



Optimierung von *in vitro* Kultursystemen für Knochenzellen– Einfluss von pH und mechanischer Stimulation

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Anne-Marie Galow, geb. am 21.07.1988 in Greifswald
aus Rostock

urn:nbn:de:gbv:28-diss2018-0002-7

Rostock, 23.03.2017

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Jan Gimsa
Universität Rostock
Lehrstuhl für Biophysik

2. Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Barbara Nebe
Universitätsmedizin Rostock
Zentrum für Medizinische Forschung
AB Zellbiologie

Datum der Einreichung: 24.03.2017

Datum der Verteidigung: 13.10.2017

Abstract

In their microenvironments, cells are exposed to various stimuli such as biological cell-cell interactions, soluble chemical factors or physical forces. The stimuli may trigger specific cell responses, such as cell proliferation and differentiation as well as the alteration of biosynthesis. This thesis aims at the consideration of the effects of selected stimuli on the behavior of bone cells. A major goal of this work was the optimization of the *in vitro* culture conditions for osteoblasts.

Detailed investigations of the proliferation and differentiation phases of MC3T3 osteoblasts revealed the pH dependence of several cellular parameters. The *in vitro* findings on the optimal pH conditions were not only beneficial in cell culture, but also hinted at new approaches for the treatment of bone defects. A first step into this direction was the establishment of a model system for implants, designed to modify the pH in their microenvironments. The influence of this system on the cell properties was assessed using the MC3T3 cell line and primary human osteoblasts.

In order to investigate the underlying mechanisms of bone regeneration, a modifiable *in vitro* model system is desirable. The system should resemble the physiological conditions as close as possible but also allow for the adjustment of individual factors. The pursuit of initial approaches towards such a model was another aim of this thesis. For this purpose, a special co-culture system was established, which allowed for the mechanical stimulation of one cell population during cell culture. With the system, the interactions between osteocytes and osteoblasts were studied. By stimulating particularly the osteocytes, the approach took the often postulated importance of osteocytes as mechanosensors and the effector function of the osteoblasts into account.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VII
1. EINLEITUNG	1
2. STAND DER WISSENSCHAFT UND ZIELSTELLUNG	3
2.1 EXTRAZELLULÄRER PH-WERT	3
2.2 MODIFIZIERTE IMPLANTATE	4
2.3 MECHANISCHE STIMULATION	5
2.4 Co-KULTUR	6
2.5 ZIELSTELLUNG	7
3. MATERIAL UND METHODEN	9
3.1 MATERIAL	9
3.1.1 GERÄTE	9
3.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	10
3.1.3 ZELLEN UND MEDIEN	10
3.1.4 CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN	11
3.1.5 ASSAYS, KITS UND ANTIKÖRPER	11
3.2 METHODEN	13
3.2.1 ZELLKULTUR UND MEDIEN	13
3.2.2 ZELLZAHLBESTIMMUNG	15
3.2.3 WST-ASSAY	16
3.2.4 ATPLITE-ASSAY	17
3.2.5 ALIZARIN RED-ASSAY	18
3.2.6 GENECHIP®-ARRAYS UND PATHWAY-ANALYSE	18
3.2.7 ANFERTIGUNG EINES MODELLSYSTEMS FÜR EIN ALKALISIERENDES IMPLANTAT	20
3.2.8 FLUORESENZFÄRBUNG	23

3.2.9 WOUND HEALING-ASSAY	24
3.2.10 ETABLIERUNG DER CO-KULTUR UND MECHANISCHE STIMULATION	24
3.2.11 ELISA DER KULTURÜBERSTÄNDE	28
4. ERGEBNISSE	29
4.1 EINFLUSS DES PH-WERTES AUF OSTEOBLASTEN	29
4.1.1 PH-WERT-ÄNDERUNGEN IN KULTUR	29
4.1.2 PH-WERT-ABHÄNGIGE PROLIFERATION	30
4.1.3 PH-WERT-ABHÄNGIGE DIFFERENZIERUNG	39
4.2 PH MODIFIZIERENDES IMPLANTATMODELL	45
4.2.1 PH-WERT-ÄNDERUNGEN IM MODELLSYSTEM	45
4.2.2 ANWACHSVERHALTEN UND PROLIFERATION IM MODELLSYSTEM	47
4.2.3 GENEXPRESSION IM MODELLSYSTEM	50
4.2.4 „WOUND HEALING“ UNTER MODELLBEDINGUNGEN	53
4.3 MECHANISCHE STIMULATION IN DER CO-KULTUR	54
4.3.1 PROLIFERATION UNTER MECHANISCHER STIMULATION	54
4.3.2 KOLLAGENSEKRETION UNTER MECHANISCHER STIMULATION	56
4.3.3 POTENTIELLE SIGNALTRANSDUKTION UNTER MECHANISCHER STIMULATION	56
5. DISKUSSION	58
5.1 EXPERIMENTELLES VORGEHEN	58
5.2 EINFLUSS DES EXTRAZELLULÄREN PH-WERT AUF OSTEOBLASTEN	59
5.2.1 PH-ABHÄNGIGKEIT DER PROLIFERATION	59
5.2.2 PH-ABHÄNGIGKEIT DER DIFFERENZIERUNG	61
5.2.3 EINFLUSS DES EXTRAZELLULÄREN PH-WERTES <i>IN VIVO</i>	64
5.3 DAS MODELLSYSTEMS FÜR EIN ALKALISIERENDES IMPLANTAT	65
5.3.1 PROLIFERATION IM MODELLSYSTEM	65
5.3.2 GENEXPRESSION IM MODELLSYSTEM	66
5.3.3 WEITERE ASPEKTE – WOUND HEALING UND INFektION	66
5.4 DAS CO-KULTUR-SYSTEMS ZUR MECHANISCHEN STIMULATION	67
6. ZUSAMMENFASSUNG	71
LITERATURVERZEICHNIS	73

<u>ANHANG</u>	80
Danksagung	81
Erklärung	82
Veröffentlichungen	83
Exposé zum Patent „Alkalisierende Modifikation von Implantaten und Knochenbaumaterialien zur Optimierung der Regeneration von Knochendefekten“	84
Protokolle	85
Transkriptom Ansatz vs. Kontrolle	99

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of variance
ATF4	Activating transcription factor 4
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone morphogenetic protein
BMSCs	Bone Marrow Stromal Cells
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMP1	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FABP4	Fatty acid binding protein 4
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FDR	False Discovery Rate
FGF23	Fibroblast growth factor 23
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Mio.	Millionen
OD	Optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction

PGE2	Prostaglandin E2
PMMA	Polymethylmethacrylat
PVA	Polyvinylalkohol
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RIN	RNA Integrity Number
RMA	Robust multiarray average
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
Runx2	Runt-related transcription factor 2
SFRP2	Secreted frizzled-related protein 2
SIBLING	Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein
SOST	Sclerostin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFRSF19	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19
TRITC	Tetramethylrhodamine-isothiocyanat
WIF1	Wnt inhibitory factor 1
WST	Water soluble Tetrazolium salt
α -MEM	α Minimum Essential Medium

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 pH-Wert-Änderungen in Kultur	29
Tabelle 2 pH-Werte nach 24 h Inkubation bei verschiedenen CO ₂ -Konzentration.....	30
Tabelle 3 Fitparameter der Funktion inklusive numerisch bestimmter Parameter.....	33
Tabelle 4 pH-Wert der Proben bei verschiedenen NaOH-Konzentrationen	37
Tabelle 5 Top 5 der hoch- bzw. herunterregulierten Gene	41
Tabelle 6 Vergleich der Fold changes ermittelt über Gen-Chip und PCR.....	41
Tabelle 7 Signalwege mit anteilig den meisten hoch- bzw. herunterregulierten Genen.	42
Tabelle 8 im Modellsystem regulierte Gene eingeteilt nach ihrer übergeordneten Funktion.....	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht Stimuli und Zellreaktionen nach Ou und Hosseinkhani [30]	7
Abbildung 2 Spaltung von WST-1 in Formazan	16
Abbildung 3 Pipettierschema der ATP-Konzentrationsreihe	17
Abbildung 4 Ausschnitt einer Lochplatte zur Darstellung der Lochgrößen und –abstände	21
Abbildung 5 Ausschnitt einer Lochplatte zur Darstellung der Ausmaße eines Loches .	21
Abbildung 6 Vorbereitung des wound healing assay [68]	24
Abbildung 7 Co-Kultur-System mit Peek-Teilen	25
Abbildung 8 Schema: Co-Kultur mit Osteozyten und Osteoblasten	26
Abbildung 9 Wassertank zur Applikation der mechanischen Stimulation durch periodische Zugspannung	26
Abbildung 10 Messaufbau zur Validierung der Membranauslenkung	27
Abbildung 11 pH-abhängiger WST-Metabolismus	31
Abbildung 12 pH-abhängige Zellzahl über sechs Versuchstage	32
Abbildung 13 pH-abhängiger ATP-Gehalt	32
Abbildung 14 pH-Abhängigkeit der Proliferations-Indikatoren Zellzahl, WST- Metabolismus und ATP-Gehalt nach sechs Tagen in Kultur [69]	34
Abbildung 15 pH-Abhängigkeit der Proliferations-Indikatoren Zellzahl, WST- Metabolismus und ATP-Gehalt [69]	36
Abbildung 16 Absorption in Abhängigkeit vom Proben pH.....	37

Abbildung 17 Absorption je 1 Mio. Zellen in Abhängigkeit vom pH.....	38
Abbildung 18 ATP-Gehalt je 1 Mio. Zellen in Abhängigkeit von pH-Wert und Kultivierungsdauer	38
Abbildung 19 Absorption je 1 Mio. Zellen in Abhängigkeit von pH-Wert und Kultivierungsdauer	39
Abbildung 20 Venn-Diagramm der drei Vergleichsgruppen zwischen pH 7,4, pH 7,8 und pH 8,4.....	40
Abbildung 21 Schematisches Netzwerk regulierter Signalwege bei pH 7,8 [69]	43
Abbildung 22 Kalziumabscheidung bei Langzeitkultur unter Standard-pH- Bedingungen und bei pH 7,8 [69]	44
Abbildung 23 pH-Werte in zellfreiem Medium über alkalisierender Matrix	45
Abbildung 24 Medium-pH im Modellsystem an den Versuchstagen 1, 3, 5 und 7 [74]	46
Abbildung 25 Zellzahl in Kontrolle und Modellsystem über sieben Versuchstage	47
Abbildung 26 Proliferation im Modellsystem (MC3T3-Zellen) [74].....	48
Abbildung 27 Fluoreszenzfärbung der Zellen und der ECM im Modellsystem	49
Abbildung 28 Proliferation im Modellsystem (humane Osteoblasten)	49
Abbildung 29 im Modellsystem regulierte Signal- und Stoffwechselwege.....	50
Abbildung 30 Hierarchisches Cluster der im Modellsystem am stärksten regulierten Gene.....	51
Abbildung 31 Zellrasen zu Beginn des Wound healing-Assays und nach 48 h.....	53
Abbildung 32 Wound healing-Assay: Abhängigkeit der Zeit vom pH-Wert	53
Abbildung 33 Osteoblasten-Proliferation in Abhängigkeit der Kulturbedingungen	55
Abbildung 34 Osteoblasten-Proliferation in Abhängigkeit der Co-Kultur	55
Abbildung 35 Sezerniertes Kollagen nach mechanischer Stimulation	56
Abbildung 36 PGE2-Konzentration in konditionierten Osteozytenuberstanden	57
Abbildung 37 Schema zur pH-abhängigen Proliferation	60
Abbildung 38 Im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung wirkende Transkriptionsfaktoren und osteogene Marker [77]	62
Abbildung 39 Zusammenfassung der Stimulationsversuche	70

1. Einleitung

Gesunde Knochen spielen als Binde- und Stützgewebe eine bedeutende Rolle für die Lebensqualität jedes Menschen. Dabei beschreibt die Einteilung in diese Gewebegruppe nur eine der vielfältigen Funktionen unserer Knochen. Von den nur wenige Millimeter großen Gehörknöchelchen, die der Schallübertragung dienen, bis hin zu den langen Röhrenknochen, welche Ansatzpunkte für die Muskeln und Sehnen des Bewegungsapparates bieten, erfüllen Knochen verschiedenste Aufgaben. Die Struktur des Knochens hängt stark von seiner jeweiligen Funktion ab. Grundsätzlich besteht das Knochengewebe aus verschiedenen Zelltypen und der von ihnen produzierten mineralisierten extrazellulären Matrix (ECM). Zu den Zelltypen des Knochengewebes gehören hauptsächlich Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

Osteoblasten bilden die Knochenmatrix und differenzieren sich letztendlich zu Osteozyten, welche die zahlreichste und langlebigste Population der Knochenzellen darstellen. Osteoblasten durchlaufen während ihrer Entwicklung eine Sequenz von drei aufeinander folgenden Phasen: Zellproliferation, extrazelluläre Matrixreifung und Mineralisation [1]. Nur vollständig differenzierte Osteoblasten sind in der Lage die extrazelluläre Knochenmatrix zu bilden. Die Hauptkomponenten der extrazellulären Knochenmatrix sind zu 45% anorganische Mineralien wie die zahlreichen Hydroxylapatit-Kristalle und zu 30% organische Materialien wie die hauptsächlich vorliegenden Kollagenfibrillen. Den Osteoblasten in ihrer Funktion gegenüber gestellt sind die Matrix abbauenden Osteoklasten. Der Osteoklastenhaushalt wird über verschiedene Wirkstoffe maßgeblich durch die Osteoblasten beeinflusst [2,3]. Ausschlaggebende Faktoren sind vor allem der Osteoklasten aktivierende Receptor Activator of NF-κB Ligand (RANKL) sowie Osteoprotegerin, welches als Fangrezeptor für RANKL fungiert und so dessen Wirkung hemmt. Beide Moleküle werden von Osteoblasten sezerniert. Das Verhältnis dieser Moleküle und die resultierenden Wechselwirkungen zwischen den beiden Knochenzellpopulationen sind entscheidend für die Bilanz des Knochenumsatzes [4]. Insbesondere den Osteozyten wird als einzige permanent residente Zellpopulation die Rolle als Regulator des Knochenumsatzes zugesprochen. Eingelagert in die Knochenmatrix und über multizelluläre Netzwerke miteinander verbunden, sind sie in der Lage, mechanische und chemische Signale aus ihrer Umgebung zu integrieren und sowohl die Knochenbildung als auch die Resorption zu regulieren. Die Kommunikation innerhalb dieser Netze erfolgt zum einen direkt über Zell-Zell-Kontakte und zum anderen indirekt über sezernierte Signalmoleküle [5,6].

Die Zusammensetzung und Struktur des Knochens ist nicht homogen, sondern unterscheidet sich in den inneren als Spongiosa bezeichneten und den äußeren als Kompakta bezeichneten Bereichen. Die Spongiosa bildet ein engmaschig vernetztes System, das aus feinen Knochenbälkchen, den sogenannten Trabekeln, besteht und über das Knochenmark versorgt wird. Sie wird von der Kompakta umgeben, welche durch homogene Strukturen, den Osteonen, charakterisiert ist. Osteone bestehen aus Knochenlamellen, die konzentrisch den sogenannten Havers-Kanal umschließen, in welchem die Blutgefäße und Nervenstränge verlaufen. Mit interstitieller Flüssigkeit

gefüllte Canaliculi durchlaufen das Osteon radial und stehen mit dem Havers-Kanal in Kontakt. Über diese Kanäle erfolgt die Versorgung der Knochenzellen [7]. Die Belastbarkeit der Knochen ist vor allem abhängig von der jeweiligen Gestalt des Knochens und den mechanischen Eigenschaften des Knochenmaterials. Diese Faktoren können durch Umbauprozesse in gewissen Grenzen angepasst werden. Jährlich werden circa 10% des Skelettes umgebaut [8]. Dieser Prozess dient neben der Anpassung an veränderte mechanische Ansprüche auch der Vorbeugung von Materialermüdung und der Reparatur von Mikroschäden. Die Stabilität der Knochen verändert sich mit dem Alter. Die Knochenmasse nimmt zunächst etwa bis zum 30. Lebensjahr zu, verringert sich danach jedoch kontinuierlich [9]. Da die heutige Gesellschaft stark den Auswirkungen des demografischen Wandels unterliegt, nimmt die Inzidenz von Alterserkrankungen allgemein stetig zu [10]. Durch verschiedene Faktoren beeinflusst, können die Abbauprozesse im Knochen stark beschleunigt ablaufen. Die pathologische Abnahme der Knochendichte wird als Osteoporose bezeichnet und gehört zu den am weitesten verbreiteten Alterserkrankungen. Mit zunehmendem Alter kommt es häufiger zu einer metabolischen Azidose [11]. Da der pH-Wert eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Knochenremodellierung spielt [12], erscheint es plausibel, dass Osteoporose häufig mit einer solchen Azidose assoziiert ist [13]. Diese Umstände geben Anlass die Rolle des pH-Wertes sowohl bei der Pathogenese von degenerativen Erkrankungen wie Osteoporose, als auch vor dem Hintergrund potentieller therapeutischer Maßnahmen genauer zu untersuchen.

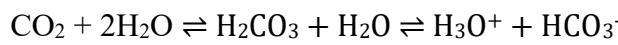
Neben dem Einfluss des extrazellulären pH-Wertes, ist die Rolle der mechanischen Belastung auf den Knochenumbau von größerer Bekanntheit. Seit langem ist das sogenannte Wolffsche Gesetz beschrieben, nach dem Knochen unter Belastung aufgebaut und bei fehlender Belastung abgebaut wird [14]. Diese These konnte auf der makroskopischen Ebene mehrfach bewiesen [15], der ihr zu Grunde liegende Mechanismus jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Zahlreiche Techniken zur Applikation von mechanischen Druck- oder Zugkräften auf Knochenzellen wurden etabliert, um den Mechanismus auf zellulärer Ebene zu untersuchen [16]. Neben diesen direkten Stimuli zeigten auch Flüssigkeitsströmungen und die aus ihnen resultierenden Scherkräfte einen großen Einfluss auf das Verhalten der Knochenzellen. Wie die Druck- und Zugkräfte beeinflusst der Flüssigkeitsstrom sowohl die Expression spezifischer Proteine als auch die morphologischen Eigenschaften der Zellen [17–19]. Eine ähnliche Strömung der Flüssigkeit in den Canaliculi der Knochen bei Belastung könnte somit ebenfalls einen Einflussfaktor auf die Knochenumbauprozesse in Folge mechanischer Beanspruchung darstellen. Eine Abgrenzung der verschiedenen Einflussfaktoren ist selbst in den bestehenden *in vitro* Systemen nicht immer möglich.

Um die Mechanismen der Regenerationsprozesse vollständig zu ergründen und aus den Ergebnissen Therapieansätze für unsere alternde Gesellschaft ableiten zu können, sind weitere Untersuchungen und verbesserte *in vitro* Systeme nötig.

2. Stand der Wissenschaft und Zielstellung

2.1 Extrazellulärer pH-Wert

In vivo wird der systemische pH-Wert stark reguliert und in engen Grenzen von pH 7,35 – 7,45 stabilisiert [20]. Diese Säure-Base-Homöostase wird durch verschiedene Puffersysteme aufrechterhalten. Den größten Einfluss auf den Säure-Base-Haushalt im Blut und in den Geweben hat das Carbonat-Puffersystem. Dem Puffersystem liegen folgende Reaktionen zu Grunde.



Protonen und Bicarbonat-Ionen können über die Nieren ausgeschieden oder zurückgehalten werden. Das CO₂ hingegen kann über die Lungen abgeatmet werden. Die schnelle Regulation des pH-Wertes durch Steigerung oder Absenkung des CO₂ Partialdruckes über die Atmung wird als respiratorische Regulation bezeichnet. Durch Fehlatmung kann sowohl eine respiratorische Azidose als auch Alkalose hervorgerufen werden. Dem gegenüber stehen die metabolische Azidose und Alkalose, denen Stoffwechselstörungen zu Grunde liegen. Da diesen häufig weniger schnell entgegenzuwirken ist, sind sie oftmals von größerer klinischer Relevanz als die respiratorisch bedingten Störungen des Säure-Base-Haushalts.

Azidose ist in der Pathogenese verschiedener Stoffwechselerkrankungen involviert und stimuliert unter anderem bei Menschen die Freisetzung von Knochenmineral [21]. Weiterhin wirkt sich eine Azidose negativ auf die Knochenmineralisierung aus [12]. Ein gegenläufiger Effekt wurde bei einer metabolischen Alkalose beobachtet, bei der die Knochenresorption inhibiert und die Kollagensynthese durch Osteoblasten stimuliert wurde [22]. Der pH-Wert spielt damit auch eine zentrale Rolle bei der Steuerung der Knochenremodellierung [23]. *In situ* fördert ein niedriger pH-Wert die Osteoklastenaktivität. Die Osteoklasten-vermittelte Knochenresorption verläuft bei pH 7,0 maximal und wird oberhalb von pH 7,4 eingestellt [24]. Obwohl bekannt ist, dass der pH-Wert des intrazellulären und extrazellulären Milieus eine große Rolle bei vielen biochemischen Reaktionen spielt, sind Studien, die die Auswirkungen dieses Parameters und den zu Grunde liegenden Mechanismus *in vitro* untersuchen, relativ selten. Eine mögliche Ursache könnte die weite Verbreitung und der gewohnheitsmäßige Gebrauch des Natrium/Hydrogencarbonat-Puffersystems in der Kultur fast aller Zelltypen sein. Dieses Puffersystem stabilisiert einen pH-Wert von 7,4, um dem systemischen Blut-pH zu entsprechen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Bedingungen in den verschiedenen Geweben, wie Muskel, Gehirn oder Knochen zu starken lokalen Änderungen des systemischen pH-Wertes führen. Einen Hinweis darauf liefert zum Beispiel Untersuchungen zum pH-Wert im Muskel nach körperlicher Belastung [25]. Die lokal unterschiedlichen pH Bedingungen implizieren pH-Optima für die verschiedenen Zelltypen. Diese Optima könnten erheblich vom Blut-pH und voneinander abweichen, sodass ein kritischer Blick auf die spezifischen pH Bedürfnisse der verschiedenen Zelltypen empfehlenswert zu sein scheint. In den wenigen Arbeiten, die sich mit dem

Einfluss unterschiedlicher pH-Werte auf Knochenzellen befassten, wurden die Zellreaktionen nur über relativ kurze Versuchszeiträume von 0,5-48 h beobachtet. Nichtsdestotrotz konnten in diesen Arbeiten deutliche Effekte des extrazellulären pH-Wertes auf den Zellmetabolismus gezeigt werden. Kaysinger und Ramp berichten über eine Steigerung der Aktivität adulter menschlicher Osteoblasten mit steigendem pH-Wert im Bereich von pH 7,0- pH 7,6 [26,27]. Weiterhin belegten Studien über den Einfluss des Medium-pH auf die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in eine osteogene Zelllinie die erhebliche Bedeutung des extrazellulären pH-Wertes in der Knochenphysiologie [28,29]. Über den Einfluss eines deutlich alkalischen Medium-pH auf das Proliferationsverhalten von Osteoblasten gibt es bisher keine ausreichenden Studien. Um auch diesen Aspekt zu beleuchten, haben im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens über einen längeren Kulturzeitraum ausführliche Untersuchungen der Proliferation und der Aktivität von Osteoblasten bei unterschiedlichen pH-Werten stattgefunden. Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Entwicklungsphasen Matrixreifung und Mineralisierung komplementieren das Bild.

Neben einem potentiellen therapeutischen Wert, könnte die Einstellung des pH-Wertes auch in der 3D-Zellkultur von großem Nutzen sein. Momentan sind die Versorgung mit Medium und Sauerstoff in den 3D-Scaffolds Forschungsschwerpunkte [30]. Aktuelle Untersuchungen zielen hauptsächlich auf die Etablierung einer dynamischen Kultur ab, um die Sauerstoffversorgung zu erhöhen [31]. Die Problematik der ausreichenden Sauerstoffversorgung könnte jedoch von geringerer Bedeutung sein als vielmehr die Entfernung des CO₂ aus dem System, um die Ansäuerung durch gelöstes Carbonat zu vermeiden. Eine Anpassung des pH-Wertes könnte eine einfache Möglichkeit darstellen, um nachteilige Auswirkungen auf die Zellproliferation und den Zellstatus durch Übersäuerung des Milieus zu vermeiden und so die Vitalität der Zellen auch während der statischen Zellkultur in 3D-Scaffolds zu verbessern.

2.2 Modifizierte Implantate

Der orthopädische Implantat-Sektor bildet einen immer größer werdenden Teil der biomedizinischen Industrie. Dabei können vier Hauptanwendungen der Implantat-Technologie unterschieden werden, der rekonstruktive Gelenkersatz, Wirbelsäulen-Implantate, orthobiologische Implantate und Trauma-Implantate [32]. Um ihrer Funktion gerecht zu werden, müssen orthopädische Implantate neben der generellen Stabilität und Biokompatibilität Eigenschaften aufweisen, welche an die jeweiligen Anwendungsgebiete angepasst sind. Zu diesem Zweck wurden verschiedenste Biomaterialien mit unterschiedlichen mechanischen und chemischen Eigenschaften entwickelt und charakterisiert [32]. Implantate können aus einem einzigen Typ von Biomaterial bestehen, wie in chirurgischen rostfreien Stahlplatten, oder aus verschiedenen modularen Komponenten aufgebaut sein, wie in vielen Hüftgelenks-Ersatzsystemen, die Titan, Kobalt-Chrom-Legierung, Polyethylen und Polymethylmethacrylat (PMMA) enthalten können. Titan und seine Legierungen werden häufig als Implantatmaterialien verwendet, da die sich natürlich bildende Oxidschicht sowohl biokompatibel als auch bioaktiv ist [33]. Dennoch gibt es zwei Hauptprobleme,

denen sich die Implantat-Technologie nach wie vor stellen muss. Die Anfälligkeit des inerten Implantatmaterials für die Ansiedlung eingebrachter oder zirkulierender Bakterien und die sogenannte aseptische Lockerung durch suboptimale Osseointegration. Als Osseointegration bezeichnet man den direkten strukturellen und funktionellen Verbund von Implantat und umliegendem Knochengewebe [34]. Sowohl das Design des Implantates als auch die Materialeigenschaften müssen an die jeweilige biologische Funktion und Umgebung optimal angepasst sein, um erfolgreich integriert zu werden. Um die Osseointegration zu optimieren gibt es diverse Strategien. Die Modifikation von Implantatmaterialien kann auf physikalischen oder chemischen Ansätzen basieren. Physikalische Ansätze beinhalten hauptsächlich die Modifikation der Oberflächentopographie oder -energie [32]. Durch Verfahren wie Säureätzen, Sandstrahlen oder Eloxieren kann die Oberflächenrauhigkeit der Materialien erhöht und so die Adsorption von Matrix-Proteinen und das Anwachsen von Knochenzellen verbessert werden [35]. Chemische Ansätze umfassen Methoden zur Schaffung einer bioaktiven Oberfläche zum Beispiel durch das Auftragen von Beschichtungen [32]. Dabei werden vor allem organische Moleküle wie Wachstumsfaktoren, Peptide oder Enzyme in die Beschichtung eingetragen, um spezifische Zellantworten auszulösen. Häufig wird Kalziumphosphat als Beschichtungsmaterial verwendet, da es dem Knochenmaterial sehr ähnlich ist und es für seine bioaktiven Eigenschaften bekannt ist [36]. Um dem Problem der Implantat-assoziierten Infektionen zu begegnen, wurden ebenfalls Antibiotika in Beschichtungsmaterialien verwendet [37]. Ihre routinemäßige Anwendung in der Implantat-Technologie ist auf Grund des Risikos der Vermehrung Antibiotika-resistenter Pathogene jedoch bisher nicht vorgesehen. An alternativen Modifikationen, die eine antibakterielle Wirkung versprechen, wird derzeit intensiv geforscht.

2.3 Mechanische Stimulation

Bereits im 19. Jahrhundert erkannte man, dass Knochen unter Belastung aufgebaut und bei fehlender Belastung abgebaut wird. Diese Beobachtung wurde in dem sogenannten Wolffschen Gesetz formuliert [14], welches bis heute Gültigkeit hat. In der aus diesem Gesetz abgeleiteten „Mechanostathypothese“ gibt Frost ein Intervall vor in dem ein Knochenaufbau und -umbau stattfinden kann, während eine mechanische Über- oder Unterbelastung destruktive Reaktionen des Knochens auslöst [38,39]. So können lange Ruhezustände des Skelettsystems, zum Beispiel durch Bettlägerigkeit oder funktionelle Immobilisierung, eine massive Abnahme der Knochensubstanz zur Folge haben [40,41], während eine erhöhte mechanische Belastung nachweislich zu einer Zunahme der Knochenmasse führt [42]. Der zu Grunde liegende Mechanismus konnte auf zellulärer Ebene bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden, da die Knochenregeneration ein sehr komplexer Prozess ist, der vielfältigen Regulationsmechanismen unterliegt. Neben hormonellen und nervalen Regulationsmechanismen wird den mechanischen Reizen eine zentrale Bedeutung zugeschrieben.

Bei mechanischer Belastung wirken Dehnungs- und Kompressionsprozesse auf die Zellen ein. Das Ausmaß der Dehnung wird in Strain angegeben und berechnet sich aus dem Quotienten der Längen- oder Flächenänderung zu der Ursprungslänge

beziehungsweise -fläche. Physiologische Werte schwanken zwischen nur wenigen μ Strain bei geringer Beanspruchung bis über 3000 μ Strain bei starker Belastung, wie zum Beispiel beim Bergab Laufen [43]. Zahlreiche Techniken zur Applikation von mechanischen Druck- oder Zugkräften auf Knochenzellen wurden etabliert, um den Mechanismus auf zellulärer Ebene zu ergründen [16]. Da es bei Belastungen wahrscheinlich auch zu Bewegungen der Flüssigkeitssäule in den Canaliculi der Knochen kommt, wurden neben den Druck- oder Zugkräften auch Scherkräfte auf ihren Einfluss auf Knochenzellen untersucht. Wie die Druck- und Zugkräfte beeinflusst der Flüssigkeitsstrom sowohl die Expression spezifischer Proteine als auch die morphologischen Eigenschaften der Zellen [17–19,44]. In den bisherigen Arbeiten zum Thema der mechanischen Stimulation wurde häufig nur der direkte Einfluss eines einzelnen Faktors auf eine bestimmte Zellart untersucht, wobei es sich oftmals um Osteoblasten handelte [45,46]. Da Osteozyten die bei Weitem größere Knochenzellpopulation ausmachen und in den Knochenstrukturen selber verankert sind, ist es jedoch wahrscheinlicher, dass Osteozyten als Mechanosensoren dienen. Mittlerweile ist diese These allgemein anerkannt und der Fokus der Forschung verschiebt sich auf die Mechanismen, die den Osteozyten ermöglichen die mechanische Belastung wahrzunehmen und weiterhin auf die Zellantworten, die daraufhin die Regulation des Knochenumbaus bewirken [47,48]. Es gibt viele Signalmoleküle, die von Osteozyten als Reaktion auf eine mechanische Stimulation sezerniert werden und mit dem Knochenanabolismus verbunden sind. Zu ihnen gehören zum Beispiel NO, ATP, PGE2, SOST, DKK1, IGF-1, SDF-1 und FGF23 [6]. Obwohl bekannt ist, dass alle Knochenzelltypen einander über Signalmoleküle wie die hier aufgeführten beeinflussen [49], sind Studien, in denen das Zusammenspiel verschiedener Zellarten in einem System betrachtet wird, immer noch selten.

2.4 Co-Kultur

Um zelluläre Mechanismen unter möglichst konstanten Rahmenbedingungen untersuchen zu können, wurden verschiedene *in vitro* Systeme entwickelt. Diese erlauben es Zellantworten auf einen definierten Stimulus hin zu analysieren, ohne dass Umwelteinflüsse und systemische Gegenregulationen die Ergebnisse überlagern oder verfälschen. Um den Versuchsaufbau möglichst simpel und eindeutig zu gestalten wurde in den meisten Fällen nur ein einzelner Zelltyp beziehungsweise nur eine bestimmte Zelllinie betrachtet. Nachdem mittlerweile jedoch viele grundlegende Mechanismen bekannt und verstanden sind, rückt das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen immer mehr in den Fokus. Die in fast allen Geweben vorkommenden Fibroblasten haben zum Beispiel *in vitro* einen erheblichen Einfluss auf zahlreiche andere Zelltypen [50]. Sie können sowohl das Wachstum als auch die Expressionsmuster von Zellen beeinflussen und sind daher mitunter in der Tumorforschung von großem Interesse [50]. Ebenfalls mit Hinblick auf pathologische Zustände werden Co-Kulturen aus Lungenepithelzellen und Immunzellen genutzt, um die Auswirkungen von Feinstaub und Nanopartikeln auf die Lunge zu studieren [51]. Ein weiteres Forschungsgebiet, in dem Co-Kulturen häufig Anwendung finden, ist die Stammzellforschung. Sowohl in der Neurologie als auch in

der Orthopädie konnten intensive Wechselwirkungen zwischen Stammzellen und ausdifferenzierten Zellen gezeigt werden [52,53]. In der orthopädischen Forschung sollen sich diese Wechselwirkungen vor allem im Bereich des „Tissue Engineering“ zu Nutze gemacht werden, um mit Gefäßen durchzogenes Knochengewebe zu erzeugen [54]. Zuvor trugen Co-Kulturen aus den verschiedenen Knochenzelltypen bereits zu der Erkenntnis bei wie Osteoblasten den Osteoklastenhaushalt beeinflussen und so den Knochenumbau steuern [2,3]. Heute befassen sich Studien vermehrt auch mit den Osteozyten, welche auf Grund ihrer Lage innerhalb der Knochenmatrix mit den damaligen Methoden für Untersuchungen nur schwer zugänglich waren. Studien, in denen der Einfluss der Signalübertragung zwischen Osteozyten und Osteoblasten und das Zusammenspiel zwischen diesen beiden Zellpopulationen betrachtet werden soll, finden bisher trotzdem zu meist nur mit Hilfe konditionierter Medien statt [55,56]. Bei diesem Vorgehen kann jedoch nicht abgeschätzt werden ob die Konzentration kurzlebiger Signalmoleküle oder Second messenger, wie zum Beispiel NO und PGE2 während der Medienübertragung in unphysiologische Bereiche verschoben wird. Aus diesem Grund soll der im Rahmen dieser Doktorarbeit geplante Versuchsaufbau angepasst werden, um besser den physiologischen Bedingungen zu entsprechen.

2.5 Zielstellung

Zellen sind in ihrer Mikroumgebung zahlreichen Stimuli ausgesetzt. Zu ihnen gehören beispielsweise Zell-Zell-Interaktionen, lösliche Faktoren sowie das Einwirken physikalischer Kräfte. Diese Stimuli lösen spezifische Zellantworten aus, zu denen Proliferation, Differenzierung und eine veränderte Biosynthese gehören können. Die untenstehende Abbildung gibt eine allgemeine Übersicht diverser Stimuli und Zellreaktionen wieder. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen ausgewählter Stimuli auf das Verhalten von Knochenzellen.

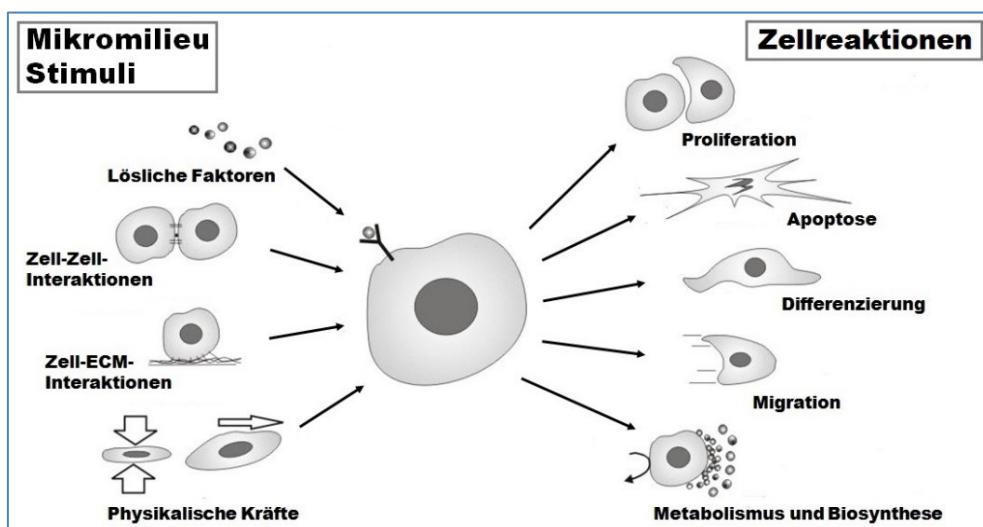


Abbildung 1 Übersicht Stimuli und Zellreaktionen nach Ou und Hosseinkhani [30]

Eines der Hauptanliegen dieser Arbeit war die Optimierung der Kultivierungsbedingungen für Osteoblasten *in vitro*. Dazu sollen ausführliche

Untersuchungen der Proliferationsphase sowie der Differenzierungsphasen Matrixreifung und Mineralisierung bei unterschiedlichen pH-Werten stattfinden. Die Optimierung der Parameter *in vitro* kann nicht nur eine Verbesserungsmöglichkeit für die Zellkultur darstellen, sondern auch neue Möglichkeiten zur Behandlung von Knochendefekten aufzeigen. So soll hier weiterhin ein Modellsystem für ein Implantat vorgestellt werden, welches in der Lage ist den pH-Wert in der Mikroumgebung zu modifizieren. Beurteilt wird dessen Einfluss auf Zelleigenschaften von Osteoblasten wie zum Beispiel Wachstumsverhalten, Metabolismus und Biosynthese.

Um die der Knochenregeneration zu Grunde liegenden Prozesse besser zu verstehen, ist die Etablierung eines modifizierbaren *in vitro* Modells, in dem verschiedene Faktoren einzeln variierbar sind und welches gleichzeitig möglichst den physiologischen Bedingungen entspricht, erstrebenswert. Ein weiteres Anliegen dieser Arbeit war daher erste Ansätze zu einem solchen Modell zu verfolgen. Zu diesem Zweck wurde ein Co-Kultur-System etabliert, in dem während der Kultivierung eine mechanische Stimulation erfolgen konnte. Hierbei wurde sich vor allem mit den Wechselwirkungen zwischen Osteozyten und Osteoblasten befasst, wobei vorrangig die Osteozyten einer mechanischen Stimulation ausgesetzt werden. Dadurch trägt dieses System gleichermaßen der vielfach postulierten Bedeutung der Osteozyten als Mechanosensoren sowie der Effektorfunktion der Osteoblasten Rechnung.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
CO ₂ Inkubator	SANYO (Panasonic), Hamburg, DE
Mikroskop CK 40	Olympus GmbH, Hamburg, DE
Konfokales Laser-Raster-Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, DE
Zentrifuge Rotofix 32 A	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, DE
Zentrifuge himac CT15RE	Hitachi, Düsseldorf, DE
LumiStar	BMG Labtech GmbH, Ortenberg, DE
PolarStar	BMG Labtech GmbH, Ortenberg, DE
Automated cell counter TC20	BioRad Laboratories GmbH, München, DE
pH-Meter Five Easy TM	Mettler Toledo, Gießen, DE
InLab Mikro-pH-Elektrode	Mettler Toledo, Gießen, DE
Microplate reader Infinite 200 PRO	Tecan Group Ltd, Männedorf, CH
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Nanodrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Waldbronn, DE
GeneChip® Hybridisierungsofen 645	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Genechip-Scanner 3000	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Ibidi Heating System (universal fit)	ibidi GmbH, Planegg / Martinsried, DE
USB-Kamera	OCS.tec GmbH & Co. KG, Neuching, DE
Ultraschallsensor inkl. Software	Fraunhofer-Institut für Zerstörungsfreie Prüfverfahren IZFP

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatten (6-,12- und 24-Wellformat)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Testplatten 96-Well transparent	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Nunc TM Testplatten 96-Well weiß	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
BioFLEX [®] Culture Plates	Flexcell International Corporation, Burlington, NC, USA
Zellkultureinsätze ThinCert TM , 6-Well transparent	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Dünnwandiger PUR-Schlauch	Raumedic, Helmbrechts, DE
Falkons (15 ml + 50 ml)	TPP, Trasadingen, CH
Reaktionsgefäße	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kultur-Insert 2 Well	ibidi GmbH, Planegg / Martinsried, DE
μ-Slide 2 Well Glass Bottom	ibidi GmbH, Planegg / Martinsried, DE

3.1.3 Zellen und Medien

Material	Hersteller
MC3T3-E1	Leibnitz-Institut DSMZ, Braunschweig, DE
MC3T3 sc 14	LGC Standards, Wesel, DE
MLO-Y4	bereit gestellt vom Institut für unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm, DE
Primäre humane Osteoblasten	bereit gestellt von der Orthopädischen Klinik und Poliklinik, Rostock, DE
Kollagen A	Biochrom, Berlin, DE
α Minimum Essential Medium F0915	Biochrom, Berlin, DE
α Minimum Essential Medium (Pulver)	PanBiotech, Eidenbach, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium	PanBiotech, Eidenbach, DE
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, Eggenstein, DE
Bovine Calf Serum, Iron Fortified	SAFC, Buchs, CH

PenStrep-Lösung	Biochrom, Berlin, DE
Amphotericin B	Biochrom, Berlin, DE
L-Glutamin-Lösung	Whittaker Bioproducts, Baltimore, MD, USA
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
beta-Glycerin-phosphat Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Calcitriol (α 1,25(OH)2Vitamin D3)	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
Trypsin-EDTA (0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA)	Gibco, Eggenstein, DE
Kollagenase A	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Dispase II	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

3.1.4 Chemikalien und Lösungen

Reagenz	Hersteller
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Paraformaldehyd	Fluka, Buchs, CH
Alizarin Red S	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Phalloidin Konjugat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Trizol	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Polyvinylalkohol (PVA)	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, DE
Titanoxid (TiO ₂)	Fluka, Buchs, CH

3.1.5 Assays, Kits und Antikörper

Assay	Hersteller
ATPlite-Assay	PerkinElmer, Rodgau, DE
WST-Assay	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA

Anti-Collagen Typ 1 Primärantikörper (rabbit)	Rockland Immunochemicals Inc. Limerick, PA, USA
Anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 Konjugat (goat)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
RNeasy Plus-Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNA-Pico-Chip-Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, DE
GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST Array	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
TaqMan™ Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Primer DMP1 (Mm01208363_m1)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
Primer FABP4 (Mm00445878_m1)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
Primer SFRP2 (Mm01213947_m1)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
Primer TNFRSF19 (Mm00443506_m1)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
Primer ATF4 (Mm00515324_m1)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
Collagen alpha-1(I) chain ELISA Kit	Wuhan EIAab Science, Guangguguoji, CHN
SDF-1 alpha Mouse ELISA Kit	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
IGF-1 Mouse ELISA Kit	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
Prostaglandin E2 High Sensitivity ELISA Kit	Abcam, Cambridge, UK

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur und Medien

Im Laufe der Doktorarbeit wurde hauptsächlich mit zwei verschiedenen Knochenzelltypen gearbeitet. Dabei handelte es sich zum einen um die Osteoblasten-Zelllinie MC3T3, sowie deren Subklon MC3T3 sc 14 und zum anderen um eine der äußerst wenigen aus Osteozyten entwickelten Zelllinien, MLO-Y4. Neben Versuchen an Osteoblasten-Monokulturen wurde die Etablierung einer Co-Kultur angestrebt. Um mögliche Probleme auf Grund einer Interspezies-Heterogenität zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass beide Zelllinien murinen Ursprungs sind. Während die MC3T3-Zellen ursprünglich aus der Calvaria einer neugeborenen Maus extrahiert wurden [57], stammen die MLO-Y4 aus Röhrenknochen transgener Jungtiere [58]. Die Kultivierung im begasten Brutschrank (gesättigte Wasserdampf atmosphäre, 37 °C, 5 % CO₂) und Passagierung der Zellen vor Versuchsbeginn erfolgten nach Standardprotokollen in T25-Kulturflaschen. Im Falle der Osteozyten mussten diese zuvor mit Kollagen A beschichtet werden. Dazu wurde der Boden der Kulturflasche vor Einsaat der Zellen mit 0,1 mg/ml Kollagen A überschichtet und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Als Kulturmedium wurde das carbonatpuffer-haltige Grundmedium α -Minimum Essential Medium (α -MEM) mit 2,0 g/l NaHCO₃ verwendet und zusätzlich mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin-Lösung und 1 % Pentamycin-Streptomycin-Stocklösung versetzt. Die Kultivierung der MLO-Y4 erfolgte im gleichen Grundmedium, jedoch wurde statt ausschließlich FBS eine Mischung aus 5 % FBS und 5 % eisenversetztem Fetal Calf Serum (FCS) verwendet.

