

Aus dem Lehrstuhl für Orthopädie  
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Joachim Grifka  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

DIE ROLLE DES NK1R UNTER DEM EINFLUSS VON FLUID FLOW SHEAR STRESS  
IN MURINEN OSTEOZYTEN

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Judith Kalhammer

2022



Aus dem Lehrstuhl für Orthopädie

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Joachim Grifka

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

DIE ROLLE DES NK1R UNTER DEM EINFLUSS VON FLUID FLOW SHEAR STRESS  
IN MURINEN OSTEOZYTEN

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Judith Kalhammer

2022

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Susanne Grässel

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Richard Bauer

Tag der mündlichen Prüfung:

*Ich hebe meine Augen auf zu den Bergen. Woher kommt mir Hilfe?*

*Meine Hilfe kommt vom HERRN, der Himmel und Erde gemacht hat.*

Lutherbibel 2017, Psalm 121, 1-2

# Inhalt

1	Einleitung .....	5
1.1	Knochenaufbau .....	5
1.2	Knochenmetabolismus .....	5
1.2.1	Differenzierung und Regulierung von Osteoklasten .....	6
1.2.2	Entwicklung von Osteoblasten und Enddifferenzierung zu Osteozyten .....	7
1.2.3	Einfluss von Osteozyten auf Osteoblasten und Osteoklasten .....	10
1.3	Lakunocanaliculäres System und Fluid Flow Shear Stress .....	10
1.4	Mechanorezeption und -transduktion von Osteozyten.....	11
1.5	Mechanorezeption im sensiblen Nervensystem .....	12
1.5.1	Die Rolle des Nervensystems im Knochen .....	13
1.5.2	Der sensible Neurotransmitter alpha-Calcitonin gene-related peptide ( $\alpha$ CGRP) und sein Rezeptor CRLR/Ramp1 .....	14
1.5.3	Der sensible Neurotransmitter Substanz P (SP) und sein Rezeptor NK1R.....	16
1.5.3.1	Isoformen des NK1R .....	21
2	Ziel der Arbeit .....	25
3	Material und Methoden .....	27
3.1	Material .....	27
3.1.1	Geräte und Hilfsmittel .....	27
3.1.2	Chemikalien .....	30
3.1.3	Zellkulturmedien, Zusätze und Puffer.....	31
3.1.4	Pufferliste .....	32
3.1.5	Bakterienstämme und Vektoren .....	33
3.1.6	Zelllinien .....	33
3.1.7	Kits .....	34
3.1.8	Software .....	34
3.1.9	Primerliste .....	35

3.1.10	Antikörperliste.....	36
3.2	Methoden .....	37
3.2.1	Zellkultur .....	37
3.2.1.1	Murine Osteozyten-Zelllinie MLO-Y4 .....	37
3.2.1.2	293FT-Zellen .....	38
3.2.1.3	NIH 3T3-Zellen .....	39
3.2.1.4	RAW 264.7-Zellen .....	39
3.2.2	Die Auswirkungen von Fluid Flow Shear Stress auf bestimmte Gene of interests in der murinen Osteozyten-Zelllinie MLO-Y4 .....	40
3.2.2.1	Versuchsaufbau .....	40
3.2.2.2	Verwendetes Material .....	41
3.2.2.3	Versuchsablauf .....	43
3.2.3	Molekularbiologie .....	45
3.2.3.1	Transduktion der NK1R-Isoformen NK1R-F und NK1R-T in MLO-Y4- Zellen	45
3.2.3.2	Informationen zu den verwendeten Plasmiden.....	46
3.2.3.3	Plasmidisolation.....	46
3.2.3.4	Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese .....	47
3.2.3.5	Fragmentisolation .....	48
3.2.3.6	Ligationsansatz .....	48
3.2.3.7	Hitzeschocktransformation in E. coli Bakterien.....	48
3.2.3.8	Kontrolle der Ligation durch Restriktionsverdau, Gelelektrophorese und Sanger-Sequenzierung.....	49
3.2.3.9	Transfektion in 293FT-Zellen und Virusproduktion .....	50
3.2.3.10	Transduktion des Virus in NIH3T3-Zellen und Berechnung der „transduction units“	51
3.2.3.11	Transduktion des Virus in MLO-Y4-Zellen .....	52
3.2.3.12	RNA Isolation.....	54

3.2.3.13	cDNA Synthese .....	55
3.2.3.14	qRT-PCR .....	55
3.2.4	Proteinchemische Methoden .....	56
3.2.4.1	Proteinisolation aus MLO-Y4-Zellen .....	56
3.2.4.2	BCA-Assay .....	57
3.2.4.3	SDS-Gelelektrophorese .....	57
3.2.4.4	Western Blotting.....	58
3.2.4.5	Detektion der Proteine .....	59
3.2.5	Statistik.....	60
4	Ergebnisse .....	60
4.1	Einfluss von Fluid Flow Shear Stress auf die Genexpression in MLO-Y4-Zellen.....	60
4.1.1	Genexpression der Neuropeptidrezeptoren und Neuropeptide .....	61
4.1.1.1	NK1R-F, NK1R-T und SP.....	61
4.1.1.2	CRLR, Ramp1 und $\alpha$ CGRP.....	63
4.1.2	Genexpression von regulatorischen Proteine der Osteoklastogenese .....	65
4.1.3	Genexpression von Osteogenese-Inhibitoren.....	67
4.2	Überprüfung der Transformation und Transduktion der NK1R-Isoformen in MLO-Y4-Zellen .....	68
4.2.1	Überprüfung auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR .....	68
4.2.2	Überprüfung der Expression der Rezeptorvarianten auf Proteinebene mittels Western Blot.....	71
5	Diskussion .....	74
5.1	Eignung und Limitationen des FFSS-Versuchs .....	74
5.1.1	Fluid Flow Shear Stress Stärke .....	74
5.1.2	Verwendete Zellen .....	75
5.1.3	Versuchsaufbau .....	76
5.2	Genexpression der sensiblen Neuropeptide und ihrer Rezeptoren .....	77
5.2.1	NK1R-T/F, NK1R-F und NK1R-T und SP.....	77



