

Technische Universität München  
Klinik und Poliklinik für Plastische Chirurgie und Handchirurgie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. H.-G. Machens

**Osteomalazie *in vitro*:**  
**Einfluss der Matrixmineralisierung auf osteoklastäre**  
**Differenzierung und Resorption**

Lisanne Grünherz

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. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Arndt F. Schilling
2. Prof. Dr. Hans-Günther Machens
3. Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe

Die Dissertation wurde am 19.01.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.01.2017 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

---

I Inhaltsverzeichnis

II Verzeichnis der Abbildungen

III Verzeichnis der verwendeten Abbildungen

1 Einleitung.....	1
1.1. Osteomalazie .....	1
1.2. Diagnose und Symptomatik .....	1
1.3. Ätiologie und Pathophysiologie .....	3
1.4. Vitamin D Mangel.....	4
1.5. Bedeutung der Zell-Matrix-Interaktion .....	5
2 Fragestellung.....	6
3. Material.....	7
3.1. Geräte und Laborbedarf .....	7
3.2. Verbrauchsmaterial.....	8
3.3. Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	9
4. Methoden .....	11
4.1. <i>In vitro</i> Kultivierung humaner Osteoklasten .....	11
4.1.1. Isolation mononukleärer Zellen .....	11
4.1.2 Kultivierung humaner Osteoklasten .....	12
4.2. <i>In vitro</i> Simulation einer Osteomalazie .....	12
4.2.1. Vorbereitung des Dentins.....	12
4.2.2. Demineralisierung des Dentins .....	13
4.2.3. Masson-Goldner-Trichrom Färbung des Dentins .....	13
4.2.4. Histomorphometrie von Knochenbiopsien .....	13
4.3. Rasterkraftmikroskopie .....	14
4.3.1. Aufbau und Messprinzip.....	14
4.3.2. Kraft-Abstands-Kurven .....	16
4.3.3. Elastizitätsmessungen .....	16
4.3.4. Kalibrierung des Cantilevers .....	17
4.3.5. Kurvenauswertung .....	18
4.3.6. Bildaufnahme .....	19
4.3.7. Vermessung der Kollagenfasern.....	19
4.4. Herstellung der Kollagengele.....	20

# Inhaltsverzeichnis

---

4.5. Herstellung RGD-Peptid beschichtetes Dentin.....	21
4.6. MTT-Test .....	21
4.7. Färbung der Tartratresistenten Sauren Phosphatase .....	21
4.8. Durchflusszytometrie .....	22
4.9. Infinite Fokus Mikroskopie .....	23
4.10. Quantitative Real Time PCR.....	24
4.10.1. RNA Isolation .....	24
4.10.2. Konzentrationsbestimmung der RNA.....	25
4.10.3. Kontrolle der RNA-Integrität .....	26
4.10.4. Reverse Transkription .....	26
4.10.5. Prinzip der Quantitativen Real-Time PCR.....	27
4.10.6. Detektion der PCR-Produkte.....	27
4.10.7. Primeretablierung .....	28
4.10.8. Reaktionsprotokoll der qPCR.....	29
4.10.9. Auswertung der qPCR Ergebnisse .....	30
4.11. Immunhistochemie von Hautschnitten.....	31
4.11.1. Fixierung .....	31
4.11.2. Entwässerung .....	31
4.11.3. Paraffineinbettung .....	31
4.11.4. Schnittherstellung.....	31
4.11.5. Antikörperfärbung.....	31
4.12. TROP2 Färbung .....	32
4.13. Statistik .....	33
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
5.1. Vergleich von Osteoidsaum und demineralisierter Oberfläche.....	34
5.2. Mikromechanik der Oberfläche.....	35
5.3. Auswirkung auf den Zellmetabolismus .....	38
5.4. Auswirkung auf die Osteoklastenzahl .....	39
5.5. Auswirkung auf den Anteil CalcR positiver Zellen .....	40
5.6. Auswirkung auf die Resorptionsaktivität .....	42
5.7. Auswirkung auf die Genexpression .....	43
5.8. TROP2 positive Langerhanszellen in menschlicher Haut.....	45
5.9. Osteomalazie <i>in vitro</i> und TROP2 Expression .....	46
5.10. Mechanotransduktionsgene.....	46

# Inhaltsverzeichnis

---

5.11. Resorptionsaktivität auf RGD-Peptid .....	48
6. Diskussion .....	49
7. Zusammenfassung .....	57
8. Literaturverzeichnis .....	58
9. Danksagung .....	70

## Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tab. 1	Arbeitsschritte der RNA - Isolation	24
Tab. 2	Verwendete Primer	28
Tab. 3	Vergleich Osteoidsaum und demineralisierte Oberfläche	35
Tab. 4	E-modul Dentin und OIV	36
Abb. 1	Knochenbiopsien von Gesunden und Osteomalazie	1
Abb. 2	„Schicksal“ einer Stammzelle	5
Abb. 3	Aufbau eines Rasterkraftmikroskops	15
Abb. 4	Kraft-Abstands-Kurve	16
Abb. 5	Sensitivität des Cantilevers	17
Abb. 6	Bestimmung der Federkonstante	18
Abb. 7	Herstellung der Kollagengele	20
Abb. 8	Phasentrennung	25
Abb. 9	Gelelektrophorese	26
Abb. 10	Ablauf einer PCR	27
Abb. 11	Osteoidsaum und Osteomalazie <i>in vitro</i>	34
Abb. 12	Histogramm E-modul	35
Abb. 13	Kraft-Abstands-Kurve MS und OIV	36
Abb. 14	Darstellung des kollagenen Netzwerkes mittels RKM	37
Abb. 15	MTT Test	38
Abb. 16	TRAP Färbung	39
Abb. 17	Osteoklastenzahl im FACS	40
Abb. 18	Anteil CalcR <sup>+</sup> Osteoklasten im FACS	41
Abb. 19	Resorptionsaktivität	42
Abb. 20	Genexpression	44
Abb. 21	TROP2 <sup>+</sup> und CD207 <sup>+</sup> Langerhanszellen	45
Abb. 22	TROP2 Färbung	46
Abb. 23	Mechanotransduktion	47
Abb. 24	Resorptionsaktivität auf RGD-Peptid	48

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	Rinderalbumin
°C	Grad Celsius
CalcR	Calcitonin Rezeptor
CatK	Cathepsin K
CD207	Langerin
CDC42	Zellteilungs-Kontrollprotein 42
cm	Zentimeter
Ct-Wert	Cycle treshold
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxynukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-modul	Elastizitätsmodul
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FGF23	Fibroblasten Wachstumsfaktor 23
FSC	Forward scatter
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
HSC	Hämatopoietische Stammzelle
Hz	Hertz
IFM	Infinite Fokus Mikroskop
kHz	Kilohertz
kPa	Kilopascal
kV	Kilovolt
m	Meter
mA	Milliampere
mbar	Millibar
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
Min	Minute
ml	Milliliter

## Abkürzungsverzeichnis

---

mm	Millimeter
MPa	Megapascal
MNC	Mononukleäre Zelle
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MS	Mineralisierte Oberfläche
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N	Newton
nm	Nanometer
OIV	Osteomalazie <i>in vitro</i> (Demineralisierte Oberfläche)
p	Pico
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
qPCR	Quantitative Real Time Polymerase-Ketten-Reaktion
REP	Rauhigkeitsausschlussebene
RhoA	Rho GTPase A
RKM	Rasterkraftmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
ROCK1	Rho assoziierte Proteinkinase 1
Sek	Sekunde
SSC	Sideward scatter
TRAP	Tartratresistente Saure Phosphatase
TROP2	Tumor assoziierter Kalzium Signalvermittler 2
V	Volt

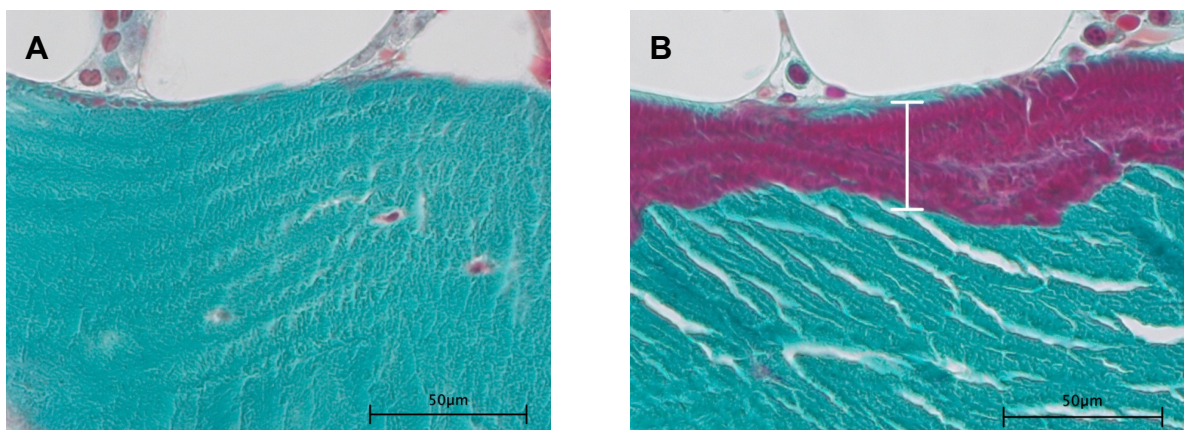
## 1 Einleitung

### 1.1. Osteomalazie

Knochen ist ein lebendiges zelluläres Gewebe, dessen Integrität für die Funktion unseres Körpers essentiell ist. Er dient dem Knochenmark als Sitz, als Speicher in der Kalziumhomöostase, sowie als Stütz- und Halteapparat. Das vorwiegend aus Knochen bestehende Skelett formt unseren Körper, schützt unsere lebenswichtigen Organe und schafft die Voraussetzung für jede Bewegung, sei es Laufen oder Atmen. Demzufolge ist es nicht verwunderlich, dass Knochenerkrankungen wie eine Osteomalazie mit erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität der betroffenen Patienten einhergehen.

### 1.2. Diagnose und Symptomatik

Das Krankheitsbild der Osteomalazie ist durch eine verminderte Mineralisierung des Knochens charakterisiert und definiert durch eine durchschnittliche Verzögerungszeit der Mineralisation von 100 Tagen sowie einer durchschnittlichen Osteoiddicke, die der nicht mineralisierten Knochenmatrix entspricht, von größer 12,5  $\mu\text{m}$  (Parfitt 1997) (Abb. 1). Des Weiteren wird häufig das Verhältnis des Osteoids zum Gesamtknochen angegeben, das bei einer Osteomalazie größer als 10 % ist (Parfitt 1997).



**Abbildung 1:** Lichtmikroskopische Aufnahmen (400-fache Vergrößerung) von Masson-Goldner-Trichrom gefärbten Knochenbiopsien eines gesunden (A) sowie eines an Osteomalazie erkrankten Patienten (B). Der sich darstellende Osteoidsaum wurde zur Verdeutlichung mit einem weißen Balken markiert.



# 1 Einleitung

---

Die Diagnose einer Osteomalazie kann nur histologisch gesichert werden, da charakteristische radiologische Zeichen wie Fischwirbel und Looser-Umbauzonen sowie im Serum gemessene Abweichungen der alkalischen Phosphatase, des Phosphat- und Kalziumgehaltes, fehlen können (Peach, Compston et al. 1982, Bisballe, Eriksen et al. 1991).

Genauere Zahlen zu Inzidenz und Prävalenz einer Osteomalazie sind auf Grund der vielen Erkrankungen, die ursächlich für die Knochenstoffwechselstörung sein können, nicht verfügbar. Eine deutsche Studie von 2010 konnte jedoch bei 26 % von 675 transiliakalen Knochenbiopsien von 20- bis 90-Jährigen eine Osteomalazie nachweisen (Priemel, von Domarus et al. 2010). Außerdem liegt die Vermutung nahe, dass unter den 6,3 Millionen Osteoporose-Betroffenen in Deutschland (Hadji, Klein et al. 2013), ebenfalls an Osteomalazie erkrankte Personen sind, da das für die Diagnostik der Osteoporose eingesetzte Verfahren der Dual-Röntgen-Absorptiometrie nicht sicher zwischen beiden Erkrankungsbildern unterscheiden kann (Menkes 2013).

Die Symptome einer Osteomalazie sind sehr vielseitig und reichen von diffusen Knochenschmerzen, Muskelschwäche, Druckempfindlichkeit der Knochen, Gehstörungen und dem charakteristischen Watschelgang bis zu den körperlichen Beschwerden, die durch Verformungen der Knochen und pathologische Frakturen bedingt sind (Basha, Rao et al. 2000, Jones, Horst et al. 2007, Bhan, Rao et al. 2010, Gifre, Peris et al. 2011).

## 1.3. Ätiologie und Pathophysiologie

Es gibt eine Vielzahl von Erkrankungen, die mit einer Osteomalazie einhergehen können, hier zu nennen seien beispielsweise Störungen des Phosphat- (Shaikh, Berndt et al. 2008, Penido and Alon 2012) und Vitamin D Stoffwechsels (Thacher and Clarke 2011), chronisches Nierenversagen (Mac Way, Lessard et al. 2012), renale tubuläre Azidose (Pereira, Miranda et al. 2009, Pandita, Bhat et al. 2012), eine lang andauernde Therapie mit Antikonvulsiva (Kulak, Borba et al. 2004, Ashjazadeh, Zamani et al. 2009), chronisches Leberversagen (Luxon 2011, Mansueto, Carroccio et al. 2012), Tumore (Hu, Yuan et al. 2011, Jiang, Xia et al. 2012) und gastrointestinale Erkrankungen (Vogelsang, Ferenci et al. 1995, Bikle 2007).

Als weitaus häufigste Ursache wird jedoch ein Mangel an Vitamin D angesehen, der zu einer verminderten Aufnahme von Kalzium und Phosphat im Darm bzw. einer verminderten Rückresorption in den Nieren führt (Parfitt 1997, Kraenzlin 2003, Bhan, Rao et al. 2010). Dem Knochen fehlen somit die notwendigen Substrate zur Mineralisation seiner Grundsubstanz. Das führt wiederum dazu, dass der Körper als Reaktion auf die niedrigen Kalzium- und Phosphatspiegel Parathormon ausschüttet, welches durch eine Stimulierung des Knochenabbaus Phosphat und Kalzium mobilisiert und somit die Entstehung einer Osteomalazie fördert (Yoshida and Stern 2012).

Obwohl klinische Studien den Mechanismus der Wirkung von Vitamin D auf den Knochen überwiegend als indirekte Folge auf die Stimulation der Kalzium- und Phosphataufnahme ansehen (Yoshida and Stern 2012), zeigen in vitro Experimente weitere mögliche Effekte von Vitamin D auf den Knochenstoffwechsel. So konnte gezeigt werden, dass Vitamin D die osteoblastäre Differenzierung über eine Regulation der Gentranskription fördert (van Driel, Pols et al. 2004, Montecino, Stein et al. 2007). Ferner führt Vitamin D dosisabhängig zu einer Stimulation der Sekretion von Osteocalcin und der alkalischen Phosphatase in Osteoblastenkulturen (Chenu, Valentin-Opran et al. 1990) und hat antiapoptotische Effekte auf Osteozyten (Vertino, Bula et al. 2005). Zusätzlich scheint die anabole Wirkung von Vitamin D auf den Knochen über eine Stimulation Kollagen-vernetzender Enzyme vermittelt zu werden (Shiraishi, Higashi et al. 2002, Nagaoka, Mochida et al. 2008).

Im Widerspruch dazu stehen in vitro Experimente mit Osteoklasten, die belegen, dass Vitamin D die Differenzierung und Resorptionsaktivität von Osteoklasten

induziert und damit den Knochenabbau fördert (Takahashi, Akatsu et al. 1988, Suda, Takahashi et al. 1999, Lee, Kalinowski et al. 2002).

Demzufolge scheint die Wirkung von Vitamin D auf den Knochenstoffwechsel weitaus komplexer zu sein als bisher vermutet und sowohl über Knochen-aufbauende Osteoblasten als auch Knochen-abbauende Osteoklasten vermittelt zu werden.

## **1.4. Vitamin D Mangel**

Die Bedeutung eines Vitamin D Mangels, definiert als 25-Hydroxyvitamin D (25-OHD) Level unter 20ng/ml im Plasma, hat in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen.

Weltweit sind geschätzte 1 Milliarde Menschen betroffen, die entweder an einer Vitamin D Insuffizienz (25-OHD < 30ng/ml) oder einem Mangel leiden (Holick 2007). Allein in Deutschland, einem vergleichsweise sehr wohlhabenden Land, zeigen insgesamt 57-58 % der Bevölkerung zwischen 18 und 79 Jahren zu niedrige Vitamin D Level, die bereits einem Vitamin Mangel entsprechen. In der Altersgruppe zwischen 65 und 79 Jahren leiden sogar bis zu 75 % der Frauen unter einem Vitamin D Mangel (Hintzpeter, Mensink et al. 2008).

Dazu kommt, dass der Bedarf an Vitamin D hauptsächlich über die körpereigene Bildung in der Haut und nur mäßig über die Nahrung gedeckt werden kann. Die für die fotochemisch induzierte Reaktion benötigte Wellenlänge, durch die in der Haut Vitamin D aus 7-Dehydrocholesterol gebildet wird, liegt allerdings zwischen 280 und 320nm und ist in den Regionen jenseits des 40. Breitengrades (Deutschland liegt zwischen dem 47. und 55.) nur im Frühling und Sommer verfügbar (Webb, Kline et al. 1988). Es ist somit nicht verwunderlich dass in Deutschland, einem Land mit einer durchschnittlichen Arbeitswoche von mehr als 41 Stunden, eine hohe Prävalenz des Vitamin D Mangels beobachtet werden kann (Markus 2012).

Vor dem Hintergrund dieser Daten und der Studie von Priemel et. al, die zeigte dass eine Osteomalazie bei allen Patienten mit einem Vitamin D Mangel einherging, könnte das Auftreten einer Osteomalazie in nächster Zeit immer mehr an Relevanz gewinnen (Priemel, von Domarus et al. 2010).

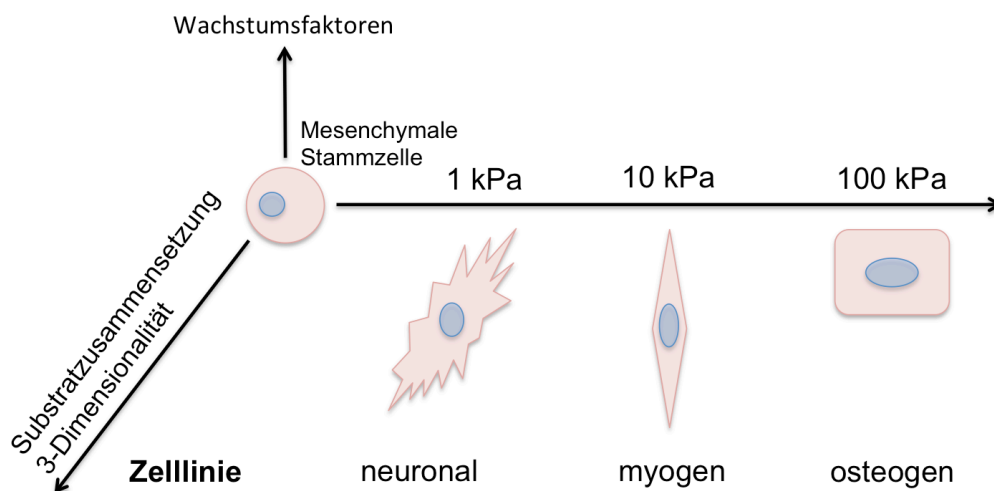
## 1.5. Bedeutung der Zell-Matrix-Interaktion

Die bei der Osteomalazie verminderte Mineralisation des Knochens hat zur Folge, dass der Knochen an Elastizität zunimmt und damit verbunden an Festigkeit und Stabilität verliert (Anumula, Magland et al. 2008).

Der Effekt der Elastizität bzw. des sogenannten Elastizitätsmoduls (E-modul) der umgebenden Matrix auf das Zellverhalten ist in den letzten Jahren viel erforscht worden und könnte auch im Zusammenhang der Osteomalazie eine Rolle spielen.

So konnte für eine Vielzahl von Zellen in vitro gezeigt werden, dass der E-modul der umgebenden Matrix Proliferation, Lokomotion, Adhäsion, Morphologie, Ausbreitung und Differenzierung maßgeblich beeinflusst (Pelham and Wang 1997, Wang, Dembo et al. 2000, Flanagan, Ju et al. 2002, Reinhart-King, Dembo et al. 2005, Engler, Sen et al. 2006, Khatiwala, Peyton et al. 2006, Hadjipanayi, Mudera et al. 2009, Khatiwala, Kim et al. 2009). Der in diesem Kontext von Engler et. al eingeführte Begriff „matrix control of stem cell fate“ (Abb. 2) beschreibt die Beobachtung, dass mesenchymale Stammzellen (MSC) allein in Abhängigkeit vom E-modul ihrer Umgebung entweder Osteoblasten-, Muskelzell- oder Nervenzellspezifische Gene exprimieren (Engler, Sweeney et al. 2007).

Für hämatopoietische Stammzellen (HSC), aus denen sich Osteoklasten differenzieren, sind ähnliche Effekte beschrieben, die vor allem den Einfluss der Mechanik der Stammzellnische hervorheben. So konnte gezeigt werden, dass der E-modul Migrations-, Adhäsions- und Proliferationsverhalten von HSCs beeinflusst (Holst, Watson et al. 2010, Lee-Thedieck, Rauch et al. 2012).



**Abbildung 2:** Das „Schicksal“ einer Stammzelle. Die Abbildung soll den von Engler et al. beschriebenen Effekt, dass allein der E-modul der umgebenen Matrix unabhängig von weiteren Faktoren das „Schicksal“ einer Stammzelle bestimmt, verdeutlichen.

### 2 Fragestellung

Vor dem Hintergrund der Bedeutung der Zell-Matrix-Interaktion und der bekanntlich veränderten Oberflächeneigenschaften bei Osteomalazie, war es unser Ziel, die Auswirkung der Matrixmineralisierung auf die osteoklastäre Differenzierung zu untersuchen. Daraus ergaben sich folgende Fragen:

1. Können wir eine Osteomalazie in vitro simulieren?
2. Welchen Einfluss hat die veränderte Mechanik der Matrix auf die Differenzierung von Osteoklasten?
3. Wie werden die Beobachtungen auf zellulärer Ebene vermittelt?

Hieraus ergab sich die zu prüfende Hypothese, dass eine verminderte Oberflächenmineralisierung, wie sie für eine Osteomalazie bekannt ist, zu einer veränderten osteoklastären Differenzierung und Resorption führt.

