

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Untersuchung des Einflusses der mineralischen Komponente des Knochens
auf die Genexpression osteoblastärer Zellen**

Johannes Wischmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Marcus R. Makowski

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe
2. apl. Prof. Dr. Klaus Wörtler

Die Dissertation wurde am 18.08.2020 bei der Technischen Universität
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.02.2021 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildungsverzeichnis | 3 |
| Tabellenverzeichnis..... | 4 |
| Abkürzungsverzeichnis | 5 |
| Zusammenfassung | 6 |
| Publikation | 8 |
| 1 Einleitung..... | 8 |
| 1.1 Der menschliche Knochen..... | 8 |
| 1.1.1 Aufbau des Knochengewebes | 10 |
| 1.1.2 Desmale Ossifikation | 11 |
| 1.1.3 Chondrale Ossifikation..... | 12 |
| 1.1.4 Knochenumbau (Bone Remodeling)..... | 13 |
| 1.2 Mechanismen der Osteoblasten Migration | 15 |
| 1.2.1 Chemotaxis..... | 16 |
| 1.2.2 Oberflächenkomposition | 18 |
| 1.2.3 Mechanische und elektrische Stimuli..... | 19 |
| 1.3 In-vitro Modelle..... | 20 |
| 2 Klinische Relevanz | 21 |
| 3 Hypothese | 23 |
| 4 Aufgabenstellungen der Arbeit | 24 |
| 4.1 1. Entwicklung eines neuen Oberflächenmodells..... | 24 |
| 4.2 2. Validierung des neuen Oberflächenmodells | 24 |
| 4.3 3. Anwendung des neuen Oberflächenmodells | 25 |
| 5 Material | 26 |
| 5.1 Zellkultur | 26 |
| 5.2 RNA-Extraktion..... | 27 |
| 5.3 PCR und RT-Reaktion..... | 27 |
| 5.4 Primer | 27 |
| 5.5 Wachstumsfaktoren | 28 |
| 5.6 Laborgeräte und Werkzeuge..... | 28 |
| 6 Methoden | 30 |
| 6.1 Zellreihen..... | 30 |
| 6.2 Subkultivierungsprotokolle | 31 |
| 6.3 Zellzählung | 32 |
| 6.4 Präparation..... | 33 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 6.5 | Demineralisierung | 33 |
| 6.6 | Sterilisierung..... | 34 |
| 6.7 | Adhäsions-Assay | 34 |
| 6.8 | RNA Extraktion..... | 35 |
| 6.9 | RNA-Transkription..... | 36 |
| 6.10 | QRTPCR..... | 37 |
| 6.11 | Microarray | 41 |
| 6.12 | Knochendichtemessung | 42 |
| 6.13 | Fluoreszenz-Mikroskopie | 43 |
| 6.14 | Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)..... | 44 |
| 6.15 | Methodischer Aufbau des entwickelten Oberflächenmodells | 50 |
| 6.16 | Migrations-Assay..... | 52 |
| 7 | Ergebnisse | 59 |
| 7.1 | Entwicklung und Validierung des neuen Oberflächenmodells | 59 |
| 7.1.1 | Knochendichtemessung..... | 59 |
| 7.1.2 | Fluoreszenz-Mikroskopie..... | 60 |
| 7.2 | Anwendung des neuen Oberflächenmodells | 62 |
| 7.2.1 | Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)..... | 62 |
| 7.2.2 | QRTPCR | 72 |
| 8 | Weiterführende Ergebnisse | 83 |
| 8.1 | Migrations-Assay..... | 83 |
| 9 | Diskussion..... | 93 |
| 9.1 | Stärken, Schwächen und Potential des neuen Oberflächenmodells | 93 |
| 9.2 | Charakteristika der identifizierten Gene der Osteoblasten-Migration..... | 96 |
| 9.3 | Schlussfolgerung | 99 |
| 9.4 | Die Kombination von Oberflächenmodell und Migrations-Assay | 102 |
| 9.5 | Stärken und Limitationen der Arbeit | 104 |
| 10 | Ausblick | 105 |
| 11 | Danksagungen | 108 |
| 12 | Literaturverzeichnis..... | 109 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildung 1: Substantia compacta und spongiosa..... | 11 |
| Abbildung 2: Chondrale Ossifikation | 13 |
| Abbildung 3: Mikroskop-Aufnahmen von MG-63 Zellen und humanen Osteoblasten..... | 31 |
| Abbildung 4: Neubauer-Zählkammer | 32 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer (Seitansicht)..... | 32 |
| Abbildung 6: Fotos der EXAKT 300 CL Bandsäge | 33 |
| Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ablaufs der reversen Transkription..... | 37 |
| Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Ergebnisses einer QRT-PCR | 40 |
| Abbildung 9: Exemplarische Darstellung eines Microarray-Rohdatensatzes..... | 42 |
| Abbildung 10: Osteodensitometrie..... | 43 |
| Abbildung 11: Exemplarischer Ausschnitt der komprimierten Microarray-Daten..... | 45 |
| Abbildung 12: GSEA-Parameter..... | 47 |
| Abbildung 13: Methodischer Aufbau des neu entwickelten Oberflächenmodells..... | 51 |
| Abbildung 14: μ -slide Chemotaxis | 53 |
| Abbildung 15: Aufbau der μ -Slide Chemotaxis..... | 53 |
| Abbildung 16: Chemotaktischer Gradient in der μ -slide Chemotaxis | 54 |
| Abbildung 17: MG-63 Zellen während der Timelapse-Aufnahme | 55 |
| Abbildung 18: Errechnete Parameter im Chemotaxis & Migration Tool | 56 |
| Abbildung 19: Directness..... | 57 |
| Abbildung 20: Rayleigh-Test..... | 58 |
| Abbildung 21: Ergebnis der Knochendichtemessung | 60 |
| Abbildung 22: Fluoreszenz-markierte MG-63 Zellen I | 61 |
| Abbildung 23: Fluoreszenz-markierte MG-63 Zellen II | 62 |
| Abbildung 24: Allgemeine GSEA Analyse-Parameter | 63 |
| Abbildung 25: Verhältnis der NES zu den statistischen Signifikanzen | 64 |
| Abbildung 26: Enrichment plots | 66 |
| Abbildung 27: ADAMTS4..... | 75 |
| Abbildung 28: COL1A1 | 76 |
| Abbildung 29: HAS2..... | 77 |
| Abbildung 30: HMCN1..... | 78 |
| Abbildung 31: ITGA2 | 79 |
| Abbildung 32: MMP1 | 80 |
| Abbildung 33: NID2..... | 81 |
| Abbildung 34: VCAN | 82 |
| Abbildung 35: Ergebnisse der Migrations-Assays..... | 85 |
| Abbildung 36: Signifikante chemotaktische Effekte..... | 92 |
| Abbildung 37: Relevante untersuchte Gene | 101 |
| Abbildung 38: Ausblick | 107 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Verwendete Materialien in der Zellkultur..... | 26 |
| Tabelle 2: Verwendete Materialien für die RNA-Extraktion..... | 27 |
| Tabelle 3: Verwendete Materialien für die PCR und die RT-Reaktion..... | 27 |
| Tabelle 4: Verwendete Primer..... | 27 |
| Tabelle 5: Verwendete Wachstumsfaktoren..... | 28 |
| Tabelle 6: Verwendete Laborgeräte und Werkzeuge..... | 28 |
| Tabelle 7: Verwendete Zelllinien und Medien..... | 30 |
| Tabelle 8: Mittels QRT-PCR amplifizierte Gene mit Namen und Gen-Symbole..... | 37 |
| Tabelle 9: QRT-PCR Temperatur-Zyklus..... | 39 |
| Tabelle 10: Gene Set Parameter (GSEA)..... | 48 |
| Tabelle 11: Parameter für jedes Gen innerhalb eines Gene Sets..... | 50 |
| Tabelle 12: Analysierte Zelllinien im Migrations-Assay..... | 55 |
| Tabelle 13: Ergebnisse der Knochendichtemessung..... | 59 |
| Tabelle 14: Allgemeine GSEA-Analyse-Parameter..... | 62 |
| Tabelle 15: Top 5 hochregulierte Gene Sets im demineralisierten Phänotyp..... | 64 |
| Tabelle 16: Top 5 hochregulierte Gene Sets im mineralisierten Phänotyp..... | 65 |
| Tabelle 17: Gene Set GO_EXTRACELLULAR_MATRIX_COMPONENT..... | 67 |
| Tabelle 18: Gene Set GO_PROTEIN_COMPLEX_INVOLVED_IN_CELL_ADHESION .. | 69 |
| Tabelle 19: Gene Set GO_EXTRACELLULAR_STRUCTURE_ORGANIZATION..... | 69 |
| Tabelle 20: Selektiv amplifizierte Gene und deren Funktion in der Knochenphysiologie..... | 73 |
| Tabelle 21: Ergebnisse Migrations-Assay, HT1080, Positivkontrolle..... | 86 |
| Tabelle 22: Ergebnisse Migrations-Assay, MG-63, Negativkontrolle..... | 86 |
| Tabelle 23: Ergebnisse Migrations-Assay, MG-63, Chemokin: DMEM+10% FBS..... | 87 |
| Tabelle 24: Ergebnisse Migrations-Assay, MG-63, Chemokin: DMEM+IGF (50ng/ml)..... | 87 |
| Tabelle 25: Ergebnisse Migrations-Assay, MG-63, Chemokin: DMEM+IGF (50ng/ml)..... | 88 |
| Tabelle 26: Ergebnisse Migrations-Assay, MG-63, Chemokin: DMEM+VEGF (50ng/ml)... | 88 |
| Tabelle 27: Ergebnisse Migrations-Assay, Hos, Chemokin: RPMI+10% FBS..... | 89 |
| Tabelle 28: Ergebnisse Migrations-Assay, Hos, Chemokin: RPMI+10% FBS..... | 89 |
| Tabelle 29: Ergebnisse Migrations-Assay, Hos/MNNG, Chemokin: RPMI+10% FBS..... | 90 |
| Tabelle 30: Ergebnisse Migrations-Assay, Hobs, Osteoblast Growth Medium+10% FBS..... | 90 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| ACTB | Beta-Actin |
| BMP | Bone morphogenic protein |
| BMU | Bone metabolic unit |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CoM | Center of mass |
| Ct | threshold cycle |
| DEXA | dual energy X-ray absorptiometry |
| DMEM | Dulbecco´s Modified Eagle Medium |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ES | Enrichment Score |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |
| FBS | Fetales Kälberserum |
| FC | Foldchange |
| FDR | false discovery rate |
| FMI | Forward Migration Index |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GO | Gene ontology |
| GSEA | Gene Set Enrichment Analysis |
| HKG | house-keeping-genes |
| IGF-1 | Insulin-like Growth Factor 1 |
| ILK | Integrin-linked kinases |
| MMP | Matrix-Metalloprotease |
| MSigDB | Molecular Signatures Database |
| NES | Normalized Enrichment Score |
| OGM | Osteoblast Growth Medium |
| OPG | Osteoprotegerin |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PDGF | Platelet-Derived Growth Factor |
| QRT-PCR | Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | rounds per minute |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute Medium |
| RT | reverse Transkriptase |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| TNS | Trypsin Neutralisierungslösung |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |

Zusammenfassung

Die gerichtete Migration von Osteoblasten unterliegt komplexen Regulationsmechanismen und nimmt eine zentrale Rolle innerhalb der Knochenphysiologie, beispielsweise während dem Bone remodeling, ein. Um die komplexen Prozesse im Knochengewebe zu untersuchen, herrscht in der orthopädischen Forschung ein großer Bedarf an guten in-vitro Modellen, welche aufgrund unterschiedlichen limitierenden Faktoren jedoch oft schwierig sind zu etablieren. Da Osteoblasten die einzigen bekannten knochenbildenden Zellen sind, ist es im Kontext von gestörter bzw. unregulierter Knochenbildung wie beispielsweise bei der Osteoporose bzw. dem Osteosarkom, von großem klinischem Interesse detailliert zu verstehen, welchen Regulationsmechanismen Osteoblasten unterliegen.

Es ist bekannt, dass für gerichtete Zellbewegung das koordinierte Zusammenspiel von sowohl Zellbewegungs-fördernden, als auch Zelladhäsions-fördernden Proteinen, welche zum größten Teil mit der extrazellulären Matrix (EZM) assoziiert sind, wichtig ist. Während des Knochenaufbaus und -umbaus wird die Migration von Osteoblasten hauptsächlich durch Chemotaxis, mechanische und elektrische Stimuli, sowie der Zusammensetzung der Knochenoberflächen gesteuert. Innerhalb ihrer Lebensspanne sind Osteoblasten sowohl mineralisierten, als auch demineralisierten und durch Osteoklasten resorbierten Knochenoberflächen exponiert. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass Osteoblasten über beispielsweise Integrine und Laminine die Beschaffenheit der Knochenoberflächen „wahrnehmen“ und die Komposition der Knochenoberflächen darüber unmittelbar Einfluss auf die Regulation von Migrationsprozessen von Osteoblasten nimmt. Die Hypothese ist, dass demineralisierte Knochenoberflächen Änderungen in der koordinierten Genexpression von mit Migration, Adhäsion und extrazellulärer Matrix assoziierten Genen in adhärenenten Osteoblasten induzieren. Zur Untersuchung der Hypothese wurde in dieser Arbeit ein neues flexibel-anpassbares in-vitro Modell entwickelt, welches es ermöglicht, Änderungen der globalen Genexpression in Abhängigkeit des Mineralisierungsgrades von Knochenoberflächen zu messen.

Hierzu wurde Schweine-Tibia in dünne Scheiben gesägt und anschließend mit Essigsäure sterilisiert, sowie mit EDTA demineralisiert bzw. in ihrem nativen mineralisierten Zustand belassen. Der Mineralisierungsgrad wurde mittels Osteodensitometrie quantifiziert, wobei sich zeigte, dass die Behandlung mit EDTA eine geeignete Methode darstellt, um eine vollständige Demineralisierung der Knochenscheiben zu erzielen. Anschließend wurden Osteoblasten-artige MG-63 Zellen auf den prozessierten Knochenoberflächen ausgesät und

inkubiert. Um die Morphologie und Adhäsion der Zellen visuell zu überprüfen, wurden mit fluoreszierenden Molekülen markierte MG-63 Zellen auf mineralisierten bzw. demineralisierten Knochenoberflächen mikroskopisch untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Knochenoberflächen die Zellen hinsichtlich der genannten Eigenschaften nicht negativ beeinflussten. Des Weiteren konnte mikroskopisch bestätigt werden, dass die adhärennten Zellen mit einem mechanischen Zell-schonenden Verfahren vollständig zur weiteren Verarbeitung von den Knochenoberflächen entfernt werden konnten. Nach Inkubation und mechanischer Entfernung der Zellen wurde die Gesamt-RNA extrahiert und diese für Microarray-Analysen verwendet. Parallel dazu, wurde ein Teil der Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben, um für einzelne Gene die im Microarray gemessenen Unterschiede der Genexpression später mittels QRT-PCR zu bestätigen. Die Rohdaten der Microarray-Analyse wurden mit der Software Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) in Kombination mit der Molecular Signature Database (MSigDB) analysiert und ausgewertet. Mit GSEA wurden die Daten auf Anreicherung von vorab definierten Gene Sets untersucht. Ein Gene Set besteht dabei aus mehreren Genen, welche publikationsbasiert innerhalb der MSigDB thematisch geordnet sind.

Durch die gleichzeitige Betrachtung mehrerer miteinander im Zusammenhang stehender Gene ist es möglich fundiertere und biologisch relevantere Aussagen über Phänotypen zu treffen, als dies mit der isolierten Betrachtung weniger unterschiedlich exprimierten Genen möglich wäre. Hierbei zeigte sich, dass auf demineralisierten Knochenoberflächen 3 der Top 5 angereicherten Gene Sets mit der extrazellulären Matrix assoziiert waren. Innerhalb dieser Gene Sets wurden Gene ausgewählt, welche in der Literatur als relevant für die Knochenphysiologie angesehen werden, sowie als interessant für die Generierung neuer Hypothesen erachtet worden sind, um diese selektiv mittels QRT-PCR zu amplifizieren. Hierbei konnten die im Microarray gemessenen Änderungen der Genexpression für die Gene COL1A1, ITGA2, VCAN, MMP1, ADAMTS4, HAS2, HMCN1 und NID2 in der QRT-PCR bestätigt werden.

Die ausgeprägte Assoziation mit der EZM von den auf demineralisierten Knochenoberflächen am stärksten angereicherten Gene Sets bestätigt die dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese. Zudem zeigte sich auf demineralisierten Knochenoberflächen eine vermehrte Expression von HMCN1 und NID2, deren detaillierte Rollen im Knochen bisher nicht beschrieben wurden. Die Identifikation dieser beiden Gene ist als besonders relevant für das

Verständnis der Osteoblasten-Migration auf Knochenoberflächen zu erachten und kann als Ausgangspunkt zukünftiger Hypothesen dienen.

Publikation

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Matrix mineralization controls gene expression in osteoblastic cells

Wischmann J, Lenze F, Thiel A, Bookbinder S, Querido W, Schmidt O, Burgkart R, von Eisenhart-Rothe R, Richter GHS, Pleshko N, Mayer-Kuckuk P

Exp Cell Res. 2018 Nov 1;372(1):25-34. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.09.005.

1 Einleitung

1.1 Der menschliche Knochen

Das menschliche Skelett besteht aus 208 bis 212 Knochen. Der humane Knochen hat im menschlichen Organismus eine mechanische, eine protektive, sowie eine metabolische und endokrine Funktion. Als Ursprung und Ansatzpunkt der Muskulatur sowie der Sehnen und Bänder ist der Knochen verantwortlich dafür, dass Muskelkontraktionen in einer gerichteten Bewegung des Körpers resultieren. Des Weiteren hat der Knochen eine stabilisierende sowie formgebende Funktion und ist für die Statik des Organismus entscheidend. Dadurch, dass verschiedene Organsysteme durch knöcherne Strukturen umgeben sind, nimmt der Knochen eine ausgeprägte schützende Funktion wahr. So ist beispielsweise das Gehirn von der knöchernen Schädelkalotte umgeben und die Rippen bilden ein schützendes Hüllsystem um die thorakalen Organe. Außerdem umgibt der Knochen schützend das Knochenmark, in welchem die blutbildenden Zellen synthetisiert werden. Der Knochen spielt eine wichtige Rolle im Calcium- und Phosphat-Haushalt des menschlichen Organismus. So ist das Skelett das größte Reservoir für Calcium im menschlichen Organismus. Durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Hormone wie Calcitonin und Parathormon, sowie dem Vitamin Calcitriol wird die Exkretion bzw. Aufnahme von Calcium und Phosphat gesteuert und dadurch Knochenaufbau und –abbau, sowie der Säure-Basen-Haushalt reguliert.

Durch die Vielfalt und die Komplexität der unterschiedlichen Funktionen, die der Knochen im menschlichen Organismus hat, kann das Skelett als eigenständiges Organ betrachtet werden. Wie andere Organe auch, kann das Skelett Ausgangspunkt unterschiedlichster pathologischer Prozesse sein. Neben degenerativen Erkrankungen wie der Osteoporose, Frakturen und angeborenen Pathologien des Skelettsystems, können sich Neoplasien wie das Osteosarkom

bilden, welche auch aufgrund des hohen Metastasierungspotentials häufig mit einer niedrigen Überlebenswahrscheinlichkeit einhergehen. Charakteristisch für einige Knochentumoren, beispielsweise dem Ewing-Sarkom, ist zudem, dass diese sich vorwiegend bereits im jungen Lebensalter manifestieren.

Makroskopisch lässt sich die Knochenmorphologie unterschiedlich einteilen. Zu den *Ossa longa* bzw. Röhrenknochen zählen die Knochen der Extremitäten sowie die Hand- und Fußbildenden Knochen, die Metacarpal- und die Metatarsalknochen. Der mittige Teil des Röhrenknochens wird als Diaphyse, die die Diaphyse umgebenden Teile des Knochens als Epiphyse bezeichnet. Die Übergangszone zwischen Diaphyse und Epiphyse wird als Metaphyse bezeichnet. In der Epiphyse befinden sich zum einen die von hyalinem Knorpel ausgekleideten Gelenkflächen des Knochens, zum anderen finden dort die für das knöcherne Längenwachstum verantwortlichen, knochenbildenden Prozesse statt. Als *ossa plana* werden flache Knochen, wie die Rippen, das Sternum und die Scapula bezeichnet. Zu den *ossa brevia* werden kurze und kompakte Knochen, wie die Hand- und Fußwurzelknochen gezählt. Gesichtsschädel-bildende Knochen, wie das *os sphenoidale* oder das *os frontale* sind pneumatisiert und werden zu den *ossa pneumatica* gezählt. *Ossa sesamoidea* sind Sesambeinbildende Knochen, welche oft als *Hypomochlion* zusammen mit Sehnen und Bändern eine funktionelle Einheit bilden und die biomechanische Kraftübertragung durch die Muskulatur auf den Knochen effizienter machen. Prominentestes Beispiel hierfür ist die Patella.

Eine weitere makroskopische Einteilung der Knochen, ist die Unterscheidung zwischen der *substantia compacta*, welche ungefähr drei Viertel der Knochenmasse ausmacht, und der *substantia spongiosa*, welche ein Viertel ausmacht. Während die schwammartige (trabekuläre) *substantia spongiosa* im Inneren und somit nahe dem Knochenmark vorzufinden ist, verläuft die stabilere *substantia compacta* im Außenbereich direkt unter dem Periost. Im Gegensatz zur *substantia compacta*, in welcher der Knochen durch ein eigenes Gefäßsystem (Havers-Gefäße) versorgt wird, wird der Knochen in der *substantia spongiosa* über Gefäße versorgt, welche ihren Ursprung im Knochenmark haben. Makroskopisch ist außerdem das Periost von dem Endost abzugrenzen, welches die Innenräume des Knochens auskleidet.

Mikroskopisch lässt sich der Knochen anhand des Aufbaus der extrazellulären Matrix, im Speziellen der Verlaufsrichtung der Kollagenfasern einteilen. Knochen, welcher durch eine eher ungerichtete Ausrichtung der Kollagenfasern gekennzeichnet ist, wird als Geflechtknochen bezeichnet, Knochengewebe mit einer zur Zug- und Druck-Richtung parallelen Ausrichtung der Kollagenfasern als Lamellenknochen. Durch die an die

mechanische Kraftwirkung optimierte Verlaufsrichtung der Kollagenfasern im Lamellenknochen ist dieser anisotrop gegenüber mechanischer Belastung. Im Rahmen der Embryonalentwicklung und der Heilung von Knochendefekten in Folge von Frakturen wird in der Regel zuerst Geflechtknochen gebildet und dieser anschließend durch den an die Belastung optimal angepassten Lamellenknochen ersetzt.

1.1.1 Aufbau des Knochengewebes

Knochengewebe besteht aus einem organischen und einem anorganischen Anteil. Der organische (zelluläre) Anteil des Knochengewebes besteht aus knochenbildenden Osteoblasten bzw. Osteozyten und knochenabbauenden Osteoklasten, sowie der durch Osteoblasten synthetisierten Knochenmatrix. Als anorganischer Anteil des Knochengewebes wird das in der Knochenmatrix enthaltene Mineral bezeichnet.

Osteoblasten besitzen die Eigenschaft zu Osteozyten auszudifferenzieren. Dabei machen Osteozyten mit ca. 95% den überwiegenden zellulären Anteil innerhalb des Knochengewebes aus (Capulli, Paone, and Rucci 2014). Verbände von Osteozyten sind, eingebettet in mineralisiertem Osteoid, in einem komplexen Kanalsystem (canaliculi) organisiert, über dessen Ausläufer sie mittels Zell-Zell-Kontakten (beispielsweise Gap junctions) als funktionelles Synzytium miteinander kommunizieren. Innerhalb der substantia compacta bilden Osteozyten und Gefäßendothelzellen eine funktionelle Einheit, das Osteon. Dabei verlaufen Knochenlamellen, welche hauptsächlich aus Kollagen bestehen, konzentrisch um den Havers-Kanal, welcher die Gefäßversorgung für das jeweilige Osteon beinhaltet (Abbildung 1). Zwischen mehreren Havers-Kanälen besteht in Form von Volkmann-Kanälen eine Verbindung, welche ähnlich den Canaliculi für die interzelluläre Kommunikation benötigt werden. Osteoblasten zeichnen sich außerdem durch ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum, sowie einer hohen Dichte an Mitochondrien aus, was ihre ausgeprägte sekretorische Funktion widerspiegelt. Während Osteoblasten aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen entstehen, stammen Osteoklasten von hämatopoetischen Progenitorzellen aus der Monozyten-Makrophagen-Linie ab (Martin and Ng 1994).

Die Knochenmatrix besteht aus, von Osteoblasten synthetisierter mineralisierter EZM, welche hauptsächlich aus quervernetztem Kollagen Typ I und Hydroxylapatit, sowie zu einem geringeren Anteil aus akzessorischen Glykoproteinen und Proteoglykanen, wie Osteopontin und Osteocalcin, sowie weiteren anorganischen Ionen zusammengesetzt ist (Blair et al. 2017). Die nicht-mineralisierte durch Osteoblasten synthetisierte extrazelluläre Matrix wird als

Osteoid bezeichnet. Die Bestandteile von Hydroxylapatit ($Ca_5[OH(PO_4)_3]$) sind Calcium, Phosphat und Hydroxyl-Ionen, welche sich in kristallinen Strukturen zusammenlagern.

Die Mineralisierung des Osteoids durch die Osteoblasten, ist ein zentraler Prozess innerhalb der Knochenphysiologie, welcher dem Knochen seine charakteristische Festigkeit und Widerstandfähigkeit gegenüber mechanischer Belastung verleiht. Dabei erfolgt der Prozess sowohl durch einen aktiven, als auch durch einen passiven transmembranären Transport. In einem ersten Schritt erfolgt die Sekretion von Calcium und Phosphat Kationen in die EZM, welche anschließend durch unter anderem Wasser- und Protonenzug zu Mikrokristallen verdichtet werden. Dies geschieht durch in der apikalen Osteoblasten Membran angesiedelten Cl^-/H^+ - und in der basolateralen Membran integrierten Na^+/H^+ -Austauschern (Larrouture et al. 2015). In einem finalen Schritt werden die amorphen Calciumphosphat-Komplexe durch verschiedene Prozesse in Hydroxylapatit transformiert. Die genauen Mechanismen, welche die Mineralisierung des Osteoids modulieren sind weiterhin nicht vollständig erforscht.

Compact Bone & Spongy (Cancellous Bone)

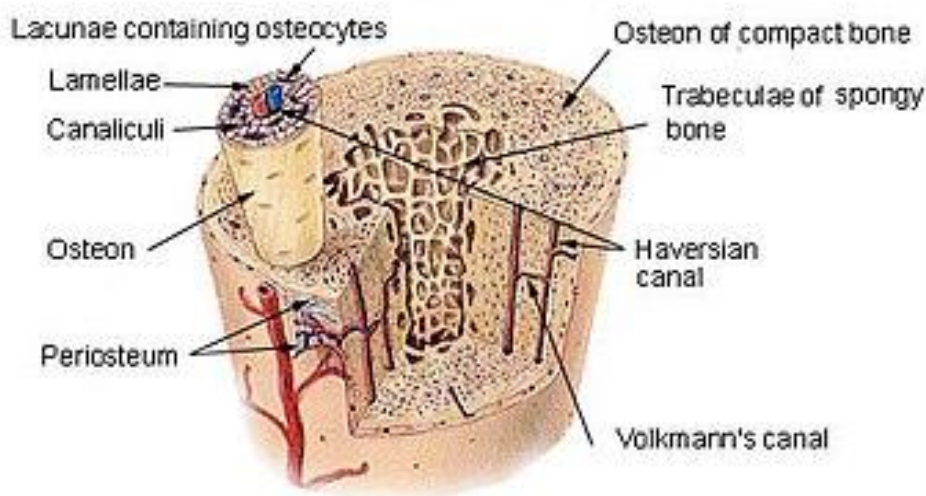


Abbildung 1: Substantia compacta und spongiosa

Erklärungen im Text. Quelle: <https://www.ck12.org/book/CK-12-Biology/section/21.2/>

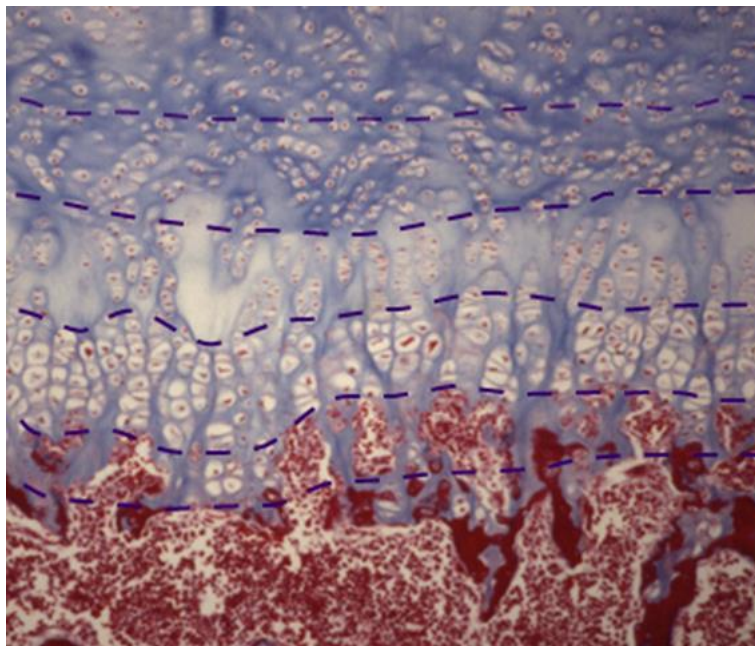
1.1.2 Desmale Ossifikation

Die desmale bzw. direkte Ossifikation bezeichnet die Knochenbildung unmittelbar aus embryonalem Mesenchym (Karaplis 2008). Neuro- und Viscerocranium, sowie die Clavicula entstehen während der embryonalen Entwicklung auf diese Weise. Dabei entstehen inselförmig Osteoblasten aus embryonalen Vorläuferzellen, welche dann durch Synthese von

Osteoid die Knochenmatrix formen. Anschließend erfolgt die Mineralisierung des Osteoids und in Teilen der Osteoblasten-Population die Ausdifferenzierung zu Osteozyten.

1.1.3 Chondrale Ossifikation

Im Gegensatz zur desmalen Ossifikation entsteht neuer Knochen bei der chondralen Ossifikation aus hyalinem Knorpelgewebe durch die Anlagerung von Osteoblasten, sowie der Resorption von Knorpelgewebe durch Chondroklasten (Karaplis 2008). Als enchondrale Ossifikation wird dabei die Knochenneubildung im Bereich der Epiphysenfugen bezeichnet, welche in einem Längenwachstum des Knochens resultiert. Die perichondrale Ossifikation führt hingegen zu einem Dickenwachstum im Bereich der Diaphyse, indem sich zirkulär Osteoblasten an die Knorpelhaut (Perichondrium) anlagern, welche anschließend nach Resorption von Knorpelgewebe durch Chondroklasten, durch Osteoid-Synthese und anschließender Mineralisation neuen Knochen bilden. Bei der enchondralen Ossifikation lassen sich innerhalb der zonal aufgebauten Epiphysenfuge von proximal nach distal die Eröffnungszone, die hypertrophe Zone, die Proliferationszone, sowie die Reservezone unterscheiden (Abbildung 2). In der Eröffnungszone am Knorpel-Knochen-Übergang beginnt die Knorpelresorption durch Chondroklasten, gefolgt von einer Neovaskularisation, welche die Infiltration von Osteoblasten in die Eröffnungszone ermöglicht. Die hypertrophe Zone zeichnet sich durch Wasser-einlagernde Chondrozyten aus, was zu einer Volumenvermehrung führt und somit zum Längenwachstum führt. In der Proliferationszone dominieren Mitose-aktive Knorpelzellen, wohingegen die Reservezone hauptsächlich aus undifferenzierten Chondrozyten gebildet wird.



Epiphysenknorpel

Reservezone

Proliferationszone

Hypertrophe Zone

Eröffnungszone

Abbildung 2: Chondrale Ossifikation

Histologisches Bild einer Epiphysenfuge. Die einzelnen Zonen, in denen die chondrale Ossifikation abläuft, sind durch die gestrichelten Linien getrennt. Quelle: <http://www.unifr.ch/anatomy/elearning/de/stuetzgewebe/osteogenese/wachstum/d-wachstum.php>; Abbildung modifiziert durch den Autor.

1.1.4 Knochenumbau (Bone Remodeling)

Neben der pränatalen und im Laufe der Frakturheilung geschehenden Umwandlung von Geflecht- in Lamellenknochen, findet im definitiven postnatalen Knochen, sowohl in der substantia compacta, als auch in der substantia spongiosa ein stetiger Knochenumbau (Bone Remodeling) statt (Marks Jr. 1996). Zweck dieses dynamischen Vorgangs ist die kontinuierliche Erhaltung der Knochensubstanz, die kontinuierliche Adaption auf mechanische Belastungen des Skeletts, sowie die Reparatur von Mikrofrakturen, welche durch mechanische Beanspruchung des Knochens entstehen. So gibt es Indizien dafür, dass Mikrofrakturen innerhalb des Knochens als primäres Signal dienen, Bone Remodeling-Prozesse in Gang zu setzen (Hassenkam, Jorgensen, and Lauritzen 2006). Bone Remodeling ist in der Bone metabolic unit (BMU) lokalisiert, welche die kleinste funktionelle Einheit darstellt, in dem der Knochenumbau stattfindet (Jilka 2003). Innerhalb der BMU wird in einem ersten Schritt alter Knochen durch Osteoklasten resorbiert und in einem zweiten Schritt neuer Knochen durch einwandernde Osteoblasten resynthetisiert. Dazu werden die resorbierten Zonen zuerst mit, von Osteoblasten gebildetem, Osteoid ausgefüllt und anschließend mineralisiert. Ein Teil der Osteoblasten differenziert anschließend zu Osteozyten. Die Osteozytogenese ist Gegenstand intensiver Forschung und nicht vollständig verstanden. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass der Wnt-Signalweg sowie die

Modulierung durch Bone morphogenic proteins (BMP) essentiell für die Differenzierung der Osteoblasten ist (Capulli, Paone, and Rucci 2014). Des Weiteren wird angenommen, dass die mineralische Komponente des Hydroxylapatits die Osteozytogenese initiiert (Robin et al. 2016) und der Mineralisierungsgrad dabei mit dem Differenzierungsgrad der Osteoblasten korreliert (Capulli, Paone, and Rucci 2014). Außerdem scheint die Migration von Osteoblasten entlang der quervernetzten Kollagenfasern essentiell für die Osteozytogenese zu sein (Uchihashi et al. 2013).

Knochenaufbau- und -abbau laufen physiologischer Weise in einem dynamischen Gleichgewicht ab. Die Apoptose von Osteozyten scheint als eines der ersten Signale zu dienen, welche dieses Gleichgewicht hin zur Resynthese von Knochen verschiebt (Seeman 2008). Des Weiteren wird angenommen, dass die durch Osteoklasten resorbierte Knochenoberfläche als Signalgeber für die in die BMU migrierenden Osteoblasten fungiert, Osteosynthese zu initiieren. Es wird angenommen, dass die resorbierten Knochenoberflächen infiltrierenden Osteoblasten als eine Art Vorlage für die Knochenneubildung dienen. Nichtsdestotrotz ist der genaue Mechanismus, wie sich Knochenresorption und Knochensynthese gegenseitig regulieren, nicht vollständig bekannt.

Der Knochenumbau innerhalb einer BMU erfolgt über mehrere Monate und somit über einen längeren Zeitraum als die Lebensdauer eines Osteoblasten und Osteoklasten. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass diese Zellen während dem Bone Remodeling fortlaufend aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen bzw. hämatopoetische Progenitorzellen ersetzt werden (Jilka 2003). Hierfür ist die Neovaskularisation der BMU entscheidend, welche eine kontinuierliche Infiltration durch Osteoprogenitorzellen ermöglicht. Es ist zudem bekannt, dass Osteoblasten selbst über die Sekretion von Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) regulatorisch auf hämatopoetische Stammzellen wirken (Taichman and Emerson 1994). Innerhalb der BMU kommunizieren Osteoblasten, Osteoklasten und vaskuläre Endothelzellen, sowie deren Progenitorzellen über ein komplexes Muster aus parakriner Diffusion von Liganden und Zytokinen, dem Austausch von Mikromolekülen über gap junctions, Zell-EZM-Interaktionen und transmembraner Rezeptor-Liganden-Interaktion via direktem Zell-Zell-Kontakt (Matsuo and Irie 2008).

Bereits seit 1997 ist das RANK-RANKL-System bekannt als wichtiger Baustein der Osteoblasten-Osteoklasten-Kommunikation. RANKL ist ein transmembranes Glykoprotein, welches zu der Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)-alpha-Superfamilie gehört und von Osteoblasten

exprimiert wird. RANKL bindet an das durch Osteoklasten-Progenitorzellen exprimierte RANK, wodurch die Differenzierung dieser Zellen zu Osteoklasten initiiert und mediiert wird. Der Vorgang kann durch das ebenfalls von Osteoblasten exprimierte Osteoprotegerin (OPG) antagonisiert werden, welches somit eine osteoprotektive Wirkung besitzt. Es ist bekannt, dass in osteoporotischen Knochen auf molekularer Ebene das Gleichgewicht hin zu dem pro-osteolytischen RANK-RANKL-System verschoben ist (Wright et al. 2009). Auf therapeutischer Ebene ist es heutzutage möglich, beispielsweise im Rahmen der Osteoporose-Therapie, über den monoklonalen RANKL-Antikörper Denosumab in die Homöostase dieses Systems regulatorisch einzugreifen. Das Zusammenspiel mehrerer beteiligter Zellarten auf engstem Raum, sowie verschiedenster Regulationsmechanismen während dem Bone Remodeling, macht die BMU zu einem herausfordernden Forschungsfeld innerhalb der Knochenbiologie, indem aktuell viele Details noch nicht geklärt werden konnten.

1.2 Mechanismen der Osteoblasten Migration

Sowohl für den Ablauf der desmalen und der chondralen Ossifikation, als auch für das Bone Remodeling ist eine präzise Navigation und Migration der Osteoblasten erforderlich. Dabei ist es Osteoblasten möglich, auf Knochenoberflächen als einzelne Zelle oder auch in Zellverbänden zu migrieren. Hierbei findet die Fortbewegung bevorzugt entlang von Kollagenfasern statt (Jones and Boyde 1977), was den Zusammenhang zwischen der Komposition der EZM und der gerichteten Migration von Osteoblasten verdeutlicht. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Kollagenfasern innerhalb des Knochens mit mineralischen kristallinen Strukturen beschichtet sind (Hassenkam et al. 2004), woraus sich die Vermutung ableiten lässt, dass die mineralische Komponente des Knochens unter anderem als Leitstruktur für migrierende Osteoblasten dienen kann. Interessanterweise korreliert das Migrationsverhalten dabei negativ mit dem Differenzierungsgrad der Osteoblasten.