5.2.2	CRLR, Ramp1 und $\alpha$ CGRP .....	78
5.2.3	Genexpression regulatorischer Proteine der Osteoklastogenese .....	79
5.2.4	Genexpression von Osteoblastogenese-Inhibitoren .....	80
5.2.5	Überprüfung der Transduktion der NK1R-Isoformen in MLO-Y4-Zellen.....	81
5.2.6	Überprüfung der NK1R-T/F und NK1R-F Expression auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR.....	82
5.2.7	Überprüfung der verschiedenen Zellklone auf Proteinebene mittels Western Blot	83
6	Ausblick .....	85
7	Zusammenfassung.....	86
8	Anhang .....	89
8.1	Berechnungen für den Fluid Flow Shear Stress-Versuch .....	89
8.1.1	Berechnung der Zeit zum Durchlauf eines Kreislaufs im Schlauchsystem .....	91
8.2	Überblick über absolute Ct-Werte gemessen im Fluid Flow Shear Stress-Versuch...	92
8.3	Plasmidkarten und Gensequenzen im Rahmen des Überexpressionsversuchs.....	93
8.3.1	Plasmidkarte und Gensequenz von pLenti-6/V5-D-TOPO.....	94
8.3.2	Plasmidkarte und Gensequenz von 18AFGMLC_NK1R-F_pMA-RQ_(AmpR)	95
8.3.3	Plasmidkarte und Gensequenz von 18AFGMMC_NK1R-T_pMA-RQ_(AmpR)	96
8.3.4	Sequenzierergebnis von pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F.....	98
8.3.5	Sequenzierergebnis von pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T.....	100
8.4	Überblick über die absoluten Ct-Werte nach Überexpression.....	101
9	Abkürzungsverzeichnis .....	102
10	Literaturverzeichnis.....	107
11	Danksagung.....	0
12	Eidesstattliche Erklärung.....	2

# **1 Einleitung**

## **1.1 Knochenaufbau**

Um unterschiedlichen mechanischen Belastungen standhalten zu können, müssen Knochen folgende Eigenschaften besitzen: Stärke, Steifheit, Flexibilität und Dehnbarkeit (1). Die Zusammensetzung des Knochengewebes spiegelt diese Anforderungen wider. Es besteht aus mineralisierter Extrazellulärmatrix (EZM) und verschiedenen Zelltypen, im wesentlichen Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten. Die EZM wird vor allem von Kollagenfibrillen und Hydroxyapatit-Kristallen gebildet, was dem Knochen eine besondere „Biegefestigkeit“ verleiht. Er ist sowohl druck- als auch zugfest. Im reifen Knochen lagern sich die Kollagenfibrillen der EZM in Lamellen an. Zwischen zwei Knochenlamellen liegen in linsenförmigen Lakunen Osteozyten, die „Hauptzellen“ des Knochens. Durch eine unterschiedliche Anordnung der Lamellen entstehen die beiden Knochenformen Spongiosa und Compacta. Eine flächige Anordnung und Organisation der Knochenlamellen in trabekulären Strukturen ist bezeichnend für Spongiosa. Die konzentrische Anordnung der Lamellen um ein Havers-Blutgefäß ist der Grundbaustein der stabilen Compacta. Beide Bauformen finden sich in der Architektur des Knochens: Im Inneren liegt Spongiosa, wobei die Hohlräume zwischen den Trabekeln mit Knochenmark gefüllt sind. Die Rindenschicht (Corticalis) des Knochens besteht aus Compacta und ist von einer dünnen Haut, dem Periost, überzogen. Auch die Innenfläche des Knochens ist von einer Haut bedeckt, dem Endost. Es umgibt die Trabekel der Spongiosa und die Wände des Gefäßsystems innerhalb der Compacta. Das Endost wird von nicht-mineralisierten Kollagenfibrillen, mesenchymalen Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten gebildet. Das außen am Knochen anliegende Periost gliedert sich in das aus straffem Bindegewebe bestehende Stratum fibrosum, welches über Sharpey-Fasern in der Corticalis des Knochens verankert ist und in das unmittelbar am Knochen anliegende Stratum osteogenicum. Letzteres enthält die gleichen Bestandteile wie das Endost, sowie zahlreiche Gefäße und Nerven (2).

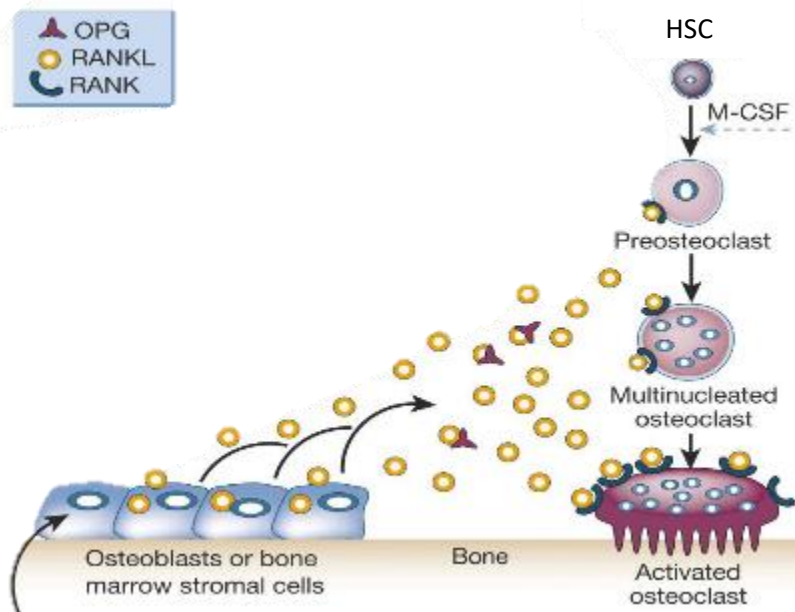
## **1.2 Knochenmetabolismus**

Der Skelettknochen steht in fortwährender Interaktion mit endogenen und exogenen Einflüssen. Die Anpassung an diese Faktoren zur Erhaltung der Homöostase wird durch das Zusammenspiel von hoch spezialisierten Knochenzellen, den Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten, bewirkt. Sie steuern die Entwicklung des Skeletts während der Wachstumsphase,

ein Prozess, der sich „Modeling“ nennt. Im adulten gesunden Knochen findet ebenfalls ein kontinuierlicher Ersatz „alter“ Matrix durch neu synthetisierte Knochenmatrix statt, was als „Remodeling“ bezeichnet wird und der Anpassung an sich verändernde Beanspruchung sowie endogene Bedürfnisse dient (3). Beispielsweise bewirkt mechanische Belastung eine reaktive Knochenneubildung, Umstrukturierung und Trabekelausrichtung (4–6). Eine grobe Schätzung ist, dass sich das Knochengewebe durch Remodeling etwa alle 10 Jahre einmal gänzlich erneuert. Vereinfacht läuft der Knochenumbau wie folgt ab: Nach einem endogenen oder exogenen Stimulus folgt ein Prozess der Knochenresorption, der von Osteoklasten bewirkt wird. Anschließend folgt die Synthese und Ablagerung neuer Knochenmatrix, generiert von Osteoblasten (3). Die Balance zwischen Resorption und Knochenbildung wird zu einem Hauptteil durch Osteozyten gesteuert (7).