### 3. Material

#### 3.1. Geräte und Laborbedarf

Laminar-Flow Werkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Zentrifuge für 15/50 ml Reagiergefäße: Rotanta 460 R	Andreas Hettich GmbH & CO.KG, Tuttlingen
Zentrifuge für 0,5/1,5/2,0 ml Reagiergefäße: Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge für 0,2 ml Reagiergefäße: Mini Star	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasserbad	Memmert GmbH & CO.KG, Schwabach
Kühlschrank -80°C: Herafreeze Basic	Thermo Scientific, Langenselbold
Inkubator: Hera cell 150	Thermo Scientific, Langenselbold
Neubauer Zählkammer	Marienfeld-Superior, Lauda- Königshofen
Lichtmikroskop: Eclipse TS 100	Nikon GmbH, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop: Eclipse TE 2000-S	Nikon GmbH, Düsseldorf
Reagenzglasschüttler	IKA Janke & Kunkel, Staufen
Pipettierhilfe: Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Einkanal Pipetten (0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl; 500-5000 µl): Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrowelle: "Express" Cook & Defrost	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Bandsäge	PSI Grünwald GmbH & Co. KG, Laudenbach
Mikroplattenleser: Mithras LB 940	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Gentle Macs Dissociator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Langenselbold

## 3 Material

---

iQ5 Cycler	Bio-Rad Laboratories, Herkules, USA
FACS Canto II	BD Biosciences, New Jersey, USA
Rasterkraftmikroskop: Nano Wizard	JPK Instruments, Berlin
Infinite Fokus Mikroskop – Alicona	Alicona Imaging GmbH, Grambach, Österreich

### 3.2. Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen (0,5-10 µl; 1-200 µl; 100-1000 µl): Tip One	STARLAB GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen mit Filter (0,5-10 µl; 1-200 µl; 100-1000 µl): Tip One	STARLAB GmbH, Ahrensburg
Einwegskalpell (Nr. 21)	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Reagenzgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Hörstel
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen für Zellyse: Molecularbiology Tubes	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Objektträger 76x26 mm (RKM-Calibration)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Objektträger (75x25 mm): Menzel-Gläser Superfrost Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Deckgläser (24x40 mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Pap Pen, Immunostaining Pen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Nagellack klar	Interco Cosmetics GmbH, Wiesbaden
Einbettkassetten: Bio Safe White Alufolie	Medite GmbH, Burgdorf TIM-KWK Vertrieb GmbH , Gaienhofen

## 3 Material

---

Zellkulturschale 100	TPP Techno Plastic Products AG, Hörstel
Zellkulturtestplatte (24-Well/96-Well-Platte)	TPP Techno Plastic Products AG, Hörstel
96-Well-Platten für qPCR	Bio-Rad Laboratories, Herkules, USA
Microseal B Film für qPCR 96-Well Platten	Bio-Rad Laboratories, Herkules, USA
Fliegengitter aus Polyester	Windhager GmbH, Freilassing
Sterile Kompressen (10 cm x 10 cm)	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied

### 3.3. Chemikalien, Lösungen und Puffer

Alpha Medium (mit Nukleosiden)	Biochrom AG, Berlin
MEM Earle's 10x (mit Phenolrot)	Biochrom AG, Berlin
Trypsin 2,5 %	Biochrom AG, Berlin
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Dulbecco (ohne $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ )	
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Paisley, U.K.
Fetales Kälberserum (FCS) Gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
L-Glutamin 200 mM	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/Streptomycin/Amphotericin Lösung (Ab/Am)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Essigsäure 100 %: Rotipuran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure 25 %: Rotipuran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fast Red Violett	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Naphthol AS-MX Phosphat Dinatriumsalz	Sigma Aldrich, St Louis, USA
MTT (Thiazolylblau)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
4',6-Diamidin-2-phenylindol, Dilactate (DAPI)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
RANKL (Cat.: 310-01)	PeptoTech GmbH, Hamburg
M-CSF (Cat.: 300-25)	PeptoTech GmbH, Hamburg
Antikörper gegen TROP2, 1 mg/ml (Cat.: ab79976)	Abcam GmbH, Cambridge, United Kingdom
Antikörper gegen Langerin, 1 mg/ml (Cat.: ab49730)	Abcam GmbH, Cambridge, United Kingdom



### 3 Material

---

Ziege Anti-Maus IgG, Alexa Fluor 568 (Cat.: A11019)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ziege Anti-Hase IgG, Alexa Fluor 488 (Cat.: A21222)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
5x iScript RT Supermix	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Sso Advanced SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Ficoll Paque Plus	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
APC CALcR (FAB4614A)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rinderalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, St Louis, USA
Kollagen G (0,4 % in Hcl)	Biochrom AG, Berlin
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 70 %: Rotipuran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trizol	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Formaldehyd 3,5 - 3,7 %	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken
Buffy Coat	Transfusionsmedizin, Ulm
Osteoklastenmedium	Alpha Medium
	10 % FBS Gold
	1 % L-Glutamin
	1 % Ab/Am
	40 ng/ml RANKL
	20 ng/ml M-CSF

### 4. Methoden

#### 4.1. *In vitro* Kultivierung humaner Osteoklasten

##### 4.1.1. Isolation mononukleärer Zellen

Zur Kultivierung humaner Osteoklasten wurden zunächst mononukleäre Zellen (MNC) des peripheren Bluts aus Buffy Coats isoliert. Der Buffy Coat, im deutschen als Leukozytenfilm bezeichnet, entsteht als Nebenprodukt bei der Verarbeitung einer Vollblutspende und macht ca. 1 % von dessen Volumen aus. Er besteht hauptsächlich aus Leukozyten, einschließlich MNCs und Thrombozyten. Die verwendeten Buffy Coats wurden am selben Tag von Blutspendern gewonnen, aufbereitet und anschließend verarbeitet.

Zur Isolation der MNCs wurde die Dichtegradientenzentrifugation angewendet, mit Hilfe derer die MNCs von den Thrombozyten und Erythrozyten aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte getrennt werden können. Als Trennlösung wurde Ficoll, ein synthetisches Polymer aus Saccharose, verwendet. Dieses besitzt eine niedrigere Dichte als Erythrozyten und Thrombozyten und eine höhere Dichte als mononukleäre Zellen.

Während der Zentrifugation sammeln sich die MNCs entsprechend ihrer Dichte an der Grenzschicht zwischen Ficoll und verdünntem Buffy Coat, die schwereren Ery- und Thrombozyten hingegen pelletieren am Boden des Zentrifugenröhrchens.

Zunächst wurden 25 ml eines Buffy Coats mit PBS im Verhältnis 1:8 verdünnt.

Acht 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden mit jeweils 25 ml Ficoll Paque Plus gefüllt und anschließend mit 25 ml des verdünnten Buffy Coats vorsichtig überschichtet, so dass die zwei Phasen getrennt blieben. Die Röhrchen wurden bei ausgeschalteter Bremse für 30 Min bei 20°C und 350g (350-fache Erdbeschleunigung ‚g‘) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die MNCs als milchig-weiße Phase zwischen Ficoll und Buffy Coat sichtbar. Diese mittlere Phase von je 4 Zentrifugenröhrchen wurde in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und anschließend mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Daraus resultierten zwei Zentrifugenröhrchen, die nun bei aktivierter Bremse für 10 Min bei 20°C und 300g zentrifugiert wurden. Danach wurden die Überstände

abgenommen, die Zellpellets resuspendiert und in einem Zentrifugenröhrchen vereint. Dieses wurde erneut mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (aktivierte Bremse, 10 Min, 20°C, 300g).

Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 10 µl der Suspension in 990 µl 10 % Essigsäure in einem 1,5 ml Reagenzgefäß verdünnt und für 10 Sek mit dem Vortexer durchmischt. Die Essigsäure, die zur Lyse der Erythrozyten führt, lässt die Leukozyten und MNCs unbeschädigt und vereinfacht die daran anschließende mikroskopische Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer.

### 4.1.2 Kultivierung humaner Osteoklasten

Die isolierten MNCs wurden mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in einer 24-Well-Platte mit Osteoklastenmedium auf den zu untersuchenden Oberflächen kultiviert. Während der Zelldifferenzierung von 4 Wochen, fand an Tag 1 und 4 ein kompletter Mediumwechsel statt. In der darauf folgenden Zeit wurde alle 2-3 Tage die Hälfte des Mediums durch frisches Osteoklastenmedium ersetzt.

## 4.2. *In vitro* Simulation einer Osteomalazie

### 4.2.1. Vorbereitung des Dentins

Das Dentin der Stoßzähne von Elefanten wird als Standardmaterial für die osteoklastäre Resorption *in vitro* verwendet. Dentin besteht aus Kollagen I und Hydroxylapatit, wobei dessen Verhältnis dem vom Knochen entspricht (Jantou-Morris, Horton et al. 2010)

Auf der einen Seite mag sich die Ähnlichkeit zum Knochengewebe auf die Differenzierung der Osteoklasten positiv auswirken, auf der anderen Seite ermöglicht uns die Kultivierung auf Dentin die Visualisierung von Resorptionslakunen, ein wichtiges Zeichen aktiver Osteoklasten.

Aus Dentinblöcken wurden zunächst unter Verwendung einer Bandsäge 10,0 x 10,0 x 0,7 mm große Dentinchips angefertigt. Außerdem wurde zur Markierung der Oberfläche eine Ecke des Dentinchips mit einer zusätzlichen Kante (Phase) versehen. Bevor die Dentinchips Verwendung in der Zellkultur fanden, wurden sie für 5 Min in 70 % Ethanol eingelegt und im Anschluss in einer Petrischale unter der Werkbank

trocknen gelassen. Nach dem Trocknen wurden die Dentinchips mit einer sterilen Pinzette in eine 24-Well-Platte (je ein Dentinchip pro Well) überführt. Innerhalb der nächsten 2 h wurden die frisch isolierten MNCs auf das Dentin in die 24-Well-Platte pipettiert.

### 4.2.2. Demineralisierung des Dentins

Die bereits zugeschnittenen Dentinchips wurden für eine Minute mit 1 molarer Salzlösung behandelt und sorgfältig mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend wurden sie für 24 h in destilliertem Wasser eingelegt, um mögliche Reste der Salzsäure zu entfernen. Vor der Verwendung für die Zellkultivierung wurden die behandelten Dentinchips ebenfalls für 5 Min in 70 % Ethanol gelegt und unter der Werkbank trocken gelassen.

### 4.2.3. Masson-Goldner-Trichrom Färbung des Dentins

Das Dentin wurde nach der bereits beschriebenen Vorgehensweise vorbereitet. Zusätzlich wurden demineralisierte und unbehandelte Dentinchips mit der Bandsäge in der Mitte quer durchgeschnitten. Anschließend erfolgte eine Färbung dieser nach Masson-Goldner-Trichrom, die freundlicherweise durch das Institut für Pathologie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf nach standardisiertem Protokoll durchgeführt wurde. Zur Vermessung der Demineralisierungszone wurden Bilder mit einem Lichtmikroskop in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Im Anschluss wurde die Demineralisierungszone mit Hilfe des elektronischen Lineals im Graphic Converter Version 8.2. (Lemke Software GmbH, Peine) bestimmt.

### 4.2.4. Histomorphometrie von Knochenbiopsien

Knochenbiopsien von Osteomalazie Patienten, die vom Institut für Pathologie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, dienten als Vergleich für eine Osteomalazie. Zur Vermessung des Osteoidsaums wurden zunächst Bilder der nach Masson-Goldner-Trichrom gefärbten Knochenbiopsien mit einem Lichtmikroskop in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Anschließend konnte die Ausdehnung des Osteoidsaums mit Hilfe des elektronischen Lineals im Graphic Converters Version 8.2. (Lemke Software

GmbH, Peine) bestimmt werden und mit den Aufnahmen des demineralisierten Dentins verglichen werden.

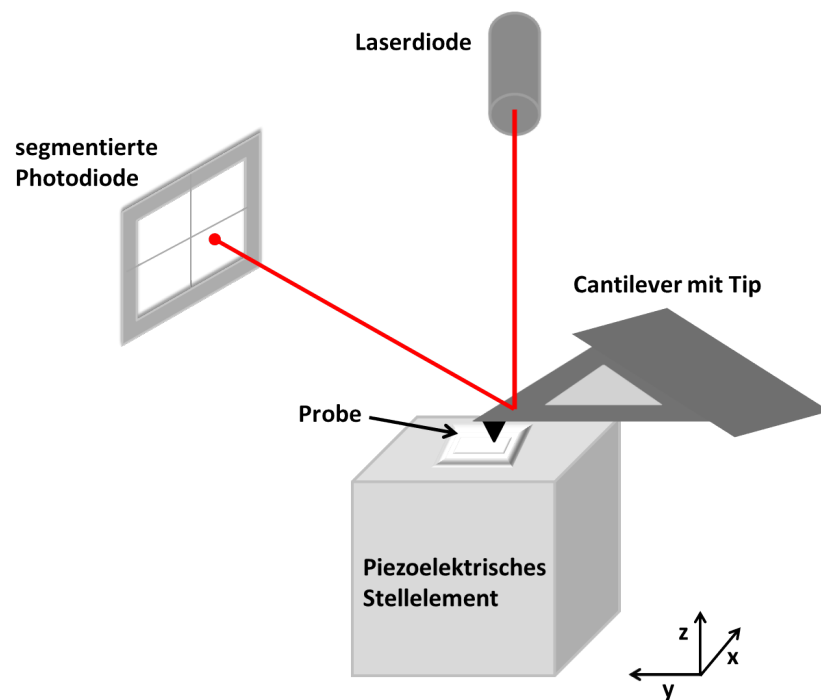
### 4.3. Rasterkraftmikroskopie

#### 4.3.1. Aufbau und Messprinzip

Das Rasterkraftmikroskop gehört zu den Rastersondenmikroskopen und ist derzeit eines der wichtigsten Werkzeuge zur Untersuchung der Mikromechanik einer Probe im Nanometerbereich.

Das Messprinzip (Abb. 3) beruht auf einer Spitze (Tip), die in die Nähe der zu untersuchenden Probe gebracht wird und die Oberfläche dieser Probe mäanderförmig abrastert. Dabei wird die Bewegung zwischen Spitze und Probe durch piezoelektrische Stellelemente realisiert. So kann entweder der Probenstisch mit der Probe oder die Spitze selbst bewegt werden. Das Ende der Spitze ist an einer weichen Blattfeder, dem sogenannten Cantilever befestigt. Beim Abrastern der Probenoberfläche kommt es durch anziehende oder abstoßende Kräfte zur Auslenkung des Cantilevers. Dabei dient ein Laserstrahl dazu, die Auslenkung des Cantilevers zu detektieren. Dieser wird auf die Rückseite des Cantilevers fokussiert. Durch Reflektion gelangt der Laserstrahl auf eine segmentierte Photodiode. Eine Biegung des Cantilevers führt somit zu einem abgelenkten Lasersignal, welches auf die Photodiode trifft. Die hierbei aufgenommenen Daten werden als Funktion des Ortes auf einem Monitor sichtbar.

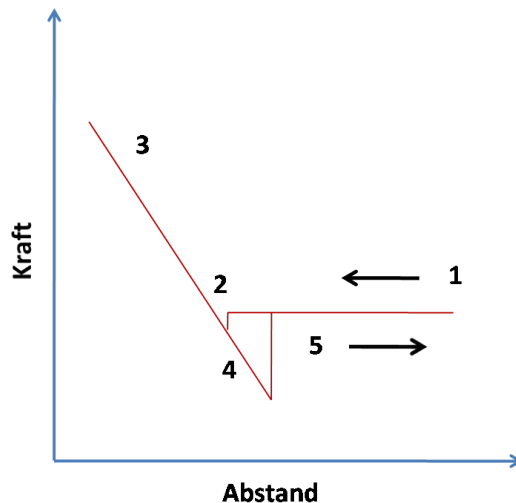
Das Rasterkraftmikroskop kann je nach Art und Beschaffenheit der zu untersuchenden Probe in verschiedenen Messmodi betrieben werden. In dieser Arbeit wurde der Modus konstanter Kraft angewendet, bei dem die Höhe der Probe mit Hilfe des Piezos so nachgeregelt wird, dass die vertikale Auslenkung des Cantilevers und damit auch die Kraft konstant bleiben (Kaupp 2010). Die dabei entstandenen Kraft-Abstands-Kurven geben Aufschluss über die Elastizität der Probe.



**Abbildung 3:** Schematischer Aufbau des Rasterkraftmikroskops. Das piezoelektrische Stellelement rastert die Oberfläche ab. Die Auslenkung des Cantilevers, die durch die Proben topographie zustande kommt, wird durch den Laser verstärkt und auf der segmentierten Photodiode detektiert (Prein 2012).

### 4.3.2. Kraft-Abstands-Kurven

Mit Hilfe von Kraft-Abstands-Kurven (Abb. 4) lassen sich Proben im Hinblick auf ihre Elastizität untersuchen. Hierzu wird, entsprechend dem Modus der konstanten Kraft, die Spitze mit einer definierten Kraft auf die Probe gedrückt und danach wieder entfernt. Dabei wird die auf die Spitze einwirkende Kraft in Abhängigkeit von der Spitzenposition aufgezeichnet (Burnham, Colton et al. 1991).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung einer idealen Kraft-Abstands-Kurve.

1: Annäherung der Spitze an die Probe, 2: Spitze springt auf die Oberfläche und steht in Kontakt mit der Probe, 3: Kraft steigt proportional zum weiter abnehmenden Abstand, 4: Cantilever fährt wieder zurück, steht aber noch in Kontakt mit der Probe, 5: Spitze löst sich von der Oberfläche. Annäherungskurve = 1-3, Rückfahrkurve = 4-5 (Prein 2012).

### 4.3.3. Elastizitätsmessungen

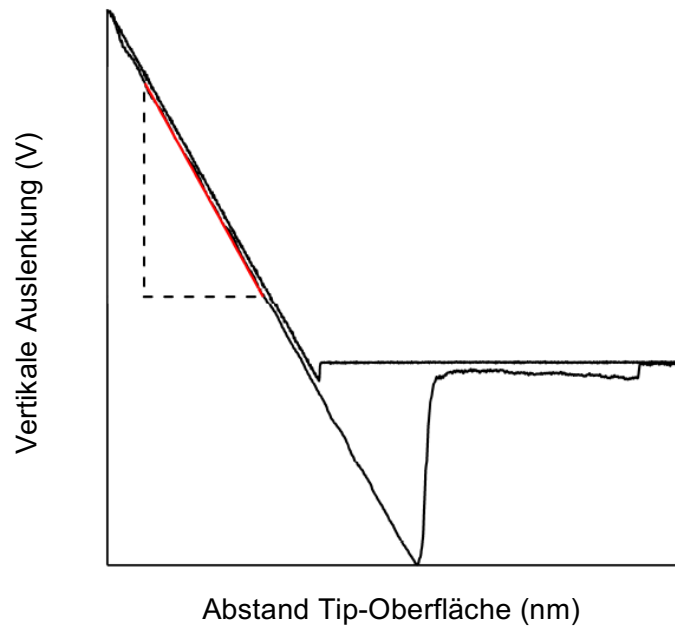
Zur Bestimmung des E-modul wurde das demineralisierte Dentin wie unter 4.2.2. beschrieben, vorbereitet und mit dem RKM in Verbindung mit der SPM Software Version 4.0.38 (JPK Instruments, Berlin) vermessen.

Die Elastizitätsmessungen wurden in PBS durchgeführt. Der verwendete Cantilever (MLCT Microcantilever, Bruker, Mannheim) besaß eine Federkonstante von 0,02 N/m und einen Öffnungswinkel von 17,5°.

Für die Elastizitätsmessungen wurden ein Ausschnitt von 10 x 10 µm und ein Raster von 25 x 25 Messpunkten gewählt. Gemäß des Modus der konstanten Kraft wurde eine Kraft von 5 V mit einer Scangeschwindigkeit von 1 Hz festgelegt.

### 4.3.4. Kalibrierung des Cantilevers

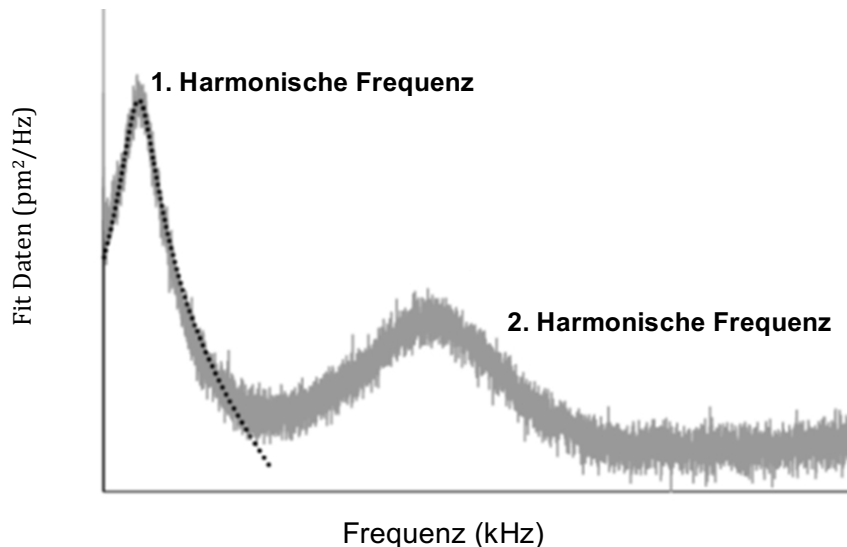
Im Anschluss an die Elastizitätsmessungen wurde jeder Cantilever auf einem Glasobjektträger in PBS kalibriert. Hierzu wurde zunächst durch die Aufnahme einer Kraft-Abstands-Kurve und die Umrechnung des Auslenkungssignales von Volt auf Nanometer, die Sensitivität des Cantilevers bestimmt. Dabei wurde jeweils der steile Anstieg der Kraft-Abstands-Kurve verwendet (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Kraft-Abstands-Kurve zur Bestimmung der Sensitivität des Cantilevers (Schmidt 2008).



Anschließend wurde die Federkonstante des Cantilevers mit Hilfe der Methode des thermischen Rauschens bestimmt. Hierzu wurde der Cantilever mindestens 400 nm von der Glasoberfläche entfernt und ein sogenanntes Kraftspektrum aufgezeichnet. Ein Lorentz-Fit diente dazu die erste harmonische Resonanzfrequenz zu fitten und so die Federkonstante zu bestimmen (Abb. 6). Sowohl die Sensitivität als auch die Federkonstante wurden pro Cantilever dreimal bestimmt und der Mittelwert gebildet.



**Abbildung 6:** Bestimmung der Federkonstante mit Hilfe des thermischen Rauschens. Nach der Aufnahme eines Kraftspektrums (graue Kurve) wird die erste harmonische Frequenz mit Hilfe eines Lorentz-Fit (schwarz gepunktete Kurve) gefittet und dadurch die Federkonstante bestimmt (Schmidt 2008).

### 4.3.5. Kurvenauswertung

Die aufgenommenen Kraft-Abstands-Kurven wurden mit Hilfe der JPK Data Processing Software Version 4.2.20 (JPK Instruments Ag, Berlin) ausgewertet. Der E-modul wurde mit Hilfe eines modifizierten Hertz Modells für einen konischen Indentor bestimmt (Domke J 1998).

$$= \frac{2}{1 - \nu} \cdot \tan^2 \alpha \cdot \frac{E}{(1 - \nu) \cdot \alpha^2}$$

$\alpha$  entspricht dem Flächenöffnungswinkel der Messspitze. Die Poissonzahl  $\nu$  der Probe ist unbekannt und wurde daher auf den Wert von 0,5 für inkompressible Proben festgelegt.

Die Kraft  $F$  ergibt sich aus der Federkonstante  $k$  und der Auslenkung des Cantilevers  $d$ :

$$F = k \cdot d = k \cdot (z - \delta),$$

wobei sich die Auslenkung des Cantilevers  $d$  aus der Differenz der Piezobewegung  $z$  und der Eindrücktiefe  $\delta$  ergibt.

Der gesamte Verlauf der Kraftkurven wurde für die Berechnung des E-moduls gefittet. Anschließend wurde die Häufigkeitsverteilung der berechneten E-module mit Hilfe der Igor Pro Software Version 6.0.2.4 (WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, Oregon, USA) in einem Histogramm dargestellt. Für die Bestimmung des Modus der Häufigkeitsverteilung wurde ein Gauß-Fit herangezogen.

### 4.3.6. Bildaufnahme

Für die Bildaufnahmen wurde das Dentin wie unter 4.2.2. beschrieben vorbereitet.

