawler JW, Slayter HS. The release of heparin binding peptides from platelet thrombospondin by proteolytic action of thrombin, plasmin and trypsin. *Thromb Res* 1981;22(3):267-279.
- (180) Keller KM, Keller JM, Kuhn K. The C-Terminus of Type-I Collagen Is a Major Binding-Site for Heparin. *Biochim Biophys Acta* 1986;882(1):1-5.
- (181) Tsilibary EC, Reger LA, Vogel AM, Koliakos GG, Anderson SS, Charonis AS, et al. Identification of a Multifunctional, Cell-Binding Peptide Sequence from the A1(Nc1) of Type-Iv Collagen. *Journal of Cell Biology* 1990;111(4):1583-1591.
- (182) Sanantonio JD, Lander AD, Wright TC, Karnovsky MJ. Heparin Inhibits the Attachment and Growth of Balb/C-3t3 Fibroblasts on Collagen Substrata. *Journal of Cellular Physiology* 1992;150(1):8-16.
- (183) Diefenderfer DL, Osyczka AM, Garino JP, Leboy PS. Regulation of BMP-induced transcription in cultured human bone marrow stromal cells. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 2003;85-A(3):19-28.
- (184) Hausser HJ, Brenner RE. Low doses and high doses of heparin have different effects on osteoblast-like Saos-2 cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004;91(5):1062-1073.

- (185) Franklin NM, Stauber JL, Apte SC, Lim RP. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environ Toxicol Chem* 2002;21(4):742-751.
- (186) Banfalvi G, Ujvarosi K, Trencsenyi G, Somogyi C, Nagy G, Basnakian A. Cell culture density dependent toxicity and chromatin changes upon cadmium treatment in murine pre-B-cells. *Apoptosis* 2007;12(7):1219-1228.
- (187) Fujita R, Yoshida A, Mizuno K, Ueda H. Cell density-dependent death mode switch of cultured cortical neurons under serum-free starvation stress. *Cell Mol Neurobiol* 2001;21(4):317-324.
- (188) Brunner T. Wenn Zellen sterben. Unipress der Universität Bern Oktober 2003. Heft 118.
- (189) Muir JM, Andrew M, Hirsh J, Weitz JI, Young E, Deschamps P, et al. Histomorphometric analysis of the effects of standard heparin on trabecular bone in vivo. *Blood* 1996;88(4):1314-1320.
- (190) Selvarnurugan N, Kwok S, Vasilov A, Jefcoat SC, Partridge NC. Effects of BMP-2 and pulsed electromagnetic field (PEMF) on rat primary osteoblastic cell proliferation and gene expression. *Journal of Orthopaedic Research* 2007;25(9):1213-1220.
- (191) Mabie PC, Mehler MF, Kessler JA. Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. *Journal of Neuroscience* 1999;19(16):7077-7088.
- (192) Kendall SE, Battelli C, Irwin S, Mitchell JG, Glackin CA, Verdi JM. NRAGE mediates p38 activation and neural progenitor apoptosis via the bone morphogenetic protein signaling cascade. *Molecular and Cellular Biology* 2005;25(17):7711-7724.
- (193) Salehi AH, Roux PP, Kubu CJ, Zeindler C, Bhakar A, Tannis LL, et al. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* 2000;27(2):279-288.
- (194) Groth T, Wagenknecht W. Anticoagulant potential of regioselective derivatized cellulose. *Biomaterials* 2001;22(20):2719-2729.
- (195) Kirsch T, Sebald W, Dreyer MK. Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol* 2000;7(6):492-496.
- (196) Kanzaki S, Takahashi T, Kanno T, Ariyoshi W, Shinmyozu K, Tujisawa T, et al. Heparin inhibits BMP-2 osteogenic bioactivity by binding to both BMP-2 and BMP receptor. *Journal of Cellular Physiology* 2008;216(3):844-850.
- (197) Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, et al. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry* 2008;283(43):29119-29125.
- (198) Dal-Pra S, Furthauer M, Van-Celst J, Thisse B, Thisse C. Noggin1 and Follistatin-like2 function redundantly to Chordin to antagonize BMP activity. *Developmental biology* 2006;298(2):514-526.