### **1.2.1 Differenzierung und Regulierung von Osteoklasten**

Osteoklasten entwickeln sich aus der hämatopoetischen Stammzelllinie. Mononukleäre Vorstufen der Granulozyten- beziehungsweise Makrophagenpopulation, werden unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors PU.1, dem receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) und dem macrophage colony stimulating factor (M-CSF) zu Osteoklastenvorstufen differenziert. M-CSF regt außerdem die weitere Entwicklung zu pre-Osteoklasten und die Hochregulation des receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (RANK) an. Nach der Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK, wird eine Fusion der Vorstufen zu funktionellen mehrkernigen Osteoklasten bewirkt (8,9). RANKL, M-CSF und der lösliche Decoy-Rezeptor für RANKL, Osteoprotegerin (OPG), werden von Osteoblasten produziert, die dadurch Einfluss auf die Knochenresorption nehmen (6) (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Osteoklastogenese und deren Regulierung durch Osteoblasten.**

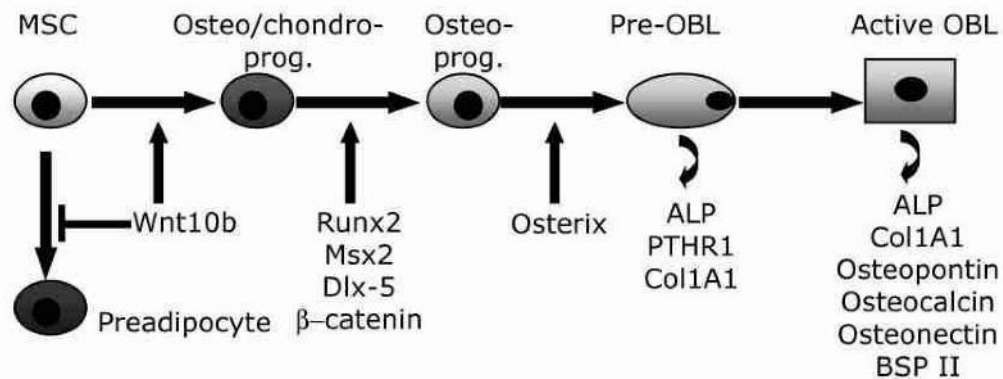
Makrophagen-Vorläuferzellen der hämatopoetischen Stammzelllinie (HSC) differenzieren unter dem Einfluss von macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) und receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) zu reifen Osteoklasten. M-CSF bewirkt die Hochregulierung von receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK), dem Rezeptor für RANKL. Osteoprotegerin (OPG) kann an RANKL binden und es neutralisieren, wodurch einerseits die Osteoklastogenese gehemmt und andererseits die Aktivierung reifer Osteoklasten verhindert wird. (adaptiert aus Boyle et al. (10))

OPG hemmt sowohl die Osteoklastendifferenzierung, als auch die Aktivierung reifer Osteoklasten und wirkt somit insgesamt inhibierend auf den Knochenabbau (siehe Review (9)). Der Abbau von Knochen verläuft in mehreren Schritten: Zunächst wird die Knochenmatrix von Osteoklasten angesäuert, um die nicht-organischen Bestandteile des Knochens aufzulösen. Anschließend setzen Osteoklasten lysosomale Enzyme, wie Kathepsin K und Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) frei, wodurch die organischen Knochenbestandteile abgebaut werden. Die entstandenen Fragmente werden durch Endozytose von den Osteoklasten aufgenommen. Am Ende dieses Resorptionszyklus sterben Osteoklasten durch Apoptose oder sie verweilen in einem inaktiven Zustand im Endost (2,8).

### 1.2.2 Entwicklung von Osteoblasten und Enddifferenzierung zu Osteozyten

Osteoblasten entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen (MSC), welche pluripotent sind und sich je nach Stimulus zu Adipozyten, Chondrozyten, Fibroblasten, Myoblasten oder Osteoblasten differenzieren können (11,12). Der Wingless-int (Wnt) Signalweg ist für die

Osteoblastogenese ein zentraler Signaltransduktionsweg. Verschiedene Hormone und Transkriptionsfaktoren können Einfluss auf die Osteoblastendifferenzierung nehmen (12) (Abbildung 2).



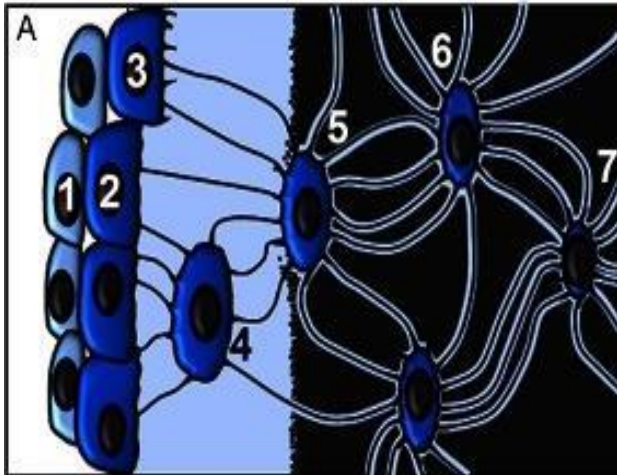
**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Osteoblastogenese.**

Osteoblasten (OBL) entwickeln sich unter dem Einfluss des Wnt Signalwegs (*Wnt10b*) aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) zunächst zu Osteo-/Chondroprogenitorzellen (Osteo/chondro-prog.) und anschließend, durch den Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren (*Runx2*, *Msx2*, *Dlx-5*,  $\beta$ -catenin), zu Osteoprogenitorzellen (Osteo-prog.). Der Transkriptionsfaktor Osterix stimuliert die weitere Differenzierung zu pre-Osteoblasten (pre-OBL), welche Alkalische Phosphatase (ALP) und type 1 parathyroid receptor (PTHR1) exprimieren, sowie Kollagen Typ 1 (*Col1A1*) sezernieren. Aktive, reife Osteoblasten (Active OBL) schließlich sezernieren weitere Knochenmatrixproteine wie Osteopontin, Osteocalcin, Osteonectin und bone sialoprotein II (BSP II). (adaptiert aus Rucci et al. (8))

Reife Osteoblasten übernehmen im Knochen eine zentrale anabole Funktion. Sie produzieren und sezernieren Knochenmatrixproteine und bauen dadurch den Knochen auf. Darüber hinaus sind Osteoblasten wesentlich an der Mineralisierung des Osteoids (unverkalkte Matrix) beteiligt. Sie setzen aus Vesikeln in ihrer Umgebung Phosphate frei, welche zusammen mit Calcium aus der extrazellulären Flüssigkeit Hydroxyapatit-Kristalle bilden (13). Nach Abschluss der Knochenformation differenzieren Osteoblasten entweder zu Osteozyten, indem sie in die Knochenmatrix eingebettet werden, zu inaktiven Osteoblasten, die als bone lining cells (BLC) auf der Knochenoberfläche ruhen oder sie sterben durch Apoptose (14).