Die Bilder wurden an Luft mit einer Scangeschwindigkeit von 1 Hz und einer Auflösung von 512 x 512 Pixeln im Kontaktmodus bei konstanter Kraft aufgenommen. Anschließend wurden die Höhenbilder als auch die Bilder der vertikalen Ausrichtung mit Hilfe der Gwyddion Software Version 2.25 (<http://gwyddion.net>) bearbeitet um den polynominellen Untergrund zu entfernen. Zusätzlich wurden bei den Höhenbildern die Daten nivelliert so dass die Facetten nach oben zeigen. Zuletzt wurde die Farbskala so eingestellt, dass das Kollagenetzwerk möglichst klar erkennbar war.

### 4.3.7. Vermessung der Kollagenfasern

Die Kollagenfasern wurden mit Hilfe des Profilometer Tools der Gwyddion Software Version 2.25 (<http://gwyddion.net>) vermessen. Dementsprechend wurden einzelne Kollagenfasern markiert um die Oberflächentopographie dieser bzw. die Abstände in Abhängigkeit von der vertikalen Auslenkung des Cantilevers zu analysieren.

### 4.4. Herstellung der Kollagengele

Die Herstellung der Kollagengele (Abb. 7) erfolgte nach dem etablierten Protokoll von Hadjipanyi et al. (Hadjipanyi, Mudera et al. 2009). Dazu wurden zunächst 8 ml 0,4 % Kollagenlösung G mit 2 ml 10-fach MEM Earle's Medium versetzt. Anschließend wurden unter ständigem Schwenken des Zentrifugenröhrchens 25  $\mu$ l Tropfen 1 molarer Natronlauge bis zum Eintreten des pinken Farbumschlages dazu gegeben.

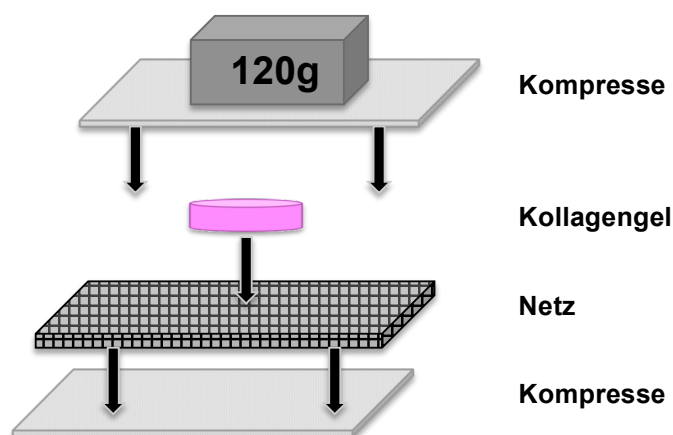
Als nächstes wurden zwei 24-Well-Platten mit je 500 ml der Lösung beschickt und für 2 h bei 37°C inkubiert, was zur vollständigen Polymerisation des Kollagens führte. Danach wurde eine Hälfte der Kollagengele gepresst um den Wassergehalt zu reduzieren, mit dem Ziel die Kollagenkonzentration zu erhöhen.

Die Kollagengele wurden dazu auf ein zuvor autoklaviertes Polyester Netz, das sich wiederum zwischen zwei sterilen Kompressen befand, gelegt.

Im nächsten Schritt wurde alles mit 120 Gramm (= vier mit je 30 ml Wasser gefüllten Zentrifugenröhrchen) für 5 Min beschwert. Danach konnten die gepressten Gele vorsichtig mit einer Pinzette gelöst werden und in eine mit Alpha Medium vorgelegte 24-Well-Platte transferiert werden.

Dieser Methode zu Folge entspricht das ungepresste 0,4 % Kollagengel einem E-modul von  $42,2 \pm 22$  kPa ( $\approx 50$  kPa) und das gepresste 20 % Kollagengel einem E-modul von  $1805,3 \pm 214$  kPa ( $\approx 2$  MPa). (Hadjipanyi, Mudera et al. 2009)

Bis zur Verwendung in der Zellkultur wurden die Kollagengele mit Alpha Medium beschichtet im Inkubator aufbewahrt.



**Abbildung 7:** Schema zur Herstellung der gepressten Kollagengele.

### **4.5. Herstellung RGD-Peptid beschichtetes Dentin**

Dentinchips wurden nach der bereits unter 4.2.1. beschriebenen Vorgehensweise vorbereitet. Im Anschluss erfolgte eine RGD-Peptid Beschichtung, die freundlicherweise durch die Biomed GmbH durchgeführt wurde.

### **4.6. MTT-Test**

Das Ausmaß des Zellmetabolismus wurde mit dem 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid Test (MTT), einem gelben Tetrazoliumsalz, verifiziert. Der Nachweis beruht auf der Reduktion des gelben Farbstoffes durch Reduktionsäquivalente der Zellen (NADH und NADPH), die während der Glykolyse entstehen. Das Ausmaß der Reduktion bzw. des daraus folgenden Farbumschlages des Mediums kann mit Hilfe eines Photometers quantifiziert werden.

Ein MTT Test wurde an Tag 1 und 28 durchgeführt. Dazu wurden die Dentinchips mit einer Pinzette in eine neue 24-Well-Platte überführt. Danach wurden je 1 ml neues Zellkulturmedium und 100 µl MTT hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch aus Medium und MTT durch je 400 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) ersetzt. Nach gründlichem Suspendieren wurden je 100 µl des DMSO in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit dem Mikroplattenleser bei 560 nm analysiert.

### **4.7. Färbung der Tartratresistenten Sauren Phosphatase**

Die Tartratresistente Saure Phosphatase (TRAP) ist ein intrazelluläres Enzym, das in Osteoklasten sowie in aktivierten Makrophagen und Neuronen vorkommt. Obwohl die genaue Funktion des Enzyms unbekannt ist, ist es ein wichtiges Leitenzym von Osteoklasten, in denen es im Bürstensaum, in den Lysosomen, als auch in den Zisternen und Vesikeln des Golgi Apparates, lokalisiert ist.

Die TRAP Färbung fand nach 28 Tagen der Osteoklastenkultivierung statt. Dazu wurden die Dentinchips mit einer Pinzette in eine neue 24-Well-Platte transferiert und einmal mit je 500 µl PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit je 500 µl der TRAP-Fixierlösung für 5 Min bei RT fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung wieder abgenommen und die Zellen wurden mit je 500 µl des TRAP Färbepuffers für 20 Min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Färbepuffer abpipettiert und durch Reinstwasser ersetzt. Bis zur Auswertung, die innerhalb der nächsten 48 h erfolgte, wurden die gefärbten Zellen im Kühlschrank aufbewahrt.

Um den Effekt der Oberfläche auf die Osteoklastenzahl zu untersuchen, wurde die Anzahl der Osteoklasten als Zellen mit mindestens drei Zellkernen bestimmt. Hierzu wurden lichtmikroskopisch je drei Gesichtsfelder eines Dentinchips in 10-facher Vergrößerung ausgezählt.

### **4.8. Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie dient der quantitativen Erfassung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Dabei werden die zu analysierenden Zellen durch eine Kapillare gesaugt, wodurch sie einzeln in die sogenannte Durchflusszelle gelangen, in der sie durch Laserlicht angeregt werden. Dort wird zum einen die Lichtstreuung, die mit der Größe (=Vorwärtsstreulicht / Forward Scatter) und der Komplexität (=Seitwärtsstreulicht / Sideward Scatter) der Zellen korreliert, sowie das emittierte Fluoreszenzlicht, der zuvor zur Markierung von Zellbestandteilen eingesetzten Fluorochrome, detektiert.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Osteoklasten mit entsprechenden Antikörpern markiert. Dazu wurden an Tag 28 je zehn Dentinchips auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und zunächst mit 5 ml PBS behandelt um mögliche Reste des Osteoklastenkulturmediums vollständig zu entfernen.

Im Anschluss wurden je 5 ml 2,5 % Trypsin zu den Dentinchips in die Zentrifugenröhrchen gegeben und für 2 Min im 37° Wasserbad inkubiert. Um das Ablösen der Zellen zu unterstützen wurden die Zentrifugenröhrchen während der Inkubationsdauer zweimal behutsam geschüttelt. Danach wurde die Trypsinisierung durch die Zugabe von je 10 ml Zellkulturmedium beendet. Im Anschluss wurden die Zellsuspensionen der zwei Zentrifugenröhrchen vereint und für 5 Min bei 20°C, 280g und aktivierter Bremse zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und die Zellpellets wurden in 100 µl PBS mit 1 % BSA resuspendiert. Anschließend wurde 1 µl des Antikörpers gegen den CalcR dazu gegeben und für 1 h bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation wurden je 1 ml PBS in die Zentrifugenröhrchen pipettiert und für 5 Min bei 20°C, 280g und aktivierter Bremse zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen. Um nicht gebundene Reste des Antikörpers vollständig zu entfernen, wurden die Zellen nach dem gleichen Procedere ein weiteres Mal mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellpellets in 0,5 ml PBS mit 3 % FCS resuspendiert und innerhalb der nächsten Stunde mit dem Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der FlowJo Software Version 10.0.6. (Tree Star, Ashland, USA). Dafür wurde zunächst ein Osteoklastengate anhand der Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellen festgelegt. Die Zellzahl, Anzahl CalcR positiver Zellen, sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurden dann bezogen auf das Osteoklastengate bestimmt. Zur Bestimmung der Autofluoreszenz dienten zudem nicht gefärbte Osteoklasten.

### **4.9. Infinite Fokus Mikroskopie**

Das Infinite Fokus Mikroskop (IFM) ist ein 3D Messgerät, mit dem die Topographie einer Oberfläche im Mikro- und Nano-Bereich untersucht werden kann. Eine solche Vermessung der mineralisierten und demineralisierten Oberfläche sowie des RGD-Peptid beschichteten Dentins diente der Bestimmung der osteoklastären Resorptionsaktivität.

Nach 28 Tag Kultivierung wurden zunächst die Osteoklasten von den Dentinchips gelöst, um im Anschluss die Resorptionslakunen drei-dimensional zu vermessen. Dazu wurde eine Auflösung von 800 nm x 800 nm x 100 nm gewählt. Um eine Verwechslung zwischen Oberflächenrauhigkeit und den Resorptionslakunen zu vermeiden, wurde eine materialspezifische Rauigkeitsausschlussebene (REP) definiert. Diese entsprach jeweils dem Mittelwert des Höhenprofils, der für jede Probe individuell bestimmt wurde, abzüglich zwei Standardabweichungen.

Zur Quantifizierung der Resorption wurden nur Resorptionslakunen, die tiefer als die REP waren, gewertet. Das Ausmaß der Resorption wurde mit Hilfe der Visualisierung der topographischen Oberfläche mit der Image Tool Software 3.0 (UTHSCSA Image Tool, San Antonio, TX, USA) bestimmt. Auf diese Weise wurden das resorbierte Volumen sowie die Tiefe der vermessen Resorptionslakunen quantifiziert.<sup>i</sup>

---

<sup>i</sup> Die Etablierung dieser Methodik erfolgte im Rahmen der Doktorarbeit von Thomas Winkler zum Thema „Die osteochondrale Zone: Strukturelle und zelluläre Untersuchung“ (2011).

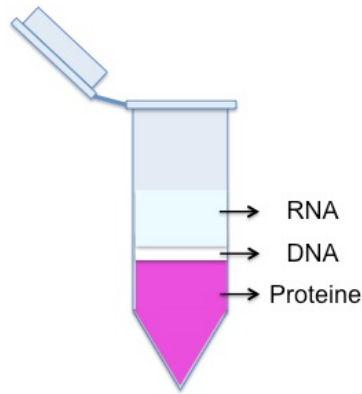
## 4.10. Quantitative Real Time PCR

### 4.10.1. RNA Isolation

Die Isolation der Ribonukleinsäure (RNA) erfolgte gemäß eines etablierten Trizol Protokolls an Tag 3 und an Tag 28 (Tabelle 1). Je Ansatz (n=3) wurden jeweils 10 Dentinchips bzw. Kollagengele verwendet.

Arbeitsschritte	MS / OIV	50 kPa / 2 MPa Kollagengel
<b>Zellyse:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transfer der Dentinchips in 50 ml Zentrifugenröhrchen</li> <li>• Vortex für 1 Min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transfer der Kollagengele in MACS Zentrifugenröhrchen</li> <li>• Zugabe von 2 ml Trizol</li> <li>• Inkubation für 5 Min bei RT</li> <li>• RNA Programm (01.01)</li> </ul>
<b>Phasentrennung:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transfer der Suspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen</li> <li>• Zugabe von 0,4 ml Chloroform</li> <li>• Zentrifugation für 15 Min bei 4°C, 12000g</li> <li>• Transfer der wässrigen, klaren Phase (Abb. 8) in 2 ml Reagenzgefäß</li> </ul>	
<b>RNA-Präzipitation:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zugabe von 1 ml Isopropanol</li> <li>• Inkubation für 10 Min bei RT</li> <li>• Zentrifugation für 10 Min bei 4°C, 12000g</li> <li>• Entfernung des Überstandes</li> </ul>	
<b>Waschen der RNA (2x):</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zugabe von 1 ml 70 % Ethanol</li> <li>• Zentrifugation für 10 Min bei 4°C, 12000g</li> </ul>	
<b>Auflösen der RNA:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trocknen des RNA-Pellets für ca. 10 Min</li> <li>• Resuspension der RNA in 50 µl RNase freiem Wasser</li> </ul>	

**Tabelle 1:** Arbeitsschritte der RNA - Isolation



**Abbildung 8:** Phasentrennung nach Chloroformzugabe. Die obere wässrige Phase enthält RNA, die milchige Interphase Desoxyribonukleinsäure (DNA) und die untere Chloroformphase Proteine.

### 4.10.2. Konzentrationsbestimmung der RNA

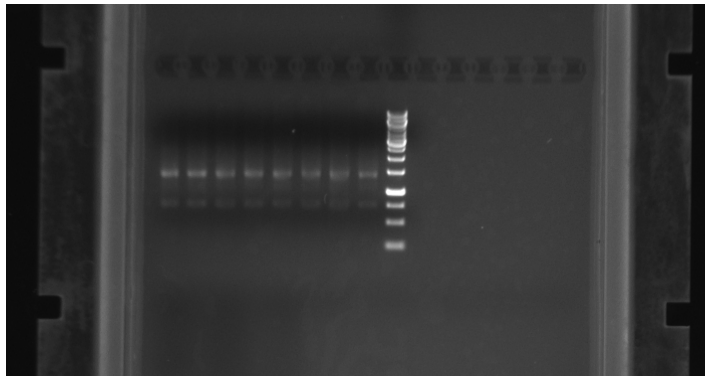
Die RNA Konzentration wurde über die optische Dichte, die durch ein Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde, erfasst. Zusätzlich wurde die Reinheit der RNA durch das Verhältnis der Absorption bei 260/280 nm quantifiziert. Es wurde ein Quotient von 2,0 angestrebt, der die Reinheit der RNA bestätigt.



### 4.10.3. Kontrolle der RNA-Integrität

Um die RNA auf Degradierung zu überprüfen wurden 2 µg der Probe mittels Gelelektrophorese analysiert. Dafür wurde ein 1,2 % Agarosegel mit 7 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die entsprechenden Proben wurden nach dem Zusatz von je 2 µl Ladepuffer bei 75 V aufgetrennt. Dabei wandert die RNA gemäß ihrer negativen Ladung zum Pluspol.

Das Bandenmuster kommt durch die Größenunterschiede der Nukleinsäurestränge und der damit verbundenen Wanderungseigenschaften zustande. Bei intakter RNA sind im Gel zwei deutlich erkennbare Banden, die 28S- und die 18S-Bande ribosomaler RNA zu erkennen. Zur besseren Visualisierung der Banden wurde das Gel anschließend in einer Dunkelkammer mit UV-Licht fotografiert (Abb. 9).



**Abbildung 9:** Die Gelelektrophorese zeigt die Auftrennung der RNA in eine 28S- und eine 18S-Bande. Die zwei gut erkennbaren und voneinander abgrenzbaren Banden sprechen für eine gute Integrität der RNA-Probe.

### 4.10.4. Reverse Transkription

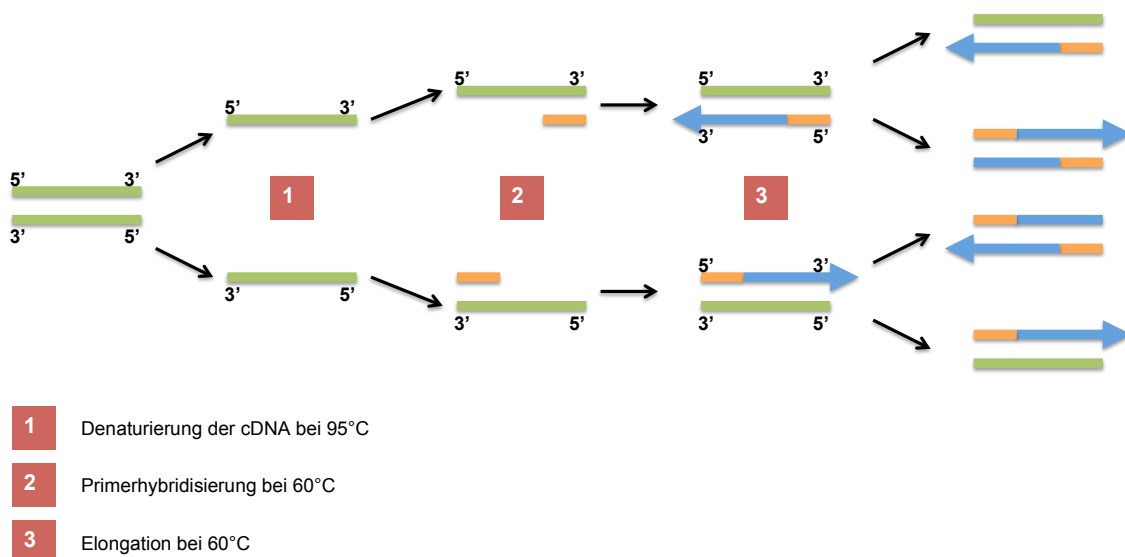
Zur Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) musste die RNA zunächst in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Für jeden PCR Vorgang wurden jeweils 200 ng cDNA der Probe eingesetzt. Dafür wurde eine bestimmte Menge RNA mit 4 µl i-Script RT Supermix versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl adjustiert. Als Kontaminationskontrolle dienten 4 µl i-Script RT Supermix mit 16 µl RNase-freiem Wasser. Die Reverse Transkription erfolgte mit dem iCycler und beinhaltete folgende Reaktionsschritte:

- 5 Min bei 25°C für die Hybridisierung der Oligo-dT-Primer
- 30 Min bei 42°C für die Reverse Transkription
- 5 Min bei 85°C für die Inaktivierung der Reversen Transkriptase

### 4.10.5. Prinzip der Quantitativen Real-Time PCR

Die Methode der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) dient dem Nachweis bestimmter Nukleinsäureabschnitte. Das Prinzip (Abb. 10) beruht auf einer enzymatischen in vitro Amplifikation durch DNA-Polymerasen, die in Anwesenheit von Nukleotiden einen gewünschten DNA-Abschnitt vervielfältigen. Dazu werden kurze Oligonukleotidsequenzen (Primer) benötigt, die nach erfolgter Denaturierung der DNA in zwei Einzelstränge an dessen 3'OH Ende binden und somit den zu vervielfältigenden Abschnitt von beiden Seiten begrenzen. Die DNA-Polymerase beginnt dann am 3'-Ende des angelagerten Primers den entsprechenden Bereich der DNA zu replizieren.

Der Vorteil der qPCR liegt darin, dass die Amplifikation des Ausgangsmaterials in Echtzeit überwacht werden und die Transkriptionsmenge eines Gens quantitativ bestimmt werden kann.



**Abbildung 10:** Schematischer Ablauf einer PCR

### 4.10.6. Detektion der PCR-Produkte

Der Nachweis der entstandenen PCR-Produkte erfolgte über die Messung der Fluoreszenz des zuvor zugegebenen, DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I. Dieser bindet sequenzunabhängig aber spezifisch an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes ist in gelöster Form gering, erhöht sich aber nach Bindung an die DNA. Dementsprechend führt die Amplifikation der DNA ebenfalls zu einem Anstieg der Fluoreszenz, die direkt

## 4 Methoden

proportional zur Konzentration des neu gebildeten PCR-Produktes ist und durch die optische Detektionseinheit des iCyclers erfasst wird. Dieser ordnet jeder Probe einen Cycle Threshold (Ct-Wert) zu, der dem Zyklus entspricht an dem die Fluoreszenz erstmals über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Dabei ist der Ct-Wert der Zyklus, bei dem die PCR-Amplifikation in die exponentielle Phase eintritt und kann als zuverlässig proportional zur Ausgangskonzentration angesehen werden.

### 4.10.7. Primeretablierung

Folgende Primer wurden für diese Arbeit etabliert:

Gen	Sequenz (5'→3')	Produktgröße
28S rRNA	Vorwärts: CGG TTT CGC GAG CGC GTT G Rückwärts: ATA GCC GCA ACC GGA CCC TGG	284 bp
CalcR	Vorwärts: TGC CAC TGC CTT TCA GAA GTG ATT T Rückwärts: TCA CAT TTG TAC CAC AGC TGC CAG A	271 bp
CatK	Vorwärts: CTT TGC TCT GTA CCC TGA GGA GAT Rückwärts: TGT TAT ATT GCT TCC TGT GGG TCT T	77 bp
TROP2	Vorwärts: TGG CCT ACC CGA GGA GAA GAG GA Rückwärts: CGT TCA GGC AGC TGA AAC AGG CT	126 bp
CD207	Vorwärts: TGG CAC CCA GCC TCC CTT CT Rückwärts: GGA GGA GGT GCC GGA GAG GT	112 bp
CDC42	Vorwärts: GCT GGT GTC GGC ATC ATA CT Rückwärts: TAT GGG CCT TGT CTC ACA CG	129 bp
RhoA	Vorwärts: TTG TTG GCA TAG CTC TGG GG Rückwärts: GCT GCA TGA ACT TGG GCT TT	72 bp
ROCK1	Vorwärts: AGG TGC TGC CTT TTT GGA TT Rückwärts: AGT GAT GGC TGT TCC ACT TGA	114 bp

**Tabelle 2:** Verwendete Primer

Hierzu wurde zunächst für jeden Primer die optimale Temperatur, bei welcher die spezifische Anlagerung an die cDNA stattfindet, bestimmt. Um diese zu erhalten wurde eine qPCR mit einem Temperaturgradienten, bestehend aus 8 verschiedenen Temperaturen, durchgeführt. Im Anschluss wurde die Schmelzkurve der entstandenen Amplifikate, die für spezifische Produkte nur einen Peak anzeigen sollte, geprüft.

Außerdem erfolgte eine Gelelektrophorese, um mit Hilfe eines Längenstandards zu überprüfen, ob die Länge des entstandenen Amplifikats der vom Hersteller angegebenen Produktlänge entsprach. Ein sehr gutes Ergebnis konnte für alle eingesetzten Primer bei 60°C erzielt werden, so dass die PCR-Bedingungen (siehe 4.9.8.) dementsprechend ausgelegt wurden. Für die Gelelektrophorese der qPCR Produkte wurde ein 0,8 % Agarosegel mit 7 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die entsprechenden Proben wurden nach dem Zusatz von je 2 µl Ladepuffer bei 75 V aufgetrennt. Zusätzlich diente ein 100 Basenpaare (bp) Längenstandard dem späteren Vergleich mit den Banden der qPCR Produkte.

Des Weiteren wurde die Effizienz für jeden Primer bestimmt. Dazu wurden qPCR Durchläufe mit Verdünnungsreihen bekannter cDNA Konzentrationen einer Probe, die das zu untersuchende Gen möglichst stark exprimiert, durchgeführt. Anschließend wurden die resultierenden Ct-Werte gegen die jeweilige cDNA Konzentration aufgetragen um eine Regressionsgerade zu berechnen. Dabei entspricht die Steigung der berechneten Geraden der Effizienz des Primers.