Das migratorische Potential der Osteoblasten ist eng verknüpft mit Zell-EZM-Interaktionen, Zell-Adhäsion und einem funktionalen Zytoskelett. So wird über Zell-EZM-Interaktionen via transmembranen Integrin-Rezeptoren und Integrin-linked Kinasen (ILK) Zell-Adhäsion in Osteoblasten reguliert (Dejaeger et al. 2017). Der Knock-out von ILK in Mäusen resultiert dabei in einer eingeschränkten Funktionalität des Zytoskeletts, sowie in verminderter Zell-Adhäsion und -Migration, was den Zusammenhang dieser Prozesse unterstreicht (Dejaeger et al. 2017). Weiterhin werden Zell-Adhäsions-Prozesse, sowie die Mineralisierung des Osteoids über Modifizierung der EZM durch Matrix-Metalloproteasen (MMP) reguliert (Paiva and Granjeiro 2017). MMPs scheinen dabei über Degradation der EZM nicht nur Adhäsions- und

Migrations-Prozesse zu beeinflussen, sondern auch die Rekrutierung und Differenzierung von Endothelzellen, Osteoblasten, Osteoklasten, sowie deren Progenitorzellen während dem Bone Remodeling. Überexpression von Periostin (POSTN), ein Protein der EZM, in Osteoblasten führt zudem zu einer verstärkten Zell-Adhäsion und einer verminderter Zell-Migration (Cobo et al. 2016).

In der Zusammenschau der Daten wird deutlich, dass Zell-EZM-Interaktionen, Zell-Adhäsion und Zell-Migration in Osteoblasten nicht getrennt voneinander betrachtet werden können. Die Migration und Adhäsion von Osteoblasten wird maßgeblich von vier Prozessen beeinflusst: Chemotaktische Gradienten (Chemotaxis), Komposition der Knochenoberfläche (Haptotaxis), mechanische (u.a. Flowtaxis) und elektrische Stimuli.

1.2.1 Chemotaxis

Chemotaxis bezeichnet die gerichtete Fortbewegung von Zellen entlang eines Konzentrations-Gradienten eines oder mehrerer gelösten Moleküle (Chemokine). Als Chemoattractant wird dabei ein Chemokin bezeichnet, welches eine gerichtete Zellbewegung zu dem Molekül hin hervorruft, wohingegen ein Chemorepellent ein Chemokin bezeichnet, welches in einer von diesem weg gerichteten Bewegung resultiert. Dabei ist es möglich, dass ein Chemokin konzentrationsabhängig sowohl ein Attractant, als auch ein Repellent sein kann. Zellen ist es dabei möglich, das chemotaktische Signal selbst zu modulieren, beispielsweise durch Endozytose und anschließender Präsentation des Chemokins auf der Zelloberfläche (Ulrich and Heisenberg 2009), sowie durch Endo- und Exozytose von Integrinen als Regulationsmechanismus der Zellmigration (Caswell and Norman 2008).

Das Potential von Osteoblasten, sich entlang chemotaktischer Gradienten zu bewegen, ist seit längerem bekannt (Jones and Boyde 1977). Das Ansprechen von Osteoblasten auf Fetales Kälberserum, (FBS) als Chemoattractant wurde zudem bereits in mehreren Studien beschrieben. FBS, welches weltweit als Medium-Zusatz in Zellkulturen eingesetzt wird, ist dabei bekannt bei Zellen unterschiedlicher Gewebe chemotaktische Effekte in vitro hervorzurufen (Fang et al. 2017). Mittlerweile wurden eine große Anzahl von Proteinen identifiziert, welche chemotaktische Effekte bei Osteoblasten, Osteozyten sowie deren Progenitorzellen hervorrufen (Dirckx, Van Hul, and Maes 2013). Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) ist ein, vor allem von Thrombozyten sezerniertes Protein, welches durch die Kombination von alpha- und beta-Ketten unterschiedliche Isoformen aufweist. PDGF-BB fungiert als Chemoattractant für Saos-2-Osteosarkomzellen und primäre Osteoblasten über eine Reorganisation des Zytoskeletts, wobei es hinsichtlich dem chemotaktischen Potential

deutlich Unterschiede zwischen den Isoformen von PDGF gibt (Colciago et al. 2009) (Casati et al. 2014). Dabei wird das chemotaktische Signal unter anderem durch die Sekretion von PDGF-BB durch Osteoklasten moduliert und initiiert, was eine gegenseitige Regulation von Migrationsprozessen zwischen Osteoblasten und Osteoklasten während dem Bone Remodeling vermuten lässt (Sanchez-Fernandez et al. 2008). Die vermehrte Expression von PDGF in biopsiertem Material aus Frakturen, deutet außerdem eine Relevanz von PDGF für das Bone Remodeling während der Frakturheilung in vivo an (Andrew et al. 1995).

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein Molekül, welches als Chemotaxis Zellen unterschiedlicher Gewebe beeinflusst. Zudem wird die Neovaskularisation von Tumorgewebe durch die Überexpression von VEGF initiiert und reguliert. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass VEGF ein Chemoattractant für primäre Osteoblasten und für mesenchymale Stammzellen darstellt (Mayr-Wohlfart et al. 2002) (Fiedler et al. 2005). Ebenfalls als Chemoattractant für Osteoblasten wirkt Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) (Hengartner et al. 2013). IGF-1 ist ein mitogenes Peptidhormon, welches vorwiegend in Hepatozyten und Adipozyten synthetisiert wird. Durch die Bindung von IGF-1 an Rezeptor-gekoppelte-Tyrosin-Kinasen setzt IGF-1 intrazelluläre Signalkaskaden in Gang. Durch die eigenständige Sekretion von IGF-1 durch Osteoblasten scheint IGF-1 zudem innerhalb eines Osteoblasten-Kollektivs eine Rolle in der gegenseitigen Regulation der Migration zu spielen (Nakasaki et al. 2008). Es konnte zudem gezeigt werden, dass das chemotaktische Potential von sowohl der PDGF-Isoform PDGF-BB, als auch von VEGF-A und IGF-1 durch die Exposition von Osteoblasten mit Interleukin 1 Beta, einem Zytokin des Immunsystems, inhibiert werden kann (Hengartner et al. 2013). Dabei stellte sich zudem heraus, dass Interleukin 1 Beta keinen negativen Einfluss auf PDGF-BB hinsichtlich der Rolle als Chemoattractant für mesenchymale Stammzellen hat. Dies lässt vermuten, dass PDGF-BB innerhalb der BMU sowohl für Osteoblasten, als auch deren Progenitorzellen als Chemokin wirkt und dabei unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegt.

Zusammenfassend sind PDGF, VEGF und IGF potente Chemokine für Osteoblasten und deren Progenitorzellen, sowie Osteosarkom-Zellen. Das chemotaktische Potential der genannten Proteine ist dabei lediglich eine Funktion unter mehreren physiologischen Prozessen, welche durch diese moduliert werden. Die detaillierten Regulationsmechanismen, sowie die Art und Weise, wie Osteoblasten mehrere chemotaktische Signale beispielsweise während dem Bone Remodeling oder während der Frakturheilung integrieren, sind noch nicht vollständig erforscht.

1.2.2 Oberflächenkomposition

Die Komposition und Beschaffenheit der Knochenoberflächen, fungiert als wichtiger Signalgeber für Osteoblasten, welche sich auf diesen fortbewegen, beispielsweise mittels Haptotaxis. Als Haptotaxis wird die Fortbewegung entlang eines Konzentrationsgradienten von einem, beispielsweise an eine Knochenoberfläche, gebundenen Moleküls bezeichnet. Ähnlich der Chemotaxis ist das migratorische Potential hierbei von verschiedenen Faktoren, wie Rezeptoraffinität des chemotaktischen Liganden sowie Konzentration des Gradienten abhängig.

Es konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten haptotaktische Signale durch EZM-Komponenten wie Kollagen 1, Fibronectin und Laminin-1 wahrnehmen (Sotobori et al. 2006). Osteoblasten sind während dem Bone Remodeling mineralisierten, demineralisierten, sowie durch Osteoklasten resorbierten Knochenoberflächen ausgesetzt. Für die fokale Adhäsion von Osteoblasten auf verschiedenen Knochenoberflächen spielt die Expression unterschiedlicher Integrine als Transmembranrezeptoren eine zentrale Rolle. Integrine verbinden zum einen Zellen mit Strukturen der EZM und zum anderen spielen sie durch Zell-Zell-Verbindungen in der interzellulären Kommunikation eine Rolle. Der direkte Zusammenhang zwischen Integrinen und Zellmigration konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (Anderson, Owens, and Naylor 2014). Dabei vermitteln Integrine mittels focal adhesion kinase (FAK)- und mitogen-activated protein kinases (MAPK)-abhängige Signalwege Informationen über die Zellumgebung ins Innere der Zelle, genauer an das Zytoskelett (Clark et al. 1998). Außerdem ist anzunehmen, dass Integrine es Osteoblasten ermöglichen, Oberflächenbeschaffenheiten zu identifizieren (Olivares-Navarrete et al. 2015) und darüber die Expression von Osteopontin (OPN) zu stimulieren (Carvalho et al. 2003). Des Weiteren beeinflussen Integrine via Bindung von connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) an Integrin-Rezeptoren innerhalb der EZM Adhäsion, Differenzierung und Organisation des Zytoskeletts von Osteoblasten (Hendesi et al. 2015). Zudem induziert Integrin $\alpha 2$ über die Aktivierung des Osteocalcin-Promoters die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten (Xiao et al. 1998), was einen Zusammenhang zwischen der Beschaffenheit der EZM und Proliferationsprozessen im Knochen vermuten lässt. Im Tiermodell konnte zudem der Zusammenhang zwischen Integrinen und Haptotaxis gezeigt werden, indem durch Antikörper-vermittelte Deaktivierung von Integrin $\alpha 5\beta 1$ eine verminderte Fibronectin-abhängige haptotaktische Migration von Osteoblasten beobachtet werden konnte (Sotobori et al. 2006).

Zusammenfassend zeigen bisherige Studien das enge Verhältnis von Knochenoberflächen, EZM, Adhäsion, Migration und Proliferation von Osteoblasten. Es scheint im Speziellen so zu sein, dass die Komposition und Beschaffenheit der Knochenoberfläche über komplexe Signaltransduktionsmechanismen wichtige Signale für die Regulation und Modulation der genannten Prozesse liefert, was zu der Hypothese dieser Arbeit führte.

1.2.3 Mechanische und elektrische Stimuli

Neben chemotaktischen Signalen und Modulation durch verschiedene Knochenoberflächen wird die Migration von Osteoblasten durch mechanische Stimuli in Form von Flüssigkeitsbewegungen-induziertem Scherstress, mechanischer Belastung und physikalischem Druck beeinflusst (Thompson, Rubin, and Rubin 2012). Bereits vor einiger Zeit konnte gezeigt werden, dass mechanische Belastung des Skelett über einen längeren Zeitraum zu einer Vermehrung und Verdichtung von Knochengewebe führt (Karlsson, Johnell, and Obrant 1993), umgekehrt führt körperliche Inaktivität auf längere Sicht zu einer Reduktion der Knochenmasse. Man nimmt dabei an, dass Osteoblasten und vor allem Osteozyten als Mechanosensoren dienen, welche nach Stimulation über komplexe Signalkaskaden Knochenaufbau bzw. -Abbau induzieren (Maycas, Esbrit, and Gortazar 2017).

Zudem wurden Osteoblasten *in vitro* beobachtet, deren Migration durch Flüssigkeitsbewegungen-induzierten Scherstress stimuliert werden konnte (Riehl et al. 2017). In diesem Zusammenhang wird von Flowtaxis gesprochen, ein Prinzip, welches durch mehrere Studien, durchgeführt mit verschiedenen Zellarten, bestätigt werden konnte (Thompson, Rubin, and Rubin 2012). Neben Änderungen im Migrationsverhalten von Osteoblasten, wurde außerdem gezeigt, dass Scherstress zu Alterationen auf Genexpressionsebene führt, was sich in Modulation der Hypoxie induzierter Faktor 1 α (HIF-1 α) und AMP-abhängige Proteinkinase (AMPK)-Signaltransduktionswege zeigte (Govey, Kawasawa, and Donahue 2015). Es scheint zudem ein Zusammenhang zwischen dem Migrationsverhalten von Osteoblasten und Potentialänderungen durch Modulation der Na⁺-K⁺-ATPase sowie bestimmten Isoformen des Na⁺/H⁺-Austauschers zu geben. Darüber hinaus konnte in mehreren *in vitro* Studien gezeigt werden, dass Osteoblasten hinsichtlich Migration, Differenzierung und Mineralisierung durch Applikation von elektrischen Stimuli beeinflusst werden können (Kumar, Nune, and Misra 2016) (Ozkucur et al. 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Beeinflussung des Knochenmetabolismus durch mechanische und elektrische Stimuli ein sich entwickelndes Feld ist, wobei für dessen weitere Erforschung noch wichtige Vorarbeiten ausstehen.

1.3 In-vitro Modelle

In der orthopädischen Forschung existiert eine große Anzahl an in-vitro-Modellen um Pathologien des Knochengewebes wie bspw. Osteoporose, Frakturen oder Implantat-assoziierte Komplikationen zu untersuchen. Eine herausragende Rolle nehmen hierbei Modelle im Kontext der Endoprothetik und der Materialentwicklung ein, um die Interaktionen von künstlichen Implantaten und biologischen Strukturen in-vitro zu analysieren (Schwartz and Boyan 1994). Hierbei wird nicht nur angestrebt, dass das Implantat die knochenbiologischen Prozesse nicht negativ beeinflusst, sondern im Optimalfall sogar fördert (Bueno and Basting 2015). Besonderes Interesse liegt dabei auf der intra- und postoperativen Infektion von Implantaten durch v.a. bakterielle Besiedelung, was oft eine Untersuchung der Zell-Implantat-Interaktionen unter Einbeziehung von antibakteriellen Implantat-Beschichtungen nötig macht (Shapiro et al. 2012). Titan als Komponente der meisten orthopädischen Endoprothesen erfordert die genaue Untersuchung von Zell-Interaktion mit Titan-beschichteten Oberflächen, um beispielsweise Aussagen über den Heilungsverlauf nach Implantation einer Endoprothese treffen zu können (Yamamichi et al. 2008) (Pereira et al. 2013). Es ist dabei anzunehmen, dass die Ultrastruktur des Implantat-Materials unmittelbar Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Migration, Adhäsion und Proliferation hat (Feller et al. 2015). Dabei sind die in den Modellen verwendeten biologischen Strukturen häufig Knochen-Matrices, welche menschlicher oder tierischer Herkunft sein können, bzw. artifiziell hergestellt werden (Metzger et al. 2017) (Davies 1996).

Neben molekularbiologischen Methoden wie Genexpressionsanalysen und Zell-Überlebensanalysen kommen zur Evaluierung der in-vitro Modelle häufig Untersuchungen mit Elektronen- und Rasterkraftmikroskopen zum Einsatz, um insbesondere die Ultrastruktur der verwendeten Oberflächen zu quantifizieren (Klymov et al. 2016) (Lincks et al. 1998) (Yamamichi et al. 2008).

Im Kontrast zu der großen Verfügbarkeit an primär im Kontext von pathologischen Situationen zum Einsatz kommenden Oberflächenmodellen, ist die Auswahl an relevanten in-vitro Modellen mit gesetztem Fokus auf physiologische Prozesse im Rahmen der Knochenentwicklung, des Knochenaufbaus und des -umbaus limitiert (Czekanska et al. 2012). Große Schwierigkeit in der Entwicklung von neuen Modellen ist hierbei die Übertragbarkeit

auf in-vivo ablaufende Prozesse durch bspw. die bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht suffiziente Integrierbarkeit aller während dem Bone Remodeling beteiligten Zelllinien in einem kombinierten in-vitro Modell. So ist aktuell kein Modell bekannt, in welchem sich das koordinierte Zusammenspiel von Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten, vaskulären Endothelzellen, sowie deren Progenitorzellen innerhalb der BMU simulieren lässt (Krishnan, Vogler, and Mastro 2015). Des Weiteren ist die genaue strukturelle Charakterisierung der Knochenoberflächen, welchen die unterschiedlichen Zellreihen zu unterschiedlichen Zeitpunkten exponiert sind, Gegenstand aktueller Forschung (Shemesh et al. 2016). Es ist zudem schwierig, den Aufbau dieser Oberflächen artifiziell umzusetzen.

Die bekannten in-vitro Modelle unterscheiden sich zum einen hinsichtlich der verwendeten Zelllinien mit deren entsprechenden Vor- und Nachteilen, sowie den verwendeten Oberflächen und Zusätzen, bspw. in Form von artifiziellen extrazellulären Matrices (Czekanska et al. 2012). So ist neben der Herkunft (tierisch/human) der Zelllinien auch der Differenzierungsgrad der verwendeten Osteoblasten entscheidend im Hinblick auf das chemotaktische Ansprechen auf bestimmte Wachstumsfaktoren, der Mineralisierungsdynamik oder der Interaktion mit Molekülen der EZM (Papadimitropoulos et al. 2011) (Czekanska et al. 2012).

Zusammenfassend sind in-vitro Modelle ein zentraler Bestandteil der experimentellen orthopädischen Forschung, wobei vor allem ein großer Bedarf an Modellen zur reproduzierbaren Beobachtung von physiologisch ablaufenden Prozessen in der Knochenbiologie mit guter Übertragbarkeit auf in-vivo ablaufende Prozesse herrscht. Aufgrund dessen wurde sich für diese Arbeit zum Ziel gesetzt ein Oberflächenmodell zu etablieren, welches in der detaillierten Untersuchung dieser Prozesse seine Stärken aufweist.

2 Klinische Relevanz

In fast allen physiologisch ablaufenden Prozessen während der Knochenentwicklung, dem Knochenwachstum, sowie der lebenslangen Regeneration und Anpassung des Skeletts auf mechanische Beanspruchung wird dem koordinierten Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten eine zentrale Rolle zuteil. Deshalb ist ein grundlegendes und detailliertes Verständnis über diese beiden Zellreihen im Hinblick auf Störungen dieser physiologischen Prozesse in Form von metabolischen Knochenerkrankungen, Frakturen, genetisch bedingten Skelettdeformitäten und Neoplasien fundamental für die orthopädische Forschung.

So führt bspw. Osteoporose zu einer Störung im Zusammenspiel zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, was zu einer Einschränkung des Knochengewebes hinsichtlich seines regenerativen und proliferativen Potentials führt und damit zu der für Osteoporose charakteristischen reduzierten mechanischen Stabilität in Teilen des Skeletts führt (Wang, Zhang, and Bikle 2017). Des Weiteren führt Osteoporose zu strukturellen Unterschieden sowohl im organischen als auch im anorganischen Anteil des Knochengewebes (Raisz 2005), welche mittlerweile durch verschiedene Methoden charakterisiert werden können (Paschalis et al. 2004) (Boskey and Mendelsohn 2005). Dies kann unmittelbar zu Störungen im Gleichgewicht zwischen Osteozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und deren Progenitorzellen führen. Am Beispiel der Osteoporose wird klar, dass das detaillierte Verständnis von Osteoblasten in osteoporotischem Knochen essentiell ist, um auf Grundlage dessen neue Optionen für Therapie, Diagnostik und Prävention dieses Krankheitsbildes zu entwickeln.

Ein weiteres Beispiel ist die Heilung von Knochendefekten in Folge von Frakturen, bei der im Rahmen der primären bzw. sekundären Frakturheilung und speziell in der anschließenden Umwandlung von Geflecht- in Lamellenknochen eine präzise Zusammenarbeit von Osteoblasten, Osteoklasten und deren Progenitorzellen notwendig ist (Wang, Zhang, and Bikle 2017). Auch hier ist die Grundlage für therapeutische Strategien ein detailliertes Verständnis über die auf molekularer Ebene ablaufenden Mechanismen, um bspw. der Entstehung von Pseudarthrosen vorzubeugen, welche mit schwerwiegenden längerfristigen Folgen für Patienten einhergehen können (Santolini, West, and Giannoudis 2015).

Neben Ungleichgewichten in der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten als Grundlage für die Pathogenese von Knochenerkrankungen, scheinen Störungen in Migrationsprozessen ebenfalls eine Rolle zu spielen, was den bereits beschriebenen starken Zusammenhang zwischen diesen Prozessen unterstreicht. So konnte gezeigt werden, dass in osteoporotischem Knochen, sowohl die Migration von Osteoblasten, als auch die Expression von Proteinen der EZM reduziert ist (Haasters et al. 2014). Des Weiteren ist bekannt, dass während der Frakturheilung eine Kaskade von Signalwegen in Gang gesetzt wird, um sowohl über Chemotaxis, als auch über Induktion von EZM-Proteinen Migration, Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten gleichermaßen zu initiieren (Tsiridis, Upadhyay, and Giannoudis 2007).

Nichtsdestotrotz sind im Vergleich zu Mechanismen der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten deutlich weniger Details über Migrationsprozesse bekannt, besonders im Hinblick auf eine Nutzung von spezifischen Signalwegen bzw.

bestimmten Molekülen als potentielle Ziele von Therapeutika. So wird bspw. die medikamentöse Osteoporose-Therapie seit Jahren durch primär anti-resorptive Arzneimittel wie Bisphosphonate oder Denosumab dominiert, welche ihre Wirkung hauptsächlich durch Inhibierung der Proliferation und der Aktivität von Osteoklasten entfalten (Corrado et al. 2017). Es ist jedoch ein eindeutiger Trend dahingehend auszumachen, neben anti-resorptiven Medikamenten verstärkt Ressourcen in die Etablierung von primär Knochenbildungsfördernden Therapeutika mit speziellem Fokus auf mit Osteoblasten assoziierten Targets zu investieren (Rachner, Khosla, and Hofbauer 2011), um in Zukunft die Möglichkeit zu haben multimodal in die molekulare Pathogenese der Osteoporose eingreifen zu können. Die steigende Bedeutung der physiologischen Mechanismen von Osteoblasten als potentielle therapeutische Angriffspunkte, sowie das Erachten der Osteoblasten-Migration im Speziellen als Forschungsfeld mit großem Potential, führte mit zu der dieser Arbeit zugrundeliegenden Hypothese.

3 Hypothese

Der, in mehreren Studien, gezeigte starke Zusammenhang zwischen Proteinen der Knochenmatrix mit Migration, Adhäsion sowie Proliferation von Osteoblasten und deren Progenitorzellen führte zu der Annahme, dass die mineralische Komponente der Knochenmatrix ebenfalls in die genannten Prozesse involviert ist, woraus die folgende, dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese entstand:

Demineralisierte Knochenoberflächen induzieren Änderungen in der koordinierten Genexpression von mit Migration, Adhäsion und EZM assoziierten Genen in adhärenenten humanen Osteoblasten.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der explorativen Untersuchung von durch demineralisierte Knochenoberflächen hervorgerufene Änderungen auf Ebene der Genexpression in adhärenenten humanen Osteoblasten. Der Fokus lag dabei auf Genen, welche in den genannten Prozessen eine Rolle spielen. Das Genexpressionsprofil von Zellen, welche nativen mineralisierten Knochenoberflächen exponiert waren, wurde im Vergleich beider Phänotypen als Kontrolle benutzt.

4 Aufgabenstellungen der Arbeit

4.1 1. Entwicklung eines neuen Oberflächenmodells

Zur Bearbeitung der gestellten Hypothese war es ein Ziel dieser Arbeit, ein neues Oberflächenmodell zu entwickeln, mit welchem Änderungen der Genexpression von auf Knochenoberflächen adhären und migrierenden Osteoblasten in Abhängigkeit des Mineralisierungsgrades der Knochenoberfläche gemessen werden können. Gleichzeitig soll es das Modell zudem ermöglichen, die untersuchten Zellen über ein zelluläres Bildgebungsverfahren auf den Knochenoberflächen sichtbar zu machen, um die Bewegung der Osteoblasten mittels Timelapse Aufnahmen quantifizieren zu können. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse sollen zudem innerhalb des Modells sowohl reproduzierbar, als auch mit einer weiteren molekularen Analyseverfahren verifizierbar sein.

4.2 2. Validierung des neuen Oberflächenmodells

Sowohl die in dem neuen Oberflächenmodell verwendeten Zelllinien, als auch die verwendeten Oberflächen sollten unter folgenden Gesichtspunkten validierbar sein:

2.1 Quantifizierung des Mineralisierungsgrades der in dem Modell verwendeten Knochenoberflächen mit einer dafür geeigneten Methode.

2.2 Visuelle Beurteilung mittels zellulärer Bildgebung der in dem Modell verwendeten Zellen hinsichtlich folgender Fragestellungen:

Werden die im Modell verwendeten Zellen durch die bearbeiteten Knochenoberflächen beeinträchtigt?

Sind Unterschiede in der Morphologie und im Adhäsionsverhalten von Zellen auf mineralisierten im Vergleich zu Zellen auf demineralisierten Knochenoberflächen optisch festzustellen?

Ist es möglich mit einem nicht-chemischen und somit Zell-schonenden Verfahren eine ausreichende Anzahl an Zellen von den Knochenoberflächen zu gewinnen, um eine Genexpressionsanalyse durchzuführen?

4.3 3. Anwendung des neuen Oberflächenmodells

Das validierte neue Oberflächenmodell sollte anschließend zur Analyse des Einflusses mineralisierter und demineralisierter Knochenoberflächen auf die globale Genexpression einer humanen Osteoblasten Zelllinie angewendet werden, um die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Hypothese zu untersuchen.

5 Material

5.1 Zellkultur

Tabelle 1: Verwendete Materialien in der Zellkultur

| Produktname | Katalognummer | Firma |
|---|---------------|------------------|
| Penicillin-Streptomycin | 081M0850 | Sigma |
| Trypsin-EDTA Solution | SLBQ5385V | Sigma |
| L-Glutamine | K0283 | Biochrom |
| Fetal Bovine Serum | S0115 | Biochrom |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | 31885-023 | gibco |
| RPMI Medium 1640 | 21875-034 | gibco |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline | D8537-16 | Sigma |
| Osteoblast Growth Medium (OGM) | C-27001 | Promocell |
| Osteoblast Supplement Mix | C-39615 | Promocell |
| DetachKit | C-41210 | Promocell |
| concentrate PAA | 1278723 | Bioxal SA |
| EDTA | 8040.3 | Roth |
| Natronlauge 5mol/l | KK71.1 | Roth |
| Vybrant DiO Cell-labeling Solution | V22886 | molecular probes |
| Destilliertes Wasser | 171858002 | Braun |
| μ -Slide Chemotaxis, Collagen IV-coated | 80322 | Ibidi |
| Aspirationspipetten | 710183 | Greiner Bio-One |
| Kristallviolett | T8154-100ML | Sigma |
| 50 ml Falcons | 352096 | BD |
| Zellkulturflasche 25 cm ² | 690175 | Greiner Bio-One |
| Zellkulturflasche 75 cm ² | 658175 | Greiner Bio-One |
| Zellkulturflasche 175 cm ² | 660175 | Greiner Bio-One |
| 10 cm dish | | Greiner Bio-One |
| Zellkulturschalen 6 cm | 628160 | Greiner Bio-One |

| | | |
|----------------------------------|--------------------------|-----------------|
| Feather Disposable Scalpel | 02.001.30.021 | Feather |
| Polystyrol Pinzetten | 02171/0 | J. Söllner AG |
| Filter Tips 10 µl-1000 µl | Variiert je nach Volumen | Biozym |
| Zellkulturpipetten 2 ml-50 ml | Variiert je nach Volumen | Greiner Bio-One |
| Cell scraper | 541080 | Greiner Bio-One |

5.2 RNA-Extraktion

Tabelle 2: Verwendete Materialien für die RNA-Extraktion

| Produktname | Katalognummer | Firma |
|----------------------|---------------|--------|
| Trizol | T9424 | Sigma |
| Rneasy Plus Mini Kit | 74134 | Qiagen |
| Rnase-Free Dnase Set | 79254 | Qiagen |

5.3 PCR und RT-Reaktion

Tabelle 3: Verwendete Materialien für die PCR und die RT-Reaktion

| Produktname | Katalognummer | Firma |
|---|-------------------------|--------|
| QuantiTect SYBR Green PCR Kit | 204143 | Qiagen |
| QuantiTect Reverse Transcription Kit | 205313 | Qiagen |
| QuantiTect Primer Assay | Variiert je nach Primer | Qiagen |

5.4 Primer

Tabelle 4: Verwendete Primer

| Gen | Gen Symbol | Produktname | Katalognummer | Firma |
|----------------------|---------------|----------------|---------------|--------|
| Collagen Typ 1 A1 | COL1A1 | Mm_Col1a1_2_SG | QT02589482 | Qiagen |
| Hemicentin-1 | HMCN1 | Hs_HMCN1_1_SG | QT00011228 | Qiagen |
| Nidogen-2 | NID2 | Hs_NID2_1_SG | QT00055258 | Qiagen |
| Integrin α 2 | ITGA2 | Hs_ITGA2_1_SG | QT00086695 | Qiagen |

| | | | | |
|--|---------|-----------------|------------|--------|
| Versican | VCAN | Hs_VCAN_1_SG | QT00064064 | Qiagen |
| Matrix metalloproteinase-1 | MMP1 | Hs_MMP1_1_SG | QT00014581 | Qiagen |
| A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 | ADAMTS4 | Hs_ADAMTS4_1_SG | QT00032949 | Qiagen |
| Hyaluronan synthase 2 | HAS2 | Hs_HAS2_vb.1_SG | QT01335180 | Qiagen |
| Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase | GAPDH | Hs_GAPDH_1_SG | QT00079247 | Qiagen |
| Beta-Actin | ACTB | Hs_ACTB_1_SG | QT00095431 | Qiagen |

5.5 Wachstumsfaktoren

Tabelle 5: Verwendete Wachstumsfaktoren

| Wachstumsfaktor | Produktname | Katalognummer | Firma |
|-----------------|--|---------------|-----------------|
| VEGF | VEGF Protein, Human recombinant | 01-185 | Merck Millipore |
| IGF-I | IGF-I Protein, Human Recombinant Animal Free | GF306 | Merck Millipore |
| PDGF-BB | PDGF-BB, recombinant human | GF149 | Merck Millipore |

5.6 Laborgeräte und Werkzeuge

Tabelle 6: Verwendete Laborgeräte und Werkzeuge

| Name | Firma |
|---|--------------------------|
| StepOnePlus Real-Time PCR System (PCR Cycler) | Thermo Fisher Scientific |

| | |
|---|--------------------|
| Zellkultur-Inkubator | Heraeus |
| Nanodrop | |
| Axiovert25 Zellkultur-Mikroskop | Zeiss |
| Observer Z1 Mikroskop | Zeiss |
| Axio Cam MRc | Zeiss |
| Axio Cam MRm | Zeiss |
| CO ₂ - und Inkubations-Modul | Zeiss |
| EXAKT 300 CL Bandsäge | EXAKT, Deutschland |
| Feather Disposable Scalpel | Feather |
| PCR Thermo cycler | Hybaid |

6 Methoden

6.1 Zellreihen

Alle Zellreihen wurden in Zellkulturflaschen oder Petri-Schalen mit Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Inkubator kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte bei sterilen Bedingungen unter einer Laminar Flow Sterilbank. Je nach Zellreihe wurden unterschiedliche Medien mit verschiedenen Zusätzen verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7: Verwendete Zelllinien und Medien

| Zelllinie | Zelltyp | Spender | Medium | Zusätze im Medium |
|--|-----------------------|------------------------------------|---------------|---|
| MG-63 (Abbildung 3, links) | Human, Osteosarkom | 14 Jahre Männlich Kaukasisch | DMEM | 10% FBS 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin |
| Hos/MNNG | Human, Osteosarkom | 13 Jahre Weiblich Kaukasisch | RPMI | 10% FBS 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin |
| Hos | Human, Osteosarkom | 13 Jahre Weiblich Kaukasisch | RPMI | 10% FBS 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin |
| HT1080 | Human, Fibrosarkom | 35 Jahre Männlich Kaukasisch | DMEM | 10% FBS 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin |
| Osteoblasten (Abbildung 3, rechts) | Human, Primär | 86 Jahre Männlich Kaukasisch | OGM | Osteoblast Supplement Mix |

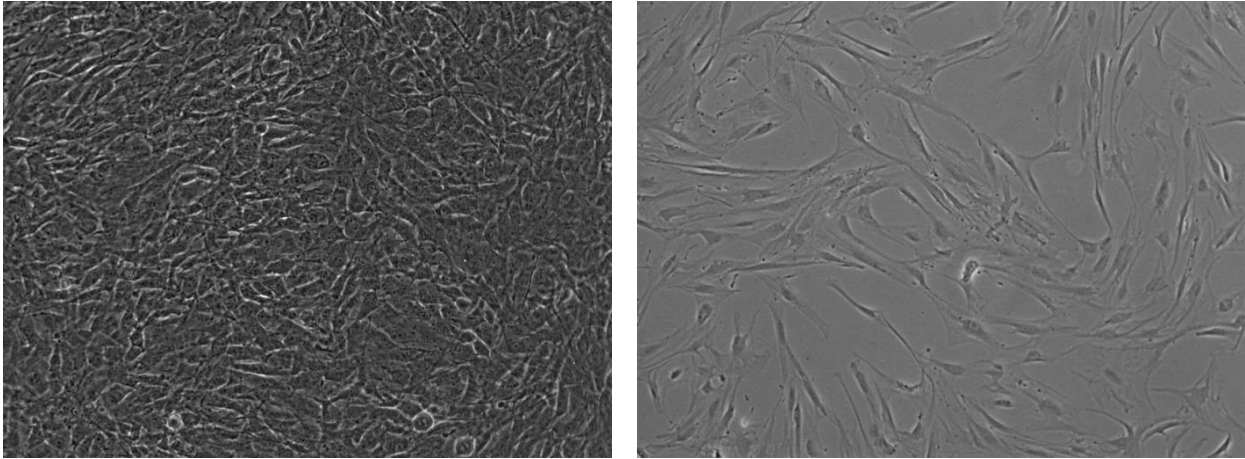


Abbildung 3: Mikroskop-Aufnahmen von MG-63 Zellen und humanen Osteoblasten

MG-63 Zellen (linkes Bild, 10-fache Vergrößerung) bei ca. 90% Konfluenz und humane Osteoblasten (10-fache Vergrößerung, rechtes Bild) bei ca. 50% Konfluenz.

6.2 Subkultivierungsprotokolle

Alle für die Subkultivierung verwendeten flüssigen Substanzen wurden vor Benutzung in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt, sowie bei 4 °C gelagert.

Die Subkultivierung der Zellen erfolgte bei 80-90 % Konfluenz. In einem ersten Schritt wurde das Medium aus der Zellkulturflasche oder der Petri-Schale mit einer Aspirationspipette, welche an eine Vakuumpumpe angeschlossen war, aspiriert. Nach einem Waschschrift mit Phosphate buffered saline (PBS) wurde Trypsin hinzugegeben und die Zellen 7-9 Minuten lang bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, bis sie sich von der Oberfläche ablösten. Um das Trypsin zu inaktivieren wurde nach dem Inkubieren die vierfache Menge an Medium hinzugegeben. Danach wurden die Zellen in ein Zellkulturgefäß mit frischem Medium transferiert. Die Subkultivierung erfolgte alle drei Tage in einem Verhältnis von 5:1.

Die Subkultivierung der humanen Osteoblasten unterschied sich von der Subkultivierung der anderen Zelllinien. Sie erfolgte bei 80 % Konfluenz mit einem DetachKit (Promocell), bestehend aus Hapes-Puffer, Trypsin/EDTA Lösung und Trypsin Neutralisierungslösung (TNS). Nach Aspiration des Medium erfolgte ein Waschschrift mit Hapes-Puffer. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von Trypsin/EDTA Lösung bei Raumtemperatur inkubiert, bis sie sich von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes lösten. Im nächsten Schritt erfolgte die Inaktivierung des Trypsins durch TNS. Die Zellsuspension wurde dann bei 220 g für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand aspiriert. Nach der Zentrifugation wurde OGM hinzugegeben und die Zellen re-suspendiert. Zum Schluss wurde die Zellsuspension in ein Zellkulturgefäß mit frischem Medium transferiert. Die

Subkultivierung der humanen Osteoblasten erfolgte alle drei Tage in einem Verhältnis von 3:1

6.3 Zellzählung

Das Zählen der Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Neubauer-Zählkammer ist eine Glasplatte mit einer H-förmigen Vertiefung welche mit einem Deckglas bedeckt wird. Oberhalb und unterhalb der Vertiefung befindet sich in der Platte jeweils ein Zählraster (Abbildung 4). Durch das Bedecken mit dem Deckglas entsteht zwischen den Zählrastern und dem Deckglas eine Zählkammer mit einer Tiefe von 0,1 mm (Abbildung 5). Die Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit Kristallviolett gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden in beiden Zählrastern jeweils die Zellen gezählt, welche sich in den vier graufarbenen Quadranten (Kantenlänge=1 mm) in den Ecken befanden.

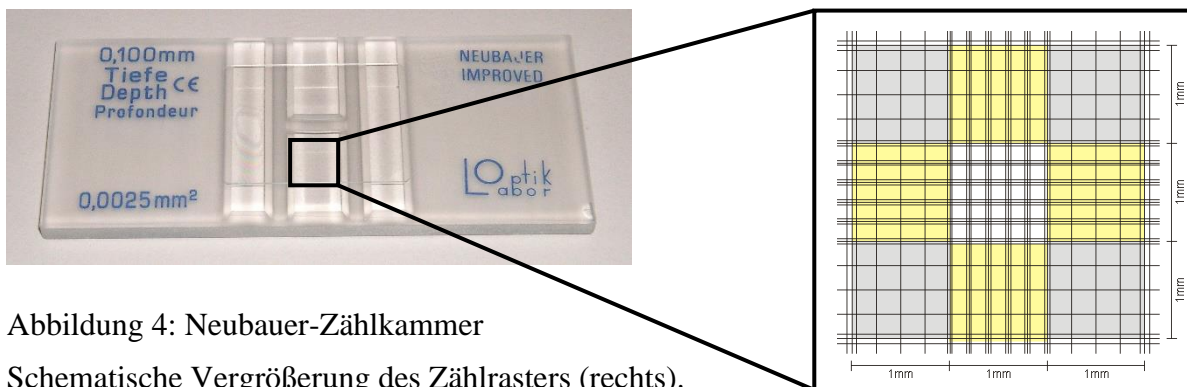


Abbildung 4: Neubauer-Zählkammer

Schematische Vergrößerung des Zählrasters (rechts).

Für die Zellzählung wurden in beiden Zählrastern jeweils die Zellen in den graufarbenen Quadranten gezählt (rechts).

Quelle: <https://de.wikipedia.org/wiki/Z%C3%A4hlkammer>, modifiziert durch den Autor.



Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer (Seitansicht)

Beide Zählraster haben eine Tiefe von 0,1mm. Daraus resultiert ein Volumen von 0,9 mm³ je Zählraster.

Quelle: http://e-learning.studmed.unibe.ch/hemosurf_demo/Demo_D/Lab/count_manual.htm

Die Zellzahl pro Milliliter wurde mit folgender Formel errechnet.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen in allen Quadranten}}{\text{Anzahl der Quadranten (= 8)}} \times \text{Verdünnungsfaktor (= 2)} \times 10^4$$

6.4 Präparation

Unbehandelte Tibia vom Schwein wurde von einem Münchner Schlachthaus bezogen und bei -80 °C gelagert. Nach Auftauen bei Raumtemperatur wurde in einem ersten Schritt die Tibia von umgebendem Gewebe mit einem Skalpell befreit. Anschließend wurde der Knochen mit einer handelsüblichen Handsäge in Stücke zerteilt.

Im nächsten Schritt wurden die Schweine-Tibia in Scheiben (ca. 2 x 3 cm, Dicke=600 µm) zersägt. Hierzu wurden die Knochenstücke in einer elektrischen, mit Wasser gekühlten Diamant-Bandsäge in einer in drei Ebenen verstellbaren Vorrichtung eingespannt und fixiert (Abbildung 6). Die Bandsäge wurde mit einer Geschwindigkeit von 560 m/min betrieben.



Abbildung 6: Fotos der EXAKT 300 CL Bandsäge

Ein Behälter unter der Sägevorrichtung wird mit Wasser befüllt. Dieses wird hochgepumpt, um während dem Sägevorgang das Präparat zu kühlen (linkes Bild). Über das Gewinde, welches sich seitlich an der Verkleidung befindet, wird das Sägeblatt gespannt (linkes Bild).