Im Rahmen der Arbeit sollten die Auswirkungen erhöhter extrazellulärer pH-Werte auf das Verhalten von Osteoblasten untersucht werden. Es soll zwischen Proliferationsverhalten und Differenzierungsverhalten unterschieden werden. Die Experimente dazu werden im Folgenden getrennt betrachtet.

Proliferationsversuche

Für die Experimente zur pH-abhängigen Proliferation wurde pulverförmiges α -MEM genutzt, welches keinen Carbonatpuffer enthält. Es wurde entsprechend den Herstellerangaben in Analysenwasser gelöst und mit 20 mM HEPES als alternativem Puffersystem versetzt. HEPES wurde als Puffer eingesetzt, da es zu den zwitterionischen Good's Puffern gehört [59], die anders als die flüchtigen Carbonatpuffersysteme nur geringfügig vom umgebenden CO₂-Partialdruck abhängen. Damit ist die Stabilität des pH-Wertes auch während der Arbeit unter der Sterilwerkbank gewährleistet. Nach Zugabe von 10 % FBS, 1 % L-Glutamin-Lösung und 1 % der Pentamycin-Streptomycin-Lösung wurde der jeweilig erwünschte pH-Wert mit 0,1 M HCl- beziehungsweise NaOH-Lösung eingestellt. Der optimale Arbeitsbereich des HEPES-Puffer liegt zwischen pH 6,8 und pH 8,2 [60]. Um im Zentrum dieses optimal stabilisierten Bereiches zu arbeiten, wurden Medien pH-Werte zwischen pH 7,2 und pH 7,8 zur ausführlichen Untersuchung der pH-Abhängigkeiten gewählt. Neben den Versuchen bei pH 7,2, pH 7,4, pH 7,6 und pH 7,8 wurden für einzelne Teilversuche auch Medien außerhalb des optimalen Pufferbereiches angesetzt. So wurden zum Beispiel für einen Übersichtsversuch in 0,2er

Schritten alle pH-Werte zwischen pH 7,2 und pH 9,0 eingestellt und weitergehende Versuche bei pH 8,4 durchgeführt. Zuletzt wurde das Medium stets sterilfiltriert. Die Kultivierung fand in einem Inkubator unter atmosphärischer CO₂-Konzentration statt. Um alle Wachstumsphasen abzubilden, wurden zu Beginn jedes Versuchsdurchlaufes geringe Zellzahlen ausgesät und diese Kulturen bis über die Konfluenz hinaus untersucht. Dazu wurden 20.000 Zellen je Well einer 24-Well-Platte in 500 µl Medium ausgesät und über sechs Tage analysiert. Um die Stabilität der anfänglich eingestellten pH-Werte über den gesamten Versuchszeitraum zu gewährleisten, wurde der pH täglich kontrolliert und anschließend die Hälfte des Mediums ausgetauscht. Die Vitalität der Zellen und ihre Proliferation wurden unter Verwendung von Standardverfahren gemessen, welche gesondert erläutert werden. Zu ihnen gehören die Zellzahlbestimmung, die Bestimmung des WST-1 Umsatzes, sowie die Messung der ATP-Konzentration. Die statistische Auswertung der Versuchsdaten erfolgte mit Hilfe des Programmes SigmaPlot. Die einzelnen Versuchsgruppen umfassten sofern nicht anders angegeben für alle Messungen einen Stichprobenumfang von jeweils n=10.

Differenzierungsversuche

Für Langzeitversuche, bei denen die Eigenschaften differenzierter Osteoblasten untersucht werden sollten, wurde auf den Subklon MC3T3 sc 14 zurückgegriffen. Im Gegensatz zu der Grundzelllinie, welche nach mehrfachem Passagieren eine gewisse Heterogenität im Ausmaß der Differenzierung aufweisen soll, wird dem Subklon sc 14 generell ein sehr hohes Differenzierungspotential zugesprochen [61]. Wie für die Proliferationsversuche wurden zu Versuchsbeginn 20.000 Zellen je Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Medien entsprachen in ihrer Zusammensetzung ebenfalls den zuvor beschriebenen Versuchsmedien. Auf Grund des erhöhten zeitlichen Aufwandes wurden nur wenige pH-Werte zur Untersuchung der pH-Wert abhängigen Differenzierung ausgewählt. Analysiert wurden Langzeitkulturen bei Medium pH-Werten von pH 7,4, 7,8 und 8,4. Diese Werte entsprechen dem Standard pH-Wert, dem Höchstwert der ursprünglichen Proliferationsversuche, sowie einem pH-Wert außerhalb des optimalen Pufferbereiches, der jedoch im Übersichtsversuch die größten Veränderungen auslöste. Nachdem die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden Zusatzstoffe eingesetzt, um das Gleichgewicht weg von übermäßiger Proliferation hin zu Differenzierungsprozessen zu verschieben. Zu diesem Zweck wurde den Medien 10 mg/ml beta-Glycerin-phosphat und 10 ng/ml Calcitriol zugesetzt. Für beide Substanzen sind differenzierungsfördernde Eigenschaften beschrieben [62,63]. Auf Grund der höheren Zellzahlen wurden die Zellen während der Langzeitkultivierung mit 1 ml Medium (statt 500 µl) überschichtet, welches alle zwei Tage zu 75 % ausgetauscht wurde. Ein vollständiger Medienwechsel wurde vermieden, um eine Modifikation des Mediums durch die Osteoblasten nicht zu unterdrücken. Die Genexpression, sowie das Kalzifikationsvermögen der Zellen wurden nach 14 beziehungsweise 21 und 28 Tagen in Kultur untersucht. Dazu wurden GeneChip®-Arrays ausgewertet beziehungsweise ein Alizarin Red Assay durchgeführt, wie nachfolgend erörtert.

Humane Osteoblasten

Neben den murinen Zelllinien wurde im späteren Verlauf auch mit primären humanen Osteoblasten gearbeitet. Diese wurden freundlicherweise vom Forschungslabor für Biomechanik und Implantatechnologie der Universitätsmedizin Rostock zur Verfügung gestellt. Die Zellen stammen aus bei chirurgischen Eingriffen entfernten Hüftköpfen. Die nachfolgend beschriebene Zellisolation wurde von der Arbeitsgruppe Geweberegeneration um Prof. Bader durchgeführt.

Zunächst wurde die Spongiosa mittels Meißel aus dem Hüftkopf gelöst und in eine sterile mit 20 ml PBS gefüllte Petrischale übergeführt. Nach mehreren Waschschritten wurde die Spongiosa mit einer Schere zerkleinert, in 50 ml Falkons übertragen und mit 3 ml Kollagenase A, 3ml DMEM und 6 ml Dispase II überschichtet. Nach 3 h auf einem Schüttler bei 37°C und 120 rpm, wurde die verdaute Spongiosa filtriert und anschließend 8 min bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm² Zellkulturflasche gegeben. Zuletzt wurden 7 ml DMEM mit 10 % FCS, 1 % Pentamycin-Streptomycin, 1 % Amphotericin B und 1 % Hepespuffer in die Zellkulturflaschen hinzugegeben. Anschließend wurden vorverdünnte Lösungen von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat und Dexamethason hinzupipettiert, sodass Endkonzentrationen von 50 μ g/ml Ascorbinsäure, 10 mM β -Glycerophosphat und 100 nM Dexamethason vorlagen. Nach ein bis zwei Tagen bei 37°C und 5 % CO₂ erfolgte ein Medienwechsel, bei dem die zahlreichen Erythrozyten im Überstand entfernt wurden. Die Zellen wurden bei ungefähr 80 %-iger Konfluenz in 75 cm² Zellkulturflaschen im Verhältnis 1:6 passagiert. Anschließend wurden die Osteoblasten bei ausreichender Dichte für die am Lehrstuhl für Biophysik durchgeführten Zellkulturversuche verwendet.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde zunächst das jeweilige Medium entfernt und der Zellrasen mit temperiertem PBS gewaschen. Anschließend wurde ausreichend Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben um sie vollständig zu bedecken. Nach einer circa 5-minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurde die Trypsinierung durch Zugabe einer entsprechenden Menge FBS-haltigem Medium abgestoppt und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde die Zellzahlbestimmung überwiegend mit Hilfe des Automated cell counter TC20 durchgeführt. Die Probenaufbereitung erfolgte dazu wie bei der manuellen Auszählung. Bei voraussichtlich sehr geringen Zellzahlen beziehungsweise einer geringen Zellkonzentration in der Probe wurden diese vor der Auszählung mit 800 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und in einem geringeren definierten Volumen aufgenommen.

3.2.3 WST-Assay

Die metabolische Aktivität der Zellen sowie die Zellproliferation wurde mit dem kommerziellen Zellproliferations Reagenz WST-1 bestimmt. Bei WST-1 handelt es sich um ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz. Es wird, wie in der untenstehenden Abbildung illustriert, durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase System, welches zur Atmungskette der Mitochondrien gehört, zu Formazan gespalten. Die Menge des gebildeten Formazan-Farbstoffs korreliert nach Herstellerangaben direkt mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen in der Kultur. Ein allgemeines Protokoll befindet sich im Anhang.

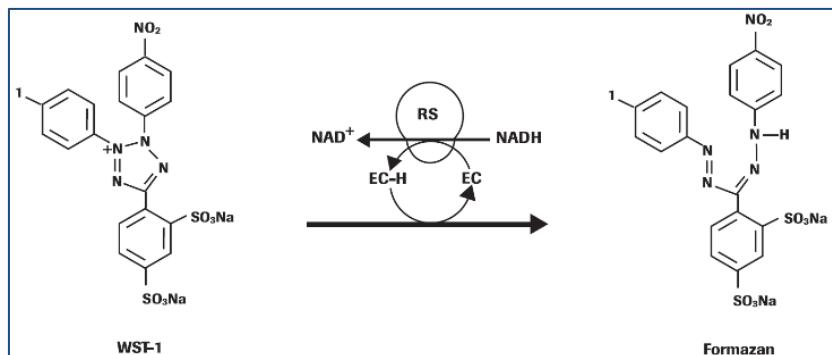


Abbildung 2 Spaltung von WST-1 in Formazan
EC=electron coupling reagent RS=mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system

Zur Durchführung des Assays wurde zunächst dem jeweiligen Kulturmedium entsprechendes frisches Medium mit 1 % WST-1-Reagens versetzt. Anschließend wurde das Kulturmedium aus den jeweiligen Proben-Wellen vollständig abpipettiert und mit dem gleichen Volumen frischen WST- Mediums ersetzt. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C im zur vorherigen Kultivierung verwendeten Inkubator. Zuletzt wurden die Kulturüberstände mit je vier Replikaten á 100 µl in eine transparente 96-Well-Platte übertragen. Als Negativ-Kontrolle diente ohne Zellkontakt mitgeführt WST-Medium. Die optische Absorption konnte in einem Plattenreader bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen werden (Software Fluostar Galaxy).

Da keine Informationen zu einer eventuellen pH-Abhängigkeit des Assays vorlagen, wurden neben den die Proliferationsversuche begleitenden WST-Assays, weitere Tests durchgeführt, um die Eigenschaften dieses Assays eingehender zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zwei Tests bei gleicher Zellzahl durchgeführt. Dazu wurden die MC3T3-Zellen jeweils in hohe Dichte (etwa 250.000 Zellen pro Well einer 12-Well-Platte) ausgesät und unter Standard-pH-Bedingungen kultiviert bis sie adhärent und konfluent waren.

In einem ersten Ansatz wurden auch während der Inkubationszeit für alle Proben Standard-pH-Bedingungen beibehalten. Erst nachdem die Überstände in die 96-Well-Testplatten übertragen wurden, erfolgte eine Änderung des pH-Wertes. Dazu wurden jeweils 10 µl einer NaOH-Lösung in verschiedenen Konzentrationen (0 mM, 10 mM, 100 mM und 1 M) in die Testwells hinzugegeben. Aus einem Probenwell wurden jeweils zwölf Replikate in die Testplatte übertragen, sodass letztlich jede der vier NaOH-Konzentration in je drei Replikaten getestet werden konnte. Insgesamt wurden sieben Probenwells untersucht. Da das Probenvolumen zu gering war um den pH-Wert direkt in

den Testwells zu messen, wurde der entsprechende pH-Wert in einem größeren Volumen mit dem gleichen Konzentrationsverhältnis ermittelt.

In einem zweiten Ansatz wurde der Assay dann bei verschiedenen pH-Werten (pH 7,4, 7,8 und 8,4) während der einstündigen Inkubation durchgeführt. Die Zellzahlen aller Probenwells wurden wie unter dem Abschnitt „Zellzahlbestimmung“ genau bestimmt. Die Ergebnisse der photometrischen Messung konnten so auf die jeweilige Zellzahl bezogen und als Absorption pro 1 Mio. Zellen ausgedrückt werden.

3.2.4 ATPlite-Assay

Adenosintriphosphat (ATP) ist ein Nukleotid, welches in biologischen Systemen als universeller Energieträger dient. Es wird für alle grundlegenden energieverbrauchenden Prozesse benötigt, beispielsweise für die Synthese organischer Moleküle, den aktiven Stofftransport, sowie für mechanische Arbeit. Die ATP-Konzentration stellt somit einen Indikator für die zelluläre Leistungsfähigkeit und Vitalität dar. Um auf den zellulären Status sowie indirekt auf die Proliferation der Kulturen schließen zu können, wurde die zelluläre ATP-Konzentration mit dem handelsüblichen ATP-Lumineszenz-Detektionstests System ATPlite® analysiert. In Vorbereitung auf das Assay musste zunächst eine ATP-Konzentrationsreihe pipettiert werden. Dazu wurde der mitgelieferte ATP-Standard (10 mM) in einem ersten Schritt mit FBS-freiem Medium 1:100 auf 100 µg/ml verdünnt. Im zweiten Schritt erfolgte das Ansetzen der Verdünnungsreihe durch serielles Verdünnen im Verhältnis 1:2. Insgesamt wurden so acht Verdünnungen von 100 - 0,78 µg/ml in FBS-freiem Medium hergestellt.

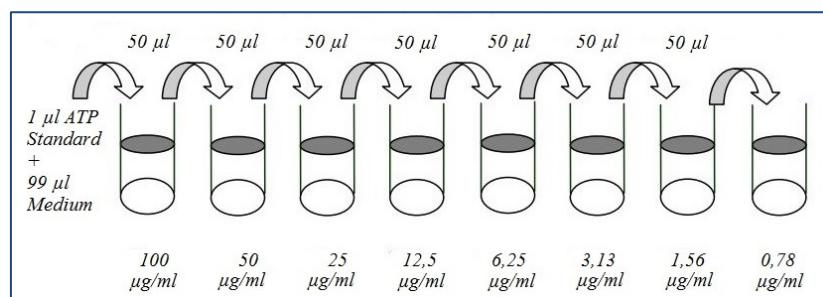


Abbildung 3 Pipettierschema der ATP-Konzentrationsreihe

Dargestellt ist das typische Pipettierschema zur Herstellung einer ATP-Konzentrationsreihe ausreichend zur Vorlage von zwei Standardreihen in einer 96-Well Testplatte.

Zur Durchführung des Assays wurde das Kulturmedium vollständig aus den zu untersuchenden Wells entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit dem mitgelieferten Zelllyspuffer überschichtet und kurz bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wurden in einer weißen 96-Well Testplatte die ATP-Standardreihe und die Blanks pipettiert. Dazu wurden sowohl für die Standardreihe als auch für die Blanks zunächst 50 µl Lysispuffer je Well vorgelegt. Anschließend wurden entweder 100 µl Medium für die Blanks oder 90 µl Medium und je 10 µl aus der Konzentrationsreihe für die Standardreihe hinzugefügt. Für die Proben wurde die zweifache Menge an Medium zum Lysispuffer in den Wells hinzugegeben. Das homogenisierte Lysat wurde nachfolgend in vier Replikaten a 150 µl je Probe mit in die Testplatte übertragen. Zuletzt wurde die Reaktion durch Zugabe von je 100 µl Substratpuffer gestartet. Nachdem die Testplatte für 10 min im

Dunkeln inkubiert wurde, konnte die Lumineszenzmessung in einem Platten-Reader erfolgen. Ein entsprechendes Protokoll befindet sich im Anhang.

3.2.5 Alizarin Red-Assay

Die Fähigkeit der MC3T3-Zellen zur Matrixmineralisierung wurde mit einem kommerziellen Alizarin Red S Färbeassay untersucht. Alizarin ist ein Anthrachinon-Derivat und bildet mit Kalzium einen rot gefärbten Chelatkomplex [64]. Durch diese Eigenschaft ist der Farbstoff geeignet, um Kalzium in Geweben und Zellkulturen nachzuweisen. Vor Beginn der Färbung musste eine 40 mM Stocklösung aus dem Alizarinpulver hergestellt werden. Dazu wurden 2 g des Pulvers in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Da die Färbereaktion vom pH-Wert abhängig ist, musste dieser kontrolliert und gegebenenfalls mit Ammoniumhydroxid auf pH 4,1-4,3 korrigiert werden. Vor Gebrauch wurde die Stocklösung 1:4 in destilliertem Wasser verdünnt.

Für diesen Versuch wurden die Zellen zum einen unter Standard-pH-Bedingungen (pH 7,4) und zum anderen bei pH 7,8 beziehungsweise pH 8,4 kultiviert. Sobald die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium mit 10 mM beta-Glycerin-phosphat und 10 nM Calcitriol ergänzt. Der Kalzium-Nachweis erfolgte jeweils nach 14 Tagen und 21 Tagen in Kultur. Für die Färbung wurde der Zellrasen zunächst mit PBS gespült und durch die Zugabe von 4 % Paraformaldehyd bei 37°C für 15 min fixiert. Nach einem weiteren Waschschritt mit destilliertem Wasser wurden die Zellen mit der 10 mM Alizarin-Färbelösung überschichtet und für 5 min inkubiert. Die überschüssige Lösung wurde anschließend abgenommen und der Zellrasen mehrfach mit destilliertem Wasser gespült. Die Färbeergebnisse konnten mit einem Lichtmikroskop untersucht werden. Ein Protokoll in Kurzform befindet sich im Anhang.

3.2.6 GeneChip®-Arrays und Pathway-Analyse

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst mit Hilfe des im RNeasy Plus-Kit enthaltenden RTL-Plus-Puffer lysiert. Anschließend wurde die RNA nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert und die Gesamt-RNA der Proben photometrisch im Nanodrop 1000 System quantifiziert. Die Integrität der RNA-Proben wurde mit Hilfe eines RNA-Pico-Chip-Kits in einem Agilent Bioanalyzer 2100 überprüft. Die ausgegebene RNA Integrity Number (RIN) gibt auf einer Skala von 1 (vollkommen zersetzt) bis 10 (völlig intakt) die Qualität der RNA wider. Es wurden in allen Ansätzen Werte zwischen 9,3 und 9,8 erreicht. Für die Expressionsanalyse wurden 200 ng RNA eingesetzt.

Die Analyse erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers in Affymetrix Genechip Mouse 2.0 ST Arrays. Das sogenannte „Whole Transkriptom-Protokoll“ wurde durch die Einführung von T7 Promotor-Tags in alle RNA Moleküle gestartet und aRNA durch die *in vitro* Transkription nach Eberwine [65] hergestellt. Um einen sogenannten 3' Bias zu vermeiden wurden alle RNA Moleküle linear amplifiziert und anschließend aufgereinigt. Die Hybridisierung wurde in einem GeneChip® Hybridisierungsofen 645 bei 45°C über Nacht durchgeführt. Die hergestellten Mikroarrays wurden zuletzt mit einem Genechip-Scanner bei 0,7 µm Auflösung eingelesen.

Die primäre Datenanalyse erfolgte mit der Affymetrix Expression Console 1.4.1.46 Software einschließlich des Robust Multiarray Average (RMA) Modul zur Normalisierung der einzelnen Chips. Die Auswertung der erhaltenen Transkriptom-Daten erfolgte mit Hilfe der Software Transcriptome Analysis Console v3.0, welche ebenfalls von der Herstellerfirma Affymetrix online bereitgestellt wurde. Die vollständigen Microarray-Daten stehen in der Gene Expression Omnibus-Datenbank (GEO Beitrag: GSE84907) zur Verfügung. Unterschiede zwischen den Ansätzen wurden als signifikant angesehen, wenn der korrigierte FDR p-Wert bei $<0,01$ lag und ein Fold Change von $> |2|$ erreicht wurde. Der Fold Change berechnet sich entsprechend den Herstellerangaben von Affymetrix [66] nach folgendem Prinzip:

$$\text{Fold Change} = \begin{cases} 2^{\text{Signal Log Ratio}} & , \quad \text{Signal Log Ratio} \geq 0 \\ (-1) \times 2^{-(\text{Signal Log Ratio})} & , \quad \text{Signal Log Ratio} < 0 \end{cases}$$

Die Listen aller differentiell exprimierten Gene wurden in das Programm Ingenuity Pathway Analyses von Ingenuity Systems/Qiagen importiert, um auf der Grundlage von bestehenden Datenbanken aus den experimentell erhaltenen Daten regulierte Signalwege und globale Netzwerke zu identifizieren. Die so extrahierten Signalwege und Netzwerke wurden auf ihre jeweilige Relevanz für den untersuchten Zelltyp überprüft und offensichtlich irrelevante Signalwege, wie zum Beispiel jene betreffend die Spermienmotilität oder die Ausbildung neuronaler Synapsen, ausgeschlossen. Standard-z-Scores wurden verwendet, um die Aktivierung ($z > 1$) oder Repression ($z < 1$) bestimmter Wege zu beurteilen. Für z-Scores nahe Null erlauben keine Prognosen.

Zur Validierung der erhaltenen Daten wurde die Expression ausgewählter Gene erneut mittels quantitativer real-time PCR analysiert und mit den Gen-Chip-Daten verglichen. Untersucht wurden fünf Gene, die in den Gen-Chip-Experimenten besonders stark reguliert wurden oder für die terminale Funktion von Osteoblasten als besonders relevant angesehen wurden (DMP1, FABP4, SFRP2, TNFRSF19 und ATF4). Die zuvor für die Gen-Chips verwendeten RNA-Proben wurden dazu auf 800 ng pro 20 μl Probe eingestellt und zunächst mit Hilfe eines High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit nach den Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die anschließende real-time PCR wurde unter Verwendung des TaqMan Universal PCR Master Mix und vorgefertigter Primer und Sonden in einem 7900 Hochdurchsatz-Sequenzdetektionssystem durchgeführt. Der Mastermix wurde mit folgenden Volumina je Probe angesetzt:

DPEC-H ₂ O	8,0 μl
2x innuMIX qPCR MasterMix	10 μl
Primermix	1,0 μl
cDNA-Probe	1,0 μl

Die Proben wurden in Triplets mit einem Gesamtvolumen von je 20 μl gemessen. Als Referenzgen diente Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH). Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des relativen Expressions-Software-Tools REST-384 (<http://rest.gene-quantification.info/>) analysiert.

3.2.7 Anfertigung eines Modellsystems für ein alkalisierendes Implantat

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde ein *in vitro* Modellsystem entwickelt, um die Möglichkeiten einer alkalisierenden Modifikation von Implantaten zu untersuchen. Ziel des Modellsystems war es den Medien pH-Wert im System über einen möglichst langen Kultivierungszeitraum in einem vergleichsweise alkalischem Bereich von pH 7,6 – pH 8,4 zu stabilisieren. Das Modell wurde soweit wie möglich vereinfacht, um möglichst viele Störgrößen und Fehlerquellen auszuschließen und so robuste Ergebnisse produzieren zu können. Es wurde reduziert auf eine alkalisierenden Matrix, eine Modell-Implantatoberfläche und die darauf anwachsenden Knochenzellen. Als Matrix wurde nach diversen Vorversuchen ein biokompatibles Elektrolyt-Gel ausgewählt. Auf diese Trägermatrix wurden Scheiben aus einem typischen Implantatmaterial als Kulturoberfläche gesetzt. Um den Stoffdurchtritt aus der Matrix zu gewährleisten, wurden diese Scheiben durch das Einbringen vielzähliger Löcher durchlässig strukturiert. Sie werden daher im Folgenden als Lochplatten bezeichnet. Als Knochenzellen dienten die im Laufe der Arbeit bereits ausführlich untersuchten MC3T3-Zellen. Als Osteoblasten-Zelllinie stellen diese Zellen ein geeignetes wenn auch stark vereinfachtes Modell für die Regenerationsprozesse an Implantaten dar. Ihr Wachstum kann als ein Indikator für die Osseointegration betrachtet werden. Untersucht wurden das Wachstumsverhalten sowie die Genexpression der MC3T3-Zellen nach Aussaat in die Systeme. Im Anschluss an die Versuche mit der Zelllinie wurde im Weiteren mit primären humanen Osteoblasten gearbeitet, um einschätzen zu können ob die erhaltenen Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Die Herstellung der einzelnen Modellsystem-Komponenten sowie der entsprechende Ansatz der Kontrollen werden im Folgenden näher erläutert.

Herstellung der Lochplatten

Im Modellsystem dienen die Lochplatten der Imitation einer modifizierten Implantatoberfläche. Als ein Material, welches typischer Weise für Implantate verwendet wird und außerdem leicht zu bearbeiten ist, wurde Titan zur Herstellung der Lochplatten ausgewählt. Zur Anfertigung der zu besiedelnden Platten wurden Kreise mit einem Durchmesser von 21 mm aus 150 μm dicken Titanblechen heraus geschnitten. Mit diesen Abmessungen passen sie leicht in die Wells einer handelsüblichen 12-Well-Platte. Die Bearbeitung der Titanbleche erfolgte an der Schweißtechnischen Lehr- und Versuchsanstalt Rostock. Zum Heraustrennen der Kreise wurde ein Infrarot-Laser mit 1030 nm und einer Brennweite von 100 mm bei einer Leistung von 70 % verwendet. Mit einer Schneidgeschwindigkeit von 500 mm/s und einer Pulsfrequenz von 66,66 kHz wurden die Kreise in 60 Wiederholungen aus den Titanblechen gelöst. Um die Platten durchlässig zu gestalten, wurden im Abstand von 500 μm Löcher mit einem Durchmesser von circa 50 μm gelasert. Zu diesem Zweck wurden die Parameter des Lasers angepasst. Bei einer Leistung von 50 %, einer Schneidgeschwindigkeit von 1000 mm/s und einer Pulsfrequenz von 200 kHz wurden die Löcher mit 500 Wiederholungen schrittweise in die Platten eingebracht. Die Ergebnisse wurden mit einem Konfokalmikroskop

kontrolliert. Entsprechende Aufnahmen sind in den unten stehenden Abbildungen gezeigt. Vor Verwendung in der Zellkultur wurden die Titanplatten stets im Ultraschallbad gereinigt und für 300 s bei 75 % Leistung mit Luftplasma behandelt.

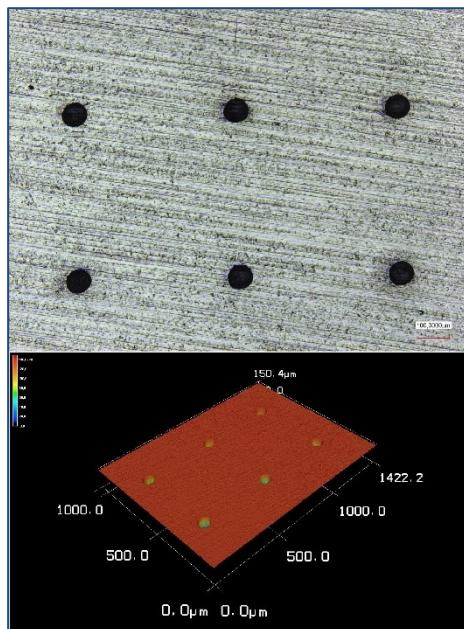


Abbildung 4 Ausschnitt einer Lochplatte zur Darstellung der Lochgrößen und -abstände

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden in der Schweißtechnischen Lehr- und Versuchsanstalt Rostock angefertigt.

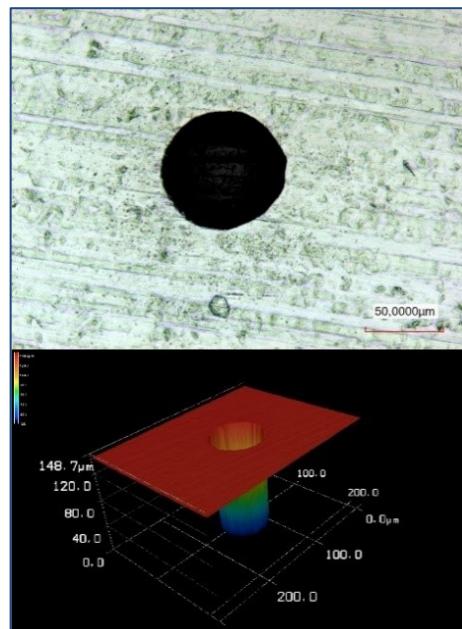


Abbildung 5 Ausschnitt einer Lochplatte zur Darstellung der Ausmaße eines Loches

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden in der Schweißtechnischen Lehr- und Versuchsanstalt Rostock angefertigt.

Herstellung PVA

Während die Titanplatten als Wachstumsfläche dienen, besteht die Aufgabe der darunter liegenden Matrix darin den pH-Wert des Kulturmediums über einen möglichst langen Versuchszeitraum auf Werte zwischen pH 7,6 – pH 8,4 anzuheben. Zur nachhaltigen Modifikation des Medium-pH-Wertes ist eine Trägermatrix mit Reservoir-Eigenschaft notwendig. Diese musste den Ansprüchen der Biokompatibilität genügen und idealerweise leicht zu verarbeiten sein. Auf der Suche nach einer solchen Matrix wurde zufällig ein neuer Polymer-Elektrolyt, welcher in Zink-Nickel-Batterien Verwendung fand, als vielversprechender Kandidat entdeckt [67]. Da das Polymer mit Polyvinylalkohol (PVA), Titanoxid (TiO_2), Wasser und Kaliumhydroxid als Elektrolyten aus nur wenigen Komponenten besteht, ist es relativ einfach in der Herstellung. Um eine potentiell zytotoxische Wirkung zu hoher Konzentrationen Kalium zu vermeiden, wurde Natriumhydroxid als Elektrolyt eingesetzt. Zur Herstellung eines Gels mit 1 M NaOH ausreichend zur Befüllung einer Petrischale mit 60 cm^2 wurden folgende Mengen benötigt:

PVA	6,0 g
TiO_2	3,0 g
NaOH	2,39 g
A. dest.	60 ml

Zunächst wurde das NaOH eingewogen und nach Zugabe des Wassers in einem 100 ml Becherglas gelöst. Anschließend wurden das PVA und das Titandioxid in die Natronlauge übergeführt und die Lösung unter ständigem Rühren langsam auf 89°C erwärmt. Nach zwei Minuten bei 89°C war die Lösung noch pipettierfähig und musste zügig in die Petrischale übertragen werden. Das Gel wurde dann für ca. 48 h bei Raumtemperatur zum Sedimentieren stehen gelassen, bevor der Überstand abgenommen werden konnte. Anschließend wurde das Gel ohne Abdeckung bei 40°C im Trockenschränk über 24 h getrocknet. Während des Trocknungsprozesses musste das Gel regelmäßig beobachtet werden, um eine zu weit gehende Austrocknung und dadurch bedingtes Versprüden zu vermeiden. Vor Versuchsbeginn wurden die Gele stets zum Quellen entweder in 1 M NaOH-Lösung für die Ansätze oder im Falle der Kontrollen in destilliertem Wasser eingelegt. Für die Kontrollen wurde das NaOH soweit wie möglich aus den Gelen ausgewaschen. Dazu wurden die Gele mit je 1 l destilliertem Wasser pro Gel überschichtet. Das Wasser wurde über mindestens fünf Tage zweimal täglich ausgewechselt, bevor am Vortag des Versuchsbeginnes Gelscheiben in der passenden Größe ausgestanzt und in PBS übergeführt wurden. Die NaOH-beladenen Gele wurden ebenfalls ausgestanzt und über Nacht in PBS eingelegt. Um osmotischen Stress auf Grund eines Konzentrationsgefälles zwischen Medium und PVA-Gel zu vermeiden wurden die Gele in 12-Well-Platten übertragen und zunächst mit 2 ml Carbonat gepuffertem Medium überschichtet. Nach einer 12-stündigen Inkubation bei 37° im CO₂-begasten Inkubator wurde der pH-Wert der entsprechenden Überstände überprüft, um einzuschätzen ob die gewünschte alkalisierende Wirkung beziehungsweise die vollständige Auswaschung erreicht wurde. Anschließend wurde das Medium ausgetauscht bevor die Titanplatten eingebracht und die Osteoblasten ausgesät wurden.

Kultivierung der Osteoblasten

Die Kultivierung der Zellen vor Versuchsbeginn erfolgte wie unter „3.2.1 Zellkultur und Medien“ beschrieben. Für die Versuche im Modellsystem wurden 50.000 MC3T3-Zellen beziehungsweise 100.000 humane Osteoblasten je Titanplatte ausgesät und in je 2 ml carbonatgepuffertem α-MEM beziehungsweise DMEM kultiviert. Für Untersuchungen des Anwachs- und Proliferationsverhaltens wurden die Zellen bis zu sieben Tage kultiviert. Nach vier Tagen in Kultur wurden 50 % des Mediums gewechselt. An Tag 1, 3, 5 und 7 erfolgten jeweils ein WST-Assay sowie die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerkammer, um die Proliferation zu beurteilen. Um dabei störende Einflüsse der alkalisierenden Matrix auf die verwendeten Reagenzien zu vermeiden, wurden stets alle Titanplatten zunächst in eine neue Zellkulturplatte übertragen.

Um das Anwachsverhalten der MC3T3-Zellen und die Sekretion von Kollagen 1 im alkalisierenden System (nachfolgend auch als Ansatz bezeichnet) und der Kontrolle miteinander zu vergleichen, wurde in weiteren Versuchen an Tag 7 eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Durchführung ist im Folgenden unter „Fluoreszenzfärbung“ genauer beschrieben. Weiterhin fanden mit der Zelllinie Versuche zur Biosynthese statt, für die die MC3T3-Zellen nach 14 Tagen lysiert und für ein GeneChip®-Array aufbereitet wurden, wie unter „GeneChip®-Arrays und Pathway-Analyse“ beschrieben. Analog zu den zuvor beschriebenen Differenzierungsversuchen

wurde den Zellkulturmedien nach 7 Tagen 10 mg/ml beta-Glycerin-phosphat und 10 ng/ml Calcitriol zugesetzt. Die Weiterverarbeitung der lysierten Zellen für die Genanalyse wurde extern im Institut für Immunologie von der Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie durchgeführt und ist daher an dieser Stelle nicht weiter beschrieben. Insgesamt wurden 12 GeneChip®-Arrays verwendet, auf denen circa 30.000 Gentranstripte nachgewiesen werden können. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Ansatzgruppe befand sich jeweils ein Ausreißer, sodass nur jeweils 5 Chips für die weitere Analyse genutzt wurden. Die Auswertung erfolgte wie unter „GeneChip®-Arrays und Pathway-Analyse“ beschrieben. Die Software Transcriptome Analysis Console v3.0 verwendet eine One-Way ANOVA als Analysetool und verfügt neben der einfachen statistischen Analyse ebenfalls über die Möglichkeit betroffene Signaltransduktions- und Stoffwechselwege abzubilden.

3.2.8 Fluoreszenzfärbung

Um das Wachstumsverhalten der Osteoblasten auf den Lochplatten zu beurteilen und die Sekretion von Kollagen 1 im alkalisierenden System und der Kontrolle miteinander zu vergleichen, wurde eine Fluoreszenzfärbung durchgeführt. Dabei wurden die Zellkerne und das Zytoskelett mit Hilfe von spezifischen Farbstoffen beziehungsweise Farbstoff-konjugierten Molekülen angefärbt. Der Nachweis des Kollagens erfolgte über einen spezifischen Primärantikörper und einen entsprechenden Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper. Zunächst wurden die bewachsenen Titanplatten in eine neue 12-Well-Platte übergeführt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Überschichten mit 4 % Paraformaldehyd über 10 min fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen für 10 min mit 0,1 % TritonX behandelt, um sie zu permeabilisieren. Nachdem die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen wurden, folgte die Blockierung mit 2 % Bovinem Serumalbumin (BSA) für 30 min bei Raumtemperatur. Um überschüssiges BSA vollständig zu entfernen, wurde vor den Färbereaktionen dreimal mit PBS gewaschen. Zuerst wurde ausreichend Volumen einer 1 µg/ml DAPI-Lösung hinzugegeben, um die Zellen zu bedecken. Nach einer 10-minütigen Inkubation und dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen dann sowohl mit 5 µg/ml Phalloidin-Konjugat als auch mit 10 µg/ml des Primärantikörpers gegen Kollagen 1 überschichtet. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen, bevor der Sekundärantikörper mit 10 µg/ml auf die Zellen gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurde. Abschließend wurden die Lochplatten nach drei weiteren Waschschritten auf Objektträgern fixiert und mit Deckgläschchen und Eideckmedium eingebettet. Da das Eideckmedium vor der mikroskopischen Betrachtung ausgehärtet sein sollte, fand die Auswertung der Färbeergebnisse erst am Folgetag statt. Ein konfokales Laser-Raster-Mikroskop erlaubte die Abbildung der fluoreszenzgefärbten Strukturen in mehreren Ebenen.

3.2.9 Wound healing-Assay

Die Migrations- und Proliferationsfähigkeit der MC3T3-Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde mit Hilfe eines sogenannten Wound healing-Assays bewertet. Hierbei wird ein definierter Defekt in den Zellrasen eingebracht und anschließend die Zeit bis zum Wiedererreichen der Konfluenz beurteilt. Der Defekt wurde über den gesamten Zeitraum mikroskopisch beobachtet. Einzelbilder, die mit Hilfe einer am Mikroskop angebrachten USB-Kamera aufgenommen wurden, konnten anschließend zu einem Zeitraffervideo weiterbearbeitet werden.