Es wurden mindestens drei Effizienzkurven für jeden Primer durchgeführt, wobei eine Effizienz von -3,6 bis -3,1 als Voraussetzung für die Verwendung des Primers festgelegt wurde.

### 4.10.8. Reaktionsprotokoll der qPCR

Die qPCR wurde mit dem iCycler durchgeführt. Es wurde ein Reaktionsvolumen von 20 µl, das folgende Reagenzien enthielt, eingesetzt:

- 10 µl SYBR I
- 4 µl RNase freies Wasser
- 2 µl Primer „Vorwärts“ (2,5 µM)
- 2 µl Primer „Rückwärts“ (2,5 µM)
- 2 µl cDNA

## 4 Methoden

---

Für jede Probe wurden drei Ansätze je qPCR Durchlauf pipettiert.

Die Reaktionsbedingungen des qPCR Vorganges waren wie folgt:

- 1 Zyklus: Initiale Denaturierung für 2 Min bei 98°C
- 40 Zyklen: Denaturierung für 10 sec bei 95°C  
Primerhybridisierung und Elongation für 30 sec bei 60°C
- 80 Zyklen: Schmelzkurvenanalyse je 6 sec bei 65-95°C (0,5°C Schritte)

Nach 4 wöchiger Zellkultur der Osteoklasten auf der mineralisierten und der demineralisierten Oberfläche wurden die Genexpression des Calcitonin Rezeptors (CalcR), Cathepsin K (CatK), Langerin (CD207) und des Tumor assoziierten Kalzium Signalvermittlers 2 (TROP2) analysiert. An Tag 3 hingegen fand die Untersuchung der Genexpression der Rho GTPase A (RhoA), der Rho assoziierten Proteinkinase 1 (ROCK1) und des Zellteilungs-Kontrollproteins (CDC42) von den Zellen auf der mineralisierten (MS) und demineralisierten Oberfläche (OIV) sowie den 50 kPa und 2 MPa Kollagengelen statt.

### 4.10.9. Auswertung der qPCR Ergebnisse

Die Ergebnisse der qPCR wurden nach der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet. Dazu wurde zunächst der Mittelwert der Ct-Werte der drei Ansätze jeder Probe berechnet. Anschließend erfolgte die Berechnung des  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes nach folgenden Formeln:

$$\Delta\text{Ct-Wert} = \text{Ct-Wert}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct-Wert}_{\text{Referenzgen (28S rRNA)}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct-Wert} = \Delta\text{Ct-Wert}_{\text{Probe}} - \Delta\text{Ct-Wert}_{\text{Kontrolle}}$$

*OIV, 50 kPa und 2 MPa Kollagengel*

*MS*

$$\text{n-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct-Wert}}$$

Zur besseren Darstellung sowie für die statistische Auswertung wurde außerdem die n-fache Expression des Gens für jede Oberfläche relativ zur Expression des Referenzgens 28S rRNA berechnet.

$$\text{n-fache Expression relativ zu 28S rRNA} = 2^{-\Delta\text{Ct-Wert}}$$

### 4.11. Immunhistochemie von Hautschnitten

#### 4.11.1. Fixierung

Die verwendete humane Haut entstammte von Patienten, die sich einer Face Lift Operation unterzogen hatten. Die Hautschnitte wurden in einer Petrischale zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 1 cm x 1 cm große Schnitte mit einem Einwegskalpell angefertigt und in Biopsiekassetten überführt. Zur Fixierung wurden die Biopsiekassetten für 24 h in 3,5 - 3,7 % Formaldehyd aufbewahrt.

#### 4.11.2. Entwässerung

Die Entwässerung der fixierten Hautschnitte wurde vom Pathologischen Institut am Klinikum Rechts der Isar durchgeführt.

#### 4.11.3. Paraffineinbettung

Nach der Entwässerung wurden die Hautbiopsien zur weiteren Verarbeitung in Paraffin eingebettet.

#### 4.11.4. Schnittherstellung

Aus den gegossenen Paraffinblöcken wurden mit dem Mikrotom 7 µm große Schnitte hergestellt. Um eine Faltenbildung zu vermeiden wurden die angefertigten Schnitte in einem 37°C warmen Wasserbad gestreckt und danach auf Objektträger aufgezogen. Die Hautschnitte wurden für mindestens eine Woche bei RT getrocknet bevor die Antikörperfärbung durchgeführt wurde.

#### 4.11.5. Antikörperfärbung

Vor der Durchführung der Antikörperfärbung mussten die Schnitte zunächst deparaffinisiert werden. Dazu wurden die Objektträger mit den entsprechenden Hautschnitten in einer Küvette, mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), das vorher 1:10 mit PBS verdünnt wurde, in der Mikrowelle bei 560 Watt für 2 Min erhitzt. Anschließend wurden die Schnitte in der EDTA Lösung für 20 Min bei RT abgekühlt. Danach wurden die Objektträger aus der Küvette genommen und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Hierbei wurden jeweils 300 µl destillierten Wassers

## 4 Methoden

---

mit einer Pipette vorsichtig auf die Hautschnitte pipettiert und wieder abgenommen. Nach der gleichen Vorgehensweise folgten zwei Waschschrirte mit PBS.

Im Anschluss wurde jeweils ein Objektträger in eine mit feuchtem Krepppapier ausgelegte Petrischale überführt. Außerdem wurde der Hautschnitt mit einem Immersionsmarker umkreist, der durch seine Hydrophobizität ein Verlaufen des Antikörpers verhindert.

Danach wurden die Hautschnitte mit jeweils 100  $\mu$ l 10 % BSA Lösung für 1 h bei RT blockiert. Die Blockierung dient der Absättigung freier Bindungsstellen, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Daran anschließend erfolgte die Inkubation des ersten gegen TROP2 gerichteten Antikörpers, der zuvor 1:200 in PBS verdünnt wurde, für 15-18 h bei 4°C. Bevor am nächsten Tag der zweite Antikörper auf den Schnitt pipettiert wurde, wurden 5 Waschschrirte mit PBS durchgeführt, um die Reste des ersten Antikörpers vollständig zu entfernen. Der Fluoreszenz markierte Antikörper (Ziege Anti-Maus IgG, Alexa Fluor 568) wurde 1:1000 in PBS verdünnt, für 1 h bei 37°C inkubiert. Das gleiche Procedere erfolgte für die Färbung von CD207 bzw. dem zugehörigen Fluoreszenz markierten Antikörper (Ziege Anti-Hase IgG, Alexa Fluor 488).

Zuletzt wurde der Hautschnitt mit 10  $\mu$ l 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) und einem Deckgläschen bedeckt. Um ein Austrocknen des Hautschnittes zu verhindern, wurden die Kanten des Deckgläschens zusätzlich mit Nagellack versiegelt.

Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung des zweiten Antikörpers dienten Hautschnitte, die lediglich mit dem zweiten Antikörper inkubiert wurden.

Die Auswertung der Hautschnitte erfolgte am folgenden Tag am Mikroskop.

### **4.12. TROP2 Färbung**

Die Färbung von TROP2 erfolgte an 28 Tagen kultivierten Osteoklasten auf mineralisierter (MS) und demineralisierter Oberfläche (OIV). Dazu wurden die Osteoklasten zunächst mit 3,5 - 3,7 % Formaldehyd für 15 Min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen mit 10 % BSA Lösung für eine Stunde bei RT inkubiert. Daran anschließend erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers gegen TROP2, der zuvor 1:200 in PBS verdünnt wurde, für 15-18 h bei 4°C. Am nächsten Tag wurden zunächst 5 Waschschrirte mit PBS durchgeführt um Reste des ersten Antikörpers vollständig zu entfernen. Danach erfolgte die Inkubation des zweiten Fluoreszenz markierten Antikörpers (Ziege Anti-Maus IgG, Alexa Fluor 568), der 1:1000 in PBS verdünnt

wurde, für 1 h bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen wiederum gründlich mit PBS gewaschen bevor die Zellkerne mit DAPI gefärbt wurden. Zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung des zweiten Antikörpers dienten Osteoklasten, die lediglich mit dem zweiten Antikörper inkubiert wurden.

Zur Auswertung wurden die Osteoklasten unter dem Mikroskop betrachtet.

### **4.13. Statistik**

Die Histomorphometrie der Knochenbiopsien, die Analyse der Goldner-Trichrom gefärbten Dentinchips sowie die IFM Aufnahmen erfolgten jeweils mit drei unterschiedlichen Proben, so dass am Ende Mittelwert und Standardabweichung gebildet werden konnten. In die Auswertung der RKM Messungen wurden ebenfalls die Datensätze drei verschiedener Proben einbezogen, es wurde jedoch ein Modus mit entsprechender Standardabweichung gebildet.

Die Bestimmung der Osteoklastenzahl, des Zellmetabolismus, der Genexpression sowie die durchflusszytometrische Analyse wurden ebenfalls dreimal mit verschiedenen Ansätzen wiederholt. Daran anschließend erfolgte die statistische Auswertung mit Hilfe der Sigma Plot Software. Mittelwert, Standardabweichung sowie zweiseitiger unabhängiger Student's t-test dienten der Berechnung des P-Wertes. Für die statistische Auswertung der Mechanotransduktionsgene wurde ein paarweiser Vergleich der Gruppe mittels Tukey Test, durchgeführt.

Ein P-Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

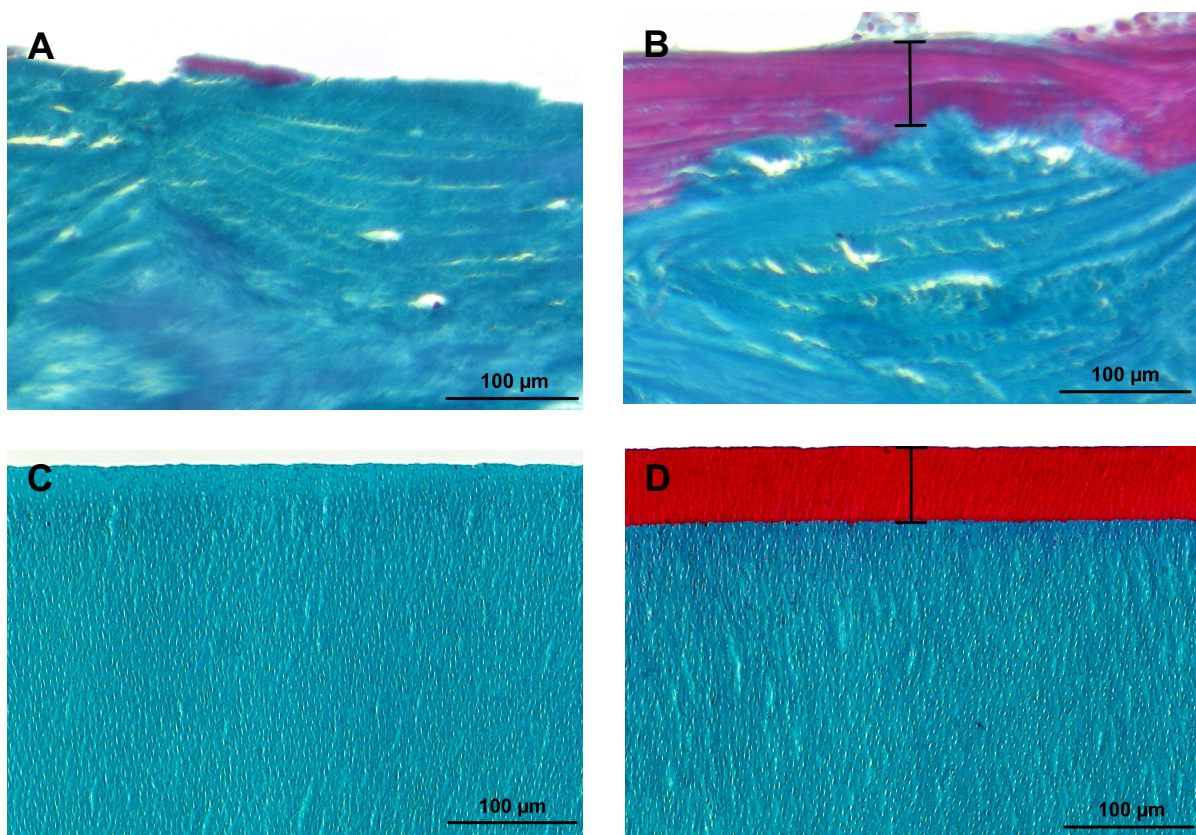


### 5. Ergebnisse

#### 5.1. Vergleich von Osteoidsaum und demineralisierter Oberfläche

Die Histomorphometrie der Knochenbiospien von Osteomalazie Patienten zeigte einen Osteoidsaum von  $57,8 \pm 6,9 \mu\text{m}$ .

Durch die standardisierte Demineralisierung des Dentins konnten wir eine ganz ähnliche Demineralisierungszone nachbilden, die nach Masson-Goldner-Trichrom Färbung eine Tiefe von  $56,4 \pm 1,0 \mu\text{m}$  zeigte (Abb. 11).



**Abbildung 11:** Lichtmikroskopische Aufnahmen (200-fache Vergrößerung) der Masson-Goldner-Trichrom gefärbten Knochenbiospien von gesunden (A) und von Osteomalazie Patienten (B). Der sich in rot darstellende Osteoidsaum wurde mit einem schwarzen Balken markiert. Lichtmikroskopische Aufnahmen (200-fache Vergrößerung) der Masson-Goldner-Trichrom gefärbten mineralisierten (C) und demineralisierten Oberfläche / Osteomalazie *in vitro* (D).

## 5 Ergebnisse

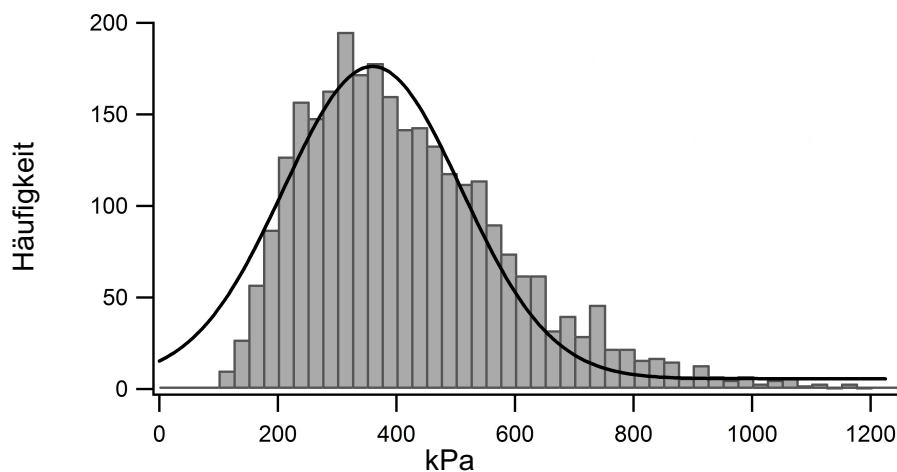
Oberfläche	Mittelwert Tiefe ( $\mu\text{m}$ )	Standardabweichung ( $\mu\text{m}$ )
Osteoidsaum	57,8	$\pm 6,9$
Osteomalazie <i>in vitro</i>	56,4	$\pm 1,0$

**Tabelle 3:** Gegenüberstellung der Tiefe des Osteoidsaums und der nahezu übereinstimmenden Tiefe der mittels Demineralisierung entstandenen Demineralisierungszone (= Osteomalazie *in vitro*).

### 5.2. Mikromechanik der Oberfläche

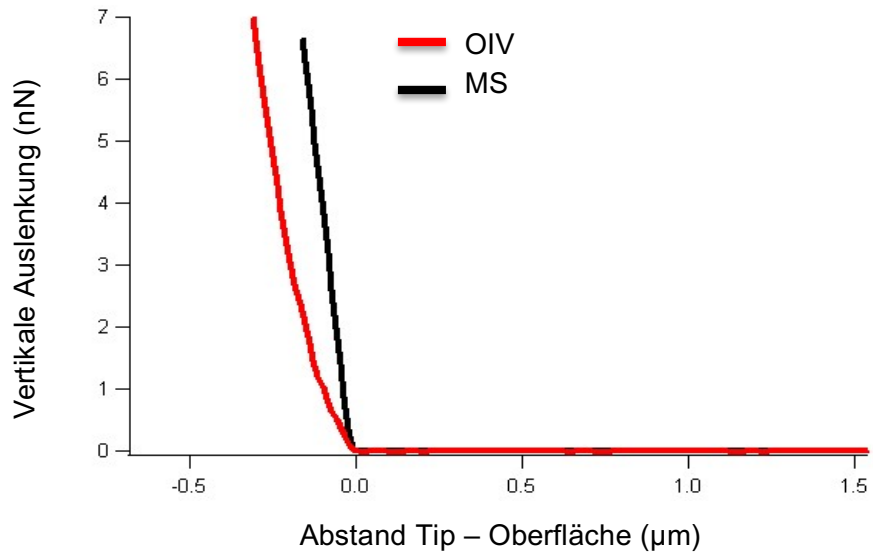
Es ist bekannt, dass die Mikromechanik eine große Rolle im Rahmen der Interaktion zwischen Zellen und ihrer Umgebung spielt. Vor diesem Hintergrund und der Kenntnis, dass eine Osteomalazie zu einem niedrigeren E-modul des Knochens führt (Anumula, Magland et al. 2008), wurde der E-modul des Osteomalazie *in vitro* (OIV) Modells mittels RKM bestimmt.

Der E-modul von OIV belief sich auf  $366 \pm 4,3$  kPa (Abb. 12). Der Vergleich einer repräsentativen Kraft-Abstands-Kurve des OIV Modells und der mineralisierten Oberfläche (MS) zeigt einen deutlich flacheren Verlauf der OIV Kurve, was durch den niedrigeren E-modul bestätigt wird (Abb. 13). Für unbehandeltes Dentin, das der mineralisierten Oberfläche (MS) entspricht, wird in der Literatur ein, mittels Nanoindentierung gemessener E-Modul, zwischen 18-20 GPa angegeben (Ho, Balooch et al. 2004, Bertassoni and Marshall 2009, Pugach, Strother et al. 2009). Demzufolge führt die Demineralisierung des Dentins zu einem nahezu 100.000-fachen Unterschied (Tabelle 4).



**Abbildung 12:** Das Histogramm zeigt die Häufigkeitsverteilung der gemessenen E-module. Ein Gauss-Fit wurde verwendet um das Maximum zu bestimmen.

## 5 Ergebnisse



**Abbildung 13:** Die gemeinsame Darstellung der Kraft-Abstands-Kurven von MS und OIV verdeutlicht den niedrigeren E-modul des OIV Modells, da bei gleicher Kraft (y-Achse) die Oberfläche eine größere Eindringtiefe (x-Achse) erlaubt. Die Kurve von MS hingegen zeigt nahezu einen geraden Verlauf, der durch den hohen E-modul von Dentin erklärt werden kann.

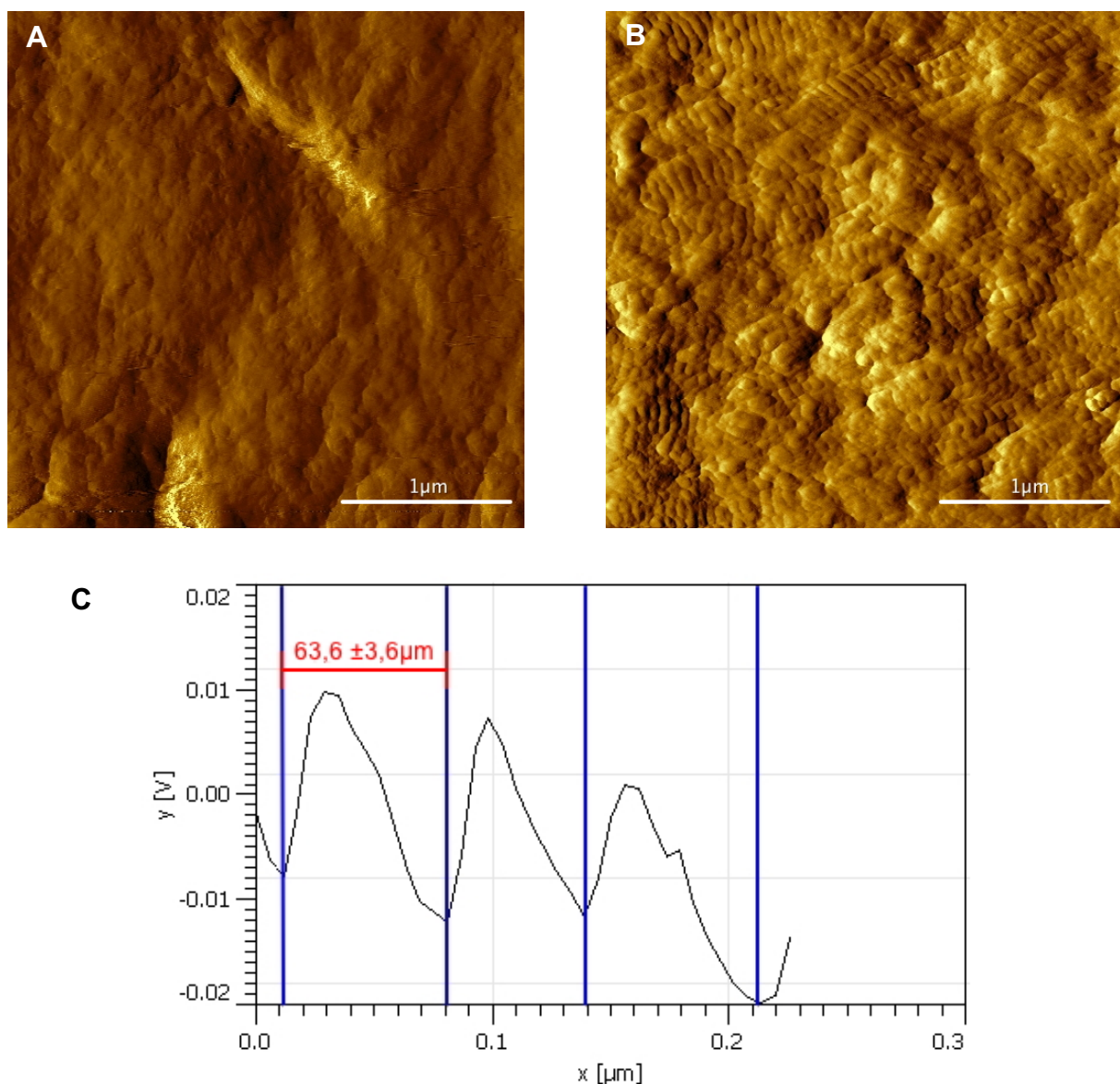
	E-modul (kPa)	Standardabweichung (kPa)
Dentin	$2 \times 10^6$	$\pm 1,9 \times 10^6$
Osteomalazie <i>in vitro</i>	366	$\pm 4,3$

**Tabelle 4:** Die Tabelle soll den nahezu 100.000-fachen Unterschied im E-modul zwischen dem vermessenen OIV Modell und einem Literaturwert für Dentin verdeutlichen.

## 5 Ergebnisse

Außerdem spiegeln die RKM Aufnahmen von MS und OIV (Abb. 14 A, B) eine unterschiedliche Oberflächenstruktur wieder.