Das zu sägende Präparat wird in einer stufenlos in alle drei Ebenen verstellbaren Einspannvorrichtung auf dem Schlitten fixiert (rechtes Bild). Der Schlitten wird anschließend über eine Seilrolle mittels frei wählbaren Gewichten auf das Sägeblatt zubewegt. Wasser, welches in einen Behälter unter der Säge gefüllt wird, wird hochgepumpt und kühlt das zu sägende Objekt.
Quelle: privat

6.5 Demineralisierung

Die Entkalkung von Knochen mittels EDTA ist eine gängige Technik zur Aufbereitung von Knochengewebe, beispielsweise zwecks histologischer Färbung. Es ist dabei nicht anzunehmen, dass die Integrität des Gewebes mit Ausnahme des Minerals signifikant

beeinflusst wird (Abrantes et al. 2017). Heutzutage wird die Demineralisierung von Knochengewebe routinemäßig in der Histologie und Histopathologie eingesetzt. EDTA fungiert dabei als Chelatbildner, welcher mit dem im Knochen vorhandenen Kalzium Komplexe bildet und dieses herauslöst.

Die Demineralisierung der gesägten Knochenscheiben erfolgte mit 0,5 M EDTA über 16 Stunden bei Raumtemperatur. Hierzu wurden 30 ml 0,5 M EDTA in ein 50 ml Falcon hinein pipettiert und in diese anschließend die Knochenscheiben platziert. Auf die Knochenscheiben, welche in ihrem nativen mineralisierten Zustand weiterverarbeitet worden sind, wurde das Demineralisierungsprotokoll nicht angewandt.

6.6 Sterilisierung

Die Sterilisierung von Knochenproben mit Essigsäure ist ein gängiges und erprobtes Verfahren (Pruss et al. 2001). Sowohl die mineralisierten, als auch die demineralisierten Knochenscheiben wurden mit 2%iger Essigsäure über 16 Stunden bei Raumtemperatur sterilisiert. Die Falcons wurden über den Zeitraum auf einem rotierenden Plattformschüttler platziert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit PBS ebenfalls über 16 Stunden. Nach dem Waschschrift wurden die Knochenscheiben direkt im Adhäsions-Assay weiterverarbeitet.

6.7 Adhäsions-Assay

Der Adhäsions-Assay wurde unter einer Laminar Flow Sterilbank durchgeführt. Nach Demineralisierung, Sterilisierung und dem Waschschrift wurden die mineralisierten bzw. demineralisierten Knochenscheiben jeweils in einer 6 cm Petrischale platziert. In jede Schale wurde 8 ml DMEM mit 10% FBS, 5% Penicillin/Streptomycin und 5% L-Glutamin hinein pipettiert, sodass die Knochenscheiben vollständig mit Medium bedeckt waren.

MG-63 Zellen wurden anschließend gemäß dem Protokoll subkultiviert und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellsuspension wurde nach dem Zählen bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand aspiriert. Danach wurde DMEM in einer Menge hinzugefügt, dass eine Zellkonzentration von 1,2 Millionen/ml erreicht wurde. In jede Petrischale wurde 1 ml dieser Zellsuspension hinein pipettiert, sodass jede Schale 1,2 Millionen MG-63 Zellen in 9 ml DMEM beinhaltet. Die Petrischalen wurden vorsichtig geschwenkt, sodass die Zellen gleichmäßig auf den Knochenoberflächen und den Oberflächen der Schalen verteilt wurden. Dies wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Im Anschluss daran wurden die Petrischalen 72 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

Nach der Inkubation wurden die Knochenscheiben aus den Petrischalen mit einer sterilen Polystyrolpinzette herausgenommen und jeweils in einer mit 8 ml DMEM gefüllten 6 cm Petrischale platziert. Dann wurden die auf den Knochenscheiben adhärenen MG 63-Zellen vorsichtig mit einem Zellwischer von den Knochenoberflächen entfernt und in dem Medium aufgefangen. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Falcons transferiert, bei 500 g 5 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand aspiriert. 750 µl Trizol wurden zu dem Zellpellet hinzugefügt und die Zellen wurden durch vorsichtiges hoch- und runter-pipettieren re-suspendiert. Im Anschluss daran wurde die RNA der Zellen extrahiert.

Insgesamt wurden 24 Millionen MG-63 Zellen auf 20 Knochenscheiben (10 mineralisierte und 10 demineralisierte) ausgesät. Es wurden insgesamt 10 RNA Extraktionen aus jeweils 2,4 Millionen Zellen von 2 Knochenscheiben durchgeführt. Somit ergaben sich 5 Proben von Zellen, welche auf einer mineralisierten Knochenoberfläche inkubiert wurden und 5 Proben von Zellen, welche auf einer demineralisierten Knochenoberfläche inkubiert wurden. Die RNA aus jeweils 4 Proben wurde für den Microarray benutzt, die RNA aus der jeweils letzten Probe wurde direkt im Anschluss in cDNA umgeschrieben.

6.8 RNA Extraktion

Die RNA Extraktionen wurden mit einem RNeasy Mini Kit (Qiagen) und einem RNase-Free Dnase-Set (Qiagen) gemäß der dem Kit beiliegenden Arbeitsanweisung durchgeführt. Es wurde die Gesamt-RNA extrahiert. Aufgrund der hohen Instabilität der RNA, sowie der Gefahr durch Kontamination mit RNasen, wurde die RNA-Extraktion und einer Laminar Flow Sterilbank durchgeführt. Außerdem wurden Arbeitsflächen und Handschuhe zwischen den Arbeitsschritten mehrmals mit RNase-Away-Spray (Carl Roth) gereinigt.

In einem ersten Schritt wurden die durch das Trizol lysierten Zellpellets jeweils in 1,5 ml Eppendorf Gefäße transferiert. Anschließend wurden zu jeder Probe 125 µl Chloroform hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen der Eppendorf Gefäße wurden diese 15 Minuten bei 12000 rounds per minute (rpm) bei 4 °C zentrifugiert. Das Zentrifugieren führte in den Eppendorf Gefäßen zur Bildung eines wässrigen Überstands, welcher durch vorsichtiges Abpipettieren in neue 1,5 ml Eppendorf Gefäße mit jeweils 700 µl 70% Ethanol transferiert wurde. Anschließend wurden die dem RNeasy Mini Kit beiliegenden Silika-Membran-RNA-Bindungssäulen mit dem Inhalt der Eppendorf Gefäße beladen. Es erfolgten mehrere Waschschritte mit den dem RNeasy Mini Kit beiliegenden Pufferlösungen (RW1 Puffer und RPE Puffer) um die auf den Säulen gebundene RNA von Verunreinigungen zu befreien. Mittels Hinzugeben von DNase auf die Säulen, wurde die RNA von verunreinigender DNA

befreit. In einem letzten Schritt wurde die gereinigte Gesamt-RNA durch Hinzugabe von 40 µl Rnase-freiem destilliertem Wasser und darauffolgendem Zentrifugieren bei 15000 rpm bei 4 °C für 60 Sekunden von den RNA-Bindungssäulen gelöst, und in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert. Diese wurden bis zur Durchführung des Microarray in flüssigem Stickstoff gelagert. Je Probe wurden 1,2 µl dazu verwendet, um die RNA-Konzentration der Proben, sowie die Verunreinigung durch Trizol mittels einem NanoDrop Spektralphotometer (ThermoFischer) zu überprüfen. Nach einer Kalibrierung mit Rnase-freiem Wasser ohne RNA, wurde die Probe auf die optische Messoberfläche des Spektralphotometers pipettiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration durch die Absorption von Licht durch die Probenbestandteile errechnet.

6.9 RNA-Transkription

Ein Teil der extrahierten RNA des demineralisierten Phänotyps (MG-63 Zellen, inkubiert auf demineralisierten Knochenoberflächen) und des mineralisierten Phänotyps (MG-63 Zellen, inkubiert auf mineralisierten Knochenoberflächen) wurde unmittelbar nach der RNA-Extraktion in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde ein QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen), gemäß der beiliegenden Arbeitsanweisung, sowie ein Thermocycler verwendet.

In einem ersten Schritt wurde zu der umzuschreibenden RNA eine Puffer-Lösung (gDNA Wipeout Buffer) hinzugegeben und für 3 Minuten bei 42 °C inkubiert. Durch den gDNA Wipeout Buffer wurde die RNA von Kontaminationen durch DNA gereinigt. Als nächstes wurde eine reverse Transkriptase (RT), ein Primer-Mix, sowie eine Pufferlösung hinzugegeben und für 15 Minuten bei 42 °C inkubiert. Die hinzugefügten Primer binden an das 3' Ende der RNA-Einzelstränge (Abbildung 7, **A**) und dienen der RT als Startpunkt (**B**). Die RT erreicht sowohl ihr Aktivitätsoptimum, als auch ihr Affinitätsoptimum für RNA bei 42 °C und hat als multifunktionelles Enzym zwei unterschiedliche enzymatische Aktivitäten. Als RNA-abhängige-DNA-Polymerase synthetisiert die RT eine zu der RNA komplementäre Polynukleotid-Sequenz in 5'→3' Richtung (**C**). Mit einer enzymatischen RNase-H-Aktivität wird daraufhin der ursprüngliche RNA-Strang durch die RT degradiert (**D**). Nach der bei 42 °C ablaufenden reversen Transkription folgt unmittelbar eine Temperaturerhöhung auf 95 °C für 3 Minuten, welche die RT deaktiviert. Zusammenfassend produziert die RT aus einer Einzelstrang-RNA eine komplementäre Einzelstrang-cDNA.

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert und anschließend für die QRT-PCR verwendet.

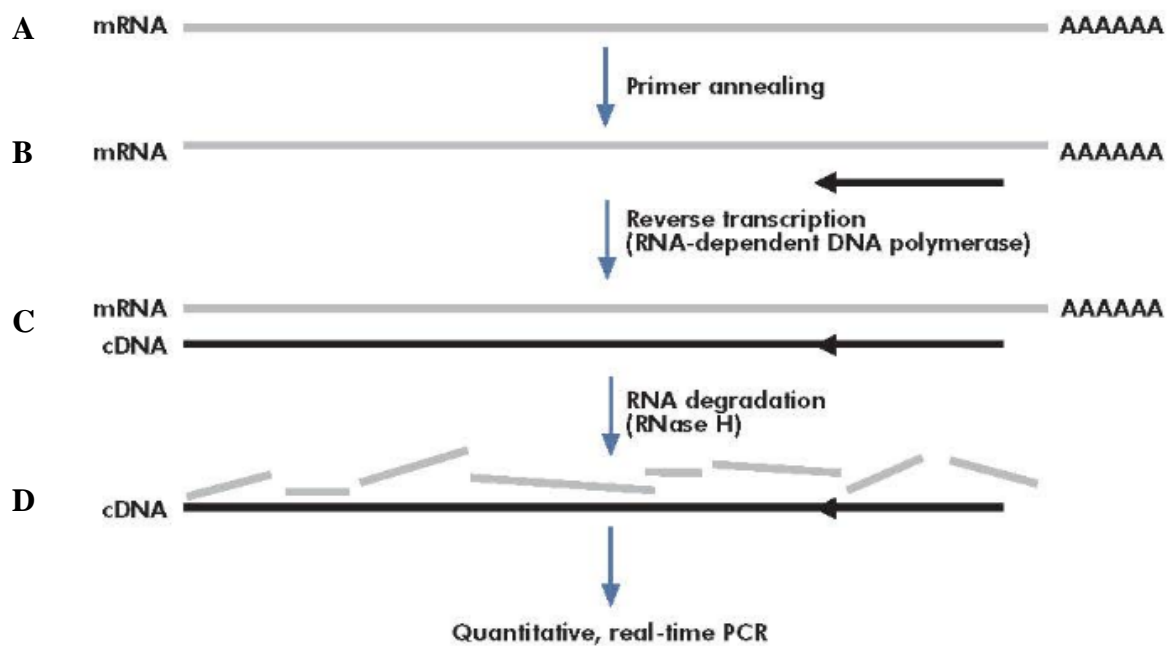


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ablaufs der reversen Transkription Erklärungen zu Schritt **A** bis **D** im Text.

Quelle: QuantiTect-Reverse-Transcription-Handbook; Modifiziert durch den Autor.

6.10 QRTPCR

Mit der transkribierten cDNA wurde eine QRTPCR durchgeführt. Hierfür wurde ein QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) in Kombination mit dem QuantiTect-Primer-Assay (Qiagen) gemäß der den Kits beiliegenden Arbeitsanweisung verwendet. Die QRTPCR wurde mit einem StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Jeder Primer wurde amplifiziert in einem Gesamt-Reaktions-Volumen von 20 μ l je Reaktionsgefäß, bestehend aus 10 μ l QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 2 μ l QuantiTect Primer, 2 μ l cDNA und 6 μ l RNase-freiem Wasser. Es wurden die im Folgenden 8 gelisteten Primer des QuantiTect-Primer-Assays (Qiagen) verwendet (Tabelle 8).

Tabelle 8: Mittels QRTPCR amplifizierte Gene mit Namen und Gen-Symbole

| Gen | Gen-Symbol |
|----------------------------|------------|
| Collagen Typ 1 A1 | COL1A1 |
| Hemicentin-1 | HMCN1 |
| Nidogen-2 | NID2 |
| Integrin α 2 | ITGA2 |
| Versican | VCAN |
| Matrix metalloproteinase-1 | MMP1 |

| | |
|--|---------|
| A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 | ADAMTS4 |
| Hyaluronan synthase 2 | HAS2 |
| Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase | GAPDH |
| Beta-Actin | ACTB |

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode um mittels Primer definierte DNA-Sequenzen, sog. Template-DNA, in vitro mit einer Polymerase in mehreren Schritten (Zyklen) zu vervielfältigen. Hierbei wird das synthetisierte Endprodukt des vorausgegangenen Zyklus als Ausgangsprodukt für den nächsten Schritt benutzt. Dadurch kommt es zu einer exponentiellen Amplifizierung der Template-DNA. Die zu amplifizierenden DNA-Sequenzen werden durch die Zugabe von Primern definiert, welche spezifisch vor oder hinter dem zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt mit dem DNA-Einzelstrang hybridisieren und als Startpunkt für eine DNA-Polymerase dienen. Hierfür wird typischerweise eine hitzestabile DNA-Polymerase (z.B. taq-Polymerase) verwendet, welche bei Temperaturen von über 90 °C ihr enzymatisches Aktivitätsoptimum aufweist. Da die einzelnen Schritte einer PCR nur bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen, werden PCRs in Thermocyclern durchgeführt, welche dynamische Temperaturänderungen ermöglichen. Eine PCR läuft typischerweise in 3 Schritten ab, welche zusammengefasst als ein Zyklus bezeichnet werden.

1. Denaturierung: Die Doppelstränge der zu amplifizierenden DNA werden durch hohe Temperaturen getrennt, sodass nach dem Denaturierungsschritt eine Einzelstrang-DNA vorliegt.
2. Primer-Hybridisierung: Die Primer hybridisieren bei einer spezifischen Temperatur mit dem zu amplifizierenden Einzelstrang-DNA-Abschnitt. Diese Temperatur wird in der Regel niedriger gewählt, als bei dem Denaturierungsschritt.
3. Extensionsschritt: Es wird auf die Temperatur erhitzt, bei der die DNA-Polymerase ihr enzymatisches Aktivitätsoptimum hat. Die DNA-Polymerase benutzt die spezifischen Primer als Startpunkt und synthetisiert einen zu der Template-DNA komplementären Einzel-Strang in 5' → 3' Richtung. Die Polymerase benutzt hinzugefügte

Desoxyribonucleosidtriphosphate als Bausteine für die amplifizierte DNA. Nach Ablauf des Extensionsschrittes beginnt ein neuer Zyklus mit dem Denaturierungsschritt.

Es gibt eine große Anzahl von PCR-Protokollen welche hinsichtlich der Temperaturen, der Dauer der einzelnen Schritte, sowie der Anzahl der durchgeführten Zyklen variieren. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PCRs wurde folgendes Schema verwendet (Tabelle 9).

Tabelle 9: QRTPCR Temperatur-Zyklus

| Schritt | Temperatur | Dauer |
|---|-------------------|--------------|
| <i>Initialer Aktivierungsschritt (aktiviert die HotStar Taq DNA-Polyermase)</i> | 95°C | 15 Minuten |
| 1. Denaturierung | 94 °C | 15 Sekunden |
| 2. Primerhybridisierung | 55 °C | 30 Sekunden |
| 3. Extension | 72 °C | 30 Sekunden |
| Anzahl der Zyklen (Schritt 1.-3.) | 40 | |

Die Besonderheit der QRTPCR besteht darin, dass sich die amplifizierte DNA in Echtzeit nach Ablauf eines Zyklus messen lässt. Hierfür wird dem Reaktionsgemisch ein fluoreszierender DNA-Farbstoff, in diesem Fall SYBR Green (Qiagen), hinzugefügt, welcher mit der DNA interkaliert. Die Menge der amplifizierten DNA je Reaktionsgefäß korreliert mit der Intensität des detektierten Fluoreszenzsignals.

Die Datenanalyse der QRTPCR erfolgt durch Auftragen der Intensitäten der detektierten Fluoreszenzsignale der jeweiligen Proben, gegen die Anzahl der Zyklen (Abbildung 8). Daraus ergibt sich ein sigmoider Verlauf. Der Threshold-cycle-Wert (Ct) gibt an, in welchem Zyklus in einer Probe das erste Mal eine Erhöhung der Intensität des Fluoreszenzsignals oberhalb eines vorher definierten Grenzwertes festgestellt wurde. Der Ct korreliert negativ mit der initialen Menge an Template-DNA in der jeweiligen Probe.

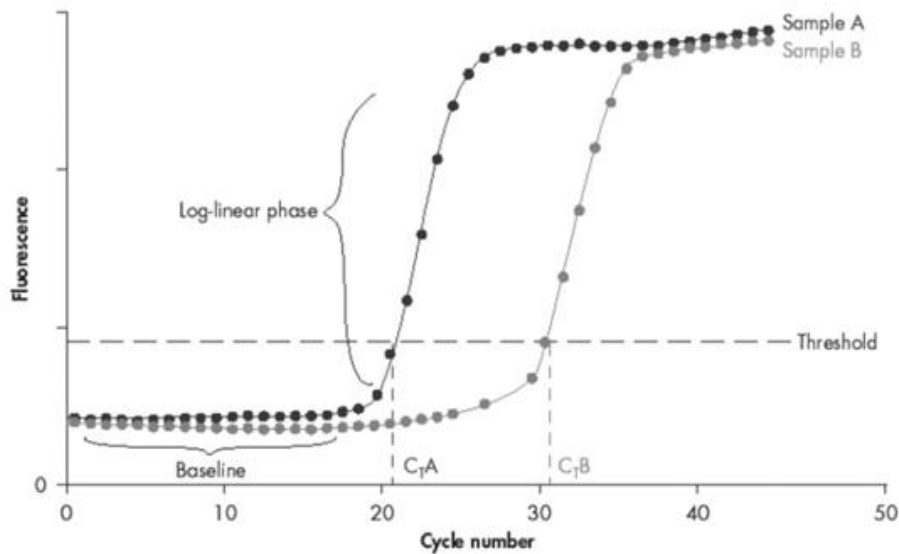


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Ergebnisses einer QRT-PCR

Aufgetragen ist die Zyklusanzahl (X-Achse) gegen die Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals (Y-Achse) für Sample A bzw. Sample B. CtA bzw. CtB bezeichnet den Zyklus, in welchem das gemessene Fluoreszenzsignal einen vorab definierten Grenzwert (Threshold) überschritten hat. Quelle: EN-QuantiTect-Primer-Assay-Handbook, <https://www.qiagen.com/se/resources/resourcedetail?id=882a8baa-29df-4182-a2a5-17083f4dbe11&lang=>

Für die Auswertung der QRT-PCR wurde eine relative Quantifizierung basierend auf der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode, beschrieben in (Livak and Schmittgen 2001) durchgeführt. Die unbehandelte Kontrolle, dient bei der relativen Quantifizierung anschließend als endogene Referenz, d.h. die Genexpression der Behandlung wird relativ zu dieser Kontrolle bestimmt (Schmittgen and Livak 2008). Dazu wurden als interne Referenz-Kontrollen die house-keeping-genes (HKG) Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Beta-Actin (ACTB) jeweils für den mineralisierten- und demineralisierten Phänotyp in der QRT-PCR mitbestimmt. Die für die QRT-PCR verwendeten HKG sollten weder während unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen oder als Reaktion auf die experimentelle Behandlung über einem Maße variieren, welches eine Normalisierung mit Hilfe der HKG nicht aussagekräftig macht (Bollmann et al. 2012). Die ΔCt -Werte, $\Delta\Delta Ct$ -Werte und die relative Gen-Expression (RQ) bzw. der Foldchange (FC) für ein ausgewähltes Gen (X) wurden mit folgenden Formeln berechnet:

$$\Delta Ct_{\text{Behandlung/Kontrolle}} = \text{Mittelwert}_{Ct_X} - \text{Mittelwert}_{Ct_{HKG}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Behandlung}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

6.11 Microarray

Die Microarray-Analysen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Günther Richter (Kinderklinik München Schwabing, Technische Universität München) durchgeführt.

Microarrays sind ein Analyseverfahren um Änderungen der Genexpression qualitativ und quantitativ zu messen. Heutzutage werden Microarrays routinemäßig zur genetischen Analyse von Patientenmaterial verwendet, zudem sind sie in der medizinischen Forschung weit verbreitet (Inaoka, Inokawa, and Nomoto 2015) (Marzancola, Sedighi, and Li 2016). Je nach Art des Microarrays werden verschiedene Array-Typen unterschieden (Inaoka, Inokawa, and Nomoto 2015). Bei einem Expressions-Array wird ein Träger (Mikrochip) verwendet, auf dem DNA-Fragmente der Sequenzen aller bekannten Gene gebunden und chemisch immobilisiert sind. Die zu untersuchenden RNA Proben werden in einem ersten Schritt mit einem fluoreszierenden Molekül markiert. Anschließend wird die RNA in Fluoreszenz-markierte cDNA transkribiert. Durch Aufbringen der Fluoreszenz-markierten cDNA auf das Trägermaterial des Mikrochips kommt es zur Hybridisierung der Proben-DNA mit den jeweiligen komplementären DNA-Sequenzen. Die durch die Hybridisierungen veränderten Fluoreszenzsignale können anschließend durch optische Messverfahren quantifiziert werden. Die Intensität des detektierten Fluoreszenzsignals korreliert somit mit der Gesamtmenge an RNA der ursprünglichen Probe welche für ein bestimmtes Gen kodiert (Inaoka, Inokawa, and Nomoto 2015).

Die Microarrays wurden mit einem Human Gene ST 1.0 Array (Affymetrix) durchgeführt. Dieser erforderte eine minimale RNA-Konzentration von 70 ng/μl, sowie eine Mindestmenge von 3 μl je Probe. Der Human Gene ST 1.0 Chip ist ein Expressions-Array, welcher mit DNA Fragmenten beschichtet ist, die jeweils eine Länge von 25 Nukleotiden aufweisen. Das Expressionsmuster der MG-63 Zellen, welche auf einer mineralisierten bzw. demineralisierten Knochenoberfläche inkubiert wurden, wurde als mineralisierter bzw. demineralisierter Phänotyp bezeichnet. Je Phänotyp wurden 4 Microarrays mit dem Human Gene ST 1.0 Array aus 4 RNA-Proben durchgeführt (n=4). Somit wurden insgesamt 8 Microarray-Analysen durchgeführt. Die gewonnenen Rohdaten der Microarray-Analyse wurden anschließend mittels Robust Multi-array Average Normalisierung (RMA), beschrieben in (Irizarry et al.

2003) automatisch normalisiert. Abbildung 9 zeigt exemplarisch den tabellarischen Aufbau der prozessierten und normalisierten Rohdaten.

| | A | B | C | D | AQ | AR | AS | AT | AU | AV | AW | AX | AY |
|------|--------------|--------------|-------------|-----------------------------|-----------|----------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| 1 | Probe Set ID | Gene Accessi | Gene Symbol | Gene Description | W-ProbeD2 | W-ProbeD | CW-ProbeM2 | W-ProbeM | W_Probe M | W_ProbeD1 | W_ProbeD2 | W_ProbeD4 | W_ProbeM |
| 6695 | 7968270 | NR_002162 | // ATP5EP2 | // ATP synthase, H+ transpo | 201.6799 | 165.93 | 167.5734 | 179.748 | 231.8014 | 119.964 | 152.5076 | 191.5331 | 206.5025 |
| 6696 | 7968272 | --- | --- | --- | 181.6204 | 158.2333 | 180.4269 | 173.8943 | 160.3373 | 170.8839 | 147.5409 | 177.1332 | 137.3717 |
| 6697 | 7968274 | NM_175854 | PAN3 | PAN3 poly(A) specific ribo | 248.9147 | 284.1539 | 269.4555 | 188.8398 | 253.6862 | 239.4001 | 234.7677 | 285.2238 | 306.1342 |
| 6698 | 7968295 | --- | --- | --- | 6.450024 | 10.31893 | 8.254499 | 7.378348 | 7.11135 | 7.92184 | 10.00267 | 8.135694 | 7.826636 |
| 6699 | 7968297 | NM_015932 | POMP | proteasome maturation f | 873.4171 | 854.5072 | 755.0816 | 575.5432 | 765.8213 | 658.5959 | 654.1274 | 590.9839 | 757.0117 |
| 6700 | 7968307 | NM_001033 | KIAA0774 | KIAA0774 | 26.69231 | 24.39683 | 25.07649 | 33.09052 | 22.63438 | 24.26287 | 27.88972 | 25.95542 | 21.0548 |
| 6701 | 7968323 | ENST000004 | LOC440131 | similar to bA90M5.1 (nov | 21.44939 | 18.24739 | 19.28366 | 29.30721 | 16.6643 | 20.16163 | 21.96097 | 18.97499 | 18.18491 |
| 6702 | 7968331 | NM_003347 | UBE2L3 | ubiquitin-conjugating en | 1945.901 | 1487.514 | 1638.656 | 1497.296 | 1373.855 | 1402.754 | 1663.617 | 1127.383 | 1924.57 |
| 6703 | 7968333 | NM_005800 | USPL1 | ubiquitin specific peptid | 124.6592 | 189.7058 | 139.7254 | 95.17348 | 77.75439 | 161.6553 | 135.9147 | 74.89151 | 133.6461 |
| 6704 | 7968344 | NM_001629 | ALOX5AP | arachidonate 5-lipoxygen | 23.8984 | 25.27444 | 25.84636 | 27.03427 | 25.58017 | 30.53242 | 26.25016 | 22.00463 | 25.09433 |
| 6705 | 7968351 | NM_032849 | C13orf33 | chromosome 13 open rea | 21.77579 | 20.35709 | 19.51937 | 19.00516 | 22.4973 | 23.89647 | 252.7943 | 19.02794 | |
| 6706 | 7968361 | BC030277 | C13orf26 | chromosome 13 open rea | 6.01454 | 5.689461 | 6.386166 | 6.477113 | 6.200632 | 5.889373 | 6.076273 | 5.81565 | 5.671655 |
| 6707 | 7968370 | NM_194318 | B3GALT1 | beta 1,3-galactosyltransfe | 42.4068 | 64.90291 | 23.5341 | 36.25737 | 66.84068 | 53.90006 | 63.13953 | 55.91736 | 55.34823 |
| 6708 | 7968389 | NM_130806 | RXFP2 | relaxin/insulin-like family | 9.244424 | 16.82161 | 14.77264 | 11.6665 | 7.495494 | 26.63579 | 29.9248 | 7.700708 | 20.63068 |
| 6709 | 7968411 | NR_027062 | EEF1DP3 | eukaryotic translation elc | 51.52995 | 44.80658 | 62.36662 | 41.02547 | 42.08775 | 53.55553 | 39.20688 | 43.19786 | 50.47087 |
| 6710 | 7968417 | NM_023037 | FRY | furry homolog (Drosophil | 51.62521 | 27.86556 | 78.5003 | 35.09728 | 70.63111 | 29.88954 | 33.18698 | 94.5845 | 65.98638 |
| 6711 | 7968484 | NM_000059 | BRCA2 | breast cancer 2, early ons | 73.1756 | 62.04783 | 75.91367 | 51.44654 | 32.48576 | 73.67918 | 68.06652 | 32.67772 | 124.3454 |
| 6712 | 7968514 | --- | --- | --- | 9.131577 | 9.944846 | 10.8285 | 8.078288 | 11.21645 | 10.27746 | 9.372296 | 11.23912 | 10.79834 |
| 6713 | 7968516 | NM_015032 | PD55B | PD55, regulator of cohesi | 158.1273 | 171.5854 | 118.5705 | 125.1388 | 80.34094 | 160.3838 | 151.4942 | 81.67896 | 182.8267 |
| 6714 | 7968556 | NM_004795 | KL | klotho | 14.67983 | 12.69541 | 15.74356 | 22.00173 | 13.31059 | 15.00998 | 12.37136 | 13.43396 | 13.97853 |
| 6715 | 7968563 | NM_002915 | RFC3 | replication factor C (activ | 294.113 | 233.8893 | 181.4457 | 213.2251 | 40.4241 | 191.7142 | 239.7247 | 35.91645 | 310.4147 |

Abbildung 9: Exemplarische Darstellung eines Microarray-Rohdatensatzes

Dieser Ausschnitt des Datensatzes zeigt die Microarray-Rohdaten nach Normalisierung und Prozessierung. Je Zeile werden für ein untersuchtes Gen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der analysierten Proben (Spalte AQ bis AY) dargestellt. Für jedes gemessene Gen wird außerdem eine Chip-spezifische Identifikationsnummer (Spalte A), die Gene Accession Number (Spalte B), das gebräuchliche Gen Symbol (Spalte C), sowie eine kurze Beschreibung dargestellt (Spalte D). Quelle: privat.

6.12 Knochendichtemessung

Die Osteodensitometrie-Messungen erfolgten in Kooperation mit dem Helmholtz-Zentrum München.

Um die Demineralisierung durch EDTA der Knochenscheiben zu überprüfen und zu quantifizieren wurde eine Knochendichtemessung (Osteodensitometrie) durchgeführt. Die Osteodensitometrie ist ein medizinisch-technisches Verfahren, zur Bestimmung der Knochendichte. Heutzutage wird es im klinischen Alltag routinemäßig zur Diagnose und Verlaufskontrolle der Osteoporose und anderen Stoffwechselerkrankungen, welche mit einem Substanzverlust des Knochens einhergehen, eingesetzt (Kanis et al. 2013). Neben der quantitativen Computertomographie wird die dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) als Verfahren genutzt. DEXA ist eine Technik, bei der die zu untersuchende Probe simultan durch zwei Röntgenquellen mit unterschiedlicher Intensität durchstrahlt wird. Hierbei wird die dreidimensionale Struktur des Knochens als zweidimensionale planare Ebene abgebildet. Anschließend wird durch die Absorption der Röntgenstrahlung die Masse an Kalziumkristallen pro Fläche ermittelt.

Es wurde eine DEXA) mit dem Faxitron Ultrafocus (Faxitron Bioptics LCC, Tucson, AZ) in Kombination mit der Vision DXA Version 2.4.2 Software durchgeführt. Die Datenakquirierung erfolgte sequentiell bei 40 kV/0.28 mA und 80 kV/0.14 mA. Die Demineralisierung und Sterilisierung der untersuchten Knochenscheiben wurde gemäß dem Demineralisierungs- bzw. Sterilisierungsprotokoll durchgeführt. Es wurden insgesamt fünf mineralisierte und fünf demineralisierte Knochenscheiben analysiert (Abbildung 10).

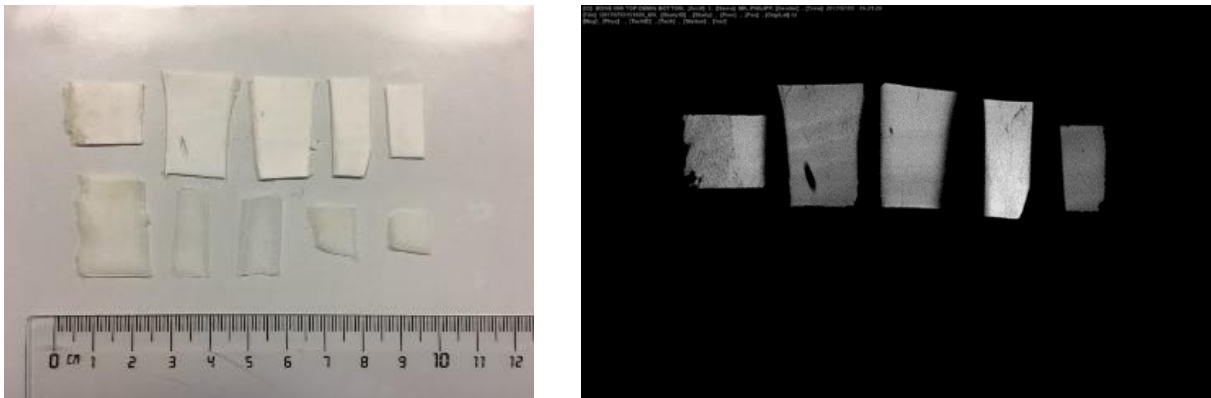


Abbildung 10: Osteodensitometrie

Die Fotos zeigen 5 mineralisierte Knochenscheiben (jeweils in der oberen Reihe) und 5 demineralisierte Knochenscheiben (jeweils in der unteren Reihe). Das linke Foto zeigt die nativen präparierten Knochenscheiben. Die beiden Fotos auf der rechten Seite zeigen die Knochenscheiben im Faxitron Ultrafocus dargestellt nach ihrem Mineralgehalt (rechts oben), sowie als funktionelle Aufnahme (rechts unten).

Quelle: privat

6.13 Fluoreszenz-Mikroskopie

Mit der Fluoreszenz-basierten Markierung von MG-63 Zellen auf mineralisierten und demineralisierten sterilisierten Knochenscheiben wurde optisch das Adäsionsverhalten der Zellen, sowie das Überleben nach Inkubation auf den prozessierten Oberflächen überprüft. Außerdem wurde untersucht, ob die Zellen abhängig von der Qualität der Oberfläche (mineralisiert bzw. demineralisiert) Unterschiede in ihrer Morphologie und ihrem Adhäsionsverhalten zeigten. Die Markierung der MG-63 Zellen mittels fluoreszierendem Farbstoff wurde mit einem Vybrant Cell-Labeling Solutions Kit, DiD-Tracer (Molecular Probes) gemäß der dem Kit beiliegenden Arbeitsanweisung für das Färben von

Zellsuspensionen durchgeführt. Die DiD-Tracer werden bei einer Wellenlängen-Maximum von 644 nm erregt und emittieren Licht mit einem Wellenlängen-Maximum von 665 nm. In einem ersten Schritt wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 1 Millionen MG-63 Zellen/ml erstellt. Dann wurden 5 µl der Färbe-Lösung hinzugegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit der Zellsuspension vermischt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einer 6 cm Petrischale 20 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension bei 1500 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand aspiriert und so viel von in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmtem DMEM hinzugegeben, dass die gefärbte Zellsuspension eine Konzentration von 1,2 Millionen Zellen/ml aufwies.

Im Folgenden wurde eine mineralisierte und eine demineralisierte Knochenscheibe jeweils in einer 6 cm Petrischale platziert und mit 8 ml DMEM vollständig bedeckt. Die verwendeten Knochenscheiben wurden davor, dem Sterilisations- bzw. Demineralisierungsprotokoll folgend, sterilisiert bzw. demineralisiert. Daraufhin wurde 1 ml der gefärbten Zellsuspension in die Petrischale pipettiert. Durch vorsichtiges Schwenken der Schale wurde die Zellsuspension gleichmäßig auf der Knochenoberfläche und der Schalen-Oberfläche verteilt. Die mineralisierten bzw. demineralisierten Knochenscheiben wurden anschließend 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Petrischalen mit den Knochenscheiben in einer Mikroskopgekoppelten Inkubationskammer bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und mit einem Z1-Observer Mikroskop (Zeiss) mikroskopiert und fotografiert. Hierzu wurden die fluoreszierenden Moleküle mittels einer Fluoreszenzlampe angeregt. Die Aufnahmen erfolgten mit der AxioCamMR3 in Kombination mit einem 45 Texas Red Filter und folgenden Objektiven mit Phasenkontrast: EC Plan-Neofluar 10x/0.30 Ph 1, LD A-Plan 20x 0.3 Ph1, LD A-Plan 32x/0.40 Ph und LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr Ph 2 M27.

6.14 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

Die in den Microarray-Analysen gewonnenen Rohdaten wurden mit der Software GSEA, (Broad Institute) in Kombination mit der MSigDB (Broad Institute) (Subramanian et al. 2005) (Liberzon et al. 2011) analysiert und ausgewertet. Insgesamt wurden 20693 Gene mit GSEA analysiert. Die Microarray Rohdaten wurden mit den C 5 GO (Gene Ontology) Gene Sets (insgesamt 5917 Gene Sets) der MSigDB verglichen. Diese beinhalten die Subklassen GO biological process (4436 Gene Sets), GO cellular component (580 Gene Sets) und GO molecular function (901 Gene Sets). Nachdem Gene Sets mit <15 Genen und >10000 Genen

für die Analyse ausgeschlossen worden sind, wurden insgesamt 4865 Gene Sets untersucht. In einem ersten Schritt wurden zwei Phänotyp Klassen definiert. Hierbei entsprach Phänotyp 1 dem mineralisierten Phänotyp (Expressionsprofil der MG-63 Zellen, inkubiert auf mineralisierten Knochenoberflächen) und Phänotyp 2 dem demineralisierten Phänotyp (Expressionsprofil der MG-63 Zellen inkubiert auf demineralisierten Knochenoberflächen).

Die Rohdaten wurden komprimiert, indem für jedes untersuchte Gen der FC mit folgender Formel errechnet wurde:

$$\log_2(FC) = \log_2 \left(\frac{\text{Mittelwert der Fluoreszenzwerte } (n = 4)_{\text{mineralisierter Phänotyp}}}{\text{Mittelwert der Fluoreszenzwerte } (n = 4)_{\text{demineralisierter Phänotyp}}} \right)$$

Abbildung 11 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt der komprimierten Daten. In der linken Spalte sind die Gensymbole gelistet. In der rechten Spalte die zur Basis 2 logarithmierten FC für das jeweilige Gen. Ein negativer log2 FC zeigt eine stärkere Expression des Genes im demineralisierten Phänotyp, ein positiver log 2 FC, eine stärkere Expression im mineralisierten Phänotyp. Die Daten wurden anschließend als .rnk Datei in GSEA eingespeist und analysiert.

| | |
|---------|------------|
| HEY1 | -2.4402776 |
| SULF2 | -2.4410317 |
| NPR3 | -2.4636428 |
| PRRX1 | -2.4775364 |
| VCAN | -2.4895008 |
| DSE | -2.496271 |
| MIR21 | -2.5189474 |
| ACPP | -2.539953 |
| C5ORF23 | -2.5572124 |
| MIR31 | -2.595794 |
| TSPAN13 | -2.6334343 |
| EPHA3 | -2.6559665 |
| BPGM | -2.742249 |
| PRR5L | -2.7462554 |
| C5ORF13 | -2.7526848 |
| PGM2L1 | -2.7959561 |

Abbildung 11: Exemplarischer Ausschnitt der komprimierten Microarray-Daten

Erklärungen im Text. Quelle: privat

Im Unterschied zu anderen Analyseverfahren für Microarray Daten, trifft GSEA weniger Aussagen über einzelne Gene, als über die Korrelation von Gene Sets mit dem jeweiligen untersuchten Phänotyp (Subramanian et al. 2005). Gene Sets, sind eine auf publizierten Ergebnissen basierende vorab definierte Gruppe von Genen mit beispielsweise einer

ähnlichen biologischen Funktion, einer ähnlichen chromosomalen Lokalisation oder einem ähnlichen Regulationsmechanismus (Subramanian et al. 2005). Ein Gen kann dabei in mehreren untersuchten Gene Sets vertreten sein. Die Fokussierung auf mehrere Stoffwechselwege erleichtert die Interpretation und das Treffen von globalen Aussagen hinsichtlich Genexpressionsprofilen mehrerer Phänotypen (Subramanian et al. 2005). GSEA benutzt die verwendete .rnk Datei als Rangliste, in der Gene mit dem größten positiven log₂ FC (stärkste Korrelation mit Phänotyp 1) oben auf der Liste gelistet und Gene mit dem größten negativen log₂ FC (stärkste Korrelation mit Phänotyp 2) unten gelistet werden. Anschließend untersucht die Software anhand von unterschiedlichen Parametern für jedes vorab definierte Gene Set, ob die dem Gene Set zugehörigen Gene präferentiell oben oder unten in der erstellten Rangliste verteilt sind. Folgende Parameter werden von GSEA für ein Gene Set bestimmt (Abbildung 12) Die Details der einzelnen Parameter werden in Tabelle 10 erklärt.