Für die einzelnen Versuche wurde zunächst eine Zellsuspension mit 250.000 Zellen/ml in Standard α -MEM hergestellt. Von dieser Suspension wurden je 100 μ l pro Well in ein 2er Kulturinsert von ibidi übergeführt, welches zuvor in ein ibidi μ -Slide eingelegt wurde. Nach Erreichen der Konfluenz nach circa 24 h im Inkubator wurde das Insert mit einer sterilen Pinzette entfernt, sodass eine circa 500 μ m breite Furche im Zellrasen entstand. Der Zellrasen wurde dann mit dem zu verwendenden Testmedium vorsichtig gespült, um das vorherige Kulturmedium sowie Zelltrümmer vollständig zu entfernen. Die Zellen wurden für diesen Versuch mit 2 ml HEPES-gepuffertem α -MEM überschichtet, welches auf einen pH-Wert von entweder pH 7,4 oder pH 8,0 eingestellt war. Der pH-Wert pH 8,0 wurde gewählt, da er den pH-Bedingungen im für diese Arbeit angefertigten Modellsystem eines alkalisierenden Implantates entspricht. Der pH-Wert pH 7,4 als Kontrolle wurde gewählt, da dieser Wert dem systemischen Blut-pH entspricht. Der bis hierhin erläuterte Versuchsablauf ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

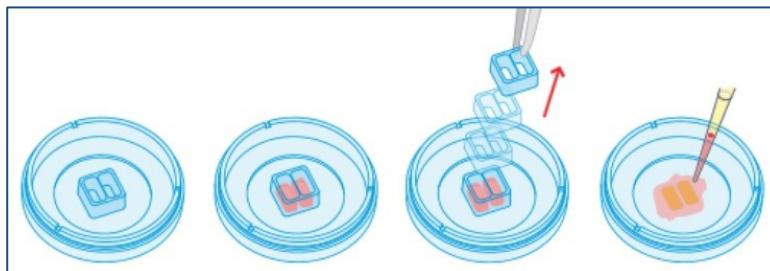


Abbildung 6 Vorbereitung des wound healing assay [68]

Der so vorbereitete Versuchsansatz konnte in einem portablen Inkubator bei 37°C mikroskopisch beobachtet werden. Der ibidi μ -Slide wurde dazu so eingelegt, dass die eingebrachte Furche gerade und mittig im Bildausschnitt zu sehen war. Mit Hilfe der Software Scope Photo konnte alle 120 sec eine Aufnahme des Defektes angefertigt werden. Dabei wurde die Temperatur über den gesamten Versuchszeitraum überwacht.

3.2.10 Etablierung der Co-Kultur und mechanische Stimulation

Zur Untersuchung des Einflusses mechanischer Stimulation auf Knochenzellen wurde eine Co-Kultur der beiden im Abschnitt „Zellkultur und Medien“ bereits beschriebenen Zelllinien MC3T3 und MLO-Y4 etabliert. Dazu wurde ein System entwickelt, welches sowohl die Co-Kultur beider Zelltypen als auch eine mechanische Stimulation durch Zugspannung erlaubt. Im Gegensatz zur Mischkultur erfolgte eine räumliche Trennung beider Zelltypen mit Hilfe eines Inserts. Dies ermöglicht zum einen auf die Ansprüche

der unterschiedlichen Zelltypen Rücksicht zu nehmen und zum anderen die Begrenzung der mechanischen Stimulation auf ausschließlich einen Zelltyp. Untersucht wurde der Einfluss der mechanischen Stimulation auf die Proliferation und Kollagensekretion unstimulierter Osteoblasten im System sowie die Freisetzung von Signalmolekülen.

Das Co-Kultur-System besteht aus einer 6-Well-Platte, Inserts, sowie speziell gefertigten Zwischenstücken und Deckelstrukturen aus biokompatiblem Polycarbonat. In Abbildung 7 ist der Aufbau der genannten Bestandteile gezeigt. Die Zwischenstücke gewährleisteten zu jedem Zeitpunkt einen ausreichenden Abstand zwischen dem Boden der Well-Platte und dem Boden der Inserts. Bei der 6-Well-Platte handelte es sich um eine sogenannte Bio Flex®-Platte der Firma Flexcell International Corporation. Diese verfügt über einen verformbaren Boden, welcher mit Kollagen beschichtet ist und sich so für die Kultivierung der Osteozyten eignet. Im Laufe der Versuche erfuhren die unteren Zellpopulationen durch Auslenkung der flexiblen Membran eine Zugspannung. Nach Überprüfung der aktuellen Literatur wurde eine Dehnung von 1000 μ Strain als physiologischer Wert für die Versuche festgelegt. Die Stimulation erfolgte bei einer Frequenz von 1 Hz. Die Osteoblasten benötigen keine Kollagenbeschichtung und sollten keiner Zugspannung ausgesetzt werden. Sie wurden daher in den Inserts kultiviert. Diese besitzen einen transparenten, semipermeablen Boden mit einer Porengröße von 1 μ m, sodass ein Stoffaustausch zwischen den beiden Knochenzellpopulationen gewährleistet ist.



Abbildung 7 Co-Kultur-System mit Peek-Teilen

Da die flexible Membran keinen Anschliff erlaubt, wurde zur Darstellung eine standard Plastik-Zellkultur-Platte verwendet.

Während der Proliferationsphase unterscheiden sich die Ansprüche der beiden Zelllinien an das Medium nur geringfügig. Die MLO-Y4 benötigen im Gegensatz zu den MC3T3 statt 10 % FBS eine Mischung aus 5 % FBS und 5 % FCS. Während des Anwachsens der Zellen kann auf Grund der Poren in der Insertmembran nicht garantiert werden, dass es nicht zu einem Konzentrationsausgleich zwischen den Flüssigkeitsreservoirs kommt. Nach Erreichen der Konfluenz sollte jedoch eine vollständige Abtrennung der Flüssigkeitsreservoirs durch den Zellrasen gewährleistet sein, sodass ein Stoffaustausch nur noch aktiv durch die Osteoblasten erfolgen kann. In der nachfolgenden Abbildung ist der Aufbau des Co-Kultur-Systems vereinfacht dargestellt.

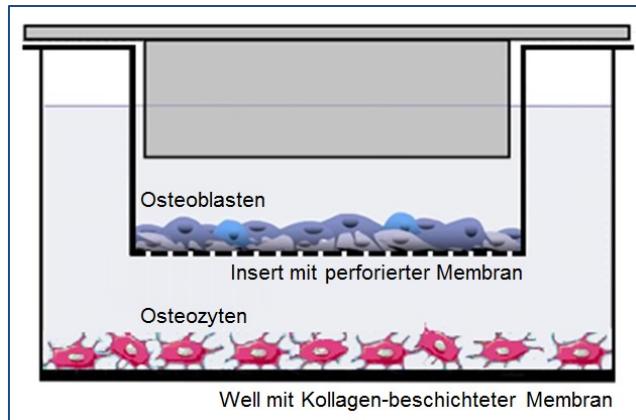


Abbildung 8 Schema: Co-Kultur mit Osteozyten und Osteoblasten
Die Kollagen-beschichtete Membran ist flexibel und wird während der Versuche gedehnt.

Die mechanische Stimulation der Osteozyten erfolgte durch die Einwirkung einer periodischen Zugspannung. Die Zugspannung wurde durch Dehnung der flexiblen Membran erreicht. Dazu wurde die Membran durch Anlegen eines Druckes nach oben ausgelenkt. Der Druck entstand in einem Wassertank, welcher unter der Kulturplatte angebracht wurde. Die Befüllung mit Wasser erfolgte über eingebrachte Schlauchanschlüsse. In der nachfolgenden Abbildung ist der Aufbau aus Zellkulturplatte und Wassertank dargestellt. Im Anschnitt ist das Wasserreservoir unterhalb der einzelnen Membranböden abgebildet.

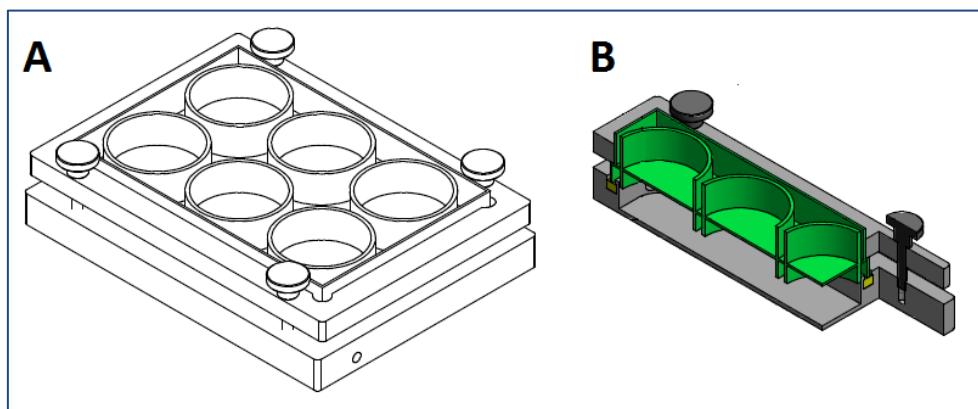


Abbildung 9 Wassertank zur Applikation der mechanischen Stimulation durch periodische Zugspannung
Dargestellt sind schematische Zeichnungen des Wassertanks inklusive eingespannter FlexCell-Platte in Vollansicht (A) sowie im Anschnitt (B)

In dem Wassertank befand sich ein Ballonkatheter-Schlauch, aus dem durch Anlegen eines Unterdruckes noch vor Befüllung des Tanks die Luft vollständig entzogen wurde. Sobald der Unterdruck abgelassen wurde, dehnte sich der Schlauch wieder auf die Ursprungsgröße aus und verdrängte so ein definiertes Volumen an Wasser. Durch das wiederholte Anlegen und Ablassen des Unterdruckes entsteht ein periodischer Druck im System, der zur Dehnung der Membran führt. Die Druckänderungen wurden mit einer während des PoreGenic-Projektes am Lehrstuhl angefertigten Pumpe realisiert. Die mitentwickelte Software erlaubt eine präzise Steuerung und die Einstellung von Pumpintervallen, sodass eine Applikation des periodischen Druckes über definierte Zeiträume möglich war. Die Stimulation wurde über drei Tage zweimal täglich für jeweils 2 h vorgenommen. Zwischen den Stimulationsperioden lag eine zweistündige Pause. Die

benötigte Auslenkung der Membran um $1000 \mu\text{Strain}$ zu erreichen, wurde zuvor unter der Modellannahme, dass die nach oben ausgelenkte Membran einem Kreissegment entspricht, berechnet.

Um das Stimulationsystem zu validieren, wurde die tatsächliche Auslenkung der Membran mit Hilfe eines Ultraschallsensors ermittelt. Dazu wurde zunächst ein Referenzsignal aufgenommen, welches die Ausgangsposition der Membran definiert. Anschließend wurde die Pumpe eingeschalten und das Messsignal detektiert. Die Differenz zwischen Mess- und Referenzsignal kann dargestellt und zur Bestimmung der Membranauslenkung verwendet werden. Da die Dauer bis zum Wiedereintreffen des von der Membran reflektierten Schalls am Detektor nur von der Distanz zwischen Detektor und Membran abhängt, lässt sich bei bekannter Schallgeschwindigkeit in wässriger Lösung direkt auf die Membranauslenkung zurückrechnen. Die errechnete Auslenkung konnte über die Zeit aufgetragen werden, sodass eine Kontrolle der gewünschten Frequenz möglich war. Außerdem konnte die maximale Auslenkung über die Zeit verfolgt und so die Gleichförmigkeit der Stimulation kontrolliert werden. In der untenstehenden Abbildung ist der Messaufbau aus Stimulationssystem und Ultraschallsensor gezeigt, sowie die Benutzeroberfläche der verwendeten Software, welche wie der Sensor vom Fraunhofer-Institut für zerstörungsfreie Prüfverfahren zur Verfügung gestellt wurde. Die Messung der Membranauslenkung wurde in größeren zeitlichen Abständen wiederholt, um die Langzeitstabilität des Systems zu kontrollieren und zum Beispiel eine signifikante Ermüdung des Ballonkatheter-Schlauchs über die Zeit auszuschließen. Nach mehreren hunderttausend Pumpzyklen ließ sich eine verstärkte Auslenkung der Membran messen, die auf eine Zunahme der Schlauchelastizität zurückzuschließen ließ, sodass der Schlauch ausgetauscht werden musste.

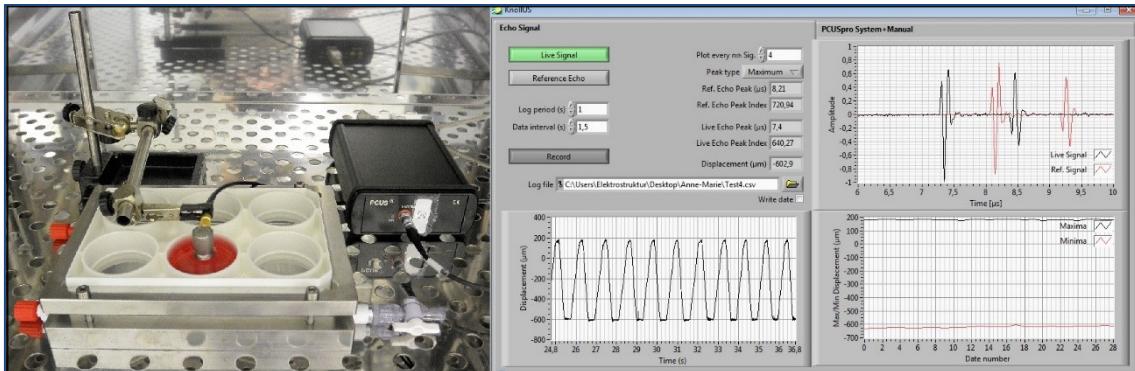


Abbildung 10 Messaufbau zur Validierung der Membranauslenkung
Ultraschallsensor zur Messung der Relativbewegung der Membran (links) und Software zur Überwachung Stabilität von Frequenz und Amplitude im System (rechts)

3.2.11 ELISA der Kulturüberstände

Um den Einfluss der Stimulation nicht nur auf die Proliferation der Osteoblasten sondern auch auf eine ihrer Funktionen zu untersuchen, wurde die Kollagen-Sekretion mit Hilfe eines „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) analysiert. Nach der zuvor beschriebenen Stimulation der Zellen in der Flex®-Platte, wurden die Überstände der zeitgleich in den Inserts kultivierten Osteoblasten abgenommen und bei 1000 rpm zentrifugiert, um noch darin befindliche Zellen und Zellreste zu entfernen. Die zellfreien Überstände wurden bis zur Weiterverwendung bei -80°C eingefroren. Um in das Medium sezerniertes Kollagen zu detektieren, wurde ein Collagen alpha-1(I) chain ELISA Kit verwendet. Die gesammelten Überstände mussten dazu zunächst aufgetaut und im Verhältnis 1:4 in PBS verdünnt werden. Der ELISA wurde anschließend nach den Angaben des Herstellerprotokolls für folgende Proben durchgeführt: Osteoblastenüberstände über stimulierten Osteozyten, Osteoblastenüberstände über stimulierten Osteoblasten und Osteoblastenüberstände über unstimulierten Osteozyten als Kontrolle. Je Kondition wurden acht Proben in Triplikaten untersucht. Als Blank diente unkonditioniertes Medium. Der mitgelieferte Kollagenstandard erlaubte eine direkte Quantifizierung des sezernierten Kollagens in den Proben. Um die erhaltenen Daten zu normalisieren, wurde außerdem der Proteingehalt in den jeweiligen Inserts mit Hilfe eines Bradfordassays nach den Herstellerangaben bestimmt und die kalkulierte Gesamtkollagenmenge auf die so ermittelte Proteinmenge bezogen.

Neben der Evaluierung der Osteoblastenfunktion wurden weitere ELISA-Kits verwendet, um die Sekretion von Molekülen zu analysieren, die potentiell für eine veränderte Proliferation und Funktion der Osteoblasten verantwortlich sein könnten. Dazu wurden nach Ende der Versuchszeit die Überstände über den stimulierten Osteozytenpopulationen beziehungsweise den unstimulierten Kontrollen abgenommen und zunächst bis zur Weiterverwendung bei -80°C eingefroren. Als potentielle Kandidaten wurden stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) und Prostaglandin E2 (PGE2) nachgewiesen. Die Durchführung der ELISAs erfolgte nach den jeweiligen Herstellerprotokollen in jeweils zehn unverdünnten Proben pro Kondition. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen. Als Blank diente wie zuvor unkonditioniertes Medium. Alle ELISA-Kits enthielten definierte Standards, welche die Quantifizierung der jeweiligen Moleküle ermöglichten. Die detaillierten Protokolle befinden sich im Anhang.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss des pH-Wertes auf Osteoblasten

Betrachtet wurde der Einfluss des pH-Wertes auf Osteoblasten während der drei Entwicklungsphasen: Proliferation, Matrixreifung, und Mineralisierung. Dazu wurden verschiedene Indikatoren dieser Phasen nachgewiesen. Die Ergebnisse werden nach einer vorangehenden Betrachtung des Einflusses der Kultivierung auf den Medien pH im folgenden Abschnitt vorgestellt.

4.1.1 pH-Wert-Änderungen in Kultur

Vor dem täglichen Medienwechsel wurde stets der pH-Wert in den jeweiligen Kulturmedien bestimmt. Die Messungen zeigten, dass sich der initial eingestellte pH-Wert während der Kultivierung verändert. Vor allem nach längerer Kultur und mit Annäherung an die Konfluenz der Zellen wurden diese Veränderungen innerhalb der 24 h Messintervalle größer. Die mittlere Abweichung der pH-Werte über den gesamten Versuchszeitraum variierte bei den verschiedenen pH-Gruppen sowohl im Betrag als auch in der Richtung. Während der mittlere pH-Wert der pH 7,4-Gruppe über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstant blieb, wurden sowohl für die pH 7,2-Gruppe als auch für die pH 7,6-Gruppe geringfügige Abweichungen des pH-Wertes detektiert. Innerhalb von 24 h erhöhte sich der pH-Wert in der pH 7,2-Gruppe im Durchschnitt um 0,07. Im Gegensatz dazu verringerte er sich in der pH 7,6-Gruppe um durchschnittlich 0,06. Innerhalb der pH 7,8-Gruppe war die mittlere pH-Wert Abweichung mit 0,15 etwas stärker ausgeprägt. Der besonders starken Änderung des pH-Wertes in der pH 8,4-Gruppe liegt wahrscheinlich die große Abweichung des initial eingestellten Wertes vom pKs-Wert des verwendeten HEPES-Puffers (7,39 bei 37°C) zu Grunde. Die Ergebnisse der pH-Wert-Bestimmungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst (n=30).

Tabelle 1 pH-Wert-Änderungen in Kultur

Medium pH Anfangswert	pH 7,2	pH 7,4	pH 7,6	pH 7,8	pH 8,4
Medium pH Wert in Kultur	7,27 ± 0,03	7,41 ± 0,02	7,54 ± 0,04	7,65 ± 0,07	8,03 ± 0,19
pH-Wert Änderung	+ 0,07	+ 0,01	- 0,06	- 0,15	- 0,33

Um eine Alternative zu carbonatfreien HEPES-gepufferten Medien zu finden, wurde untersucht wie sich der pH-Wert eines carbonat-gepufferten Mediums bei Änderung der CO₂-Konzentration im Inkubator verhält. Dazu wurde zellfreies α-MEM über 24 h in einem Inkubator mit der jeweiligen CO₂-Konzentration inkubiert, bevor der Medium-pH bestimmt wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass der in dieser Arbeit untersuchte pH-Bereich zu großen Teilen auch mit carbonat-gepuffertem Medium abgebildet werden konnte. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 2 pH-Werte nach 24 h Inkubation bei verschiedenen CO₂-Konzentration

CO ₂ -Konzentration	5 %	4 %	3 %	2 %	1 %	0 % (Luft)
Medium pH	7,43	7,55	7,66	7,84	8,13	8,17

4.1.2 pH-Wert-abhängige Proliferation

Zur Einschätzung der pH-Abhängigkeit der Proliferation wurden drei Indikatoren analysiert, welche unterschiedliche Aspekte der Zellvitalität und des Proliferationsprozesses widerspiegeln. Untersucht wurden der WST-Metabolismus, die Zellzahl und der ATP-Gehalt. Die täglichen Messungen ermöglichen zusätzlich Aussagen über den zeitlichen Verlauf des Ansprechens der einzelnen Indikatoren auf die veränderten Konditionen. Wenn nicht anders angegeben erfolgte die statistische Analyse auf Signifikanz mit Hilfe einer Zwei-Wege-ANOVA ($p = 0,05$) unter Verwendung der Student-Newman-Keuls Methode für die Gruppenvergleiche. Diese statistischen Betrachtungen wurden ausschließlich bei Stichprobenumfängen von mindestens $n=10$ durchgeführt.

WST-Metabolismus

Die Menge des in der Inkubationszeit zu Formazan verstoffwechselten WST-1 nahm im Laufe des Versuchszeitraumes in allen pH-Gruppen zu, was darauf hindeutet, dass die Zellen unter allen getesteten pH-Bedingungen fähig waren zu proliferieren. Zwischen den pH-Gruppen zeigten sich jedoch bereits nach zwei Tagen in Kultur deutliche Unterschiede. Mit steigendem pH-Wert konnten verstärkte Absorptionen gemessen werden. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Werten der pH 7,4- und pH 7,8-Gruppe konnte bereits zu diesem Zeitpunkt belegt werden und blieb über den gesamten Versuchszeitraum nachweisbar. Im Gegensatz dazu wurde das Signifikanzniveau ($p = 0,05$) in der pH 7,6- und pH 7,2-Gruppe an einigen Tagen erreicht und an anderen knapp verfehlt. So wurde beispielsweise die im Vergleich zum Standard von pH 7,4 erhöhte Absorption in der pH 7,6-Gruppe an den Tagen 2, 3 und 5 als signifikant getestet während an den Tagen 4 und 6 keine Signifikanz erreicht wurde. Dieser Umstand lässt sich wahrscheinlich auf die relativ hohen Standardabweichungen zurückführen. Ähnliche Ergebnisse wurden für die pH 7,2-Gruppe erhalten, wobei die Absorption in diesen Fällen stets niedriger als unter Standardbedingungen ausfiel. In der nachfolgenden Grafik sind die Ergebnisse des WST-Assays für die Tage 2, 4 und 6 dargestellt.

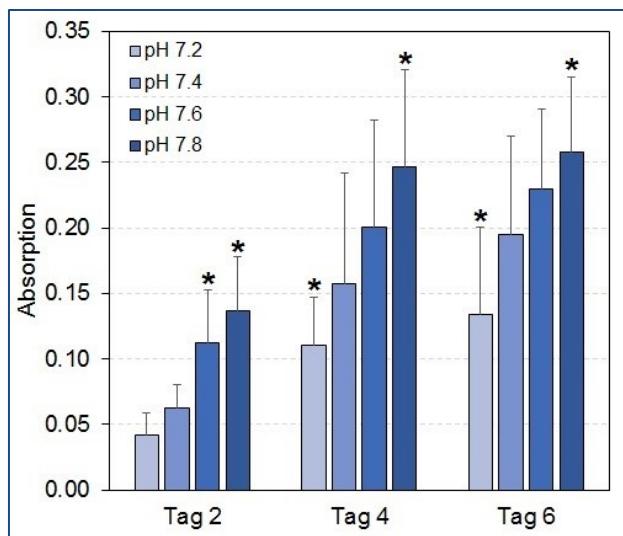


Abbildung 11 pH-abhängiger WST-Metabolismus

Gemessen wurde die Absorption des Stoffwechselproduktes Formazan bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (n=10), wobei sich die markierten Signifikanzen stets auf die Werte der pH 7,4-Gruppe am jeweiligen Versuchstag als Referenz beziehen.

Zellzahl

Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung korrelierten weitgehend mit denen des WST-Assays. Die Tendenz zunehmender Werte bei steigendem pH war auch bei der Zellzahlbestimmung deutlich zu erkennen. Im Gegensatz zum WST-Assay zeigten sich Signifikanzen jedoch erst mit Beginn der logarithmischen Wachstumsphase ab Tag 3. Die Wachstumskurven der einzelnen Gruppen sind in der unten stehenden Grafik abgebildet und signifikante Unterschiede mit Sternchen markiert. Um die Übersichtlichkeit zu gewährleisten, sind ausschließlich die signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Standard von pH 7,4 eingezeichnet und nicht diejenigen zwischen allen möglichen Paarvergleichen. Obwohl anzunehmen wäre, dass sich die Zellzahlen mit Erreichen der Plateauphase am Ende des Versuchszeitraumes unabhängig vom pH-Wert annähern würden, blieben die Unterschiede beträchtlich. An Tag 6 war die mittlere Zellzahl in der pH 7,8-Gruppe im Vergleich zu den Standardkulturbedingungen bei pH 7,4 um mehr als 40% erhöht. Die pH 7,6-Gruppe zeigte noch eine Erhöhung um circa 18%. In der pH 7,2-Gruppe lagen über den gesamten Versuchszeitraum die niedrigsten Zellzahlen vor. Sie erreichten an Tag 6 im Mittel nur circa 73% des Wertes für den Standard.

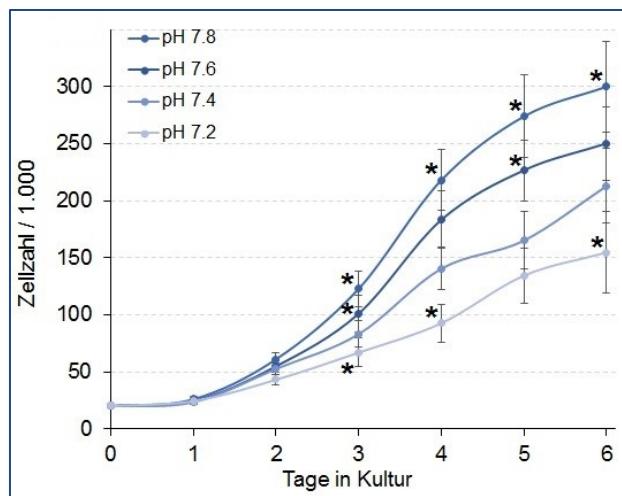


Abbildung 12 pH-abhängige Zellzahl über sechs Versuchstage

Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler ($n=10$) der ermittelten Zellzahlen an den einzelnen Versuchstagen. Die markierten Signifikanzen beziehen sich stets auf die pH 7,4-Gruppe als Referenz.

ATP-Gehalt

Zur Vervollständigung des Überblicks auf die pH-abhängige Zellvitalität und Proliferation wurde der ATP-Gehalt an jedem der sechs Versuchstage gemessen. Im Gegensatz zum WST-Assay ließen sich in der ersten Phase des Versuchs keinerlei signifikante Unterschiede des ATP-Gehaltes zwischen den einzelnen pH-Gruppen nachweisen. Erst ab Versuchstag 4 zeichnete sich eine Tendenz hin zu höheren ATP-Gehalten bei alkalischerem Medium ab. Ab diesem Zeitpunkt zeigten die Messungen im Vergleich zu den Standardkulturbedingungen deutlich höhere Werte bei pH 7,6 und pH 7,8, während die Werte für die pH 7,2-Gruppe stets deutlich niedriger lagen. Die Messergebnisse an Tag 6 ergaben letztendlich einen signifikant erhöhten ATP-Gehalt bei pH 7,8 ($65,34 \pm 19,17 \mu\text{M}$) gegenüber dem Standard-pH von 7,4 ($52,13 \pm 14,87 \mu\text{M}$). Die Ergebnisse für die Tage 2, 4 und 6 sind in der folgenden Grafik abgebildet.

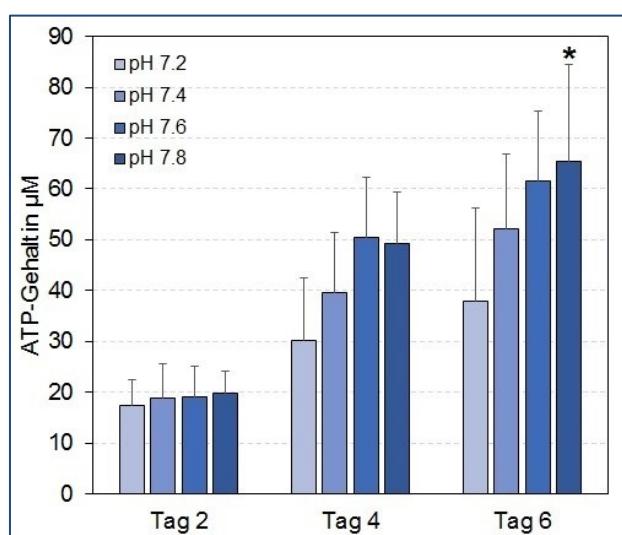


Abbildung 13 pH-abhängiger ATP-Gehalt

Gemessen wurde die ATP-Konzentration im Zellysat. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung ($n=10$). Die eingezzeichnete Signifikanz bezieht sich auf den Wert der pH 7,4-Gruppe am selben Versuchstag als Referenz.

pH-Abhängigkeit der Proliferations-Indikatoren über einen erweiterten pH-Bereich

Um abzuschzen bis in welchen pH-Bereich eine Alkalisierung des Mediums noch förderlich für die Proliferation ist und ab welchem pH-Wert ein gegenteiliger Effekt eintritt, wurde ein Übersichtsversuch in einem erweiterten pH-Bereich durchgefrt. Nach sechs Tagen in Kultur wurden die drei Indikatoren für die Proliferation gemessen und zur besseren Vergleichbarkeit jeweils in Relation zur pH 7,4-Gruppe gesetzt. Die relativen Messwerte in Abhängigkeit vom pH-Wert sind in der untenstehenden Grafik aufgefrt. Die Daten wurden anschließend mit folgender Funktion gefittet:

$$f(pH) = \frac{f_{max}}{1 + \left(\frac{pH}{IC_{50}^{pH1}} \right)^{hs1}} - \frac{f_{max}}{1 + \left(\frac{pH}{IC_{50}^{pH2}} \right)^{hs2}}$$

Die gefitteten Parameter sind in folgender Tabelle aufgefrt. Fettgedruckte Werte beziehen sich auf Parameter, die numerisch bestimmt wurden. Sie sind durch den Exponenten „*graph*“ gekennzeichnet.

Tabelle 3 Fitparameter der Funktion inklusive numerisch bestimmter Parameter

Parameter	Zellzahl	WST-1 Metabolism	ATP Gehalt
$IC_{50}^{pH1} / IC_{50}^{pH2}$	9.10 / 8.99	8.09 / 8.93	8.02 / 8.98
$hs1 / hs2$	56.61 / -89.31	13.42 / -5.07	9.78 / -49.68
f_{max}	355.6	470.6	288.5
$pH_{max}^{graph} / f_{max}^{graph}$	8.62 / 251.4	8.40 / 177.9	8.48 / 168.5

IC_{50}^{pH1} und IC_{50}^{pH2} stellen die charakteristischen halbmaximalen pH-Werte der beiden Funktionszweige dar, die mit den „Hill Slopes“ $hs1$ und $hs2$ ansteigen beziehungsweise abfallen. Die Funktion verfgt über eine theoretische maximale Plateau-Höhe. Die Überlappung der beiden Funktionszweige resultiert jedoch in den niedrigeren Werten für f_{max}^{graph} , welche genau wie die damit verbundenen Werte für pH_{max}^{graph} numerisch bestimmt wurden (Tabelle 3).

Die in Abbildung 14 abgebildeten Ergebnisse zeigen, dass selbst pH-Werte mehr als eine pH-Stufe oberhalb des Standard-pH-Wertes von 7,4 möglich sind, ohne negative Auswirkungen auf die gemessenen Proliferations-Indikatoren zu verursachen. Für alle Indikatoren scheint sich ein Plateau zwischen pH 8,2 und pH 8,8 zu ergeben, in dem die jeweiligen Messergebnisse maximal sind.

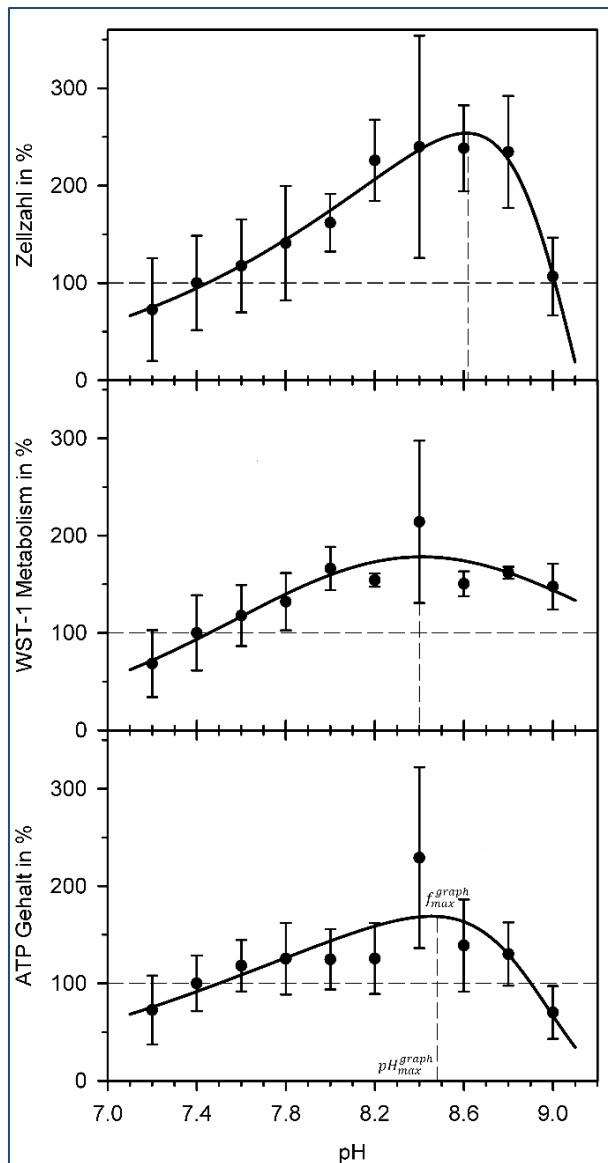


Abbildung 14 pH-Abhängigkeit der Proliferations-Indikatoren Zellzahl, WST-Metabolismus und ATP-Gehalt nach sechs Tagen in Kultur [69]

Der größte Effekt zeigte sich bei der Zellzahlbestimmung. Hier konnte in den alkalischen Medien eine Steigerung der Zellzahl auf über 200 % erreicht werden. Mit Steigerungen auf annernd 180 % fiel der Effekt bei dem WST-Metabolismus etwas geringer aus. Wie sich bereits in den vorangegangen Versuchen abzeichnete, war die pH-Abhängigkeit des ATP-Gehaltes weniger deutlich als bei den beiden anderen Indikatoren. Dennoch ließen sich auch hier Steigerungen auf ca. 170 % beobachten. Die höchsten Werte konnten bei allen drei Indikatoren bei einem pH-Wert von ca. 8,4 gemessen werden, jedoch ist die Streuung in dieser Gruppe ungewöhnlich hoch, sodass die Annahme eines Optimum-Plateaus plausibler erscheint als ein einzelner Optimal-Wert. Erst bei pH-Werten über pH 8,8 kam es zu Einbrüchen der Messwerte. Diese waren besonders deutlich bei der Zellzahl, sowie im ATP-Gehalt zu erkennen. Im Gegensatz dazu blieben die Messwerte für den WST-Metabolismus beinahe unverändert hoch. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz wurde in späteren Versuchen ermittelt. Die entsprechenden Ergebnisse werden im Abschnitt „pH-Abhängigkeit des WST-Metabolismus“ vorgestellt.

Zeitliches Ansprechen der Indikatoren

Da sich pH-Werte relativ weit im alkalischen Bereich als tolerierbar und sogar förderlich erwiesen, wurde für zusätzliche Versuche eine weitere pH-Gruppe, welche eine ganze pH-Stufe über den Standardbedingungen lag, gewählt, um maximale Effekte zu erzielen. Wie durch den vorangegangenen Übersichtsversuch zu erwarten war, zeigten sich in dieser Gruppe für alle getesteten Proliferationsindikatoren signifikante Unterschiede im Vergleich zur pH 7,4-Gruppe. Es bleibt zu erwähnen, dass mit dieser erhöhten Anzahl der Versuchsgruppen auch die Anzahl der Gruppenvergleiche steigt, was Auswirkungen auf die Ergebnisse des Student-Newman-Keuls-Tests hat. Aus diesem Grund unterschieden sich die ermittelten Signifikanzen von den zuvor für die pH-Gruppen 7,2-7,8 erhaltenen Ergebnissen. Bereits bei der ausschließlichen Betrachtung dieser pH-Gruppen war aufgefallen, dass sich für den WST-Assay zu einem früheren Zeitpunkt Signifikanzen nachweisen ließen als für die anderen beiden Parameter. Nach Normalisierung der unterschiedlichen Messwerte auf die Werte der pH 7,4-Gruppe an Versuchstag 6, wurde dieses unterschiedlich schnelle Ansprechen der verschiedenen Indikatoren in der pH 8,4-Gruppe besonders deutlich. In der nachfolgenden Abbildung sind die relativen Messwerte der drei Indikatoren für Versuchstag 3 und 6 aufgeführt. Während sich die Zellzahl an Tag 3 bei höheren pH-Werten nicht signifikant von denen der pH 7,4-Gruppe unterschied, zeigte der WST-Assay bereits erheblich gesteigerte Absorptionswerte. Weniger große aber dennoch signifikante Unterschiede wiesen die Messungen des ATP-Gehaltes auf. Während sich der relative ATP-Gehalt von Tag 3 auf Tag 6 mehr als verdoppelt hat, vervierfachte sich die relative Zellzahl sogar. Im Gegensatz dazu erhöhte sich der relative WST-Metabolismus wesentlich geringfügiger. Betrachtet man die pH 8,4-Gruppe sprach der WST-Metabolismus als erster Indikator an, gefolgt vom ATP-Gehalt. Als letztes zeichneten sich bei der Zellzahl signifikante Unterschiede ab.

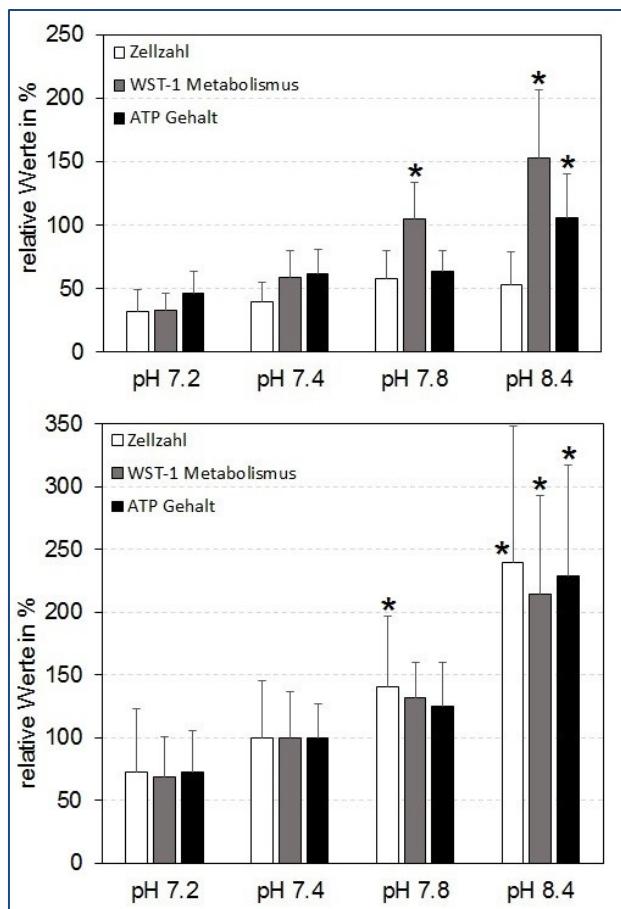


Abbildung 15 pH-Abhängigkeit der Proliferations-Indikatoren Zellzahl, WST-Metabolismus und ATP-Gehalt [69]
 Dargestellt sind die Werte nach 3 (oben) und 6 (unten) Tagen in Kultur. Alle Daten wurden auf die Werte der pH 7,4-Gruppe an Tag 6 normalisiert. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert und der Standardabweichung aus 10 Wells. Signifikanzen beziehen sich auf die Werte des Standards (pH 7,4) am entsprechenden Tag.

pH-Abhängigkeit des WST-Metabolismus

Der WST-Assay wird als Zellproliferations-Assay verkauft, da die Menge des in der Atmungskette aus dem WST-1 metabolisierten Formazan-Farbstoffes direkt mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen in der Kultur korrelieren soll. Die Zellkulturversuche in dieser Arbeit erfolgten jedoch in einem ungewöhnlich großen pH-Bereich. Da zum Zeitpunkt der Arbeiten keine Informationen zur pH-Abhängigkeit des WST-Assays vorlagen, wurden zusätzliche Tests durchgeführt, um die Ursache der im Laufe dieser Arbeit aufgetretenen Diskrepanz zwischen der Zellzahlbestimmung und dem WST-Assay zu ergründen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zunächst unter Standardbedingungen kultiviert und bei gleicher Zellzahl verwendet.

Ein erster Test diente dazu, einen möglichen Einfluss des pH-Wertes auf die photometrische Messung selbst, zum Beispiel durch die Beeinflussung der Absorption durch den Farbumschlag des pH-Indikators im Zellkulturmedium, auszuschließen. Erst nach der einstündigen Inkubation und Übertragung der Überstände in die Testplatte wurde der pH-Wert der Proben durch die Zugabe von NaOH-Lösungen verschiedener Konzentrationen abgeändert. Da die Volumina zu gering waren um mit der verwendeten pH-Elektrode direkt in der Testplatte zu messen, wurden die entsprechenden pH-Werte

in einem größeren Volumen mit dem gleichen Konzentrationsverhältnis ermittelt. Es ergaben sich die in folgender Tabelle aufgeführten pH-Werte.

Tabelle 4 pH-Wert der Proben bei verschiedenen NaOH-Konzentrationen

NaOH-Konzentration in mM	pH-Wert
0	7,28
10	7,39
100	8,42
1000	12,72

Mit Ausnahme der 1000 mM Probe wurden keine signifikanten Unterschiede in der Absorption festgestellt. In dem für die Zellversuche relevanten pH-Bereich konnte somit ein störender Einfluss des pH-Wertes auf die photometrische Messung ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse sind im nachfolgenden Boxplot zusammengefasst. Da die Messwerte der 1000 mM Proben im selben Bereich lagen wie die Messwerte der Blanks, ergaben sich nach Abzug der Blankwerte teilweise negative Endwerte.