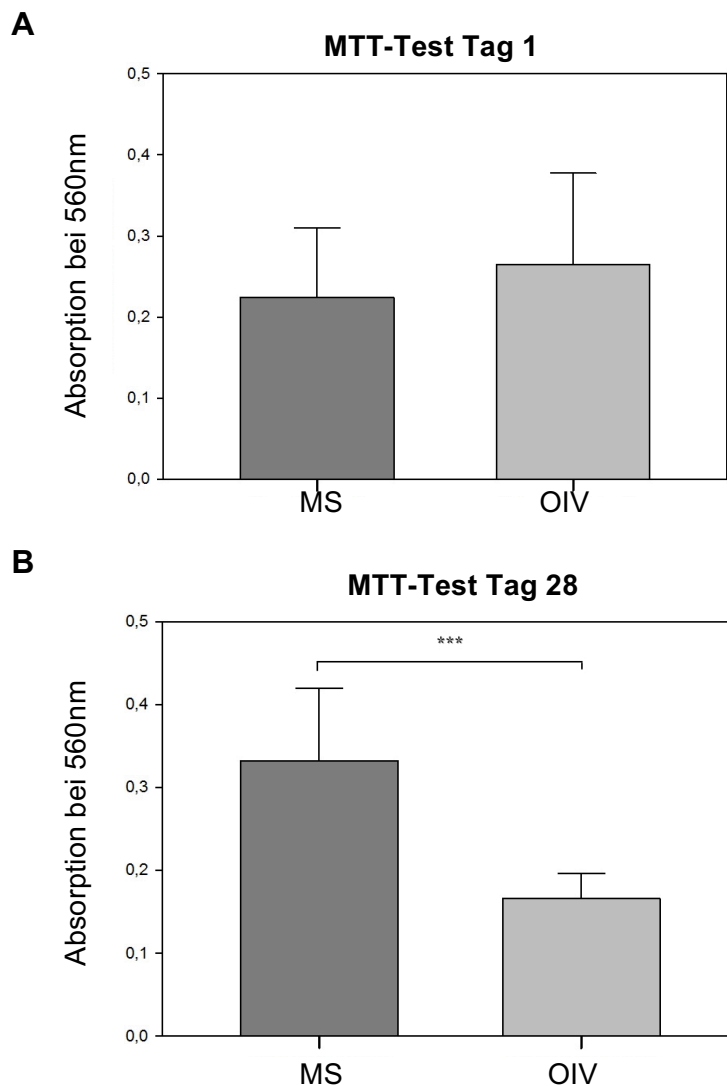
In diesem Zusammenhang zeigt das OIV Modell viele streifige Strukturen, die vermuten lassen, dass es sich hierbei um die typische periodische Querstreifung einzelner Kollagenmoleküle in einer Kollagenfibrille handelt. Die Profilometer Vermessung dieser ergab einen Bandenabstand von  $63,6 \pm 3,6 \mu\text{m}$ , der in etwa einer D-Band Periode und somit der Länge eines Kollagenmoleküls entspricht und die Freilegung des Kollagennetzwerkes durch die Demineralisierung bestätigt (Abb. 14 C).



**Abbildung 14:** RKM Bilder ( $10 \times 10 \mu\text{m}$ , vertikale Auslenkung) von MS (A) und OIV (B). Die Graphik (C) zeigt jeweils den Abstand (x-Achse) drei vermessener Kollagenmoleküle einer Kollagenfibrille. Auf der y-Achse wird die vertikale Auslenkung des Cantilvers dargestellt.

### 5.3. Auswirkung auf den Zellmetabolismus

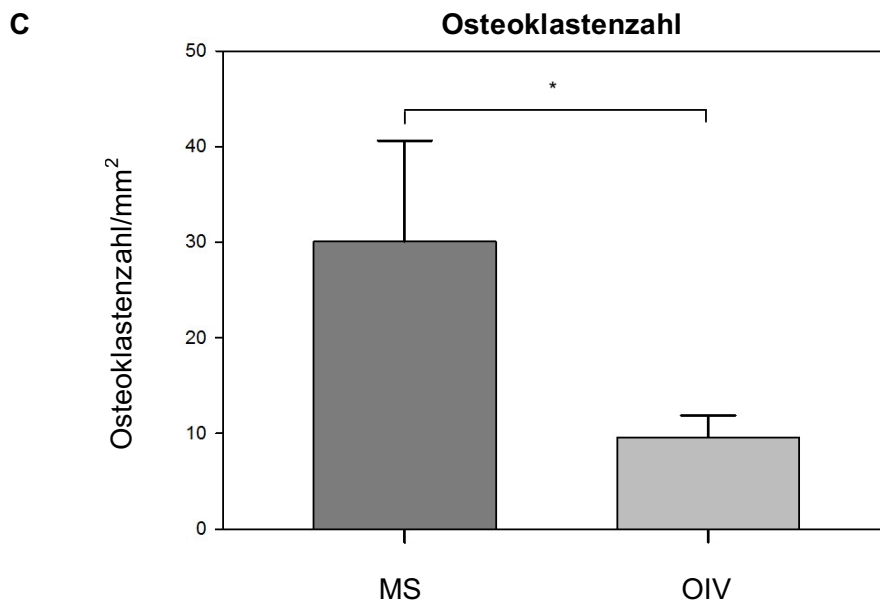
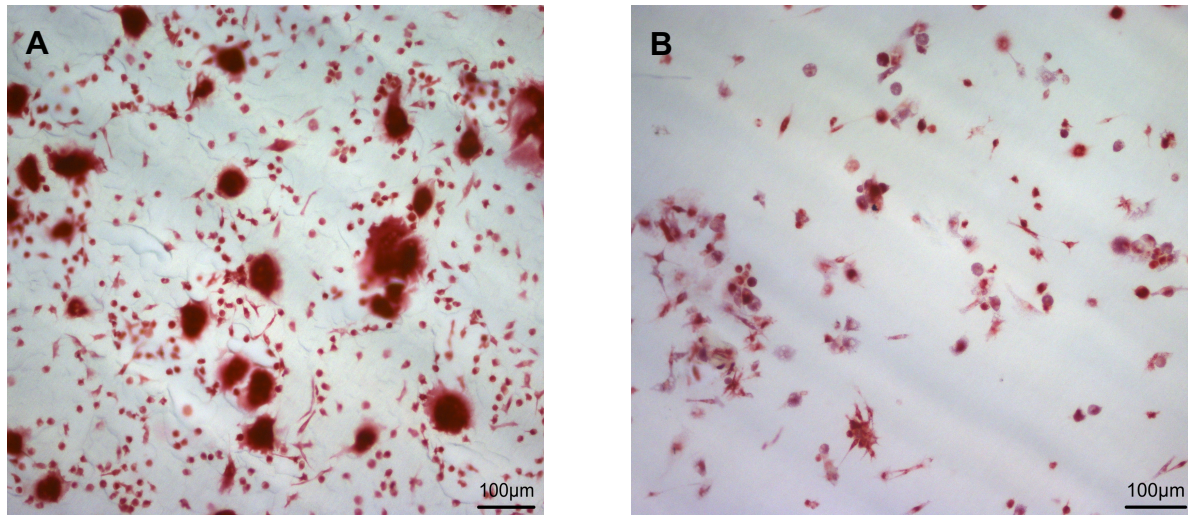
Die Ergebnisse des MTT-Tests zeigen an Tag 1 keinen Unterschied bezüglich des Metabolismus der Zellen auf OIV und MS (Abb. 15 A, MS =  $0,22 \pm 0,08$  vs. OIV =  $0,26 \pm 0,11$ ,  $P = 0,33$ ). An Tag 28 kommt es jedoch zu einem signifikant reduzierten Stoffwechsel in den Zellen auf OIV (Abb. 15 B, MS =  $0,33 \pm 0,08$  vs. OIV =  $0,16 \pm 0,03$ ,  $P < 0,001$ ). Die Zellen auf MS hingegen zeigen nach 28 Tagen einen erhöhten Zellstoffwechsel (Tag 1 =  $0,22 \pm 0,08$  vs. Tag 28 =  $0,33 \pm 0,08$ ,  $P = 0,006$ ).



**Abbildung 15:** MTT-Test an Tag 1 (A) und Tag 28 (B) zeigen einen um ca. die Hälfte reduzierten Zellmetabolismus in den Zellen auf OIV an Tag 28. (\*\* $P < 0,001$ )

### 5.4. Auswirkung auf die Osteoklastenzahl

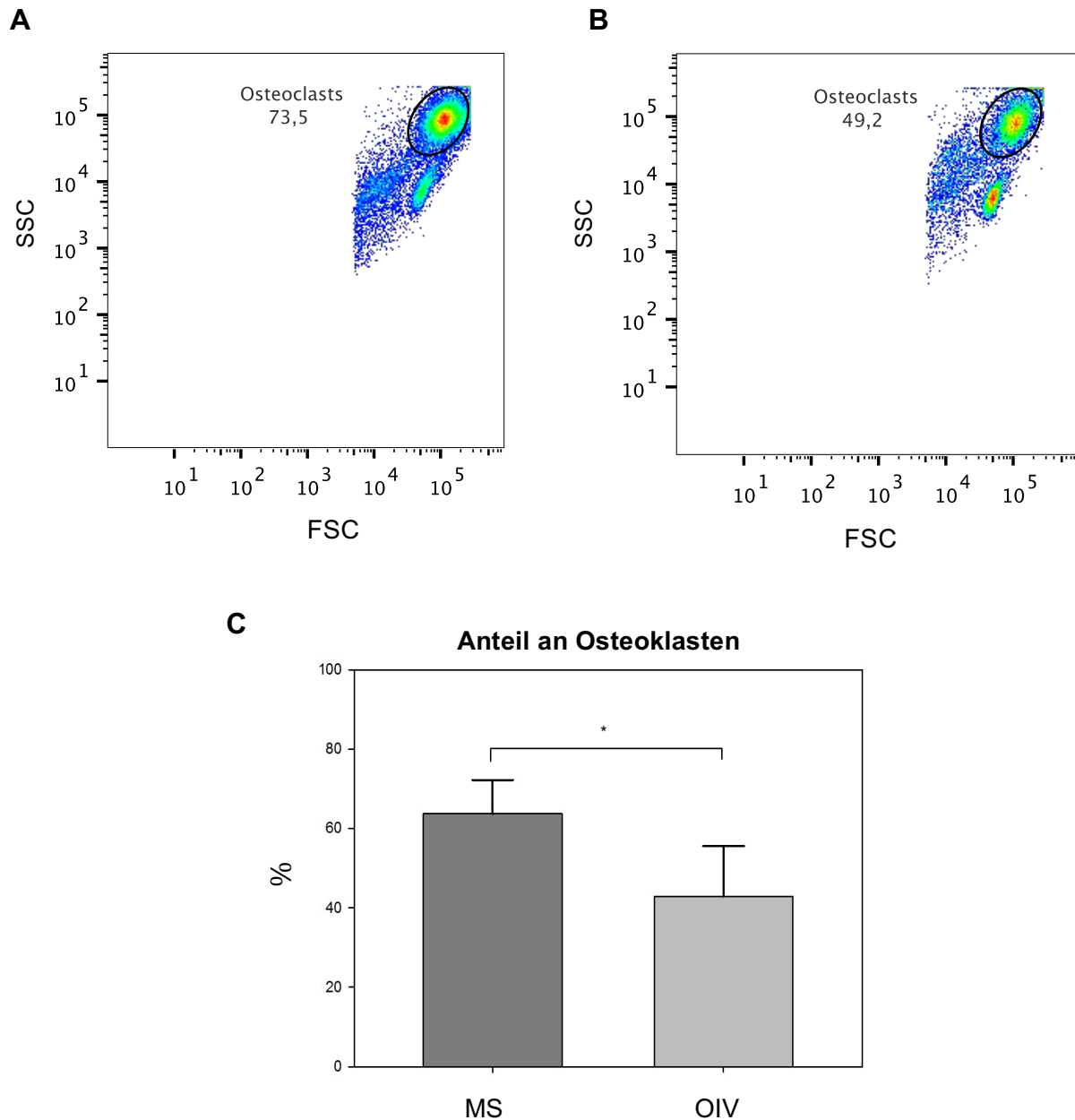
Nach 28 Tagen konnte eine signifikante Reduktion der Osteoklastenzahl beobachtet werden (Abb. 16). Die Zahl der Osteoklasten auf OIV verringerte sich um 2/3 im Vergleich zu MS (Abb. 16 C, MS =  $30,08 \pm 8,60$  vs. OIV =  $9,59 \pm 1,88$ ,  $P = 0,03$ ).



**Abbildung 16:** Lichtmikroskopische Aufnahmen (100-fache Vergrößerung) der TRAP Färbungen an Tag 28 (A = MS, B = OIV). Das Balkendiagramm (C) verdeutlicht die signifikante Reduktion der Osteoklastenzahl auf OIV. (\* $P < 0,05$ )

### 5.5. Auswirkung auf den Anteil CalcR positiver Zellen

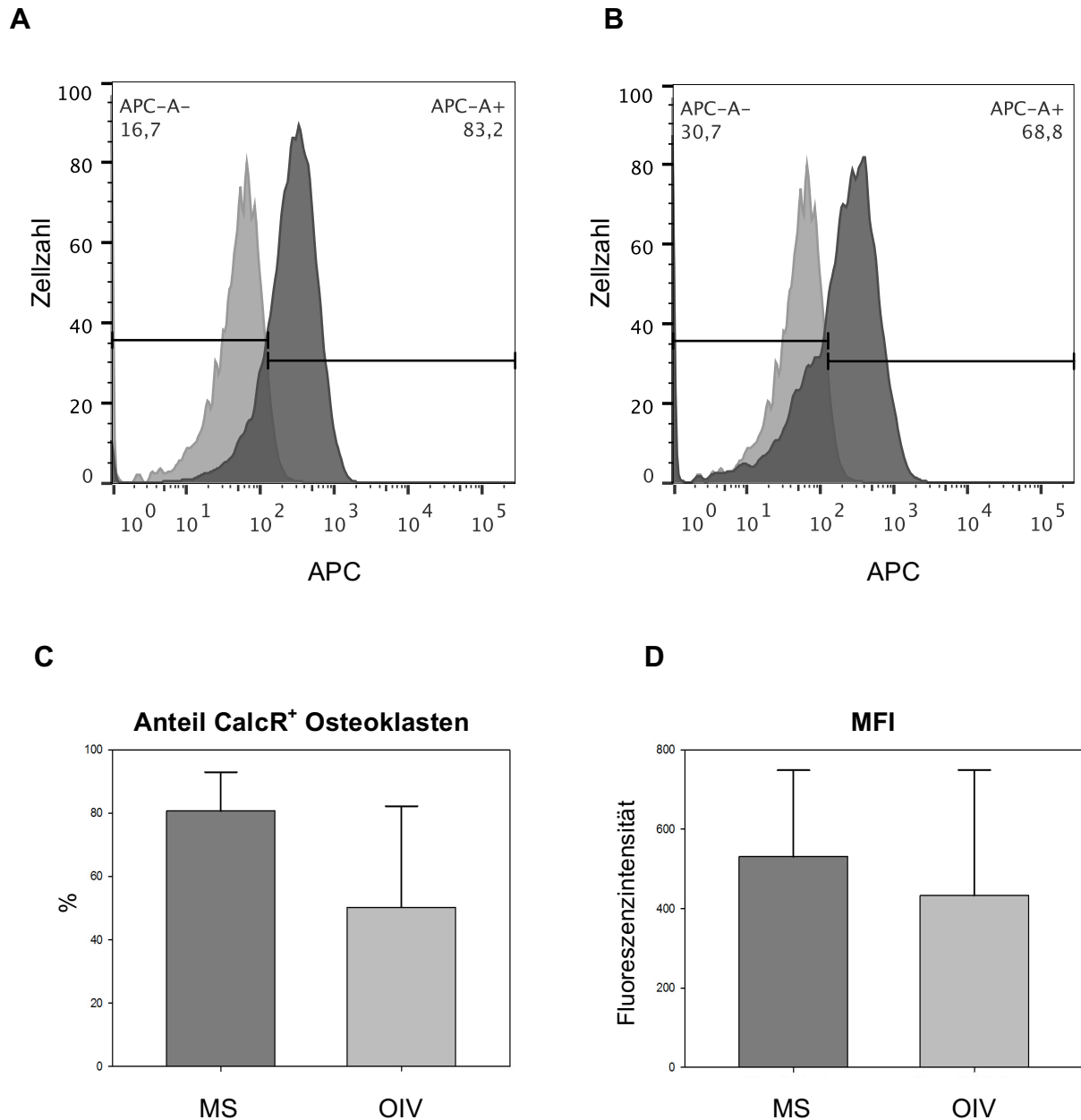
Die FACS Ergebnisse bestätigen eine reduzierte Osteoklastenzahl nach 28-tägiger Kultivierung auf dem OIV Modell (Abb. 17; MS = 52,81 ± 21,58 % vs. OIV = 29,32 ± 18,47 %, P = 0,049).



**Abbildung 17:** Repräsentative Pseudo-colour dotplots von MS (A) und OIV (B) zeigen den prozentualen Anteil der Osteoklasten an der Gesamtzellzahl. Das Gating erfolgte anhand der Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellen. Das Balkendiagramm (C) veranschaulicht die verminderte Osteoklastenzahl auf OIV (\*P < 0,05).

## 5 Ergebnisse

Es konnte jedoch weder im Anteil CalcR positiver Osteoklasten (Abb. 18 C, MS = 66,55 ± 27,41 % vs. OIV = 39,61 ± 23,66 %, P = 0,072) noch mittels des berechneten MFI (Abb.18 D, MS = 472,07 ± 172,42 vs. OIV = 368,99 ± 202,01, P = 0,325) ein signifikanter Unterschied zwischen MS und OIV festgestellt werden.

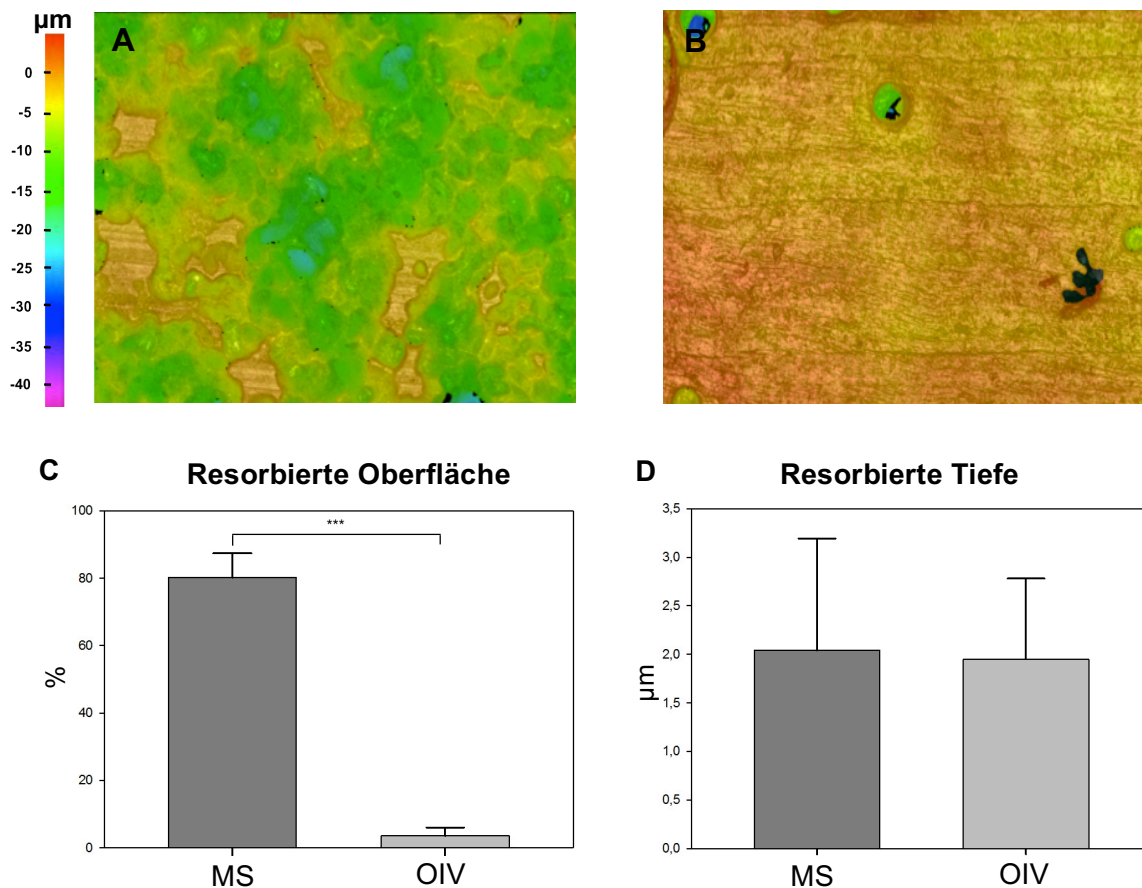


**Abbildung 18:** Die Histogramme (A = MS, B = OIV) zeigen den Anteil CalcR<sup>+</sup> Osteoklasten im vorher festgelegten Osteoklastengate im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle. Balkendiagramme für den Anteil CalcR<sup>+</sup> Osteoklasten (C) und den MFI (D) veranschaulichen die Beobachtung, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Osteoklasten auf MS und OIV hinsichtlich der Expression des CalcR erkennbar ist.



## 5.6. Auswirkung auf die Resorptionsaktivität

Um die Funktionsfähigkeit der differenzierten Osteoklasten zu betrachten, wurde das Ausmaß ihrer Resorptionsaktivität mittels IFM analysiert (Abb. 19 A, B). Die zweidimensionalen Aufnahmen der unterschiedlichen Oberflächen zeigen auf MS viele in grün dargestellte und dementsprechend zwischen 5-20  $\mu\text{m}$  tiefe Resorptionslakunen. Im Gegensatz dazu lassen sich auf dem OIV Modell nur wenige Resorptionslakunen finden. Das Ergebnis der Vermessungen bestätigt, dass 80 % der mineralisierten Oberfläche resorbiert wurden und lediglich 4 % auf OIV. (Abb. 19 C, MS =  $80,15 \pm 7,22$  % vs. OIV =  $3,54 \pm 2,47$  %;  $P < 0,001$ ). Die Vermessung der einzelnen Lakunen zeigte jedoch keinen Unterschied bezüglich der Resorptionstiefe zwischen beiden Oberflächen (Abb. 19 D, MS =  $2,04 \pm 1,15$   $\mu\text{m}$  vs. OIV =  $1,95 \pm 0,83$   $\mu\text{m}$ ;  $P = 0,896$ ).<sup>i</sup>



**Abbildung 19:** IFM Aufnahmen von MS (A) und OIV (B). Die Balkendiagramme zeigen den Anteil der resorbierten Oberfläche an der Gesamtoberfläche (C), sowie die Tiefe (D) der einzelnen Resorptionslakunen. (\*\*\*) $P < 0,001$ )

<sup>i</sup> Diese Ergebnisse sind im Rahmen der Doktorarbeit von Thomas Winkler zum Thema „Die osteochondrale Zone: Strukturelle und zelluläre Untersuchung“ (2011) entstanden.