Mit 90-95% machen Osteozyten den größten Anteil an der absoluten Knochenzellzahl aus. Sie entwickeln sich aus Osteoid-produzierenden Osteoblasten, die während der Ablagerung neuer Knochenmatrix in die neugebildete EZM eingebettet werden und sich dabei schrittweise zu Osteozyten differenzieren (15). Die Zellen durchlaufen dabei einen morphologischen Wandel:

Von ehemals polygonalen Zellen entwickeln sie sich zu sternförmigen Osteozyten mit geringerem Zellvolumen (14,16,17), die viele Jahre in der Knochenmatrix funktionsfähig bleiben, bis sie nekrotisch, apoptotisch oder im Rahmen von Remodeling-Prozessen durch Osteoklasten abgebaut werden (16) (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Osteozytendifferenzierung.**

*Darstellung der schrittweisen Entwicklung von Osteozyten aus Preosteoblasten (1), die zunächst zu mineralisierenden Osteoblasten (2) und im Folgenden zu eingebetteten Osteoblasten (3) werden. Anschließend differenzieren sie zu Osteoid-Osteozyten (4) und nach einiger Zeit zu mineralisierten Osteozyten (5). Letztlich haben sie sich zu reifen Osteozyten (6 und 7) differenziert. Die Zellen verändern während des Reifungsprozesses sukzessive ihre Morphologie durch eine Reduktion des Volumens und dem Verlust von Zellorganellen. Zugleich bilden sie zahlreiche Dendriten aus, die für die interzelluläre Kommunikation und die Mechanorezeption verantwortlich sind. (adaptiert aus Dallas et al. (16))*

Osteozyten exprimieren im Verlauf ihrer Entwicklung Gene, die eine Schlüsselrolle im Differenzierungsprozess und in der Osteozytenfunktion spielen. Beispielsweise bewirkt das Transmembran-Glykoprotein E11/gp38 und die Membran Typ 1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) die Ausbildung von Dendriten und Canaliculi. Dentin matrix protein 1 (DMP1), matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome (PHEX) und fibroblast growth factor 23 (FGF23) sind Faktoren, die im Zusammenhang mit Mineralisierung und Phosphatmetabolismus stehen (18,19). Reife Osteozyten exprimieren große Mengen an Sklerostin, das Produkt des *SOST*-Gens. Sklerostin antagonisiert die Wirkung von Schlüsselaktivatoren des Wnt/ $\beta$ -catenin Signalwegs, nämlich low-density lipoprotein receptor-related protein 5 und 6 (Lrp5 und Lrp6),

und ist somit, ebenso wie Dickkopf-related protein 1 (Dkk1), ein Antagonist in der Knochenbildung (14,20,21).

### **1.2.3 Einfluss von Osteozyten auf Osteoblasten und Osteoklasten**

Während der Osteoblasteneinbettung im Rahmen der Osteozytogenese werden in der EZM Lakunen für die Osteozytenzellkörper gebildet und Canaliculi für die dendritischen Fortsätze (15). Das Dendritennetzwerk der Osteozyten erstreckt sich durch Zell-Zell-Kontakte vom Knochenmark zu verschiedenen Osteozytenvorstufen, BLC, die an der Knochenoberfläche ruhen und zu Osteoklasten. Durch dieses Netzwerk steuern Osteozyten die Knochenhomöostase. Sie tun dies durch Sekretion von löslichen Mediatoren oder durch direkte Interaktion mit den lokalen Knochenzellen (22,23).

Osteozyten können die Aktivität von Osteoklasten durch differentielle Expression von RANKL, OPG und M-CSF regulieren. Exprimieren Osteozyten weniger RANKL oder mehr OPG, so resultiert daraus eine Zunahme an Knochenmasse (16,24,25). M-CSF wiederum fördert die Bildung und Reifung von Osteoklasten und damit den Knochenabbau (6).

Osteoblasten werden direkt und indirekt von Osteozyten reguliert. Zum einen bewirkt eine Aktivierung von Osteoklasten im Zuge des Remodelings auch eine Stimulierung von Osteoblasten (26). Zum anderen produzieren Osteozyten Faktoren, die stimulierend oder inhibierend auf Osteoblasten wirken. Von Osteozyten freigesetzte Modulatoren wie Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Insuline-like growth factor-1 (IGF-1), Wnt, Stickstoffmonoxid (NO) und Adenosintriphosphat (ATP) haben einen stimulierenden Effekt auf die Osteoblastogenese und Knochenformation (27). Durch Sekretion der Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweginhibitoren Dkk1 und Sklerostin hemmen Osteozyten die Osteoblastogenese (20,27,28).

### **1.3 Lakunocanaliculäres System und Fluid Flow Shear Stress**

In den vergangenen Jahrzehnten wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt, welche Reize für die Knochenformation verantwortlich sind. Weinbaum et al. (29) und Hillsley und Frangos (30) stellten die These auf, dass der Flüssigkeitsstrom im Lakunocanaliculären System (LCS) der Stimulus ist, der bei mechanischer Belastung die Adaption des Knochens hervorruft.

Die Hohlräume des Knochengewebes lassen sich im Wesentlichen in drei Bereiche gliedern: Das Gefäßsystem, zu dem die vertikal verlaufenden Havers-Kanäle und die horizontal verlaufenden Volkmann-Kanäle gehören, die Lakunen und Canaliculi der Osteozyten und die

Poren zwischen den Hydroxyapatit-Kristallen innerhalb der EZM. Sie alle sind mit Flüssigkeit gefüllt (29). Der Durchmesser der Lakunen, in denen die Osteozyten liegen, misst in etwa 15 – 20µm, der Durchmesser der Canaliculi beträgt etwa 25-300nm (16). Schätzungen zufolge macht die Oberfläche des LCS im adulten humanen Skelett eine Fläche von 215m<sup>2</sup> aus (31). Ein konstanter Flüssigkeitsgrundfluss wird durch den extravaskulären Druck hervorgerufen. Wird eine zusätzliche, intermittierende mechanische Belastung ausgeübt, kommt es zu schnellen Richtungswechseln im Flüssigkeitsstrom des LCS, dem sogenannten „Fluid Flow“ (29,32). Beim Vorbeifließen der Flüssigkeit an der Osteozytenzellmembran kommt es zu einer Interaktion mit Oberflächenmolekülen. Es entstehen Scherkräfte, die als „Shear Stress“ bezeichnet werden (6,27).