- (199) Wills A, Harland RM, Khokha MK. Twisted gastrulation is required for forebrain specification and cooperates with Chordin to inhibit BMP signaling during X. tropicalis gastrulation. *Developmental Biology* 2006;289(1):166-178.
- (200) Zimmerman LB, DeJesusEscobar JM, Harland RM. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 1996;86(4):599-606.
- (201) Zhou YQ, Liu HX, Mistretta CM. Bone morphogenetic proteins and noggin: Inhibiting and inducing fungiform taste papilla development. *Developmental Biology* 2006;297(1):198-213.
- (202) Zhu W, Kim J, Cheng C, Rawlins BA, Boachie-Adjei O, Crystal RG, et al. Noggin regulation of bone morphogenetic protein (BMP) 2/7 heterodimer activity in vitro. *Bone* 2006;39(1):61-71.
- (203) Nakamura Y, Wakitani S, Nakayama J, Wakabayashi S, Horiuchi H, Takaoka K. Temporal and spatial expression profiles of BMP receptors and Noggin during BMP-2-induced ectopic bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research* 2003;18(10):1854-1862.
- (204) Paine-Saunders S, Viviano BL, Economides AN, Saunders S. Heparan sulfate proteoglycans retain Noggin at the cell surface - A potential mechanism for shaping bone morphogenetic protein gradients. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277(3):2089-2096.
- (205) Wilsie LC, Chanchani S, Navaratna D, Orlando RA. Cell surface heparan sulfate proteoglycans contribute to intracellular lipid accumulation in adipocytes. *Lipids Health Dis* 2005;4(2):1-15.
- (206) Miller SA, Brown AJ, Farach-Carson MC, Kim-Safran CB. HIP/RPL29 down-regulation accompanies terminal chondrocyte differentiation. *Differentiation* 2003;71(6):322-336.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Groth für die Vergabe der sehr interessanten Thematik, seine wissenschaftliche Betreuung, und seine stete Bereitschaft für offene, kritische und vor allem motivierende Gespräche, was das Entstehen der Dissertation in erster Linie ermöglicht hat und darüber hinaus wesentlich zum erfolgreichen Abschluss beigetragen hat.

Prof. Dr. rer. nat. habil. Steffen Fischer danke ich herzlich für die Zusammenarbeit im Rahmen des DFG-Projektes, zu dessen Gelingen er wesentlich beigetragen hat. Ohne die Zusammenarbeit wäre das Entstehen der Dissertation nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Kai Zhang für die Synthese und Bereitstellung des sehr umfangreichen Probenmaterials, die Zusammenführung aller chemischen Daten sowie die hervorragende Kooperation im Projektverlauf und bei der Erstellung von Publikationen und Postern.

Frau Dr. rer. nat. Erica Brendler (Universität Freiberg) danke ich für die unzähligen NMR Messungen und Frau Dr. rer. nat. Kathrin Gebauer (TU) für die Durchführung der umfangreichen Elementar Analysen. Auch Frau Dr. rer. nat. Judith Kuntsche (MLU) möchte ich für die Durchführung von Arbeiten zur Molmassenbestimmung und die nette Zusammenarbeit danken.

Besonderen Dank schulde ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biomedizinische Materialien für das überaus freundliche Arbeitsklima und die stete Bereitschaft zur Kooperation oder Unterstützung meiner Arbeiten. Ganz besonderer Dank gilt dabei Frau MSc. Neha Aggarwal für die Durchführung von Arbeiten der Toxizitätsbestimmung und Proliferation sowie Frau Marlies Porobin für die Unterstützung bei Zellkultur-Versuchen mit Chitosanen.

Herrn MSc. Deepak Guduru danke ich besonders für die Durchführung von Arbeiten im chemischen Labor, für seine Unterstützung bei Arbeiten am Computer und seine stets herzliche und freundliche Art. Besonders danken möchte ich auch Dr. rer. nat. Jürgen Vogel für viele gute Ratschläge in allen Dingen des wissenschaftlichen Alltags und besonders für ergiebige Diskussionen über chemische Fragestellungen.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung während der ganzen Zeit meiner Promotion und die aufmunternden Worte während der Fertigstellung der Arbeit.

Publikationen

Schriftliche Publikationen

Peschel D, Zhang K, Aggarwal N, Brendler E, Fischer S, Groth T.: Synthesis of novel cellulose derivatives and investigation of their mitogenic activity in the presence and absence of FGF2.