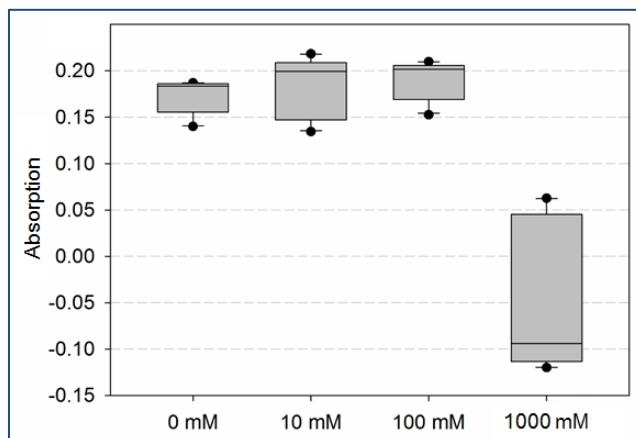


Abbildung 16 Absorption in Abhängigkeit vom Proben pH

Dargestellt ist Absorption bei 450 nm und 620 nm (Referenz) in Abhängigkeit von der NaOH-Konzentration der zugegebenen Lösungen (n=7). Negative Werte treten auf, wenn die Blankwerte über denen der entsprechenden Messwerte liegen.

In einem zweiten Test wurde das Medium ausschließlich für die einstündige Inkubationszeit auf HEPES-gepufferte Medien der pH-Werte 7,4, 7,8 und 8,4 umgestellt. Die photometrischen Messungen zeigten unterschiedliche Absorptionen bei den verschiedenen pH-Werten obwohl dieselben Zellzahlen vorlagen. Die Ergebnisse wurden als Absorption je 1 Mio. Zellen in der untenstehenden Grafik aufgetragen. Eine lineare Regression ergab eine statistisch signifikante ($p < 0,001$) pH-Abhängigkeit der Absorption pro eine Mio. Zellen mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,62$. Ein Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,79 belegte die starke Korrelation zwischen den Parametern pH und Absorption je 1 Mio. Zellen.

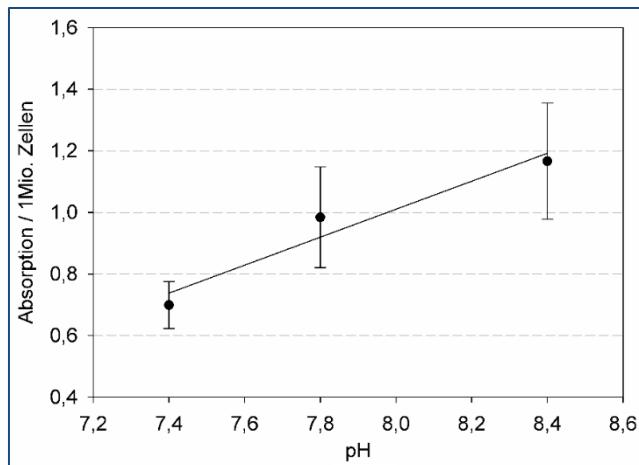


Abbildung 17 Absorption je 1 Mio. Zellen in Abhängigkeit vom pH

Dargestellt ist die auf die Zellzahl normierte Absorption bei 450 nm und 620 nm (Referenz) nach einstündiger Inkubation in Medien der angegebenen pH-Werte. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichung (n=7).

Obwohl während der Proliferationsversuche die mikroskopisch bestimmten Zellzahlen und die photometrisch gemessenen Absorptionen in den verschiedenen pH-Gruppen oberflächlich betrachtet gut miteinander korrelierten, wurden nach der Feststellung der Korrelation des pH-Wertes während der Inkubationszeit und der gemessenen Absorption, die Verhältnisse zwischen den einzelnen Indikatoren genauer analysiert. Dazu wurden die Ergebnisse des WST-Assays sowie die des ATPlite-Assays für die pH-Gruppen 7,2, 7,4, 7,8 und 8,4 über den gesamten Versuchszeitraum auf die Zellzahl des jeweiligen Versuchstages bezogen. Es zeigte sich, dass der ATP-Gehalt je Zelle in allen untersuchten pH-Gruppen ähnlich war, beziehungsweise kein Trend ersichtlich wurde. Unabhängig vom pH deutete sich lediglich ein Trend in Richtung eines geringeren ATP-Gehaltes je Zelle mit zunehmender Kultivierungsdauer an (Abbildung 18).

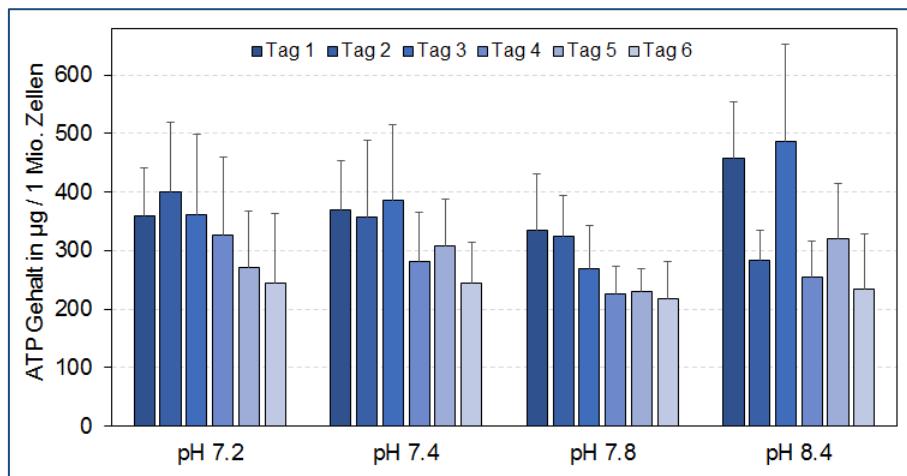


Abbildung 18 ATP-Gehalt je 1 Mio. Zellen in Abhängigkeit von pH-Wert und Kultivierungsdauer

Dargestellt ist der zelluläre ATP-Gehalt in den jeweiligen pH-Gruppen im Verlauf der 6-tägigen Versuchsdauer (n=10).

Im Gegensatz zu den ATP-Daten ergaben sich für den WST-Assay deutliche Unterschiede in der gemessenen Absorption je Zelle in Abhängigkeit vom pH-Wert. Wie die Versuche zur Korrelation von pH-Wert und Absorption bei gleicher Zellzahl nahe legten, zeigte sich, dass die Absorptionen je Zelle in den alkalischen pH-Gruppen zu Versuchsbeginn deutlich höher waren als bei der pH 7,4-Gruppe oder der pH 7,2-Gruppe.

Im Laufe der 6-tägigen Versuchszeit schwächte sich dieser Effekt jedoch deutlich ab bis an Versuchstag 6 kein Unterschied zwischen den pH-Gruppen mehr feststellbar war (Abbildung 19). Die Etablierung eines einfachen Korrekturfaktors war durch diese zusätzliche Zeitabhängigkeit des Effektes im Rahmen der Doktorarbeit nicht realisierbar. Eine mögliche Ursache für die Zeitabhängigkeit wird unter „pH-Abhängigkeit der Proliferation“ diskutiert.

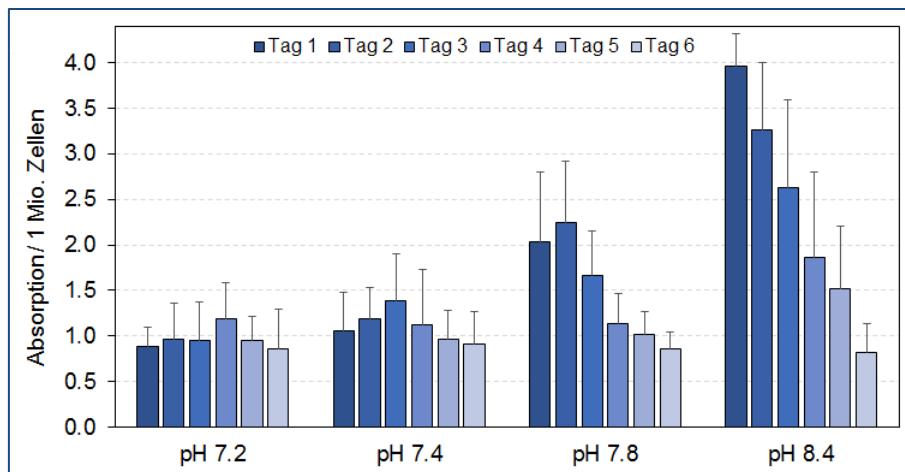


Abbildung 19 Absorption je 1 Mio. Zellen in Abhängigkeit von pH-Wert und Kultivierungsdauer
Dargestellt ist die auf die Zellzahl normierte Absorption bei 450 nm in den jeweiligen pH-Gruppen im Verlauf der 6-tägigen Versuchsdauer (n=10).

4.1.3 pH-Wert-abhängige Differenzierung

Um zu überprüfen ob die Zellen der Osteoblasten-Zelllinie MC3T3 unter den experimentellen Bedingungen ihre Fähigkeit zur Differenzierung beibehalten und inwiefern diese pH-abhängig ist, wurden Langzeitversuche durchgeführt, mit denen die Phasen der Matrixreifung und der Mineralisierung abgedeckt werden sollten. Die Zellen wurden dazu entweder unter Standardbedingungen (pH 7,4) oder bei alkalischen Bedingungen (pH 7,8 oder pH 8,4) kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde den Medien in beiden Fällen beta-Glycerin-phosphat und Calcitriol hinzugegeben, um die Differenzierung zu unterstützen. Analysiert wurden die Regulation der Genexpression nach 14 Tagen während der Phase der Matrixreifung, sowie die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix als Indikator der Mineralisierungsphase.

Regulation der Genexpression

Mit Hilfe von Gen-Chip-Arrays konnte die Genexpression in den unterschiedlichen pH-Gruppen miteinander verglichen werden. Es wurden jeweils vier Chips je pH-Gruppe (pH 7,4, pH 7,8 und pH 8,4) eingesetzt. Bei der Transkriptomanalyse erwiesen sich in beiden alkalischen Ansätzen mehrere hundert Gene im Vergleich zum Standard als signifikant unterschiedlich exprimiert. Obwohl sich die Anzahl regulierter Gene bei pH 7,8 und pH 8,4 ähnelte, zeigten sich diverse Unterschiede bei den regulierten Genen. Während von den jeweils über 500 regulierten Genen insgesamt 301 Gene in beiden alkalischen Gruppen auftraten, waren 205 Gene ausschließlich in der pH 7,8-Gruppe und 239 Gene ausschließlich in der pH 8,4-Gruppe reguliert. Somit liegt bei

pH 8,4 nicht nur eine Amplifikation der Wirkung im Vergleich zu pH 7,8 vor. Bei einem direkten Vergleich der pH 7,8-Gruppe mit der pH 8,4-Gruppe erwiesen sich 96 Gene als signifikant unterschiedlich exprimiert. Das nachfolgende Venn-Diagramm erlaubt einen Überblick über die Anzahl der in den jeweiligen Vergleichsgruppen gemeinsam und exklusiv regulierten Gene.

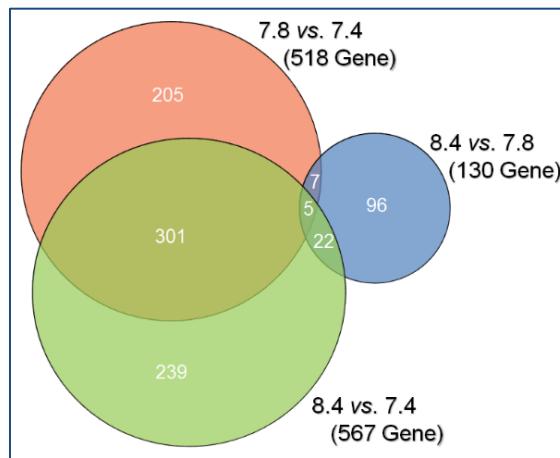


Abbildung 20 Venn-Diagramm der drei Vergleichsgruppen zwischen pH 7,4, pH 7,8 und pH 8,4

Dargestellt sind die Anzahlen regulierter Gene für die Vergleiche pH 7,8 und 7,4 (roter Kreis), pH 8,4 und 7,4 (grüner Kreis) sowie pH 8,4 und 7,8 (blauer Kreis) sowie deren Schnittmengen.

Da der Medium-pH in der pH 8,4-Gruppe größeren Schwankungen unterworfen war und sich ein eher uneindeutiges Bild des Expressionsprofils ergab, konzentriert sich die Darstellung der Ergebnisse im Folgenden auf die pH 7,8-Gruppe. Alle Daten, einschließlich der pH 8,4 Daten, wurden online unter der GEO accession number GSE84907 hinterlegt.

Die fünf bei pH 7,8 am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene sind in Tabelle 5 zusammen mit ihrer jeweiligen Funktion aufgeführt. Sie sind an Prozessen der Mineralisierung (DMP1, ANXA8), der Zelladhäsion und -ausbreitung (FABP4, HMGA2, CTGF, FLRT1, S100B), der Differenzierung (SFRP2, TNFRSF19) sowie dem Stoffwechsel (GYS2) beteiligt. Auffällig ist die besonders stark ausgeprägte Überexpression von DMP1, einem ECM-Protein aus der Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein (SIBLING) Familie.

Die Genexpression typischer Transkriptionsfaktoren früher Osteoblasten wie zum Beispiel Runx2 und SP7 (Osx) erwies sich bei pH 7,8 als entweder unverändert oder sogar herunterreguliert. Im Gegensatz dazu war der Transkriptionsfaktor Activating transcription factor 4 (ATF4), welcher als ein kritischer Regulator der terminalen Differenzierung und Funktion betrachtet wird [70] hochreguliert (Fold change: 2.22).

Tabelle 5 Top 5 der hoch- bzw. herunterregulierten Gene

Affymetrix ID	Gen	Funktion	Fold change
17439805	<i>DMP1</i>	Knochen-Mineralisierung	14.5
17404091	<i>FABP4</i>	Zell-Proliferation	6.8
17232235	<i>CTGF</i>	Zell-Adhäsion	4.7
17245422	<i>HMG A2</i>	Zell-Proliferation	4.7
17298775	<i>ANXA8</i>	Kalziumionen-Bindung	4.2
17472497	<i>GYS2</i>	Glykogen-Synthese	-8.7
17398557	<i>SFRP2</i>	Apoptose, Knochen-Morphogenese	-8.9
17362256	<i>FLRT1</i>	Zell-Adhäsion	-9.1
17234494	<i>S100B</i>	Zell-Proliferation, Stressantwort	-10.2
17307433	<i>TNFRSF19</i>	Apoptose	-11.3

Die Ergebnisse der Validierungsversuche mittels PCR stimmten weitgehend mit den jeweiligen Gen-Chip-Daten überein. In der nachfolgenden Tabelle sind die mittleren Fold changes der Gene *DMP1*, *FABP4*, *SFRP2*, *TNFRSF19* und *ATF4* für beide Methoden aufgeführt. Die Hauptunterschiede wurden durch einen verringerten dynamischen Bereich bei der Berechnung der Fold changes in der Gen-Chip-Technologie und die unterschiedlichen Berechnungsalgorithmen bei der Normalisierung von PCR-Daten und Gen-Chip-Daten verursacht. Während bei der PCR eine Normalisierung über GAPDH als Referenzgen erfolgte, wird bei der Auswertung der Gen-Chips der sogenannte RMA-Algorithmus verwendet. Wie bei den meisten Algorithmen zur Chip-Analyse werden Fold changes bei dieser Methode im Vergleich zur PCR eher unterschätzt [71]. Die Berechnung des Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten bewies mit einem Wert von $r = 0.99$ die Validität der Gen-Chip-Analyse.

Tabelle 6 Vergleich der Fold changes ermittelt über Gen-Chip und PCR

Gen	Fold change Chip	Fold change PCR
<i>DMP1</i>	14,49	20,35
<i>FABP4</i>	6,83	9,29
<i>SFRP2</i>	-8,85	-28,71
<i>TNFRSF19</i>	-11,27	-37,94
<i>ATF4</i>	2,22	2,72

Die bei der Transkriptionsanalyse als reguliert identifizierten Gene konnten mit Hilfe des Programmes Ingenuity Pathway Analyses verschiedenen Signalwegen und Netzwerken zugeordnet werden. Die so extrahierten Signalwege wurden nach einer Überprüfung hinsichtlich ihrer Relevanz für den Zelltyp für weitere Analysen verwendet. In der untenstehenden Tabelle sind jeweils die Signalwege, in denen sich die meisten hoch- beziehungsweise herunterregulierten Gene befinden, aufgeführt.

Tabelle 7 Signalwege mit anteilig den meisten hoch- bzw. herunterregulierten Genen

(Aktivierte / Reprimierte) Signalwege	z-score	p-value	Betroffene Gene
p38 MAPK Signaling	2.64	5.4E-5	7 (110)
Endoplasmic Reticulum Stress Pathway	0	6.9E-4	3 (20)
IL10 Signaling	0	2.6E-3	4 (65)
ERK/MAPK Signaling	0.82	2.6E-3	6 (177)
Acute-Phase Response Signaling	2.0	1.3E-2	5 (157)
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	1.0	1.6E-2	5 (166)
PCP pathway	-1.63	5.1E-4	6 (62)
Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency	-2.45	4.4E-3	6 (94)
Wnt/Ca ⁺ Pathway	-2.0	1.2E-2	4 (55)
HIF1 α Signaling	0	2.1E-2	5 (96)
eNOS Signaling	-2.0	2.4E-2	6 (135)

Es konnte gezeigt werden, dass durch die alkalischen Kultivierungsbedingungen zahlreiche Signalwege im Zusammenhang mit Stress, Differenzierung und Knochenzellfunktion reguliert wurden.

Zu den Signalwegen, in denen sich die meisten heraufregulierten Gene befinden, gehört das p38 MAPK Signaling, welches an Zellantworten auf extrazelluläre Stressstimuli und inflammatorische Zytokine wie TNF, IL1 und IL18 beteiligt ist [72,73]. Während die Expression dieser Zytokine bei pH 7,8 unverändert oder geringfügig herunterreguliert war, ließ sich für die entsprechenden Rezeptoren eine signifikant erhöhte Genexpression nachweisen. Obwohl die p38 MAPK selbst nicht signifikant reguliert wurde, führten die verschiedenen Regulationsprozesse zu einer insgesamt erhöhten Aktivität des Signalnetzwerkes (z-Score: 2.64).

Die Regulationsprozesse bei pH 7,8 führten zu einer Verminderung der Aktivität beider nicht kanonischen Wnt-Signalwege (PCP pathway und Wnt/Ca⁺ Pathway) auf der Transkriptionsebene. Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante Herunterregulation der typischen Antagonisten des kanonischen Wnt-Signalweges WIF1 und SFRP2 festgestellt, welche eine erhöhte Aktivität dieses Signalweges verursachen würde.

Das kondensierte Schema in Abbildung 21 fasst die Interaktion der für die Antwort auf den alkalischen pH-Wert als am relevantesten erachteten Gene zusammen.

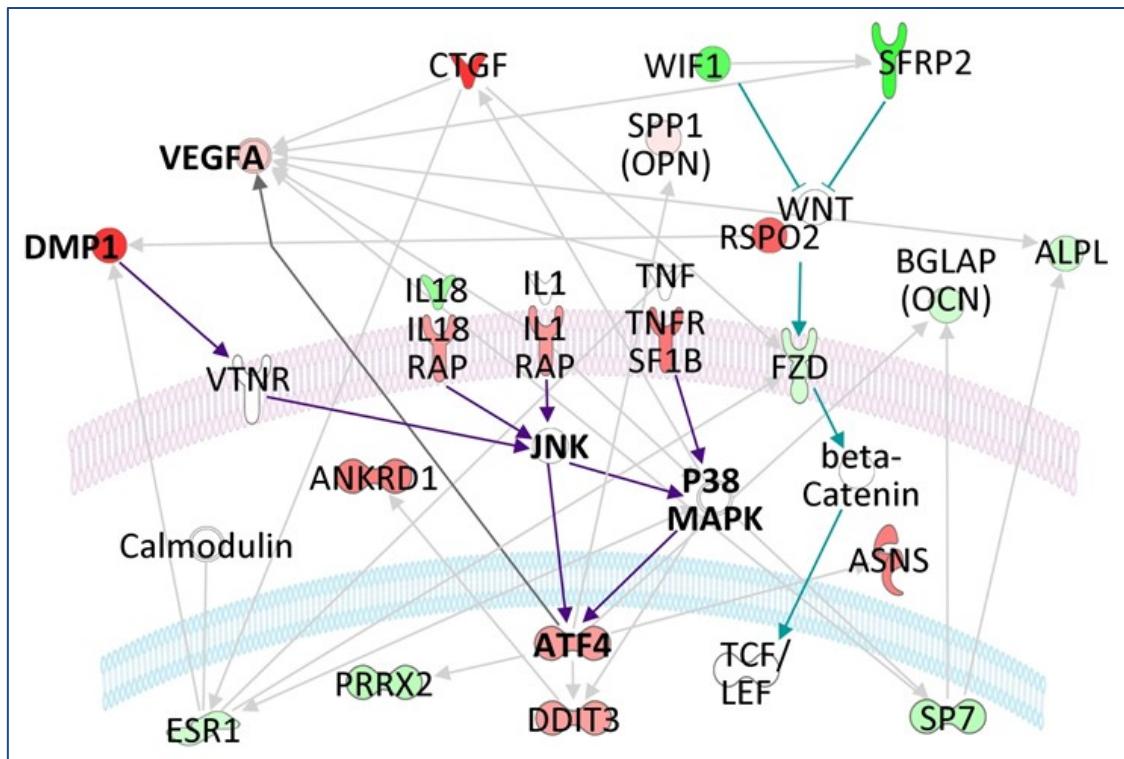


Abbildung 21 Schematisches Netzwerk regulierter Signalwege bei pH 7,8 [69]

Gezeigt sind heraufregulierte (rot), herunterregulierte (grün) und nicht signifikant regulierte Gene (weiß) innerhalb eines mit der Ingenuity Pathway Analyses Software zusammengefassten Netzwerkes. Die dargestellten Signalwege wurden aus den auf den Genlisten basierenden und von der Software ausgegebenen globalen funktionalen Netzwerken extrahiert.

Mineralisierung der extrazellulären Matrix

Ein sehr später Marker für die Osteoblasten Differenzierung ist die Fähigkeit der Zellen zur Mineralisierung der sie umgebenden Matrix. In der Mineralisierungsphase wird Kalzium in die ECM sezerniert, welches mit Hilfe des Farbstoffes Alizarin Red angefärbt wurde. Ohne die Zugabe der Zusätze beta-Glycerin-phosphat und Calcitriol nach Erreichen der Konfluenz, begann sich der Phänotyp der MC3T3-Zellen im Laufe des Versuches zu verändern. Die Zellen nahmen unabhängig vom Medium-pH eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie an. In diesen Kulturen konnten zu keinem Zeitpunkt Kalziumablagerungen detektiert werden. In den Ansätzen, welche die entsprechenden Zusätze enthielten, blieb der Übergang zu der Fibroblasten-ähnlichen Morphologie aus. Hier waren einige apoptotische Zellen und ein weniger dichter Zellrasen zu beobachten. Dennoch konnte in diesen Ansätzen Kalzium nachgewiesen werden. In der untenstehenden Abbildung sind die Färbeergebnisse nach 14 und 21 Tagen bei Standard-pH-Bedingungen beziehungsweise bei pH 7,8 gezeigt. Während bei pH 7,4 weder nach 14 Tagen noch nach 21 Tagen Kalzium nachgewiesen werden konnte, waren bei pH 7,8 bereits nach 14 Tagen erste Kalzium enthaltende Zellen anfärbbar. Nach 21 Tagen waren diese Zellen von großflächigen Kalziumablagerungen bedeckt. Die Ablagerungen schienen in einer zellfreien Matrix eingelagert zu sein, welche als stark ausgeprägte ECM interpretiert werden kann. Obwohl diese Matrix sowohl unter Standardbedingungen als auch bei pH 7,8 ähnlich stark ausgeprägt zu sein schien, erwies sich die Abscheidung des Kalziums als pH-abhängig. Eine Verlängerung des Versuches auf 28 Tage zeigte, dass die Zellen auch unter Standardbedingungen fähig waren Kalzium zu sezernieren, jedoch

setzte die Kalziumabscheidung bei pH 7,8 bereits nach der Hälfte dieser Kultivierungszeit und damit signifikant schneller ein.

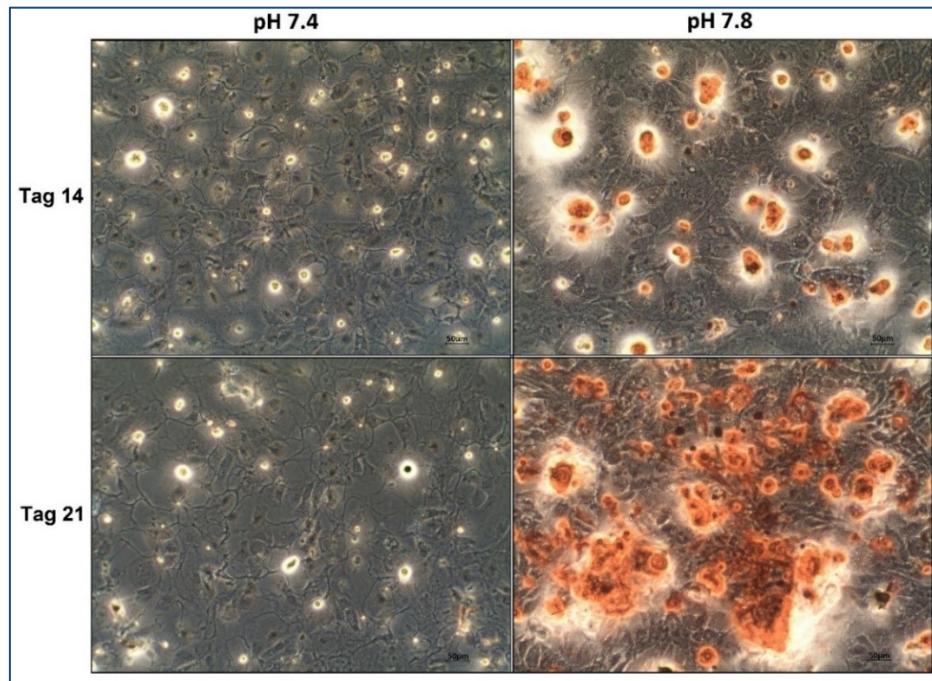


Abbildung 22 Kalziumabscheidung bei Langzeitkultur unter Standard-pH-Bedingungen und bei pH 7,8 [69]
MC3T3 sc14 wurden für 14 beziehungsweise 21 Tage in beta-Glycerin-phosphat- und Calcitriol-haltigem Medium bei pH 7,4 und pH 7,8 kultiviert bevor mit Hilfe eines Alizarin Red Assays Kalzium rot angefärbt wurde.

4.2 pH modifizierendes Implantatmodell

Gegenstand der Untersuchungen war das Implantat-Modellsystem aus alkalisierender Matrix, perforierten Titanplatten und Osteoblasten der Zelllinie MC3T3 beziehungsweise primären humanen Osteoblasten. Betrachtet wurden die alkalisierenden Eigenschaften des Implantatmodells und ihr Einfluss auf das Anwachsverhalten, die Proliferation und die Genexpression der Osteoblasten. Ergebnisse aus den Vorversuchen zur Findung einer geeigneten Matrix und zur Überprüfung dessen Biokompatibilität sind an dieser Stelle nicht explizit dargestellt. Neben dem PVA-Polymer-Elektrolyt wurden Agarose, Gelantine und Polydimethylsiloxan als mögliche Matrices getestet. Alle untersuchten Matrices sind biokompatibel, jedoch zeigte der PVA-Polymer-Elektrolyt bei NaOH-Beladung das geeignetste Release-Verhalten und die am besten handhabbare Konsistenz. Mit dem Begriff Matrix sind im Folgenden nur noch die PVA-Polymer-Elektrolyt-Gele bezeichnet.

4.2.1 pH-Wert-Änderungen im Modellsystem

Um das Release-Verhalten beziehungsweise die Kapazität der alkalisierenden Matrix einzuschätzen, wurden die Gele ohne Lochplatten in 12-Well-Platten eingebracht, mit 2 ml Medium überschichtet und der Medium pH-Wert über sieben Tage verfolgt. Hierbei wurde das Medium nach der täglichen Messung jeweils komplett ausgetauscht und somit die in Lösung gegangenen Hydroxidionen aus dem System entfernt, um einen Eindruck von der NaOH-Kapazität der Gele zu erhalten. Die Ergebnisse sind im folgenden Graphen als Mittelwerte und Standardabweichung ($n=10$) dargestellt. Auf eine statistische Auswertung der Zeitabhängigkeit wurde in diesem Versuch verzichtet, da auf Grund der herstellungsbedingten Abweichungen zwischen den einzelnen Gelansätzen die praktische Anwendbarkeit eines mathematischen Modells der Zeitabhängigkeit im Einzelfall fraglich bleibt.

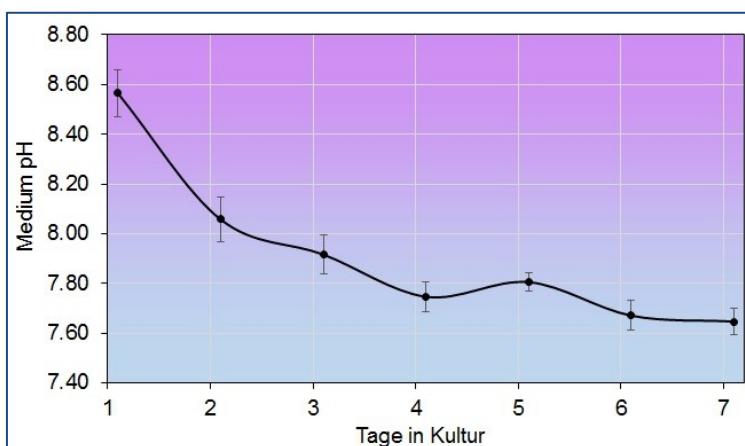


Abbildung 23 pH-Werte in zellfreiem Medium über alkalisierender Matrix

Gemessen wurde der Medium-pH vor dem täglichen Medienwechsel über den mit 1 M NaOH beladenen PVA-Gelen ($n=10$).

Auffällig ist, dass der Abfall des pH-Wertes von der ersten Messung zur zweiten mit 0,5 pH-Stufen besonders stark ausgeprägt ist. In den darauffolgenden Messintervallen fallen die Schwankungen im Medium-pH deutlich geringer aus. An dieser Stelle ist

anzumerken, dass wie unter „Anfertigung eines Modellsystems für ein modifiziertes Implantat – Herstellung PVA“ beschrieben, für die Zellkulturversuche vor der Aussaat der Zellen stets ein Medienwechsel stattgefunden hat, sodass das Release-Verhalten der Gele und der entsprechende Medium-pH zu Beginn der Versuche vergleichbar mit den Ergebnissen von Tag 2 des Kapazitätsversuches ist. Im Laufe des Kapazitätsversuches fiel der Medium-pH etwa um eine pH-Stufe, blieb mit einem pH von $7,65 \pm 0,05$ aber deutlich über dem Standard-Medium-pH von 7,4 und beweist so eine hohe NaOH-Kapazität der Gele.

Während der Zellkulturversuche wurde der Medium-pH an jedem Versuchstag gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Grafik aufgetragen. Auf eine statistische Auswertung der pH-Wert-Änderungen über die Zeit wurde verzichtet. Im Gegensatz zum zuvor erläuterten Kapazitäts-Versuch fand in den Zellkulturversuchen nur ein einmaliger Medienwechsel an Tag 4 statt, sodass an den restlichen Versuchstagen keine Hydroxidionen aus dem System entfernt wurden. Die Änderungen des pH-Wertes über die Zeit fielen daher geringer aus, wobei ein deutlicher Abfall des pH-Wertes durch den Medienwechsel an Tag 4 zu beobachten war. Die allmähliche Ansäuerung des Mediums durch die Stoffwechselendprodukte der Zellen, wie sie in der Kontrolle zu beobachten war, schien in den Ansätzen vollständig durch die alkalisierende Matrix abgepuffert zu werden. Nach dem Medienwechsel war sogar eine leichte Alkalisierung von Tag 5 auf Tag 7 zu beobachten. Auffällig war, dass in der Anfangsphase des Versuches auch in den Kontrollen leicht erhöhte pH-Werte erfasst wurden. Eine mögliche Ursache ist eine nicht ausreichende Auswaschung des NaOH aus den Kontrollgelen. Dass die verwendete Matrix auch nach der intensiven Auswaschung, wie unter „Anfertigung eines Modellsystems für ein modifiziertes Implantat – Herstellung PVA“ beschrieben, noch in der Lage war das carbonat-gepufferte Medium zu alkalisieren, ist ein weiterer Beweis für ihre hohe Kapazität.

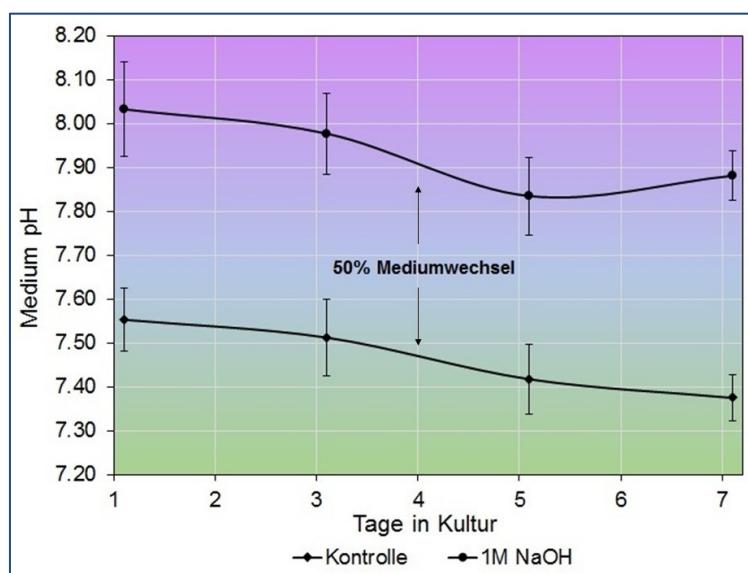


Abbildung 24 Medium-pH im Modellsystem an den Versuchstagen 1, 3, 5 und 7 [74]

Der Medium-pH über den alkalisierenden Implantatmodellen und den entsprechenden Kontrollen wurde an den jeweiligen Versuchstagen der Proliferationsversuche gemessen und ist somit den Daten aus dem WST-Assay und der Zellzahlbestimmung zuordnbar ($n=15$).

4.2.2 Anwachsverhalten und Proliferation im Modellsystem

In fünf Versuchsdurchläufen mit einem jeweiligen Umfang von drei Proben je Kondition wurde das Anwachsverhalten der Zellen im Modellsystem beurteilt. Dazu wurde die Zellzahl bereits am ersten Tag nach der Aussaat direkt über Auszählung und indirekt über einen WST-Assay kontrolliert. Es musste festgestellt werden, dass von den 50.000 Zellen, die ausgesät wurden, in jedem Versuchsdurchlauf nur ungefähr die Hälfte angewachsen war. Dieser Umstand galt sowohl für die Kontrolle ohne alkalisierende Matrix als auch den Ansatz, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die perforierte Titanplatte Ursache für diese Beobachtung war und nicht etwa das alkalisierende Medium. Um störende Einflüsse der alkalisierenden Matrix zu vermeiden, wurden stets alle Lochplatten vor der Weiterbehandlung der Zellen in eine neue Zellkulturplatte übertragen. Eine optische Kontrolle nach Entfernung der Lochplatten zeigte, dass am Boden der Zellkulturplatte Osteoblasten angewachsen waren, die bei der Aussaat durch die Löcher gefallen sein müssen. Da die alkalisierende Matrix undurchsichtig ist, konnte sie nicht mikroskopiert werden, sodass keine Aussage über eventuell hier angewachsene Zellen getroffen werden konnte.

Während an Tag 1 noch keine Unterschiede in der Zellzahl erkennbar waren, zeigten sich bereits an Tag 3 erste Tendenzen höherer Zellzahlen im alkalisierenden System. Diese Tendenz blieb über den restlichen Versuchszeitraum bestehen. In der untenstehenden Abbildung sind die Zellzahlen in der Kontrolle und dem alkalisierenden System grafisch dargestellt. Die Varianz der einzelnen Lochplatten, sowie der nicht absolut standardisierbaren alkalisierenden Matrices führte jedoch zu so großen Abweichungen der Absolutwerte zwischen den einzelnen Versuchsdurchläufen, dass eine statistische Auswertung kaum möglich war. Aus diesem Grund wurden die Messwerte jedes Ansatzes auf die jeweilige Kontrolle normiert und diese normierten Werte für die statistische Auswertung weiterverwendet.

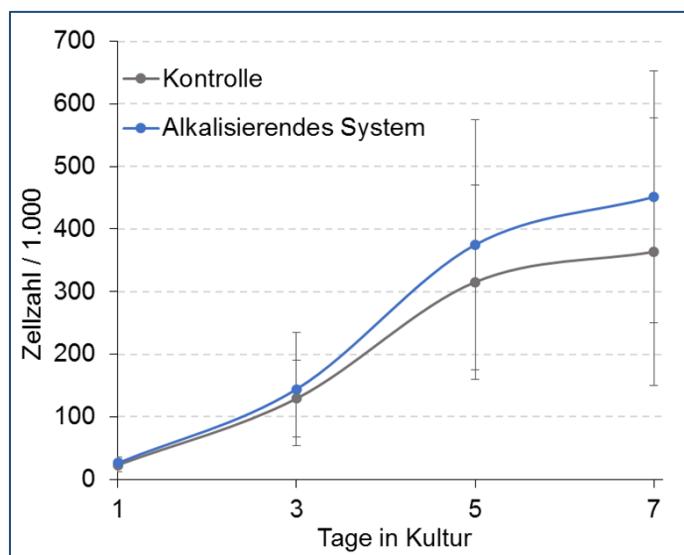


Abbildung 25 Zellzahl in Kontrolle und Modellsystem über sieben Versuchstage

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung ($n=15$) der ermittelten Zellzahlen an den Versuchstagen 1, 3, 5 und 7. Starke Abweichungen zwischen den einzelnen Versuchsdurchläufen bedingen die hohen Standardabweichungen.

Sowohl im t-Test als auch in der One-way ANOVA ließen sich so signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und alkalisierendem System nachweisen. Die Ergebnisse nach sieben Tagen in Kultur sind in Abbildung 26 grafisch dargestellt. Auffällig war, dass sich die Ergebnisse für den WST-Assay und die Zellzahlbestimmung unterschieden. Während die Zellzahl im alkalisierenden System signifikant erhöht war, war der WST-Metabolismus signifikant verringert. Bei den Betrachtungen zur pH-Abhängigkeit des WST-Assays hatte sich bei erhöhten pH-Werten ebenfalls eine Abnahme der Absorption je Zelle im Laufe des Versuchszeitraumes gezeigt. Da der WST Assay in diesem Versuch in Kontrolle und Ansatz bei gleichem Medium-pH stattgefunden hat, könnte eine solche Abnahme des zellulären WST-Metabolismus zu den beobachteten Unterschieden geführt haben. Eine mögliche Ursache für die in den verschiedenen Versuchsansätzen aufgetretenen Effekte bei dem WST-Assay wird unter „pH-Abhängigkeit der Proliferation“ diskutiert.

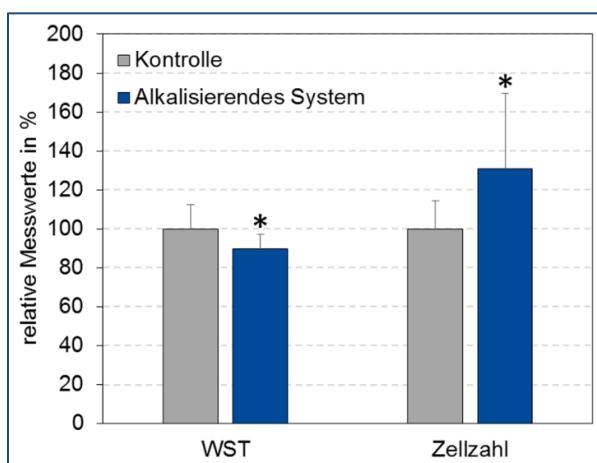


Abbildung 26 Proliferation im Modellsystem (MC3T3-Zellen) [74]

In jedem Versuchsdurchlauf wurden die beim WST-Assay gemessene Absorption und die Zellzahl im alkalisierenden Modellsystem auf die jeweilige Kontrolle normiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (n=15) der normierten Werte an Tag 7.

Auf Grund der Undurchsichtigkeit der Lochplatten konnte während der Kultivierung keine optische Kontrolle des Anwachsverhaltens in Bezug auf die räumliche Verteilung und die Morphologie der Zellen erfolgen. Um eventuelle Unterschiede bei der Ausbildung des Zellrasens und der ECM zu erkennen, wurden die Zellen nach sieben Tagen in Kultur fixiert und bestimmte Strukturen fluoreszenzmarkiert. Angefärbt wurden die Zellkerne, das Zytoskelett, sowie das ECM Protein Kollagen. Es zeigten sich keine qualitativen Unterschiede bei der Ausbildung des Zellrasens oder der Menge des sezernierten Kollagens zwischen Kontrolle und Ansatz.

In allen Proben war der Großteil der Löcher in den perforierten Titanplatten trotz des sonst konfluent erscheinenden Zellrasens deutlich zu erkennen. Um zu untersuchen ob diese erkennbaren Löcher tatsächlich zellfrei sind, wurde mit Hilfe eines Konfokalmikroskopes schrittweise durch die Proben gefahren und so ein z-stack angefertigt. Die Analyse dieser z-Stacks ergab, dass die Löcher nicht zellfrei waren sondern sich der Zellrasen in die Vertiefungen herabsenkte. Dies traf auch auf die Ansätze zu, in denen sich unterhalb der Titanplatten kein Zellkulturplastik sondern die alkalisierende Matrix befand. In Abbildung 27 sind die Aufsicht auf den Zellrasen um ein Loch herum, die Ansicht vom Boden des Loches, sowie der dazugehörige z-Stack gezeigt.