Es wirken zwei Arten von Fluid Flow Shear Stress (FFSS) auf die etwa 42 Milliarden Osteozyten des menschlichen Skeletts ein: Ein stetiger („steady“) und ein wirbelnder (oszillierender) FFSS (31,33). Das LCS der Osteozyten ist neben der interstitiellen Flüssigkeit auch mit Kollagenfibrillen und einer Proteoglykanmatrix gefüllt, die mit der Zellmembran der Osteozyten und den Osteozytendendriten in Verbindung stehen (2,29). Sowohl in primären Osteozyten, als auch in der murinen Osteozytenzelllinie MLO-Y4 konnte gezeigt werden, dass FFSS eine Vielzahl an Reaktionen hervorruft (16) und eine zentrale Rolle im Rahmen der Mechanorezeption und –transduktion des Knochens spielt (34,35).

#### **1.4 Mechanorezeption und -transduktion von Osteozyten**

Osteozyten sind die wichtigsten Mechanosensoren im Knochen. Sie nehmen mechanische Belastung wahr und reagieren darauf, vereinfacht und zusammenfassend dargestellt, indem sie die Freisetzung kataboler Moleküle herunterregulieren und die Sekretion anaboler Mediatoren verstärken (27).

Detaillierter betrachtet reagieren Osteozyten auf einen mechanischen Reiz mit der Sekretion von Kalziumionen, NO, ATP, PGE<sub>2</sub> und IGF-1 (16,33,36). Außerdem wird vermehrt Connexin 43, ein integraler Bestandteil von gap junctions und Hemikanälen exprimiert, beziehungsweise an die Zelloberfläche transloziert, was zu einer gesteigerten Kanalbildung in den Osteozyten führt (32,36,37). Als Reaktion auf die Aktivierung entsprechender Mechanorezeptoren werden diverse Zielgene des Wnt/β-catenin Signalwegs reguliert: Unter anderem werden vermehrt Frizzled (Fz) Transmembranrezeptoren und Wnt-Proteine gebildet und die Expression der Signaltransduktionsweginhibitoren Sklerostin und Dkk1 wird reduziert (6,38,39). Die



Genexpression von Osteozytendifferenzierungsmarkern wie MEPE und DMP1 wird von Osteozyten nach Belastung hochreguliert (40–42).

Die Mechanismen, über welche Osteozyten eine mechanische Belastung initial wahrnehmen, sind aktuell noch unvollständig erforscht (27,43). Als mögliche Mechanorezeptoren werden die Integrine der Glycocalyx, ein primäres Cilium (44), sowie verschiedene sensorische Rezeptoren auf der Zelloberfläche diskutiert (45,46).

Untereinander und mit den Osteoblasten auf der Knochenoberfläche sind Osteozyten durch gap junctions verbunden, so dass eine Signalweitergabe zwischen den Zellen möglich ist (47). Die Signalweitergabe, Mechanotransduktion genannt, erfolgt hauptsächlich über Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -catenin Signalwegs (6,27,48,49), der neben der Signaltransduktion auch eine zentrale Rolle bei der Osteoblastendifferenzierung, Proliferation und Matrixproduktion innerhalb des Osteozytennetzwerks spielt (6,7). Der Wnt/ $\beta$ -catenin Signaltransduktionsweg ist essentiell für den Erhalt funktioneller Osteozyten. Eine Deletion von  $\beta$ -catenin in Osteozyten verändert die Knochenstruktur und führt zu fragilem und porösen Knochen (49). Eine Aktivierung des Signalwegs erfolgt, wenn der Ligand Wnt an den Rezeptorkomplex aus Lrp 5 oder 6 und einem Fz-Rezeptor bindet (7). Nachfolgend werden Wnt-Zielgene abgelesen, die in den Schutz vor Apoptose, in die Zell-Zell Kommunikation, die Regulation des Knochenremodelings und in die Mechanotransduktion involviert sind (44). Mechanische Belastung in der Form von FFSS nimmt ebenfalls über den Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweg Einfluss auf Osteozyten und ihre Vitalität, Funktion und Kommunikation (siehe Review (50)).

## **1.5 Mechanorezeption im sensiblen Nervensystem**

Das sensible Nervensystem nimmt eine Vielzahl mechanischer, chemischer und thermischer Stimuli wahr und übermittelt diese über sogenannte „sensible Nervenfasern“ an das ZNS, wo die Informationen bewusst oder unbewusst wahrgenommen und verarbeitet werden. Die unterschiedlichen Reize werden dabei zunächst nach der Lokalisation ihrer Entstehung unterteilt in die Oberflächensensibilität (Exterozeption), bei der Stimuli der Haut und der Sinnesorgane registriert und weitergeleitet werden, und in die Tiefensensibilität (Propriozeption), deren Mechanorezeptoren vor allem in Muskeln, Sehnen und Bändern des Bewegungsapparates liegen. Die Exterozeption wird außerdem noch nach der Reizart differenziert: Leichter Druck, Vibration und feine Berührungen werden als epikriptive

Wahrnehmung bezeichnet, grober Druck, Schmerz, Temperatur und starke mechanische Belastung als protopathisch (51).

Die Wahrnehmung der Stimuli erfolgt mit Hilfe sensibler Endigungen, die ubiquitär, aber in bestimmten Regionen des Körpers vermehrt, vorkommen. Dazu zählen beispielsweise Ruffini-Korpuskel, welche durch oberflächliche Hautdehnung oder durch Bänder- und Kapselspannung gereizt werden, Meißner-Korpuskel, die Vibration und Hautberührungen registrieren und freie Nervenendigungen, die unter anderem Kälte und Wärme, mechanische, chemische und noxische Reize erfassen. Vor allem im Rahmen der Wahrnehmung noxischer, also potenziell schädlichen Reize, spielen Neuropeptide wie Substanz P (SP), Neurokinin A, Calcitonin-gene related peptide ( $\alpha$ CGRP) oder Somatostatin, eine zentrale Rolle. Sie haben zugleich eine Transmitter-, Neuromodulator- und Hormonfunktion, liegen in den Nervenendigungen in Vesikeln gespeichert vor und werden nach Depolarisation der sensiblen Nervenendigungen in das umgebende Gewebe sezerniert. Dort bewirken die Neuropeptide unter anderem eine gesteigerte Gefäßpermeabilität (betrifft SP), Vasodilatation (betrifft  $\alpha$ CGRP), Mastzelldegranulation (betrifft SP und  $\alpha$ CGRP), aber auch anti-inflammatorische Effekte (betrifft Somatostatin) (52). Neben den lokalen Effekten bewirken die Neuropeptide auch eine Vielzahl an systemischen Wirkungen (siehe  $\alpha$ CGRP Abschnitt 1.5.2; siehe SP Abschnitt 1.5.3).