Acta Biomaterialia **6** (2010) 2116 – 2125.

Peschel D, Zhang K, Fischer S, Groth T.: Modulation of osteogenic activity of bone morphogenic protein 2 by cellulose and chitosan derivatives.

Acta Biomaterialia **8** (2012) 183–193

Zhang K, Peschel D, Brendler E, Groth T, Fischer S.: Synthesis and Bioactivity of Cellulose Derivatives.

Macromolecular Symposia **280** (2009) 28–35.

Zhang K, Peschel D, Klinger T, Gebauer K, Groth T, Fischer S.:

Synthesis of carboxyl cellulose sulfate exhibiting biological activity with various contents of regioselectively introduced sulfate and carboxyl groups.

Carbohydrate Polymers **82** (2010) 92–99.

Zhang K, Peschel D, Helm J, Groth T, Fischer S.: FT Raman investigation of novel chitosan sulfates exhibiting osteogenic capacity.

Carbohydrate Polymers **83** (2011) 60-65.

Poster

Peschel D, Zhang K, Brendler E, Fischer S, Groth T. Synthesis, characterization and binding of sulfated compounds to growth factors used in tissue regeneration and differentiation.

13. Internationale Fachtagung Polymerwerkstoffe, Halle, 24.–26. September 2008.

Peschel D, Zhang K, Brendler E, Fischer S, Groth T. Development of sulfated and carboxylated cellulose derivatives for binding of growth factors.

Max Bergmann Symposium, Dresden, 04.–06. November 2008.

Peschel D, Zhang K, Aggarwal, Fischer S, Groth T. Biochemical and biological characterization of derivatised celluloses for tissue culture and controlled release applications.

Controlled release society, Halle, 19.-20. März 2009.

Peschel D, Zhang K, Aggarwal, Fischer S, Groth T. Effects of derivatised celluloses on cell proliferation.

3. Internationales Symposium "Interface Biology of Implants",
Rostock, 13.-15. Mai 2009.

Zhang K, Fischer S, Peschel D, Groth T. Synthesis of carboxyl cellulose sulfates.

103rd Zellcheming Meeting - 50th Cellulose Symposium, Wiesbaden, 24.-26. Juni 2008.

Zhang K, Peschel D, Fischer S, Groth T. Synthesis of chitosan sulfates with potentiating effects on the activity of BMP-2.

14. Internationale Fachtagung Polymerwerkstoffe, 15.-17. September 2010, Halle.

Mündliche Präsentationen

Peschel D, Zhang K, Fischer S, Groth T. Effekte der Kooperation substituierter Cellulosen mit Wachstumsfaktoren auf Zellkulturen.

Mitteldeutsches Technologietreffen, Leipzig, 25. November 2009.

Peschel D, Zhang K, Aggarwal N, Fischer S, Groth T. Cooperation of derivatised polysaccharides and growths factors and their effects on the proliferation and differentiation of different cells.

XXXVII. Congress European Society for Artificial Organs, Skopje, Mazedonien, 8-11. September 2010.

Zhang K, Peschel D, Brendler B, Groth T, Fischer S. Synthesis, characterisation and properties of carboxyl cellulose sulfate.

105th Zellcheming Meeting - 52th Cellulose Symposium, Wiesbaden, 28. November – 5. Dezember 2010.

Groth T, Niepel T, Kirchhof K, Liu ZM, Gu Q, Peschel D, Zhang K, Fischer S. Polysaccharide-coated surfaces for control of cellular behavior.

29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Mikrozirkulation und Hämorheologie, Berlin, 17.-18. September 2010.

Zhang K, Fischer S, Peschel D, Weltrowski A, Groth T. Synthesis and characterisation of biologically active chitosan sulfate.

241st ACS National Meeting & Exposition, Anaheim, USA, 27.-31. März 2011.

Erklärung

Die Arbeit entstand in einem DFG-Projekt (GR 1290/7-1) in Kooperation zwischen der Arbeitsgruppe Biomedizinische Materialien der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und dem Institut für Holz- und Pflanzenchemie der Technischen Universität Dresden. Die chemischen und analytischen Arbeiten wurden an der Technischen Universität Dresden und der Universität Freiberg durchgeführt. Alle Arbeiten des biologisch/biochemischen Teils wurden an der Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

Halle, den 27.01.2012

Dieter Peschel