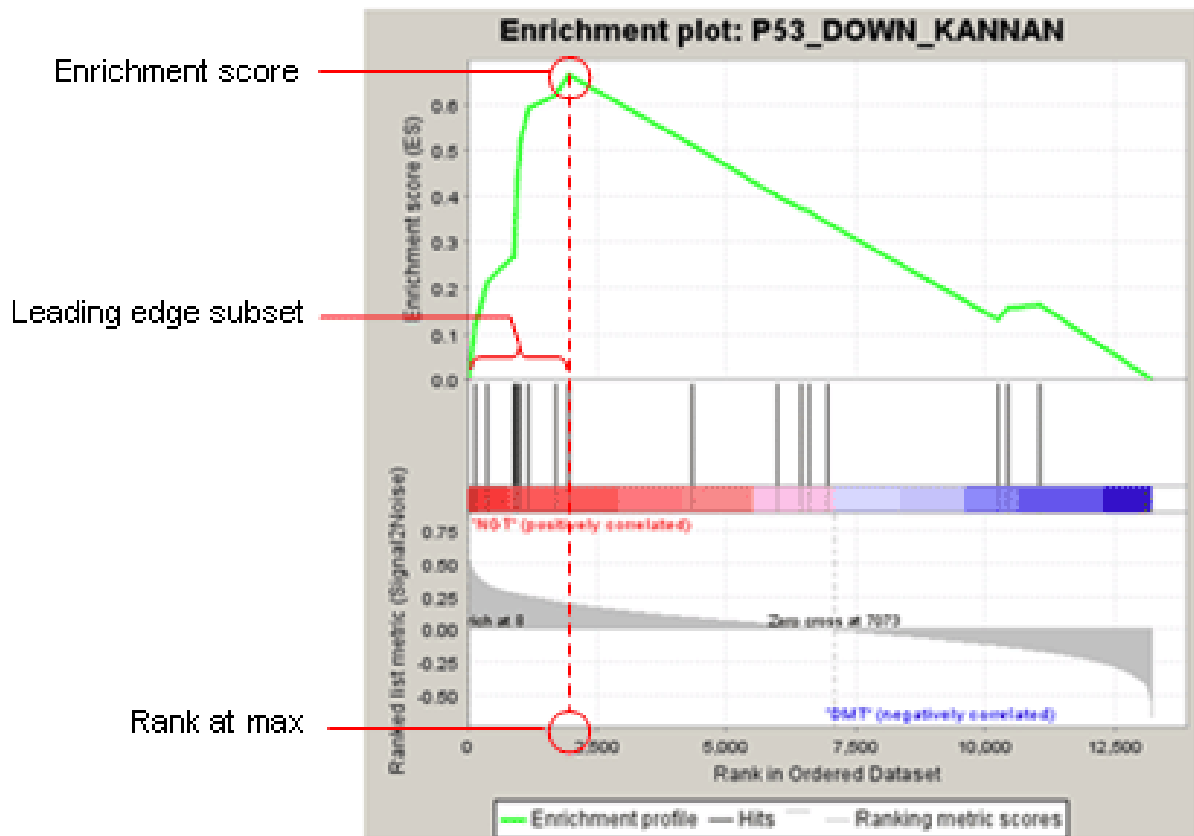


Abbildung 12: GSEA-Parameter

Diese Abbildung zeigt exemplarisch einen Enrichment plot für ein mit GSEA analysiertes Gene Set. Eine positive Korrelation (rot) zeigt eine starke Korrelation mit Phänotyp 1 an. Eine negative Korrelation (blau) zeigt eine starke Korrelation mit Phänotyp 2 an. Jeder vertikal verlaufende schwarze Strich entspricht einem Gen innerhalb des analysierten Gene Sets (Hits). Der bei der Untersuchung dieses Gene Sets erzielte Enrichment Score schneidet den dazu korrespondierenden Wert des Rank at max (grüne Linie, Enrichment profile).

Quelle:

http://software.broadinstitute.org/gsea/doc/GSEAUserGuideFrame.html?_Interpreting_GSEA_Results

Tabelle 10: Gene Set Parameter (GSEA)

| Gene Set Parameter | Definition |
|--|--|
| Größe | Anzahl der Gene in dem untersuchten Gene Set. Gene Sets mit <15 und >10000 Genen wurden aus der Analyse ausgeschlossen. |
| Enrichment Score (ES) | Der ES (Abbildung 12) gibt an, wie stark ein analysiertes Gene Set mit einem Phänotyp korreliert. Hierzu wird das Gene Set mit der Rangliste dynamisch verglichen. Zu Anfang wird ein ES von 0 angenommen. Der ES wird fortlaufend erhöht, wenn ein Gen in der Rangliste zu einem Gene Set gehört. Dies wird als „Gene Hit“ bezeichnet. Umgekehrt wird der ES erniedrigt, wenn ein Gen in Rangliste gelistet ist, aber nicht zu dem Gene Set gehört. Je stärker die Korrelation mit einem Phänotyp, d.h. je größer der Betrag des FC, desto stärker wird der ES erhöht, wenn das betreffende Gen in der Rangliste einem Gene Set angehört. Ein positiver ES mit hohem Betrag, zeigt somit eine starke Korrelation mit Phänotyp 1, ein negativer ES mit hohem Betrag eine starke Korrelation mit Phänotyp 2 an (Subramanian et al. 2005). |
| Normalized Enrichment Score (NES) | Der NES wird aus dem ES errechnet. Um ES untereinander vergleichbar zu machen werden diese basierend auf der Anzahl an Genen des korrespondierenden Gene Sets normalisiert (Subramanian et al. 2005). |
| Nom p-value | Der nominale p-Wert gibt die statistische Signifikanz eines ES für ein Gene Set an. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,1% festgelegt. Eine Nullhypothese wird generiert, indem Gene zufällig Gene Sets zugewiesen werden, ohne die Anzahl der Gene je Gene Set zu verändern. Für jedes dieser permutierten Gene Sets wird ein ES errechnet. Anschließend wird der ES des untersuchten Gene Sets mit den ES der permutierten Gene Sets auf signifikante Unterschiede hin analysiert. Für die untersuchten Daten wurden für jedes Gene Set 1000 Permutationen festgelegt. |

| | |
|-----------------------------------|--|
| False discovery rate (FDR) | Die FDR gibt für jedes untersuchte Gene Set die Wahrscheinlichkeit eines falsch positiven Ergebnisses an. Bei einer kleinen Anzahl von Proben je Phänotyp wird empfohlen, Gene Sets mit einer FDR <25% als relevant anzusehen (Subramanian et al. 2005). |
| Rank at max | Über den maximalen Rang (Abbildung 12) wird angegeben, an welcher Position der Rangliste für ein Gene Set der maximale ES erzielt wurde. Ein Gene Set, welches stark mit Phänotyp 1 korreliert, weist einen niedrigen maximalen Rang auf. Umgekehrt weist ein stark mit Phänotyp 2 korrelierendes Gene Set einen hohen maximalen Rang auf. |
| Leading Edge Subset | Das Leading Edge Subset (Abbildung 12) umfasst die Gene, welche am meisten zum Erzielen des ES eines Gene Sets beigetragen haben. Diese befinden sich in der Rangliste vor (bei positivem ES) bzw. nach (bei negativem ES) der Position, die dem Rank at max entspricht. |
| Leading Edge | Hierbei werden drei Statistiken unterschieden. „% List“ gibt den prozentualen Anteil der Rangliste an, der vor (bei positivem ES) oder nach (bei negativem ES) Erzielen des maximalen ES analysiert wurde. „% Tags“ ist der prozentuale Anteil an „Gene Hits“ in der Rangliste, welche vor (bei positivem ES) oder nach (bei negativem ES) registriert wurden. „% Signal“ kombiniert die vorherigen beiden statistischen Werte. „% Signal“ würde einen Wert von 100 annehmen, wenn n Gene eines Genesets mit den ersten n Positionen der Rangliste übereinstimmen würden. Wenn die Gene des untersuchten Gene Sets gleichmäßig über die Rangliste verteilt sind, sinkt „% Signal“ gegen 0. |

Außerdem werden folgende Details für jedes Gen innerhalb eines Gene Sets angegeben (Tabelle 11).

Tabelle 11: Parameter für jedes Gen innerhalb eines Gene Sets

| Gen Parameter | Definition |
|----------------------------------|--|
| Rang in Rangliste | Position des Gens innerhalb der erstellten Rangliste. |
| Rang-Score | Score, der benutzt wurde, um die Position des Gens in der Rangliste zu definieren. In diesem Fall wurde der logarithmierte FC benutzt. |
| Running ES | Der Running ES ist der dynamische ES, der erzielt wurde, als das entsprechende Gen als „Gene Hit“ registriert wurde. |
| Core Enrichment (Ja/Nein) | Dieser Parameter gibt an, ob ein Gen zu dem leading edge subset eines Gene Sets gehört. |

Nach der Analyse mit GSEA wurden ausgewählte Gene aus Gene Sets anschließend mittels QRTPCR amplifiziert, um die Expressionsunterschiede zwischen den Phänotypen zu verifizieren. Um Microarray-Daten zu bewerten, ist dies eine Möglichkeit im Microarray analysierten Gene selektiv mittels QRTPCR zu validieren (Chen et al. 2007). Hierbei wird der im Microarray gemessene Unterschied eines Genes mit dem in der QRTPCR gemessenem Unterschied desselben Genes bestätigt.

6.15 Methodischer Aufbau des entwickelten Oberflächenmodells

Um die dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese zu untersuchen, wurde ein neues in-vitro Modell entwickelt. Hierzu wurden die im Voraus beschriebenen Methoden in einem gemeinsamen Arbeitsablauf kombiniert. Dieser wird im Folgenden schematisch dargestellt (Abbildung 13).

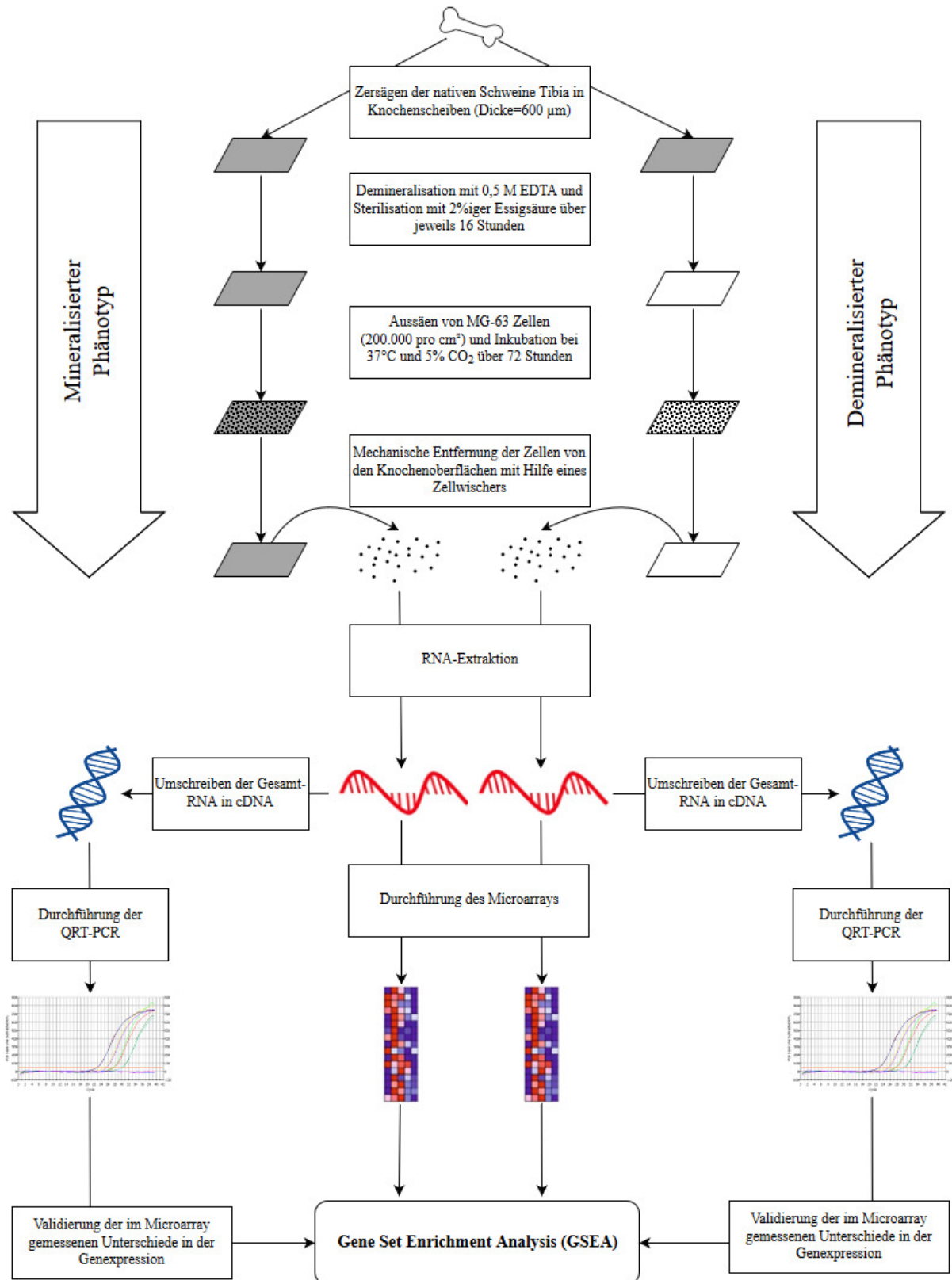


Abbildung 13: Methodischer Aufbau des neu entwickelten Oberflächenmodells

Die Abbildung zeigt schematisch die Abfolge der verwendeten Methoden des in dieser Arbeit neu entwickelten in-vitro Oberflächenmodells. Alle Methoden wurden jeweils zur Untersuchung des mineralisierten Phänotyps (links) und des demineralisierten Phänotyps (rechts) angewandt. Grafik erstellt durch den Autor mit draw.io (<https://www.draw.io/>).

6.16 Migrations-Assay

Eine zusätzliche Aufgabenstellung der Arbeit war es, die Bewegung der in dem Modell untersuchten Osteoblasten mittels Timelapse Aufnahmen zu quantifizieren. Hierbei wurde sich für diese Arbeit zum Ziel gesetzt, qualitative und quantitative Aussagen über verschiedene Chemokine für mehrere Osteoblasten-Zellreihen zu treffen. Es wurden die Chemokine PDGF-BB, VEGF-A, IGF-1 und FBS untersucht, da diese nach Literaturrecherche als vielversprechende Chemokine für Osteoblasten erachtet wurden. Es wurden die Zellreihen MG-63, Hos, Hos/MNNG, sowie primäre humane Osteoblasten analysiert. Dabei wurden die Zellen in mehreren Migrations-Assays über zwölf Stunden definierten Konzentrationsgradienten der Chemokine ausgesetzt. Währenddessen wurden Timelapse Aufnahmen (Aufnahmen in definierten Zeitabständen über einen bestimmten Zeitraum) durchgeführt um das Verhalten der Zellen über den Zeitraum des Versuchs zu dokumentieren.

Die Migrations-Assays wurden mit μ -slides Chemotaxis Collagen IV (Ibidi) durchgeführt. Die Timelapse-Aufnahmen wurden in Intervallen von zehn Minuten über einen Zeitraum von zwölf Stunden gemacht. Die Aufnahmen wurden von einer monochromatischen Kamera (AxioCam MR3, Zeiss), welche in ein Observer Z1-Mikroskop (Zeiss) integriert war. Über die Dauer der Timelapse-Aufnahmen wurden die μ -slides Chemotaxis Collagen IV in einer an das Mikroskop gekoppelten Inkubationskammer bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

μ -slides Chemotaxis Collagen IV (Abbildung 14, links) sind transparente Kammern aus Kunststoff, in denen sich gegen den Gradienten eines wählbaren Chemokins gerichtete Zellmigration in Echtzeit beobachten lässt. Das Innere der Kammern ist mit Kollagen IV beschichtet.



Abbildung 14: µ-slide Chemotaxis

Die Abbildung zeigt ein Foto einer befüllten µ-slide Chemotaxis (links), sowie schematisch eine inkubierte µ-slide Chemotaxis (rechts). Während der Inkubation wird die Kammer in einer Petrischale platziert, sowie mit befeuchteten Kompressen umlegt, um der Verdunstung des Chemokins, der Kontrollsubstanz und des verwendeten Zellmediums entgegen zu wirken. Quelle: <http://ibidi.com/channel-slides/9--slide-chemotaxis-ibitreat.html>

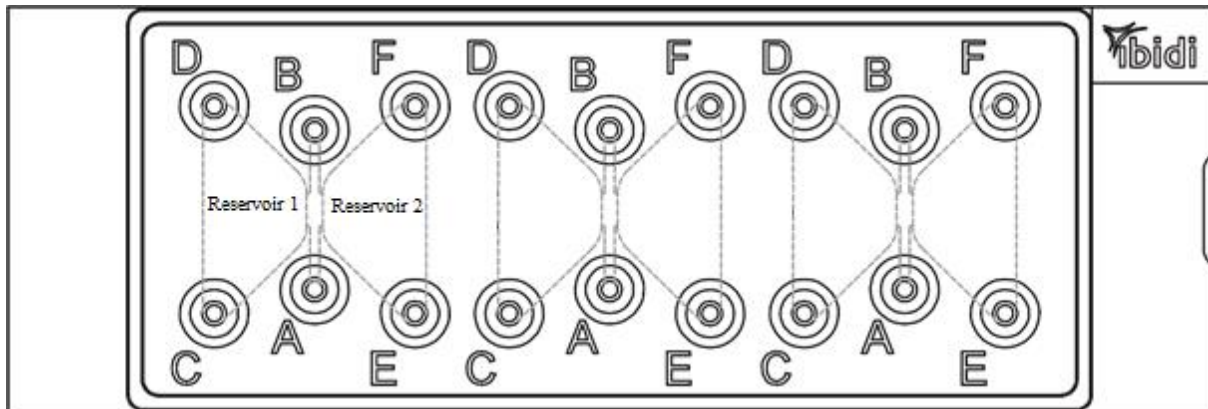


Abbildung 15: Aufbau der µ-Slide Chemotaxis

Für Reservoir 1 bzw. Reservoir 2 gibt es jeweils zwei Öffnungen (C und D bzw. E und F), über welche die Chemokine in die Reservoirs hinein pipettiert werden. Außerdem gibt es für jeweils zwei Reservoirs zwei Öffnungen (A und B) in welche die Zellsuspension hinein pipettiert wird. Quelle: <http://ibidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Chemotaxis-Slides/m-Slide-Chemotaxis>; modifiziert durch den Autor.

Die Kammern wurden in einem ersten Schritt unter einer Laminar Flow Sterilbank mit einer Zellsuspension mit einer Konzentration von 3 Millionen Zellen/ml befüllt. Hierzu wurden zunächst die Öffnungen C, D, E und F (Abbildung 15) mit Steckern verschlossen. Dann wurden 6 µl der Zellsuspension auf die Öffnung A pipettiert. Als nächstes wurde die gleiche Menge an Luft aus Öffnung B vorsichtig mit einer Pipette aspiriert. Die Zellsuspension verteilte sich daraufhin gleichmäßig in dem Lumen zwischen Öffnung A und Öffnung B. Dies wurde anschließend unter dem Mikroskop kontrolliert. Alle Stecker wurden entfernt und die befüllte Kammer wurde für 2-3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in einer 10 cm Petrischale

inkubiert, um eine Adhäsion der Zellen in der Kammer zu gewährleisten. Um die Evaporation zu minimieren wurden in der Petrischale zwei mit sterilem PBS befeuchtete sterile Kompressen platziert (Abbildung 14, rechts).

Nach der Inkubation wurde eine Adhäsion aller Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend wurden Reservoir 1 und 2 (Abbildung 16) der Kammer unter einer Laminar Flow Sterilbank mit einem Chemokin, bzw. mit der Kontrollsubstanz befüllt. Hierzu wurden zunächst alle, bis auf die dem Reservoir zugehörigen Öffnungen mit Steckern verschlossen. Anschließend wurden 65 μl Chemokin bzw. Kontrollsubstanz direkt in eine Öffnung des entsprechenden Reservoirs pipettiert. Durch eine durchgängige Verbindung zwischen beiden Reservoirs und dem Lumen, in dem sich die Zellen befinden, bildete sich dadurch ein linearer Gradient des Chemokin, dem die adhärenen Zellen ausgesetzt waren (Abbildung 16). Es wurden Timelapse-Aufnahmen mit den in Tabelle 12 gelisteten Zellreihen und Chemokine über jeweils 12 Stunden durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten von dem „Tunnel“ zwischen Öffnung A und B (Abbildung 17).

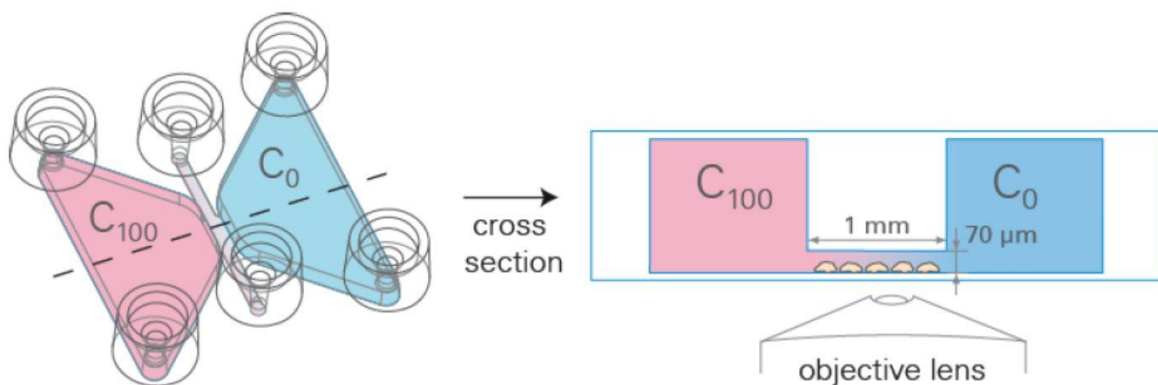


Abbildung 16: Chemotaktischer Gradient in der μ -slide Chemotaxis

Das rötlich hervorgehobene Reservoir C_{100} enthält das Chemokin, das bläulich dargestellte Reservoir C_0 das Kontrollmedium. Der „Tunnel“, in welchem die Zellen adhären, hat eine Länge von 1 mm und eine Höhe von $70\ \mu\text{m}$. Quelle: <https://ibidi.com/channel-slides/9--slide-chemotaxis-ibitreat.html>



Abbildung 17: MG-63 Zellen während der Timelapse-Aufnahme
 Aufnahme mit der Schwarz-Weiß-Kamera des Observer Z-1. Während
 den Timelapse-Aufnahmen wird die Zellmigration entlang dem
 chemotaktischen Gradienten in Richtung des mit dem Chemokin
 befüllten Reservoirs verfolgt. Vergrößerung: 10x. Quelle: privat

Tabelle 12: Analytierte Zelllinien im Migrations-Assay

| Zellreihe | Reservoir 1 (Chemokine) | Reservoir 2 (Kontrolle) |
|-----------|---|-------------------------|
| MG-63 | DMEM (10%FBS) | DMEM (ohne FBS) |
| | VEGF/PDGF/IGF (50 ng/ml) + DMEM (ohne FBS) | DMEM (Ohne FBS) |
| Hos | DMEM (10%FBS) | DMEM (ohne FBS) |
| | VEGF (50 ng/ml) + DMEM (ohne FBS) | |
| HT-1080 | DMEM (10%FBS) | DMEM (ohne FBS) |
| Hobs | DMEM (10%FBS) | DMEM (ohne FBS) |
| Hos/MNNG | DMEM (10%FBS) | DMEM (ohne FBS) |

Die Datenakquirierung erfolgte mit dem Manual Tracking Plugin für die ImageJ Software (NIH) bzw. der WimTaxis Software (Wimasis Image Analysis). WimTaxis ermöglicht ein automatisiertes Tracken der Zellen. Dabei werden den beobachteten Zellen in jeder einzelnen Timelapse-Aufnahme x- und y-Koordinaten zugewiesen. Da die WimTaxis Software Schwierigkeiten hatte, durch die Morphologie der humanen Osteoblasten diese voneinander

zu unterscheiden, wurde die Datenaquirierung der Timelapse-Aufnahmen der humanen Osteoblasten durch den Autor manuell mit dem Manual Tracking Plugin für die ImageJ Software durchgeführt. Sowohl bei der automatisierten als auch bei der manuellen Analyse wurden die ermittelten Koordinaten anschließend in das Chemotaxis&Migration Tool (Ibidi) eingelesen und ausgewertet. Alle statistischen Tests und Diagramme wurden mit dem Chemotaxis&Migration Tool durchgeführt und erstellt.

Für jeden ausgewerteten Koordinaten-Datensatz werden durch die Software folgende Parameter errechnet (Abbildung 18):

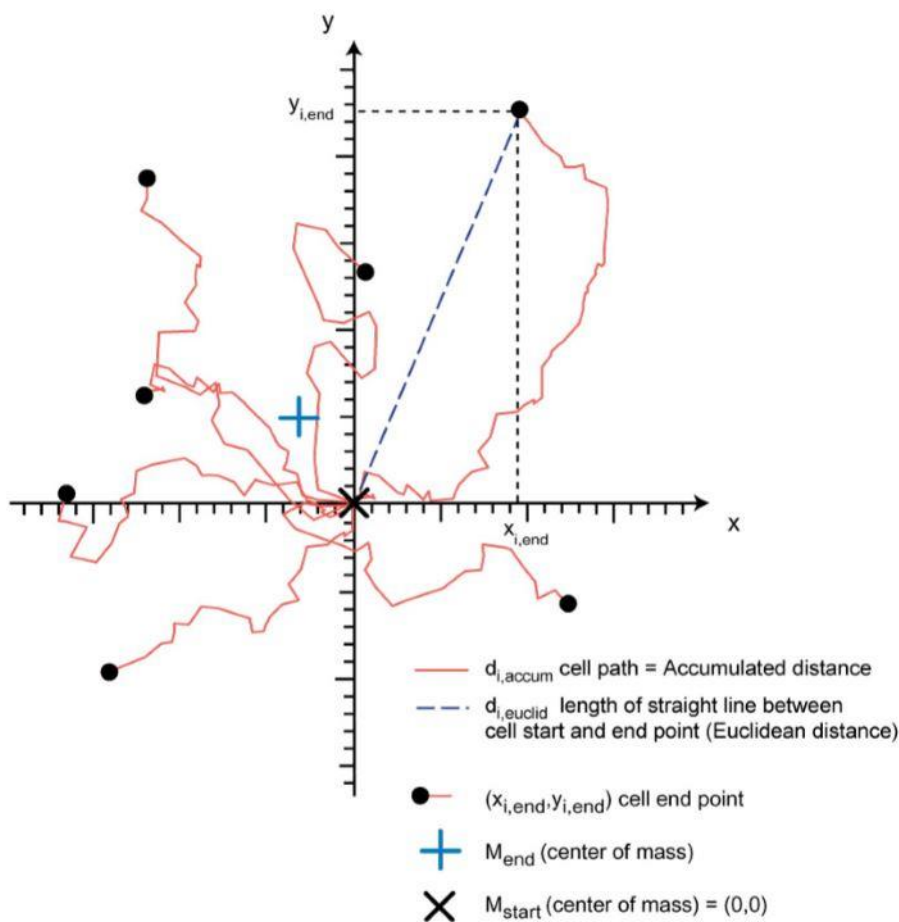


Abbildung 18: Errechnete Parameter im Chemotaxis & Migration Tool

Erklärungen zu den einzelnen Parametern im Text. Quelle: Chemotaxis&Migration Tool Handbook, <https://ibidi.com/manual-image-analysis/171-chemotaxis-and-migration-tool.html>

Akkumulierte Distanz (d_{accum}): Die von einer Zelle i zurückgelegte Distanz ($d_{i,accum}$), bzw. der Mittelwert der akkumulierten Distanzen aller analysierten Zellen (d_{accum}).

Euklidische Distanz (d_{euclid}):

Länge der geraden Strecke zwischen Start- und Endpunkt einer Zelle i ($d_{i,euclid}$), bzw. der Mittelwert der euklidischen Distanzen aller analysierten Zellen (d_{euclid}).

Zell-Endpunkt ($x_{i,end}y_{i,end}$):

Endpunkt einer Zelle i . Die Koordinaten können sowohl positiv, als auch negativ sein.

Center of Mass (CoM_{start} bzw. CoM_{end}): CoM_{start} ist mit $x=0,0$ und $y=0,0$ definiert.

CoM_{end} ist der Mittelwert aller Zell-Endpunkte. Die Koordinaten können sowohl positiv als auch negativ sein. Dieser Parameter ist relevant für die quantitative Beurteilung des chemotaktischen Effekts.

Ausrichtung einer Zelle i ($Directness_i$) = $\frac{d_{i,accum}}{d_{i,euclid}}$, dieser Parameter kann Werte zwischen ≈ 0 und 1 annehmen.

Ausrichtung aller Zellen ($Directness$) = $\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{d_{i,accum}}{d_{i,euclid}}$, dieser Parameter kann Werte zwischen ≈ 0 und 1 annehmen (Abbildung 19).

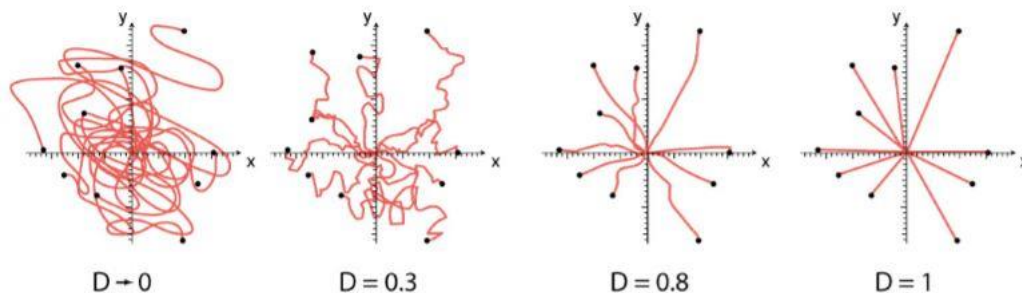


Abbildung 19: Directness

Werte nahe 1 entsprechen einem durch die einzelnen Zellen zurückgelegten geraden Weg bezogen auf den Nullpunkt. Werte nahe 0 entsprechen ungerichteten Zellbewegungen. Quelle: Chemotaxis&Migration Tool Handbook, <https://ibidi.com/manual-image-analysis/171-chemotaxis-and-migration-tool.html>

Geschwindigkeit

Geschwindigkeit, mit der sich eine Zelle fortbewegt ($Geschwindigkeit_i$), bzw. Mittelwert der Geschwindigkeiten aller analysierten Zellen (Geschwindigkeit).

FMI (Forward Migration Index)

Mit dem FMI kann beurteilt werden, in welchem Verhältnis zur X- bzw. Y-Achse sich die Zellen bewegen. Voraussetzung dafür ist, dass der chemotaktische Gradient entweder horizontal oder vertikal zu den Achsen aufgebaut wird (Foxman, Kunkel, and Butcher 1999). Es werden zwei FMI wie folgt errechnet.

$$Y_{FMI} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{y_{i,end}}{d_{i,accum}} \text{ und } X_{FMI} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{x_{i,end}}{d_{i,accum}}.$$

Anstelle von Y_{FMI} und X_{FMI} werden FMI^{\parallel} (FMI, horizontal zu einem chemotaktischen Gradienten) und FMI^{\perp} (FMI, vertikal zu einem chemotaktischen Gradienten) angegeben. Sowohl FMI^{\parallel} als auch FMI^{\perp} können positive oder negative Werte annehmen. Ein chemotaktischer Effekt zeichnet sich durch einen (negativen oder positiven) FMI^{\parallel} , dessen Betrag höher ist, als der des korrespondierenden FMI^{\perp} (Foxman, Kunkel, and Butcher 1999). In einer Negativkontrolle ist zu erwarten, dass sowohl FMI^{\parallel} als auch FMI^{\perp} Werte gegen 0 annehmen.

Rayleigh Test

Der Rayleigh Test (Abbildung 20) beurteilt die Zell-Endpunkte hinsichtlich ihrer Verteilung um den Ursprung ($X=0$, $Y=0$). Als Nullhypothese wird eine zirkuläre Verteilung der Zell-Endpunkte um den Ursprung angenommen. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt. Ein statistisch signifikanter chemotaktischer Effekt ist anzunehmen bei $p < 0,05$. Bei einer Negativkontrolle wäre zu erwarten, dass p einen Wert $> 0,05$ annimmt. Zusammen mit dem FMI und dem CoM ist der Rayleigh Test der wichtigste Parameter zur Beurteilung des chemotaktischen Effekts.

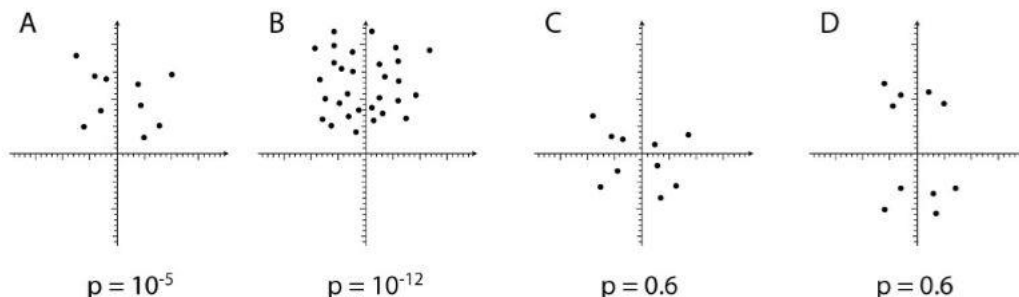


Abbildung 20: Rayleigh-Test

Erklärungen im Text. Quelle: Chemotaxis&Migration Tool Handbook, <https://ibidi.com/manual-image-analysis/171-chemotaxis-and-migration-tool.html>

7 Ergebnisse

7.1 Entwicklung und Validierung des neuen Oberflächenmodells

7.1.1 Knochendichtemessung

Um den Mineralisierungsgrad der Knochenscheiben zu quantifizieren wurden mehrere Knochendichtemessungen durchgeführt. Insgesamt wurden 10 Knochenscheiben analysiert. 5 Knochenscheiben wurden von der Messung über 16 Stunden mit 0,5 M EDTA demineralisiert, die anderen 5 wurden in ihrem nativen mineralisierten Zustand belassen. Die Knochendichtemessung von 5 mineralisierten und 5 demineralisierten Knochenscheiben ergab folgende Werte (Abbildung 21, Tabelle 13). Es wurde jeweils der Mittelwert aus den Werten der Proben gebildet. Mit einem t-Test für unverbundene Stichproben wurde auf statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Mittelwerten beider Messungen getestet.

Tabelle 13: Ergebnisse der Knochendichtemessung

| Knochenscheiben | Knochendichte (g/m ²) | | | | | Mittelwert | Standardabweichung |
|--------------------------|-----------------------------------|------|------|-------|------|------------|--------------------|
| Mineralisiert (n=5) | 74,3 | 64,8 | 82,6 | 106,5 | 54,8 | 76,6 | 17,6 |
| Demineralisiert (n=5) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

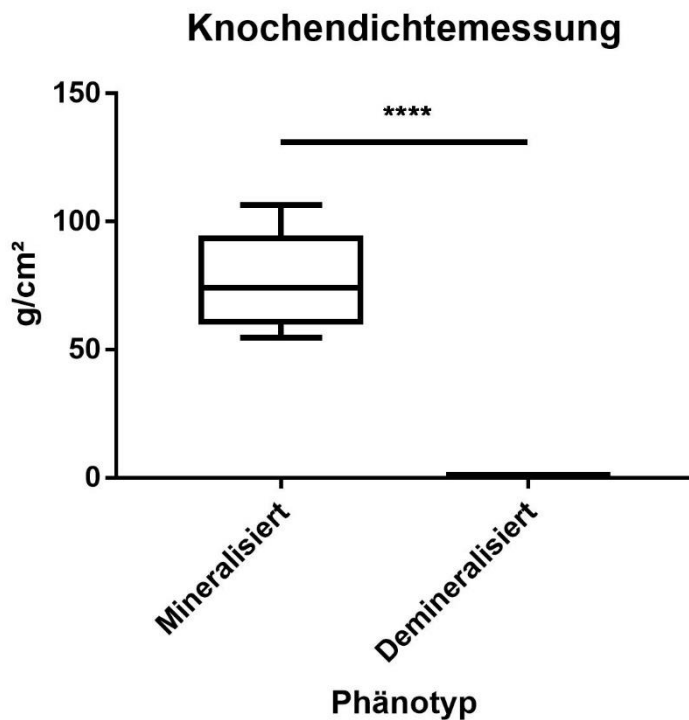


Abbildung 21: Ergebnis der Knochendichtemessung

Es werden Mittelwerte mit Standardabweichungen gezeigt. **** $p < 0,0001$, Grafik erstellt mit GraphPad Prism 7.

In der durchgeführten Knochendichtemessung zeigte sich eine deutliche Reduktion ($p < 0,0001$) der Knochendichte nach Demineralisierung mit 0,5 M EDTA über 16 Stunden. Die Knochendichte war nach der Demineralisierung durch das verwendete Gerät nicht mehr quantifizierbar.

7.1.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Durch das Aussäen von Fluoreszenz-markierten MG-63 Zellen auf den sterilisierten mineralisierten und sterilisierten demineralisierten Knochenoberflächen wurde optisch überprüft, inwiefern die Zellen nach 48 stündiger Inkubation auf den mit Essigsäure und EDTA bearbeiteten Knochenoberflächen überlebten, sowie fähig waren zu adhären. Es wurde zudem überprüft, ob Zellen, welche auf einer mineralisierten Knochenoberfläche inkubiert wurden eine andere Zellmorphologie zeigen, als Zellen, welche auf einer demineralisierten Knochenoberfläche adhären. Hierzu wurden vergleichende Aufnahmen von MG-63 Zellen auf einer mineralisierten und einer demineralisierten Knochenoberfläche in unterschiedlichen Vergrößerungen gemacht (Abbildung 22).