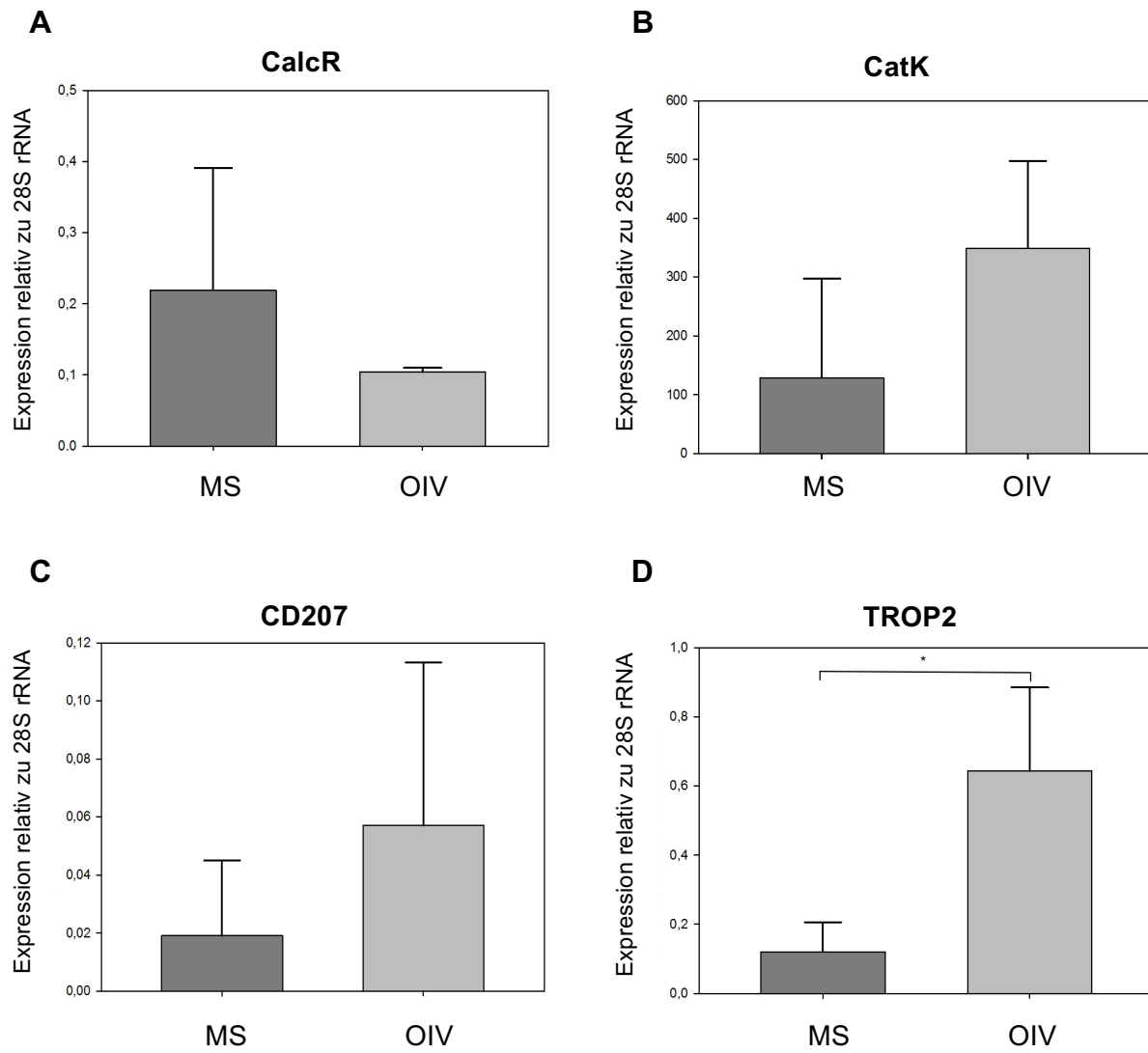
### 5.7. Auswirkung auf die Genexpression

Um eine Erklärung für die beobachteten Auswirkungen auf Zellmetabolismus, Osteoklastenzahl und Resorptionsaktivität zu finden, untersuchten wir die Genexpression des CalcR und von CatK. Es konnte jedoch weder für den CalcR (Abb. 20 A, MS =  $0,21 \pm 0,14$  vs. OIV =  $0,10 \pm 0,01$ ) noch für CatK (Abb. 20 B, MS =  $128,40 \pm 137,85$  vs. OIV =  $348,70 \pm 121,44$ ) ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Expressionslevels auf den unterschiedlichen Oberflächen festgestellt werden.

Ein mRNA Microarray deutete daraufhin, dass es sich bei den am stärksten hochregulierten Genen um TROP2 und CD207 handelt.

Um das Ergebnis des Microarrays zu bestätigen, wurden zusätzliche qPCR Analysen durchgeführt. Diese zeigten keine signifikant erhöhte Expression von CD207 (Abb. 20 C, MS =  $0,02 \pm 0,02$  vs. OIV =  $0,06 \pm 0,05$ ), bestätigten jedoch eine 5-fache Hochregulierung der TROP2 Expression von den Zellen auf OIV (Abb. 20 D, MS =  $0,12 \pm 0,07$  vs. OIV =  $0,64 \pm 0,20$ ; P = 0,02).

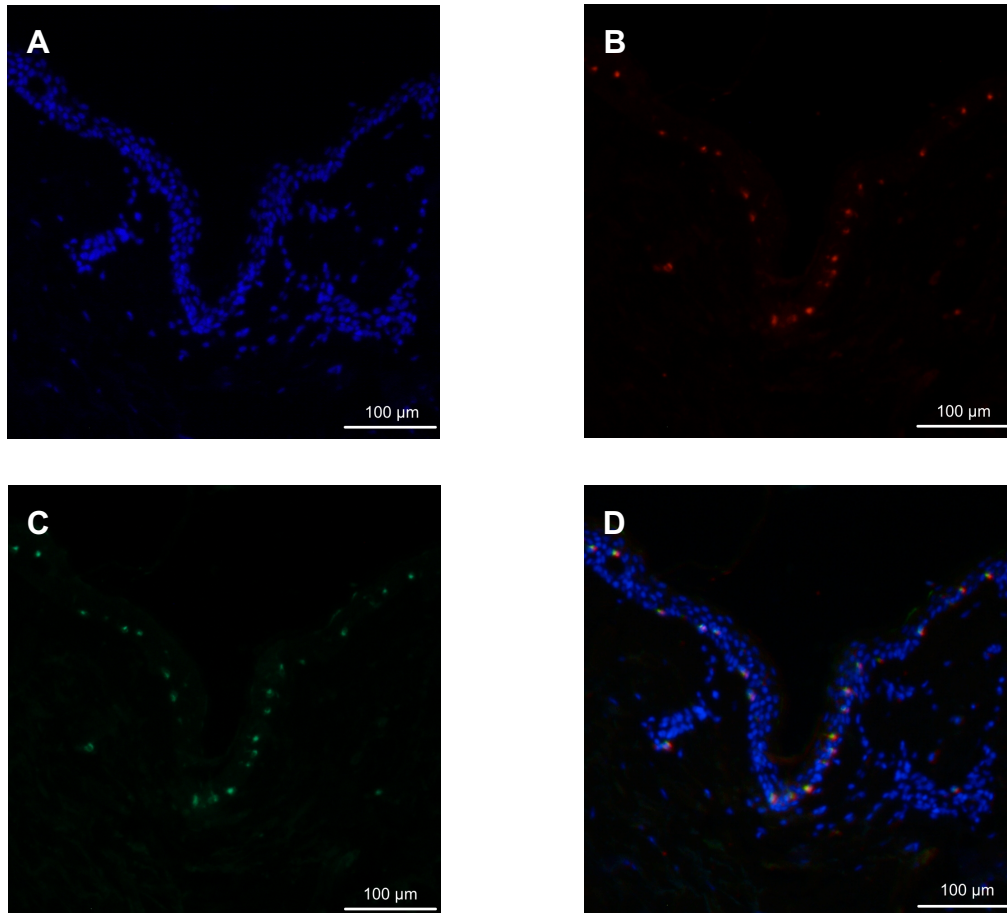
## 5 Ergebnisse



**Abbildung 20:** Die Balkendiagramme zeigen die Genexpression des CalcR (A), von CatK (B), CD207 (C) und TROP2 (D) relativ zu 28S rRNA auf MS und OIV. (\*P < 0,05)

### 5.8. TROP2 positive Langerhanszellen in menschlicher Haut

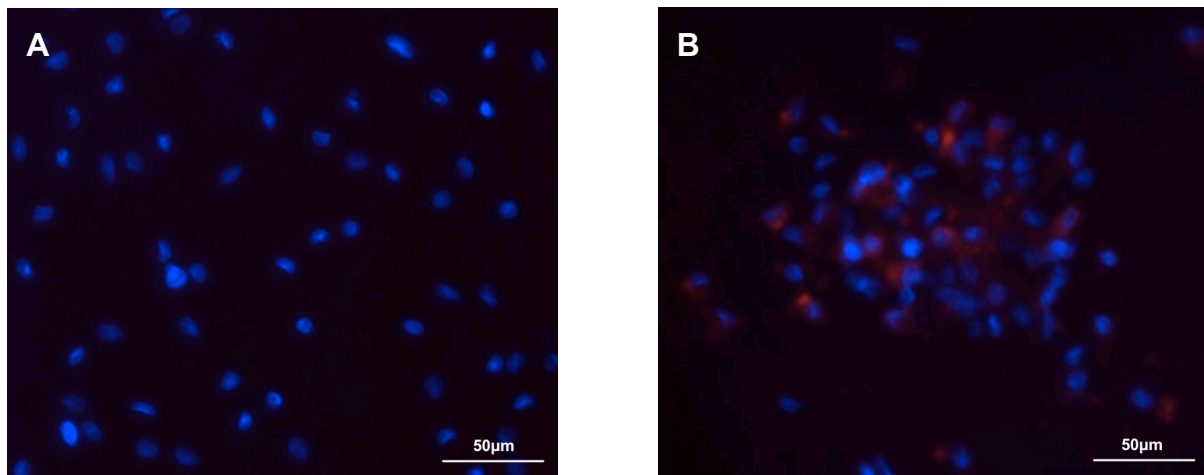
Gemäß Eisenwort et al. (Eisenwort, Jurkin et al. 2011) exprimieren epidermale Langerhanszellen in menschlicher Haut sowohl TROP2 als auch CD207. Um dies für die von uns verwendeten Antikörper zu verifizieren, wurden immunhistochemische Färbungen an menschlicher Haut durchgeführt (Abb. 21), die eine Kolo-kalisation von CD207 und TROP2 in der Epidermis bestätigen.



**Abbildung 21:** Immunhistochemische Färbungen (Fluoreszenzmikroskop, 200-fache Vergrößerung) zeigen TROP2<sup>+</sup> (B, D) und CD207<sup>+</sup> (C, D) Zellen in Epidermis und Dermis. Zellkerne stellen sich in blau dar (A, D).

### 5.9. Osteomalazie *in vitro* und TROP2 Expression

Um die TROP2 Expression zusätzlich auf Proteinebene zu analysieren, erfolgten immunhistochemische Färbungen von MS und OIV nach 28-tägiger Kultivierung. Diese bestätigen die qPCR Ergebnisse und zeigten TROP2 positive Zellen auf OIV (Abb. 22 B), wobei auf MS keine Färbung nachzuweisen war (Abb. 22 A).



**Abbildung 22:** TROP2 Färbung (Fluoreszenzmikroskop, 400-fache Vergrößerung) von MS (A) und OIV (B). TROP2<sup>+</sup> Zellen stellen sich in rot dar, Zellkerne hingegen in blau.

### 5.10. Mechanotransduktionsgene

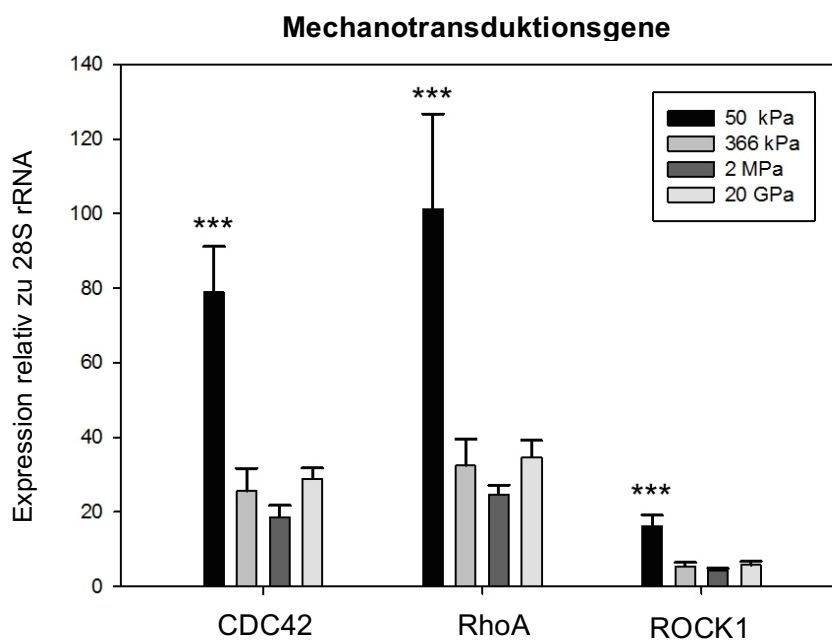
Um zu untersuchen ob der große Unterschied im E-modul für die veränderte Differenzierung und Funktion der Osteoklasten verantwortlich ist, wurde die Expression von Genen, die mit Mechanotransduktion in Verbindung gebracht werden, analysiert. In Anbetracht der Tatsache, dass die Demineralisierung des Dentins zu einer Veränderung des E-moduls, des Kalziumgehalts sowie einem Freilegen des Kollagennetzwerkes führt, bezogen wir Kollagengele, die sich lediglich im E-modul (50 kPa / 2 MPa) unterschieden, mit in den Versuch ein. Es wurde die Genexpression an Tag 3 von RhoA, ROCK1 und CDC42 untersucht (Abb. 23).

Die Ergebnisse zeigen weder für CDC42 (Abb. 23, 20 GPa/MS =  $28,93 \pm 2,85$  vs. 366 kPa/OIV =  $25,66 \pm 6,07$ ;  $P = 0,94$ ), RhoA (Abb. 23, GPa/MS =  $34,69 \pm 4,47$  vs. 366 kPa/OIV =  $32,40 \pm 7,22$ ;  $P = 0,99$ ), noch für ROCK1 (Abb. 23, 20 GPa/MS =  $5,77 \pm 1,01$  vs. 366 kPa/OIV =  $5,42 \pm 1,01$ ;  $P = 0,99$ ) eine unterschiedliche Genexpression in den Zellen auf MS im Vergleich zu OIV.

Im Gegensatz dazu wurde ein signifikant höheres Expressionslevel auf dem <50 kPa Kollagengel für alle untersuchten Mechanotransduktionsgene, verglichen mit dem 2

## 5 Ergebnisse

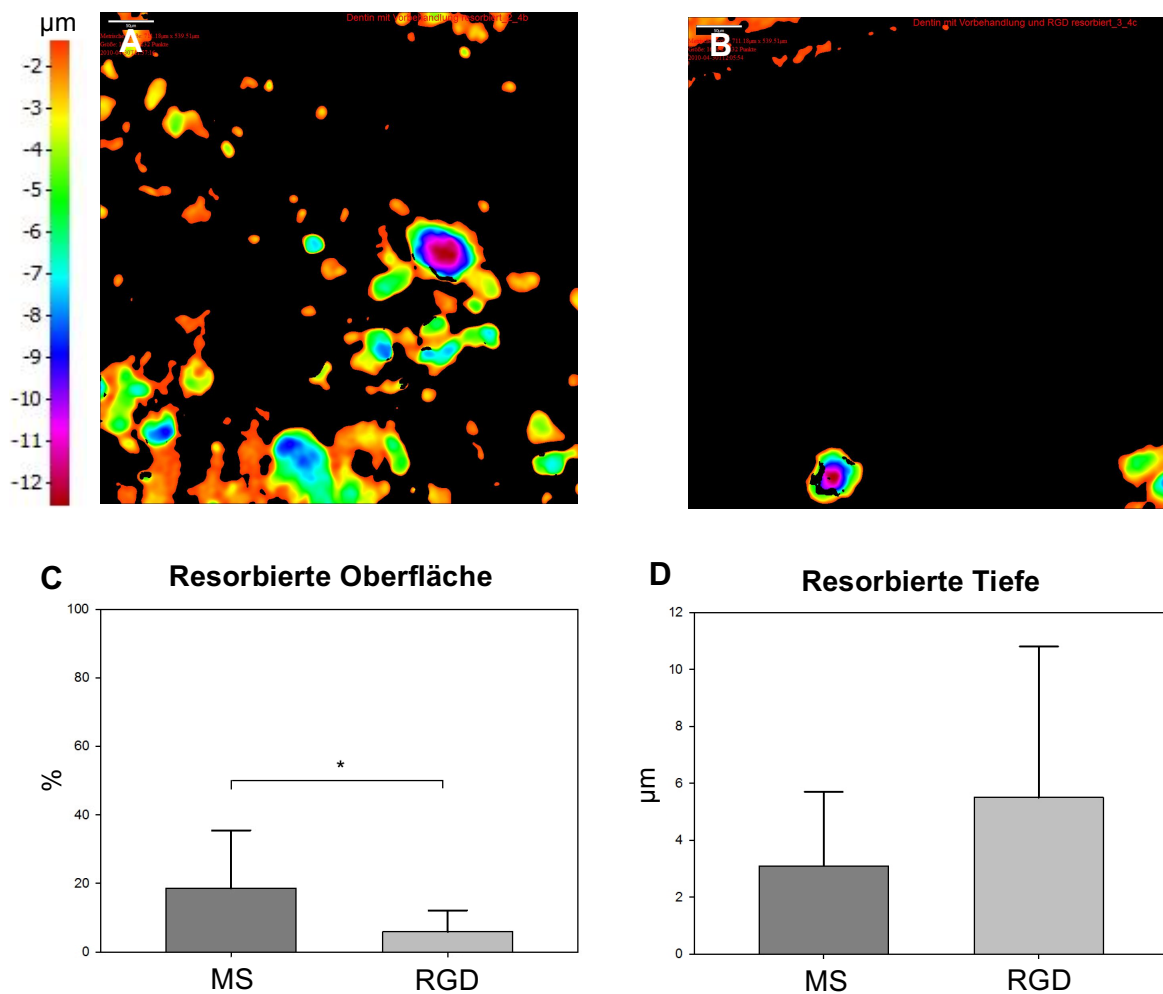
MPa Kollagengel, MS sowie OIV festgestellt. (RhoA: 20 GPa/MS =  $34,69 \pm 4,47$ ; 366 kPa/OIV =  $32,40 \pm 7,22$ ; <50 kPa =  $100,99 \pm 25,73$ ; 2 MPa =  $24,71 \pm 2,46$ ; P (<50 kPa vs. 2 MPa) <0,001; P (<50 kPa vs. 20 GPa/MS) = 0,001; P (<50 kPa vs. 366 kPa/OIV) = 0,001; ROCK1: 20 GPa/MS =  $5,77 \pm 1,01$ ; 366 kPa/OIV =  $5,42 \pm 1,01$ ; <50 kPa =  $16,28 \pm 2,81$ ; 2 MPa =  $4,32 \pm 0,57$ ; P (<50 kPa vs. 2 MPa) <0,001; P (<50 kPa vs. 20 GPa/MS) <0,001; P (<50 kPa vs. 366 kPa/OIV) <0,001; CDC42: 20 GPa/MS =  $28,93 \pm 2,85$ ; 366 kPa/OIV =  $25,66 \pm 6,07$ ; <50 kPa =  $78,95 \pm 12,19$ ; 2 MPa =  $18,64 \pm 3,12$ ; P (<50 kPa vs. 2 MPa) <0,001; P (<50 kPa vs. 20 GPa/MS) <0,001; P (<50 kPa vs. 366 kPa/OIV) <0,001).



**Abbildung 23:** Das Balkendiagramm zeigt die Expression der analysierten Mechanotransduktionsgene an Tag 3 auf dem 50 kPa und 2 MPa Kollagengel sowie der mineralisierten Oberfläche/20 GPa und OIV/366 kPa. (\*\*\*)P <0,001)

### 5.11. Resorptionsaktivität auf RGD-Peptid

Um eine mögliche Interaktion zwischen den Zellen und der infolge der Demineralisierung freigelegten RGD-Sequenz zu untersuchen, wurde die Resorptionsaktivität auf RGD-Peptid beschichtetem Dentin im Vergleich zur mineralisierten Oberfläche analysiert (Abb. 24). Auf der RGD-Oberfläche fand nahezu keine Resorption statt (Abb. 24 C, MS =  $18,5 \pm 17,0$  % vs. RGD =  $5,9 \pm 6,2$  %;  $P = 0,01$ ), wobei die entstandenen Resorptionslakunen wiederum gleich tief waren (Abb. 24 D, MS =  $3,1 \pm 2,6$   $\mu\text{m}$  vs. RGD =  $5,5 \pm 5,3$   $\mu\text{m}$ ;  $P = 0,15$ ).



**Abbildung 24:** IFM Aufnahmen von MS (A) und RGD-Peptid beschichtetem Dentin (B). Die Balkendiagramme zeigen den Anteil der resorbierten Oberfläche an der Gesamtoberfläche (C), sowie die Tiefe (D) der einzelnen Resorptionslakunen. (\* $P < 0,05$ )

### 6. Diskussion

Das erste Ziel der Arbeit war es eine Osteomalazie in vitro zu simulieren, um in einem nächsten Schritt einen möglichen Beitrag zum Verständnis des Pathomechanismus der Erkrankung leisten zu können.

Die Demineralisierungszone des OIV Modells entspricht einer Tiefe von  $56,4 \pm 1,0$   $\mu\text{m}$  und liegt somit in der Größenordnung des zuvor vermessenen Osteoidsaums der Knochenbiopsien von an Osteomalazie erkrankten Patienten. Zudem liegt die Demineralisierungszone im Bereich der von Parfitt etablierten Definition einer Osteomalazie mit einer durchschnittlichen Osteoiddicke größer  $12,5$   $\mu\text{m}$  (Parfitt 1997). Das Ergebnis der Elastizitätsmessung lässt außerdem vermuten, dass eine Osteomalazie zu einer Reduktion der Gewebesteifigkeit des Knochens von nahezu fünf Zehnerpotenzen im Vergleich zu gesundem Knochengewebe führt. Obwohl diesbezüglich keine Daten zur Oberflächenmechanik einer Osteomalazie im Nanometerbereich vorliegen, führt eine Osteomalazie bekanntermaßen zu Skelettdeformitäten (Drezner 2001, Lips, van Schoor et al. 2008, Jiang, Xia et al. 2012) und einem erhöhten Risiko pathologischer Frakturen (Arnsten, Freeman et al. 2007, Baidya, Chowdhury et al. 2012, Jiang, Xia et al. 2012) und somit zu Symptomen, die auf eine veränderte Knochenmechanik hinweisen. Diese Beobachtung wird durch eine Arbeit bestärkt, die an Hand eines Hasenmodells zeigen konnte, dass eine Osteomalazie im Rahmen einer Knochen-Dreipunkt-Biegetestung zu einer Abnahme der Knochenfestigkeit um 26 % führte (Anumula, Magland et al. 2008).

Die Masson-Goldner-Trichrom gefärbten Knochenbiopsien von Osteomalazie Patienten zeigen einen deutlich abgrenzbaren Osteoidsaum, der zu 90 % aus Kollagen Typ I besteht. Analog dazu bestätigen die RKM Aufnahmen sowie Profilometervermessungen, dass die Demineralisierung zu einem Freilegen des kollagenen Netzwerkes führt. Es liegt demnach nahe, dass der gemessene E-modul von 366 kPa möglicherweise dem kollagener Fasern vom Typ I entspricht. Der Wert des E-moduls von Kollagen Typ I zeigt in Abhängigkeit von der Messmethode, dem Hydrierungszustand sowie interindividuellen Unterschieden der zu vermessenden Kollagenproben eine breite Streuung in der Literatur. So wird für dehydrierte Kollagen Typ I Fibrillen je nach Messmethode ein Wert zwischen 1,8 und 7 GPa für



## 6 Diskussion

---

AFM basierte Zugprüfung (van der Rijt, van der Werf et al. 2006, Gautieri, Vesentini et al. 2011) und ein Wert zwischen 1,2 und 11,5 GPa für AFM basierte Nanoindentation (Strasser, Zink et al. 2007, Wenger, Bozec et al. 2007, Grant, Brockwell et al. 2008) angegeben. Der E-modul hydrierter Kollagen Typ I Fibrillen, der der Situation in vivo näher ist, entspricht hingegen 200-500 MPa mittels AFM basierter Zugprüfung (van der Rijt, van der Werf et al. 2006, Gautieri, Vesentini et al. 2011) sowie 1,2 MPa (Grant, Brockwell et al. 2008) – 6 GPa (Wenger, Bozec et al. 2007) mittels AFM basierter Nanoindentation. Die weite Streuung des E-moduls kann zusätzlich durch die Anisotropie von Kollagen erklärt werden (Wenger, Bozec et al. 2007).

