

Biomarker in Zellkultur

Werden Zellkultur Proben in Testkits verwendet die für die Bestimmung von Biomarkern in Serum und Plasma validiert wurden sind verschiedene Aspekte zu berücksichtigen.

Das für Serum / Plasma validierte Testsystem kann durch das verwendete Probenmaterial aus Zellkultur beeinflusst werden.

Um zu testen, ob das Assay-System durch Kreuzreaktionen oder Störungen durch die verwendeten Komponenten beeinflusst wird, empfehlen wir sowohl das Medium als auch alle weiteren Substanzen im Test zu bestimmen. Insbesondere FCS kann mit den Antikörpern im Test kreuzreagieren oder die Medien können die Antikörperreaktion beeinflussen.

Empfohlen wird ein Kulturmedium mit folgenden Komponenten:

- DMEM oder äquivalentes handelsübliches Medium
- Fetales Rinder- oder Kalbsserum oder Serumersatz (FCS freies Medium)
- L-Glutamin oder Ascorbat
- Antibiotikum

Um den Einfluss von FCS auszuschließen wird empfohlen, falls möglich, ein FCS freies Medium zu verwenden.

Testen von Medium, Mediumzusätzen und weiteren verwendeten Puffern

- **Puffer:** z.B. auch Elutionspuffer, die verwendet wurden um eine Substanz aus einem Gel oder Gewebe zu eluieren
- **Matrix:** z.B. serumfreies Medium, Serumersatz
- **Mediumkombination** testen:
 1. Medium
 2. Medium inklusive aller Zusätze jedoch ohne FCS bzw. alternativer Matrix
 3. Medium inklusive aller Zusätze mit FCS bzw. alternativer Matrix (Komplett- Medium)
 4. nur FCS oder entsprechend alternative Matrix
- **Wiederfindung / Recovery:**
Dem Komplett-Medium Standardmaterial/Substanz zugeben (spiken), um die Wiederfindung zu bestimmen;
z.B. im Verhältnis 1:5, 20% vom höchstem Kit Standard und 80% Komplett-Medium im Assay testen
- **Linearität:**
das gespikte/aufgestockte Medium in Verdünnungen bestimmen um die Linearität zu prüfen:
 - a) mit Verdünnungspuffer oder Nullstandard aus dem Kit 1:2 und 1:4
 - b) mit Medium 1:2 und 1:4
- **Standardkurve (optional):**
Stock Standard oder den höchsten Standard aus dem Kit mit Komplett-Medium verdünnen und im Testkit bestimmen

Knochenmarker in Zellkultur

Assay	Analyt	Anmerkungen zum Testverfahren
BAP	Knochenspezifische alkalische Phosphatase	Die alkalische Phosphatase ist membrangebunden und kann in Zellysate gemessen werden.
Osteocalcin	Intaktes Osteocalcin	Zellen können in serumhaltigem Medium gezüchtet werden, Osteocalcin muss jedoch aus serumfreiem Gewebekulturüberstand entnommen werden.
CICP / PICP	C-terminales Propeptid des Typ-I-Kollagens (CICP)	Zellen können in serumhaltigem Medium gezüchtet werden, die Parameter müssen jedoch aus serumfreiem Gewebekulturüberstand entnommen werden.
DPD	Deoxypyridinolin-Crosslinks	Knochenkollagenspezifisch – direkter Nachweis der Knochenresorption. Zellen können in serumhaltigem Medium gezüchtet werden, die Parameter müssen jedoch aus serumfreiem Gewebekulturüberstand gemessen werden.
PYD	Pyridinolin-Crosslinks	
NTX	alpha-2 (I) N-Telopeptide	
Helical Peptide		Ergebnisse weisen darauf hin, dass der ELISA zur Bestimmung des helikalen Peptids am besten für in vitro-Analysen geeignet ist. Diese Testmethode ist besonders vorteilhaft, da sie geringe Probenmengen benötigt und die Kurve einen großen Bereich der Probenkonzentrationen abdeckt (z.B. das 30fache des CTX-beta-in vitro-Assays). Die Hintergrundkonzentrationen durch das Medium sind sehr gering.
TRAP5b	Tartratresistente saure Phosphatase 5b	Nachweis der Osteoklastenaktivität.