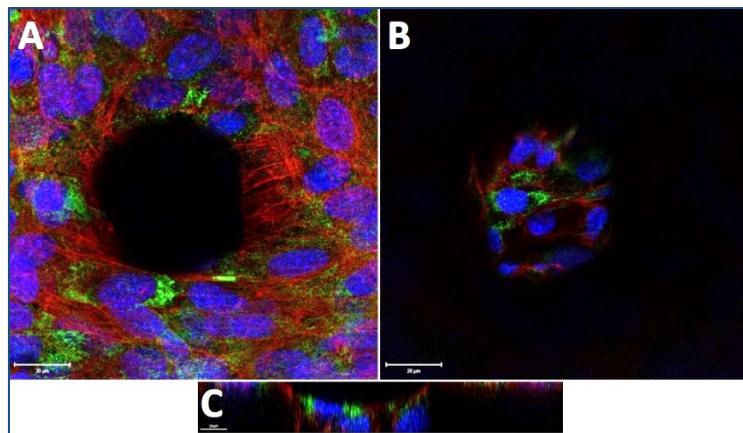


Abbildung 27 Fluoreszenzfärbung der Zellen und der ECM im Modellsystem

Dargestellt ist ein Ausschnitt des Zellrasens um ein Loch der Titanplatte (A), am Boden des Loches (B) sowie die entsprechende Seitenansicht (C). Angefärbt sind die Zellkerne in blau (DAPI), das Aktin-Cytoskelett in rot (TRITC) und Kollagen in grün (Primär-Antikörper + A488-gekoppelter Sekundär-Antikörper).

Nach den erfolgreichen Versuchen mit der murinen Zelllinie MC3T3, wurden die Proliferationsversuche mit primären humanen Osteoblasten wiederholt. Die Zellen von fünf verschiedenen Patienten wurden jeweils in Triplikaten verwendet. Die Limitierungen im Anwachsverhalten traten genau wie bei den MC3T3-Zellen auf und erwiesen sich für die primären Zellen als noch gravierender. Von den 100.000 eingebrachten Zellen konnte nach 24 h nur noch ungefähr ein Viertel auf den Titanplatten nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten die humanen Osteoblasten im Vergleich zu der Zelllinie eine stark verringerte Proliferation. Die Zellzahl lag in fast allen Versuchen auch nach sieben Tagen in Kultur noch unter 100.000 Zellen. Nichtsdestotrotz waren die normalisierten Daten vergleichbar mit den Ergebnissen, welche für die murinen Zellen erhalten wurden. Während die Zellzahl der MC3T3 im alkalisierenden Modellsystem an Tag 7 um circa 31% erhöht war, war die Zellzahl der primären humanen Osteoblasten um circa 34% gesteigert. Wie in Abbildung 28 zu sehen, konnten im Gegensatz zu den MC3T3-Zellen keine signifikanten Unterschiede im WST-Metabolismus festgestellt werden.

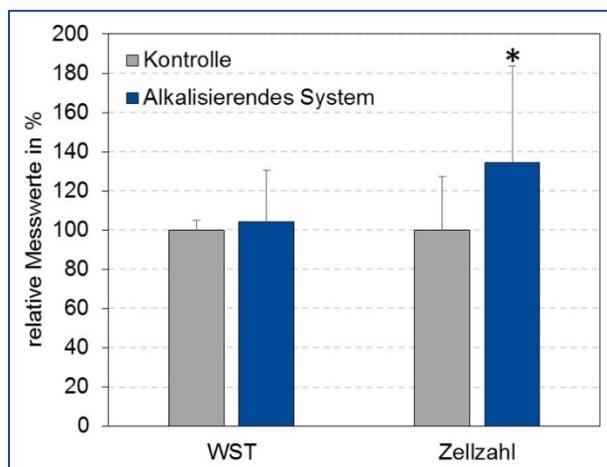


Abbildung 28 Proliferation im Modellsystem (humane Osteoblasten)

In jedem Versuchsdurchlauf wurden die Absorption des WST-1 Stoffwechselproduktes Formazan und die Zellzahl im alkalisierenden System auf die jeweilige Kontrolle normiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (n=15; 5 Patienten) der normierten Werte an Tag 7.

4.2.3 Genexpression im Modellsystem

Zur Analyse der Genexpression im Modellsystem wurden vollständige Transkriptome der in Kontrolle und Ansatz angesiedelten Osteoblasten angefertigt und miteinander verglichen. Für die statistische Auswertung wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgesetzt und ein Fold change ≥ 2 vorausgesetzt. Von den circa 30.000 detektierten Gentranskripten erwiesen sich unter diesen Rahmenbedingungen 252 Gene als signifikant unterschiedlich exprimiert. Davon waren 169 Gene im Ansatz hoch- und 83 Gene herunterreguliert. Bevor auf einzelne regulierte Gene eingegangen wird, soll zunächst die übergeordneten Signal- und Stoffwechselwege betrachtet werden. Die untenstehende Grafik enthält eine Auflistung der am stärksten betroffenen Wege.

Die meisten der regulierten Signalwege können grob in drei Hauptbereiche eingeteilt werden: Adhäsion, Proliferation und DNA-Reparatur (siehe Tabelle 8). Im Bereich der Adhäsion sind besonders viele Proteine hochreguliert, die an der Ausbildung von Fokalkontakten beteiligt sind. Über den PI3K-Akt-mTOR-Wege stehen diese Proteine ebenfalls mit mTOR, einem für das Wachstum und Überleben verantwortlichen Protein in Verbindung. Ebenfalls das Wachstum und Überleben steuernd wirken die Proteine des EGFR1 Signalweges. Bei dem Epidermal Growth Factor Receptor 1 (EGFR1) handelt es sich um einen Rezeptor für verschiedene Wachstumsfaktoren. Zusammen mit anderen Proteinen des Zellzyklus war die Genexpression vieler dieser Proteine im Ansatz hochreguliert. Weiterhin zählten Proteine, die bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen, zu den hochregulierten Genen. Hierzu gehören auch Proteine des p53 Signalweges wie zum Beispiel die an den Kontrollpunkten der Mitose wirkenden Cycline.

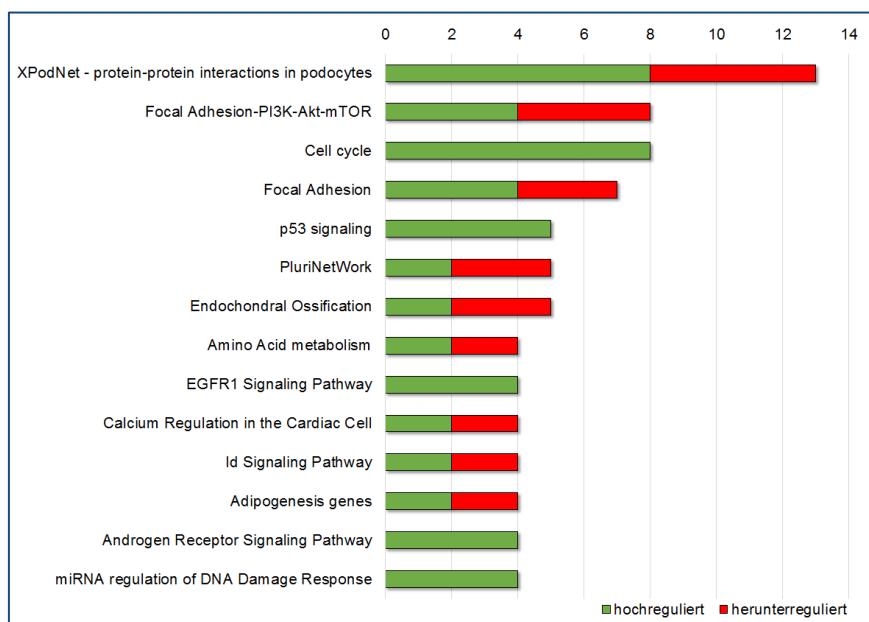


Abbildung 29 im Modellsystem regulierte Signal- und Stoffwechselwege

Gezeigt sind alle Signal- und Stoffwechselwege, in denen mindestens 4 Gene in Anwesenheit des alkalisierenden Implantatmodells reguliert wurden.

Neben den regulierten Signalwegen sollten auch die einzelnen Gene betrachtet werden. Da es sich mit 252 regulierten Genen um eine zu große Anzahl handelte, um sie übersichtlich darzustellen, wurden die Daten zunächst unter sehr strengen

Randbedingungen gefiltert. Nur diejenigen Gene, die mindestens um das 3-fache reguliert wurden und zusätzlich ein Signifikanzniveau von $p = 0,00001$ erreicht haben, sind in einer hierarchische Clusteranalyse in

Abbildung 30 dargestellt. Die hierarchische Clusteranalyse ist eine verbreitete Methode zur Genexpressionsdatenanalyse bei der Gene mit ähnlichen Expressionsmustern zusammengefasst und in immer weiter übergeordneten Clustern gruppiert werden. Da die Cluster keine Funktionseinheiten darstellen, sondern durch einen mathematischen Algorithmus basierend auf der Pearson Korrelation entstehen, soll in dieser Arbeit auf eine Interpretation der Clusteranalyse verzichtet werden.

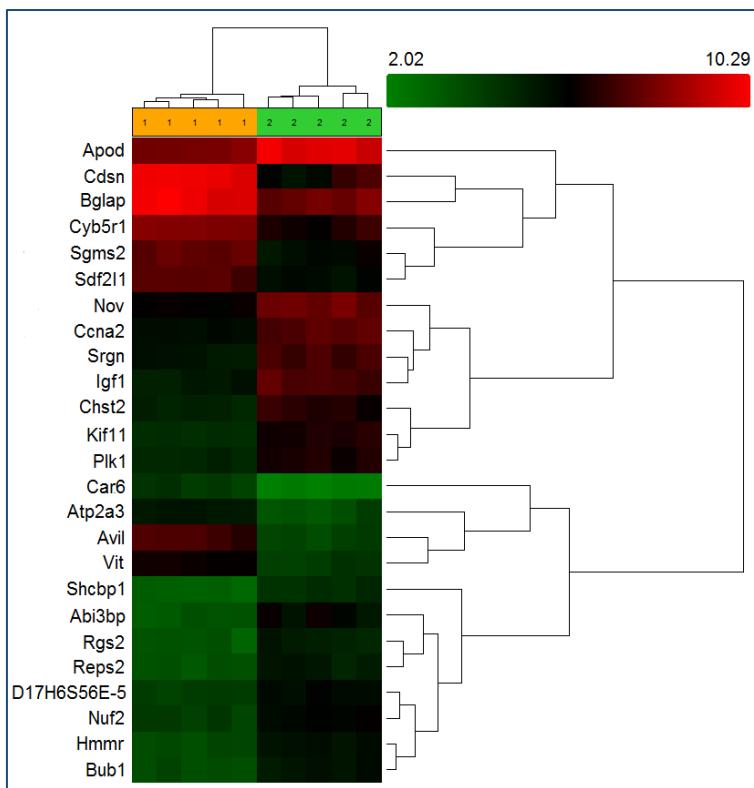


Abbildung 30 Hierarchisches Cluster der im Modellsystem am stärksten regulierten Gene

Abgebildet sind alle Gene, die mit einem Fold change von ≥ 3 und einem Signifikanzniveau von $p = 0,00001$ reguliert wurden. Die Farbkodierung entspricht den Signalintensitäten auf den Gen-Chips für die jeweils fünf Proben der Kontrolle (1) und des Ansatzes (2).

Im Weiteren wurden sowohl die Gene, welche mindestens um das 3-fache reguliert wurden als auch solche, die hochsignifikante Ergebnisse ($p = 0,0001$) lieferten, genauer betrachtet. Dabei wurden unspezifische Enzyme wie ubiquitär wirkende Kinasen, Reduktasen und Transferasen, die keiner spezifischen Zellantwort zuordenbar sind, nicht weiter betrachtet. In Tabelle 8 sind die übrigen auf Grund ihrer spezifischen Funktion als relevant für die Beurteilung des Modellsystems erachteten Gene aufgelistet. Zusätzlich wurden die Daten gezielt auf für die Knochenregeneration relevante Gene hin analysiert, welche ebenfalls in Tabelle 8 aufgeführt sind.

Viele knochenspezifische Gene wurden im Ansatz nicht oder nur kaum reguliert. Wie die Ergebnisse der Fluoreszenzfärbung bereits erahnen ließen, wiesen die Transkriptionsdaten nicht auf eine Regulation der Genexpression des Kollagens Typ1 im Ansatz hin. Auch die Expression der typischen Osteoblastenmarker der Familie der Bone

morphogenetic proteins (BMPs) war größtenteils unverändert. Nur für BMP4 und BMP6 ließen sich signifikante Unterschiede nachweisen. Während BMP6 im Ansatz kaum reguliert wurde (Fold change: -1,07; p=0,041), war BMP4 leicht hochreguliert (Fold change: 1,3; p=0,023). Obwohl der für die Differenzierung von Osteoblasten maßgebliche Transkriptionsfaktor Runt-related transcription factor 2 (Runx2) im Ansatz kaum reguliert war (Fold change: 1,07; p=0,047), zeigten die von Runx2 regulierten Gene Bglap und Alpl eine verringerte Expression (siehe Tabelle 8).

Da die Knochenregeneration nicht allein von den Osteoblasten abhängt, sondern durch das Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten bestimmt wird, wurden auch Faktoren in die Analyse mit einbezogen, die von Osteoblasten sezerniert werden und auf Osteoklasten wirken. Der Knochenaufbau und – abbau wird maßgeblich durch das Verhältnis der beiden sezernierten Faktoren RANKL und OPG beeinflusst [4]. Während das Gen für OPG (TNFRSF11B) nicht signifikant unterschiedlich exprimiert wurde, war das Gen für RANKL (Tnfs11) im Ansatz herunterreguliert, sodass sich insgesamt das RANKL/OPG-Verhältnis verschob. Des Weiteren waren der Osteoklasten-stimulierende Faktor Ostf1 und der Osteoblasten-hemmende Faktor Ostn leicht herunterreguliert.

Tabelle 8 im Modellsystem regulierte Gene eingeteilt nach ihrer übergeordneten Funktion

Funktion	Gen	Fold change	p-value
Adhäsion	kinesin family member 11 (Kif11)	+3,61	<0,0001
	integrin alpha 8 (Itga8)	+2,81	<0,0001
	Advillin (Avil)	-10,41	<0,0001
Proliferation	insulin-like growth factor 1 (Igf1)	+3,88	<0,0001
	hyaluronan mediated motility receptor (Hmmr)	+3,50	<0,0001
	c-fos induced growth factor (Figf)	+2,64	<0,0001
DNA-Reparatur	thioredoxin interacting protein (Txnip)	+14,86	0,0017
	cyclin A2 (Ccna2)	+3,31	<0,0001
	polo-like kinase 1 (Plk1)	+3,13	<0,0001
	stromal cell-derived factor 2-like 1 (Sdf2l1)	-3,34	0,0001
Knochenregeneration	Osteomodulin (Omd)	+2,10	<0,0001
	Osteoglycin (Ogn)	+2,02	<0,0001
	bone gamma carboxyglutamate protein (Bglap)	-2,97	<0,0001
	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (alpl)	-1,70	0,0054
	Osteocrin (Ostn)	-1,54	0,0005
	osteoclast stimulating factor 1 (Ostf1)	-1,37	<0,0001
	tumor necrosis factor superfamily member 11 (Tnfs11)	-1,31	0,0029

4.2.4 „Wound healing“ unter Modellbedingungen

Die Migrations- und Proliferationsfähigkeit der MC3T3-Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde mit Hilfe eines sogenannten Wound healing-Assays untersucht, bei dem nach Einbringung eines definierten Defektes die Dauer bis zum Wiedererreichen der Konfluenz analysiert wird. Der Versuch wurde in zehn Durchgängen je pH-Stufe durchgeführt. Unter beiden pH-Bedingungen waren die Osteoblasten in der Lage den eingebrachten Defekt im Zellrasen zu überwachsen. Zunächst war stets eine Migration der Osteoblasten in den zellfreien Raum zu beobachten. Durch vermehrte Zellteilungen und weitere Migrationsprozesse wurde dieser Raum im Laufe der Zeit von den Osteoblasten eingenommen bis erneut Konfluenz erreicht war.

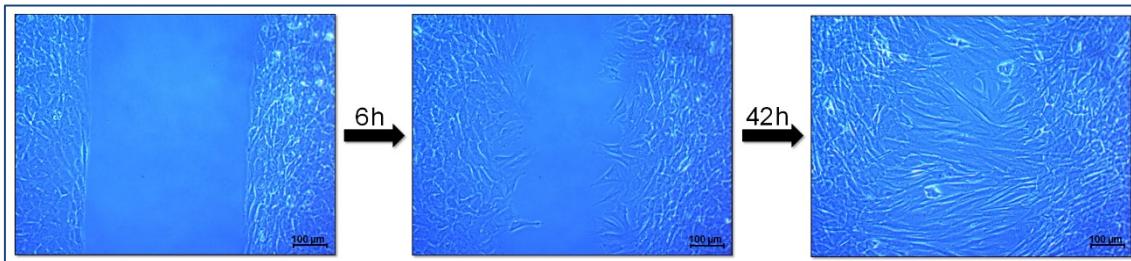


Abbildung 31 Zellrasen zu Beginn des Wound healing-Assays und nach 48 h

Die nach Einbringung des Defektes zellfreie Fläche wird im Laufe der Versuchszeit vollständig von den Osteoblasten überwachsen. Gezeigt ist eine exemplarische Bildsequenz nach 0, 6 und 48 h bei Standard-pH-Bedingungen.

Bei pH 7,4 benötigten die Osteoblasten im Durchschnitt $46,38 \pm 12,51$ h um den Defekt wieder zu verschließen. Bei pH 8,0 war der Defekt bereits nach $41,10 \pm 12,01$ h verschlossen. Somit lief der Defektverschluss in alkalischem Medium circa 10,4% schneller ab. Auf Grund der hohen Standardabweichung wurde das Signifikanzniveau im einseitigen t-Test mit $p=0,186$ jedoch überschritten. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Abbildung dargestellt.

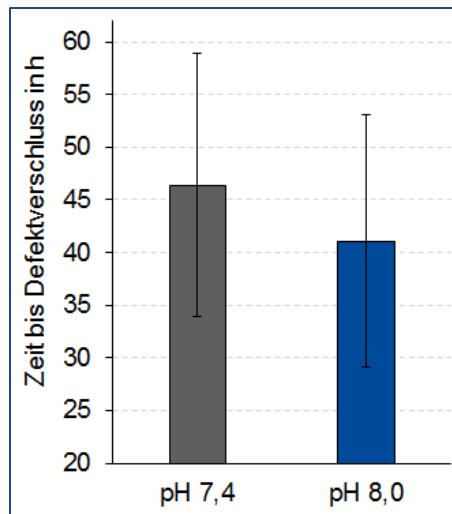


Abbildung 32 Wound healing-Assay: Abhängigkeit der Zeit vom pH-Wert

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung ($n=10$) der von den Osteoblasten benötigten Zeit, um den 500 µm breiten Defekt im Zellrasen zu verschließen.

4.3 Mechanische Stimulation in der Co-Kultur

Bei den Untersuchungen zum Einfluss der mechanischen Stimulation auf das Verhalten von Knochenzellen lag der Fokus auf der Interaktion von Osteozyten und Osteoblasten. In dem für diese Arbeit entwickelten Co-Kultur-System war es auf Grund der zwei durch eine semipermeable Membran voneinander getrennten Reaktionsräume möglich nur eine der beiden Zellpopulationen zu stimulieren und so auch indirekte Einflüsse der mechanischen Stimulation auf die jeweils unstimulierte Zellpopulation zu analysieren. Betrachtet wurden die Proliferation der Osteoblasten sowie deren Kollagen-Sekretion in Abhängigkeit von der Stimulation. Weiterhin wurde mit Hilfe von ELISAs die Sekretion potentieller Signalmoleküle durch die stimulierte Zellpopulation untersucht.

4.3.1 Proliferation unter mechanischer Stimulation

In den Versuchen zur mechanischen Stimulation wurden folgende Bedingungen betrachtet. Zum einen wurde zwischen den Stimulationsansätzen und den statischen Kontrollansätzen unterschieden, zum anderen wurden jeweils Systeme mitgeführt, in denen sich keine Osteozyten auf der Bodenmembran des unteren Reaktionsraumes befanden. Dieses Vorgehen ermöglichte es in den Stimulationsansätzen den Einfluss der stimulierten Osteozyten auf die Osteoblasten im oberen Reaktionsraum vom Einfluss des durch die periodische Membranbewegung ausgelösten oszillierenden Flüssigkeitsstroms abzugrenzen. Weiterhin ließ sich so abschätzen ob bereits die Anwesenheit von Osteozyten ausreicht, um die Proliferation der Osteoblasten zu beeinflussen. In einem weiteren Versuchsansatz wurde überprüft ob der Zelltyp der stimulierten Population eine Rolle spielt. Hierzu wurden die Co-Kulturen aus Osteozyten und Osteoblasten mit Co-Kulturen aus zwei Osteoblastenpopulationen verglichen.

Die statistische Analyse auf Signifikanz erfolgte mit Hilfe einer Zwei-Wege-ANOVA ($p < 0,05$) unter Verwendung der Student-Newman-Keuls Methode für die Gruppenvergleiche. Die Stichprobenumfänge betrugen $n = 15$ für alle Konditionen. Um Einschränkungen der statistischen Aussagekraft auf Grund der Varianz zwischen den einzelnen Versuchsdurchläufen zu vermeiden, wurden die Messwerte normiert. Zu diesem Zweck wurden die Werte der statischen Kontrollansätze, der Osteozyten-Osteoblasten-Co-Kulturen, als 100 %-Referenzwerte festgelegt. In jedem Versuchsdurchlauf wurden die Absolutwerte der restlichen Konditionen jeweils auf diese Referenz normiert und diese normierten Werte für die statistische Auswertung weiterverwendet.

In den statischen Kontrollansätzen erwies sich der Einfluss der Osteozyten auf die Proliferation der Osteoblasten als vernachlässigbar. Es ergab sich kein Unterschied in den relativen Zellzahlen zwischen den Co-Kultursystemen und den Systemen, in denen sich nur die oberen Osteoblastenpopulation befanden. In den Stimulationsansätzen hingegen war der Einfluss der Osteozyten deutlich. Insgesamt ließ sich ein signifikant positiver Effekt der mechanischen Stimulation auf die Osteoblastenproliferation nachweisen. Dieser lag in den Systemen ohne Osteozyten jedoch knapp über dem Signifikanzniveau ($p = 0,145$). Betrachtet man im Gegensatz dazu die Co-Kultursysteme mit Osteozyten,

zeigten sich signifikant höhere Osteoblastenzellzahlen in den Stimulationsansätzen als in den Kontrollansätzen. Die relativen Zellzahlen waren in diesen Stimulationsansätzen außerdem signifikant höher als in den Stimulationsansätzen ohne Osteozyten. Die Ergebnisse für alle vier Bedingungen sind in Abbildung 33 dargestellt.

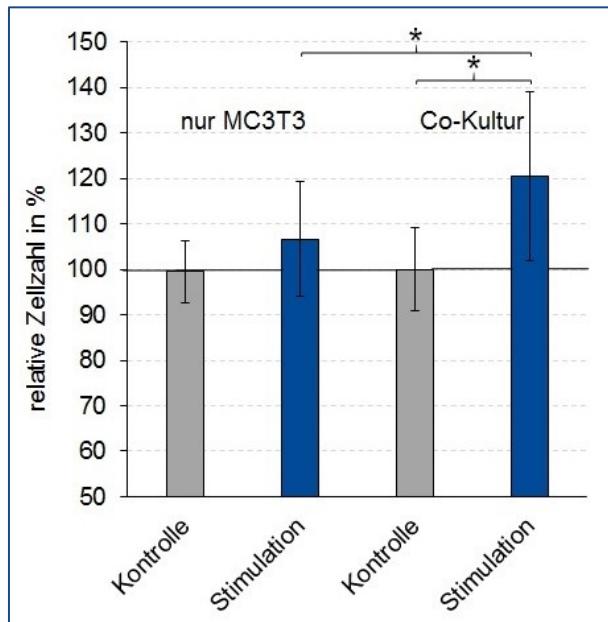


Abbildung 33 Osteoblasten-Proliferation in Abhängigkeit der Kulturbedingungen

In jedem Versuchsdurchlauf wurden die Zellzahlen auf die Werte der Kontrollansätze mit Osteozyten normiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (n=15) der normierten Werte nach 3 Tagen Stimulation.

Der Vergleich zwischen den verschiedenen Co-Kulturen zeigte, dass sowohl unter statischen Kontrollbedingungen als auch unter Einwirken mechanischer Stimulation die Osteoblastenproliferation in den oberen Inserts bei den Co-Kulturen aus zwei Osteoblastenpopulationen leicht gehemmt war. Die Zellzahlen waren im Vergleich zu den Co-Kulturen aus Osteozyten und Osteoblasten circa 10 % geringer.

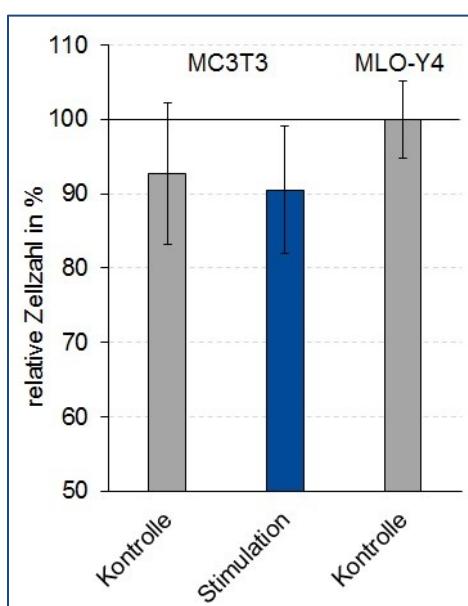


Abbildung 34 Osteoblasten-Proliferation in Abhängigkeit der Co-Kultur

In jedem Versuchsdurchlauf wurden die Zellzahlen auf die Werte der Kontrollansätze mit Osteozyten normiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (n=15) der normierten Werte nach 3 Tagen Stimulation.

4.3.2 Kollagensekretion unter mechanischer Stimulation

Eine der Hauptfunktionen von Osteoblasten ist die Sekretion von Kollagen. Der Einfluss der Stimulation im Co-Kultursystem auf diese Osteoblastenfunktion wurde über den Nachweis von Kollagen-1 α im Überstand untersucht. In allen Proben konnte eine hohe Menge an sezerniertem Kollagen nachgewiesen werden. Die errechnete Gesamtkollagenmenge betrug $494,4 \pm 19,7 \mu\text{g}$ für die Kontrollen, $503,8 \pm 65,0 \mu\text{g}$ für die Stimulationsansätze mit Osteozyten und $527,3 \pm 68,0 \mu\text{g}$ für die Stimulationsansätze mit Osteoblasten. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen konnten unter Verwendung eines t-Test auch nach einer Normalisierung auf die Gesamtproteinmenge keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die normalisierten Werte lagen im Durchschnitt bei $7,56 \pm 2,78 \mu\text{g}$ Kollagen/ μg Protein. Es zeigte sich lediglich eine Tendenz einer gesteigerten Kollagensekretion in den Stimulationsansätzen, welche zwei Osteoblastenpopulationen enthielten. Die erhaltenen Ergebnisse sind im folgenden Boxplot zusammengefasst.

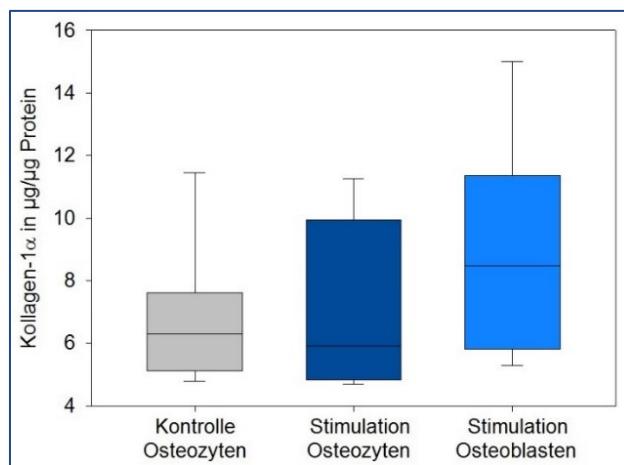


Abbildung 35 Sezerniertes Kollagen nach mechanischer Stimulation

4.3.3 Potentielle Signaltransduktion unter mechanischer Stimulation

Um Hinweise auf den Mechanismus zu finden, der bei der Stimulation der Osteozyten in Co-Kultur die erhöhte Osteoblastenproliferation verursacht, wurden die potentiell verantwortlichen Moleküle SDF-1, IGF-1 und PGE2 im Überstand nachgewiesen. Der statistische Vergleich erfolgte in allen Fällen mit Hilfe von gepaarten t-Tests.

SDF-1 konnte sowohl in den Kontrollen als auch in den Stimulationsansätzen in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Konzentrationen waren mit $6,25 \pm 1,18 \text{ pg/ml}$ in den Kontrollen und $5,85 \pm 1,28 \text{ pg/ml}$ in den Stimulationsansätzen unter beiden Bedingungen annähernd gleich.

Unter den beiden Versuchsbedingungen konnte ebenfalls IGF-1 in den Überständen der Osteozyten nachgewiesen werden. Mit $6,77 \pm 3,46 \text{ pg/ml}$ in den Kontrollen und $7,68 \pm 2,98 \text{ pg/ml}$ in den Stimulationsansätzen unterschieden sich die gemessenen Werte jedoch nicht ausreichend, um einen signifikanten Unterschied feststellen zu können.

Auch PGE2 konnte sowohl unter Kontrollbedingungen als auch bei Stimulation detektiert werden. Die erhaltenen PGE2-Werte unterschieden sich mit $10,78 \pm 7,75$ pg/ml für die Kontrollen und $15,59 \pm 5,79$ pg/ml für die Stimulationsansätze trotz der insgesamt relativ niedrigen Konzentrationen so deutlich voneinander, dass die statistische Auswertung eine signifikant höhere PGE2-Konzentration in den von stimulierten Osteozyten konditionierten Medien ergab. Die Ergebnisse für den PGE2-Nachweis sind in der untenstehenden Grafik abgebildet.

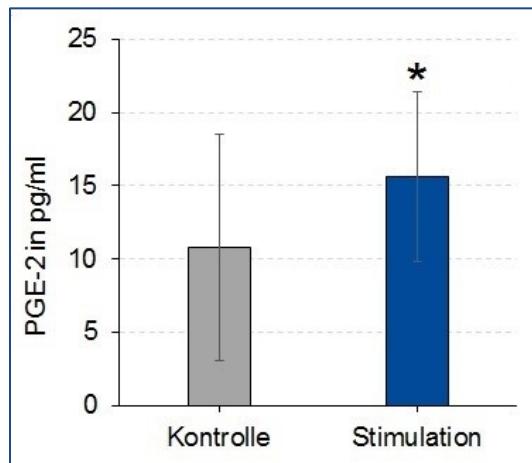


Abbildung 36 PGE2-Konzentration in konditionierten Osteozytenüberständen

Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (n=10) der Konzentrationen von PGE2 im Überstand von unstimulierten und stimulierten Osteozyten im Co-Kultur-System.

5. Diskussion

5.1 Experimentelles Vorgehen

Osteoblasten durchlaufen während ihrer Entwicklung eine Sequenz von drei Hauptphasen: Zellproliferation, extrazelluläre Matrix-Reifung und Mineralisierung [1,75]. Nur reife, differenzierte Osteoblasten sind in der Lage die extrazelluläre Matrix zu produzieren, modulieren und schließlich zu mineralisieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des pH-Wertes während dieser drei Phasen untersucht. Außerdem wurden zwei *in vitro* Kultursysteme etabliert, die einer optimierten Kultur von Knochenzellen beziehungsweise der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Knochenzellpopulationen dienen sollten.

Für die Analyse der Proliferation wurden die drei Parameter Zellzahl, WST-Metabolismus und ATP-Gehalt gewählt, da sie verschiedene Aspekte der Proliferation reflektieren. In der nachfolgenden Phase der Matrixreifung wurde ein vollständiges Transkriptom angefertigt, um ein umfassendes Bild des Einflusses des pH-Wertes auf die Osteoblasten zu gewinnen. Die eintretende Kalzifikation der ECM in der Phase der Mineralisierung konnte mit Hilfe eines AlizarinRed-Assays über die Anfärbung des eingelagerten Kalziums sichtbar gemacht werden.

Nachdem in den Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit festgestellt werden konnte, dass ein alkalischer pH-Wert positive Auswirkungen auf die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten hat, wurde ein *in vitro* Modellsystem entwickelt, um die Möglichkeiten einer alkalisierenden Modifikation von Implantaten zu untersuchen. Proliferation und Genexpression im Modellsystem waren deutlich verändert. Im Rahmen dieses Ansatzes wurde außerdem ein Wound healing-Assay durchgeführt, um den Einfluss des erhöhten pH-Wertes auf die Fähigkeit der Osteoblasten Defekte im Zellrasen wieder zu verschließen, zu untersuchen.

Neben den Untersuchungen zum optimalen Medium-pH, sollte auch das Kultursystem angepasst und für *in vitro* Studien optimiert werden. Um der physiologischen Situation möglichst nahe zu kommen und trotzdem definierte Änderungen einzelner Parameter zu ermöglichen, wurde ein Co-Kultur-System entwickelt in dem zwei Reaktionsräume durch eine permeable Membran voneinander getrennt sind. Die Kulturfläche des unteren Reaktionsraumes ist durch ihre Flexibilität geeignet eine mechanische Stimulation zu erlauben. Die Kulturfläche des oberen Reaktionsraumes bleibt von dieser Stimulation unberührt, sodass explizit die durch den Stimulus ausgelöste Signaltransduktion zwischen den zwei eingesäten Zellpopulationen beurteilt werden kann.

5.2 Einfluss des extrazellulären pH-Wert auf Osteoblasten

5.2.1 pH-Abhängigkeit der Proliferation

Alle getesteten Proliferationsparameter zeigten ähnliche pH-Abhängigkeiten, mit Optima im alkalischen Bereich zwischen pH 8,4 und pH 8,6 (Abbildung 14). Dabei bleibt zu beachten, dass die initial eingestellten pH-Werte vor allem oberhalb des Pufferbereiches von HEPES zwischen den Medienwechseln zunehmend stärker in den neutralen Bereich geshiftet sind. Diese Betrachtung legt einen leicht verschobenen optimalen pH-Bereich in Bezug auf die jeweiligen Parameter-Peaks nahe, wodurch der tatsächliche Optimalbereich wahrscheinlich zwischen pH 8,0 und pH 8,4 liegt. Die gemessenen Werte waren bei optimalem pH auf bis über 200 % gesteigert. Unterschiede waren nicht nur im Ausmaß der Steigerungen sondern vor allem auch im zeitlichen Ansprechen der Parameter erkennbar.

Während für den WST-Metabolismus bereits nach zwei Tagen in Kultur unter alkalischen Bedingungen signifikant höhere Werte detektierbar waren, ließen sich für den ATP-Gehalt und die Zellzahl erst später signifikante Unterschiede nachweisen. Diese zeitliche Diskrepanz gab Anlass zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit des WST-Assays, zu der bis dahin keinerlei Informationen vorlagen. Zu diesem Zweck wurden zwei Tests bei gleicher Zellzahl durchgeführt. Die Tests ergaben, dass zwar kein störender Einfluss des pH-Wertes auf die photometrische Messung vorlag, die gemessene Absorption je Zelle aber signifikant vom pH-Wert während der einstündigen Inkubationszeit abhing. Die Verstoffwechselung von WST-1 zu Formazan muss dementsprechend bei alkalischem pH effizienter abgelaufen sein, was auf eine erhöhte Aktivität des verantwortlichen Enzyms Succinat-Reduktase schließen lässt. Über die einzelnen pH-Optima der Enzyme der Atmungskette liegen keine Informationen vor; die pH-Abhängigkeit von Enzymen ist jedoch ein allgemein bekanntes Phänomen [76]. Die Ergebnisse zur pH-Abhängigkeit des WST-Assays weisen darauf hin, dass die erhöhte Absorption, welche in den alkalischen pH-Gruppen gemessen wurde, sowohl durch die tatsächlich erhöhten Zellzahlen als auch durch die gesteigerte Effizienz der Succinat-Reduktase verursacht wurden, woraus sich die scheinbar erhöhte Sensitivität des Assays ergab. Unter der Annahme, dass die Menge an Succinat-Reduktase zu Beginn der Proliferationsversuche in allen pH-Gruppen gleich ist, müsste die gesteigerte Effizienz des Enzyms bei alkalischem pH dementsprechend zu erhöhten Absorptionswerten pro Zelle geführt haben. Tatsächlich war die Absorption je Zelle in der pH 8,4-Gruppe zu Versuchsbeginn ungefähr viermal höher als unter Standard-pH-Bedingungen. Im Laufe der 6-tägigen Versuchszeit schwächte sich dieser Effekt jedoch deutlich ab bis an Versuchstag 6 kein Unterschied zwischen den pH-Gruppen mehr feststellbar war (Abbildung 19). Das Verschwinden dieses Effekts könnte auf die Herunterregulation des Enzyms in Folge seiner erhöhten Effizienz zurückzuführen sein. Faktoren wie eine eintretende Substrathemmung bei sehr hohen Zellzahlen oder eine zunehmende Transportlimitierung durch die Ausbildung von Multilayern sind jedoch nicht auszuschließen.

Eine erhöhte Effizienz der Succinat-Reduktase würde eine gesteigerte ATP-Synthese ermöglichen. Tatsächlich konnte ein erhöhter ATP-Gehalt in den Wells der alkalischen

pH Gruppen gemessen werden. Während der ATP-Gehalt in der pH 7,4-Gruppe an Tag 6 bei $52,13 \pm 14,87 \mu\text{M}$ im Zelllysat lag, nahm er in der pH 8,4-Gruppe mit $119,45 \pm 48,44 \mu\text{M}$ einen mehr als doppelt so hohen Wert an. Bei einer Normierung auf die Zellzahl (Abbildung 18) ergaben sich jedoch in allen Gruppen sehr ähnliche Werte. Im Laufe der Proliferationsversuche war in allen pH-Gruppen lediglich eine geringfügige Abnahme des ATP-Gehaltes pro Zelle zu beobachten. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen von Komarova *et al.*, welche zwischen den Tagen 3 und 7 verringerte zelluläre ATP-Spiegel gemessen haben, wenn die Zellen in α -MEM ohne beta-Glycerinphosphat kultiviert wurden [77]. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Reduktion in unseren Versuchen durch das Testprotokoll selbst verursacht wurde, zum Beispiel durch die Behinderung der Zelllyse durch die sich allmählich ausbildende ECM-Schicht. Insgesamt weisen die Daten auf ein stabiles Gleichgewicht zwischen ATP-Synthese und dem Energieverbrauch hin [78]. Das vermehrt zur Verfügung stehende ATP scheint direkt für Proliferationsprozesse verwendet zu werden und erlaubt so die beobachteten erhöhten Zellzahlen in den alkalischen pH-Gruppen.

Obwohl man annehmen könnte, dass sich die Zellzahlen in den verschiedenen pH-Gruppen mit Annäherung an die Plateauphase angleichen, waren sie in den alkalischen pH-Gruppen auch noch an Tag 6 deutlich höher als bei Standard-pH-Bedingungen. Diese erhöhten Zellzahlen könnten auf die Bildung von Multilayern hinweisen, ein Prozess, welcher einen gewissen Grad der Differenzierung voraussetzen würde [77].

Betrachtet man die pH 8,4-Gruppe, so sprach der WST-Metabolismus als erster Indikator an, gefolgt vom ATP-Gehalt an Tag 3 und abschließend der Zellzahl ab Tag 4. Hieraus ergibt sich folgende Hypothese zum Einfluss des pH-Wertes auf die Proliferation: Der erhöhte pH-Wert führt zu einer erhöhten Aktivität der Succinat-Reduktase, sodass in Folge dessen vermehrt ATP über die Atmungskette synthetisiert werden kann. Das zusätzlich bereitgestellte ATP kann für anabole Prozesse während des Zellwachstums und der Zellteilung genutzt werden, sodass die Proliferation beschleunigt ablaufen kann. Die angenommene Herunterregulation der Succinat-Reduktase mit zunehmender Kultivierungszeit, lässt eine negative Feedbackschleife bei Annäherung an die Konfluenz vermuten. Die untenstehende Abbildung fasst den hier postulierten Prozess schematisch zusammen.