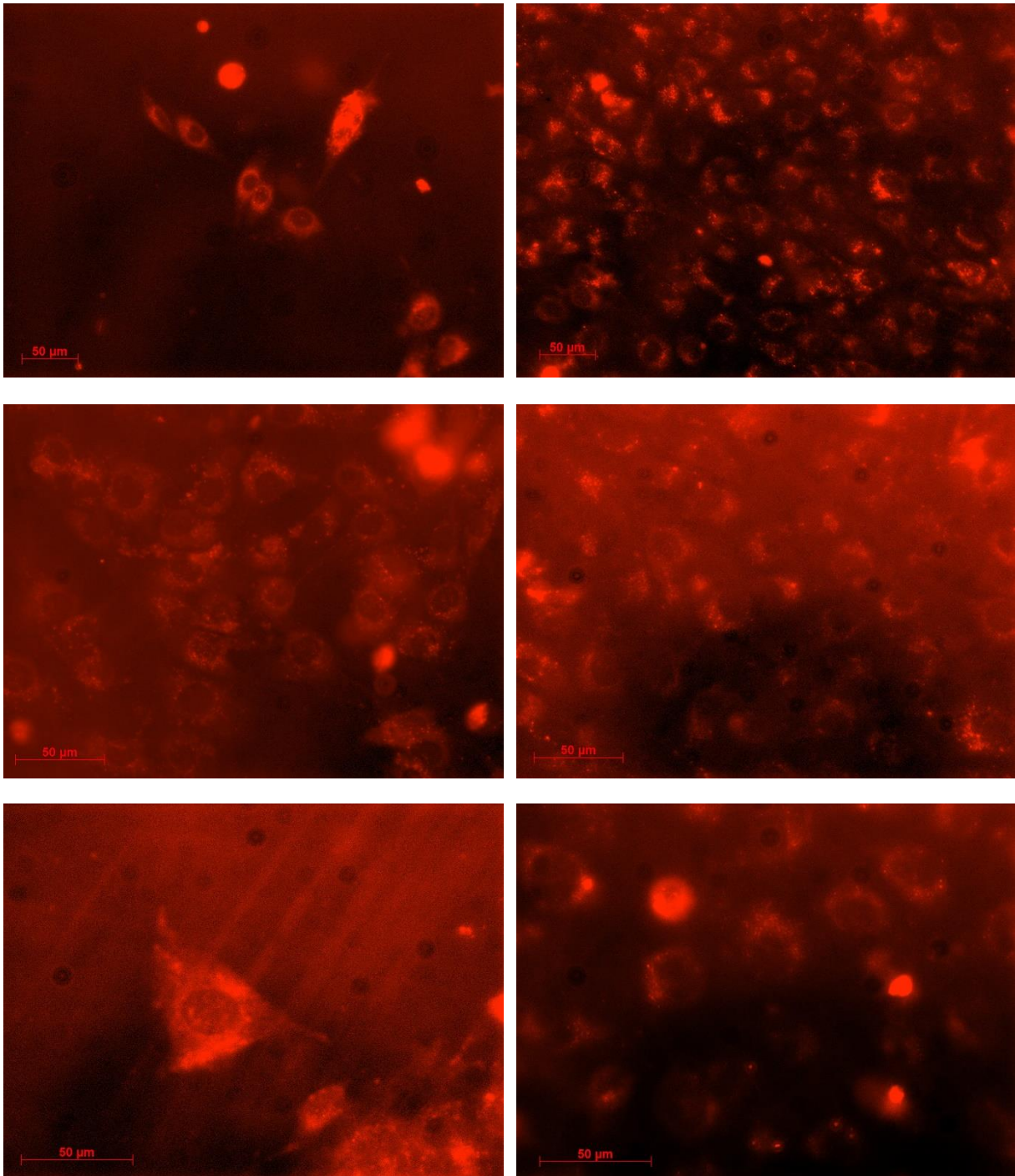


Abbildung 22: Fluoreszenz-markierte MG-63 Zellen I

MG-63 Zellen auf mineralisierten (linke Spalte) und demineralisierten (rechte Spalte) Knochenoberflächen. Vergrößerungen: 20x (obere Reihe), 32x (mittlere Reihe), 40x (untere Reihe). Quelle: privat.

Außerdem wurde überprüft, ob es möglich ist, eine ausreichende Anzahl von Zellen mit dem Zellwischer mechanisch von den Knochenoberflächen zu entfernen. Hierzu wurden zwei vergleichende Aufnahmen einer vorab definierten Stelle auf den Knochenoberflächen jeweils

bevor und nach mechanischer Entfernung gemacht (Abbildung 23). Hierbei zeigte sich, dass die Zellen fast vollständig mechanisch entfernt werden konnten.

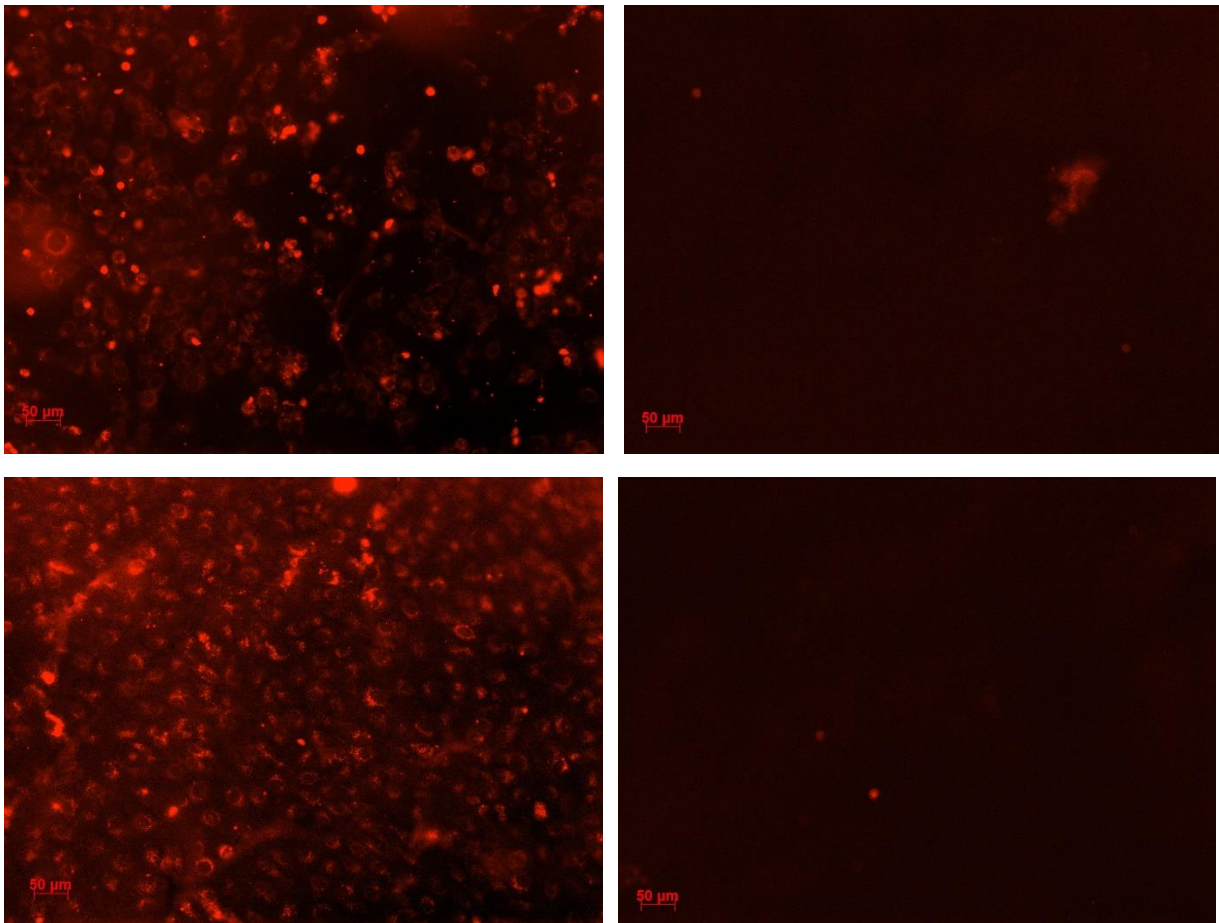


Abbildung 23: Fluoreszenz-markierte MG-63 Zellen II

MG-63 Zellen auf mineralisierten (obere Zeile) und demineralisierten (untere Zeile) Knochenoberflächen, jeweils vor (linke Spalte) und nach (rechte Spalte) dem Entfernen der adhärennten Zellen mittels Zellwischer. Vergrößerungen: 10x. Quelle: privat.

7.2 Anwendung des neuen Oberflächenmodells

7.2.1 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

7.2.1.1 Allgemeine Analyse-Parameter

Insgesamt wurden 20693 Gene des jeweiligen Phänotyps (mineralisiert bzw. demineralisiert) mit den C 5 GO Gene Sets (insgesamt 5917 Gene Sets) der MSigDB analysiert. Nach Ausschluss von Gene Sets mit <15 Genen und >10000 Genen wurden insgesamt 4865 Gene Sets analysiert (Tabelle 14, Abbildung 24).

Tabelle 14: Allgemeine GSEA-Analyse-Parameter

| Phänotyp | Mineralisiert | Demineralisiert |
|--------------------------|---------------|-----------------|
| Hochregulierte Gene Sets | 2010 | 2855 |

| | | |
|----------------------------------|-----|-----|
| Enriched Gene Sets, p-Wert <0,05 | 400 | 792 |
| Enriched Gene Sets, p-Wert <0,01 | 205 | 419 |
| Enriched Gene Sets, FDR<0,25 | 234 | 685 |

Enriched Gene Sets

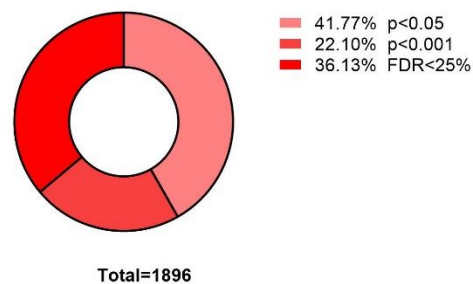
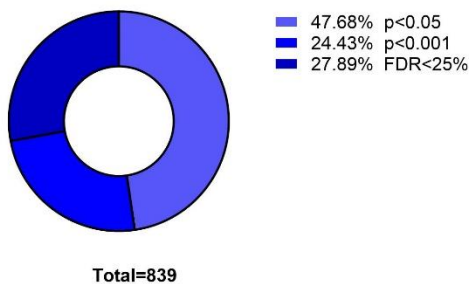
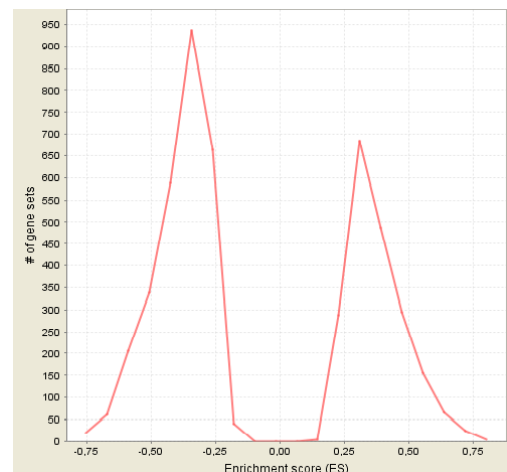
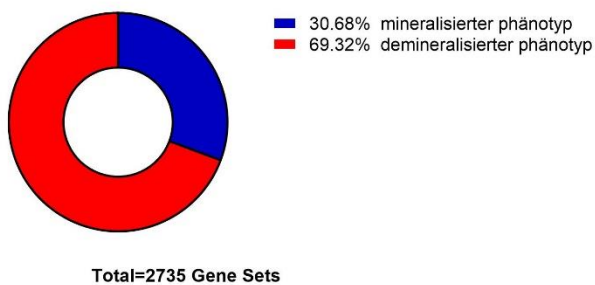


Abbildung 24: Allgemeine GSEA Analyse-Parameter

Verteilung der angereicherten Gene Sets auf die Phänotypen (oben links). Verteilung der erzielten Enrichment Scores (ES) auf die untersuchen Gene Sets (oben rechts) Ein positiver ES zeigt eine Überregulation des Gene Sets im mineralisierten Phänotyp, eine negativer ES eine Überregulation im demineralisierten Phänotyp. Es zeigt sich, dass die Mehrzahl der analysierten Gene Sets im demineralisierten Phänotyp überreguliert sind. Verteilung der statistisch signifikant angereicherten Gene Sets im mineralisierten Phänotyp (unten links) und im demineralisierten Phänotyp (unten rechts). Quelle: GSEA, Grafiken durch den Autor erstellt mit GraphPad Prism 7.

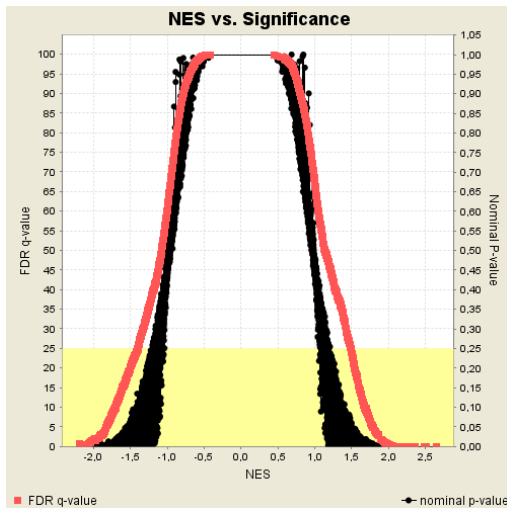


Abbildung 25: Verhältnis der NES zu den statistischen Signifikanzen

Verteilung der erzielten NES (x-Achse) und der errechneten FDR- (linke y-Achse) und p-Werte (rechte y-Achse). Quelle: GSEA.

7.2.1.2 Top 5 hochregulierte Gene Sets der jeweiligen Phänotypen

Tabelle 15 und Tabelle 16 zeigen für beide Phänotypen die jeweiligen fünf Gene Sets mit den höchsten erzielten NES, sowie deren Parameter.

Tabelle 15: Top 5 hochregulierte Gene Sets im demineralisierten Phänotyp

| Gene Set | Größe | ES | NES | Nom p-val | FDR | Rank at max | Leading edge |
|--|-------|-------|-------|-----------|--------|-------------|-------------------------------|
| GO_EXTRACELLULAR_MATRIX_COMPONENT | 119 | -0,61 | -2,19 | <0,001 | <0,005 | 1450 | tags=34%, list=7%, signal=36% |
| GO_ARTERY_MORPHOGENESIS | 49 | -0,68 | -2,16 | <0,001 | <0,005 | 448 | tags=22%, list=2%, signal=23% |
| GO_ARTERY_DEVELOPMENT | 71 | -0,65 | -2,16 | <0,001 | <0,005 | 448 | tags=21%, list=2%, signal=22% |
| GO_PROTEIN_COMPLEX_INVOLVED_IN_CELL_ADHESION | 28 | -0,77 | -2,16 | <0,001 | <0,005 | 292 | tags=29%, list=1%, signal=29% |
| GO_EXTRACELLULAR_ | 278 | -0,54 | -2,16 | <0,001 | <0,005 | 1515 | tags=26%, |

| | | | | | | | |
|------------------------|--|--|--|--|--|--|------------------------|
| STRUCTURE_ORGANIZATION | | | | | | | list=7%, signal=28% |
|------------------------|--|--|--|--|--|--|------------------------|

Tabelle 16: Top 5 hochregulierte Gene Sets im mineralisierten Phänotyp

| Gene Set | Größe | ES | NES | Nom p-val | FDR | Rank at max | Leading edge |
|---|-------|------|------|-----------|--------|-------------|--------------------------------------|
| GO_CYTOSOLIC_RIBOSOME | 93 | 0.74 | 2.64 | <0,001 | <0,005 | 2906 | tags=70%, list=14%, signal=81% |
| GO_RIBOSOMAL_SUBUNIT | 137 | 0.67 | 2.51 | <0,001 | <0,005 | 2999 | tags=56%, list=14%, signal=65% |
| GO_ESTABLISHMENT_OF_PROTEIN_LOCALIZATION_TO_ENDOPLASMIC_RETICULUM | 91 | 0.71 | 2.48 | <0,001 | <0,005 | 2893 | tags=60%, list=14%, signal=70% |
| GO_PROTEIN_LOCALIZATION_TO_ENDOPLASMIC_RETICULUM | 108 | 0.65 | 2.36 | <0,001 | <0,005 | 2893 | tags=53%, list=14%, signal=61% |
| GO_CYTOSOLIC_LARGE_RIBOSOMAL_SUBUNIT | 51 | 0.73 | 2.32 | <0,001 | <0,005 | 2906 | tags=67%, list=14%, signal=77% |

7.2.1.3 Hochregulierte Gene Sets im demineralisierten Phänotyp

Da das Genexpressionsprofil des mineralisierten Phänotyps als Kontrolle betrachtet wird, werden im Folgenden ausschließlich die hochregulierten Gene Sets des demineralisierten Phänotyps gelistet. Da der Fokus auf Genen, assoziiert mit Extrazellulärer Matrix und

Adhäsion lag, werden nur die Gene der folgenden Gene Sets detailliert aufgelistet (Abbildung 26, Tabelle 17, Tabelle 18, Tabelle 19):

GO_PROTEIN_COMPLEX_INVOLVED_IN_CELL_ADHESION,
 GO_EXTRACELLULAR_STRUCTURE_ORGANIZATION
 GO_EXTRACELLULAR_MATRIX_COMPONENT

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden für jedes Gene Set ausschließlich die Gene und ihre Parameter gelistet, welche „Core Enrichment=Ja“ als Parameter aufweisen.

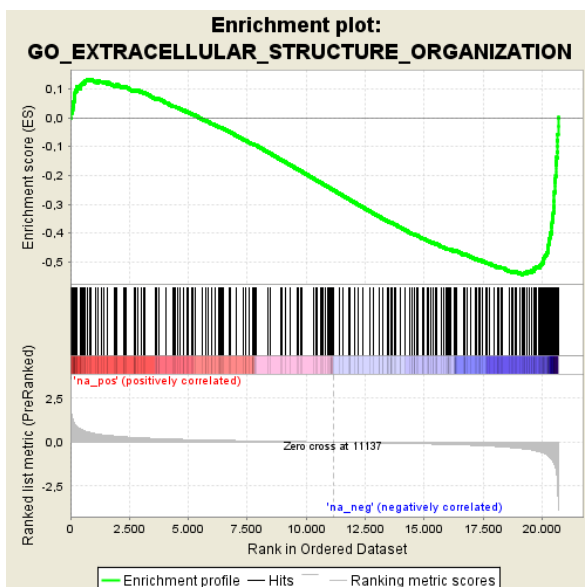
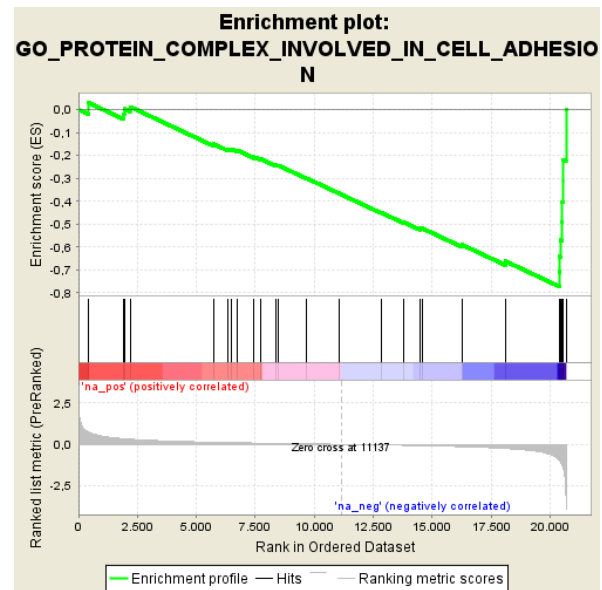
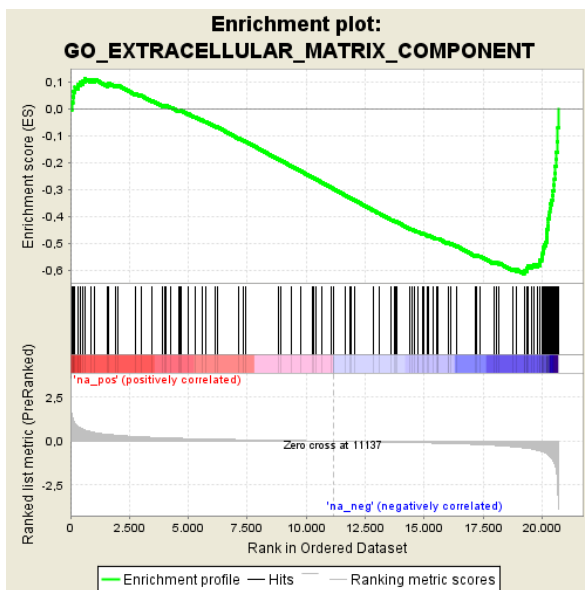


Abbildung 26: Enrichment plots

Enrichment Plots der im demineralisierten Phänotyp hochregulierten Gene Sets. Quelle: GSEA.

Tabelle 17: Gene Set GO_EXTRACELLULAR_MATRIX_COMPONENT

| Gen Symbol | Gen Name | Rang in Rangliste | Rang-Score | Running ES | Core Enrichment |
|------------|---|-------------------|------------|------------|-----------------|
| DST | Dystonin | 19244 | -0,385 | -0,606 | Ja |
| COL18A1 | Kollagen18A1 | 19285 | -0,393 | -0,601 | Ja |
| LAMB3 | Laminin Subunit Beta 3 | 19349 | -0,403 | -0,597 | Ja |
| NTN1 | Netrin 1 | 19370 | -0,406 | -0,59 | Ja |
| THBS2 | Thrombospondin 2 | 19403 | -0,411 | -0,585 | Ja |
| SPARC | Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich | 19568 | -0,448 | -0,585 | Ja |
| LAMA2 | Laminin Subunit Alpha 2 | 19657 | -0,475 | -0,58 | Ja |
| ODAM | Odontogenic, Ameloblast Associated | 19809 | -0,522 | -0,578 | Ja |
| LAMB1 | Laminin Subunit Beta 1 | 19904 | -0,561 | -0,573 | Ja |
| FBN1 | Fibrillin 1 | 19919 | -0,565 | -0,563 | Ja |
| SLC1A3 | Solute Carrier Family 1 Member 3 | 19989 | -0,591 | -0,556 | Ja |
| APLP1 | Amyloid Beta Precursor Like Protein 1 | 20000 | -0,595 | -0,546 | Ja |
| LAMC1 | Laminin Subunit Gamma 1 | 20034 | -0,613 | -0,537 | Ja |
| TNC | Tenascin C | 20058 | -0,625 | -0,526 | Ja |
| MFAP2 | Microfibril Associated Protein 2 | 20066 | -0,632 | -0,515 | Ja |
| COL27A1 | Collagen Type XXVII Alpha 1 Chain | 20089 | -0,642 | -0,505 | Ja |
| COL5A1 | Collagen Type V Alpha 1 Chain | 20170 | -0,69 | -0,496 | Ja |
| COL8A1 | Collagen Type VIII Alpha 1 Chain | 20196 | -0,703 | -0,485 | Ja |
| MATN2 | Matrilin 2 | 20206 | -0,712 | -0,473 | Ja |
| CCDC80 | Coiled-Coil | 20213 | -0,715 | -0,46 | Ja |

| | | | | | |
|----------|--|-------|--------|--------|----|
| | Domain Containing 80 | | | | |
| ADAMTS10 | ADAM Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif 10 | 20224 | -0,722 | -0,448 | Ja |
| COL12A1 | Collagen Type XII Alpha 1 Chain | 20242 | -0,744 | -0,435 | Ja |
| TIMP1 | TIMP Metalloproteinase Inhibitor 1 | 20256 | -0,758 | -0,422 | Ja |
| MFAP4 | Microfibril Associated Protein 4 | 20258 | -0,76 | -0,409 | Ja |
| COL6A3 | Collagen Type VI Alpha 3 Chain | 20301 | -0,804 | -0,396 | Ja |
| MEGF9 | Multiple EGF Like Domains 9 | 20333 | -0,842 | -0,383 | Ja |
| COL5A2 | Collagen Type V Alpha 2 Chain | 20337 | -0,848 | -0,368 | Ja |
| COL1A2 | Collagen Type I Alpha 2 Chain | 20371 | -0,892 | -0,353 | Ja |
| ITGB1 | Integrin Subunit Beta 1 | 20425 | -0,975 | -0,338 | Ja |
| COL4A2 | Collagen Type IV Alpha 2 Chain | 20441 | -1,019 | -0,321 | Ja |
| COL4A1 | Collagen Type IV Alpha 1 Chain | 20456 | -1,071 | -0,302 | Ja |
| LTBP1 | Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 1 | 20500 | -1,194 | -0,283 | Ja |
| FBLN5 | Fibulin 5 | 20531 | -1,281 | -0,261 | Ja |
| TGFBI | Transforming Growth Factor Beta Induced | 20554 | -1,377 | -0,238 | Ja |
| COL1A1 | Collagen Type I Alpha 1 Chain | 20562 | -1,405 | -0,213 | Ja |

| | | | | | |
|-------|---|-------|--------|--------|----|
| NID2 | Nidogen 2 | 20590 | -1,508 | -0,187 | Ja |
| SMOC1 | SPARC Related Modular Calcium Binding 1 | 20596 | -1,577 | -0,159 | Ja |
| TIMP3 | TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3 | 20654 | -2,212 | -0,122 | Ja |
| HMCN1 | Hemicentin 1 | 20680 | -3,030 | -0,069 | Ja |
| AMTN | Amelotin | 20692 | -3,880 | 0,000 | Ja |

Tabelle 18: Gene Set GO_PROTEIN_COMPLEX_INVOLVED_IN_CELL_ADHESION

| Gen Symbol | Gen Name | Rang in Rangliste | Rang-Score | Running ES | Core Enrichment |
|------------|--------------------------|-------------------|------------|------------|-----------------|
| MYH9 | Myosin Heavy Chain 9 | 20402 | -0,946 | -0,707 | Ja |
| ITGB1 | Integrin Subunit Beta 1 | 20425 | -0,975 | -0,641 | Ja |
| ITGA5 | Integrin Subunit Alpha 5 | 20453 | -1,067 | -0,569 | Ja |
| ITGA11 | Integrin Subunit Alpha 1 | 20502 | -1,196 | -0,489 | Ja |
| ITGAV | Integrin Subunit Alpha V | 20522 | -1,251 | -0,404 | Ja |
| ITGB6 | Integrin Subunit Beta 6 | 20551 | -1,371 | -0,311 | Ja |
| ITGB5 | Integrin Subunit Beta 5 | 20552 | -1,373 | -0,217 | Ja |
| ITGA2 | Integrin Subunit Alpha 2 | 20685 | -3,251 | 0,000 | Ja |

Tabelle 19: Gene Set GO_EXTRACELLULAR_STRUCTURE_ORGANIZATION

| Gen Symbol | Gen Name | Rang in Rangliste | Rang-Score | Running ES | Core Enrichment |
|------------|---|-------------------|------------|------------|-----------------|
| ERCC2 | ERCC Excision Repair 2, TFIIH Core Complex Helicase Subunit | 19179 | -0,376 | -0,541 | Ja |
| APP | Amyloid Beta Precursor Protein | 19215 | -0,38 | -0,54 | Ja |
| JAM3 | Junctional Adhesion Molecule 3 | 19279 | -0,391 | -0,54 | Ja |

| | | | | | |
|----------------|---|-------|--------|--------|----|
| COL18A1 | Collagen Type XVIII Alpha 1 Chain | 19285 | -0,393 | -0,537 | Ja |
| LAMB3 | Laminin Subunit Beta 3 | 19349 | -0,403 | -0,536 | Ja |
| COL16A1 | Collagen Type XVI Alpha 1 Chain | 19353 | -0,404 | -0,533 | Ja |
| COMP | Cartilage Oligomeric Matrix Protein | 19453 | -0,422 | -0,534 | Ja |
| CTSL1 | Cathepsin L | 19487 | -0,43 | -0,532 | Ja |
| MMP2 | Matrix Metalloproteinase 2 | 19557 | -0,445 | -0,532 | Ja |
| SPARC | Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich | 19568 | -0,448 | -0,529 | Ja |
| FLRT2 | Fibronectin Leucine Rich Transmembrane Protein 2 | 19655 | -0,475 | -0,529 | Ja |
| LAMA2 | Laminin Subunit Alpha 2 | 19657 | -0,475 | -0,525 | Ja |
| ATP7A | ATPase Copper Transporting Alpha | 19681 | -0,483 | -0,522 | Ja |
| ADAMTS2 | ADAM Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif 2 | 19703 | -0,488 | -0,519 | Ja |
| TNFRSF11 B | TNF Receptor Superfamily Member 11b | 19760 | -0,505 | -0,518 | Ja |
| MPZL3 | Myelin Protein Zero Like 3 | 19856 | -0,546 | -0,518 | Ja |
| LAMB1 | Laminin Subunit Beta 1 | 19904 | -0,561 | -0,516 | Ja |
| FBN1 | Fibrillin 1 | 19919 | -0,565 | -0,512 | Ja |
| PLOD3 | Procollagen-Lysine,2- Oxoglutarate 5- Dioxygenase 3 | 19948 | -0,575 | -0,508 | Ja |
| CSGALNA CT1 | Chondroitin Sulfate N- Acetylgalactosaminyltran sferase 1 | 19988 | -0,591 | -0,505 | Ja |
| LAMC1 | Laminin Subunit Gamma 1 | 20034 | -0,613 | -0,502 | Ja |
| CTSK | Cathepsin K | 20047 | -0,619 | -0,498 | Ja |
| TNC | Tenascin C | 20058 | -0,625 | -0,493 | Ja |
| MFAP2 | Microfibril Associated Protein 2 | 20066 | -0,632 | -0,488 | Ja |
| COL27A1 | Collagen Type XXVII Alpha 1 Chain | 20089 | -0,642 | -0,484 | Ja |
| TLL1 | Tolloid Like 1 | 20132 | -0,669 | -0,48 | Ja |
| COL5A1 | Collagen Type V Alpha 1 Chain | 20170 | -0,69 | -0,476 | Ja |

| | | | | | |
|----------|--|-------|--------|--------|----|
| COL8A1 | Collagen Type VIII Alpha 1 Chain | 20196 | -0,703 | -0,472 | Ja |
| CCDC80 | Coiled-Coil Domain Containing 80 | 20213 | -0,715 | -0,467 | Ja |
| COL12A1 | Collagen Type XII Alpha 1 Chain | 20242 | -0,744 | -0,462 | Ja |
| ENG | Endoglin | 20246 | -0,747 | -0,456 | Ja |
| TIMP1 | TIMP Metallopeptidase Inhibitor 1 | 20256 | -0,758 | -0,45 | Ja |
| MFAP4 | Microfibril Associated Protein 4 | 20258 | -0,76 | -0,444 | Ja |
| DPT | Dermatopontin | 20284 | -0,789 | -0,438 | Ja |
| MMP16 | Matrix Metallopeptidase 16 | 20293 | -0,797 | -0,432 | Ja |
| COL6A3 | Collagen Type VI Alpha 3 Chain | 20301 | -0,804 | -0,426 | Ja |
| TGFBR1 | Transforming Growth Factor Beta Receptor 1 | 20320 | -0,822 | -0,42 | Ja |
| COL5A2 | Collagen Type V Alpha 2 Chain | 20337 | -0,848 | -0,413 | Ja |
| SERPINB5 | Serpin Family B Member 5 | 20368 | -0,888 | -0,407 | Ja |
| COL1A2 | Collagen Type I Alpha 2 Chain | 20371 | -0,892 | -0,4 | Ja |
| PXDN | Peroxidasin | 20404 | -0,948 | -0,394 | Ja |
| APBB2 | Amyloid Beta Precursor Protein Binding Family B Member 2 | 20410 | -0,954 | -0,386 | Ja |
| BGN | Biglycan | 20411 | -0,956 | -0,378 | Ja |
| ITGB1 | Integrin Subunit Beta 1 | 20425 | -0,975 | -0,371 | Ja |
| BMP1 | Bone Morphogenetic Protein 1 | 20433 | -0,995 | -0,363 | Ja |
| COL4A2 | Collagen Type IV Alpha 2 Chain | 20441 | -1,019 | -0,355 | Ja |
| ITGA5 | Integrin Subunit Alpha 5 | 20453 | -1,067 | -0,346 | Ja |
| COL4A1 | Collagen Type IV Alpha 1 Chain | 20456 | -1,071 | -0,337 | Ja |
| THBS1 | Thrombospondin 1 | 20482 | -1,140 | -0,329 | Ja |
| ITGA11 | Integrin Subunit Alpha 11 | 20502 | -1,196 | -0,32 | Ja |
| HTRA1 | HtrA Serine Peptidase 1 | 20507 | -1,218 | -0,31 | Ja |
| LTBP2 | Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 2 | 20520 | -1,248 | -0,3 | Ja |

| | | | | | |
|----------|--|-------|--------|--------|----|
| ITGAV | Integrin Subunit Alpha V | 20522 | -1,251 | -0,29 | Ja |
| POSTN | Periostin | 20528 | -1,269 | -0,28 | Ja |
| FURIN | Furin | 20529 | -1,277 | -0,269 | Ja |
| FBLN5 | Fibulin 5 | 20531 | -1,281 | -0,259 | Ja |
| ITGB6 | Integrin Subunit Beta 6 | 20551 | -1,371 | -0,248 | Ja |
| ITGB5 | Integrin Subunit Beta 5 | 20552 | -1,373 | -0,237 | Ja |
| TGFB1 | Transforming Growth Factor Beta Induced | 20554 | -1,377 | -0,225 | Ja |
| COL1A1 | Collagen Type I Alpha 1 Chain | 20562 | -1,405 | -0,214 | Ja |
| MMP14 | Matrix Metallopeptidase 14 | 20582 | -1,489 | -0,202 | Ja |
| NID2 | Nidogen 2 | 20590 | -1,508 | -0,19 | Ja |
| MMP10 | Matrix Metallopeptidase 10 | 20591 | -1,511 | -0,178 | Ja |
| SH3PXD2B | SH3 And PX Domains 2B | 20592 | -1,522 | -0,165 | Ja |
| TGFB1 | Transforming Growth Factor Beta 1 | 20605 | -1,648 | -0,152 | Ja |
| ADAMTS4 | ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 4 | 20628 | -1,849 | -0,138 | Ja |
| MMP1 | Matrix Metallopeptidase 1 | 20651 | -2,133 | -0,121 | Ja |
| SULF2 | Sulfatase 2 | 20662 | -2,441 | -0,101 | Ja |
| VCAN | Versican | 20665 | -2,490 | -0,08 | Ja |
| HAS2 | Hyaluronan Synthase 2 | 20677 | -2,874 | -0,057 | Ja |
| ITGA2 | Integrin Subunit Alpha 2 | 20685 | -3,251 | -0,030 | Ja |
| SERPINE1 | Serpin Family E Member 1 | 20687 | -3,687 | 0,000 | Ja |

7.2.2 QRTPCR

Im Anschluss an die Analyse mit GSEA wurden verschiedene Gene mittels QRTPCR amplifiziert, und den im Microarray gemessenen FC zu verifizieren. Es wurden durch den Autor Gene ausgewählt, die zum einen in möglichst mehreren im demineralisierten Phänotypen hochregulierten Gene Sets vertreten sind, und zum anderen nach publikationsbasierter Recherche als besonders interessant für die Knochenphysiologie und für die Generierung neuer Hypothesen betrachtet wurden (Tabelle 20).

Tabelle 20: Selektiv amplifizierte Gene und deren Funktion in der Knochenphysiologie

| Gen | Substanzklasse des Proteins | FC (PCR) | FC (Micro array) | Funktionen in der Knochenphysiologie (Auswahl) |
|--------|---------------------------------|----------|------------------|---|
| COL1A1 | Extrazelluläres Strukturprotein | 4,6 | 2,6 | Hauptbestandteil der EZM von Osteoblasten (Mavrakos and Vrotsos 1988) Leitstruktur für migrierende Osteoblasten (Uchihashi et al. 2013), (Jones and Boyde 1977) Verknüpfendes Protein der mineralischen Komponenten im Knochen (Hassenkam et al. 2004) Signalgeber für die Osteozytogenese (Uchihashi et al. 2013) Mediator haptotaktischer Signale für Osteoblasten (Sotobori et al. 2006) |
| ITGA2 | Transmembranprotein | 2,4 | 10 | Funktionelle Einheit mit Kollagen 1 und Rezeptor für Kollagen 1 (Heino 2000) Regulation von Adhäsion von Osteoblasten via Integrin-linked Kinasen (Dejaeger et al. 2017) |
| MMP1 | Enzym | 1,9 | 4,3 | Degradierung und Modulation der EZM, Kollagen-Fibrillen als primäres Substrat, Prozessierung von u.a. Versican (Nagase, Barrett, and Woessner 1992) Induktion der Differenzierung von Osteoblasten über u.a. runx2, BMP-2 und osx (Hayami, Kapila, and Kapila 2011) Regulierung von Migration und Adhäsion von Osteoblasten (Ortega et al. 2003) |
| VCAN | Protein der EZM | 1,7 | 5,6 | Induziert Entwicklung von Geflecht- zu Lamellenknochen (Nakamura et al. 2005) |
| NID2 | Basalmembran-Protein | 1,6 | 2,9 | Ubiquitäres Vorkommen in der Basalmembran und zellulär pro-adhäsive Wirkung (Kohfeldt et al. 1998) |

| | | | | |
|----------|-----------------|-----|-----|--|
| HMCN1 | Protein der EZM | 1,6 | 8,2 | Ubiquitäre Involvierung in Zellmigrationsprozesse (Xu and Vogel 2011) |
| ADAMT S4 | Enzym | 1,4 | 3,6 | Degradierung und Modulation der EZM, Prozessierung von u.a. Versican (Kelwick et al. 2015) Regulierung von Migration und Adhäsion von Osteoblasten (Ortega et al. 2003) |
| HAS2 | Enzym | 1,2 | 7,1 | Enzymatische Synthese von Hyaluronan (Bastow et al. 2008) Hyaluronan fördert Zellmigration und -Adhäsion über Modulierung des Mikromilieus von Osteoblasten und induziert skelettale Entwicklung (Huang et al. 2003) (Bastow et al. 2008) |

Um die Hochregulation der Gene Sets im demineralisierten Phänotyp zu verifizieren, wurden die Gene ADAMTS4 (ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 4), COL1A1 (Collagen Type I Alpha 1 Chain), HAS2 (Hyaluronan synthase 2), HMCN1 (Hemicentin-1), ITGA2 (Integrin Subunit Alpha 2), MMP1 (Matrix Metallopeptidase 1), NID2 (Nidogen 2) und VCAN (Versican) mittels QRTPCR amplifiziert.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der QRTPCR (jeweils links), sowie die Intensitäten der Fluoreszenzsignale der entsprechenden Gene im Microarray (jeweils rechts) zum Vergleich. In den Diagrammen, welche die Ergebnisse der QRTPCR zeigen, ist auf den Y-Achsen die Genexpression des demineralisierten Phänotyps als Vielfaches der Genexpression des mineralisierten Phänotyps (endogene Kontrolle) aufgetragen. Es werden Mittelwerte mit Standardabweichungen gezeigt.

ADAMTS4

ADAMTS4 (ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 4) gehört zu dem Gene Set GO_EXTRACELLULAR_STRUCTURE_ORGANIZATION (Tabelle 19). In der QRTPCR zeigte sich eine 1,4-fache Erhöhung ($p < 0,01$) der Genexpression im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp (Abbildung 27).

Im Microarray zeigte sich eine 3,6-fach stärkere Intensität ($p < 0,05$) des Fluoreszenzsignals im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp.