### **1.5.1 Die Rolle des Nervensystems im Knochen**

Synovia, Knochentrabekel und Knochenmark, subchondraler Knochen, Periost und Frakturkallus sind von sympathischen und sensiblen Nervenfasern innerviert (53,54). Ebenso wurden Nerven in Corticalis, Havers-Kanälen und in Begleitung der versorgenden Gefäße nachgewiesen (55,56). Eine besonders hohe Nervendichte findet man in Bereichen höherer Stoffwechselaktivität, wie in der Epi- und Metaphyse (55). Knochenzellen exprimieren Rezeptoren für diverse Neurotransmitter, wie beispielsweise SP,  $\alpha$ CGRP, Vasoactive intestinal peptide (VIP) und weitere (siehe Review (57)), wodurch Neurotransmitter auch Einfluss auf das Knochenremodeling nehmen können. Beispielsweise wurde gezeigt, dass sowohl SP, als auch  $\alpha$ CGRP, wesentlich am alveolären und parodontalen Knochenumbau während der Zahnentwicklung beteiligt sind (58,59).

Wie wichtig neuronale Signale für die Knochenstruktur sind, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, bei denen nach Sympathektomie eine Zunahme der Anzahl an Havers-Kanälen sowie ein verstärkter Knochenabbau beobachtet wurde (60–63). In einer Studie von

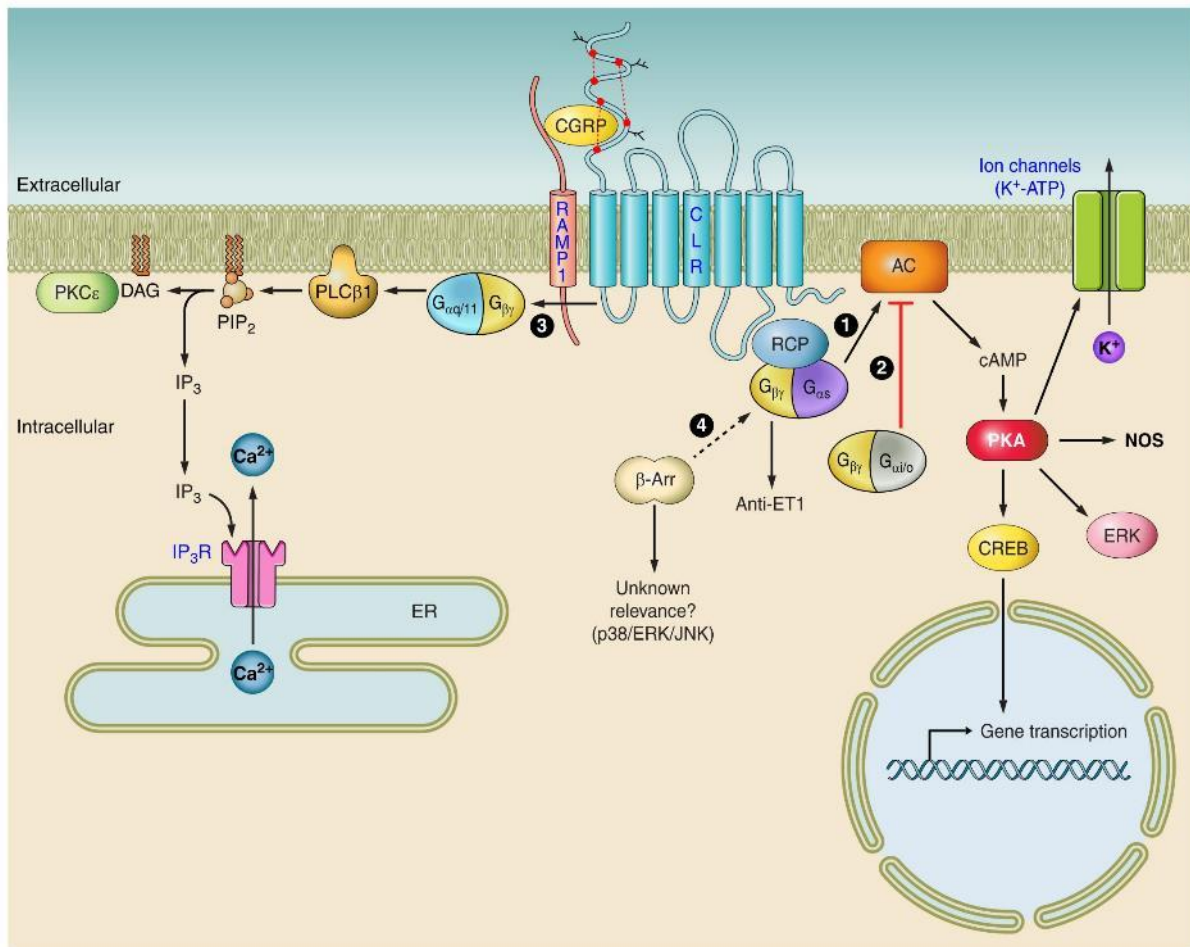
Millerward-Sadler et al. mit Chondrozyten zeigte sich außerdem der Neurokinin1-Rezeptor (NK1R), der mit dem Neuropeptid SP interagiert, als essentieller Rezeptor im Zusammenhang mit Mechanorezeption nach Belastung (64). Darüber hinaus konnte in der AG Grassel gezeigt werden, dass das Tachykinin-System auch in der Mechanotransduktion von Makrophagen eine wichtige Rolle spielt (65). In einem weiteren Projekt von Niedermair et al. wurde der Einfluss des sympathischen Nervensystems und der Einfluss des Neurotransmitters SP auf die Knochenstruktur und Knochenneubildung nach Fraktur in Mäusen untersucht. Dabei zeigten die Ergebnisse deutlich, wie essentiell die Anwesenheit sowohl eines intakten sensiblen Nervensystems als auch des Neurotransmitters SP für die Bildung einer stabilen Knochenstruktur ist. In derselben Studie konnte außerdem beobachtet werden, dass die Chondrozyten selbst im Frakturkallus SP freisetzen, sowie Rezeptoren für SP und Katecholamine exprimieren. Diese Ergebnisse unterstreichen die Vermutung, dass dieses Neurotransmittersystems eine essentielle Rolle bei der Knochenneubildung spielt (66).