Messung von BAP und Osteocalcin in Zellkulturen

Zusätzlich sind 50 nM Vitamin D3 notwendig, um messbare Mengen von Osteocalcin zu produzieren. Die Zellen können in einem serumhaltigen Medium gezüchtet werden. Osteocalcin muss jedoch aus serumfreiem Gewebekulturüberstand entnommen werden, da der Antikörper dieses Analyt auch im Serum detektiert.

Die alkalische Phosphatase der Knochen ist membrangebunden und muss in Zellysate gemessen werden. Ionen Chelatoren, wie EDTA sollten nicht in Medien benutzt werden, da diese Chelatoren das BAP Enzym inhibieren.

Nach der Inkubation sollten die Zellschichten zweimal mit Salzlösung gewaschen und mit Hilfe eines Rührstabes in die TMN Pufferlösung (20 mM Tris-HCl, pH 7.4; 2 mM MgCl₂; 150 mM NaCl) abgeschabt werden. Die Anzahl der Zellen wird durch die Coulter Zählmaschine (Model F) bestimmt, bevor die Zellen durch Zugabe von Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1 % aufgelöst werden. Die Proben werden bei 70.000g während 60 min. zentrifugiert und die Aliquots der Überstände werden auf alkalische Phosphatase Aktivitäten untersucht.

Schaf- und Humanzellen eignen sich sehr gut für diesen Zweck.

Messung von C1CP / PICP in Zellkultur

Der Assay ist geeignet für die Messung von Gewebekulturüberstand von Zellen, die Typ-I-Kollagen produzieren. Der Kollagenproduktionsstand von auf fibroblasten und Knochenzellen kann mit dem Metra® C1CP Test bestimmt werden.

Es wird empfohlen, dass der Überstand von diesen Kulturen serumfreies Medium enthält. Wenn im Medium bovines Serum vorkommt, kann es bovines C1CP enthalten, welches mit dem Antikörper im Kit kreuzreagiert und ein fälschlich erhöhtes Signal bewirkt.

In einer konfluierenden Zellkultur, die Kollagen auf einem optimalen Niveau produziert, beträgt die Menge an C1CP im Überstand etwa 20 – 50 ng/ml oder sie liegt leicht unter der C1CP-Konzentration, die in einer normalen um serumprobe erwartet wird. Gewebekulturüberstand genau wie eine gewöhnliche Serumprobe 1:12 verdünnen und den Wert entsprechend der Verdünnung zu korrigieren. Wenn die C1CP-Konzentration niedrig ist und die 1:12-Verdünnung der Probe dazu führt, dass das Ergebnis unterhalb der unteren Nachweisgrenze liegt, kann möglicherweise eine 1:6 Verdünnung vorgenommen werden.

Referenzen für BAP, PICP, OSTEOCALCIN in Zellkultur

Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, Ignatius A, Claes L (2000) Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and C1CP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity. *J Biomech* 33, 45-51.

Martínez ME, Medina S, Del Campo MT, et al. (1998) Effect of polyethylene on osteocalcin, alkaline phosphatase and procollagen secretion by human osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 62, 453-456.

Sell S, Gaissmaier C, Fritz J et al. (1998) Different behavior of human osteoblast-like cells isolated from normal and heterotopic bone in vitro. *Calcif Tissue Int* 62, 51-59.

Siggelkow H, Niedhart C, Kurre W, et al. (1998) In vitro differentiation potential of a new human osteosarcoma cell line (HOS 58). *Differentiation* 63, 81-91.

Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, et al. (1999) Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 75, 22-35.