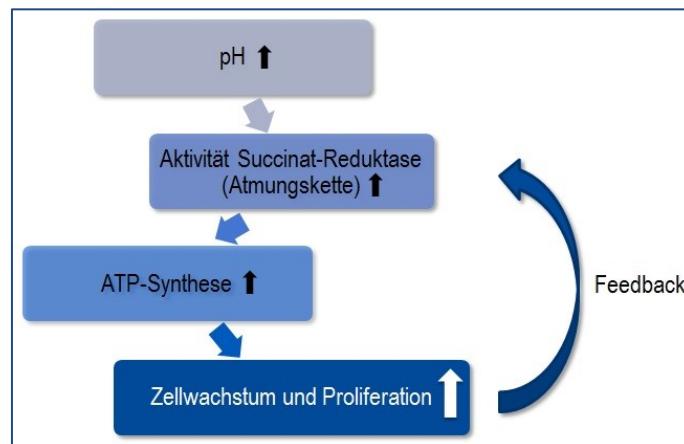


Abbildung 37 Schema zur pH-abhängigen Proliferation

5.2.2 pH-Abhängigkeit der Differenzierung

Bei langfristiger Kultivierung ohne den Zusatz von beta-Glycerin-phosphat und Calcitriol nahmen die MC3T3-Zellen mit der Zeit eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie an. In diesen Kulturen konnten auch nach 30 Tagen noch keine Kalziumablagerungen festgestellt werden. Eine mögliche Ursache hierfür ist eine eintretende Dedifferenzierung nach Erreichen der Konfluenz. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass es bei kontinuierlicher Passagierung von heterogenen Zelllinien wie den MC3T3-Zellen zu einer positiven Selektion schnell wachsender Subpopulationen kommt [79]. Diese schnell wachsenden Zellen verlieren ihre Fähigkeit zur Mineralisierung, ein Effekt, der ebenfalls in den Versuchen zu dieser Doktorarbeit zu beobachten war. Die zu Grunde liegende Ursache könnte auch hier eine Verschiebung des Gleichgewichts weg von reifen ausdifferenzierten Zellen und hin zu unreifen proliferierenden Zellen sein. In den Versuchen zur pH-abhängigen Differenzierung konnte der Phänotyp reifer Osteoblasten durch die Zugabe der Zusatzstoffe stabilisiert werden. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich zum Großteil auf den antiproliferativen Eigenschaften von Calcitriol. Es ist bekannt, dass das Ende der Proliferationsphase eine Voraussetzung für die Initiation der Osteoblasten-spezifischen Genexpression und damit den Eintritt in die Phase der Matrixreifung ist [80]. Die beschriebenen Beobachtungen weisen darauf hin, dass dieser Mechanismus auch für die immortalisierte Zelllinie MC3T3 gilt.

Um einen umfassenden Überblick über den Einfluss des pH-Wertes auf den Zellstatus und die Differenzierungsprozesse zu erlangen, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Der Zeitpunkt der Analyse wurde so gewählt, dass nach dem von Sudo *et al.* beschriebenen Ablauf der Entwicklung von MC3T3-Zellen [57] der Beginn der Matrixreifungsphase, in welcher erste Kollagenfibrillen in der ECM angereichert werden, erreicht sein müsste. Nach 14 Tagen in Kultur zeigten sich für beide alkalischen pH-Gruppen deutliche Unterschiede im Expressionsmuster im Vergleich zur Kontrolle. Das Vorliegen von hunderten differentiell exprimierten Genen weist auf einen weitreichenden Einfluss des pH-Wertes auf die Zellphysiologie hin. Dieser Einfluss schien sich jedoch in den beiden pH-Gruppen teilweise zu unterscheiden, sodass nicht allein von einer Verstrkung der auftretenden Effekte bei einer weiteren Erhöhung des pH-Wertes ausgegangen werden kann, sondern stattdessen auch die Induktion anderer Signalwege in Betracht gezogen werden muss. Es ist anzunehmen, dass eine pH-Wert-Änderung um eine ganze pH-Stufe vor allem eine Vielzahl von Stressantworten auslässt. In dieser Arbeit wird sich für eine gradlinigere Diskussion im Weiteren auf die Ergebnisse des Vergleiches der pH 7,8-Gruppe mit dem Standard konzentriert.

Bei der Betrachtung der Osteoblasten-typischen Transkriptionsfaktoren fiel auf, dass die frühen Transkriptionsfaktoren Runx2 und Osx bei pH 7,8 unverndert beziehungsweise sogar leicht vermindert exprimiert wurden. Im Gegensatz dazu war die Expression von ATF4, einem sehr späten Transkriptionsfaktor, signifikant hochreguliert. ATF4 ist ein entscheidender Faktor für die Differenzierung von Osteoblasten und deren terminale Funktion [70]. Obwohl die Transkription nicht direkt durch ATF4 reguliert wird, wird die Synthese von Kollagen Typ I von diesem Transkriptionsfaktor beeinflusst, sodass ein Fehlen von ATF4 eine unzureichend ausgebildete Knochenmatrix zur Folge hat. ATF4-

defiziente Mäuse zeigen eine verzögerte Skelettentwicklung und durch die verminderte Knochenbildung einen Phänotyp mit erheblich verringriger Knochenmasse [81].

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wies das p38 MAPK-Netzwerk, welches unter anderem die Expression von ATF4 kontrolliert, bei pH 7,8 eine verstärkte Aktivität auf. Dieses Netzwerk ist beteiligt an der Reaktion auf extrazelluläre Stressstimuli und inflammatorische Zytokine wie zum Beispiel TNF, IL-1 und IL-18 [72,73]. Während die Expression dieser Zytokine selbst in unseren Versuchen unverändert blieb, waren die entsprechenden Rezeptoren verstärkt exprimiert, sodass eine erhöhte Sensitivität gegenüber diesen Zytokinen erreicht wird. Neben ihrer Funktion bei der Stressantwort ist die p38 MAPK ebenfalls involviert in der Regulation der Proliferation und Differenzierung von Knochenvorläuferzellen. Die p38 MAPK fördert den Prozess der Knochenbildung indem sowohl die Expression osteoblasten-typischer Transkriptionsfaktoren als auch deren Aktivität durch die Phosphorylierungsaktivität dieses Enzymkomplexes gesteigert werden. Die Deletion der p38 MAPK beeinträchtigt die terminale Differenzierung von Osteoblasten und das Auftreten von Osteozyten und hat somit direkten Einfluss auf die Struktur und den Erhalt des Knochens *in vivo* [82]. Die Aktivierung des p38 MAPK Netzwerkes bei pH 7,8 weist im Umkehrschluss auf eine verstärkte Differenzierung der MC3T3 in Osteozyten hin.

Das durch den alkalischen pH-Wert am stärksten beeinflusste Gen kodiert für DMP1. DMP1 ist ein Mitglied der SIBLING Familie, zu der auch andere ECM-Proteine wie zum Beispiel Osteopontin und Bone-Sialoprotein gehören. DMP1 gilt als entscheidender Faktor für die Mineralisierung des Knochens. In primären Osteoblastenkulturen wird DMP1 sehr spät exprimiert und fällt zeitlich mit der Bildung der mineralisierten Matrix und dem Auftreten von Osteozyten zusammen [83]. DMP1 wird daher von vielen Autoren als potentieller Marker für den Übergang von Osteoblasten in den Osteozytenstatus angesehen [82,83]. In der untenstehenden Abbildung sind die zuvor erwähnten Differenzierungsprozesse schematisch dargestellt.

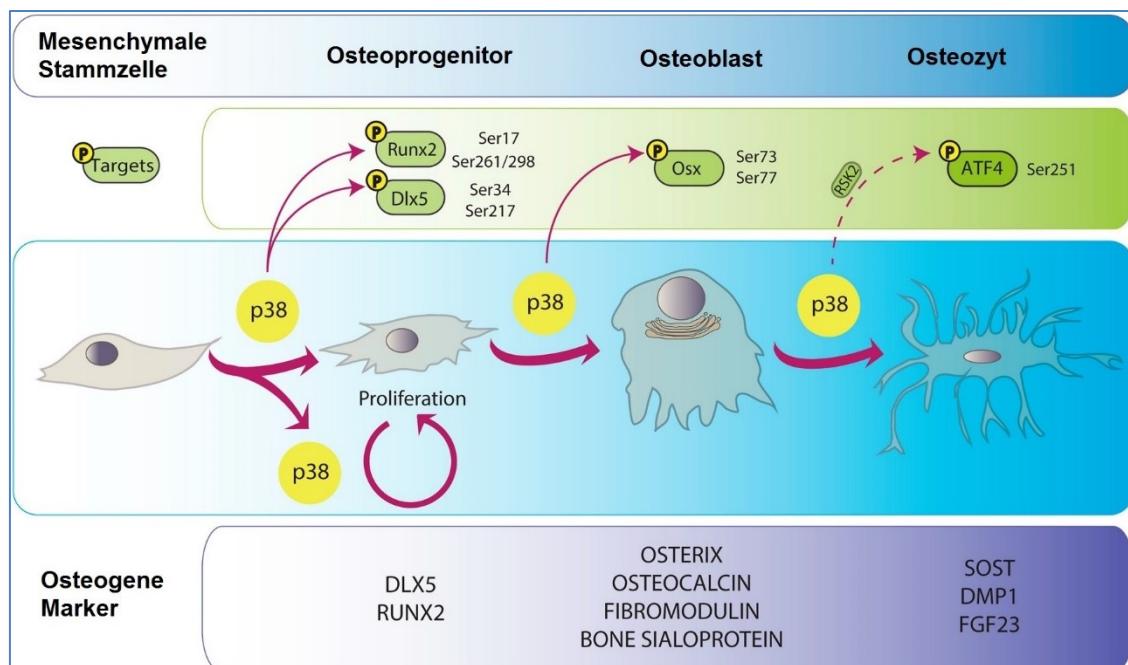


Abbildung 38 Im Verlauf der Osteoblastendifferenzierung wirkende Transkriptionsfaktoren und osteogene Marker [77]

Die bei pH 7,8 gesteigerte Aktivität des p38-Netzwerkes zusammen mit der Hochregulation des späten Transkriptionsfaktor ATF4 und des ECM-proteins DMP1 impliziert einen beschleunigten Übergang vom Osteoblasten-Phänotyp in einen Osteozyten-Phänotyp. Somit konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung der Osteoblasten unter diesen alkalischen Bedingungen stark gefördert zu sein scheint.

Ein späterer Indikator für die Differenzierung der Osteoblasten ist die Mineralisierung der Matrix. Bei pH 7,4 war bis zu Tag 21 kein eingelagertes Kalzium in der Matrix zu erkennen. Im Gegensatz dazu waren bei pH 7,8 großflächige Kalziumablagerungen zu beobachten, nachdem bereits an Tag 14 erste Kalziumvesikel beinhaltende Osteoblasten angefärbt werden konnten. Eine vergleichbare Abfolge der Mineralabscheidung wurde von Sudo *et al.* beschrieben, der die MC3T3-Zelllinie etabliert hat [57]. Bei Standard-pH-Bedingungen stellten die Autoren nach 24 Tagen erste Kalziumvesikel in den Osteoblasten fest und beobachteten die Bildung kalzifizierter Knotenpunkte nach 30 Tagen in Kultur. Um unsere Ergebnisse mit diesen Beobachtungen vergleichen zu können, wurden einige Versuche auf bis zu 30 Tage verlängert. Bei pH 7,4 ließen sich erste durch Alizarin angefärbte Osteoblasten an Tag 28 nachweisen. Als der Versuch an Tag 30 beendet wurde, waren jedoch weiterhin keine großflächigen Kalziumablagerungen erkennbar. Während die zeitliche Abfolge der Kalziumablagerung in diesem Versuch unter Standardbedingungen vergleichbar mit der von Sudo *et al.* beschriebenen war, lief diese Sequenz bei pH 7,8 deutlich beschleunigt ab. Die Ursache für diese schnellere Mineralisierung der Matrix könnte zum einen die beschleunigte Differenzierung der MC3T3 in funktionale Osteoblasten sein. Zum anderen bleibt jedoch nicht auszuschließen, dass der Kalzifikationsprozess auch durch rein physiko-chemische Effekte begünstigt worden sein könnte. Schon früh konnte gezeigt werden, dass die Fällung von Kalziumphosphaten pH-abhängig ist. In übersättigten Lösungen werden amorphe Kalziumphosphate mit zunehmendem pH-Wert effizienter zu Octacalciumphosphat und Hydroxylapatit umgesetzt [84]. Ein ähnlicher Prozess könnte im Mikromilieu der Kalzium-sezernierenden Osteoblasten ablaufen, sodass die Kalzifikation der Matrix ebenfalls mit zunehmendem pH-Wert gefördert ist. In den für diese Arbeit durchgeführten Langzeitversuchen scheint ein synergistischer Effekt der beschriebenen Faktoren am wahrscheinlichsten.

Zusammengekommen zeigen die Versuche, dass eine Alkalisierung des Mediums deutlich die Funktion reifer Osteoblasten fördert und die Differenzierung in Osteozyten zu beschleunigen scheint, auch wenn ein alkalischer pH-Wert allein nicht ausreicht, um den Osteoblasten-Phänotyp ausreichend zu stabilisieren. Die Schlussfolgerung, dass die Differenzierung unter alkalischen Bedingungen begünstigt ist, wird durch andere Arbeiten untermauert, die zu einem früheren Zeitpunkt in der Osteoblastendifferenzierung ansetzen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein erhöhter pH-Wert die Differenzierung von Knochenmark-Stroma-Zellen (BMSC, bone marrow stromal cells) in eine osteogene Zelllinie begünstigt. Es reichen bereits kleine pH-Wert-Änderungen aus, um die Fähigkeit von BMSCs typische Osteoblastenmarker zu exprimieren, signifikant zu verändern [28]. Die Förderung der Differenzierungsprozesse bei erhöhten pH-Werten scheint über alle Entwicklungsphasen der Osteoblasten zu bestehen.

5.2.3 Einfluss des extrazellulären pH-Wertes *in vivo*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der extrazelluläre pH-Wert einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation und die Differenzierung von Osteoblasten *in vitro* hat. Diese Ergebnisse ergänzen die Befunde von Brando *et al.*, welche belegen, dass die Knochenzellfunktion streng durch den pH reguliert wird [85]. Diese und andere Autoren postulieren eine wichtige Rolle für den Knochen als alkalische Pufferreserve gegen eine systemische Ansäuerung *in vivo*, sodass das Säure-Basen-Gleichgewicht auch unter pathophysiologischen Bedingungen gewährleistet werden kann [12]. Während einer Azidose wird die Osteoblasten-induzierte Einlagerung von alkalischen Mineralien im Knochen verringert und die resorptive Aktivität der Osteoklasten erhöht [23]. Eine direkte Konsequenz daraus ist die Maximierung der Verfügbarkeit von gelösten Hydroxylionen, welche die überschüssigen Protonen puffern können. Im Gegensatz dazu kommt es während der Mineralisierung zur Abscheidung von alkalischem Hydroxylapatit, einem Prozess, bei dem unvermeidlich Protonen in das extrazelluläre Medium freigesetzt werden. Die in dieser Arbeit festgestellten Einflüsse des alkalischen pH-Wertes auf die Proliferation und Differenzierung von MC3T3-Zellen könnten diesen beschriebenen Rückkopplungsmechanismus der Homöostase auf der Zellebene widerspiegeln.

Während der systemische pH-Wert in engen Grenzen reguliert wird, ist der pH-Wert in den meisten Interstitia, abhängig von der Stoffwechselaktivität der Zellen und deren Abstand zur nächsten Blutkapillaren, wahrscheinlich niedriger als 7,4 [25,86]. Die Literatur über den pH-Wert innerhalb von Geweben ist jedoch unzureichend. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass zumindest für Osteoblasten bis zu einem pH von 8,4 jede Erhöhung über pH 7,2 für die Proliferation und Mineralisierung von Vorteil ist. Ein Hinweis auf die physiologische Relevanz dieses Befundes gibt eine Arbeit von Chakkalakal *et al.*, in der er zeigen konnte, dass sich während der Knochenheilung der pH-Wert, nach einem anfänglichen Abfall, im umgebenden Knochengewebe auf bis zu pH 7,55 erhöht. Dieser pH-Wert-Anstieg wird begleitet durch einen schnell zunehmenden Kalziumgehalt in der Matrix [87]. Die Alkalisierung des extrazellulären Milieus scheint dementsprechend Teil der physiologischen Prozesse zu sein, die bei der Knochenregeneration eintreten. Die Knochenregeneration geht in den meisten Fällen mit einer Remodellierung der Knochenmatrix einher. Der anfängliche pH-Wert-Abfall könnte hierbei der Aktivitätssteigerung von Matrix-abbauenden Osteoklasten dienen, während der anschließende Anstieg des pH-Wertes die Osteoblasten und damit den Wiederaufbau der Knochenmatrix fördert.

Basierend auf den Ergebnissen zum Einfluss des extrazellulären pH-Wert auf Osteoblasten wurde ein *in vitro* Modellsystem entwickelt, um die möglichen Auswirkungen einer alkalisierenden Modifikation von Implantaten zu untersuchen. Eine entsprechende Erfindung mit dem Titel „Alkalisierende Modifikation von Implantaten und Knochenbaumaterialien zur Optimierung der Regeneration von Knochendefekten“ ist bereits zum Patent eingereicht (Zeichen: PVA11252 // P15.108DE). Ein Exposé zu der Erfindung befindet sich im Anhang.

5.3 Das Modellsystems für ein alkalisierendes Implantat

5.3.1 Proliferation im Modellsystem

In dem entwickelten Modellsystem war die NaOH-Freisetzung ausreichend, um das Medium für bis zu sieben Tage zu alkalisieren. Eine entsprechende Kapazität sollte ausreichen, um *in vivo* einen alkalischeren pH-Wert in der peri-Implantatzone zu gewährleisten oder zumindest eine durch inflammatorische Reaktionen ausgelöste Ansäuerung des Milieus abzumildern. Eine mathematische Beschreibung des Release-Verhaltens wäre nach der Standardisierung der Herstellung möglich und wäre vor einem klinischen Einsatz der Matrices sinnvoll. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf Grund der Varianz im Herstellungsprozess auf eine solche mathematische Beschreibung verzichtet.

Es lag keinerlei Beeinträchtigung des Zellwachstums durch die PVA-Matrix vor, sodass die Biokompatibilität dieser erstmals in biologischen Systemen genutzten Matrix zumindest *in vitro* belegt werden konnte. Um die Eignung als Implantatmaterial *in vivo* beurteilen zu können, müssen jedoch weitere Faktoren wie das Degradationsverhalten und die Beeinflussung der mechanischen Stabilität untersucht werden.

Im Modellsystem war die Proliferation der murinen Osteoblasten signifikant gesteigert. Die Annahme, dass dieser Effekt auf die alkalisierende Matrix zurückzuführen ist, wird durch eine Arbeit von Shen *et al.* unterstützt, in der sich ebenfalls mit Implantatmaterialien, die das Mikromilieu modifizieren, befasst wurde. Die Autoren konnten zeigen, dass Strontium enthaltendes CaSiO₃ eine leicht alkalisierende Wirkung auf das umgebende Medium hat und signifikant die Proliferation und Aktivität von MG63 Zellen fördert [88]. Bei dieser Zelllinie handelt es sich wie bei den hier verwendeten MC3T3-Zellen um eine murine Zelllinie, sodass die Ergebnisse nicht direkt in die Klinik übertragbar sind. Um Daten von größerer physiologischer Relevanz zu erhalten, wurden in dieser Doktorarbeit die Versuche im alkalisierenden Modellsystem mit primären humanen Osteoblasten wiederholt. Im Vergleich zu den immortalisierten Zelllinien zeigten die primären Zellen ein schlechteres Anwachsverhalten und wie zu erwarten eine deutlich verringerte Proliferation. Trotz dieser Umstände lieferten die Versuche im Modellsystem nach den gleichen Normalisierungsverfahren, wie sie bei den murinen Osteoblasten Anwendung fanden, vergleichbare Ergebnisse. Auf Grund der trotz Normalisierung vor allem zwischen den einzelnen Patienten aufgetretenen hohen Streuung der Daten, , war bei gleicher Stichprobengröße im zwei-seitigen t-Test nur ein p-Wert von 0,055 und damit keine statistische Signifikanz zu erreichen. Unter Anwendung eines einseitigen t-Test konnte hingegen festgestellt werden, dass das alkalisierende Implantatmodell-System auch für die primären humanen Osteoblasten signifikant höhere Zellzahlen im Vergleich zur Kontrolle ermöglicht. Damit deuten die in dieser Doktorarbeit gewonnenen Ergebnisse darauf hin, dass ein entsprechendes Implantat in der Lage sein könnte die Osseointegration *in vivo* durch die Steigerung der Osteoblastenproliferation zu verbessern.

5.3.2 Genexpression im Modellsystem

Die Daten aus den GeneChip®-Arrays unterstützen die Annahme, dass ein alkalisierendes Implantat die Osseointegration verbessern könnte. Die Regulationsprozesse zeigten sich vor allem in den Bereichen Proliferation, Adhäsion und DNA-Reparatur. Adhäsion und Proliferation der Zellen beeinflussen maßgeblich die Sekundärstabilität eines Implantates, während die starke Regulation betreffend Signalwege zur DNA-Reparatur auf Prozesse hindeutet, welche eine maligne Entartung während der gesteigerten Proliferation verhindern sollen. Bei der Betrachtung der regulierten Genprodukte, welche direkt mit der Knochenregeneration assoziiert sind, fiel zum einen die Hochregulation von an der Bildung der ECM beteiligten Genprodukten wie zum Beispiel Osteomodulin und Osteoglycin auf. Die Bildung der ECM ist Voraussetzung für die anschließenden Kalzifikationsprozesse [80] und somit für den Knochenaufbau. Zum anderen war die Herunterregulation von Osteoklasten fördernden sowie Osteoblasten hemmenden Genprodukten ein interessanter Befund, welcher das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und –abbau *in vivo* beeinflussen könnte. Weiterhin wurde eine Verschiebung des RANKL / OPG-Verhältnis zu Gunsten von OPG beobachtet. Eine solche Veränderung des Verhältnisses würde zusätzlich die Aktivität der Osteoklasten *in vivo* unterdrücken und somit den Abbau der umgebenden Knochenmatrix reduzieren [4]. Die erfassten Regulationsprozesse scheinen dementsprechend im Allgemeinen knochenaufbauende Prozesse zu begünstigen und knochenabbauende Prozesse zu hemmen. Die festgestellte Herunterregulation früher Osteoblastenmarker wie alkalische Phosphatase und Osteocalcin ist vergleichbar mit den Ergebnissen zu den vorrangegangenen Versuchen zur pH-Wert-abhängigen Differenzierung. Im Gegensatz zu den Ergebnissen wie sie nach Kultur in den Standard-Zellkulturplatten erhalten wurden, zeigte sich jedoch keine Hochregulation des späten Transkriptionsfaktors ATF4. Auch das Protein DMP1 war im alkalisierenden Modellsystem nicht hochreguliert. Diese Unterschiede weisen darauf hin, dass die Wachstumsoberfläche aus Titan den Einfluss des Medium-pH-Wertes auf die Genexpression erheblich moduliert. Dass Titan und andere Biomaterialien einen erheblichen Einfluss auf die Genexpression von Osteoblasten haben, konnte bereits gezeigt werden [89] und ist mit hoher Wahrscheinlichkeit Ursache für die hier festgestellte Einschränkung der Übertragbarkeit von Ergebnissen von einem *in vitro* System in ein anderes.

5.3.3 Weitere Aspekte – Wound healing und Infektion

Neben der Proliferation stellt die Zellmigration einen entscheidenden Faktor bei der Osseointegration von Implantaten und der Heilung von Defekten im Allgemeinen dar. Das Zusammenspiel dieser beiden Faktoren wurde in einem sogenannten „Wound healing-Assay“ untersucht. Der Versuch erfolgte zum einen bei einem dem systemischen Blut-pH entsprechenden pH-Wert von 7,4 und zum anderen unter den Modell-pH-Bedingungen bei pH 8,0. Der Trend zum beschleunigten Verschluss des eingebrachten Defektes bei Kultur in alkalisiertem Medium gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass das Anwachsen der Osteoblasten nach der Implantation bei einem alkalisierenden Implantat beschleunigt ablaufen könnte. Eine Wiederholung dieser Versuche mit

primären humanen Osteoblasten, wie für den vorangegangenen Versuch, war im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

Ein zusätzlicher positiver Aspekt der Alkalisierung der peri-Implantat-Zone wäre neben einer Abmilderung der durch inflammatorische Reaktionen ausgelösten Ansäuerung des Milieus, die antibakterielle Wirkung des alkalischen pH-Wertes. Bereits seit Jahrzehnten werden alkalisierende Zemente in der Zahnmedizin eingesetzt, mit dem Ziel bakteriellen Infektionen vorzubeugen. Ein besonders häufig verwendetes Ausgangsmaterial dabei ist Kalziumhydroxid, welches in vielen verschiedenen Füllungen Verwendung findet [90,91].

Die Möglichkeit zur Verhinderung einer Bakterienbesiedlung bei gleichzeitiger Verbesserung des Einwachsverhaltens, macht die Verwendung alkalisierender Implantate zu einer vielversprechenden Option in der Implantat-Technologie.

5.4 Das Co-Kultur-Systems zur mechanischen Stimulation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *in vitro* System entwickelt, welches sowohl die Co-Kultur zweier Zellpopulationen als auch eine mechanische Stimulation einer der Populationen durch Zugspannung erlaubt.

Mittlerweile existieren zahlreiche Studien über den direkten Einfluss mechanischer Stimuli auf bestimmte Zellpopulationen. Im Speziellen sind auch diverse Arbeiten, in denen die Auswirkungen von mechanischer Stimulation auf Osteozyten ausführlich beschrieben werden, in der Literatur zu finden [44,92,93]. Aus diesem Grund wurde an dieser Stelle darauf verzichtet den Einfluss der Zugspannung auf die Zellphysiologie der Osteozyten zu untersuchen. Es ist bekannt, dass mechanische Stimuli in Abhängigkeit von deren Dauer und Intensität verschiedene Auswirkungen auf die Genexpression und Cytokinsekretion von Osteozyten haben [44,92,93]. Studien, in denen das Zusammenspiel zwischen Osteozyten und Osteoblasten betrachtet wird, sind seltener und finden bisher zu meist nur mit Hilfe konditionierter Medien statt [55,56]. Da bei der Arbeit mit konditionierten Medien Veränderungen in der Konzentration kurzlebiger Signalmoleküle oder second messenger, wie zum Beispiel NO während der Übertragung und Inkubation nicht ausgeschlossen werden können, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit in einem zusammenhängenden System gearbeitet. Dieses Vorgehen ermöglicht die fortwährende Zufuhr solcher Signalmoleküle und vor allem eine wechselseitige Kommunikation zwischen den Zellpopulationen.

Da die Zugspannung im Zellkultursystem durch die periodische Dehnung einer flexiblen Membran ausgelöst wird, lässt sich ein resultierender oszillierender Flüssigkeitsstrom nicht vermeiden. Aus diesem Grund werden zusätzlich zu der Zugspannung von 1000 μ Strain zwangsläufig auch Scherkräfte auf die Zellen einwirken. Das Auftreten von Scherkräften kann durch den Einsatz von Mikromanipulatoren zur mechanischen Stimulation verhindert werden [94], da es sich hierbei jedoch um eine Methode auf Einzelzellebene handelt, ist sie für Co-Kultur-Systeme ungeeignet. Dass Scherkräfte eine nicht zu vernachlässigende Rolle haben, zeigt die Tendenz erhöhter Osteoblasten-

Zellzahlen in den Stimulationssystemen, in denen sich keine Zellen auf der unteren Membran befanden. Die durch die Membranbewegung verursachte Oszillation der Flüssigkeitssäule, war ausreichend, um die Proliferation der Osteoblasten zu beeinflussen auch wenn dieser Einfluss nicht signifikant war. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit anderen speziell dafür konzipierten Studien, in denen die proliferationsfördernde Wirkung von Scherstress auf Osteoblasten belegt werden konnte [95,96].

Ohne die Einwirkung mechanischer Stimulation zeigten sich keinerlei Unterschiede in der Zellzahl zwischen den Osteoblasten-Monokulturen und den Co-Kulturen mit Osteozyten. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Anwesenheit von Osteozyten im System weder einen negativen Einfluss durch den erhöhten Nährstoffverbrauch noch einen positiven Einfluss durch eventuell sezernierte Faktoren ausübte oder sich diese Effekte gegenseitig aufhoben. Weitere Versuche mit Co-Kulturen aus zwei Osteoblastenpopulationen zeigten eine Tendenz zu verringerten Zellzahlen im Vergleich zu den gemischten Co-Kulturen mit einer Osteozytenpopulation und einer Osteoblastenpopulation. Dieser Umstand lässt sich entweder durch einen erhöhten Nährstoffverbrauch durch die Osteoblasten im Vergleich zu den Osteozyten erklären oder durch die Sekretion proliferationshemmender Faktoren durch die Osteoblasten beziehungsweise den Wegfall eventuell sezernierter proliferationsfördernder Faktoren. Auch für die Stimulationsansätze unterschieden sich die Ergebnisse in Abhängigkeit von der stimulierten Zellpopulation.

Bei mechanischer Stimulation der Osteozytenpopulation war die Zahl der Osteoblasten im Co-Kultur-System um über 20% erhöht. Dieser signifikant positive Effekt der Stimulation auf die Osteoblastenproliferation deutet auf die Sekretion proliferationsfördernder Faktoren durch die Osteozyten hin. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einer ähnlichen Studie von Brady *et al.*, in der mit konditionierten Kulturüberständen durch Strömung stimulierter Osteozyten gearbeitet wurde [97]. In seiner Studie konnte eine Steigerung der Proliferation von Osteoblasten um 35% festgestellt werden, wenn diese in Medium stimulierter Osteozyten kultiviert wurden. Es gibt eine Vielzahl von Signalmolekülen, die von Osteozyten als Reaktion auf eine mechanische Stimulation sezerniert werden können, wie zum Beispiel NO, ATP, PGE2, SOST, DKK1, IGF-1, SDF-1 und FGF23 [6]. Aus diesen Signalmolekülen wurden drei Kandidaten gewählt, die potentiell für die verstärkte Proliferation der Osteoblasten verantwortlich sein könnten, um sie im Zellkultur-Überstand nachzuweisen. Dabei musste beachtet werden, dass nicht alle Osteozyten sämtliche Moleküle im gleichen Ausmaß exprimieren. So wurde für die hier verwendete Mauszelllinie MLO-Y4 zum Beispiel gezeigt, dass sowohl SOST als auch FGF23 für aussagekräftige Studien nicht in einem ausreichenden Maße nachweisbar sind [98,99]. In dieser Arbeit wurden das Chemokin SDF-1, der Wachstumsfaktor IGF-1 und das Gewebshormon PGE2 nachgewiesen.

Für SDF-1 zeigten sich keine Konzentrationsunterschiede in den Überständen der stimulierten und unstimulierten Osteozyten. Während auch der Wachstumsfaktor IGF-1 nicht in signifikant höheren Konzentrationen im Überstand stimulierter Osteozyten vorlag, erwies sich die Sekretion des Hormons PGE2 hingegen als signifikant erhöht.

Dieser Befund ist insofern überraschend, als dass man in erster Linie einen Wachstumsfaktor wie IGF-1 als Auslöser für eine gesteigerte Proliferation erwarten würde. Da synergistische Effekte mehrerer Moleküle weitgehend bekannt sind, ist es jedoch nicht auszuschließen, dass bereits eine nicht signifikante Erhöhung der IGF-1-Konzentration, im Zusammenspiel mit anderen Signalmolekülen wie dem Prostaglandin PGE2 ausreichend ist, um eine entsprechende Zellantwort auszulösen. Es konnte schon früh gezeigt werden, dass Osteozyten auf mechanische Stimulation hin Prostaglandine wie PGE2 sezernieren [100]. Prostaglandine werden nach der sequentiellen Oxidation von Arachidonsäure durch Prostaglandin H2 Synthase-1 (PGHS-1) und Prostaglandin H2 Synthase-2 (PGHS-2) über verschiedene endständige Prostaglandinsynthasen gebildet. In der Literatur wird postuliert, dass PGHS-1 für das Basisniveau von Prostaglandinen verantwortlich ist, während PGHS-2 auf Stimulation hin Prostaglandine produziert [101]. PGE2 wird über Prostaglandin-E-Synthasen aus Prostaglandin H2 erzeugt. Die hier festgestellte erhöhte Konzentration an PGE2 im Überstand der stimulierten Osteozyten aus dem Co-Kultursystem ist in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass MLO-Y4 Zellen auf Stimulation durch einen Flüssigkeitsstrom hin verstärkt PGE2 synthetisieren [101] und dieses über Connexin 43 Hemikanäle sezernieren [102]. Für PGE2 ist eine proliferationsfördernde Wirkung auf Osteoblasten beschrieben, die in MC3T3-E1 Zellen unabhängig von der typischen Signaltransduktion über die Adenylatcyclase sein soll und zumindest teilweise durch ERK vermittelt wird [103,104]. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigen damit Daten, die in Monokulturen erhoben wurden und belegen somit die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Co-Kultursystem auf andere *in vitro* Systeme. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass sich die Signaltransduktion und die Zellantworten im Allgemeinen zwischen Monokultur und Co-Kultur stark unterscheiden können.

Bei mechanischer Stimulation von Osteoblasten zeigten sich keine signifikanten Effekte auf die Proliferation der unstimulierten Osteoblastenpopulation. Es war lediglich eine Tendenz hin zu geringeren Zellzahlen zu beobachten. Die stimulierten Osteoblasten scheinen dementsprechend keine proliferationsfördernden Moleküle zu sezernieren. An dieser Stelle unterscheiden sich die Ergebnisse dieser Arbeit von der Studie von Brady *et al.*, in welcher sogar eine signifikante Verringerung der Proliferation um circa 60% beobachtet wurde, wenn die Zellen in Überständen stimulierter Osteoblasten kultiviert wurden. Trotz dieser Abweichung lässt sich zusammenfassen, dass obwohl es sich bei Osteozyten um terminal ausdifferenzierte Osteoblasten handelt, sich der Effekt der mechanischen Stimulation deutlich zwischen den beiden Zelltypen unterscheidet. Nur die Osteozyten schienen auf mechanische Stimulation hin proliferationsfördernde Moleküle zu sezernieren.

Unabhängig vom Kultursystem scheint die spezifische Art des Stimulus bei der mechanischen Stimulation eine maßgebliche Rolle für die Zellreaktion zu spielen. So berichten andere Arbeitsgruppen von einer Verringerung der Proliferation von Osteoblasten bei Kultivierung in durch stimuliert Osteozyten konditionierten Medien. Sowohl für pulsierende Fluidströme als auch gepulsten Ultraschall als Stimulus wird eine proliferationshemmende Wirkung der Zellkulturüberstände berichtet [56,105].

Neben dem Einfluss der mechanischen Stimulation auf die Proliferation von Osteoblastenpopulationen, wurde in dieser Arbeit weiterhin der Effekt auf deren Kollagensekretion untersucht. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der sezernierten Kollagenmenge zwischen dem Kontrollansatz und den Stimulationsansätzen, weder mit Osteozyten noch mit Osteoblasten. Betrachtet man den Trend der Daten, fällt jedoch auf, dass diese sich entgegengesetzt zu den Proliferationsdaten verhalten. Die höchste Kollagensekretion wurde für den Co-Kulturansatz mit zwei Osteoblastenpopulationen gemessen. In diesen Ansätzen wurden die geringsten Zellzahlen festgestellt. Die geringsten Kollagenmengen hingegen wurden in den Co-Kulturen von Osteozyten und Osteoblasten festgestellt, in denen wiederum die Osteoblastenproliferation gefördert war. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte in der anfänglichen Permeabilität der Insertmembranen liegen. Es ist bekannt, dass proliferierende Osteoblasten hohe Mengen an Pro-Kollagen und Kollagen synthetisieren und sezernieren [106]. Da die Insertmembran über 1 μm große Poren verfügt, war ein Durchtritt des sezernierten Kollagens bei Subkonfluenz in beide Richtungen möglich. Die zunehmende Ausbildung einer Kollagenmatrix führt wiederum zu einer Herunterregulation der Proliferation und zu einer Förderung der Differenzierung bei dem Übergang in die Matrixreifungsphase [80,107], daher ist es denkbar, dass der anfängliche Übertritt des sezernierten Kollagens sowohl für die leicht erhöhten Messwerte bei dem Kollagen-ELISA als auch für die verringerte Proliferation in den Co-Kulturansätzen mit zwei Osteoblastenpopulationen verantwortlich ist.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die mechanische Stimulation von Osteozyten zur Sekretion von Signalmolekülen führt, welche die Proliferation von Osteoblasten signifikant fördern. In Systemen ohne stimulierte Zellpopulation führt der entstehende oszillierende Flüssigkeitsstrom allein zu einer insignifikanten Steigerung der Osteoblastenproliferation. Im Gegensatz dazu resultiert die Stimulation von Osteoblasten sogar in einer insignifikanten Verringerung der Proliferation der unstimulierten Osteoblastenpopulation. Diese Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung schematisch zusammengefasst.



Abbildung 39 Zusammenfassung der Stimulationsversuche

Dargestellt ist die geringfügig proliferationsfördernde Einfluss des reinen oszillierende Flüssigkeitsstrom (links), die geringfügig proliferationshemmende Einfluss stimulierter Osteoblasten (mitte) sowie der signifikant proliferationsfördernde Einfluss stimulierter Osteozyten zum Teil vermittelt durch PGE2 (rechts)

6. Zusammenfassung

Ein Hauptanliegen dieser Arbeit war die Optimierung der Kultivierungsbedingungen für Osteoblasten *in vitro*. Betrachtet wurden zum einen der Einfluss des Medium-pHs und zum anderen der Einfluss von Co-Kultur und mechanischer Stimulation.

Versuche bei unterschiedlichen pH-Werten des Mediums zeigten, dass ein alkalischer pH-Wert positive Auswirkungen auf die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten hat. Alle getesteten Proliferationsparameter zeigten ähnliche pH-Abhängigkeiten mit Optima im alkalischen Bereich. Die Optima lagen bei den initial eingestellten pH-Werten zwischen pH 8,4 und pH 8,6, wobei unter Berücksichtigung der aufgetretenen pH-Shifts ein tatsächlicher Optimalbereich zwischen pH 8,0 und pH 8,4 anzunehmen ist. Die gemessenen Proliferations-Parameter waren in diesem pH-Bereich auf bis über 200 % gesteigert. Unter Kultivierung bei alkalischem pH konnte eine gesteigerte Aktivität des p38-Netzwerkes sowie eine Hochregulation des späten Transkriptionsfaktor ATF4 und des ECM-proteins DMP1 festgestellt werden. Des Weiteren lief die Mineralisierung der ECM bei pH 7,8 im Vergleich zu den Standard-pH-Bedingungen stark beschleunigt ab. Zusammen lassen diese Befunde auf einen beschleunigten Übergang vom Osteoblasten-Phänotyp in einen Osteozyten-Phänotyp schließen und somit auf eine Förderung der Differenzierung unter alkalischen Bedingungen.

In ersten Ansätzen zur Entwicklung eines *in vitro* Modellsystems für ein das Mikromilieu alkalisierendes Implantat konnte eine Matrix gefunden werden, welche über ein geeignetes Release-Verhalten verfügt, um eine ausreichende Alkalisierung zu realisieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Proliferation in den alkalisierenden Systemen sowohl für MC3T3 als auch für primäre humane Osteoblasten gesteigert werden konnte. Weiterhin scheinen die in den alkalisierenden Systemen ausgelösten Genregulationsprozesse knochen aufbauende Prozesse zu begünstigen und knochenabbauende Prozesse zu hemmen. Ein entsprechendes Implantat könnte somit die Implantatintegration *in vivo* signifikant zu verbessern. Da außerdem eine antibakterielle Wirkung alkalisierender Füllmaterialien aus der Zahnmedizin bekannt ist, lassen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse darauf schließen, dass ein alkalisierendes Implantat in der Lage sein könnte die zwei Hauptprobleme in der Implantatechnologie, Implantat-assozierte bakterielle Infektionen und die sogenannte aseptische Lockerung durch suboptimale Osseointegration, zu adressieren.

In einem weiteren *in vitro* Modellsystem wurden die Effekte mechanischer Stimulation in Co-Kultur und dabei insbesondere die vielfach postulierte Bedeutung der Osteozyten als Mechanosensoren und der Osteoblasten als Effektorzellen untersucht. Der durch die Bewegung der Membran ausgelöste oszillierende Flüssigkeitsstrom verursachte in Systemen ohne stimulierten Zellpopulation eine insignifikante Steigerung der Proliferation der unstimulierten Osteoblasten. Die Proliferation dieser Osteoblasten konnte hingegen signifikant gesteigert werden, wenn Osteozyten im Co-Kultur-System mechanisch stimuliert wurden. Bei der Suche nach Signalmolekülen, die für die gesteigerte Osteoblastenproliferation verantwortlich sein könnten, erwies sich die Konzentration des

Hormons PGE2 im Überstand der stimulierten Osteozyten als signifikant erhöht. Die mechanische Stimulation von Osteoblasten zeigte eher gegenläufige Effekte. Sie resultierte im Gegensatz zur Osteozytenstimulation in einer insignifikanten Verringerung der Proliferation der jeweils unstimulierten Osteoblastenpopulation. Es lässt sich dementsprechend feststellen, dass obwohl es sich bei Osteozyten um terminal ausdifferenzierte Osteoblasten handelt, sich der Effekt der mechanischen Stimulation deutlich zwischen den beiden Zelltypen zu unterscheiden scheint. Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Co-Kultur-Systems konnte somit die Rolle der Osteozyten als vorrangige Mechanosensoren sowie Osteoblasten-dirigierende Zellpopulation direkt belegt werden.