Des Weiteren zeigen Experimente, dass der gemessene E-modul zum einen abhängig von der Dicke der Probe ist, sowie von der festgelegten Belastungskraft des Cantilevers mit der die Messung erfolgt. Dementsprechend besteht bei der Vermessung ultradünner Proben ( $< 1 \mu\text{m}$ ) das Risiko die Elastizität des unter der eigentlichen Probe liegenden Substrates zu bestimmen (Domke J 1998). Da Kollagen Fibrillen lediglich zwischen 80 und 200 nm dick sind, könnten die oben genannten Arbeiten, bei der die Vermessung einzelner Kollagenmoleküle mittels Nanoindentation erfolgte, den wahren E-modul überschätzt haben.

Die Demineralisierungszone des OIV Modells liegt mit  $24,8 \mu\text{m}$  außerhalb des Bereiches ultradünner Proben. Dem zu Folge kann eine Messungsgenauigkeit auf Grund der Probendicke ausgeschlossen werden, dennoch liegt das E-modul von 366 kPa weit unterhalb den Literaturwerten für Kollagen Typ I.

Um letztendlich eine Aussage darüber zu treffen, ob der in dieser Arbeit gemessene E-modul mit dem einer Osteomalazie übereinstimmt, wäre eine Vermessung unfixierter Knochenbiopsien von Osteomalazie Patienten notwendig. Obwohl Dentin im Verhältnis seiner zwei Hauptkomponenten Kollagen Typ I und Hydroxylapatit dem menschlichem Knochen sehr ähnlich ist, scheinen insbesondere im Bezug auf die Mikrostruktur Unterschiede vorzuliegen (Jantou-Morris, Horton et al. 2010). Eine mögliche Veränderung des E-moduls auf Grund der unterschiedlichen Beschaffenheit von Knochen und Dentin lässt sich daher nicht sicher ausschließen.

## 6 Diskussion

---

Der zweite Teil dieser Arbeit widmete sich dem Einfluss der veränderten Oberflächenmechanik auf die Differenzierung von Osteoklasten. In diesem Kontext zeigen die Ergebnisse einen direkten Effekt auf die Differenzierung humaner MNCs zu Osteoklasten. Hier konnten sowohl eine reduzierte Zellzahl sowie ein reduzierter Zellmetabolismus als auch eine verminderte Oberflächenresorption auf OIV beobachtet werden. Analog zu dem von Engler et al. beschriebenen Effekt (siehe 1.5.) zeigen diese Ergebnisse, dass die umgebene Matrix die Osteoklastogenese und Resorptionsaktivität maßgeblich beeinflusst. Ein ähnlicher Effekt wurde von Saltel et al. beschrieben, der beobachtete, dass Osteoklasten auf demineralisiertem Dentin keine sealing zone und somit keine Resorptionsaktivität zeigten (Saltel, Destaing et al. 2004). Andere Autoren hingegen argumentieren, dass ohne das Vorhandensein einer mineralisierten Matrix keine Resorption durch Osteoklasten stattfinden kann (Chambers, Thomson et al. 1984, Nakamura, Takahashi et al. 1996, Yovich, Seydel et al. 1998). Obwohl wir einen Einfluss der veränderten Calciumkonzentration nicht ausschließen können, haben einige Arbeiten gezeigt, dass Osteoklasten ebenfalls nicht mineralisiertes Substrat, zum Beispiel Chitosan (Torres, Santos et al. 2013) oder Polyethylenglykol Hydrogele (Hsu, Olabisi et al. 2011), degradieren können. Es ist daher anzunehmen dass die beeinträchtigte Differenzierung und Resorption vielmehr ein Resultat der veränderten Matrixbeschaffenheit, als eines Calcium- oder Phosphatmangels, ist.

Auf genetischer Ebene zeigen die Ergebnisse jedoch keinen signifikanten Unterschied im Bezug auf die Expression Osteoklasten-typischer Gene wie CalcR und CathK. Ein zuvor durchgeführter mRNA Microarray, der auf eine verminderte CalcR Expression auf OIV hingedeutet hatte, wurde durch die mittels qPCR und Durchflusszytometrie gewonnenen Ergebnisse nicht bestätigt, obwohl der gemessene Mittelwert eine Reduktion der Genexpression um die Hälfte zeigte. Unter Berücksichtigung der großen Standardabweichung, der geringen Probenanzahl und somit niedrigen Teststärke, hätte das Einbeziehen weiterer Proben jedoch möglicherweise zu einem signifikanten Unterschied geführt.

Die Genexpression von CD207, einem C-Typ Lektin Rezeptor, auch als Langerin bekannt, war auf OIV analog zum mRNA Microarray verstärkt, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant war. Langerin gilt als Kennzeichen der Langerhans Zellen und ist mit den für Langerhans Zellen typischen Birbeck Granula colokalisiert (Kaplan

2010, Romani, Clausen et al. 2010). Außerdem wird Langerin von einer Gruppe von dendritischen Zellen in der Dermis (Romani, Clausen et al. 2010) und anderem Gewebe, sowie von der Lunge (Bursch, Wang et al. 2007, Geurts van Kessel, Willart et al. 2008) und dem Darm (Bogunovic, Ginhoux et al. 2009) exprimiert.

Die mRNA Microarray Ergebnisse deuteten zudem auf einen großen Expressionsanstieg von TROP2 auf OIV hin, der sowohl mittels qPCR als auch auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Färbungen bestätigt werden konnte. TROP2, auch unter dem Begriff des Tumor assoziierten Kalzium Signalvermittlers 2 (TACSTD2) bekannt, ist ein Oberflächenrezeptor, der vor allem von Trophoblasten, den Basalzellen der Prostata und den Ovalzellen der Leber exprimiert wird (Cubas, Zhang et al. 2010). Ferner zeigen klinische Daten seine wichtige Rolle als Onkogen, da sein Expressionslevel auf Tumorzellen positiv mit der Aggressivität und Bildung von Metastasen korreliert und mit einem geringeren Patientenüberleben einhergeht (Cubas, Zhang et al. 2010, Fang, Wang et al. 2012, Trerotola, Cantanelli et al. 2013). CD207 positive epidermale Langerhans Zellen zeigen ebenfalls die Expression von TROP2, wie von Eisenwort et al. berichtet (Eisenwort, Jurkin et al. 2011). Das gleiche Ergebnis zeigen unsere immunhistochemischen Doppelfärbungen humaner Haut. Vor dem Hintergrund, dass CD207 positive dendritische Zellen in der Dermis, der Lunge sowie in der Mukosa des Darm kein TROP2 exprimieren, wird die Coexpression von CD207 und TROP2 als ein Beweis für Langerhans Zellen angesehen (Eisenwort, Jurkin et al. 2011). Obwohl Langerhans Zellen und Osteoklasten einige Gemeinsamkeiten aufweisen, darunter die Differenzierung von HSCs, die Expression von RANK sowie ihre Zugehörigkeit zum Monozyten-Makrophagen-System (Barbaroux, Belet et al. 2008), wurden bisher weder TROP2 noch CD207 Expression für Osteoklasten, Osteoblasten oder Osteozyten beschrieben. Vor dem Hintergrund, dass auch dendritische Zellen CD207 exprimieren und sich ebenfalls aus den gleichen Vorläuferzellen wie Osteoklasten differenzieren (Miyamoto, Ohneda et al. 2001, Ardavin 2003, Hume 2006, Alnaeeli, Park et al. 2007) muss auch die Möglichkeit, einer durch OIV induzierten Differenzierung von dendritischen Zellen in Erwägung gezogen werden. In diesem Kontext leisten einige Arbeiten Hinweise auf die Plastizität zwischen Osteoklasten und dendritischen Zellen, die auch in unserem Setting eine Rolle gespielt haben könnte. So zeigen Osteopetrose *csf-1<sup>-/-</sup>* Mäuse eine reduzierte Zahl an dendritischen Zellen (MacDonald, Rowe et al. 2005). In vitro Experimente haben außerdem gezeigt,

## 6 Diskussion

---

dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Differenzierung von dendritischen Zellen zu Osteoklasten induzieren können (Alnaeeli, Penninger et al. 2006), ein Signalweg, der eine wichtige Rolle im Rahmen von inflammatorischem Knochenverlust, wie der rheumatoiden Arthritis, spielen könnte.

Die Rolle von TROP2, unabhängig von der Assoziation mit Langerhans Zellen, könnte ebenfalls in der Regulation von Proliferation und Differenzierung liegen. In diesem Zusammenhang haben Yang et al. gezeigt, dass TROP2 die Differenzierung und Proliferation von MSCs reguliert. Dabei führte ein Mangel an TROP2 zu einer Hemmung der Proliferation von MSCs, die wiederum in einer verminderten Adipogenese und Osteogenese resultierten (Yang, Zhu et al. 2013). Auf unser OIV Modell bezogen, könnte die erhöhte TROP2 Expression auf demineralisierter Oberfläche die Osteogenese stimulieren mit dem Ziel die Knochenstruktur zu verbessern. Eine Hypothese, die mittels einer Cokultur mit MSCs bzw. Osteoblasten verifiziert werden könnte.

Vor dem Hintergrund seiner Funktion als Onkogen (Fong, Moser et al. 2008, Cubas, Zhang et al. 2010, Fang, Wang et al. 2012, Trerotola, Cantanelli et al. 2013), bei der TROP2 den ERK-MAPK Signalweg aktiviert (Cubas, Zhang et al. 2010) und somit Zellproliferation, -migration und -invasion beeinflusst (Boucher, Morisset et al. 2000, Meloche and Pouyssegur 2007, Kim and Choi 2010), könnte die Expression von TROP2 auf OIV auch für die Entwicklung von Knochenmetastasen und Knochentumoren verantwortlich sein. In Anbetracht dessen, wäre davon auszugehen, dass eine bereits geschädigte Knochengrundsubstanz die Entwicklung von Tumoren begünstigt, eine Beobachtung, die bisher jedoch in keiner Studie beschrieben wurde. Einen anderen möglichen Erklärungsansatz der erhöhten TROP2 Expression in Tumoren liefert die sogenannte Tumor-assoziierte Osteomalazie, die sich durch die Sekretion des Fibroblasten Wachstumsfaktor 23 (FGF23) durch den Tumor auszeichnet, welcher maßgeblich an der Entstehung einer Tumor-assoziierten Osteomalazie beteiligt ist. Folglich könnte die Tumor-assoziierte Osteomalazie eine erhöhte Expression von TROP2 bewirken. (Higley, Beckett et al. 2015, Yavropoulou, Gerothanasi et al. 2015)

Obwohl die genaue Funktion von TROP2 und CD207 in diesem Kontext unbeantwortet bleibt, zeigen die Ergebnisse, dass allein die veränderte Oberflächenmechanik, unabhängig von anderen Faktoren, zur Differenzierung eines anderen Zelltyps, der Ähnlichkeiten mit Langerhans Zellen und dendritischen Zellen

## 6 Diskussion

---

zeigt, führt. Vor allem im Rahmen der Osteoimmunologie heben die Ergebnisse die Bedeutung der Zell-Matrix-Interaktion im Bezug auf Zelldifferenzierung, Ausbruch und Fortschreiten inflammatorisch-bedingten Knochenverlusts hervor.

Im letzten Teil der Arbeit sollte die Auswirkung des veränderten E-moduls auf die Mechanotransduktion untersucht werden um einen möglichen Erklärungsansatz für die beeinträchtigte Osteoklastogenese zu leisten. Dazu wurden die Expression von RhoA (Chellaiah, Soga et al. 2000, Gadea, de Toledo et al. 2007, Khatiwala, Kim et al. 2009, Keung, de Juan-Pardo et al. 2011, Huang, Yang et al. 2012), ROCK1 (Gadea, de Toledo et al. 2007, Huang, Yang et al. 2012) und CDC42 (Ito, Teitelbaum et al. 2010, Keung, de Juan-Pardo et al. 2011) analysiert, bekannte Gene, die eine Rolle im Rahmen der Mechanotransduktion spielen. Neben OIV und MS wurden in die Untersuchungen zusätzlich Kollagengele mit eingeschlossen.

Das < 50 kPa Kollagengel zeigte einen signifikanten Expressionsanstieg für alle untersuchten Gene, was die Auswirkung der Zell-Matrix-Mechanik im Rahmen der Differenzierung von Osteoklasten deutlich bestätigt. Ein E-modul < 50 kPa entspricht dem E-modul lebender Zellen, das in Abhängigkeit von Zelltyp und Messmethode zwischen 1 und 50 kPa variiert (Yourek, Hussain et al. 2007, Docheva, Padula et al. 2008, Codan, Martinelli et al. 2013). Da bekannt ist, dass Osteoklasten lediglich als Einheit in Verbindung mit der Knochenoberfläche, an der sie befestigt sind, angefundener werden können, vermuten wir dass für die Differenzierung von Osteoklasten aus HSCs eine Stimulation durch eine harte Oberfläche notwendig ist. Auf der anderen Seite scheint ein E-modul < 50 kPa, wenn beispielsweise mehrere Zellen aufeinander liegen, die Osteoklastogenese zu hemmen. Ein Prozess der für die Regulation des Knochen-Remodellings essentiell sein könnte und somit den Knochen vor unkontrollierter Resorption schützen würde.

Die Genexpression von RhoA, ROCK1 und CDC42 auf MS (20 GPa), OIV (360 kPa) und dem 2 MPa Kollagengel zeigte hingegen keinen Unterschied. Der beobachtete Effekt auf Differenzierung und Funktion von Osteoklasten durch OIV, konnte daher nicht durch diesen Mechanotransduktions-Signalweg erklärt werden.

Die AFM Bilder zeigen, dass es durch die Demineralisierung zu einem Freilegen des Kollagennetzwerkes auf OIV im Vergleich zu MS kommt, wobei die Kollagenfibrillen die charakteristische Querstreifung mit einer D-Band Periode von 67 nm aufweisen

(Gerstenfeld, Chipman et al. 1988, Holmes, Gilpin et al. 2001, van der Rijt, van der Werf et al. 2006). Die Vermutung liegt demnach nahe, dass die exponierten Kollagenfibrillen für die veränderte Differenzierung der Osteoklasten verantwortlich sind. Eine ähnliche Beobachtung wurde von Shafieyan et. al beschrieben, die Osteoklasten auf mit unterschiedlichen Kollagenkonzentrationen beschichtetem Polydimethylsiloxan differenzierten. Dabei beobachteten sie, dass eine hohe Kollagendichte zu einer Hemmung der Fusion von Monozyten führte. Zusätzlich berichten sie von einer reduzierten Anzahl an Zellkernen pro Osteoklast, sowie einer verminderten Zelloberfläche der Osteoklasten auf dem Kollagen beschichteten Polydimethylsiloxan im Vergleich zu bloßem Polystyrol (Shafieyan, Tiedemann et al. 2012).

Wir stellten daher die Vermutung auf, dass die exponierten Kollagenfibrillen und somit die freigelegte RGD-Sequenz für die veränderte Differenzierung der Osteoklasten verantwortlich sind. In der Tat zeigte sich analog zum OIV Modell auf RGD-Peptid beschichtetem Dentin eine signifikant reduzierte Oberflächenresorption bei jedoch gleicher Resorptionstiefe. Bei RGD handelt es sich um eine Tripeptid-Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Aspartat, die in Proteinen der extrazellulären Matrix vorkommt und eine Schlüsselrolle im Rahmen der Integrin vermittelten Zell-Matrix Adhäsion spielt (Helfrich, Nesbitt et al. 1992). In diesem Kontext wurde beschrieben, dass RGD enthaltende Proteine, wie Echistatin, einen inhibitorischen Effekt auf Osteoklasten haben. Dieser Effekt soll dadurch bedingt sein, dass Echistatin den Vitronectin Rezeptor von Osteoklasten besetzt und somit die Adhäsion an die RGD-Sequenz der Proteine der extrazellulären Matrix verhindert. Demzufolge kommt es zu einer beeinträchtigten Zellausbreitung und Resorption (Sato, Sardana et al. 1990, Horton, Taylor et al. 1991, Fisher, Caulfield et al. 1993, Sato, Garsky et al. 1994).

Da im OIV Modell die RGD enthaltenden Proteine, welche dem Kollagen entsprechen, jedoch in der Matrix anzufinden sind, ist anzunehmen, dass die beeinträchtigte Osteoklastogenese vielmehr Resultat eines Rezeptor-vermittelten Signalweges als einer kompetitiven Blockade des Rezeptors ist. Die Ergebnisse könnten somit daraufhin weisen, dass eine Kombination aus kollagenreichem Gewebe mit lokal erhöhten Konzentrationen von M-CSF und RANKL möglicherweise die Differenzierung von Langerhans Zellen begünstigt. Ein Effekt, der vermutlich

## 6 Diskussion

---

direkt auf Zellebene über Zell-Matrix-Interaktion vermittelt wird und im gesamten Knochenstoffwechsel eine wesentliche Rolle spielen könnte.

Im Bezug auf die Fragestellung dieser Arbeit ist es gelungen ein standardisiertes Osteomalazie Modell zu etablieren mit Hilfe dessen die Hypothese, dass eine verminderte Oberflächenmineralisierung zu einer veränderten osteoklastären Differenzierung und Resorption führt, bestätigt werden konnte. Bei reduzierter Differenzierung und Resorption von Osteoklasten auf OIV, konnte eine erhöhte Expression von CD207 und TROP2 beobachtet werden. Die Expression dieser Gene weist auf die Differenzierung eines anderen Zelltyps hin und stellt einen vielseitigen und interessanten Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dar. Auf zellulärer Ebene scheint die Auswirkung der veränderten Oberfläche direkt über Zell-Matrix-Interaktion vermittelt zu werden. Eine Beobachtung, die die Rolle der Knochenbeschaffenheit im Rahmen des Knochenstoffwechsels hervorhebt.

### 7. Zusammenfassung

Knochen ist ein lebendiges zelluläres Gewebe, dessen Integrität für die Funktion unseres Körpers essentiell ist. Demzufolge ist es nicht verwunderlich, dass eine Osteomalazie mit erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität der betroffenen Patienten einhergeht. Die Osteomalazie ist eine vielseitige und häufig unerkannt bleibende Erkrankung, die von Jahr zu Jahr an Relevanz gewinnt. Umso wichtiger ist es die Komplexität der Pathogenese vollständig zu verstehen.

Im ersten Teil dieser Arbeit ist es gelungen ein adäquates Osteomalazie in vitro Modell zu etablieren, dessen Demineralisierungszone dem einer Osteomalazie entspricht. Somit war es möglich, den Einfluss der veränderten Oberfläche auf die Differenzierung von Osteoklasten zu untersuchen. Im Rahmen dessen bestätigte sich, dass die Demineralisierung zu einer veränderten Mikromechanik führt, die wiederum einen großen Effekt auf Differenzierung und Funktion humaner Osteoklasten zeigte. So konnte zum einen eine verminderte Osteoklastenzahl mit geringer Resorptionsaktivität und zum anderen auf genetischer Ebene die Differenzierung eines den Langerhans Zellen ähnlichen Zelltyps beobachtet werden. Eine Beobachtung, die die Bedeutung der Zell-Matrix-Interaktion im Bezug auf die Zelldifferenzierung hervorhebt und vor allem für inflammatorische Erkrankungen mit Knochenverlust bedeutsam sein könnte.

Um einen möglichen Signalweg zu erarbeiten, wurden typische Mechanotransduktionsgene untersucht, die jedoch in diesem Zusammenhang keine Veränderung bezüglich ihrer Expression zeigten. Auf Grundlage einer RGD-Peptid beschichteten Oberfläche konnte jedoch ein ähnliches Ergebnis im Bezug auf die Resorptionsaktivität erzielt werden. Die Vermutung liegt demnach nahe, dass das Freilegen des kollagenen Netzwerkes durch die Demineralisierung zu einem RGD-Peptid vermittelten Signalweg führt, der wiederum die veränderte Differenzierung und Funktion der Zellen vermittelt haben könnte.

Die Arbeit leistet somit wichtige Erkenntnisse zur Zell-Matrix-Interaktion, die im Rahmen der Pathogenese und dem Fortschreiten einer Osteomalazie von großer Bedeutung sein könnte.



### 8. Literaturverzeichnis

Alnaeeli, M., J. Park, D. Mahamed, J. M. Penninger and Y. T. Teng (2007). "Dendritic cells at the osteo-immune interface: implications for inflammation-induced bone loss." J Bone Miner Res **22**(6): 775-780.

Alnaeeli, M., J. M. Penninger and Y. T. Teng (2006). "Immune interactions with CD4+ T cells promote the development of functional osteoclasts from murine CD11c+ dendritic cells." J Immunol **177**(5): 3314-3326.

Anumula, S., J. Magland, S. L. Wehrli, H. Ong, H. K. Song and F. W. Wehrli (2008). "Multi-modality study of the compositional and mechanical implications of hypomineralization in a rabbit model of osteomalacia." Bone **42**(2): 405-413.

Ardavin, C. (2003). "Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells." Nat Rev Immunol **3**(7): 582-590.

Arnsten, J. H., R. Freeman, A. A. Howard, M. Floris-Moore, Y. Lo and R. S. Klein (2007). "Decreased bone mineral density and increased fracture risk in aging men with or at risk for HIV infection." AIDS **21**(5): 617-623.

Ashjazadeh, N., A. Zamani, M. Pourjafar and G. R. Omrani (2009). "Bone density of ambulatory adult patients receiving long-term anticonvulsant drug therapy." Arch Iran Med **12**(6): 550-554.

Baidya, A., S. Chowdhury, S. Mukhopadhyay and S. Ghosh (2012). "Hypophosphatemic rickets: A case of recurrent pathological fractures." Indian J Endocrinol Metab **16**(Suppl 2): S402-404.

Barbaroux, J. B., M. Beleut, C. Brisken, C. G. Mueller and R. W. Groves (2008). "Epidermal receptor activator of NF-kappaB ligand controls Langerhans cells numbers and proliferation." J Immunol **181**(2): 1103-1108.

Basha, B., D. S. Rao, Z. H. Han and A. M. Parfitt (2000). "Osteomalacia due to vitamin D depletion: a neglected consequence of intestinal malabsorption." Am J Med **108**(4): 296-300.