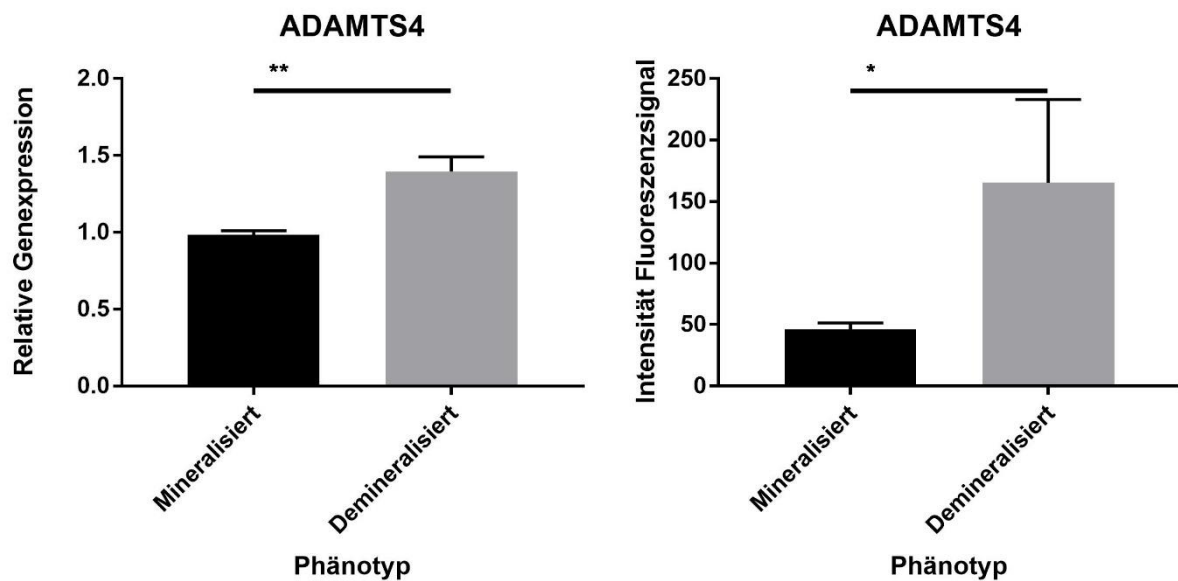


Abbildung 27: ADAMTS4

Diese Abbildung zeigt für das Gen ADAMTS4 das Ergebnis der QRTPCR (links) und den im Microarray gemessenen FC (rechts) im Vergleich dazu (jeweils für den mineralisierten und den demineralisierten Phänotyp).

Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ($n=4$). Grafiken erstellt mit GraphPad Prism 7.

COL1A1

COL1A1 (Collagen Type I Alpha 1 Chain) gehört zu den Gene Sets GO_EXTRACELLULAR_MATRIX_COMPONENT (Tabelle 17) und GO_EXTRACELLULAR_STRUCTURE_ORGANIZATION (Tabelle 19). In der QRT-PCR zeigte sich eine 4,6-fache Erhöhung ($p < 0,01$) der Genexpression im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp (Abbildung 28). Im Microarray zeigte sich eine 2,6-fach stärkere Intensität ($p < 0,01$) des Fluoreszenzsignals im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp.

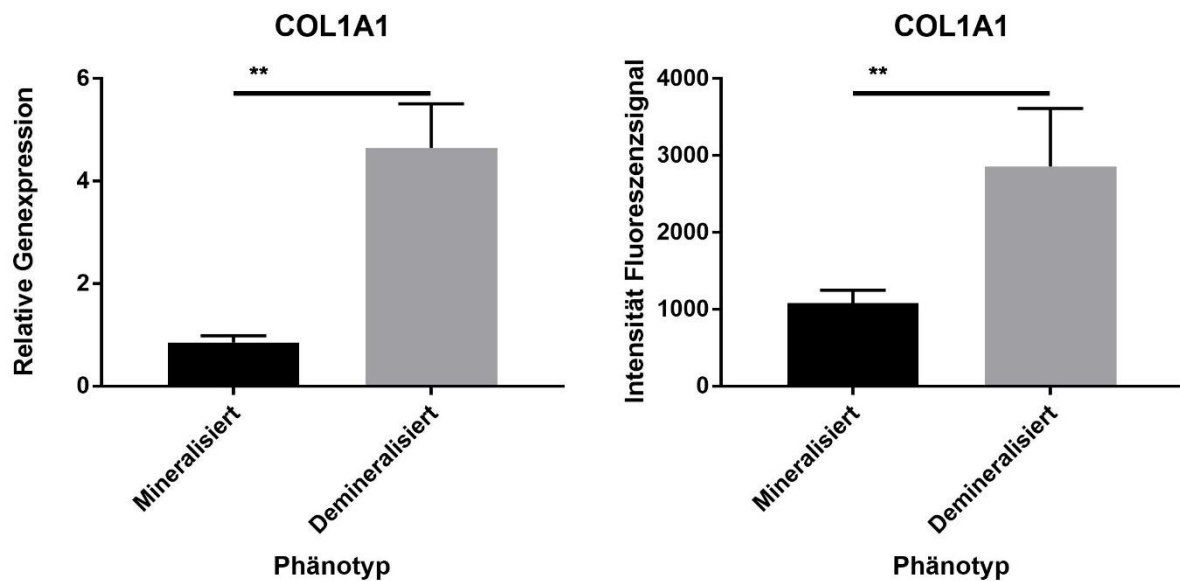


Abbildung 28: COL1A1

Diese Abbildung zeigt für das Gen COL1A1 das Ergebnis der QRT-PCR (links) und den im Microarray gemessenen FC (rechts) im Vergleich dazu (jeweils für den mineralisierten und den demineralisierten Phänotyp).

Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ($n=4$). Grafiken erstellt mit GraphPad Prism 7.

HAS2

HAS2 (Hyaluronan synthase 2) gehört zu dem Gene Set GO_EXTRACELLULAR_STRUCTURE_ORGANIZATION (Tabelle 19). In der QRT-PCR zeigte sich eine 1,2-fache Erhöhung ($p < 0,05$) der Genexpression im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp (Abbildung 29). Im Microarray zeigte sich eine 7,1-fach stärkere Intensität ($p < 0,05$) des Fluoreszenzsignals im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp.

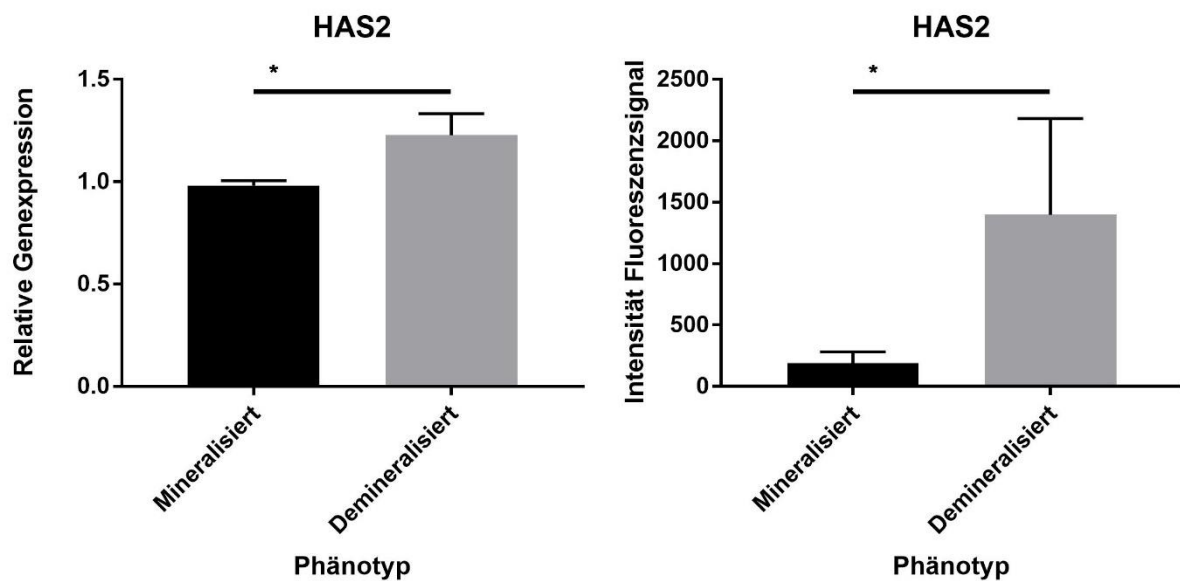


Abbildung 29: HAS2

Diese Abbildung zeigt für das Gen HAS2 das Ergebnis der QRT-PCR (links) und den im Microarray gemessenen FC (rechts) im Vergleich dazu (jeweils für den mineralisierten und den demineralisierten Phänotyp).

Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ($n=4$). Grafiken erstellt mit GraphPad Prism 7.

HMCN1

HMCN1 (Hemicentin-1) gehört zu dem Gene Set GO_EXTRACELLULAR_MATRIX_COMPONENT (Tabelle 17). In der QRTPCR zeigte sich eine 1,6-fache Erhöhung ($p < 0,01$) der Genexpression im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp (Abbildung 30). Im Microarray zeigte sich eine 8,2-fach stärkere Intensität ($p > 0,05$) des Fluoreszenzsignals im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp.

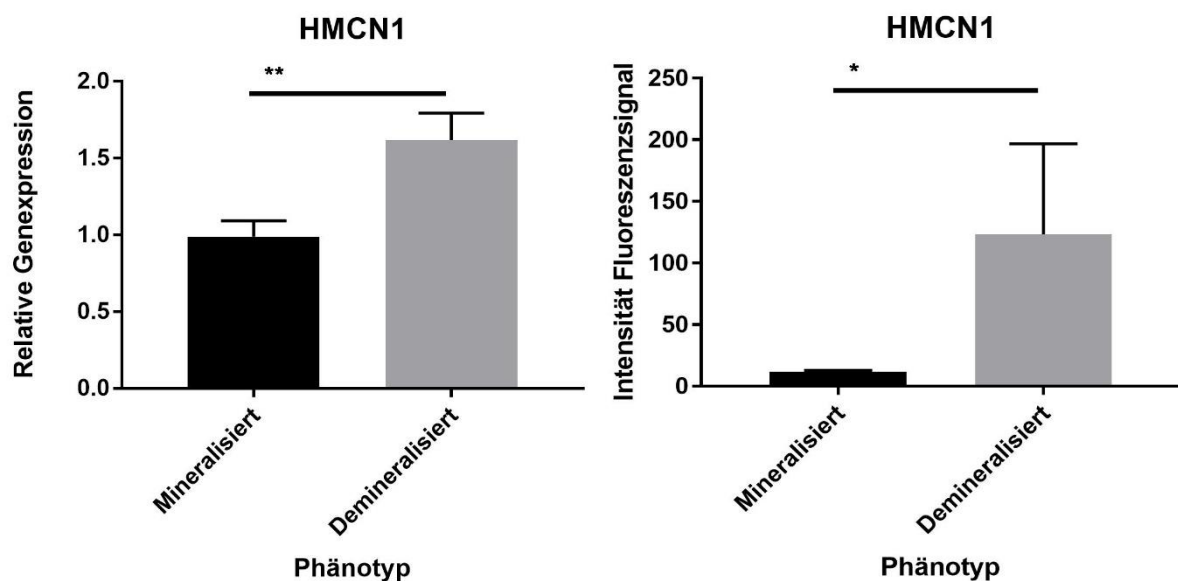


Abbildung 30: HMCN1

Diese Abbildung zeigt für das Gen HMCN1 das Ergebnis der QRTPCR (links) und den im Microarray gemessenen FC (rechts) im Vergleich dazu (jeweils für den mineralisierten und den demineralisierten Phänotyp).

Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ($n=4$). Grafiken erstellt mit GraphPad Prism 7.

ITGA2

ITGA2 (Integrin Subunit Alpha 2) gehört zu den Gene Sets GO_PROTEIN_COMPLEX_INVOLVED_IN_CELL_ADHESION (Tabelle 18) und GO_EXTRACELLULAR_STRUCTURE_ORGANIZATION (Tabelle 19). In der QRT-PCR zeigte sich eine 2,4-fache Erhöhung ($p < 0,001$) der Genexpression im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp (Abbildung 31). Im Microarray zeigte sich eine 10-fach stärkere Intensität ($p < 0,05$) des Fluoreszenzsignals im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp.

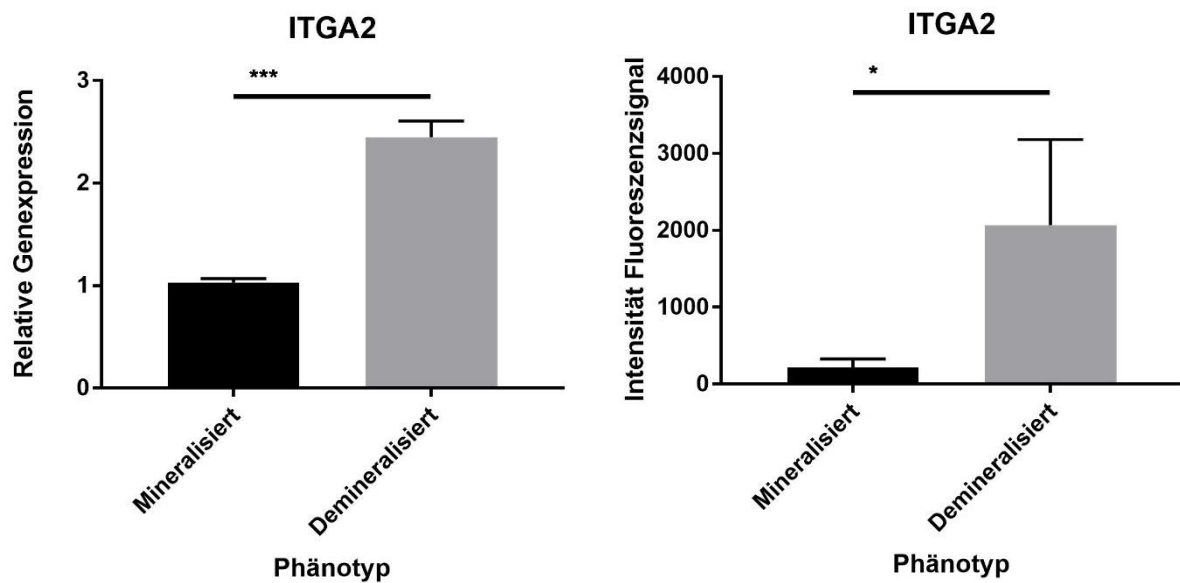


Abbildung 31: ITGA2

Diese Abbildung zeigt für das Gen ITGA2 das Ergebnis der QRT-PCR (links) und den im Microarray gemessenen FC (rechts) im Vergleich dazu (jeweils für den mineralisierten und den demineralisierten Phänotyp).

Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ($n=4$). Grafiken erstellt mit GraphPad Prism 7.

MMP1

MMP1 (Matrix Metalloproteinase 1) gehört zu dem Gene Set GO_EXTRACELLULAR_STRUCTURE_ORGANIZATION (Tabelle 19). In der QRT-PCR zeigte sich eine 1,9-fache Erhöhung ($p < 0,05$) der Genexpression im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp (Abbildung 32). Im Microarray zeigte sich eine 4,3-fach stärkere Intensität ($p < 0,05$) des Fluoreszenzsignals im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp.

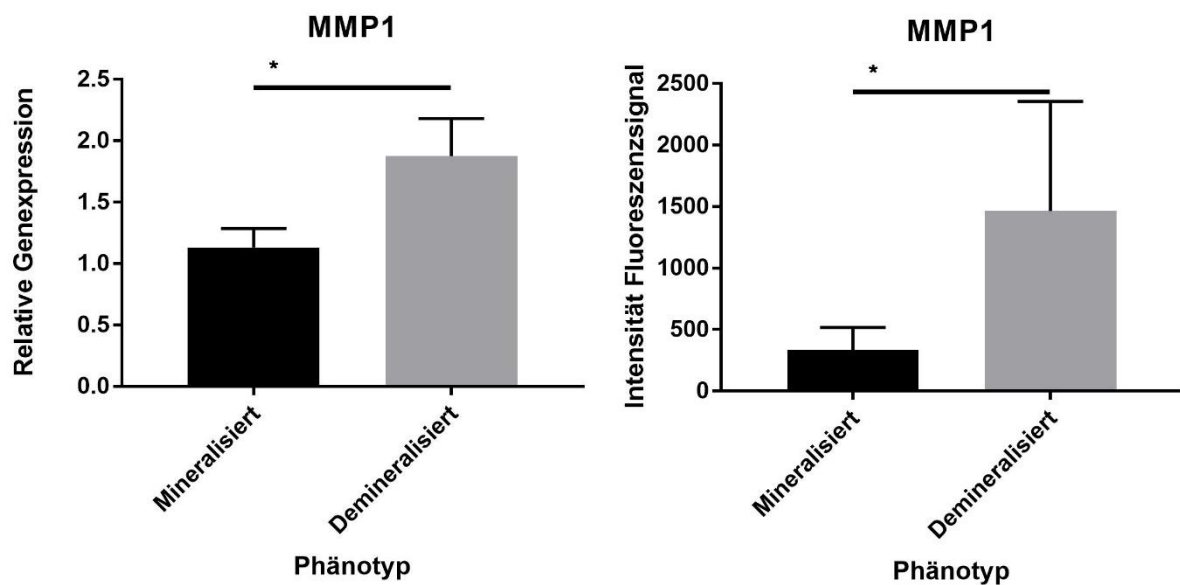


Abbildung 32: MMP1

Diese Abbildung zeigt für das Gen MMP1 das Ergebnis der QRT-PCR (links) und den im Microarray gemessenen FC (rechts) im Vergleich dazu (jeweils für den mineralisierten und den demineralisierten Phänotyp).

Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ($n=4$). Grafiken erstellt mit GraphPad Prism 7.

NID2

NID2 (Nidogen 2) gehört zu den Gene Sets GO_EXTRACELLULAR_MATRIX_COMPONENT (Tabelle 17) GO_EXTRACELLULAR_STRUCTURE_ORGANIZATION (Tabelle 19). In der QRTPCR zeigte sich eine 1,6-fache Erhöhung ($p < 0,01$) der Genexpression im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp (Abbildung 33). Im Microarray zeigte sich eine 2,9-fach stärkere Intensität ($p < 0,05$) des Fluoreszenzsignals im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp.

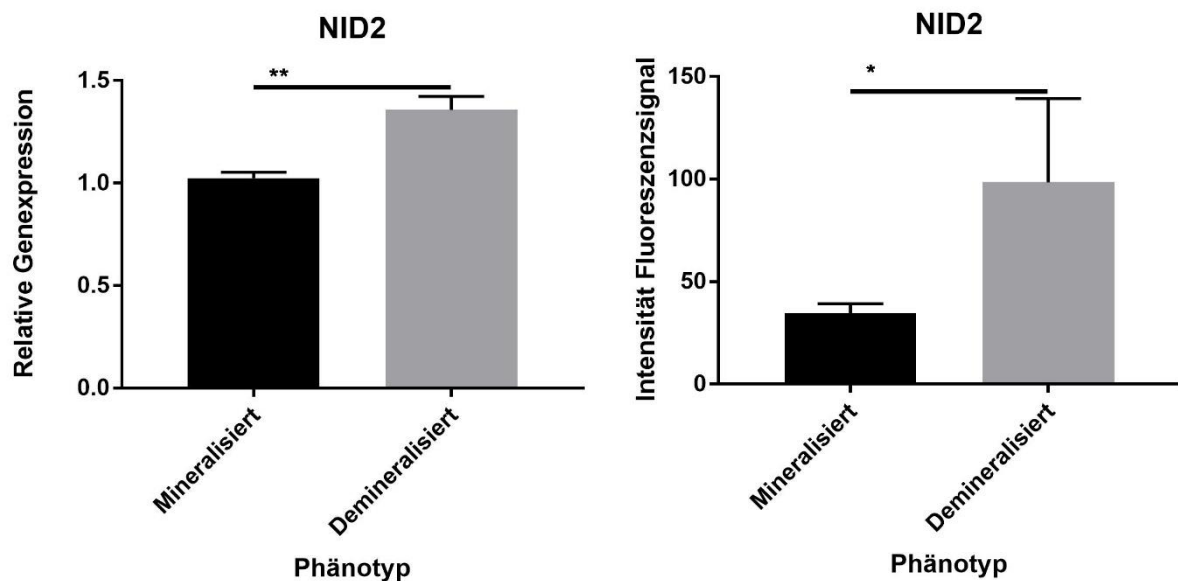


Abbildung 33: NID2

Diese Abbildung zeigt für das Gen NID2 das Ergebnis der QRTPCR (links) und den im Microarray gemessenen FC (rechts) im Vergleich dazu (jeweils für den mineralisierten und den demineralisierten Phänotyp).

Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ($n=4$). Grafiken erstellt mit GraphPad Prism 7.

VCAN

VCAN (Versican) gehört zu dem Gene Set GO_EXTRACELLULAR_STRUCTURE_ORGANIZATION (Tabelle 19). In der QRT-PCR zeigte sich eine 1,7-fache Erhöhung ($p < 0,01$) der Genexpression im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp (Abbildung 34). Im Microarray zeigte sich eine 5,6-fach stärkere Intensität ($p < 0,01$) des Fluoreszenzsignals im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp.

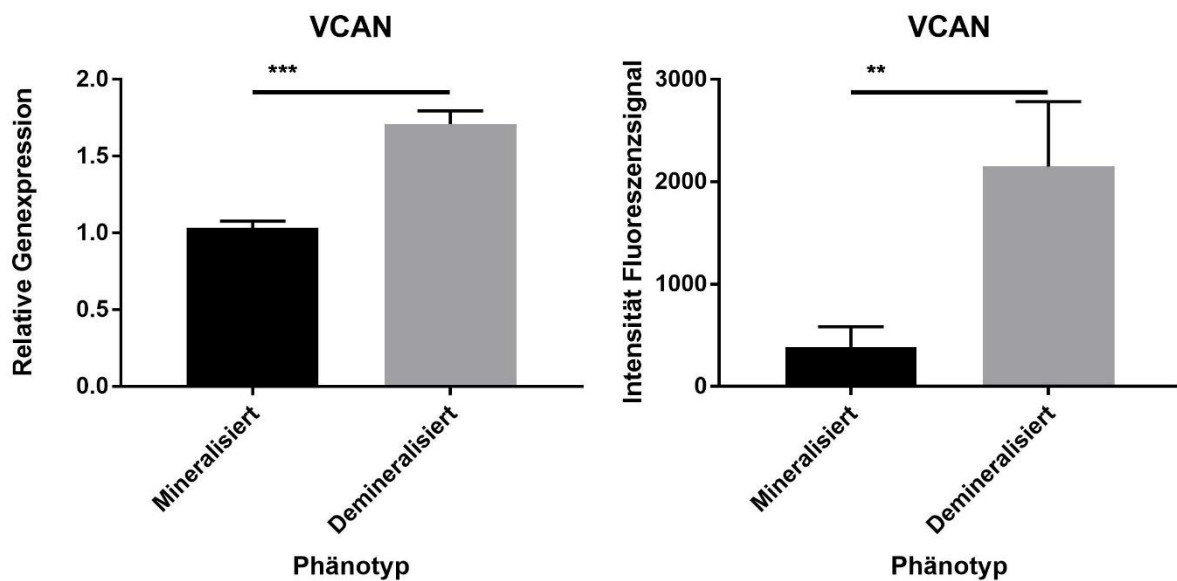


Abbildung 34: VCAN

Diese Abbildung zeigt für das Gen VCAN das Ergebnis der QRT-PCR (links) und den im Microarray gemessenen FC (rechts) im Vergleich dazu (jeweils für den mineralisierten und den demineralisierten Phänotyp).

Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ($n=4$). Grafiken erstellt mit GraphPad Prism 7.

Die Amplifizierung der Gene ADAMTS4, COL1A1, HA2, HMCN1, ITGA2, MMP1, NID2 und VCAN mittels QRT-PCR zeigte eine 1,2- bis 4,6-fache erhöhte Expression der Gene im demineralisierten Phänotyp, im Vergleich zum mineralisierten Phänotyp. In allen untersuchten Genen war die Erhöhung der Genexpression statistisch signifikant ($p < 0,05$). Vergleichend dazu zeigten die untersuchten Gene im Microarray einen tendenziell größeren Unterschied (2,6- bis 10,0-fach) zwischen beiden Phänotypen, hinsichtlich der Intensität des im Microarray detektierten Fluoreszenzsignals. Die Unterschiede in den Intensitäten der Fluoreszenzsignale waren in allen untersuchten Genen statistisch signifikant ($p < 0,05$). Insgesamt konnten die im Microarray detektierten Unterschiede der Intensität der Fluoreszenzsignale für die untersuchten Gene mittels QRT-PCR bestätigt werden.

8 Weiterführende Ergebnisse

8.1 Migrations-Assay

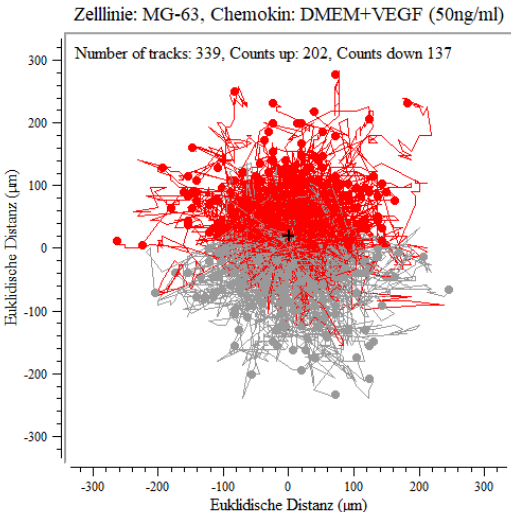
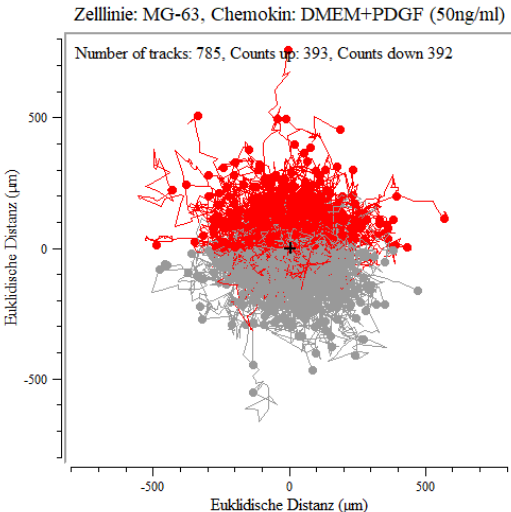
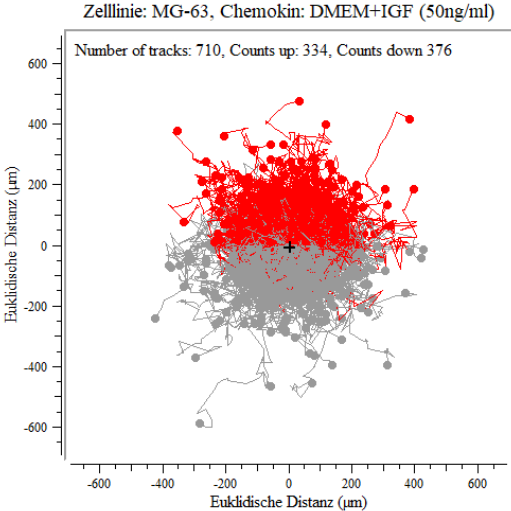
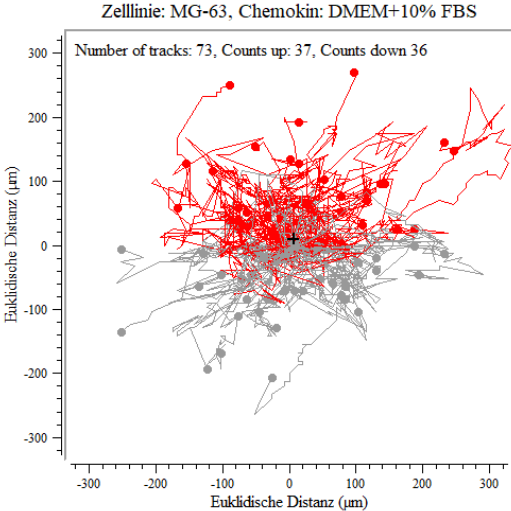
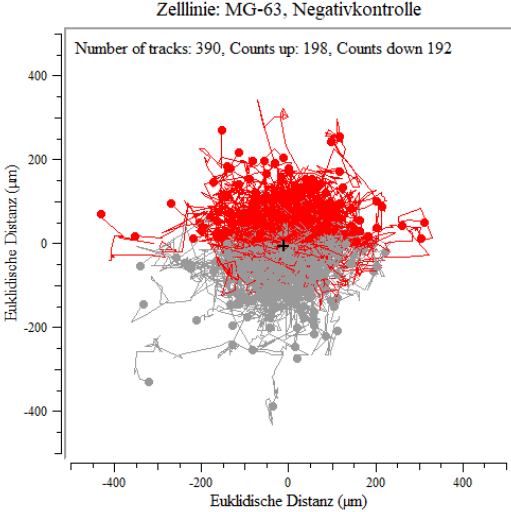
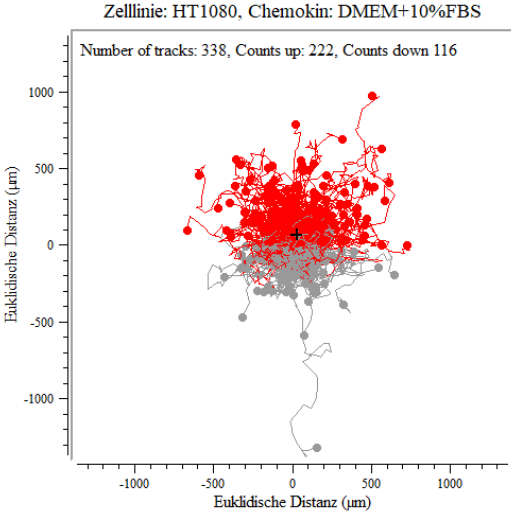
Die im Folgenden präsentierten Ergebnisse der durchgeführten Migrations-Assays dienen als Vorversuche zur Integration eines Migrations-Assays in das bereits bestehende Modell (siehe „Ausblick in die Zukunft“). Zweck der Versuche war es, für die geplante Verknüpfung von Migrations-Assay und globaler Genexpressionsanalysen in einem kombinierten Modell unterschiedliche Zellreihen und Chemokine nach ihrem migratorischen bzw. chemotaktischen Potential zu selektieren. Hierbei wurde zum Ziel gesetzt, die gegen einen chemotaktischen Gradienten gerichtete Migration von sowohl unterschiedlichen Osteosarkom-Zellreihen (MG-63, Hos, Hos/MNNG), als auch primären humanen Osteoblasten zu quantifizieren. Der Fokus lag hierbei auf der Evaluation mehrerer Chemokine mit der Zellreihe MG-63, da mit dieser Zelllinie die Genexpressionsanalysen durchgeführt wurden. Basierend auf bereits publizierten Studien wurden die Wachstumsfaktoren PDGF-BB, VEGF, IGF-1, sowie FBS ausgewählt, da für diese in der Literatur chemotaktische Effekte auf primäre humane Osteoblasten, sowie Osteosarkom-Zelllinien beschrieben wurden.

Reservoir 1 der Ibidi μ -slide Chemotaxis wurde mit dem Chemokin befüllt. Reservoir 2 wurde mit der Kontrollsubstanz befüllt. Alle Timelapse-Aufnahmen erfolgten über 12 Stunden mit einem Bild alle 10 Minuten (insgesamt 72 Bilder). Die Kammer wurde über die gesamte Dauer der Aufnahmen bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Ergebnisse der Auswertung mit dem Chemotaxis&Migration Tool werden im Folgenden dargestellt (Abbildung 35, Tabelle 21 bis einschließlich Tabelle 30). Qualitativ wird ein chemotaktischer Effekt angenommen bei $FMI^{\parallel} > FMI^{+}$ und $p < 0,05$ im Rayleigh-Test. Quantifiziert wird der chemotaktische Effekt durch die Länge CoM. Kein statistisch signifikanter chemotaktischer Effekt wird angenommen bei $FMI^{+} \approx 0$, $FMI^{\parallel} \approx 0$, und $p > 0,05$.

Um den Versuchsaufbau auf prinzipielle Funktionalität zu überprüfen, wurde eine Positivkontrolle mit HT1080-Zellen durchgeführt (Tabelle 21). Nach Rücksprache mit dem Hersteller der μ -slides, Ibidi, kann für diese Zellreihe nach 12 Stunden ein statistisch signifikanter chemotaktischer Effekt erwartet werden, wenn FBS als Chemokin verwendet wird. Wie erwartet ließ sich nach 12 Stunden ein statistisch signifikanter chemotaktischer Effekt nachweisen ($p < 0,0001$).

Statistisch signifikante chemotaktische Effekte ($p < 0,05$) ließen sich für die Osteosarkom-Zelllinien Hos (Chemokine: FBS und VEGF), Hos/MNNG (Chemokin: FBS), und MG-63

(Chemokin: VEGF), sowie für primäre humane Osteoblasten (Chemokin: FBS) beobachten (Abbildung 36).



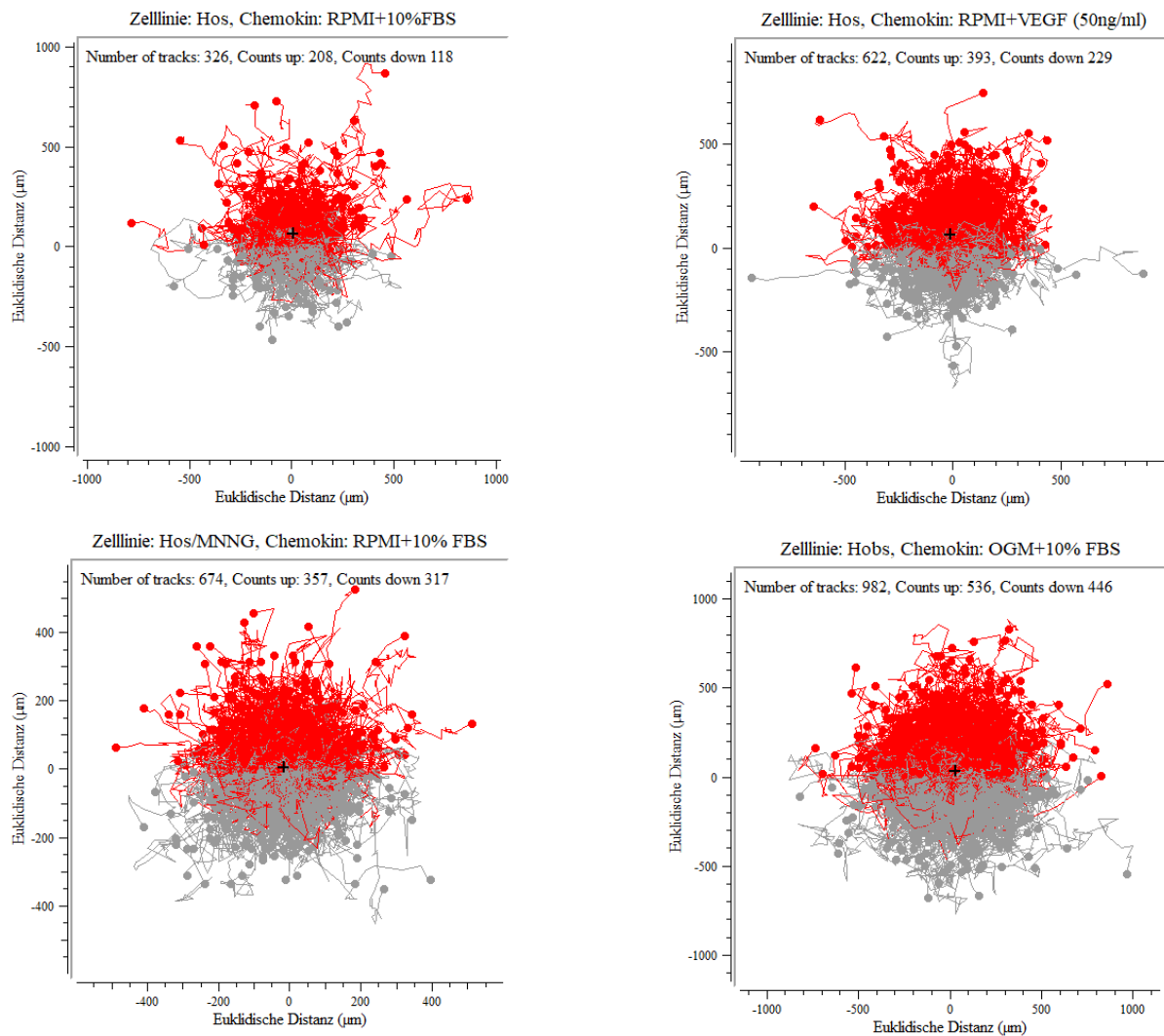


Abbildung 35: Ergebnisse der Migrations-Assays

Diese Graphen zeigen die mit Chemotaxis&Migration Tool erstellten Migrationsplots für die jeweiligen untersuchten Zelllinien mit den entsprechenden Chemokinen. Die Graphen zeigen die nach oben/ in Richtung des Chemokins migrierten Zellen (rote Pfade, „Counts up“) und die nach unten/in Richtung der Kontrollsubstanz migrierten Zellen (graue Pfade, „Counts down“). Außerdem werden die insgesamt während der Timelapse-Aufnahme gemessene Anzahl der Migrationspfade („Number of tracks“) angegeben. Die durchschnittliche Position des CoM nach Ablauf der Timelapse-Aufnahme ist jeweils mit einem schwarzen Kreuz (+) markiert. Grafiken erstellt mit Chemotaxis & Migration Tool.