Literaturverzeichnis

- [1] G.S. Stein, J.B. Lian, T.A. Owen, Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation., *FASEB J.* 4 (1990) 3111–3123.
- [2] T. Suda, I. Nakamura, E. Jimi, N. Takahashi, Regulation of Osteoclast Function, *J. Bone Miner. Res.* 12 (1997) 869–879. doi:10.1359/jbmr.1997.12.6.869.
- [3] N. Takahashi, T. Akatsu, N. Udagawa, T. Sasaki, A. Yamaguchi, J.M. Moseley, T.J. Martin, T. Suda, Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation, *Endocrinology.* 123 (1988) 2600–2602. doi:10.1210/endo-123-5-2600.
- [4] S. Khosla, Minireview: The OPG/RANKL/RANK System, *Endocrinology.* 142 (2001) 5050–5055. doi:10.1210/endo.142.12.8536.
- [5] J. Klein-Nulend, P.J. Nijweide, E.H. Burger, Osteocyte and bone structure, *Curr. Osteoporos. Rep.* 1 (2003) 5–10.
- [6] M.B. Schaffler, W.-Y. Cheung, R. Majeska, O. Kennedy, Osteocytes: Master Orchestrators of Bone, *Calcif. Tissue Int.* 94 (2014) 5–24. doi:10.1007/s00223-013-9790-y.
- [7] R. Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen, 3., vollst. überarb. Aufl., Thieme, Stuttgart [u.a.], 2009.
- [8] Renate Lüllmann-Rauch, Histologie, 3rd ed., Thieme, n.d.
- [9] J.D. Currey, K. Brear, P. Ziopoulos, The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora, *J. Biomech.* 29 (1996) 257–260. doi:10.1016/0021-9290(95)00048-8.
- [10] World Health Statistics 2015., 2015.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/170250/1/9789240694439_eng.pdf?ua=1&ua=1
- [11] L. Frassetto, A. Sebastian, Age and Systemic Acid-Base Equilibrium: Analysis of Published Data, *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 51A (1996) B91–B99. doi:10.1093/gerona/51A.1.B91.
- [12] D.A. Bushinsky, Acid-base imbalance and the skeleton, *Eur. J. Nutr.* 40 (2001) 238–244.
- [13] S.E. Brown, R. Jaffe, Acid-alkaline balance and its effect on bone health, *Int. J. Integr. Med.* 2 (2000) 1–12.
- [14] J. Wolff, Das gesetz der transformation der knochen, *Dtsch. Med. Wochenschr.* (1892) 1222–1224.
- [15] H.M. Frost, Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's Law: The bone modeling problem, *Anat. Rec.* 226 (1990) 403–413. doi:10.1002/ar.1092260402.
- [16] T.D. Brown, Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review, *J. Biomech.* 33 (2000) 3–14. doi:10.1016/S0021-9290(99)00177-3.
- [17] S.M. Ponik, J.W. Triplett, F.M. Pavalko, Osteoblasts and osteocytes respond differently to oscillatory and unidirectional fluid flow profiles, *J. Cell. Biochem.* 100 (2007) 794–807. doi:10.1002/jcb.21089.
- [18] A. Santos, A.D. Bakker, B. Zandieh-Doulabi, C.M. Semeins, J. Klein-Nulend, Pulsating fluid flow modulates gene expression of proteins involved in Wnt signaling pathways in osteocytes, *J. Orthop. Res.* 27 (2009) 1280–1287. doi:10.1002/jor.20888.
- [19] H. Xu, J. Zhang, J. Wu, Y. Guan, Y. Weng, P. Shang, Oscillatory fluid flow elicits changes in morphology, cytoskeleton and integrin-associated molecules in MLO-Y4 cells, but not in MC3T3-E1 cells, *Biol. Res.* 45 (2012) 163–169.

- [20] A. Waugh, A. Grant, Ross & Wilson Anatomy and Physiology in Health and Illness, Elsevier Health Sciences, 2014.
- [21] D.A. Bushinsky, Net calcium efflux from live bone during chronic metabolic, but not respiratory, acidosis, *Am. J. Physiol.* 256 (1989) F836-842.
- [22] D.A. Bushinsky, Metabolic alkalosis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts, *Am. J. Physiol.-Ren. Fluid Electrolyte Physiol.* 40 (1996) F216.
- [23] T.R. Arnett, Extracellular pH Regulates Bone Cell Function, *J. Nutr.* 138 (2008) 415S–418S.
- [24] T.R. Arnett, D.W. Dempster, Effect of pH on Bone Resorption by Rat Osteoclasts in Vitro, *Endocrinology.* 119 (1986) 119–124. doi:10.1210/endo-119-1-119.
- [25] L. Hermansen, J.B. Osnæs, Blood and muscle pH after maximal exercise in man, *J. Appl. Physiol.* 32 (1972) 304–308.
- [26] K.K. Kaysinger, W.K. Ramp, Extracellular pH modulates the activity of cultured human osteoblasts, *J. Cell. Biochem.* 68 (1998) 83–89. doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19980101)68:1<83::AID-JCB8>3.0.CO;2-S.
- [27] W.K. Ramp, L.G. Lenz, K.K. Kaysinger, Medium pH modulates matrix, mineral, and energy metabolism in cultured chick bones and osteoblast-like cells, *Bone Miner.* 24 (1994) 59–73. doi:10.1016/S0169-6009(08)80131-6.
- [28] D.H. Kohn, M. Sarmadi, J.I. Helman, P.H. Krebsbach, Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: Implications for tissue engineering of bone, *J. Biomed. Mater. Res.* 60 (2002) 292–299. doi:10.1002/jbm.10050.
- [29] Y.H. Leem, T.S. Nam, J.H. Kim, K.S. Lee, D.H. Lee, J. Yun, J.S. Chang, The Effects of Extracellular pH on Proliferation and Differentiation of human Bone Marrow Stem Cells, *Korean J. Bone Metab.* 19 (2012) 35. doi:10.11005/kjbm.2012.19.1.35.
- [30] K.-L. Ou, H. Hosseinkhani, Development of 3D in Vitro Technology for Medical Applications, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 17938–17962. doi:10.3390/ijms151017938.
- [31] E. Volkmer, I. Drosse, S. Otto, A. Stangelmayer, M. Stengele, B.C. Kallukalam, W. Mutschler, M. Schieker, Hypoxia in Static and Dynamic 3D Culture Systems for Tissue Engineering of Bone, *Tissue Eng. Part A.* 14 (2008) 1331–1340. doi:10.1089/ten.tea.2007.0231.
- [32] W. Wang, Y. Ouyang, C.K. Poh, others, Orthopaedic implant technology: biomaterials from past to future, *Ann. Acad. Med.-Singap.* 40 (2011) 237.
- [33] P. Santiago-Medina, P.A. Sundaram, N. Diffoot-Carlos, Titanium Oxide: A Bioactive Factor in Osteoblast Differentiation, *Int. J. Dent.* 2015 (2015). doi:10.1155/2015/357653.
- [34] A.F. Mavrogenis, R. Dimitriou, J. Parvizi, G.C. Babis, Biology of implant osseointegration, *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 9 (2009) 61–71.
- [35] L. Feller, Y. Jadwat, R.A.G. Khammissa, R. Meyerov, I. Schechter, J. Lemmer, Cellular Responses Evoked by Different Surface Characteristics of Intraosseous Titanium Implants, *BioMed Res. Int.* 2015 (2015). doi:10.1155/2015/171945.
- [36] S. Bose, S. Tarafder, Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review, *Acta Biomater.* 8 (2012) 1401–1421. doi:10.1016/j.actbio.2011.11.017.
- [37] N.J. Hickok, I.M. Shapiro, Immobilized antibiotics to prevent orthopedic implant infections, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 1165–1176. doi:10.1016/j.addr.2012.03.015.
- [38] H.M. Frost, Bone “mass” and the “mechanostat”: A proposal, *Anat. Rec.* 219 (1987) 1–9. doi:10.1002/ar.1092190104.

- [39] H.M. Frost, The laws of bone structure, C.C. Thomas, 1964. <https://books.google.co.in/books?id=FN1pAAAAMAAJ>.
- [40] A. Del Puente, N. Pappone, M.G. Mandes, D. Mantova, R. Scarpa, others, Determinants of bone mineral density in immobilization: a study on hemiplegic patients, *Osteoporos. Int.* 6 (1996) 50–54.
- [41] C.L. Donaldson, S.B. Hulley, J.M. Vogel, R.S. Hattner, J.H. Bayers, D.E. McMillan, Effect of prolonged bed rest on bone mineral, *Metab. - Clin. Exp.* 19 (1970) 1071–1084. doi:10.1016/0026-0495(70)90032-6.
- [42] E.J. Bassey, S.J. Ramsdale, Increase in femoral bone density in young women following high-impact exercise, *Osteoporos. Int.* 4 (1994) 72–75.
- [43] D.B. Burr, C. Milgrom, D. Fyhrie, M. Forwood, M. Nyska, A. Finestone, S. Hoshaw, E. Saiag, A. Simkin, In vivo measurement of human tibial strains during vigorous activity, *Bone.* 18 (1996) 405–410. doi:10.1016/8756-3282(96)00028-2.
- [44] T. Yamashiro, T. Fukunaga, N. Kobashi, H. Kamioka, T. Nakanishi, M. Takigawa, T. Takano-Yamamoto, Mechanical Stimulation Induces CTGF Expression in Rat Osteocytes, *J. Dent. Res.* 80 (2001) 461–465. doi:10.1177/00220345010800021201.
- [45] S. Damaraju, J.R. Matyas, D.E. Rancourt, N.A. Duncan, The Effect of Mechanical Stimulation on Mineralization in Differentiating Osteoblasts in Collagen-I Scaffolds, *Tissue Eng. Part A.* 20 (2014) 3142–3153. doi:10.1089/ten.tea.2014.0026.
- [46] D. Kaspar, W. Seidl, C. Neidlinger-Wilke, A. Ignatius, L. Claes, Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and CICP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity, *J. Biomech.* 33 (2000) 45–51. doi:10.1016/S0021-9290(99)00171-2.
- [47] J. Klein-Nulend, R.G. Bacabac, A.D. Bakker, others, Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton, *Eur Cell Mater.* 24 (2012) 278–91.
- [48] L. You, S. Temiyasathit, P. Lee, C.H. Kim, P. Tummala, W. Yao, W. Kingery, A.M. Malone, R.Y. Kwon, C.R. Jacobs, Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading, *Bone.* 42 (2008) 172–179. doi:10.1016/j.bone.2007.09.047.
- [49] M. Capulli, R. Paone, N. Rucci, Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers, *Arch. Biochem. Biophys.* 561 (2014) 3–12. doi:10.1016/j.abb.2014.05.003.
- [50] M. Majety, L.P. Pradel, M. Gies, C.H. Ries, Fibroblasts Influence Survival and Therapeutic Response in a 3D Co-Culture Model, *PLoS ONE.* 10 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0127948.
- [51] S.G. Klein, J. Hennen, T. Serchi, B. Blömeke, A.C. Gutleb, Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung, *Toxicol. In Vitro.* 25 (2011) 1516–1534. doi:10.1016/j.tiv.2011.09.006.
- [52] Y. Liu, R. Liu, L. Wang, L. Zeng, Z. Long, Y. Wu, The effects of different phenotype astrocytes on neural stem cells differentiation in co-culture, *Neurosci. Lett.* 508 (2012) 61–66. doi:10.1016/j.neulet.2011.12.019.
- [53] W.E. Sharaf-Eldin, N. Abu-Shahba, M. Mahmoud, N. El-Badri, The Modulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells on Osteoclastogenesis, *Stem Cells Int.* 2016 (2016). doi:10.1155/2016/1908365.
- [54] S. Almubarak, H. Nethercott, M. Freeberg, C. Beaudon, A. Jha, W. Jackson, R. Marcucio, T. Miclau, K. Healy, C. Bahney, Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration, *Bone.* 83 (2016) 197–209. doi:10.1016/j.bone.2015.11.011.

- [55] C.-H. Fung, W.-H. Cheung, N.M. Pounder, A. Harrison, K.-S. Leung, Osteocytes exposed to far field of therapeutic ultrasound promotes osteogenic cellular activities in pre-osteoblasts through soluble factors, *Ultrasonics*. 54 (2014) 1358–1365. doi:10.1016/j.ultras.2014.02.003.
- [56] L. Li, Zheng Yang, H. Zhang, W. Chen, M. Chen, Z. Zhu, Low-intensity pulsed ultrasound regulates proliferation and differentiation of osteoblasts through osteocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418 (2012) 296–300. doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.014.
- [57] H. Sudo, H.A. Kodama, Y. Amagai, S. Yamamoto, S. Kasai, In Vitro Differentiation and Calcification in a New Clonal Osteogenic Cell Line Derived from Newborn Mouse Calvaria., *J. Cell Biol.* 96 (1983) 191–198. doi:10.1083/jcb.96.1.191.
- [58] Y. Kato, J.J. Windle, B.A. Koop, G.R. Mundy, L.F. Bonewald, Establishment of an Osteocyte-like Cell Line, MLO-Y4, *J. Bone Miner. Res.* 12 (1997) 2014–2023. doi:10.1359/jbmr.1997.12.12.2014.
- [59] N.E. Good, G.D. Winget, W. Winter, T.N. Connolly, S. Izawa, R.M. Singh, Hydrogen ion buffers for biological research*, *Biochemistry (Mosc.)*. 5 (1966) 467–477.
- [60] Biological Buffer: AppliChem - BioChemica.Chemica.Synthesis.Service, (n.d.). <https://www.applichem.com/en/products/laboratory-biochemicals/biological-buffer/> (accessed September 4, 2015).
- [61] D. Wang, K. Christensen, K. Chawla, G. Xiao, P.H. Krebsbach, R.T. Franceschi, Isolation and Characterization of MC3T3-E1 Preosteoblast Subclones with Distinct In Vitro and In Vivo Differentiation/Mineralization Potential, *J. Bone Miner. Res.* 14 (1999) 893–903. doi:10.1359/jbmr.1999.14.6.893.
- [62] N. Fratzl-Zelman, P. Fratzl, H. Hörandner, B. Grabner, F. Varga, A. Ellinger, K. Klaushofer, Matrix mineralization in MC3T3-E1 cell cultures initiated by β -glycerophosphate pulse, *Bone*. 23 (1998) 511–520. doi:10.1016/S8756-3282(98)00139-2.
- [63] N.R. Jørgensen, Z. Henriksen, O.H. Sørensen, R. Civitelli, Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts, *Steroids*. 69 (2004) 219–226. doi:10.1016/j.steroids.2003.12.005.
- [64] Y.-H. Wang, Y. Liu, P. Maye, D.W. Rowe, Examination of Mineralized Nodule Formation in Living Osteoblastic Cultures Using Fluorescent Dyes, *Biotechnol. Prog.* 22 (2006) 1697–1701. doi:10.1021/bp060274b.
- [65] R.N.V. Gelder, M.E. von Zastrow, A. Yool, W.C. Dement, J.D. Barchas, J.H. Eberwine, Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87 (1990) 1663–1667.
- [66] GeneChip® Expression Analysis: Data Analysis Fundamentals - data_analysis_fundamentals_manual.pdf, (n.d.). https://www.abdn.ac.uk/ims/documents/data_analysis_fundamentals_manual.pdf (accessed July 28, 2016).
- [67] Q. Wu, J. Zhang, S. Sang, Preparation of alkaline solid polymer electrolyte based on PVA–TiO₂–KOH–H₂O and its performance in Zn–Ni battery, *J. Phys. Chem. Solids*. 69 (2008) 2691–2695. doi:10.1016/j.jpcs.2008.06.132.
- [68] Culture-Insert 2 Well, (n.d.). <http://ibidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Open-Slides-Dishes:-Removable-Chambers/Culture-Insert-2-Well> (accessed March 7, 2017).
- [69] A.-M. Galow, A. Rebl, D. Koczan, S.M. Bonk, W. Baumann, J. Gimsa, Increased osteoblast viability at alkaline pH in vitro provides a new perspective on bone regeneration, *Biochem. Biophys. Rep.* 10 (2017) 17–25. doi:10.1016/j.bbrep.2017.02.001.
- [70] G. Karsenty, Transcriptional Control of Skeletogenesis, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9 (2008) 183–196. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164437.

- [71] D. Abdueva, D. Skvortsov, S. Tavaré, Non-linear analysis of GeneChip arrays, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) e105. doi:10.1093/nar/gkl435.
- [72] J. Raingeaud, S. Gupta, J.S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R.J. Ulevitch, R.J. Davis, Pro-inflammatory Cytokines and Environmental Stress Cause p38 Mitogen-activated Protein Kinase Activation by Dual Phosphorylation on Tyrosine and Threonine, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 7420–7426. doi:10.1074/jbc.270.13.7420.
- [73] N.W. Freshney, L. Rawlinson, F. Guesdon, E. Jones, S. Cowley, J. Hsuan, J. Saklatvala, Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27, *Cell.* 78 (1994) 1039–1049.
- [74] A.-M. Galow, P. Wysotzki, W. Baumann, J. Gimsa, Enhancing the regeneration of bone defects by alkalinizing the peri-implant zone – an in vitro approach, *Curr. Dir. Biomed. Eng.* 2 (2016). doi:10.1515/cdbme-2016-0121.
- [75] T.A. Owen, M.S. Aronow, L.M. Barone, B. Bettencourt, G.S. Stein, J.B. Lian, Pleiotropic Effects of Vitamin D on Osteoblast Gene Expression Are Related to the Proliferative and Differentiated State of the Bone Cell Phenotype: Dependency upon Basal Levels of Gene Expression, Duration of Exposure, and Bone Matrix Competency in Normal Rat Osteoblast Cultures, *Endocrinology.* 128 (1991) 1496–1504. doi:10.1210/endo-128-3-1496.
- [76] K.F. Tipton, H.B. Dixon, Effects of pH on enzymes, *Methods Enzymol.* 63 (1979) 183–234.
- [77] S.V. Komarova, F.I. Ataullakhanov, R.K. Globus, Bioenergetics and mitochondrial transmembrane potential during differentiation of cultured osteoblasts, *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 279 (2000) C1220–C1229.
- [78] F.I. Ataullakhanov, V.M. Vitvitsky, What Determines the Intracellular ATP Concentration, *Biosci. Rep.* 22 (2002) 501–511. doi:10.1023/A:1022069718709.
- [79] X.-Z. Yan, W. Yang, F. Yang, M. Kersten-Niessen, J.A. Jansen, S.K. Both, Effects of Continuous Passaging on Mineralization of MC3T3-E1 Cells with Improved Osteogenic Culture Protocol, *Tissue Eng. Part C Methods.* 20 (2014) 198–204. doi:10.1089/ten.tec.2012.0412.
- [80] T.A. Owen, M. Aronow, V. Shalhoub, L.M. Barone, L. Wilming, M.S. Tassinari, M.B. Kennedy, S. Pockwinse, J.B. Lian, G.S. Stein, Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix, *J. Cell. Physiol.* 143 (1990) 420–430. doi:10.1002/jcp.1041430304.
- [81] X. Yang, K. Matsuda, P. Bialek, S. Jacquot, H.C. Masuoka, T. Schinke, L. Li, S. Brancorsini, P. Sassone-Corsi, T.M. Townes, A. Hanauer, G. Karsenty, ATF4 Is a Substrate of RSK2 and an Essential Regulator of Osteoblast Biology, *Cell.* 117 (2004) 387–398. doi:10.1016/S0092-8674(04)00344-7.
- [82] E. Rodríguez-Carballo, B. Gámez, F. Ventura, p38 MAPK Signaling in Osteoblast Differentiation, *Front. Cell Dev. Biol.* 4 (2016). doi:10.3389/fcell.2016.00040.
- [83] I. Kalajzic, A. Braut, D. Guo, X. Jiang, M.S. Kronenberg, M. Mina, M.A. Harris, S.E. Harris, D.W. Rowe, Dentin matrix protein 1 expression during osteoblastic differentiation, generation of an osteocyte GFP-transgene, *Bone.* 35 (2004) 74–82. doi:10.1016/j.bone.2004.03.006.
- [84] R. Boistelle, I. Lopez-Valero, Growth units and nucleation: the case of calcium phosphates, *J. Cryst. Growth.* 102 (1990) 609–617.
- [85] A. Brandao-Burch, J.C. Utting, I.R. Orriss, T.R. Arnett, Acidosis Inhibits Bone Formation by Osteoblasts In Vitro by Preventing Mineralization, *Calcif. Tissue Int.* 77 (2005) 167–174. doi:10.1007/s00223-004-0285-8.

- [86] H. Schade, Die Bedeutung der H-Ionenkonzentration in der Pathologie, *Colloid Polym. Sci.* 40 (1926) 252–258.
- [87] D.A. Chakkalakal, A.A. Mashoof, J. Novak, B.S. Strates, M.H. McGuire, Mineralization and pH relationships in healing skeletal defects grafted with demineralized bone matrix, *J. Biomed. Mater. Res.* 28 (1994) 1439–1443. doi:10.1002/jbm.820281209.
- [88] Y. Shen, W. Liu, K. Lin, H. Pan, B.W. Darvell, S. Peng, C. Wen, L. Deng, W.W. Lu, J. Chang, Interfacial pH: A Critical Factor for Osteoporotic Bone Regeneration, *Langmuir* 27 (2011) 2701–2708. doi:10.1021/la104876w.
- [89] K.F. Bombonato-Prado, L.S. Bellesini, C.M. Junta, M.M. Marques, G.A. Passos, A.L. Rosa, Microarray-based gene expression analysis of human osteoblasts in response to different biomaterials, *J. Biomed. Mater. Res. A* 88A (2009) 401–408. doi:10.1002/jbm.a.31701.
- [90] F. L, S. E, The alkaline and antibacterial effect of seven Ca(OH)2 liners in vitro., *Acta Odontol. Scand.* 42 (1984) 93–98.
- [91] J.F. Siqueira, H.P. Lopes, Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review, *Int. Endod. J.* 32 (1999) 361–369. doi:10.1046/j.1365-2591.1999.00275.x.
- [92] Y. Mikuni-Takagaki, Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes, *J. Bone Miner. Metab.* 17 (1999) 57–60. doi:10.1007/s007740050065.
- [93] W. Chen, H. Qing, Y. He, J. Wang, Z. Zhu, H. Wang, Gene expression patterns of osteocyte-like MLO-Y4 cells in response to cyclic compressive force stimulation, *Cell Biol. Int.* 34 (2010) 425–432. doi:10.1042/CBI20090061.
- [94] A. Vatsa, T.H. Smit, J. Klein-Nulend, Extracellular NO signalling from a mechanically stimulated osteocyte, *J. Biomech.* 40 (2007) S89–S95. doi:10.1016/j.jbiomech.2007.02.015.
- [95] M.D. Aisha, M.N.K. Nor-Ashikin, A.B.R. Sharaniza, H. Nawawi, G.R.A. Froemming, Orbital fluid shear stress promotes osteoblast metabolism, proliferation and alkaline phosphates activity in vitro, *Exp. Cell Res.* 337 (2015) 87–93. doi:10.1016/j.yexcr.2015.07.002.
- [96] A. Aryaei, A.C. Jayasuriya, The effect of oscillatory mechanical stimulation on osteoblast attachment and proliferation, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 52 (2015) 129–134. doi:10.1016/j.msec.2015.03.024.
- [97] R.T. Brady, F.J. O'Brien, D.A. Hoey, Mechanically stimulated bone cells secrete paracrine factors that regulate osteoprogenitor recruitment, proliferation, and differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459 (2015) 118–123. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.080.
- [98] S.E. Papanicolaou, R.J. Phipps, D.P. Fyhrie, D.C. Genetos, Modulation of sclerostin expression by mechanical loading and bone morphogenetic proteins in osteogenic cells, *Biorheology* 46 (2009) 389–399. doi:10.3233/BIR-2009-0550.
- [99] N. Bhattacharyya, M. Wiench, C. Dumitrescu, B.M. Connolly, T.H. Bugge, H.V. Patel, R.I. Gafni, N. Cherman, M. Cho, G.L. Hager, M.T. Collins, Mechanism of FGF23 processing in fibrous dysplasia, *J. Bone Miner. Res.* 27 (2012) 1132–1141. doi:10.1002/jbmr.1546.
- [100] D. Somjen, I. Binderman, E. Berger, A. Harell, Bone remodelling induced by physical stress is prostaglandin E2 mediated, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 627 (1980) 91–100. doi:10.1016/0304-4165(80)90126-9.
- [101] V. Saini, S. Yadav, S. McCormick, Low-Intensity Pulsed Ultrasound Modulates Shear Stress Induced PGHS-2 Expression and PGE2 Synthesis in MLO-Y4 Osteocyte-Like Cells, *Ann. Biomed. Eng.* 39 (2011) 378–393. doi:10.1007/s10439-010-0156-6.

-
- [102] P.P. Cherian, A.J. Siller-Jackson, S. Gu, X. Wang, L.F. Bonewald, E. Sprague, J.X. Jiang, Mechanical Strain Opens Connexin 43 Hemichannels in Osteocytes: A Novel Mechanism for the Release of Prostaglandin, *Mol. Biol. Cell.* 16 (2005) 3100–3106. doi:10.1091/mbc.E04-10-0912.
- [103] Y. Hakeda, T. Yoshino, Y. Natakani, N. Kurihara, N. Maeda, M. Kumegawa, Prostaglandin E2 stimulates DNA synthesis by a cyclic AMP-independent pathway in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells, *J. Cell. Physiol.* 128 (1986) 155–161. doi:10.1002/jcp.1041280204.
- [104] C. Ghayor, A. Rey, J. Caverzasio, Prostaglandin-dependent activation of ERK mediates cell proliferation induced by transforming growth factor β in mouse osteoblastic cells, *Bone* 36 (2005) 93–100. doi:10.1016/j.bone.2004.10.007.
- [105] P.S. Vezeridis, C.M. Semeins, Q. Chen, J. Klein-Nulend, Osteocytes subjected to pulsating fluid flow regulate osteoblast proliferation and differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348 (2006) 1082–1088. doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.146.
- [106] L.D. Quarles, D.A. Yohay, L.W. Lever, R. Caton, R.J. Wenstrup, Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development, *J. Bone Miner. Res.* 7 (1992) 683–692. doi:10.1002/jbmr.5650070613.
- [107] M.P. Lynch, J.L. Stein, G.S. Stein, J.B. Lian, The Influence of Type I Collagen on the Development and Maintenance of the Osteoblast Phenotype in Primary and Passaged Rat Calvarial Osteoblasts: Modification of Expression of Genes Supporting Cell Growth, Adhesion, and Extracellular Matrix Mineralization, *Exp. Cell Res.* 216 (1995) 35–45. doi:10.1006/excr.1995.1005.

Anhang

- Danksagung
- Erklärung
- Veröffentlichungen
- Exposé zum Patent „Alkalisierende Modifikation von Implantaten und Knochenbaumaterialien zur Optimierung der Regeneration von Knochendefekten“
- Protokolle
 - Zellzahlbestimmung
 - WST-Assay
 - ATPlite-Assay
 - Alizarin Red Assay
 - Collagen-ELISA
 - SDF-1 ELISA
 - IGF-1 ELISA
 - PGE2-ELISA
- Transkriptom Ansatz vs. Kontrolle - pH modifizierendes Implantatsystem

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jan Gimsa für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Dissertation als auch für die fachliche Betreuung und Begleitung während der Arbeit. Ebenfalls für die gewissenhafte Betreuung und das stets offene Ohr sei Dr. Werner Baumann gedankt.

Für die Ermöglichung des Graduiertenkollegs Welisa danke ich außerdem allen Antragstellern und Frau Prof. Dr. Ursula van Rienen als vorsitzender Sprecherin des Kollegs. Allen Betreuern des DFG Graduiertenkollegs sowie sämtlichen Welisa-Stipendiaten sei hiermit für ihre Anregungen und Diskussionen während der Workshops und für das nette Miteinander gedankt.

Den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biophysik Rostock danke ich herzlich für all ihre Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima. Insbesondere ist Reik Modrozinsky für seine Hilfe und witzige Art, mit der jedem den Arbeitstag erhellt, zu danken. Vor allem werden auch die hitzigen Mittagspausen-Diskussion mit Sebastian Bonk und Philipp Wysotzki, sowie dem zuletzt hinzugestoßenen Hendrik Brehme unvergessen bleiben.

Weiterhin möchte ich den vielen Menschen, die mich außerhalb des Lehrstuhls mit ihrer Expertise unterstützt haben danken. Zu diesen Menschen gehören unter andrem Paul Oldorf, der mit einer Engelsgeduld an allen Parametern solange dreht bis jedes Werkstück perfekt wird, Dirk Koczan, der mit seiner immensen Erfahrung die Gen-Chip-Analysen erst ermöglichte, sowie Alexander Rebl, der in schier endlosen Telefonkonferenzen mit mir an Grafiken und Abbildungen gefeilt hat.

Nicht zuletzt gilt mein Dank natürlich meiner Familie, welche stets an mich geglaubt hat und mir trotz der großen Entfernung das Gefühl gibt immer für mich da zu sein.

Erklärung

Ich gebe folgende Erklärung ab:

1. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
2. Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den 23.03.2017

Anne-Marie Galow

Veröffentlichungen

Begutachtete Artikel in Fachzeitschriften:

- Galow, A., Rebl, A., Koczan, D., Bonk, S., Baumann, W., and Gimsa, J., 2017. Increased osteoblast viability at alkaline pH *in vitro* provides a new perspective on bone regeneration. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 10, 17-25. DOI: 10.1016/j.bbrep.2017.02.001
- Galow, A. and Gimsa, J., 2017. WST-assay data hint at an increased activity of the succinate reductase in osteoblast-like cells at alkaline pH. *Data in brief* (accepted)
- Galow, A., Rebl, A., Koczan, D., and Gimsa, J., 2017. MC3T3 osteoblast-like cells cultured at alkaline pH: microarray data (Affymetrix GeneChip Mouse 2.0 ST). *Data in brief* (submitted)
- Galow, A., Wysotzki, P., Baumann, W. and Gimsa, J., 2016. Enhancing the regeneration of bone defects by alkalinizing the peri-implant zone – an *in vitro* approach. *Current Directions in Biomedical Engineering*. 2(1), 547–551. DOI: 10.1515/cdbme-2016-0121

Begutachtete Konferenzbeiträge:

- Galow, A., Wysotzki, P., Oldorf, P. and Gimsa, J., 2016. Enhancing the regeneration of bone defects by alkalinizing the peri-implant zone – an *in vitro* approach. 15th Bi-Annual Conference of the International Society of Fracture Repair, München, 07.-10.06.2016, DOI: 10.13140/RG.2.1.5081.0481
- Galow, A. and Gimsa, J., 2016. Improving osteoblast cell culture: alkaline pH promotes proliferation and differentiation. 8th Kirkstall Conference, Advances in Cell and Tissue Culture, Barcelona, 30.05.-01.06.2016, DOI: 10.13140/RG.2.1.3770.3287

Patente:

- Galow, A., Bonk, S., Wysotzki, P., Baumann, W., Medizinisches Implantat und Verfahren zu Osteoblastenkultivierung, AZ: DE 10 2015 220 651.3

Vorträge:

- Galow, A., Wysotzki, P., Enhancing the regeneration of bone defects by alkalinizing the peri-implant zone – an *in vitro* approach. Dreiländertagung Swiss, Austrian and German Societies for Biomedical Engineering, Basel, 04.-06.10.2016

Exposé zum Patent „Alkalisierende Modifikation von Implantaten und Knochenbaumaterialien zur Optimierung der Regeneration von Knochendefekten“



Alkalisierende Modifikation von Implantaten und Knochenbaumaterialien zur Optimierung der Regeneration von Knochendefekten

Fachbereich

Orthopädie
Medizintechnik
Oberflächentechnik

Stand der Entwicklung:

Idee

Schutzrechtssituation:
Patent (DE) angemeldet
[10/2015]

Angebot:
Verkauf
Lizenzierung
Entwicklungscooperation

© PVA-MV AG, 2017

Kontakt:
Christian Tholen

PVA-MV AG
Gerhart-Hauptmann-Str. 23
D-18055 Rostock

Tel: +49-381-49 74 74-0

Fax: +49-381-49 74 74-9

c.tholen@pva-mv.de
www.pva-mv.de

Einleitung

Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich um eine gezielte Modifikation der Implantatoberfläche oder oberflächennaher Schichten mit dem Ziel, eine verbesserte Fixierung des Implantates im Knochenge- webe zu realisieren.

Die biologische Befestigung des Implantat- werkstoffes im Knochengewebe wird als Osseointegration bezeichnet. Eine vollständige Integration ist Voraussetzung für die mechanische Belastbarkeit. Zur ihrer Verbesserung wird vor allem versucht die mechanischen Eigenschaften der Implantatoberfläche zu verändern oder strukturell zu optimieren. Aus dem zahnmedizini- schen Bereich ist es bekannt, Oberflächen mit Antibiotika, wachstums- oder adhäsionsfördernden Substanzen zu modifizieren. Da immer mehr Menschen Implantate benötigen, sind Fortschritte auf diesem Technologie-Gebiet von besonderer Bedeutung.

Problemstellung

Durch strukturelle Oberflächenmodifikationen kann auch die Adhäsion von Erregern und somit eine Infektion gefördert werden. Des Weiteren unterliegen die gegenwärtigen adhäsiven Beschichtungen mechanischem Stress wodurch sie nach kurzer Zeit disfunktional werden können. Auch die Einbringung von Medikamenten stellt sich in Bezug auf deren kontrollierte Frei-

setzung und die mögliche Absenkung des pH-Wertes währenddessen oder anderer Nebenwirkungen problematisch dar.

Innovation

Abgrenzend zum aktuellen Stand der Technik, in welchem sich auf die mechanischen Eigenschaften beziehungsweise auf die strukturelle Optimierung fokussiert wird, wird bei der vorliegenden Erfindung der pH-Wert lokal modifiziert. Hierbei werden alkalisierende Substanzen in das Implantat beziehungsweise auf dessen Oberfläche gebracht. Alternativ kann eine Beschichtung des Implantates erfolgen, deren Auflösung ebenfalls zu einer Alkali- sierung führt.

Durch einen alkalischen pH-Wert kann die Proliferation von Knochenzellen an der Implantatoberfläche gefördert und somit eine verbesserte Osseointegration erreicht werden. Diese Verfahrensweise stellt einen völlig neuen Ansatz für eine gezielte Modifikation der Implantatober- fläche oder oberflächennaher Schichten in der regenerativen Medizin dar.

Nutzen / Vorteile / Besonderheiten

- Beseitigung der Nachteile vergleichbarer Oberflächenmodifikationen
- Lokaler Wirkbereich
- Anpassungsmöglichkeit des pH- Wertes zur besseren Osseointegration
- Stabiler Halt des Implantates am Knochen

PVA-MV AG

Gefördert durch:

WIPANO



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

Mecklenburg
Vorpommern

Die PVA-MV AG schützt und verwertet Forschungsergebnisse der Hochschulen und ausgewählter außer universitären Forschungseinrichtungen des Landes Mecklenburg-Vorpommern. Sie bietet den exklusiven Zugang zum Schutzrechtsportfolio dieser Partner.

Protokolle

- Zellzahlbestimmung
- WST-Assay
- ATPlite-Assay
- Alizarin Red Assay
- Collagen-ELISA
- SDF-1 ELISA
- IGF-1 ELISA
- PGE2-ELISA

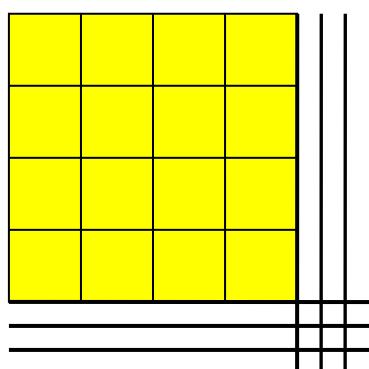
Zellzahlbestimmung

Vorbereitungen:

- Trypsin EDTA, PBS und ggf. benötigtes Medium auf 37 °C bringen
- Zusammenbau von Neubauerkammern
- Pipettierhilfen (Mehrkanal, Flüssigkeitsreservat..), Pipettenspitzen usw.

Durchführung:

1. Medium komplett aus den zu untersuchenden Wells absaugen
2. Zellen mit ausreichender Menge PBS spülen
3. Trypsin/EDTA in die Zellkulturflasche (**1ml** pro T25) oder Well (**300µl** pro Well einer 24-Well-Platte) geben
4. Inkubation für **3min** bei **37°C** (ggf. länger, bis zur vollst. Ablösung des Zellrasens)
5. Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von Medium (abhängig von Zelldichte, ca. 3ml pro T25)
6. Zellen resuspendieren und bei vorgesehener Zentrifugation in 15ml Falcon übertragen
7. Abnahme von **10µl** Probe zur Übertragung in Neubauerkammer
8. Zellen zählen: Gesamtzellzahl = ausgezählte Zellen x 10.000 x Gesamtvolumen



(optimal: 4 Großquadrate zählen und Mittelwert zur Berechnung verwenden)

WST-Assay (colorimetrisch)

Vorbereitungen:

- WST auf Raumtemperatur bringen
- Benötigtes Medium auf 37°C bringen
- Pipetierhilfen (Mehrkanal, Flüssigkeitsreservoir..), Pipettenspitzen usw.
- Frisches Medium mit entsprechender Menge WST mischen (Verhältnis 1:100)
 - 100 µl Medium → 1 µl WST
 - 1,5 ml Medium → 15 µl WST

Durchführung:

9. Medium komplett aus den zu untersuchenden Wells absaugen
10. Je nach Plattengröße mit WST versetztes Medium in Wells geben
 - 96-Well-Platten → 100 µl WST-Medium
 - 24-Well-Platte → 500 µl WST-Medium
11. Gleiche Menge WST-Medium ohne Zellen dient als Blank
12. **1 h** bei 37°C im Brutschrank inkubieren
13. Übertragen der Proben und Blanks auf eine neue Testplatte (4-fach-Bestimmung)
14. Platte im Multiwell Spektrophotometer bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm messen
15. Software PolarStar Galaxy

ATPlite-Assay (Luminiscence)

Vorbereitungen:

- Kitkomponenten auf **Raumtemperatur** bringen
- benötigtes Medium auf 37 °C bringen
- Lyophilisierte Substratsolution durch Zugabe von 5ml Substratpuffer lösen
- Lyophilisierte ATP-Standardlösung nach entsprechender Menge in A. dest lösen (10 mM Stocklösung)
- Verdünnungsreihe von 0,1 mM (1:100 Verd. aus Stock) – 0 mM in Medium herstellen (1:2)
- 96Well Microplatte (weiß-undurchsichtig)
- Pipettierhilfen (Mehrkanal, Flüssigkeitsreservat..), Pipettenspitzen usw.

Durchführung:

1. Medium komplett aus den zu untersuchenden Wells absaugen
2. **100 µl** frisches FBS-freies Medium und **50 µl** Lysispuffer in die nun leeren Wells (450 µl Medium und 225 µl Lysispuffer für 24er-Wellen)
3. Testplatte (weiß, undurchsichtig, 96Well) vorbereiten:
 - a. **100 µl** Medium + **50 µl** Lysispuffer vorlegen für Blanks
 - b. **90 µl** Medium + **50 µl** Lysispuffer vorlegen für Standards
 - c. **Je 10 µl** der ATP-Verdünnungsreihe in die entsprechenden Wells (Standard)
4. Wenn möglich beide Platten für **5 min, 500-700 rpm** auf Schüttelplatte schütteln
5. Je **150 µl** lysierte Zellen in die jeweiligen Wells der Testplatte übertragen (4-fach-Bestimmung)
6. **50 µl** Substratpuffer zu allen befüllten Wells auf der Testplatte hinzupipettieren
7. Platte für **5 min, 500-700 rpm** auf Schüttelplatte schütteln

8. Testplatte **10 min** dunkel stellen
9. Platte messen: (LumiStar)

Benutzung des Lumistars:

10. Gerät anschalten
 11. Program: LumiControl -> Run -> TestSetup -> Optionen-Tests
 12. Auswählen der Platte: new-Plate, new Test (Name des Testes eintragen)
 13. Auswahl des Plattenformates: Microplate Costar96 – Layout – Content
(Standards, Empty, Blank, Sample)
- Standards sind auf der Testplatte doppelt belegt (S1 S1; S2 S2;S3 S3)

Alizarin Red S - Färbeprotokoll

Vorbereitungen:

- Herstellen der Alizarin Red Stocklösung (40 mM)
 - 2 g Alizarin Red S (C.I. 58005)
 - 100 ml Aqua dest.
- Einstellen des pH-Wertes auf **4,1 – 4,3** mit 10% Ammoniumhydroxid
- (Lagerung im Dunkeln und nicht länger als 1 Monat)
- PBS, Aqua dest und Paraformaldehyd auf Raumtemperatur bringen
- Pipetierhilfen (Mehrkanal, Flüssigkeitsreservoir..), Pipettenspitzen usw.

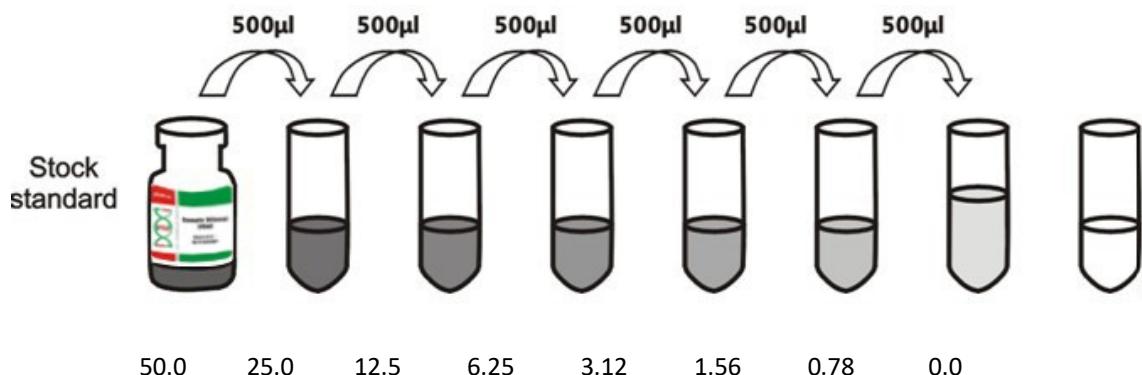
Durchführung:

1. Verdünnung der Stocklösung mit **1:4 Aqua dest.** zur 10 mM Färbelösung
2. Medium komplett aus den zu untersuchenden Wells absaugen
3. Zellen mit PBS waschen
4. Fixierung durch Überschichten mit 4% Paraformaldehyd für **5-10 min**
5. Waschen mit Aqua dest.
6. Inkubation mit Färbelösung für **30 sec – 5 min**
(nach 2 min sollte sich Kalzium rot-orange anfärben)
7. Überschüssige Färbelösung mit Aqua dest. abspülen
8. Ergebnis im Mikroskop beurteilen

Collagen-ELISA (für Überstand)

Vorbereitungen:

- Kitkomponenten auf **Raumtemperatur** bringen
- Alle Reagenzien vor Gebrauch sorgfältig mischen
- Herstellen der Reagenzien:
 - Waschpuffer: 720 ml PBS + 30 ml Waschpuffer-Konzentrat
 - Standard in 1 ml Sample Diluent zu Stammlösung 50 ng/ml lösen (vor Verwendung min. 15min stehen lassen)
 - Detection Reagent A und B: je 1:100 in Assay Diluent A bzw. B verdünnen
- Verdünnungsreihe des Standards herstellen (1:2)



- Je 500 µl Sample Diluent in 7 Eppis vorlegen
- 500 µl Stammlösung in erstes Eppi übertragen
- 500 µl aus erstem Eppi (25 ng/ml) in das nächste pipettieren usw.
- 500 µl Sample Diluent im letzten Eppi als 0-Konz.
- Bei ELISA von Zellkulturüberstanden zuvor zentrifugieren
- Pipettierhilfen (Mehrkanal, Flüssigkeitsreservat..), Pipettenspitzen usw.