## 8 Literaturverzeichnis

---

- Bertassoni, L. E. and G. W. Marshall (2009). "Papain-gel degrades intact nonmineralized type I collagen fibrils." Scanning **31**(6): 253-258.
- Bhan, A., A. D. Rao and D. S. Rao (2010). "Osteomalacia as a result of vitamin D deficiency." Endocrinol Metab Clin North Am **39**(2): 321-331, table of contents.
- Bikle, D. D. (2007). "Vitamin D insufficiency/deficiency in gastrointestinal disorders." J Bone Miner Res **22 Suppl 2**: V50-54.
- Bisballe, S., E. F. Eriksen, F. Melsen, L. Mosekilde, O. H. Sorensen and I. Hesso (1991). "Osteopenia and osteomalacia after gastrectomy: interrelations between biochemical markers of bone remodelling, vitamin D metabolites, and bone histomorphometry." Gut **32**(11): 1303-1307.
- Bogunovic, M., F. Ginhoux, J. Helft, L. Shang, D. Hashimoto, M. Greter, K. Liu, C. Jakubzick, M. A. Ingersoll, M. Leboeuf, E. R. Stanley, M. Nussenzweig, S. A. Lira, G. J. Randolph and M. Merad (2009). "Origin of the lamina propria dendritic cell network." Immunity **31**(3): 513-525.
- Boucher, M. J., J. Morisset, P. H. Vachon, J. C. Reed, J. Laine and N. Rivard (2000). "MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells." J Cell Biochem **79**(3): 355-369.
- Burnham, N. A., R. J. Colton and H. M. Pollock (1991). "Interpretation issues in force microscopy." Journal of Vacuum Science and Technology A **9**: 2548-2556.
- Bursch, L. S., L. Wang, B. Igyarto, A. Kissenpfennig, B. Malissen, D. H. Kaplan and K. A. Hogquist (2007). "Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells." J Exp Med **204**(13): 3147-3156.
- Chambers, T. J., B. M. Thomson and K. Fuller (1984). "Effect of substrate composition on bone resorption by rabbit osteoclasts." J Cell Sci **70**: 61-71.
- Chellaiah, M. A., N. Soga, S. Swanson, S. McAllister, U. Alvarez, D. Wang, S. F. Dowdy and K. A. Hruska (2000). "Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption." J Biol Chem **275**(16): 11993-12002.

## 8 Literaturverzeichnis

---

- Chenu, C., A. Valentin-Opran, P. Chavassieux, S. Saez, P. J. Meunier and P. D. Delmas (1990). "Insulin like growth factor I hormonal regulation by growth hormone and by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and activity on human osteoblast-like cells in short-term cultures." Bone **11**(2): 81-86.
- Codan, B., V. Martinelli, L. Mestroni and O. Sbaizero (2013). "Atomic force microscopy of 3T3 and SW-13 cell lines: an investigation of cell elasticity changes due to fixation." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **33**(6): 3303-3308.
- Cubas, R., S. Zhang, M. Li, C. Chen and Q. Yao (2010). "Trop2 expression contributes to tumor pathogenesis by activating the ERK MAPK pathway." Mol Cancer **9**: 253.
- Docheva, D., D. Padula, C. Popov, W. Mutschler, H. Clausen-Schaumann and M. Schieker (2008). "Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy." J Cell Mol Med **12**(2): 537-552.
- Domke J, R. M. (1998). "Measuring the Elastic Properties of Thin Polymer Films with the Atomic Force Microscope." Langmuir **14**(12): 3320-3325.
- Drezner, M. K. (2001). "Tumor-induced osteomalacia." Rev Endocr Metab Disord **2**(2): 175-186.
- Eisenwort, G., J. Jurkin, N. Yasmin, T. Bauer, B. Gesslbauer and H. Strobl (2011). "Identification of TROP2 (TACSTD2), an EpCAM-like molecule, as a specific marker for TGF-beta1-dependent human epidermal Langerhans cells." J Invest Dermatol **131**(10): 2049-2057.
- Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney and D. E. Discher (2006). "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." Cell **126**(4): 677-689.
- Engler, A. J., H. L. Sweeney, D. E. Discher and J. E. Schwarzbauer (2007). "Extracellular matrix elasticity directs stem cell differentiation." J Musculoskelet Neuronal Interact **7**(4): 335.
- Fang, Y. J., G. Q. Wang, Z. H. Lu, L. Zhang, J. B. Li, X. J. Wu, P. R. Ding, Q. J. Ou, M. F. Zhang, W. Jiang, Z. Z. Pan and D. S. Wan (2012). "Different effects of ERbeta

## 8 Literaturverzeichnis

---

and TROP2 expression in Chinese patients with early-stage colon cancer." Tumour Biol **33**(6): 2227-2235.

Fisher, J. E., M. P. Caulfield, M. Sato, H. A. Quartuccio, R. J. Gould, V. M. Garsky, G. A. Rodan and M. Rosenblatt (1993). "Inhibition of osteoclastic bone resorption in vivo by echistatin, an "arginyl-glycyl-aspartyl" (RGD)-containing protein." Endocrinology **132**(3): 1411-1413.

Flanagan, L. A., Y. E. Ju, B. Marg, M. Osterfield and P. A. Janmey (2002). "Neurite branching on deformable substrates." Neuroreport **13**(18): 2411-2415.

Fong, D., P. Moser, C. Krammel, J. M. Gostner, R. Margreiter, M. Mitterer, G. Gastl and G. Spizzo (2008). "High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer." Br J Cancer **99**(8): 1290-1295.

Gadea, G., M. de Toledo, C. Anguille and P. Roux (2007). "Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices." J Cell Biol **178**(1): 23-30.

Gautieri, A., S. Vesentini, A. Redaelli and M. J. Buehler (2011). "Hierarchical structure and nanomechanics of collagen microfibrils from the atomistic scale up." Nano Lett **11**(2): 757-766.

Gerstenfeld, L. C., S. D. Chipman, C. M. Kelly, K. J. Hodgens, D. D. Lee and W. J. Landis (1988). "Collagen expression, ultrastructural assembly, and mineralization in cultures of chicken embryo osteoblasts." J Cell Biol **106**(3): 979-989.

Geurts van Kessel, C. H., M. A. Willart, L. S. van Rijt, F. Muskens, M. Kool, C. Baas, K. Thielemans, C. Bennett, B. E. Clausen, H. C. Hoogsteden, A. D. Osterhaus, G. F. Rimmelzwaan and B. N. Lambrecht (2008). "Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **205**(7): 1621-1634.

Gifre, L., P. Peris, A. Monegal, M. J. Martinez de Osaba, L. Alvarez and N. Guanabens (2011). "Osteomalacia revisited : a report on 28 cases." Clin Rheumatol **30**(5): 639-645.

Grant, C. A., D. J. Brockwell, S. E. Radford and N. H. Thomson (2008). "Effects of hydration on the mechanical response of individual collagen fibrils." Applied Physics Letter **92**(23).

Hadji, P., S. Klein, H. Gothe, B. Haussler, T. Kless, T. Schmidt, T. Steinle, F. Verheyen and R. Linder (2013). "The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data." Dtsch Arztebl Int **110**(4): 52-57.

Hadjipanayi, E., V. Mudera and R. A. Brown (2009). "Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness." J Tissue Eng Regen Med **3**(2): 77-84.

Helfrich, M. H., S. A. Nesbitt, E. L. Dorey and M. A. Horton (1992). "Rat osteoclasts adhere to a wide range of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via a beta 3 integrin." J Bone Miner Res **7**(3): 335-343.

Higley, M., B. Beckett, S. Schmahmann, E. Dacey and E. Foss (2015). "Locally aggressive and multifocal phosphaturic mesenchymal tumors: two unusual cases of tumor-induced osteomalacia." Skeletal Radiol **44**(12): 1825-1831.

Hintzpeter, B., G. B. Mensink, W. Thierfelder, M. J. Muller and C. Scheidt-Nave (2008). "Vitamin D status and health correlates among German adults." Eur J Clin Nutr **62**(9): 1079-1089.

Ho, S. P., M. Balooch, H. E. Goodis, G. W. Marshall and S. J. Marshall (2004). "Ultrastructure and nanomechanical properties of cementum dentin junction." J Biomed Mater Res A **68**(2): 343-351.

Holick, M. F. (2007). "Vitamin D deficiency." N Engl J Med **357**(3): 266-281.

Holmes, D., C. Gilpin, C. Baldock, U. Ziese, A. Koster and K. Kadler (2001). "Corneal collagen fibril structure in the three dimensions: Structural insights into fibril assembly, mechanical properties, and tissue organization." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13).

Holst, J., S. Watson, M. S. Lord, S. S. Eamegdool, D. V. Bax, L. B. Nivison-Smith, A. Kondyurin, L. Ma, A. F. Oberhauser, A. S. Weiss and J. E. Rasko (2010). "Substrate

elasticity provides mechanical signals for the expansion of hemopoietic stem and progenitor cells." Nat Biotechnol **28**(10): 1123-1128.

Horton, M. A., M. L. Taylor, T. R. Arnett and M. H. Helfrich (1991). "Arg-Gly-Asp (RGD) peptides and the anti-vitronectin receptor antibody 23C6 inhibit dentine resorption and cell spreading by osteoclasts." Exp Cell Res **195**(2): 368-375.

Hsu, C. W., R. M. Olabisi, E. A. Olmsted-Davis, A. R. Davis and J. L. West (2011). "Cathepsin K-sensitive poly(ethylene glycol) hydrogels for degradation in response to bone resorption." J Biomed Mater Res A **98**(1): 53-62.

Hu, F. K., F. Yuan, C. Y. Jiang, D. W. Lv, B. B. Mao, Q. Zhang, Z. Q. Yuan and Y. Wang (2011). "Tumor-induced osteomalacia with elevated fibroblast growth factor 23: a case of phosphaturic mesenchymal tumor mixed with connective tissue variants and review of the literature." Chin J Cancer **30**(11): 794-804.

Huang, X., N. Yang, V. F. Fiore, T. H. Barker, Y. Sun, S. W. Morris, Q. Ding, V. J. Thannickal and Y. Zhou (2012). "Matrix stiffness-induced myofibroblast differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction." Am J Respir Cell Mol Biol **47**(3): 340-348.

Hume, D. A. (2006). "The mononuclear phagocyte system." Curr Opin Immunol **18**(1): 49-53.

Ito, Y., S. L. Teitelbaum, W. Zou, Y. Zheng, J. F. Johnson, J. Chappel, F. P. Ross and H. Zhao (2010). "Cdc42 regulates bone modeling and remodeling in mice by modulating RANKL/M-CSF signaling and osteoclast polarization." J Clin Invest **120**(6): 1981-1993.

Jantou-Morris, V., M. A. Horton and D. W. McComb (2010). "The nano-morphological relationships between apatite crystals and collagen fibrils in ivory dentine." Biomaterials **31**(19): 5275-5286.

Jiang, Y., W. B. Xia, X. P. Xing, B. C. Silva, M. Li, O. Wang, H. B. Zhang, F. Li, H. L. Jing, D. R. Zhong, J. Jin, P. Gao, L. Zhou, F. Qi, W. Yu, J. P. Bilezikian and X. W. Meng (2012). "Tumor-induced osteomalacia: an important cause of adult-onset hypophosphatemic osteomalacia in China: Report of 39 cases and review of the literature." J Bone Miner Res **27**(9): 1967-1975.

## 8 Literaturverzeichnis

---

Jones, G., R. Horst, G. Carter and H. Makin (2007). "Contemporary diagnosis and treatment of vitamin D-related disorders." J Bone Miner Res **22 Suppl 2**: V11-15.

Kaplan, D. H. (2010). "In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells." Trends Immunol **31**(12): 446-451.

Kaupp, G. (2010). "Atomic Force Microscopy, Scanning Nearfield optical Microscopy and Nanoscratching." Springer **1**: 1-7.

Keung, A. J., E. M. de Juan-Pardo, D. V. Schaffer and S. Kumar (2011). "Rho GTPases mediate the mechanosensitive lineage commitment of neural stem cells." Stem Cells **29**(11): 1886-1897.

Khatiwala, C. B., P. D. Kim, S. R. Peyton and A. J. Putnam (2009). "ECM compliance regulates osteogenesis by influencing MAPK signaling downstream of RhoA and ROCK." J Bone Miner Res **24**(5): 886-898.

Khatiwala, C. B., S. R. Peyton and A. J. Putnam (2006). "Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells." Am J Physiol Cell Physiol **290**(6): C1640-1650.

Kim, E. K. and E. J. Choi (2010). "Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases." Biochim Biophys Acta **1802**(4): 396-405.

Kraenzlin, M. (2003). "Osteomalazie." Schweiz Med Forum **32/33**: 754-763.

Kulak, C. A., V. Z. Borba, J. P. Bilezikian, C. E. Silvano, L. Paola and C. L. Boguszewski (2004). "Bone mineral density and serum levels of 25 OH vitamin D in chronic users of antiepileptic drugs." Arq Neuropsiquiatr **62**(4): 940-948.

Lee, S. K., J. Kalinowski, S. Jastrzebski and J. A. Lorenzo (2002). "1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>-stimulated osteoclast formation in spleen-osteoblast cocultures is mediated in part by enhanced IL-1 alpha and receptor activator of NF-kappa B ligand production in osteoblasts." J Immunol **169**(5): 2374-2380.

Lee-Thedieck, C., N. Rauch, R. Fiammengo, G. Klein and J. P. Spatz (2012). "Impact of substrate elasticity on human hematopoietic stem and progenitor cell adhesion and motility." J Cell Sci **125**(Pt 16): 3765-3775.

## 8 Literaturverzeichnis

---

Lips, P., N. van Schoor and N. Bravenboer (2008). "Vitamin D-related disorders." Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism 329.

Luxon, B. A. (2011). "Bone disorders in chronic liver diseases." Curr Gastroenterol Rep **13**(1): 40-48.

Mac Way, F., M. Lessard and M. H. Lafage-Proust (2012). "Pathophysiology of chronic kidney disease-mineral and bone disorder." Joint Bone Spine **79**(6): 544-549.

MacDonald, K. P., V. Rowe, H. M. Bofinger, R. Thomas, T. Sasmono, D. A. Hume and G. R. Hill (2005). "The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion." J Immunol **175**(3): 1399-1405.

Mansueto, P., A. Carroccio, A. Seidita, G. Di Fede and A. Craxi (2012). "Osteodystrophy in chronic liver diseases." Intern Emerg Med.

Markus, F. (2012). "Mein Auto, mein Haus, meine Überstunden." Retrieved 16.01.2012.

Meloche, S. and J. Pouyssegur (2007). "The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition." Oncogene **26**(22): 3227-3239.

Menkes, C. (2013, April, 3). "Clinical manifestations, diagnosis and treatment of osteomalacia." Retrieved July, 25, 2013.

Miyamoto, T., O. Ohneda, F. Arai, K. Iwamoto, S. Okada, K. Takagi, D. M. Anderson and T. Suda (2001). "Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors." Blood **98**(8): 2544-2554.

Montecino, M., G. S. Stein, F. Cruzat, S. Marcellini, J. L. Stein, J. B. Lian, A. J. van Wijnen and G. Arriagada (2007). "An architectural perspective of vitamin D responsiveness." Arch Biochem Biophys **460**(2): 293-299.

Nagaoka, H., Y. Mochida, P. Atsawasuwan, M. Kaku, T. Kondoh and M. Yamauchi (2008). "1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> regulates collagen quality in an osteoblastic cell culture system." Biochem Biophys Res Commun **377**(2): 674-678.



## 8 Literaturverzeichnis

---

- Nakamura, I., N. Takahashi, T. Sasaki, E. Jimi, T. Kurokawa and T. Suda (1996). "Chemical and physical properties of the extracellular matrix are required for the actin ring formation in osteoclasts." J Bone Miner Res **11**(12): 1873-1879.
- Pandita, K. K., K. J. Bhat and T. H. Banday (2012). "Double osteomalacia." Clin Cases Miner Bone Metab **9**(3): 198-199.
- Parfitt, A. M. (1997). Osteomalacia and related disorders. Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders. K. S. Avioli LV, Academic Press: 327-382.
- Parfitt, A. M. (1997). Vitamin D and the pathogenesis of rickets and osteomalacia. Vitamin D. G. F. Feldmann D, Pike W, Academic Press: 1029-1046.
- Peach, H., J. E. Compston, S. Vedi and L. W. Horton (1982). "Value of plasma calcium, phosphate, and alkaline phosphatase measurements in the diagnosis of histological osteomalacia." J Clin Pathol **35**(6): 625-630.
- Pelham, R. J., Jr. and Y. Wang (1997). "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13661-13665.
- Penido, M. G. and U. S. Alon (2012). "Phosphate homeostasis and its role in bone health." Pediatr Nephrol **27**(11): 2039-2048.
- Pereira, P. C., D. M. Miranda, E. A. Oliveira and A. C. Silva (2009). "Molecular pathophysiology of renal tubular acidosis." Curr Genomics **10**(1): 51-59.
- Prein, C. (2012). "Etablierung eines rasterkraftmikroskopischen Messverfahrens zur Untersuchung der Wachstumsplatte von Mäuseknorpel." Projektstudie an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften, München.
- Priemel, M., C. von Domarus, T. O. Klatter, S. Kessler, J. Schlie, S. Meier, N. Proksch, F. Pastor, C. Netter, T. Streichert, K. Puschel and M. Amling (2010). "Bone mineralization defects and vitamin D deficiency: histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-hydroxyvitamin D in 675 patients." J Bone Miner Res **25**(2): 305-312.
- Pugach, M. K., J. Strother, C. L. Darling, D. Fried, S. A. Gansky, S. J. Marshall and G. W. Marshall (2009). "Dentin caries zones: mineral, structure, and properties." J Dent Res **88**(1): 71-76.

## 8 Literaturverzeichnis

---

- Reinhart-King, C. A., M. Dembo and D. A. Hammer (2005). "The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading." Biophys J **89**(1): 676-689.
- Romani, N., B. E. Clausen and P. Stoitzner (2010). "Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin." Immunol Rev **234**(1): 120-141.
- Saltel, F., O. Destaing, F. Bard, D. Eichert and P. Jurdic (2004). "Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts." Mol Biol Cell **15**(12): 5231-5241.
- Sato, M., V. Garsky, R. J. Majeska, T. A. Einhorn, J. Murray, A. H. Tashjian, Jr. and R. J. Gould (1994). "Structure-activity studies of the s-echstatin inhibition of bone resorption." J Bone Miner Res **9**(9): 1441-1449.
- Sato, M., M. K. Sardana, W. A. Grasser, V. M. Garsky, J. M. Murray and R. J. Gould (1990). "Echstatin is a potent inhibitor of bone resorption in culture." J Cell Biol **111**(4): 1713-1723.
- Schmidt, S. W. (2008). "Dynamic Force Spectroscopy of the Silicon-Carbon Bond." Masterthesis at the University of Applied Sciences, Munich.
- Shafieyan, Y., K. Tiedemann, A. Goulet, S. Komarova and T. M. Quinn (2012). "Monocyte proliferation and differentiation to osteoclasts is affected by density of collagen covalently bound to a poly(dimethyl siloxane) culture surface." J Biomed Mater Res A **100**(6): 1573-1581.
- Shaikh, A., T. Berndt and R. Kumar (2008). "Regulation of phosphate homeostasis by the phosphatonins and other novel mediators." Pediatr Nephrol **23**(8): 1203-1210.
- Shiraishi, A., S. Higashi, T. Masaki, M. Saito, M. Ito, S. Ikeda and T. Nakamura (2002). "A comparison of alfacalcidol and menatetrenone for the treatment of bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis." Calcif Tissue Int **71**(1): 69-79.
- Strasser, S., A. Zink, M. Janko, W. M. Heckl and S. Thalhammer (2007). "Structural investigations on native collagen type I fibrils using AFM." Biochem Biophys Res Commun **354**(1): 27-32.
- Suda, T., N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M. T. Gillespie and T. J. Martin (1999). "Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families." Endocr Rev **20**(3): 345-357.

## 8 Literaturverzeichnis

---

Takahashi, N., T. Akatsu, T. Sasaki, G. C. Nicholson, J. M. Moseley, T. J. Martin and T. Suda (1988). "Induction of calcitonin receptors by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in osteoclast-like multinucleated cells formed from mouse bone marrow cells." Endocrinology **123**(3): 1504-1510.

Thacher, T. D. and B. L. Clarke (2011). "Vitamin D insufficiency." Mayo Clin Proc **86**(1): 50-60.

Torres, A. L., S. G. Santos, M. I. Oliveira and M. A. Barbosa (2013). "Fibrinogen promotes resorption of chitosan by human osteoclasts." Acta Biomater **9**(5): 6553-6562.

Trerotola, M., P. Cantanelli, E. Guerra, R. Tripaldi, A. L. Aloisi, V. Bonasera, R. Lattanzio, R. de Lange, U. H. Weidle, M. Piantelli and S. Alberti (2013). "Upregulation of Trop-2 quantitatively stimulates human cancer growth." Oncogene **32**(2): 222-233.

van der Rijt, J. A., K. O. van der Werf, M. L. Bennink, P. J. Dijkstra and J. Feijen (2006). "Micromechanical testing of individual collagen fibrils." Macromol Biosci **6**(9): 697-702.

van Driel, M., H. A. Pols and J. P. van Leeuwen (2004). "Osteoblast differentiation and control by vitamin D and vitamin D metabolites." Curr Pharm Des **10**(21): 2535-2555.

Vertino, A. M., C. M. Bula, J. R. Chen, M. Almeida, L. Han, T. Bellido, S. Kousteni, A. W. Norman and S. C. Manolagas (2005). "Nongenotropic, anti-apoptotic signaling of 1alpha,25(OH)2-vitamin D3 and analogs through the ligand binding domain of the vitamin D receptor in osteoblasts and osteocytes. Mediation by Src, phosphatidylinositol 3-, and JNK kinases." J Biol Chem **280**(14): 14130-14137.

Vogelsang, H., P. Ferenci, H. Resch, A. Kiss and A. Gangl (1995). "Prevention of bone mineral loss in patients with Crohn's disease by long-term oral vitamin D supplementation." Eur J Gastroenterol Hepatol **7**(7): 609-614.

Wang, H. B., M. Dembo and Y. L. Wang (2000). "Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells." Am J Physiol Cell Physiol **279**(5): C1345-1350.

## 8 Literaturverzeichnis

---

Webb, A. R., L. Kline and M. F. Holick (1988). "Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin." J Clin Endocrinol Metab **67**(2): 373-378.

Wenger, M. P., L. Bozec, M. A. Horton and P. Mesquida (2007). "Mechanical properties of collagen fibrils." Biophys J **93**(4): 1255-1263.

Yang, J., Z. Zhu, H. Wang, F. Li, X. Du and R. Z. Ma (2013). "Trop2 regulates the proliferation and differentiation of murine compact-bone derived MSCs." Int J Oncol **43**(3): 859-867.

Yavropoulou, M. P., N. Gerothanasi, A. Frydas, E. Triantafyllou, C. Poullos, P. Hytioglou, P. Apostolou, I. Papatotiriou, S. Tournis, I. Kesisoglou and J. G. Yovos (2015). "Tumor-induced osteomalacia due to a recurrent mesenchymal tumor overexpressing several growth factor receptors." Endocrinol Diabetes Metab Case Rep **2015**: 150025.

Yoshida, T. and P. Stern (2012). "How Vitamin D works on bone." Endocrinol Metab Clin North Am **41**(3): 557-569.

Yourek, G., M. A. Hussain and J. J. Mao (2007). "Cytoskeletal changes of mesenchymal stem cells during differentiation." ASAIO J **53**(2): 219-228.

Yovich, S., U. Seydel, J. M. Papadimitriou, G. C. Nicholson, D. J. Wood and M. H. Zheng (1998). "Evidence that failure of osteoid bone matrix resorption is caused by perturbation of osteoclast polarization." Histochem J **30**(4): 267-273.

### **9. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Arndt F. Schilling für die umfassende und freundliche Unterstützung bei den Experimenten, Vorträgen, Publikationen und nicht zuletzt der Dissertation. Die Dissertation und insbesondere die damit verbundene vielseitige Methodik haben es mir ermöglicht, die wesentlichen Elemente der Grundlagenforschung zu erlernen und für mich persönlich einen wichtigen Grundstein für meinen zukünftigen beruflichen Werdegang zu legen, für den ich sehr dankbar bin.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der Experimentellen Plastischen Chirurgie der Technischen Universität München sowie der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften und Mechatronik der Hochschule München für die intensive Hilfe bei der Umsetzung und Auswertung der Experimente sowie ihre kollegiale Unterstützung bedanken.

Zuletzt danke ich meine Eltern sowie meiner Schwester für ihren stets uneingeschränkten Rückhalt, Interesse und aufmunternde Begleitung.