Tabelle 21: Ergebnisse Migrations-Assay, HT1080, Positivkontrolle

| | | | | |
|--|---|----------------|-------------------|-----------|
| Zelllinie | <i>HT1080</i> | | | |
| Chemokin (Reservoir 1) | <i>DMEM+10% FBS</i> | | | |
| Kontrollsubstanz (Reservoir 2) | <i>DMEM</i> | | | |
| Forward Migration Index (FMI) | FMI^+ : 0,023 FMI^{\parallel} : -0,066 | | | |
| Center of Mass (μm) | X: 26,7 Y: 72,9 Länge: 77,6 | | | |
| Directness | 0,231 | | | |
| Rayleigh Test (p-Wert) | 2.887×10^{-9} | | | |
| | Minimum | Maximum | Mittelwert | SD |
| Akkumulierte Distanz (μm) | 342,938 | 2690,170 | 1115,750 | 410,173 |
| Euklidische Distanz (μm) | 6,450 | 1324,140 | 246,474 | 175,356 |
| Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{min}$) | 1,351 | 5,978 | 3,203 | 0,917 |

Tabelle 22: Ergebnisse Migrations-Assay, MG-63, Negativkontrolle

| | | | | |
|--|--|----------------|-------------------|-----------|
| Zelllinie | <i>MG-63</i> | | | |
| Chemokin (Reservoir 1) | <i>DMEM</i> | | | |
| Kontrollsubstanz (Reservoir 2) | <i>DMEM</i> | | | |
| Kontrollsubstanz (Reservoir 2) | | | | |
| Forward Migration Index (FMI) | FMI^+ : -0,020 FMI^{\parallel} : -0,006 | | | |
| Center of Mass (μm) | X: -14,3 Y: -3,0 Länge: 14,6 | | | |
| Directness | 0,194 | | | |
| Rayleigh Test (p-Wert) | 0,143 | | | |
| | Minimum | Maximum | Mittelwert | SD |
| Akkumulierte Distanz (μm) | 212,407 | 1729,360 | 745,642 | 296,924 |

| | | | | |
|--|---------|---------|---------|--------|
| Euklidische Distanz (μm) | 9,12168 | 460,667 | 125,907 | 67,002 |
| Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{min}$) | 0,518 | 4,089 | 1,763 | 0,574 |

Tabelle 23: Ergebnisse Migrations-Assay, MG-63, Chemokin: DMEM+10% FBS

| | | | | |
|--|---|----------------|-------------------|-----------|
| Zelllinie; Chemokin | <i>MG-63</i> | | | |
| Chemokin (Reservoir 1) | <i>DMEM+10%FBS</i> | | | |
| Kontrollsubstanz (Reservoir 2) | <i>DMEM</i> | | | |
| Forward Migration Index (FMI) | FMI^+ : 0,14 FMI^{\parallel} : 0,010 | | | |
| Center of Mass (μm) | X: 6,1 Y: 11,2 Länge: 12,8 | | | |
| Directness | 0,162 | | | |
| Rayleigh Test (p-Wert) | 0,712 | | | |
| | Minimum | Maximum | Mittelwert | SD |
| Akkumulierte Distanz (μm) | 290,302 | 1876,060 | 835,850 | 286,571 |
| Euklidische Distanz (μm) | 6,450 | 287,658 | 125,259 | 68,7628 |
| Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{min}$) | 0,6751 | 3,0259 | 1,586 | 0,522 |

Tabelle 24: Ergebnisse Migrations-Assay, MG-63, Chemokin: DMEM+IGF (50ng/ml)

| | | | | |
|--|---|--|--|--|
| Zelllinie | <i>MG-63</i> | | | |
| Chemokin (Reservoir 1) | <i>DMEM+IGF(50ng/ml)</i> | | | |
| Kontrollsubstanz (Reservoir 2) | <i>DMEM</i> | | | |
| Forward Migration Index (FMI) | FMI^+ : 0,003 FMI^{\parallel} : -0,008 | | | |
| Center of Mass (μm) | X: 1,4 Y: -4,3 Länge: 4,5 | | | |
| Directness | 0,209 | | | |
| Rayleigh Test (p-Wert) | 0,620 | | | |

| | Minimum | Maximum | Mittelwert | SD |
|----------------------------------|----------------|----------------|-------------------|-----------|
| Akkumulierte Distanz (µm) | 201,053 | 2001,120 | 817,088 | 288,004 |
| Euklidische Distanz (µm) | 6,450 | 651,961 | 160,052 | 89,780 |
| Geschwindigkeit (µm/min) | 0,835 | 4,33128 | 2,296 | 0,585 |

Tabelle 25: Ergebnisse Migrations-Assay, MG-63, Chemokin: DMEM+IGF (50ng/ml)

| Zelllinie | <i>MG-63</i> | | | |
|---------------------------------------|---|----------------|-------------------|-----------|
| Chemokin (Reservoir 1) | <i>DMEM+IGF(50ng/ml)</i> | | | |
| Kontrollsubstanz (Reservoir 2) | <i>DMEM</i> | | | |
| Forward Migration Index (FMI) | <i>FMI⁺: 0,000</i> <i>FMI: 0,003</i> | | | |
| Center of Mass (µm) | X: 1,2 Y: 1,3 Länge: 1,8 | | | |
| Directness | 0,202 | | | |
| Rayleigh Test (p-Wert) | 0,766 | | | |
| | Minimum | Maximum | Mittelwert | SD |
| Akkumulierte Distanz (µm) | 271.913 | 2543.560 | 964.092 | 354.468 |
| Euklidische Distanz (µm) | 9.122 | 761.127 | 179.900 | 102.297 |
| Geschwindigkeit (µm/min) | 0.950 | 5.404 | 2.693 | 0.731 |

Tabelle 26: Ergebnisse Migrations-Assay, MG-63, Chemokin: DMEM+VEGF (50ng/ml)

| | | | | |
|---------------------------------------|---|--|--|--|
| Zelllinie | <i>MG-63</i> | | | |
| Chemokin (Reservoir 1) | <i>DMEM+VEGF(50ng/ml)</i> | | | |
| Kontrollsubstanz (Reservoir 2) | <i>DMEM</i> | | | |
| Forward Migration Index (FMI) | <i>FMI⁺: -0,004</i> <i>FMI: 0,04</i> | | | |
| Center of Mass (µm) | X: -1,1 Y: 21,3 Länge: 21,3 | | | |

| | | | | |
|----------------------------------|------------------------|----------------|-------------------|-----------|
| Directness | 0,198 | | | |
| Rayleigh Test (p-Wert) | 2,434x10 ⁻⁵ | | | |
| | Minimum | Maximum | Mittelwert | SD |
| Akkumulierte Distanz (µm) | 186,657 | 1420,910 | 643,447 | 242,757 |
| Euklidische Distanz (µm) | 9,122 | 294,165 | 110,543 | 52,200 |
| Geschwindigkeit (µm/min) | 0,514 | 3,088 | 1,424 | 0,470 |

Tabelle 27: Ergebnisse Migrations-Assay, Hos, Chemokin: RPMI+10% FBS

| | | | | |
|---------------------------------------|---|----------------|-------------------|-----------|
| Zelllinie | <i>Hos</i> | | | |
| Chemokin (Reservoir 1) | <i>RPMI+10% FBS</i> | | | |
| Kontrollsubstanz (Reservoir 2) | <i>RPMI</i> | | | |
| Forward Migration Index (FMI) | <i>FMI⁺: 0,001</i> <i>FMI: 0,062</i> | | | |
| Center of Mass (µm) | X: 1,5 Y: 71,2 Länge: 71,2 | | | |
| Directness | 0,211 | | | |
| Rayleigh Test (p-Wert) | 4,105x10 ⁻⁹ | | | |
| | Minimum | Maximum | Mittelwert | SD |
| Akkumulierte Distanz (µm) | 385,578 | 3233,970 | 1121,470 | 421,087 |
| Euklidische Distanz (µm) | 6,450 | 980,845 | 225,393 | 151,423 |
| Geschwindigkeit (µm/min) | 1,152 | 5,139 | 3,207 | 0,795 |

Tabelle 28: Ergebnisse Migrations-Assay, Hos, Chemokin: RPMI+10% FBS

| | | | | |
|---------------------------------------|--|--|--|--|
| Zelllinie | <i>Hos</i> | | | |
| Chemokin (Reservoir 1) | <i>RPMI+10% FBS</i> | | | |
| Kontrollsubstanz (Reservoir 2) | <i>RPMI</i> | | | |
| Forward Migration Index (FMI) | <i>FMI⁺: -0,017</i> <i>FMI: 0,060</i> | | | |
| Center of Mass (µm) | X: -16,7 | | | |

| | | | | |
|----------------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------|----------------|
| | Y: 64,9 Länge: 67,1 | | | |
| Directness | 0,239 | | | |
| Rayleigh Test (p-Wert) | 8,235x10 ⁻¹⁵ | | | |
| | Minimum | Maximum | Mittelwert | SD |
| Akkumulierte Distanz (µm) | 345,248 | 2691,420 | 1064,830 | 393,600 |
| Euklidische Distanz (µm) | 6,450 | 945,954 | 237,314 | 130,613 |
| Geschwindigkeit (µm/min) | 1,134 | 6,175 | 3,121 | 0,775 |

Tabelle 29: Ergebnisse Migrations-Assay, Hos/MNNG, Chemokin: RPMI+10% FBS

| | | | | |
|---------------------------------------|--|----------------|-------------------|-----------|
| Zelllinie | <i>Hos/MNNG</i> | | | |
| Chemokin (Reservoir 1) | <i>RPMI+10% FBS</i> | | | |
| Kontrollsubstanz (Reservoir 2) | <i>RPMI</i> | | | |
| Forward Migration Index (FMI) | <i>FMI⁺: -0,027</i> <i>FMI: 0,008</i> | | | |
| Center of Mass (µm) | X: -20,1 Y: 8,2 Länge: 21,7 | | | |
| Directness | 0,214 | | | |
| Rayleigh Test (p-Wert) | 9,789x10 ⁻⁵ | | | |
| | Minimum | Maximum | Mittelwert | SD |
| Akkumulierte Distanz (µm) | 217,154 | 2369,990 | 867,060 | 332,130 |
| Euklidische Distanz (µm) | 6,450 | 558,884 | 169,563 | 88,528 |
| Geschwindigkeit (µm/min) | 0,944 | 4,491 | 2,347 | 0,639 |

Tabelle 30: Ergebnisse Migrations-Assay, Hobs, Osteoblast Growth Medium+10% FBS

| | | | | |
|---------------------------------------|---|--|--|--|
| Zelllinie | <i>Humane Osteoblasten</i> | | | |
| Chemokin (Reservoir 1) | <i>Osteoblast Growth Medium+10% FBS</i> | | | |
| Kontrollsubstanz (Reservoir 2) | <i>Osteoblast Growth Medium</i> | | | |
| Forward Migration Index | <i>FMI⁺: 0,022</i> | | | |

| | | | | |
|----------------------------------|------------------------------------|----------------|-------------------|-----------|
| (FMI) | <i>FMI</i> ∥: 0,030 | | | |
| Center of Mass (µm) | X: -27,4 Y: 36,9 Länge: 45,9 | | | |
| Directness | 0,216 | | | |
| Rayleigh Test (p-Wert) | 3,498x10 ⁻⁶ | | | |
| | Minimum | Maximum | Mittelwert | SD |
| Akkumulierte Distanz (µm) | 421,861 | 3800,840 | 1460,620 | 547,060 |
| Euklidische Distanz (µm) | 6,700 | 1106,960 | 294,298 | 159,183 |
| Geschwindigkeit (µm/min) | 1,205 | 7,806 | 4,237 | 0,976 |

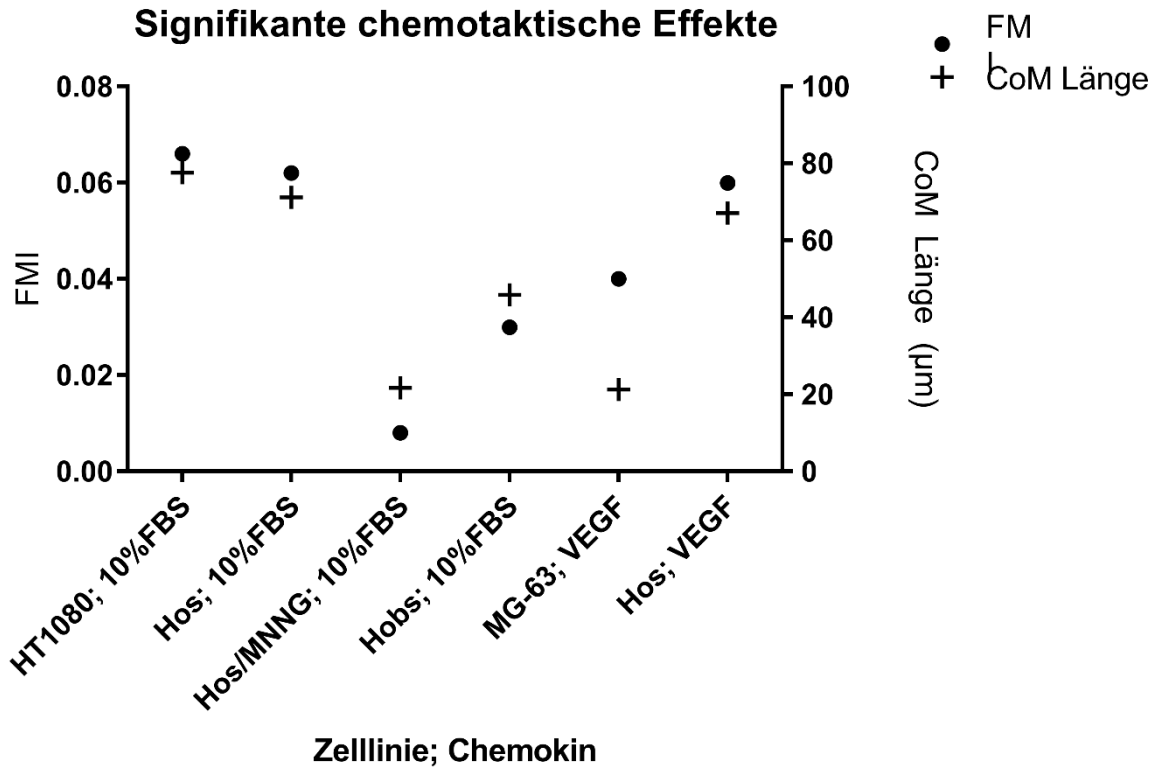


Abbildung 36: Signifikante chemotaktische Effekte

Auf der X-Achse sind die Zelllinien mit den jeweiligen Chemokinen aufgetragen, bei denen nach 12 Stunden signifikante chemotaktische Effekte beobachtet werden konnten aufgetragen. Auf der linken Y-Achse ist der beobachtete $FMI_{||}$ nach 12 Stunden aufgetragen. Auf der rechten Y-Achse ist die Länge des CoM aufgetragen, mit der sich eine quantitative Aussage über einen chemotaktischen Effekt treffen lässt. Die Zelllinie HT1080 dient als Kontrolle. Der stärkste chemotaktische Effekt wurde bei der Zelllinie Hos mit dem Chemokin FBS gemessen ($FMI_{||}=0,397$, $CoM=247,8$). Der schwächste chemotaktische Effekt trat bei der Zelllinie MG-63 mit dem Chemokin VEGF auf ($FMI_{||}=0,040$, $CoM=21,3$). Grafik erstellt mit GraphPad Prism 7.

9 Diskussion

9.1 Stärken, Schwächen und Potential des neuen Oberflächenmodells

Mit dem entwickelten Modell ist es möglich, in adhärenen Osteoblasten Änderungen der globalen Genexpression in Abhängigkeit des Mineralisierungsgrades der verwendeten Knochenoberflächen zu quantifizieren. Das Modell stellt somit einen neuen und innovativen Ansatz dar und eröffnet die Möglichkeit, den Einfluss der mineralischen Komponente inklusive assoziierten Oberflächen-Veränderungen innerhalb der Knochenphysiologie eingehend zu untersuchen. Die durchgeführten Microarray-Analysen zeigen außerdem, dass die gemessenen Werte innerhalb der beiden Phänotypen reproduzierbar sind, sowie mittels QRT-PCR validierbar. Innerhalb des Modells erfolgt die Quantifizierung der globalen Genexpression auf Transkriptions-Ebene. In weiteren Arbeiten ist es daher anzustreben, das Modell dahingehend zu erweitern, dass die Unterschiede zwischen den Phänotypen zusätzlich auf Protein-Ebene quantifiziert werden, beispielsweise über ein Western-Blot-Verfahren. Dies wäre allerdings vergleichsweise einfach zu implementieren, da die Techniken zur Zellisolation von den Knochenoberflächen, sowie die Weiterverarbeitung der Zellen bereits in der vorliegenden Arbeit entwickelt wurden, was die große Flexibilität des Modells unterstreicht. Das Modell ermöglicht es zudem, die adhärenen Zellen mittels fluoreszierenden Molekülen sichtbar zu machen, was entscheidend ist, um das zelluläre Migrationsverhalten mit den gemessenen Änderungen in der Genexpression in einem zukünftigen kombinierten Modell zu verknüpfen.

Prinzipiell zeigt sich, dass der Trend von 2D- deutlich hin zu 3D-in-vitro Modellen geht, um die Komplexität der Knochenphysiologie besser zu simulieren. So lassen sich in einem 3D-Modell beispielsweise mehr Aussagen über Zell-Zell-Interaktionen treffen, als das in einem 2D-Modell möglich wäre (Metzger et al. 2017). Es sollte daher bspw. in Betracht gezogen werden Überlegungen anzustellen, inwieweit das Modell mit einem Bioreaktor, beschrieben in (Genova et al. 2016), kombiniert werden kann, um eine künstliche Perfusion der Oberflächen zu integrieren. In diesem Kontext ist anzunehmen, dass „Tissue Engineering“ in Zukunft noch wichtiger wird, um die Plastizität und Funktionalität von Trägermaterialien zu verbessern (Tortelli et al. 2009). Die fehlende Vaskularisierung der meisten in-vitro Modelle schränkt die Möglichkeiten, physiologische Vorgänge des Knochenmetabolismus artifiziell nachzubilden deutlich ein. Da die hohe Relevanz der Vaskularisierung beispielsweise während dem bone remodeling seit längerem bekannt ist (Jilka 2003), wurde in mehreren Studien versucht, Co-Kulturen von osteogenen und vasculogenen Precursor-Zellen in

kombinierten 3D-in-vitro Modellen zu etablieren (Genova et al. 2016) (Papadimitropoulos et al. 2011). Es ist anzunehmen, dass die schwierige Umsetzbarkeit einer physiologischen Vaskularisierung auch in Zukunft einer der Hauptgründe für eine Limitierung der in-vitro Modelle hinsichtlich der Übertragung von mit Hilfe der Modelle gewonnenen Erkenntnisse auf in vivo ablaufende Prozesse ist.

Um den Mineralisierungsgrad der in dem Oberflächenmodell verwendeten Knochenscheiben zu quantifizieren wurden mehrere Knochendichtemessungen durchgeführt. Erwartungsgemäß zeigen die Ergebnisse, dass eine vollständige Demineralisierung der Knochenscheiben durch eine Behandlung mit 0,5 M EDTA über 16 Stunden möglich ist. Das Oberflächenmodell wurde somit in Hinblick auf den Mineralisierungsgrad validiert. Des Weiteren ist nicht zu erwarten, dass eine Demineralisierung der kompletten Knochenscheiben notwendig ist, da man annehmen kann, dass einzelne Osteoblasten mit der Knochenoberfläche nicht in ihrer gesamten Tiefe interagieren. Zur weiteren Charakterisierung der Knochenoberflächen wurden durch die Arbeitsgruppe von Dr. Nancy Pleshko (Department of Bioengineering, Temple University, Philadelphia, USA) Fourier-Transform-Infrarotspektrometrien (FTIR) durchgeführt, deren Ergebnisse in der auf dieser Arbeit basierenden Publikation veröffentlicht sind. Die Ergebnisse der FTIR bestätigen eine vollständige Demineralisierung der Knochenoberfläche durch die Behandlung mit EDTA und unterstützen somit der Ergebnisse der Osteodensitometrie. Des Weiteren wurden mit FTIR die sterilisierten mineralisierten Knochenscheiben hinsichtlich der Qualität ihrer mineralischen Komponente mit Referenzknochen anderer Spezies (Mensch, Kuh, Zebrafisch und Ratte) verglichen. Als Parameter für die Charakteristika der mineralischen Komponente wurden dabei die mineralische Kristallinität, die mineralische Reife, sowie der Carbonat-Gehalt gemessen. Hier zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Referenzknochen, sowie den mit Essigsäure behandelten mineralisierten Knochenscheiben. Dies lässt zum einen die Schlussfolgerung zu, dass die Behandlung mit Essigsäure die mineralische Komponente der Knochenscheiben nicht messbar beeinflusst und lässt zum anderen spekulieren, dass sich die gemessenen Änderungen der Genexpression auch eingeschränkt mit der mineralischen Komponente in bspw. menschlichen Knochen verknüpfen lassen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Osteodensitometrie und der FTIR-Spektroskopie zum einen, dass die Behandlung mit EDTA eine gute Möglichkeit darstellt, die in dem Modell verwendeten Knochenoberflächen vollständig zu demineralisieren und zum anderen, dass die

Sterilisierung die physiologische Struktur der mineralischen Komponente nicht messbar beeinflusst.

Zur weiteren Validierung des entwickelten Oberflächenmodells wurden MG-63 Zellen mit fluoreszierenden Molekülen markiert um die Zellen auf Adhäsions- und Überlebensfähigkeit hin zu untersuchen. In den Mikroskop-Aufnahmen zeigten sich keine morphologischen Rückschlüsse darauf, dass die MG-63 Zellen durch die Sterilisierung und Demineralisierung der Knochenoberflächen in ihrem Überleben und ihrer Adhäsion auf den Oberflächen beeinträchtigt sind. Obwohl die visuelle Beurteilung der Zellen auf den bearbeiteten Knochenoberflächen viele Rückschlüsse auf das optische Adhäsionsverhalten der Zellen zulässt, fehlt der Vergleich mit adhärenenten Zellen auf einer komplett nativen Knochenoberfläche, welche nicht mit Essigsäure sterilisiert wurde. Da die Sterilisierung mit Essigsäure hierbei durch ein alternatives Verfahren ersetzt werden müsste, um eine Kontamination zu vermeiden, ist es wahrscheinlich, dass die Struktur der Knochenoberfläche davon ebenfalls beeinflusst werden würde, was einen solchen Vergleich weitgehend ausschließt. Es ist davon auszugehen, dass man bei alternativen Verfahren zur Sterilisierung der Oberflächen wie bspw. Bestrahlung oder Autoklavierung ebenfalls mit mehr oder weniger ausgeprägten Nachteilen konfrontiert wird, weshalb die Suche nach einem „optimalen“ Verfahren mit keinen weiteren Vorteilen verbunden ist.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit die Fluoreszenz-Aufnahmen beurteilt, um optisch festzustellen, ob die im Modell verwendeten Zellen von den verschiedenen Oberflächenqualitäten hinsichtlich ihrer Morphologie und ihrem Adhäsionsverhalten unterschiedlich beeinflusst werden. Hierbei konnten keine Unterschiede in der Zellmorphologie auf mineralisierten, im Vergleich zu demineralisierten Knochenoberflächen festgestellt werden. Die Markierung mit Fluoreszenz ermöglicht zudem die Darstellung der Zellen auf den unterschiedlichen Knochenoberflächen in ausreichender Qualität und über einen ausreichend langen Zeitraum, um Timelapse-Aufnahmen durchführen zu können, was eine Hauptvoraussetzung für zukünftige Anwendungen des entwickelten Oberflächenmodells darstellt (siehe „Ausblick in die Zukunft“).

Im Folgenden wurde durch den Autor die Möglichkeit untersucht, mit einem nicht-chemischen und somit Zell-schonenden Verfahren eine ausreichende Anzahl an Zellen von den Knochenoberflächen zu gewinnen, um eine Genexpressionsanalyse durchzuführen. Die Fluoreszenz-Aufnahmen zeigen, dass es möglich ist, mit einem Zellwischer durch mechanische Entfernung alle adhärenenten Zellen von den sterilisierten mineralisierten bzw.

demineralisierten Knochenoberflächen zu gewinnen. Dies stellt somit eine Möglichkeit dar, Zellen ohne Zugabe von potentiell Oberflächen-angreifenden Reagenzien (bspw. Trypsin) schonend von den Knochenoberflächen zu entfernen, um diese für die anschließende RNA-Extraktion zu gewinnen. Gleichzeitig zeigte sich, dass die mechanische Entfernung der Zellen eine schnelle, preiswerte, sowie reproduzierbare Methode ist, was das Modell auch dahingehend attraktiv macht, dieses schnell und unkompliziert mit weiteren molekularen Methoden, wie bspw. Western-Blot-Verfahren, zu verknüpfen.

Insgesamt sind die durch die Behandlung mit EDTA und Essigsäure, sowie durch das Sägen der Knochenstücke hervorgerufenen strukturellen Veränderungen der Knochenoberfläche eine Limitation des entwickelten Modells, da anzunehmen ist, dass die „Wahrnehmung“ der Knochenoberfläche durch die Zellen dadurch verfälscht wird. Nichtsdestotrotz sind innerhalb des Modells die strukturellen Veränderungen der Knochenoberflächen durch die Sterilisation für beide Phänotypen identisch, was die experimentellen Bedingungen zwar nicht physiologisch, jedoch miteinander vergleichbar macht. So zeigen die Ergebnisse der FTIR-Spektroskopie, dass trotz Behandlung mit EDTA zwischen den mineralisierten und den demineralisierten Knochenoberflächen keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der oberflächlichen strukturellen Organisation des Kollagen-I-Netzwerkes, sowie der Reife des Kollagens, d.h. dem Gehalt des Netzwerkes an Kollagen-I-Cross-links messbar waren. Es ist daher anzunehmen, dass die mineralisierten bzw. demineralisierten Knochenoberflächen in ihrer Ultrastruktur vergleichbar sind und sich ausschließlich hinsichtlich des Mineralisierungsgrades unterscheiden, was zu der Schlussfolgerung führt, dass die „Wahrnehmung“ der Oberflächen durch die Osteoblasten in beiden Phänotypen identisch ist. Dies bietet optimale Voraussetzungen dafür, innerhalb des Oberflächenmodells gemessene Änderungen der zellulären Genexpression hochspezifisch auf die mineralische Komponente der Knochenoberflächen zurückführen zu können.

9.2 Charakteristika der identifizierten Gene der Osteoblasten-Migration

Die Analyse der Microarray-Daten mit GSEA zeigte eine statistisch signifikante Hochregulation von mit EZM und Zelladhäsion assoziierten Gene Sets. Es zeigte sich zudem, dass von 2855 hochregulierten Gene Sets im demineralisierten Phänotyp 3 der 5 am stärksten hochregulierten Gene Sets in die genannten Prozesse involviert sind, was auf einen starken Zusammenhang zwischen der demineralisierten Knochenoberfläche und der Induktion von Genen, welche mit Adhäsion und EZM verknüpft sind schließen lässt. Das entwickelte in-vitro Modell stellt damit eine gute Screening-Methode dar, um den Einfluss

demineralisierten Knochenoberflächen auf die globale Genexpression von humanen Osteoblasten-artigen Zellen zu messen.

Die Ergebnisse der durchgeführten QRT-PCR bestätigen die Hochregulation der Gene ADAMTS4, COL1A1, HAS2, HMCN1, ITGA2, MMP1, NID2 und VCAN im demineralisierten Phänotyp. Die im Microarray gemessenen FC fallen im Vergleich zu den in der QRT-PCR gemessenen Unterschiede in der Genexpression bei allen untersuchten Genen größer aus. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse der QRT-PCR eine statistisch signifikante Überexpression aller analysierten Gene im demineralisierten Phänotyp, was mit den Ergebnissen der Microarrays korreliert.

COL1A1 kodiert für die Alpha-1 Untereinheit von Kollagen I, welche zusammen mit einer weiteren Alpha-1 Polypeptid-Kette und einer Alpha-2 Untereinheit das vollständige Protein bildet (Tromp et al. 1988). Kollagen I ist eine von 28 Kollagen-Isoformen und spielt als Hauptbestandteil der von Osteoblasten sezernierter EZM eine zentrale Rolle in der Knochenphysiologie (Mavrakos and Vrotsos 1988), weswegen sich entschieden wurde COL1A1 selektiv zu amplifizieren. Zusammen mit verschiedenen Integrinen aus der Integrin Superfamilie bildet Kollagen I innerhalb der EZM im Knochengewebe eine funktionelle Einheit, wobei ITGA2 als Rezeptor für Kollagen I fungiert (Heino 2000). Die bereits in der Einleitung beschriebenen vielfältigen Interaktion von Kollagen I und Integrinen, sowie deren Relevanz für die Komposition der EZM, Migration, Adhäsion und Erkennung von Oberflächenbeschaffenheiten durch Osteoblasten führten außerdem zu der Entscheidung, ITGA2 als für die Fragestellung relevantes Gen zu erachten.

Die Matrix-Metalloproteinase 1 (MMP-1), welche auch als Kollagenase bezeichnet wird, ist eine Zink-abhängige Protease und moduliert über Degradierung von extrazellulären Proteinen die Zusammensetzung der EZM (Nagase, Barrett, and Woessner 1992). Obwohl Kollagen-Fibrillen das primäre Substrat von MMP-1 sind, ist die Protease in der Lage weitere EZM-Bestandteile wie Perlecan, Laminin, Aggrecan, und Versican zu prozessieren (Lu et al. 2009) (Page-McCaw, Ewald, and Werb 2007). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass die artifizielle Suppression von MMP-1 und MMP-13 in MG-63 Zellen zu einer Induktion von den osteoblastären Markern Bone morphogenetic Protein-2 (BMP-2), Alkalische Phosphatase (AP), Osteogenic Protein (OP) und Bone Sialoprotein (BSP) sowie den Transkriptionsfaktoren Runx-related transcription factor 2 (Runx2), Osterix (Osx) und muscle segment homolog Drosophila homeobox 2 (MSX2) führt und somit unmittelbar Einfluss auf die Differenzierung von Osteoblasten hat (Hayami, Kapila, and Kapila 2011). Obwohl

spekulativ, könnte man die negative Korrelation von MMP-1 und MMP-13 mit der Aktivität von osteoblastären Markern als Argument für die räumliche und zeitliche Trennung von ortsständigen differenzierten Osteoblasten einerseits und migrierenden Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen andererseits sehen.

Ähnlich wie MMP-1 ist ADAMTS4 eine Metalloproteinase, welche chondroitin sulfat hyaluronan-bindende proteoglycane (CSPGs), wie versican, brevican, aggrecan und neurocan innerhalb der EZM prozessiert und degradiert (Kelwick et al. 2015). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten über die Sekretion von ADAMTS4 die Menge an Versican innerhalb der EZM modulieren können und mit diesem Mechanismus die Entwicklung von Lamellenknochen aus Geflechtknochen während der Knochenentwicklung beeinflussen (Nakamura et al. 2005). ADAMTS4 scheint zudem, ebenso wie MMP-1 eine Rolle in der Entstehung von Osteoarthritis zu spielen (Hopwood et al. 2007) (Sieker et al. 2017). Es ist zudem bekannt, dass Matrix-Metalloproteinasen über Degradierung der EZM von Osteoblasten zelluläre Migration und Adhäsion mediieren (Ortega et al. 2003).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Versican (VCAN), welches als Protein der EZM sowohl Substrat von MMP-1, als auch von ADAMTS4 ist, über die Induktion durch Runx2 und FGF2 die Proliferation von Osteoblasten und die Osteogenese reguliert (Teplyuk et al. 2009). Es wird dabei angenommen, dass Versican Teil eines EZM-medierten Feedbackmechanismus innerhalb des Knochengewebes ist. Der in mehreren Studien gezeigte starke Zusammenhang zwischen der EZM und Migration sowie Adhäsion innerhalb des Knochengewebes, führte deshalb zu der Annahme, dass die Gene MMP-1 und ADAMTS4, sowie VCAN über Modulation und Komposition der EZM von Osteoblasten Einfluss auf diese Prozesse nimmt und somit von besonderer Relevanz für zukünftige Fragestellung sein können.

Das Enzym Hyaluronan Synthase 2 (HAS2) synthetisiert Hyaluronan bzw. Hyaluronsäure, welche in die EZM des Knochengewebes integriert wird und darüber Einfluss auf Adhäsion, Proliferation und Migration nimmt (Huang et al. 2003). Dabei stimuliert eine EZM mit einem hohen Gehalt an Hyaluronsäure Zellmigrationsprozesse und ist assoziiert mit einer Induktion der skelettalen Entwicklung (Bastow et al. 2008).

Nidogen-1 und Nidogen-2 sind ubiquitär in der Basalmembran vorkommende Proteine welche mit Kollagen 1 und 4, sowie Lamininen und Perlecan interagieren (Ho et al. 2008). NID2 wirkt dabei in ähnlichem Maße pro-adhäsiv auf Zellen wie NID1 (Kohfeldt et al. 1998).

Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass das Fehlen von NID1 und NID2 insbesondere an den Extremitäten zu schweren skelettalen Fehlbildungen führen kann, was eine mögliche Relevanz für den Knochenmetabolismus unterstreicht. Nichtsdestotrotz ist die genaue Rolle von NID2 innerhalb der Knochenphysiologie weiterhin unklar. Hemicentin-1 (HMCN1) beeinflusst Zellmigrationsprozesse, indem es als Teil der EZM über Transmembranrezeptoren insbesondere die Zytokinese im finalen Schritt der Zellteilung mediiert (Xu and Vogel 2011). Ähnlich wie im Falle von NID2 ist die ubiquitäre Involvierung in Zellmigrations- und Adhäsionsprozesse von HMCN1 ausschlaggebend, HMCN1 als relevant zur Bearbeitung der Hypothese zu erachten. Die genaue Rolle von HMCN1 innerhalb der Knochenphysiologie ist ebenfalls unklar.

Basierend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen kann v.a. die bis dato weitestgehend unbekannt Involvierung von HMCN1 und NID2 in Mechanismen der Osteoblasten-Migration als Ausgangspunkt zur Generierung neuer Hypothesen dienen, um die genaue Rolle dieser beiden Gene in der Knochenbiologie besser zu verstehen.

9.3 Schlussfolgerung

Bei Anwendung des neuen Oberflächenmodells im Hinblick auf die der Arbeit zu Grunde liegenden Hypothese wurde insgesamt eine statistisch signifikante Hochregulation von mit Zellmigration und Zelladhäsion assoziierten Genen im demineralisierten Phänotyp gemessen. Die im Microarray quantifizierten Expressionsunterschiede konnten außerdem für ausgewählte Gene mittels QRT-PCR validiert werden. Die insgesamt die Zellmigration initiiierende und fördernde Funktion der selektiv amplifizierten Gene stützen die Hypothese.

Es ist zudem auffällig, dass 2 der 5 am stärksten hochregulierten Gene Sets im demineralisierten Phänotyp mit dem Aufbau, sowie der Modulation der EZM, beispielsweise über MMP-1 und ADAMTS4, in Zusammenhang stehen. Neben der Prozessierung der EZM scheint die demineralisierte Knochenoberfläche außerdem die Expression von verschiedenen Integrinen wie bspw. ITGA2 zu induzieren. In der Zusammenschau der Ergebnisse legen die Daten nahe, dass demineralisierte Knochenoberflächen über Modulation und Induktion von Proteinen der EZM, sowie die verstärkte Expression von Zytoskelett-EZM-Verknüpfungsmolekülen, wie beispielsweise Integrinen, Zell-Adhäsion und -Migration fördern. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass demineralisierte Knochenoberflächen über dem Aufbau eines komplexen Netzwerks aus extrazellulären Strukturproteinen, Transmembranproteinen, Adhäsionsmolekülen und Enzymen die Fortbewegung von adhären Osteoblasten fördern (Abbildung 37). Die auffallend

heterogenen Funktionsklassen der Proteine, für welche die im demineralisierten Phänotyp hochregulierten Gene kodieren, unterstreichen die Komplexität dieses Prozesses, was angesichts der zentralen Rolle der Zellmigration innerhalb der Knochenphysiologie den Erwartungen entspricht.

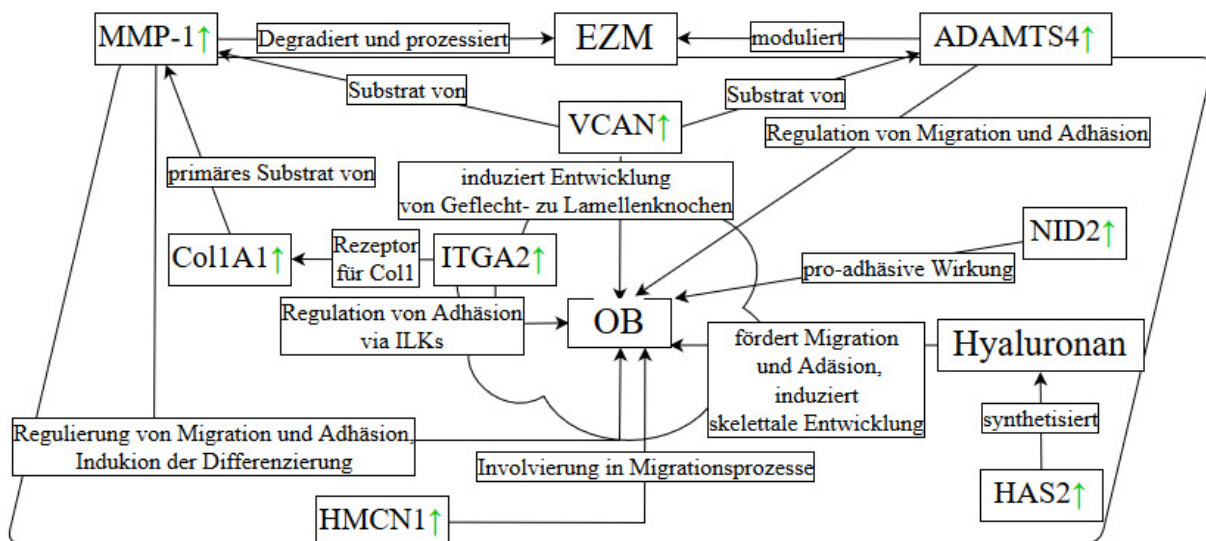
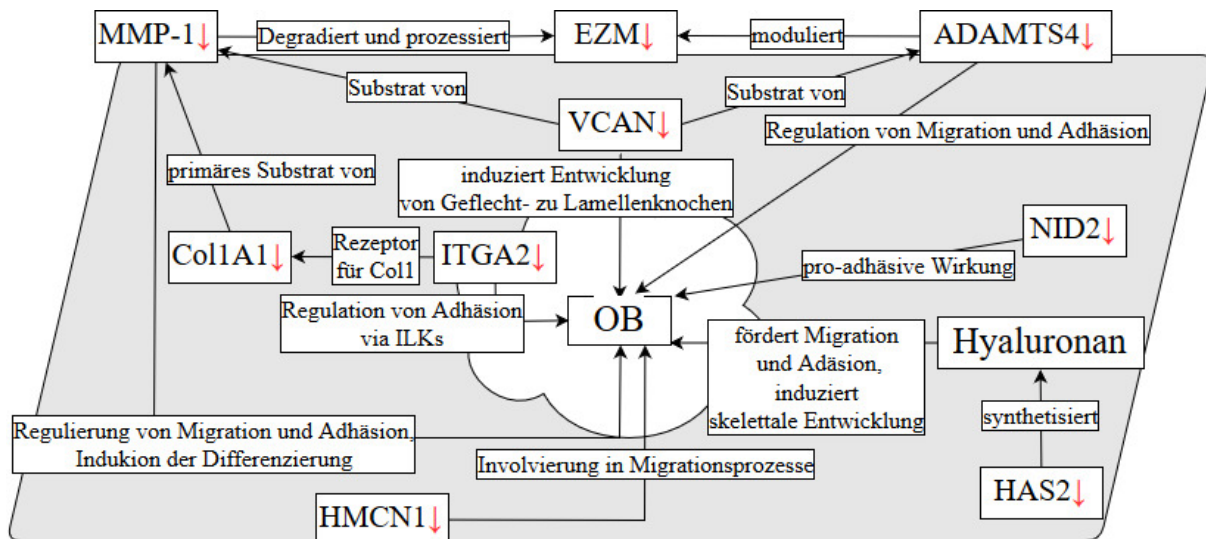


Abbildung 37: Relevante untersuchte Gene

Diese beiden Schemazeichnungen zeigen die im mineralisierten Phänotyp herunterregulierten Gene (obere Schemazeichnung), sowie die im demineralisierten Phänotyp hochregulierten Gene (untere Schemazeichnung). Außerdem werden die in der Diskussion bereits erörterte funktionelle Zusammenhänge zwischen den einzelnen Genen, des Osteoblasten (OB) und der Knochenoberfläche dargestellt. Grafiken erstellt mit draw.io (<https://www.draw.io/>).

9.4 Die Kombination von Oberflächenmodell und Migrations-Assay

Für die Zelllinie MG-63 wurde der chemotaktische Effekt der Wachstumsfaktoren VEGF, PDGF und IGF untersucht, wobei ausschließlich bei der Verwendung von VEGF ein statistisch signifikanter chemotaktischer Effekt festgestellt wurde. VEGF wurde als Chemokin ebenfalls für die Zelllinie Hos untersucht, wobei sich ebenso ein statistisch signifikanter chemotaktischer Effekt zeigte. Im Gegensatz zu den Wachstumsfaktoren PDGF und IGF scheint VEGF zudem ein vielversprechendes Chemokin darzustellen, wobei nicht für alle Zelllinien entsprechende Migrations-Assays mit VEGF als Chemokin durchgeführt wurden. Ein statistisch signifikanter chemotaktischer Effekt von FBS konnte bei primären humanen Osteoblasten, sowie fast allen verwendeten Osteosarkom-Zellreihen beobachtet werden. Interessanterweise wurde kein chemotaktischer Effekt von FBS bei MG-63 Zellen gemessen.