### **1.5.2 Der sensible Neurotransmitter alpha-Calcitonin gene-related peptide ( $\alpha$ CGRP) und sein Rezeptor CRLR/Ramp1**

$\alpha$ CGRP ist ein 37 Aminosäuren langes Neuropeptid, das durch alternatives Spleißen des *Calcitonin*-Gens entsteht. Im peripheren Nervensystem (PNS) wird es hauptsächlich in wenig myelinisierten A-delta Fasern und unmyelinisierten C-Fasern exprimiert (55).

Der Rezeptor für  $\alpha$ CGRP ist ein heteromeres Molekül, bestehend aus einer G-Proteingekoppelten Rezeptoruntereinheit mit einer 7-Transmembrandomäne, dem calcitonin receptor-like receptor (CRLR) und einer von insgesamt drei receptor activity modifying proteins (RAMPs) Untereinheiten, RAMP1. Letztere bestimmt die Rezeptorspezifität für  $\alpha$ CGRP (67). Durch Interaktion von  $\alpha$ CGRP mit CRLR/RAMP1, wird CRLR phosphoryliert, der Rezeptorkomplex internalisiert und in mehreren Schritten recycelt oder degradiert (68–70). Die Bindung von  $\alpha$ CGRP an seinen Rezeptor aktiviert eine Vielzahl an intrazellulären Signalwegen (Abbildung 4). Die vermehrte Bildung von cAMP beispielsweise bewirkt zum einen die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und zum anderen die Öffnung von ATP-sensiblen Kaliumkanälen, die eine entscheidende Rolle in der Vasodilatation spielen (71). Durch die Phosphorylierung des cAMP response element binding protein (CREB), kann  $\alpha$ CGRP Einfluss auf die Gentranskription nehmen, was auch im Rahmen der Schmerzsensibilisierung eine Rolle spielt. Außerdem schützt  $\alpha$ CGRP unter anderem durch Aktivierung des extracellular signal-

regulated kinase 1/2 (Erk1/2) Signalwegs, glatte Gefäßmuskelzellen vor Apoptose nach oxidativem Stress (siehe Review (72)). Das ubiquitäre Vorkommen von  $\alpha$ CGRP spiegelt sich in zahlreichen Effekten, die durch den Transmitter bewirkt werden: Vasodilatation, Nozizeption, Aufnahme von Glucose und Stimulation der Glykolyse im Skelettmuskel, Verstärkung der lokalen Wirkung von Entzündungsmediatoren, um nur einige zu nennen (73).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung ausgewählter Signalwege nach Aktivierung des  $\alpha$ CGRP-Rezeptors.**

Das Binden von alpha-Calcitonin gene-related peptide ( $\alpha$ CGRP) an den heterodimeren, G-Protein gekoppelten Rezeptor bestehend aus Receptor activity modifying protein1 (RAMP1) und calcitonin receptor-like receptor (hier: CLR), kann die Aktivierung mehrerer Signalwege induzieren, von denen einige hier dargestellt sind. (1) Die Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) durch die  $\alpha$ s-Untereinheit des G-Proteins bewirkt eine Freisetzung von intrazellulärem cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welches in der Folge Proteinkinase A aktiviert (PKA). PKA phosphoryliert nachfolgende Zielproteine, wie die Kaliumionen-sensiblen Adenosintriphosphat (ATP)-Kanäle, extracellular signal-regulated kinases (ERKs) und Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise das cAMP response element-binding protein (CREB). Stickstoffmonoxid wird freigesetzt (NOS). (2) Durch Aktivierung der  $\alpha$ i/o-G-Proteinuntereinheit wird die AC blockiert, was einen intrazellulären cAMP-Abfall zur Folge hat und

damit eine reduzierte PKA-Aktivität. (3) Durch die  $\alpha$ /11-G-Proteinuntereinheit wird die Aktivierung von PLC- $\beta$ 1, sowie die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) bewirkt. IP3 bindet an den IP3-Rezeptor (IP3R) des endoplasmatischen Retikulums (ER), was zur Kalziumionenfreisetzung führt. DAG aktiviert vermutlich die Proteinkinase C (PKC), die wiederum nachfolgende Proteine phosphoryliert. (4)  $\beta$  $\gamma$ -G-Proteinuntereinheiten beenden Endothelin (ET)-vermittelte Effekte. Neben den G-Proteinuntereinheiten vermittelten Effekten, werden zusätzlich G-Protein-unabhängige Signalwege aktiviert, die eine Translokation von Gerüstproteinen, wie  $\beta$ -Arrestin ( $\beta$ -Arr) an den aktivierten Rezeptor bewirken.

In der Grafik stehen Pfeile mit durchgezogenen Linien für erforschte Signalwege und unterbrochene Linien für vermutete Signalwege, die Gegenstand der Forschung sind. (adaptiert aus Russell et al. (72))