Durchführung:

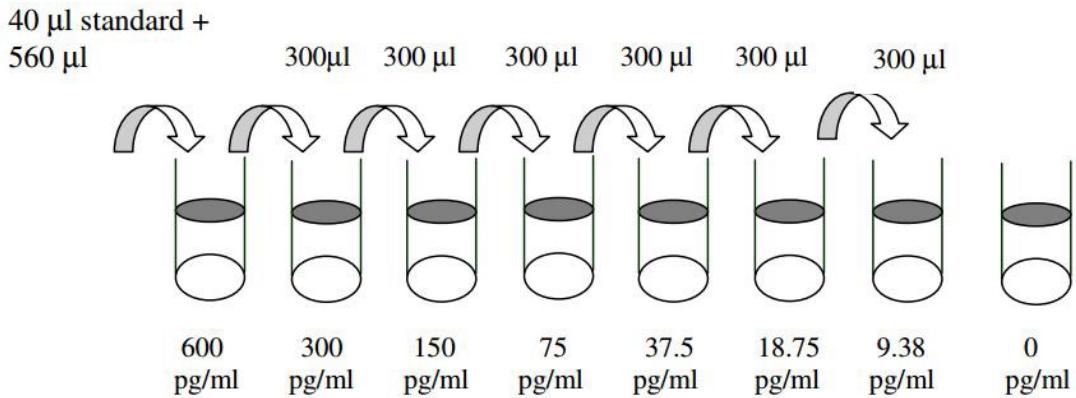
1. Zugabe von je **100 µl** Standard, Blank und Probe pro Well
2. Abdeckung mit Folie und Inkubation für **2 h** bei Raumtemperatur

3. Entnahme der Flüssigkeit (ohne Waschen)
4. Zugabe von **100 µl** Detection Reagent A (verdünnte Lösung)
5. Abdeckung mit Folie und Inkubation für **1 h** bei 37°C
6. Absaugen der Flüssigkeit und 3 Waschschrifte
 - Zugabe von ca. 400 µl Waschpuffer
 - 1-2min Abwarten
 - Vollständige Entfernung der Flüssigkeit
 - Zuletzt Abtropfen der Flüssigkeit auf Papiertuch
7. Zugabe von **100 µl** Detection Reagent B (verdünnte Lösung)
8. Abdeckung mit Folie und Inkubation für **1 h** bei 37°C
9. Absaugen der Flüssigkeit und 5 Waschschrifte (wie oben)
10. Zugabe von je **90 µl** Substrat Lösung pro Well
11. Abdeckung mit neuer Folie und Inkubation für **15-30 min** bei 37°C im Dunkeln
12. Zugabe von je **50 µl** Stop Lösung pro Well
13. Bestimmung der optischen Dichte bei 450 nm im Photometer
14. Software PolarStar Galaxy

SDF-1-ELISA (für Überstand)

Vorbereitungen:

- Kitkomponenten auf **Raumtemperatur** bringen
- Alle Reagenzien vor Gebrauch sorgfältig mischen
- Herstellen der Reagenzien:
 - Waschpuffer: 380 ml A. dest. + 20 ml 20X Waschpuffer-Konzentrat
 - Assay Diluent B: 5-fache Verdünnung mit A.dest. aus 5x Assay Diluent
 - Antikörperreagenz in 100 µl 1x Assay Diluent B zu Antikörperkonzentrat lösen
 - Antikörperkonzentrat 1:80 in 1x Assay Diluent B verdünnen (125 µl in 10 ml)
 - Streptavidin-HRP Reagenz 1:200 in 1x Assay Diluent B verdünnen (50 µl in 10 ml)
 - Standard in 600 µl Assay Diluent B zu Stammlösung 9 ng/ml lösen
- Verdünnungsreihe des Standards herstellen (1:3)



- 560 µl Assay Diluent B in Eppi 1 und je 300 µl in Eppis 2-8 vorlegen
- 40 µl Stammlösung (9 ng/ml) in Eppi 1 geben und sorgfältig mischen
- 300 µl aus erstem Eppi (600 pg/ml) in das nächste pipettieren usw.
- 300 µl Assay Diluent B im letzten Eppi als 0-Konz.
- Bei ELISA von Zellkulturüberstanden zuvor zentrifugieren
- Pipettierhilfen (Mehrkanal, Flüssigkeitsreservat..), Pipettenspitzen usw.

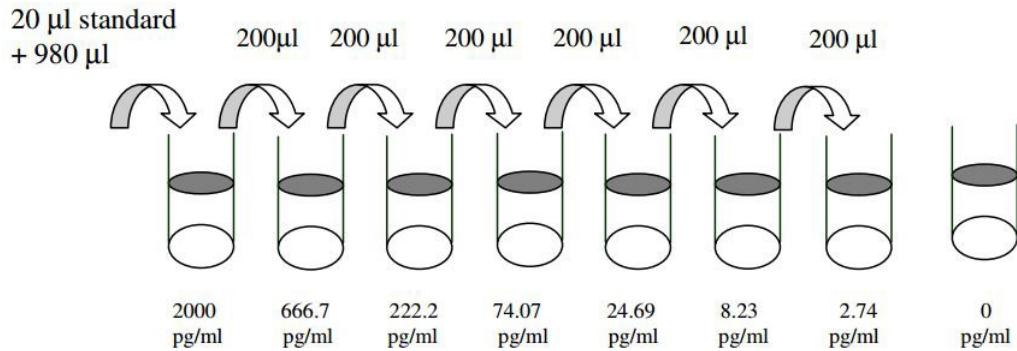
Durchführung:

1. Zugabe von je **100 µl** Standard, Blank und Probe pro Well
2. Abdeckung mit Folie und Inkubation für **2.5 h** bei Raumtemperatur
3. Absaugen der Flüssigkeit und 4 Waschschrifte
 - o Zugabe von ca. 300 µl Waschpuffer
 - o 1-2min Abwarten
 - o Vollständige Entfernung der Flüssigkeit
 - o Zuletzt Abtropfen der Flüssigkeit auf Papiertuch
4. Zugabe von **100 µl** Antikörperlösung je Well
5. Abdeckung mit Folie und Inkubation für **1 h** bei Raumtemperatur auf einem Schüttler
6. Absaugen der Flüssigkeit und 4 Waschschrifte (wie oben)
7. Zugabe von je **100 µl** Streptavidin-HRP Lösung pro Well
8. Abdeckung mit neuer Folie und Inkubation für **45 min** bei Raumtemperatur auf einem Schüttler
9. Absaugen der Flüssigkeit und 4 Waschschrifte (wie oben)
10. Zugabe von je **100 µl** TMB Substrat pro Well
11. Abdeckung mit neuer Folie und Inkubation für **30 min** bei Raumtemperatur im Dunkeln auf einem Schüttler
12. Zugabe von je **50 µl** Stop Lösung pro Well
13. Bestimmung der optischen Dichte bei 450 nm mit 550 nm-Korrektur im Photometer
14. Software PolarStar Galaxy

IGF-1-ELISA (für Überstand)

Vorbereitungen:

- Kitkomponenten auf **Raumtemperatur** bringen
- Alle Reagenzien vor Gebrauch sorgfältig mischen
- Herstellen der Reagenzien:
 - Waschpuffer: 380 ml PBS + 20 ml Waschpuffer-Konzentrat
 - Assay Diluent B: 5-fache Verdünnung mit A.dest. aus 5x Assay Diluent
 - Antikörperreagenz in 100 µl 1x Assay Diluent B zu Antikörperkonzentrat lösen
 - Antikörperkonzentrat 1:80 in 1x Assay Diluent B verdünnen (125 µl in 10 ml)
 - Streptavidin-HRP Reagenz 1:200 in 1x Assay Diluent B verdünnen (50 µl in 10 ml)
 - Standard in 400 µl Assay Diluent B zu Stammlösung 100 ng/ml lösen
- Verdünnungsreihe des Standards herstellen (1:3)



- 980 µl Assay Diluent B in Eppi 1 und je 400 µl in Eppis 2-8 vorlegen
- 20 µl Stammlösung (100 ng/ml) in Eppi 1 geben und sorgfältig mischen
- 200 µl aus erstem Eppi (2000 pg/ml) in das nächste pipettieren usw.
- 200 µl Assay Diluent B im letzten Eppi als 0-Konz.
- Bei ELISA von Zellkulturüberstanden zuvor zentrifugieren
- Pipettierhilfen (Mehrkanal, Flüssigkeitsreservat..), Pipettenspitzen usw.

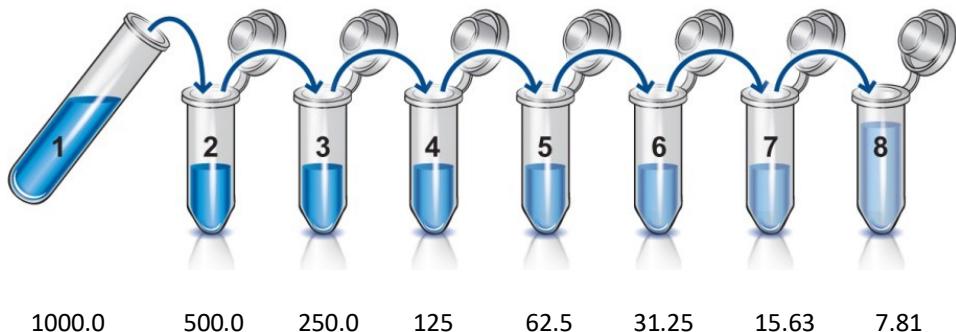
Durchführung:

1. Zugabe von je **100 µl** Standard, Blank und Probe pro Well
2. Abdeckung mit Folie und Inkubation für **2.5 h** bei Raumtemperatur
3. Absaugen der Flüssigkeit und 4 Waschschrifte
 - o Zugabe von ca. 300 µl Waschpuffer
 - o 1-2min Abwarten
 - o Vollständige Entfernung der Flüssigkeit
 - o Zuletzt Abtropfen der Flüssigkeit auf Papiertuch
4. Zugabe von **100 µl** Antikörperlösung je Well
5. Abdeckung mit Folie und Inkubation für **1 h** bei Raumtemperatur auf einem Schüttler
6. Absaugen der Flüssigkeit und 4 Waschschrifte (wie oben)
7. Zugabe von je **100 µl** Streptavidin-HRP Lösung pro Well
8. Abdeckung mit neuer Folie und Inkubation für **45 min** bei Raumtemperatur auf einem Schüttler
9. Absaugen der Flüssigkeit und 4 Waschschrifte (wie oben)
10. Zugabe von je **100 µl** TMB Substrat pro Well
11. Abdeckung mit neuer Folie und Inkubation für **30 min** bei Raumtemperatur im Dunkeln auf einem Schüttler
12. Zugabe von je **50 µl** Stop Lösung pro Well
13. Bestimmung der optischen Dichte bei 450 nm mit 550 nm-Korrektur im Photometer
14. Software PolarStar Galaxy

Prostaglandin E2-ELISA (für Überstand)

Vorbereitungen:

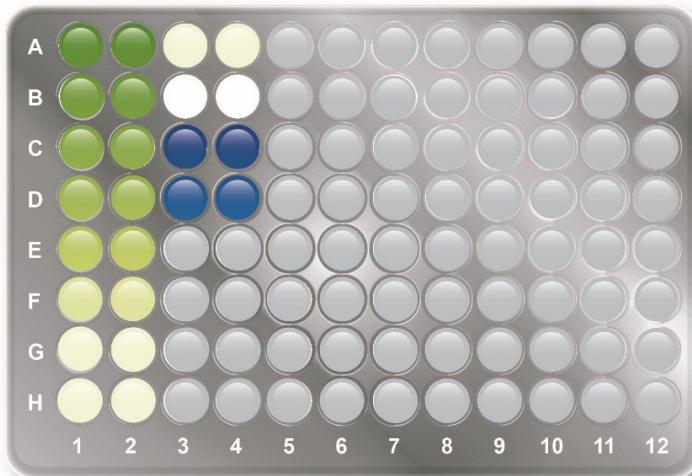
- Kitkomponenten auf **Raumtemperatur** bringen
- Alle Reagenzien vor Gebrauch sorgfältig mischen
- Herstellen des Waschpuffers: 95 ml A. dest. + 5 ml Waschpuffer-Konzentrat
- Verdünnungsreihe des Standards herstellen (1:2)



- 980 μ l Medium in Eppi 1 und je 500 μ l Medium in Eppis 2-8 vorlegen
- 20 μ l Stammlösung (50.000 pg/ml) in Eppi 1 geben und sorgfältig mischen
- 500 μ l aus erstem Eppi (1000 pg/ml) in das nächste pipettieren usw.
- 500 μ l Medium im letzten Eppi als 0-Konz.
- Bei ELISA von Zellkulturüberstanden zuvor zentrifugieren
- Pipettierhilfen (Mehrkanal, Flüssigkeitsreservat..), Pipettenspitzen usw.

Durchführung:

1. Zugabe von je **100 μ l** Medium in NSB und B_0 Wells
 2. Zugabe von je **100 μ l** Standard und Probe pro Well
 3. Zugabe von **50 μ l** Assay Puffer in NSB-Wells
 4. Zugabe von **50 μ l** PGE2-AP conjugate in jedes Well außer TA und NSB
 5. Zugabe von **50 μ l** Anti-PGE2 zu Standards und Proben
- ➔ Standard und Proben: grün, NSB: blau, TA und Blanks: leer



A1-2 - Standard #1	A3-4 - Standard #9 (Bo)
B1-2 - Standard #2	B3-4 - Blank Wells
C1-2 - Standard #3	C3-4 - Total Activity Wells (TA)
D1-2 - Standard #4	D3-4 - Non-Specific Binding Wells (NSB)
E1-2 - Standard #5	
F1-2 - Standard #6	
G1-2 - Standard #7	
H1-2 - Standard #8	

6. Abdeckung mit Folie und Inkubation bei Raumtemperatur auf Schüttler mit 500 rpm für **2 h**
7. Absaugen der Flüssigkeit und 3 Waschschrifte
 - Zugabe von ca. 400 µl Waschpuffer
 - 1-2min Abwarten
 - Vollständige Entfernung der Flüssigkeit
 - Zuletzt Abtropfen der Flüssigkeit auf Papiertuch
8. Zugabe von **5 µl** PGE2-AP conjugate in TA wells
9. Zugabe von je **200 µl** pNpp Substrat Lösung pro Well
10. Abdeckung mit Folie und Inkubation für **1 h** bei 37°C
11. Zugabe von je **50 µl** Stop Lösung pro Well
12. Bestimmung der optischen Dichte bei 405 nm im Photometer (Korrektur zwischen 570 und 590 nm)
13. Software PolarStar Galaxy
14. Kalkulation der PGE2-Konzentration:
 - a. Average Net OD = Average Bound OD - Average NSB OD
 - b. Percent Bound = (Net OD/ Net Bo OD) x 100
 - c. Berechnung der Konzentration aus Standardkurve

Transkriptom Ansatz vs. Kontrolle

Ansatz	Signal	Kontrolle	Signal	(log ₂)	Fold Change	ANOVA p-value	FDR p-value	Gene Symbol	Description
7.05	5.77	2.43		6.35E-11		0.000002		Gas2l3	growth arrest-specific 2 like 3
7.11	5.91	2.3		3.81E-10		0.000006		Scl16a4	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 4
6.22	4.75	2.76		6.65E-09		0.000039		Klf20a	kinesin family member 20A
6.39	5.37	2.04		8.92E-09		0.000039167; Gm13232; (predicted gene 13160; predicted gene 13167; predicted gene 13232			
6.36	5.03	2.53		1.34E-08		0.000039		Akap6	A kinase (PRKA) anchor protein 6
6.69	5.2	2.8		1.80E-08		0.000039		Anln	anillin, actin binding protein
5.82	4.23	3.01		1.80E-08		0.000039		D17H6S56E-5	DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5
6.46	5.43	2.05		1.95E-08		0.000039		Gm1323	high mobility group box 2; predicted gene 13167; predicted gene 13232
6.58	4.73	3.61		2.04E-08		0.000039		Kif11	kinesin family member 11
5.29	3.79	2.85		2.79E-08		0.00004		Sgol2	shugoshin-like 2 (S. pombe)
5.02	3.8	2.32		3.00E-08		0.00004		Parpbp	PARP1 binding protein
4.88	3.44	2.71		3.84E-08		0.00004		Kif4	kinesin family member 4
5.66	3.85	3.5		3.90E-08		0.00004		Hmmr	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)
4.53	3.51	2.02		4.25E-08		0.00004		Brip1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
5.39	4.08	2.48		4.33E-08		0.00004		Kit2c	kinesin family member 2C
7.5	6.27	2.36		4.42E-08		0.000041211; LOC102641MAD2		MAD2	mitotic arrest deficient-like 1
4.01	7.39	-10.41		4.62E-08		0.000041		Avil	adillin
5.89	4.86	2.04		5.17E-08		0.000044		Dtl	denticleless homolog (Drosophila)
6.19	4.83	2.57		5.67E-08		0.000044;im2862; Gm195;RIKEN cDNA 2810417H13 gene; predicted pseudogene 15428			
5.32	4.3	2.03		5.81E-08		0.000044		Ccnf	cyclin F
8.79	7.55	2.36		6.27E-08		0.000045		Nsg1	neuron specific gene family member 1
5.24	3.93	2.48		6.37E-08		0.000045		Melk	maternal embryonic leucine zipper kinase
6.43	5.41	2.03		7.03E-08		0.000048		Gm1323	high mobility group box 2; predicted gene 13160; predicted gene 13167
5.81	4.35	2.74		7.58E-08		0.00005		Casc5	cancer susceptibility candidate 5
6.56	4.91	3.13		8.54E-08		0.000055		Plk1	polo-like kinase 1
5.03	6.45	-2.69		1.04E-07		0.00006		Cox6a2	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2
2.19	4.4	-4.64		1.23E-07		0.000066		Car6	carbonic anhydrase 6
7.06	5.95	2.16		1.34E-07		0.000066		Cdkn2c	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
6.28	5.23	2.07		1.34E-07		0.000066; Gm13167; Gm high mobility group box 2; predicted gene 13160; predicted gene 13167			
4.68	3.05	3.09		1.35E-07		0.000066		Shcbp1	Shc SH2-domain binding protein 1
4.45	3.33	2.18		1.47E-07		0.000068		Cep55	centrosomal protein 55

6.89	5.35	2.9	1.55E-07	0.000069	Ect2	ect2 oncogene
7.44	5.89	2.93	1.70E-07	0.000069	Mki67	antigen identified by monoclonal antibody K1 67
4.28	6.33	-4.13	1.81E-07	0.000071	Vit	vitrin
5.03	3.97	2.09	1.85E-07	0.000071	Diap3	diaphanous homolog 3 (Drosophila)
5.6	4.5	2.14	1.89E-07	0.000071	Bub1b	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S. cerevisiae)
5.39	4.03	2.55	1.89E-07	0.000071	Kif20b	kinesin family member 20B
5.93	4.7	2.36	1.91E-07	0.000071	Rgl1	rat guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 1
7.51	5.78	3.31	1.96E-07	0.000072	Ccn2	cyclin A2
6.34	4.95	2.62	2.19E-07	0.000073	Ckap2	cytoskeleton associated protein 2
4.53	5.89	-2.57	2.22E-07	0.000073	Paqr3	progestin and adipoQ receptor family member III
5.26	6.27	-2.01	2.31E-07	0.000074	Col11a2	collagen, type XI, alpha 2
1.54	2.78	-2.36	2.36E-07	0.0000741b-1; A430106C microRNA 181b-1; RIKEN cDNA A430106G13 gene		
6.58	5.07	2.85	2.65E-07	0.0000791; Gm5593; Gm1cyclin B1; predicted gene 5593; predicted gene 12856		
5.5	4.4	2.14	2.65E-07	0.000079	Ecm2	extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific
5.56	3.68	3.68	2.91E-07	0.00008	Bub1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (S. cerevisiae)
7.49	6	2.81	2.91E-07	0.00008	Itga8	integrin alpha 8
6.91	8.38	-2.77	3.04E-07	0.000081	Hyou1	hypoxia up-regulated 1
7.04	5.79	2.39	3.15E-07	0.000082	Elov6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)
5.88	4.57	2.48	3.15E-07	0.000082	Kif23	kinesin family member 23
5.86	7.43	-2.97	3.20E-07	0.000082	Bglap	bone gamma carboxyglutamate protein
5.63	4.47	2.24	3.31E-07	0.000083	Grk5	G protein-coupled receptor kinase 5
6.91	5.81	2.14	3.36E-07	0.000083	Tcf19	transcription factor 19
6.01	4.31	3.26	3.64E-07	0.000089	Nuf2	NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)
3.59	4.77	-2.28	3.73E-07	0.000089	Sgca	sarcoglycan, alpha (dystrophin-associated glycoprotein)
7.09	5.7	2.64	3.76E-07	0.000089	Fifg	c-fos induced growth factor
5.82	4.71	2.16	4.02E-07	0.000093	Knstrn	kinetochore-localized astrin/SPAG5 binding
9.08	7.73	2.56	4.19E-07	0.000093	Sord	sorbitol dehydrogenase
7.14	8.2	-2.09	4.23E-07	0.000093	Unc5b	unc-5 homolog B (C. elegans)
8.94	7.61	2.51	4.29E-07	0.000093	Sord	sorbitol dehydrogenase
5.25	3.91	2.54	4.36E-07	0.000094	Cenpe	centromere protein E
6.75	5.69	2.08	4.43E-07	0.000094	A4gal	alpha 1,4-galactosyltransferase
7.88	6.22	3.16	4.51E-07	0.000095	Nov	nephroblastoma overexpressed gene
5.13	3.98	2.22	4.77E-07	0.000099	C330027C09Rik	RIKEN cDNA C330027C09 gene

6.45	5.28	2.25	4.92E-07	0.000101	Rrm2	ribonucleotide reductase M2
5.72	4.5	2.32	5.05E-07	0.000101	Dlgap5	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5
4.4	3.36	2.06	5.06E-07	0.000101	Sema3e	sema domain, immunoglobulin domain, short basic domain, secreted
6.11	4.96	2.23	5.35E-07	0.000106	Cdc23	cell division cycle associated 3
9.26	10.31	-2.07	5.46E-07	0.000107	Pdia4	protein disulfide isomerase associated 4
5.44	3.6	3.58	5.58E-07	0.000108	Reps2	RA1BP1 associated Eps domain containing protein 2
4.87	3.86	2.02	5.68E-07	0.000109	Gm12891; Gm1CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	
5.4	3.85	2.94	5.79E-07	0.000109	Nusap1	nucleolar and spindle associated protein 1
6.55	5.23	2.5	5.84E-07	0.000109	Tpx2	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)
7.5	8.75	-2.39	5.84E-07	0.000109	Creld2	cysteine-rich with EGF-like domains 2
5.26	3.84	2.68	6.29E-07	0.000112	Ncag	non-SMC condensin I complex, subunit G
7.71	6.32	2.63	6.32E-07	0.000112	Flrt2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2
5.83	7.57	-3.34	6.96E-07	0.000119	Sdf2l1	stromal cell-derived factor 2-like 1
6.13	4.64	2.8	7.26E-07	0.000121; Gm5593; Gm1cyclin B1; predicted gene 5593; predicted gene 12856		
6.77	5.26	2.84	7.52E-07	0.000124	Mrgprf	MAS-related GPR, member F
5.8	4.42	2.6	7.68E-07	0.000126	Ncaph	non-SMC condensin I complex, subunit H
9.97	8.87	2.15	7.80E-07	0.000128	Lum	lumican
4.28	3.15	2.18	8.30E-07	0.000133	Neil3	nei like 3 (E. coli)
5.33	4.24	2.14	8.45E-07	0.000134	RAD51	RAD51 homolog
4.88	3.6	2.43	8.91E-07	0.000138	Aspm	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)
5.39	4.16	2.35	9.49E-07	0.000145	Arhgap11a	Rho GTPase activating protein 11A
5.43	4.32	2.14	9.55E-07	0.000145	Uhrf1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1
6.44	5.26	2.26	9.85E-07	0.000148	Aurkb	aurora kinase B
7.2	5.64	2.95	0.000001	0.000153	Top2a	topoisomerase (DNA) II alpha
7.32	5.36	3.88	0.000001	0.000156	Igf1	insulin-like growth factor 1
7.37	5.65	3.31	0.000001	0.000163	Srgn	serglycin
5.02	4.01	2.02	0.000001	0.000163	Pole	polymerase (DNA directed), epsilon
4.45	3.32	2.19	0.000001	0.000169	Kntc1	kinetochore associated 1
3.09	4.42	-2.5	0.000001	0.000171	Chd7	chromodomain helicase DNA binding protein 7
4.34	3.26	2.11	0.000001	0.000174	Kif14	kinesin family member 14
5.21	4.2	2.01	0.000001	0.000175	Glt8d2	glycosyltransferase 8 domain containing 2
5.1	3.99	2.16	0.000001	0.000181	Cdea5	cell division cycle associated 5
5.11	3.97	2.2	0.000002	0.000192	Dhfr	dihydrofolate reductase

6.16	4.7	2.74	0.000002	0.0001951; Gm5593; Gm1cyclin B1; predicted gene 5593; predicted gene 12856
7.22	6.15	2.09	0.000002	0.0001961; Gm12919; Gm karyopherin (importin) alpha 2; predicted gene 12919
6.48	7.67	-2.29	0.000002	0.0000201 Lox4 lysyl oxidase-like 4
8.33	7.28	2.06	0.000002	0.0000209 Ptn pleiotrophin
5.52	4.22	2.47	0.000002	0.0000209 E2f8 E2F transcription factor 8
9.76	8.05	3.29	0.000002	0.0000209 Apod apolipoprotein D
5.1	3.59	2.86	0.000002	0.0000215 Pbk PDZ binding kinase
5.1	4.07	2.04	0.000002	0.0000215 Birc5 baculoviral IAP repeat-containing 5
5.56	4.41	2.22	0.000002	0.0000216 Kit18b kinesin family member 18B
5.96	3.43	5.76	0.000002	0.0000219 Abi3bp ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein
7.18	5.94	2.36	0.000002	0.000023 Dact1 dapper homolog 1, antagonist of beta-catenin (xenopus)
6.29	7.51	-2.33	0.000002	0.000023 Stard5 StAR-related lipid transfer (START) domain containing 5
5.03	3.93	2.14	0.000002	0.000023 Spc25, NDC80 kinetochore complex component, homolog
5.3	4.29	2.02	0.000002	0.0000231 Gm15452; Gm1CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
6.63	5.37	2.4	0.000002	0.0000237 Ccnb2 cyclin B2
3.39	4.42	-2.06	0.000002	0.0000237 Smim5 small integral membrane protein 5
7.79	6.26	2.9	0.000003	0.0000245 Hist1h2ab histone cluster 1, H2ab
5.62	4.46	2.23	0.000003	0.0000263 Casp12 caspase 12
7.87	9.96	-4.27	0.000003	0.0000263lap2; Bglap; Bgl bone gamma-carboxyglutamate protein 2
6.63	5.55	2.11	0.000003	0.0000265 Abhd14b abhydrolase domain containing 14b
6.78	5.12	3.15	0.000003	0.0000269 Chst2 carbohydrate sulfotransferase 2
5.87	7.69	-3.55	0.000003	0.000028 Sgms2 sphingomyelin synthase 2
4.51	3.39	2.17	0.000003	0.000028 Eso2 establishment of cohesion 1 homolog 2 (S. cerevisiae)
5.93	4.45	2.79	0.000003	0.000028 Prc1 protein regulator of cytokinesis 1
6.59	5.49	2.14	0.000004	0.000029 Rps6ka5 ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 5
5.6	4.34	2.38	0.000004	0.00003 Gatm glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)
5.17	3.53	3.12	0.000004	0.0000313 Rgs2 regulator of G-protein signaling 2
3.93	2.79	2.21	0.000004	0.0000321 Kitl kit ligand
6.84	5.65	2.28	0.000004	0.0000329 Racgap1 Rac GTPase-activating protein 1
4.08	5.29	-2.31	0.000005	0.000033 Adam19 a disintegrin and metalloproteinase domain 19 (meltrin beta)
6.31	5.21	2.14	0.000005	0.000034 Ddit4l DNA-damage-inducible transcript 4-like
5.76	4.49	2.41	0.000006	0.0000389 Ckap2l cytoskeleton associated protein 2-like
6.14	5.13	2.01	0.000006	0.0000391 Slc16a9 solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 9

5.35	3.84	2.85	0.000006	0.000399 2810417H13RIK RIKEN cDNA 2810417H13 gene
3.48	5.38	-3.72	0.000006	0.000399 Atp2a3 ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous
6.6	8.23	-3.1	0.000006	0.000399 Cyb511 cytochrome b5 reductase 1
3.69	2.53	2.23	0.000006	0.000399 Gm6020 predicted gene 6020
5.27	4.25	2.02	0.000006	0.000402 Ddias DNA damage-induced apoptosis suppressor
10.01	8.93	2.1	0.000006	0.000402.1t1h3d; Hist1h3e histone cluster 1, H3f; histone cluster 1, H3a; histone cluster 1, H3g
9.94	8.94	2.01	0.000007	0.000412.1t1h3d; Hist1h3k histone cluster 1, H3f; histone cluster 1, H3a; histone cluster 1, H3g
4.42	5.88	-2.75	0.000007	0.000426 Gm10722 predicted gene 10722
9.87	8.83	2.05	0.000007	0.000434 st1h3d; Hist1h3a histone cluster 1, H3e; histone cluster 1, H3b; histone cluster 1
4.34	5.39	-2.08	0.000008	0.000434 Wnt5a wingless-type MMTV integration site family, member 5A
4.34	3.03	2.48	0.000008	0.000438 Tspan13 tetraspanin 13
5.26	4.16	2.15	0.000008	0.000444 Cenpf centromere protein F
9.73	8.65	2.12	0.000008	0.000452 Hist1h3d; Hist1h3e histone cluster 2, H3c2; histone cluster 2, H3b; histone cluster 2, H3c1
6.27	10.04	-13.65	0.000008	0.000459 Cdsn corneodesmosin
9.94	8.88	2.09	0.000008	0.00046 st1h3h; Hist1h3i histone cluster 1, H3a; histone cluster 1, H3g; histone cluster 1
9.97	8.9	2.11	0.000008	0.000461 st1h3h; Hist1h3i histone cluster 1, H3a; histone cluster 1, H3g; histone cluster 1
8.17	9.67	-2.83	0.000008	0.000466 Timp3 tissue inhibitor of metalloproteinase 3
9.94	8.92	2.02	0.000009	0.000468 st1h3d; Hist1h3j histone cluster 1, H3f; histone cluster 1, H3a; histone cluster 1
6.84	5.83	2.01	0.000009	0.000479 Hist1h1b histone cluster 1, H1b
6.31	5.26	2.08	0.000009	0.000479; Gm12919; Gm karyopherin (importin) alpha 2; predicted gene 12919
10	8.93	2.09	0.000009	0.000481 Hist1h3d; Hist1h3e histone cluster 2, H3c2; histone cluster 2, H3b; histone cluster 2, H3c1
6.38	5.36	2.04	0.000009	0.000484; Gm12919; Gm karyopherin (importin) alpha 2; predicted gene 12919
4.41	3.35	2.08	0.000009	0.000488 Fancd2 Fanconi anemia, complementation group D2
9.94	8.93	2.01	0.000009	0.00049 st1h3d; Hist1h3e histone cluster 1, H3f; histone cluster 1, H3a; histone cluster 1
9.94	8.88	2.08	0.00001	0.000492 st1h3i; Hist2h3b histone cluster 1, H3a; histone cluster 1, H3g; histone cluster 1
10.38	9.34	2.06	0.000011	0.000525 Mmp13 matrix metalloproteinase 13
3.83	2.81	2.02	0.000012	0.000561 Mis18bp1 MIS18 binding protein 1
6.06	5.02	2.07	0.000012	0.000568 Mcm5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46
3.84	5.59	-3.37	0.000013	0.000569 Hpse heparanase
10.55	9.52	2.05	0.000013	0.000572 Aspn asporin
3.86	2.49	2.59	0.000013	0.000572 Depdc1a DEP domain containing 1a
7.64	6.36	2.43	0.000013	0.000589 xc; Hist1h3b histone cluster 1, H2bc; histone cluster 1, H2bg; histone cluster 1, H2be
5.78	4.6	2.27	0.000014	0.000609 Smc2 structural maintenance of chromosomes 2

7.65	9.11	-2.76	0.000015	0.000633	Slc6a9	solute carrier family 6, member 9
6.12	7.12	-2.01	0.000015	0.000632	Lox4	lysyl oxidase-like 4
7.18	5.95	2.35	0.000016	0.000646	Fam69a	family with sequence similarity 69, member A
2.36	3.8	-2.72	0.000016	0.000646	Pdia4	protein disulfide isomerase associated 4
6.48	5.32	2.24	0.000018	0.000707	Rasl1lb	RAS-like, family 11, member B
6.37	5.17	2.3	0.000018	0.000712	Adh1	alcohol dehydrogenase 1 (class I)
6.19	4.69	2.83	0.00002	0.000739	Itgb1	integrin, beta-like 1
8.88	7.74	2.2	0.00002	0.000747	S100a4	S100 calcium binding protein A4
5.07	3.97	2.14	0.00002	0.000747	Sgo1	shugoshin-like 1 (S. pombe)
4.22	5.3	-2.11	0.000021	0.000749	Ppp1r15a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A
4.82	7.35	-5.79	0.000023	0.000797	Prss35	protease, serine 35
5.95	7.15	-2.29	0.000025	0.000843	Ltbp4	latent transforming growth factor beta binding protein 4
2.98	4.68	-3.24	0.000025	0.000852	Gm17535	predicted gene_17535
7.21	5.93	2.44	0.000026	0.000855	Egfr	epidermal growth factor receptor
10.22	9.21	2.02	0.000026	0.000858	Ogn	osteoglycin
3.78	2.58	2.29	0.000027	0.000867	Depdc1a	DEP domain containing 1a
6.36	4.15	4.65	0.000028	0.000879	F13a1	coagulation factor XIII, A1 subunit
6.96	7.97	-2.02	0.000031	0.000929	Vegfa	vascular endothelial growth factor A
7.24	8.8	-2.94	0.000031	0.000933	Ndrg1	N-myc downstream regulated gene 1
5.6	4.58	2.02	0.000031	0.000936	Fbxo5	F-box protein 5
6.69	5.28	2.65	0.000034	0.001002	Pik3r3	phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55)
7.79	6.43	2.56	0.000036	0.001025	1500015010Rik	RIKEN cDNA 1500015010 gene
9.65	8.63	2.02	0.000037	0.001051	Gas6	growth arrest specific 6
5.72	4.7	2.02	0.000038	0.001076	Akap12	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12
3.79	4.79	-2.01	0.000039	0.001076	Ngf	nerve growth factor
5.27	3.07	4.6	0.000039	0.001076	Gm12248	predicted gene_12248
8.37	7.29	2.1	0.00004	0.001101	Prss23	protease, serine 23
3.87	4.88	-2.01	0.000042	0.001133	Chd7	chromodomain helicase DNA binding protein 7
5.63	7.25	-3.09	0.000044	0.001163	Ddit3	DNA-damage inducible transcript 3
5.98	4.83	2.21	0.000046	0.001189	Tnnc2	troponin C2, fast
7.66	6.48	2.26	0.000046	0.001199	Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
4.99	6.06	-2.09	0.000047	0.001205	Phyhd1; Lrrc8a	phytanoyl-CoA dioxygenase domain containing 1
5.38	7.27	-3.71	0.000048	0.001229	Spns2	spinster homolog 2

5.44	8.04	-6.03	0.00005	0.001278	Trib3	tribbles homolog 3 (Drosophila)
5.71	4.62	2.12	0.00005	0.001278	Tk1	thymidine kinase 1
3	4.57	-2.97	0.000051	0.001283	Gm10719	predicted gene 10719
5.91	9.03	-8.68	0.000051	0.00129719; Mir675; SupH19; imprinted maternally expressed transcript; microRNA 675		
4.42	5.76	-2.54	0.000052	0.001305	Insc	inscuteable homolog (Drosophila)
9.44	8.37	2.1	0.000057	0.001399	Omd	osteomodulin
4.66	6.2	-2.89	0.000058	0.001411	Slc8a3	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3
3.7	4.81	-2.17	0.000062	0.001446	Chd7	chromodomain helicase DNA binding protein 7
5.64	7.57	-3.83	0.00007	0.001574	Ifitm5	interferon induced transmembrane protein 5
6.38	5.33	2.06	0.000081	0.001727	Ar	androgen receptor
8.31	9.42	-2.15	0.000089	0.00184408K05Rik; Gm2RIKEN cDNA 5730408K05 gene; predicted gene, 25822		
3.18	4.22	-2.05	0.00009	0.00184	Chd7	chromodomain helicase DNA binding protein 7
7.34	6.12	2.33	0.000104	0.002018	Gdpd2	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 2
6.64	9.89	-9.51	0.000106	0.002039	H19	H19, imprinted maternally expressed transcript
5.59	7.36	-3.42	0.000112	0.002101	Gpr133	G protein-coupled receptor 133
5.91	4.87	2.06	0.000118	0.002167	Chaf1b	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)
6.98	8.11	-2.19	0.000124	0.002245	Tnn	tenascin N
4.3	3.15	2.23	0.000126	0.002264	Cdk15	cyclin-dependent kinase 15
3.97	5.3	-2.51	0.000128	0.002296	Gpr35	G protein-coupled receptor 35
8.2	9.5	-2.46	0.000134	0.002363	Igf2	insulin-like growth factor 2
4.1	5.63	-2.89	0.000144	0.002483	Ifi44	interferon-induced protein 44
4.38	7.01	-6.17	0.00015	0.002554	Car9	carbonic anhydrase 9
3.15	4.2	-2.07	0.000166	0.002729	Chd7	chromodomain helicase DNA binding protein 7
5.49	4.43	2.1	0.000179	0.002866	Hist1h2bb	histone cluster 1, H2bb
8.86	9.87	-2.02	0.000192	0.002985	Hspa9	heat shock protein 9
7.35	8.6	-2.38	0.0002	0.003075	Vidlr	very low density lipoprotein receptor
4.05	6.19	-4.4	0.000216	0.0032244010719; Gm107 predicted gene 10719; predicted gene 10721		
5.26	7	-3.35	0.000221	0.00327	Ncf1	neutrophil cytosolic factor 1
5.07	3.79	2.44	0.000229	0.0033454; Gm21677; Gm21677; GmRNA binding motif protein, Y chromosome; predicted gene, 2169		
6.11	7.49	-2.61	0.000244	0.003481	Slc36a2	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member
1.17	2.35	-2.27	0.000247	0.003511	Gm24149	predicted gene, 24149
3.95	5	-2.07	0.000293	0.0039364010717; Gm107 predicted gene 10717; predicted gene 10715		
6.93	8.04	-2.15	0.000307	0.004058	Rcor2	REST corepressor 2

5.93	7.02	-2.13	0.000319	0.004156	Spon2
4.61	3.53	2.12	0.000339	0.004305 4; Gm21677; Gm RNA binding motif protein, Y chromosome; predicted gene, 21693	
4.91	3.73	2.27	0.000347	0.004367 5430419D17Rik RIKEN cDNA 5430419D17 gene	
5.73	6.92	-2.28	0.000384	0.004667	ChaC, cation transport regulator 1
3.77	4.96	-2.29	0.000475	0.005406 n10718; Gm111 predicted gene 10718; predicted gene 11168	
4.76	3.29	2.76	0.0006	0.006376	Enpep
5.04	6.21	-2.25	0.000643	0.006715	Il1rap
4.46	3.45	2.02	0.000724	0.007253	Il1rl1
5.6	4.56	2.06	0.000794	0.007742	Hmgcs2
4.39	5.57	-2.26	0.000833	0.007987	Cth
9.05	10.25	-2.31	0.001183	0.01025	Pannexin 3
7.27	8.76	-2.8	0.001195	0.010327	P4ha2
6.91	8.02	-2.17	0.001456	0.011894	ER01-like (<i>S. cerevisiae</i>)
5.55	6.97	-2.68	0.001463	0.011925	Slc6a4
6.66	7.95	-2.45	0.001631	0.012891	Smpd3
8.16	4.27	14.86	0.001655	0.013035	Txnip
7.12	8.44	-2.51	0.002563	0.017834	Bnip3
5.95	6.96	-2.01	0.002563	0.017834	Arhgap29
5.31	6.57	-2.39	0.002926	0.019566	Ankrd37
8.19	9.46	-2.41	0.003504	0.022297 Bnip3; Gm16435 BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3	
5.89	6.95	-2.08	0.004304	0.025807 Tcf7	transcription factor 7, T cell specific
5.03	6.28	-2.38	0.005882	0.032116 Higd1a; Gm979c HIG1 domain family, member 1A; predicted gene 9790	