Da für die durchgeführten Migrations-Assays eine mit Kollagen IV beschichtete Oberfläche verwendet wurden, ist zudem damit zu rechnen, dass sich das Migrations-Verhalten der verwendeten Zellen auf mineralisierten bzw. demineralisierten Knochenoberflächen, welche i.d.R. kein Kollagen IV enthalten, verändert. Nichtsdestotrotz liefern die durchgeführten Migrations-Assays als Vorversuche wertvolle Hinweise darauf, welche Zelllinie und welches Chemokin das meiste migratorische bzw. chemotaktische Potential verspricht. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen der Migrations-Assays konnte bestätigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, mit der Etablierung chemotaktischer Gradienten, gerichtete Migration von Osteoblasten zu induzieren, was sich mit den Ergebnissen bereits publizierter Studien deckt (Dirckx, Van Hul, and Maes 2013).

Es sollte versucht werden, durch unterschiedliche Konzentrationen der Chemokin die chemotaktischen Effekte weiter zu differenzieren, um beispielsweise zu untersuchen, ob das Überschreiten einer bestimmten Konzentration eines Wachstumsfaktors dazu führt, dass dieser anstatt als Chemoattractant als Chemorepellent wirkt. So sind die in (Thiel et al. 2018) zusammengefassten in mehreren Studien beobachteten chemotaktischen Effekte bei durchschnittlich niedrigeren Konzentrationen von VEGF-A, PDGF-BB und IGF-1 aufgetreten, als für die in dieser Arbeit präsentierten Migrations-Assays verwendet wurden. Dahingehend könnten die hier vorgestellten Ergebnisse einen wichtigen Ansatzpunkt darstellen, den Konzentrationsbereich, in welchem ein Chemoattractant als Chemorepellent (und umgekehrt) wirkt, einzugrenzen, sowie die dafür notwendigen Voraussetzungen zu identifizieren.

Des Weiteren wurde angenommen, dass ein Wachstumsfaktor hinsichtlich seiner Aktivität, sowie dessen Potential als Chemokin für Osteoblasten zu wirken, neben dessen Konzentration maßgeblich durch die Knochenoberfläche (mineralisiert/demineralisiert/durch Osteoklasten resorbiert), seiner Herkunft (human/synthetisch/tierisch), der Quelle (Zelltyp, welcher das Chemokin sezerniert und ggf. prozessiert) und weiteren Zellen, welche ebenfalls an der Modulation des chemotaktischen Musters beteiligt sind, beeinflusst wird (Thiel et al. 2018). So ist es eine Limitation des Modells, dass in diesem nicht die komplexe Regulierung der chemotaktischen Migration von Osteoblasten durch Inhibitoren wie bspw. IL-1-beta (Interleukin-1-beta) oder LIF (leukaemia inhibitory factor) berücksichtigt wird, welche als Modulatoren von Migrationsprozessen von Osteoblasten bzw. deren Progenitorzellen identifiziert wurden (Hengartner et al. 2013) (Ota et al. 2013). Die human rekombinante Herkunft der für diese Arbeit verwendeten Wachstumsfaktoren VEGF-A, PDGF-BB und IGF-1 hat dahingehend zwar Vorteile gegenüber Wachstumsfaktoren bspw. tierischer Herkunft hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in-vivo ablaufende Prozesse, erschwert jedoch gleichzeitig einen Vergleich mit anderen Studien, bei denen Chemokine unterschiedlichster Herkunft verwendet wurden.

Im Kontext dazu ist die meistens rezeptor-vermittelte Wirkung eines Chemokins auf Osteoblasten und die damit initiierte Abfolge von intrazellulären Signalkaskaden in ihrer Vollständigkeit nur durch eingehende Analyse dieser Stoffwechselwege zu verstehen, obwohl dahingehend deutlich weniger bekannt ist, als über die generelle Wirkung von Chemokinen als solche (Thiel et al. 2018). An diesem Punkt ansetzend sind die Ergebnisse der Migrations-Assays vielversprechende Vorversuche, um in einem kombinierten Modell mit den ebenfalls in dieser Arbeit präsentierten Genexpressionsanalysen implementiert zu werden.

Die große Stärke des Migrations-Assay-Datensatzes ist zum einen der systematische Vergleich unterschiedlicher Chemokine verschiedener Konzentrationen mit mehreren Osteoblasten-Zelllinien, sowie die flexible dynamische Dokumentierung der Zellmigration mittels der Timelapse-Aufnahmen. Obwohl die für die Migrations-Assays verwendeten μ -slides primär nicht für vergleichsweise ortsständige Zellen wie Osteoblasten konzipiert sind, war es dennoch möglich, über einen längeren Zeitraum einen stabilen chemotaktischen Gradienten zu etablieren, sowie eine stabile gerichtete Migration in mehreren beobachteten Zelllinien zu messen. Dabei wurde für diese Studien Timelapse-Aufnahmen über 24 Stunden gemacht, es spricht jedoch weder eine im Laufe der Aufnahmen beobachtete Reduktion der lebenden Zellen, noch eine relevante Veränderung des chemotaktischen Gradienten dafür, die

Dauer der Timelapse-Aufnahmen für zukünftige Anwendungen der Methode zu verlängern. Zusammenfassend legen die Ergebnisse daher nahe, dass die Technik der in dieser Arbeit vorgestellten Migrations-Assays, sowie der Bildgebung robust genug ist, um mit ossären Oberflächen in einem erweiterten Modell kombiniert zu werden.

9.5 Stärken und Limitationen der Arbeit

Als Stärke dieser explorativen Arbeit, ist der große Umfang und die Flexibilität des generierten Microarray-Datensatzes hervorzuheben. Dabei wird in dieser Arbeit lediglich ein kleiner Ausschnitt der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse präsentiert, um den Fokus auf die Bearbeitung der gestellten Hypothese nicht zu verlieren. Der Datensatz zeichnet sich zum einen durch eine für eine globale Genexpressionsanalyse hohe Anzahl von analysierten Proben je Phänotyp aus, zum anderen ist es gelungen, die gemessenen Unterschiede zwischen den Phänotypen für einzelne Gene mittels QRT-PCR zu verifizieren, was die Aussagekraft der verfügbaren Daten entscheidend erhöht. Die Software GSEA erlaubt es zudem die Daten einfach und schnell auf unterschiedliche Fragestellungen hin zu analysieren und Aussagen für beide Phänotypen zu treffen. Damit besitzt der generierte Datensatz großes Potential, als Grundlage für neue Hypothesen zu dienen und so Ausgangspunkt für zukünftige experimentelle Studien zu sein.

Obwohl die erreichte Probenzahl je Phänotyp im Kontext zur gewählten Methode als suffizient einzustufen ist und mit hohem Aufwand und Kosten verbunden war, ist die Aussagekraft des Datensatzes gemessen an anderen statistischen Standards limitiert. Dem wurde versucht zu begegnen, indem in der Analyse mit GSEA sehr strenge Kriterien für statistische Signifikanz gewählt wurden. Nichtsdestotrotz sollten zukünftig neben der QRT-PCR weitere Methoden zur Verifizierung der Ergebnisse ausgewählt werden, in denen es leichter ist eine hohe Probenzahl je Phänotyp zu erzielen.

Der Umfang der Daten und die flexible Analyse dieser mit der Software GSEA ist zugleich eine Schwäche der Arbeit. Die Auswertung einer globalen Genexpressionsanalyse auf die Über- bzw. Unterregulierung von Gene Sets hin ermöglicht zwar das Treffen allgemeinerer Aussagen über das Genexpressionsprofil eines Phänotyps, was sehr hilfreich zur Hypothesenbildung und –Untersuchung sein kann, hat jedoch nicht zu vernachlässigende Schwächen in der Aussagekraft bezüglich der detaillierten Rolle einzelner Gene. Dies stellt einen bekannten Hauptkritikpunkt an Studien, in denen diese Methode verwendet wird, dar. Es ist daher anzustreben, den genauen Mechanismus analysierter Gene mit weiteren Methoden zu untersuchen und auf molekularer Ebene im Detail zu verstehen.

Obwohl für die durchgeführten Migrations-Assays auch primäre humane Osteoblasten analysiert wurden, ist die für die Genexpressionsanalyse gewählte Zellreihe MG-63 ein limitierender Faktor hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit physiologischen Prozessen im menschlichen Knochenmetabolismus, da MG-63 Zellen sich in vielen Aspekten von primären Osteoblasten unterscheiden. Des Weiteren sind die experimentellen Bedingungen der in dieser Studie durchgeführten Versuche artifiziell und nicht direkt gleichzusetzen mit ablaufenden Prozessen *in vivo*, was jedoch ein nur schwer zu vermeidender Nachteil jeder *in vitro* durchgeführten experimentell Studie darstellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die für diese Arbeit gewählten Methoden einen neuen und vielversprechenden Ansatz darstellen, in Zukunft auch sehr komplexe Fragestellungen im Feld der experimentellen orthopädischen Forschung erfolgreich zu bearbeiten.

10 Ausblick

In zukünftigen Studien ist es geplant, das in dieser Arbeit präsentierte Oberflächenmodell zur Genexpressionsanalyse mit den ebenfalls in dieser Arbeit vorgestellten Migrationsassays zur Quantifizierung der Osteoblasten-Migration in einem zweiteiligen kombinierten Modell aufeinander aufbauend zu verknüpfen (Abbildung 38).

In einem ersten Schritt sollen mit Fluoreszenz markierte Osteoblasten auf mineralisierten und demineralisierten Knochenoberflächen ausgesät und deren Adhäsion unter einem Fluoreszenz-Mikroskop überprüft werden. Anschließend ist es geplant, auf den Knochenoberflächen chemotaktische Gradienten, beispielsweise mit Hilfe von vorab installierten Reservoirs für Chemokine, zu etablieren um eine gerichtete Migration der Knochenzellen auf den Knochenoberflächen zu ermöglichen. Es ist dabei anzustreben, unterschiedliche Chemokine gleichzeitig anzubieten um die Integration mehrere chemotaktischer Signale zu beobachten, da dieser Vorgang innerhalb der physiologischen BMU ein zentraler Mechanismus der gerichteten Migration von Osteoblasten zu sein scheint (Matsuo and Irie 2008). Die gerichtete Migration der Fluoreszenz-markierten Osteoblasten auf den Knochenoberflächen soll dann über einen bestimmten Zeitraum, bspw. 72 Stunden, mittels Timelapse-Aufnahmen nach Vorbild der für diese Arbeit durchgeführten Migrations-Assays, quantifiziert werden. Im zweiten Schritt soll nach Ablauf der Timelapse-Aufnahmen mit den Zellen von den mineralisierten bzw. demineralisierten Knochenoberflächen, wie in dieser Arbeit bereits beschrieben, eine globale Genexpressionsanalyse durchgeführt werden. Die Etablierung einer neuen Methode, welche es erlaubt, ausschließlich die Zellen von den Knochenoberflächen zu entfernen und für den Microarray zu verwenden, welche ein

bestimmtes Maß an gerichteter Migration gezeigt haben, wäre hierbei optimal. Die größte Schwierigkeit bei der Verknüpfung beider Methoden, liegt in der Installation geeigneter Reservoirs für unterschiedliche Chemokine. Diese sollten zum einen gewährleisten, eine konstante und messbare Chemokin-Konzentration über den gesamten Zeitraum der Timelapse-Aufnahmen abzugeben und zum anderen die Knochenoberflächen nicht in einem Maße beeinflussen, welches die Migration der Osteoblasten einschränkt.

Die Integration des Migrations-Assays in das bestehende Modell hätte mehrere Vorteile. Zum einen bestünde die Möglichkeit, gemessene Änderungen in der globalen Genexpression nicht nur der mineralischen Komponente der Knochenoberfläche zuzuordnen, sondern auch einem bestimmten chemotaktischen Muster, sowie unterschiedlichen Konzentrationen von Chemoattractants und Chemorepellents. Des Weiteren wäre die Installation unterschiedlicher chemotaktischer Gradienten ein wichtiger Schritt, das Milieu, dem die Osteoblasten auf der Knochenoberfläche ausgesetzt sind, an die physiologischen Begebenheiten anzupassen. Hierfür ist zudem in der Zukunft anzustreben, sowohl primäre humane Osteoblasten, als auch eine humane Knochenoberfläche für das Modell zu benutzen.

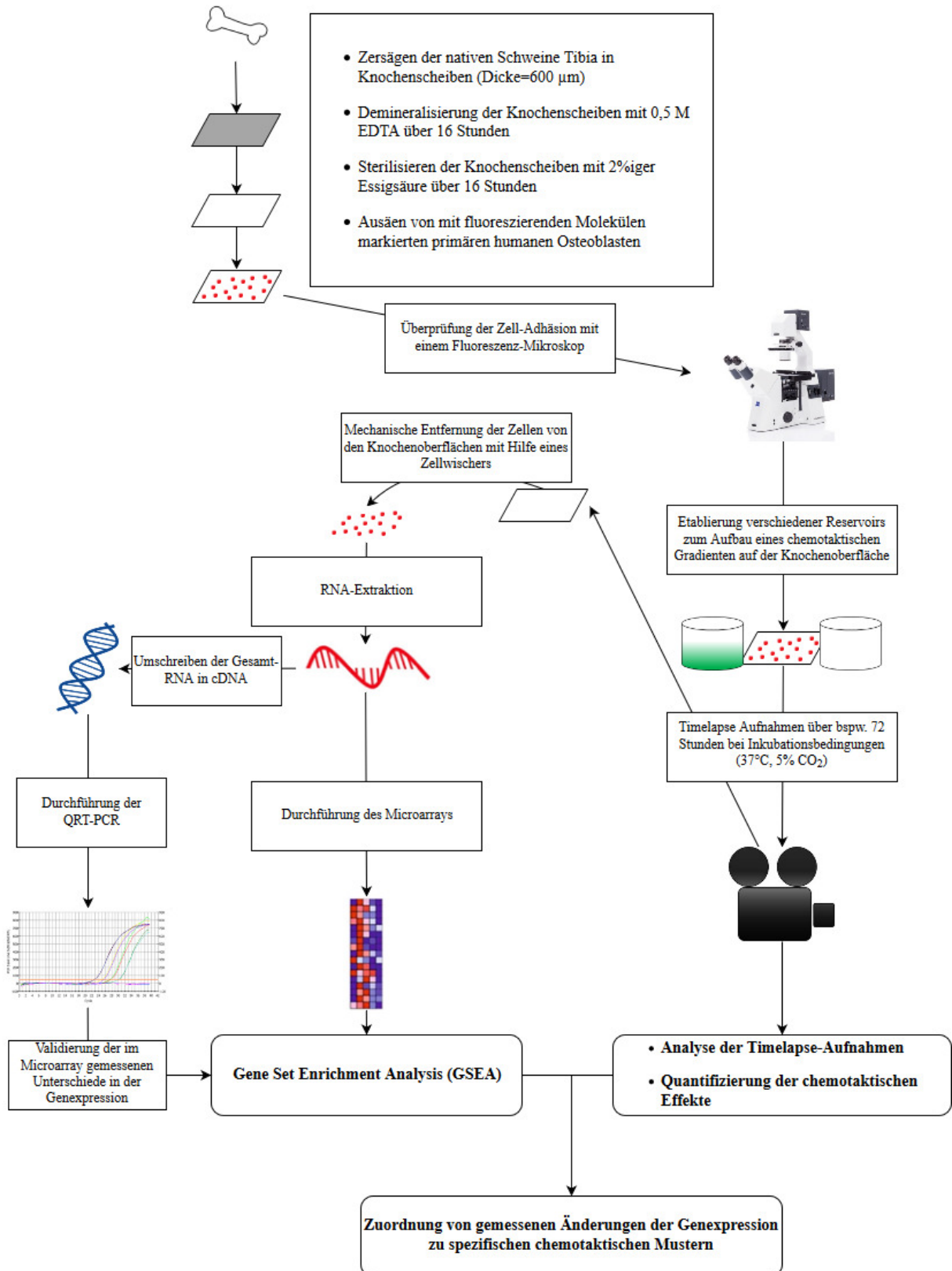


Abbildung 38: Ausblick

Diese Abbildung zeigt den Workflow für das kombinierte Oberflächenmodell. Detaillierte Erklärungen zu den einzelnen Schritten im Text. Grafik erstellt durch den Autor mit draw.io (<https://www.draw.io/>).

11 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Mein großer Dank gilt meinem Betreuer Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger von Eisenhart-Rothe und meinem Mentor Prof. Dr. med. Rainer Burgkart für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Dissertation.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Philipp Mayer-Kuckuk für seine herausragende Unterstützung, wissenschaftliche Anleitung und Lehre während des Zeitraums der Promotion, sowie darüber hinaus.

Ich möchte mich bei Dr. Günther Richter und Oxana Schmidt vom Children's Cancer Research Center der Kinderklinik der Technischen Universität München, sowie bei Prof. Dr. Nancy Pleshko, Sakina Bookbinder und Dr. William Querido vom Department of Bioengineering der Temple University Philadelphia für die hervorragend funktionierende Kollaboration und Zusammenarbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der orthopädischen Forschung am Klinikum Rechts der Isar, insbesondere bei Jutta Tuebel, Carmen Marthen, Dipl.-Ing. Peter Föhr, Dipl.-Ing. Andreas Obermaier und Dipl.-Ing. Constantin von Deimling, für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Mit-Doktoranden für die gegenseitige Unterstützung im Labor, bei Dr. Jonatan Darr für seine Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie, sowie bei Dr. med. Florian Lenze für die Zusammenarbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt der Deutschen Forschungsgesellschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Dissertation.

12 Literaturverzeichnis

- Abrantes, A. A., A. Rafacho, E. R. Rivero, F. V. Mariano, F. M. Siqueira, and R. O. Gondak. 2017. 'Tissue integrity, costs and time associated with different agents for histological bone preparation', *Microsc Res Tech*, 80: 344-49.
- Anderson, L. R., T. W. Owens, and M. J. Naylor. 2014. 'Structural and mechanical functions of integrins', *Biophys Rev*, 6: 203-13.
- Andrew, J. G., J. A. Hoyland, A. J. Freemont, and D. R. Marsh. 1995. 'Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures', *Bone*, 16: 455-60.
- Bastow, E. R., S. Byers, S. B. Golub, C. E. Clarkin, A. A. Pitsillides, and A. J. Fosang. 2008. 'Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone', *Cell Mol Life Sci*, 65: 395-413.
- Blair, H. C., Q. C. Larrouture, Y. Li, H. Lin, D. Beer-Stoltz, L. Liu, R. S. Tuan, L. J. Robinson, P. H. Schlesinger, and D. J. Nelson. 2017. 'Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro', *Tissue Eng Part B Rev*, 23: 268-80.
- Bollmann, F., I. Casper, J. Henke, and A. Pautz. 2012. 'qRT-PCR: a method and its difficulties', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 385: 949-51.
- Boskey, A., and R. Mendelsohn. 2005. 'Infrared analysis of bone in health and disease', *J Biomed Opt*, 10: 031102.
- Bueno, R. C., and R. T. Basting. 2015. 'In vitro study of human osteoblast proliferation and morphology on orthodontic mini-implants', *Angle Orthod*, 85: 920-6.
- Capulli, M., R. Paone, and N. Rucci. 2014. 'Osteoblast and osteocyte: games without frontiers', *Arch Biochem Biophys*, 561: 3-12.
- Carvalho, R. S., P. J. Kostenuik, E. Salih, A. Bumann, and L. C. Gerstenfeld. 2003. 'Selective adhesion of osteoblastic cells to different integrin ligands induces osteopontin gene expression', *Matrix Biol*, 22: 241-9.
- Casati, L., F. Celotti, P. Negri-Cesi, M. C. Sacchi, P. Castano, and A. Colciago. 2014. 'Platelet derived growth factor (PDGF) contained in Platelet Rich Plasma (PRP) stimulates migration of osteoblasts by reorganizing actin cytoskeleton', *Cell Adh Migr*, 8: 595-602.
- Caswell, P., and J. Norman. 2008. 'Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion', *Trends Cell Biol*, 18: 257-63.
- Chen, J. J., H. M. Hsueh, R. R. Delongchamp, C. J. Lin, and C. A. Tsai. 2007. 'Reproducibility of microarray data: a further analysis of microarray quality control (MAQC) data', *BMC Bioinformatics*, 8: 412.
- Clark, E. A., W. G. King, J. S. Brugge, M. Symons, and R. O. Hynes. 1998. 'Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases', *J Cell Biol*, 142: 573-86.
- Cobo, T., C. G. Vilorio, L. Solares, T. Fontanil, E. Gonzalez-Chamorro, F. De Carlos, J. Cobo, S. Cal, and A. J. Obaya. 2016. 'Role of Periostin in Adhesion and Migration of Bone Remodeling Cells', *PLoS One*, 11: e0147837.
- Colciago, A., F. Celotti, L. Casati, R. Giancola, S. M. Castano, G. Antonini, M. C. Sacchi, and P. Negri-Cesi. 2009. 'In Vitro Effects of PDGF Isoforms (AA, BB, AB and CC) on Migration and Proliferation of SaOS-2 Osteoblasts and on Migration of Human Osteoblasts', *Int J Biomed Sci*, 5: 380-9.
- Corrado, A., E. R. Sanpaolo, S. Di Bello, and F. P. Cantatore. 2017. 'Osteoblast as a target of anti-osteoporotic treatment', *Postgrad Med*, 129: 858-65.
- Czekanska, E. M., M. J. Stoddart, R. G. Richards, and J. S. Hayes. 2012. 'In search of an osteoblast cell model for in vitro research', *Eur Cell Mater*, 24: 1-17.
- Davies, J. E. 1996. 'In vitro modeling of the bone/implant interface', *Anat Rec*, 245: 426-45.

- Dejaeger, M., A. M. Bohm, N. Dirckx, J. Devriese, E. Nefyodova, R. Cardoen, R. St-Arnaud, J. Tournoy, F. P. Luyten, and C. Maes. 2017. 'Integrin-Linked Kinase Regulates Bone Formation by Controlling Cytoskeletal Organization and Modulating BMP and Wnt Signaling in Osteoprogenitors', *J Bone Miner Res*.
- Dirckx, N., M. Van Hul, and C. Maes. 2013. 'Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration', *Birth Defects Res C Embryo Today*, 99: 170-91.
- Fang, C. Y., C. C. Wu, C. L. Fang, W. Y. Chen, and C. L. Chen. 2017. 'Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines', *PLoS One*, 12: e0178960.
- Feller, L., Y. Jadwat, R. A. Khammissa, R. Meyerov, I. Schechter, and J. Lemmer. 2015. 'Cellular responses evoked by different surface characteristics of intraosseous titanium implants', *Biomed Res Int*, 2015: 171945.
- Fiedler, J., F. Leucht, J. Waltenberger, C. Dehio, and R. E. Brenner. 2005. 'VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 334: 561-8.
- Foxman, E. F., E. J. Kunkel, and E. C. Butcher. 1999. 'Integrating conflicting chemotactic signals. The role of memory in leukocyte navigation', *J Cell Biol*, 147: 577-88.
- Genova, T., L. Munaron, S. Carossa, and F. Mussano. 2016. 'Overcoming physical constraints in bone engineering: 'the importance of being vascularized'', *J Biomater Appl*, 30: 940-51.
- Govey, P. M., Y. I. Kawasawa, and H. J. Donahue. 2015. 'Mapping the osteocytic cell response to fluid flow using RNA-Seq', *J Biomech*, 48: 4327-32.
- Haasters, F., D. Docheva, C. Gassner, C. Popov, W. Bocker, W. Mutschler, M. Schieker, and W. C. Prall. 2014. 'Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients reveal reduced migration and invasion upon stimulation with BMP-2 or BMP-7', *Biochem Biophys Res Commun*, 452: 118-23.
- Hassenkam, T., G. E. Fantner, J. A. Cutroni, J. C. Weaver, D. E. Morse, and P. K. Hansma. 2004. 'High-resolution AFM imaging of intact and fractured trabecular bone', *Bone*, 35: 4-10.
- Hassenkam, T., H. L. Jorgensen, and J. B. Lauritzen. 2006. 'Mapping the imprint of bone remodeling by atomic force microscopy', *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 288: 1087-94.
- Hayami, T., Y. L. Kapila, and S. Kapila. 2011. 'Divergent upstream osteogenic events contribute to the differential modulation of MG63 cell osteoblast differentiation by MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3)', *Matrix Biol*, 30: 281-9.
- Heino, J. 2000. 'The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions', *Matrix Biol*, 19: 319-23.
- Hendesi, H., M. F. Barbe, F. F. Safadi, M. A. Monroy, and S. N. Popoff. 2015. 'Integrin mediated adhesion of osteoblasts to connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) induces cytoskeleton reorganization and cell differentiation', *PLoS One*, 10: e0115325.
- Hengartner, N. E., J. Fiedler, A. Ignatius, and R. E. Brenner. 2013. 'IL-1beta inhibits human osteoblast migration', *Mol Med*, 19: 36-42.
- Ho, M. S., K. Bose, S. Mokkapatil, R. Nischt, and N. Smyth. 2008. 'Nidogens-Extracellular matrix linker molecules', *Microsc Res Tech*, 71: 387-95.
- Hopwood, B., A. Tsykin, D. M. Findlay, and N. L. Fazzalari. 2007. 'Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodelling, WNT and transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein signalling', *Arthritis Res Ther*, 9: R100.

- Huang, L., Y. Y. Cheng, P. L. Koo, K. M. Lee, L. Qin, J. C. Cheng, and S. M. Kumta. 2003. 'The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures', *J Biomed Mater Res A*, 66: 880-4.
- Inaoka, K., Y. Inokawa, and S. Nomoto. 2015. 'Genomic-Wide Analysis with Microarrays in Human Oncology', *Microarrays (Basel)*, 4: 454-73.
- Irizarry, R. A., B. Hobbs, F. Collin, Y. D. Beazer-Barclay, K. J. Antonellis, U. Scherf, and T. P. Speed. 2003. 'Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data', *Biostatistics*, 4: 249-64.
- Jilka, R. L. 2003. 'Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis', *Med Pediatr Oncol*, 41: 182-5.
- Jones, S. J., and A. Boyde. 1977. 'The migration of osteoblasts', *Cell Tissue Res*, 184: 179-93.
- Kanis, J. A., E. V. McCloskey, H. Johansson, C. Cooper, R. Rizzoli, and J. Y. Reginster. 2013. 'European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women', *Osteoporos Int*, 24: 23-57.
- Karaplis, Andrew C. 2008. 'Chapter 3 - Embryonic Development of Bone and Regulation of Intramembranous and Endochondral Bone Formation A2 - Bilezikian, John P.' in Lawrence G. Raisz and T. John Martin (eds.), *Principles of Bone Biology (Third Edition)* (Academic Press: San Diego).
- Karlsson, M. K., O. Johnell, and K. J. Obrant. 1993. 'Bone mineral density in weight lifters', *Calcif Tissue Int*, 52: 212-5.
- Kelwick, R., I. Desanlis, G. N. Wheeler, and D. R. Edwards. 2015. 'The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family', *Genome Biol*, 16: 113.
- Klymov, A., J. Song, X. Cai, J. Te Riet, S. Leeuwenburgh, J. A. Jansen, and X. F. Walboomers. 2016. 'Increased acellular and cellular surface mineralization induced by nanogrooves in combination with a calcium-phosphate coating', *Acta Biomater*, 31: 368-77.
- Kohfeldt, E., T. Sasaki, W. Gohring, and R. Timpl. 1998. 'Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties', *J Mol Biol*, 282: 99-109.
- Krishnan, V., E. A. Vogler, and A. M. Mastro. 2015. 'Three-Dimensional in Vitro Model to Study Osteobiology and Osteopathology', *J Cell Biochem*, 116: 2715-23.
- Kumar, A., K. C. Nune, and R. Misra. 2016. 'Understanding the response of pulsed electric field on osteoblast functions in three-dimensional mesh structures', *J Biomater Appl*, 31: 594-605.
- Larrouture, Q. C., D. J. Nelson, L. J. Robinson, L. Liu, I. Tourkova, P. H. Schlesinger, and H. C. Blair. 2015. 'Chloride-hydrogen antiporters ClC-3 and ClC-5 drive osteoblast mineralization and regulate fine-structure bone patterning in vitro', *Physiol Rep*, 3.
- Liberzon, A., A. Subramanian, R. Pinchback, H. Thorvaldsdottir, P. Tamayo, and J. P. Mesirov. 2011. 'Molecular signatures database (MSigDB) 3.0', *Bioinformatics*, 27: 1739-40.
- Lincks, J., B. D. Boyan, C. R. Blanchard, C. H. Lohmann, Y. Liu, D. L. Cochran, D. D. Dean, and Z. Schwartz. 1998. 'Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition', *Biomaterials*, 19: 2219-32.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods*, 25: 402-8.
- Lu, X., Q. Wang, G. Hu, C. Van Poznak, M. Fleisher, M. Reiss, J. Massague, and Y. Kang. 2009. 'ADAMTS1 and MMP1 proteolytically engage EGF-like ligands in an osteolytic signaling cascade for bone metastasis', *Genes Dev*, 23: 1882-94.

- Marks Jr., S.C. and D.C. Mermey. 1996. 'The Structure and Development of Bone.' in L.G. Raisz J.P. Bilezikian, and T.J. Martin (ed.), *Principles of Bone Biology* (Academic Press: San Diego).
- Martin, T. J., and K. W. Ng. 1994. 'Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity', *J Cell Biochem*, 56: 357-66.
- Marzancola, M. G., A. Sedighi, and P. C. Li. 2016. 'DNA Microarray-Based Diagnostics', *Methods Mol Biol*, 1368: 161-78.
- Matsuo, K., and N. Irie. 2008. 'Osteoclast-osteoblast communication', *Arch Biochem Biophys*, 473: 201-9.
- Mavrakos, T., and G. Vrotsos. 1988. '[Osteoblasts. Morphology and biochemical activity]', *Odontostomatol Proodos*, 42: 351-6.
- Maycas, M., P. Esbrit, and A. R. Gortazar. 2017. 'Molecular mechanisms in bone mechanotransduction', *Histol Histopathol*, 32: 751-60.
- Mayr-Wohlfart, U., J. Waltenberger, H. Hausser, S. Kessler, K. P. Gunther, C. Dehio, W. Puhl, and R. E. Brenner. 2002. 'Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts', *Bone*, 30: 472-7.
- Metzger, W., S. Rother, T. Pohlemann, S. Moller, M. Schnabelrauch, V. Hintze, and D. Scharnweber. 2017. 'Evaluation of cell-surface interaction using a 3D spheroid cell culture model on artificial extracellular matrices', *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 73: 310-18.
- Nagase, H., A. J. Barrett, and J. F. Woessner, Jr. 1992. 'Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases', *Matrix Suppl*, 1: 421-4.
- Nakamura, M., S. Sone, I. Takahashi, I. Mizoguchi, S. Echigo, and Y. Sasano. 2005. 'Expression of versican and ADAMTS1, 4, and 5 during bone development in the rat mandible and hind limb', *J Histochem Cytochem*, 53: 1553-62.
- Nakasaki, M., K. Yoshioka, Y. Miyamoto, T. Sasaki, H. Yoshikawa, and K. Itoh. 2008. 'IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts', *Bone*, 43: 869-79.
- Olivares-Navarrete, R., S. E. Rodil, S. L. Hyzy, G. R. Dunn, A. Almaguer-Flores, Z. Schwartz, and B. D. Boyan. 2015. 'Role of integrin subunits in mesenchymal stem cell differentiation and osteoblast maturation on graphitic carbon-coated microstructured surfaces', *Biomaterials*, 51: 69-79.
- Ortega, N., D. Behonick, D. Stickens, and Z. Werb. 2003. 'How proteases regulate bone morphogenesis', *Ann N Y Acad Sci*, 995: 109-16.
- Ota, K., P. Quint, M. M. Weivoda, M. Ruan, L. Pederson, J. J. Westendorf, S. Khosla, and M. J. Oursler. 2013. 'Transforming growth factor beta 1 induces CXCL16 and leukemia inhibitory factor expression in osteoclasts to modulate migration of osteoblast progenitors', *Bone*, 57: 68-75.
- Ozkucur, N., T. K. Monsees, S. Perike, H. Q. Do, and R. H. Funk. 2009. 'Local calcium elevation and cell elongation initiate guided motility in electrically stimulated osteoblast-like cells', *PLoS One*, 4: e6131.
- Page-McCaw, A., A. J. Ewald, and Z. Werb. 2007. 'Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 221-33.
- Paiva, K. B. S., and J. M. Granjeiro. 2017. 'Matrix Metalloproteinases in Bone Resorption, Remodeling, and Repair', *Prog Mol Biol Transl Sci*, 148: 203-303.
- Papadimitropoulos, A., A. Scherberich, S. Guven, N. Theilgaard, H. J. Crooijmans, F. Santini, K. Scheffler, A. Zallone, and I. Martin. 2011. 'A 3D in vitro bone organ model using human progenitor cells', *Eur Cell Mater*, 21: 445-58; discussion 58.
- Paschalis, E. P., E. Shane, G. Lyritis, G. Skarantavos, R. Mendelsohn, and A. L. Boskey. 2004. 'Bone fragility and collagen cross-links', *J Bone Miner Res*, 19: 2000-4.

- Pereira, K. K., O. C. Alves, A. B. Novaes, Jr., F. S. de Oliveira, J. H. Yi, O. Zaniquelli, C. Wolf-Brandstetter, D. Scharnweber, F. Variola, A. Nanci, A. L. Rosa, and P. T. de Oliveira. 2013. 'Progression of osteogenic cell cultures grown on microtopographic titanium coated with calcium phosphate and functionalized with a type I collagen-derived peptide', *J Periodontol*, 84: 1199-210.
- Pruss, A., B. Baumann, M. Seibold, M. Kao, K. Tintelnot, R. von Versen, H. Radtke, T. Dorner, G. Pauli, and U. B. Gobel. 2001. 'Validation of the sterilization procedure of allogeneic avital bone transplants using peracetic acid-ethanol', *Biologicals*, 29: 59-66.
- Rachner, T. D., S. Khosla, and L. C. Hofbauer. 2011. 'Osteoporosis: now and the future', *Lancet*, 377: 1276-87.
- Raisz, L. G. 2005. 'Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects', *J Clin Invest*, 115: 3318-25.
- Riehl, B. D., J. S. Lee, L. Ha, I. K. Kwon, and J. Y. Lim. 2017. 'Flowtaxis of osteoblast migration under fluid shear and the effect of RhoA kinase silencing', *PLoS One*, 12: e0171857.
- Robin, M., C. Almeida, T. Azais, B. Haye, C. Illoul, J. Lesieur, M. M. Giraud-Guille, N. Nassif, and C. Helary. 2016. 'Involvement of 3D osteoblast migration and bone apatite during in vitro early osteocytogenesis', *Bone*, 88: 146-56.
- Sanchez-Fernandez, M. A., A. Gallois, T. Riedl, P. Jurdic, and B. Hoflack. 2008. 'Osteoclasts control osteoblast chemotaxis via PDGF-BB/PDGF receptor beta signaling', *PLoS One*, 3: e3537.
- Santolini, E., R. West, and P. V. Giannoudis. 2015. 'Risk factors for long bone fracture non-union: a stratification approach based on the level of the existing scientific evidence', *Injury*, 46 Suppl 8: S8-s19.
- Schmittgen, T. D., and K. J. Livak. 2008. 'Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method', *Nat Protoc*, 3: 1101-8.
- Schwartz, Z., and B. D. Boyan. 1994. 'Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface', *J Cell Biochem*, 56: 340-7.
- Seeman, E. 2008. 'Modeling and Remodeling.' in L.G. Raisz J.P. Bilezikian, and T.J. Martin (ed.), *Principles of Bone Biology* (Academic Press: San Diego).
- Shapiro, I. M., N. J. Hickok, J. Parvizi, S. Stewart, and T. P. Schaer. 2012. 'Molecular engineering of an orthopaedic implant: from bench to bedside', *Eur Cell Mater*, 23: 362-70.
- Shemesh, M., S. Addadi, Y. Milstein, B. Geiger, and L. Addadi. 2016. 'Study of Osteoclast Adhesion to Cortical Bone Surfaces: A Correlative Microscopy Approach for Concomitant Imaging of Cellular Dynamics and Surface Modifications', *ACS Appl Mater Interfaces*, 8: 14932-43.
- Sieker, J. T., B. L. Proffen, K. A. Waller, K. E. Chin, N. P. Karamchedu, M. R. Akelman, G. S. Perrone, A. M. Kiapour, J. Konrad, M. M. Murray, and B. C. Fleming. 2017. 'Transcriptional profiling of articular cartilage in a porcine model of early post-traumatic osteoarthritis', *J Orthop Res*.
- Sotobori, T., T. Ueda, A. Myoui, K. Yoshioka, M. Nakasaki, H. Yoshikawa, and K. Itoh. 2006. 'Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts', *Exp Cell Res*, 312: 3927-38.
- Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander, and J. P. Mesirov. 2005. 'Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 15545-50.

- Taichman, R. S., and S. G. Emerson. 1994. 'Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor', *J Exp Med*, 179: 1677-82.
- Teplyuk, N. M., L. M. Haupt, L. Ling, C. Dombrowski, F. K. Mun, S. S. Nathan, J. B. Lian, J. L. Stein, G. S. Stein, S. M. Cool, and A. J. van Wijnen. 2009. 'The osteogenic transcription factor Runx2 regulates components of the fibroblast growth factor/proteoglycan signaling axis in osteoblasts', *J Cell Biochem*, 107: 144-54.
- Thiel, A., M. K. Reumann, A. Boskey, J. Wischmann, R. von Eisenhart-Rothe, and P. Mayer-Kuckuk. 2018. 'Osteoblast migration in vertebrate bone', *Biol Rev Camb Philos Soc*, 93: 350-63.
- Thompson, W. R., C. T. Rubin, and J. Rubin. 2012. 'Mechanical regulation of signaling pathways in bone', *Gene*, 503: 179-93.
- Tortelli, F., N. Pujic, Y. Liu, N. Laroche, L. Vico, and R. Cancedda. 2009. 'Osteoblast and osteoclast differentiation in an in vitro three-dimensional model of bone', *Tissue Eng Part A*, 15: 2373-83.
- Tromp, G., H. Kuivaniemi, A. Stacey, H. Shikata, C. T. Baldwin, R. Jaenisch, and D. J. Prockop. 1988. 'Structure of a full-length cDNA clone for the prepro alpha 1(I) chain of human type I procollagen', *Biochem J*, 253: 919-22.
- Tsiridis, E., N. Upadhyay, and P. Giannoudis. 2007. 'Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules?', *Injury*, 38 Suppl 1: S11-25.
- Uchihashi, K., S. Aoki, A. Matsunobu, and S. Toda. 2013. 'Osteoblast migration into type I collagen gel and differentiation to osteocyte-like cells within a self-produced mineralized matrix: a novel system for analyzing differentiation from osteoblast to osteocyte', *Bone*, 52: 102-10.
- Ulrich, F., and C. P. Heisenberg. 2009. 'Trafficking and cell migration', *Traffic*, 10: 811-8.
- Wang, T., X. Zhang, and D. D. Bikle. 2017. 'Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing', *J Cell Physiol*, 232: 913-21.
- Wright, H. L., H. S. McCarthy, J. Middleton, and M. J. Marshall. 2009. 'RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease', *Curr Rev Musculoskelet Med*, 2: 56-64.
- Xiao, G., D. Wang, M. D. Benson, G. Karsenty, and R. T. Franceschi. 1998. 'Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor', *J Biol Chem*, 273: 32988-94.
- Xu, X., and B. E. Vogel. 2011. 'A new job for ancient extracellular matrix proteins: Hemocentins stabilize cleavage furrows', *Commun Integr Biol*, 4: 433-5.
- Yamamichi, N., K. Pugdee, W. J. Chang, S. Y. Lee, M. Yoshinari, T. Hayakawa, and Y. Abiko. 2008. 'Gene expression monitoring in osteoblasts on titanium coated with fibronectin-derived peptide', *Dent Mater J*, 27: 744-50.