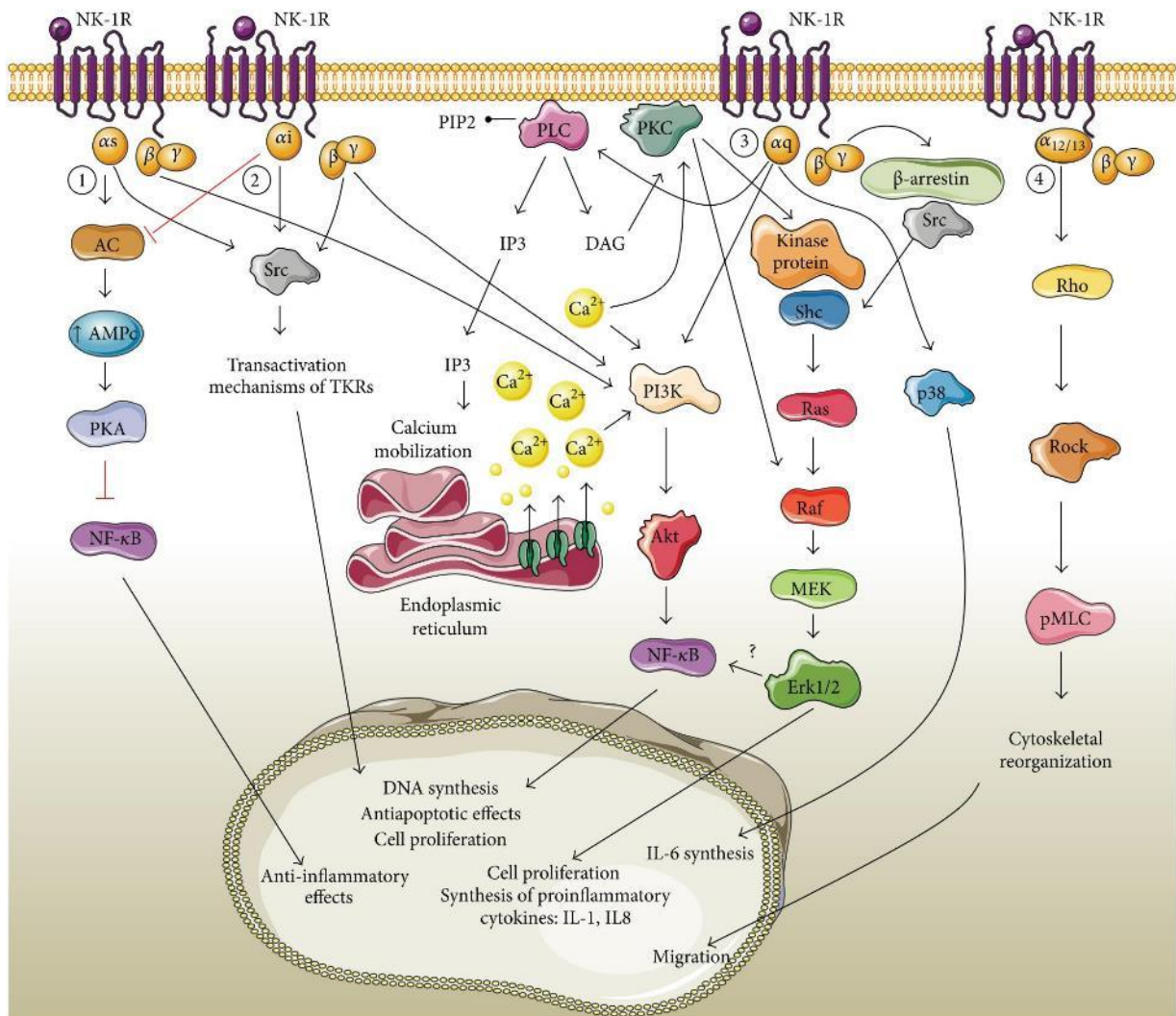
Immunhistochemische Färbungen zeigten die Expression von  $\alpha$ CGRP im Periost (53,74–76), Knochenmark (75) und epiphysären Trabekelknochen (76,77), in der Corticalis (76) und im Bereich von Volkmann- und Havers-Kanälen (76). Die Rezeptoruntereinheiten CRLR und RAMP1 werden von Knochenmarksmakrophagen, Osteoklasten und Osteoklastenvorläufern, von Osteoblasten und, wie in noch unveröffentlichten Ergebnissen der AG Grassel gezeigt werden konnte, auch von Osteozyten exprimiert (67,78,79). Die Stimulation von Osteoblasten mit  $\alpha$ CGRP führt zu einem Anstieg von IGF-1 (80) und IL-6 (81), zu einer verminderten Expression von TNF $\alpha$  (82) sowie zu einer Hemmung des Knochenabbaus durch Osteoklasten (83). Sample et al. konnten zeigen, dass  $\alpha$ CGRP beim Remodeling und der Knochenreparatur nach Ermüdungsbrüchen von zentraler Bedeutung ist (84). *In vitro* Versuche mit Ratten-Knochenmarksleukozyten zeigten unter Stimulation mit  $\alpha$ CGRP ein signifikantes Wachstum der Zellkolonien bezüglich Größe und Anzahl (85). Die Abwesenheit von  $\alpha$ CGRP wiederum führt zu einer geringeren Zellteilung der Knochenzellen, einer erhöhten Apoptoserate und zu einer reduzierten Osteoblastogenese, wie in der AG Grassel in einer prä-klinischen Studie an Mäusen gezeigt werden konnte (86). Insgesamt lassen die Ergebnisse vermuten, dass unter Einfluss von  $\alpha$ CGRP vermehrt Knochen gebildet wird und der Neurotransmitter eine zentrale Rolle in der anabolen Regulation des Knochenmetabolismus spielt (77,87).

### 1.5.3 Der sensible Neurotransmitter Substanz P (SP) und sein Rezeptor NK1R

Das Neuropeptid SP besteht aus 11 Aminosäuren (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>) (88) und wird von dem *Tachykinin Precursor 1 (TAC1)* Gen codiert (89). Es ist Teil der umfassenden und weit verbreiteten Tachykinin Neurohormonpeptidfamilie, die neben SP noch weitere Neuropeptide beinhaltet (89). *TAC1* codiert außer für SP auch für Neurokinin A, Neuropeptid K und Neuropeptid  $\gamma$  (90). Der Unterschied zwischen den vier Peptiden liegt in

der Aminosäuresequenz (90), der pharmakologischen Aktivität und der Bindungspräferenz gegenüber verschiedenen Tachykinin Rezeptoren (91). Der Rezeptor mit der höchsten Affinität für SP ist der Neurokinin 1-Rezeptor (NK1R) (91). Ihren Namen tragen Tachykinine, weil sie in der glatten Muskulatur eine schnelle (*tachy-*) Kontraktion auslösen (90). Hauptsächlich werden die Peptide in verschiedenen Bereichen des peripheren und zentralen Nervensystems exprimiert, wo sie als Neurotransmitter beziehungsweise als Neuromodulatoren fungieren. Darüber hinaus haben sie in nicht-neuronalen Strukturen auch autokrine, parakrine und endokrine Funktionen (91,92). SP kommt nahezu ubiquitär im Körper vor und bewirkt unter anderem Schmerz-, Stress- und Angstwahrnehmung. Eine Sekretion im gastrointestinalen und pulmonalen Bereich führt zu Muskelkontraktion der glatten Muskulatur und Immunstimulation (93). Im Immunsystem induziert SP eine proinflammatorische Wirkung, ebenso im respiratorischen, gastrointestinalen und muskuloskelettalen System (94).

Die unterschiedlichen Wirkungen von SP werden in den Zielzellen ausgelöst, nachdem SP in den synaptischen Spalt freigesetzt wird, zur postsynaptischen Membran diffundiert und dort an seinen Rezeptor NK1R bindet. Der NK1R ist, wie alle Tachykinin-Rezeptoren, ein G-Proteingekoppelter Rezeptor, der die Signale intrazellulär über die Untereinheiten,  $G\alpha$ ,  $G\beta$  und  $G\gamma$  vermittelt. Die Aktivierung von *second messenger*-Molekülen führt zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege in der Zelle ähnlich wie für den  $\alpha$ CGRP-Rezeptor. So kann beispielsweise die Aktivierung des NK1R die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Zellkern initiieren, was die Expression verschiedener Wachstumshormone und Interleukine, wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  und IFN $\gamma$ , induziert oder die Aktivierung des Mitogen-activated protein kinases (MAPK) Signalwegs verursacht (95). Weitere Signalwege des NK1R umfassen die Aktivierung von Erk1/2, der PKC (96) und des intrazellulären Kalziumspeichers (93,96) (Abbildung 5).



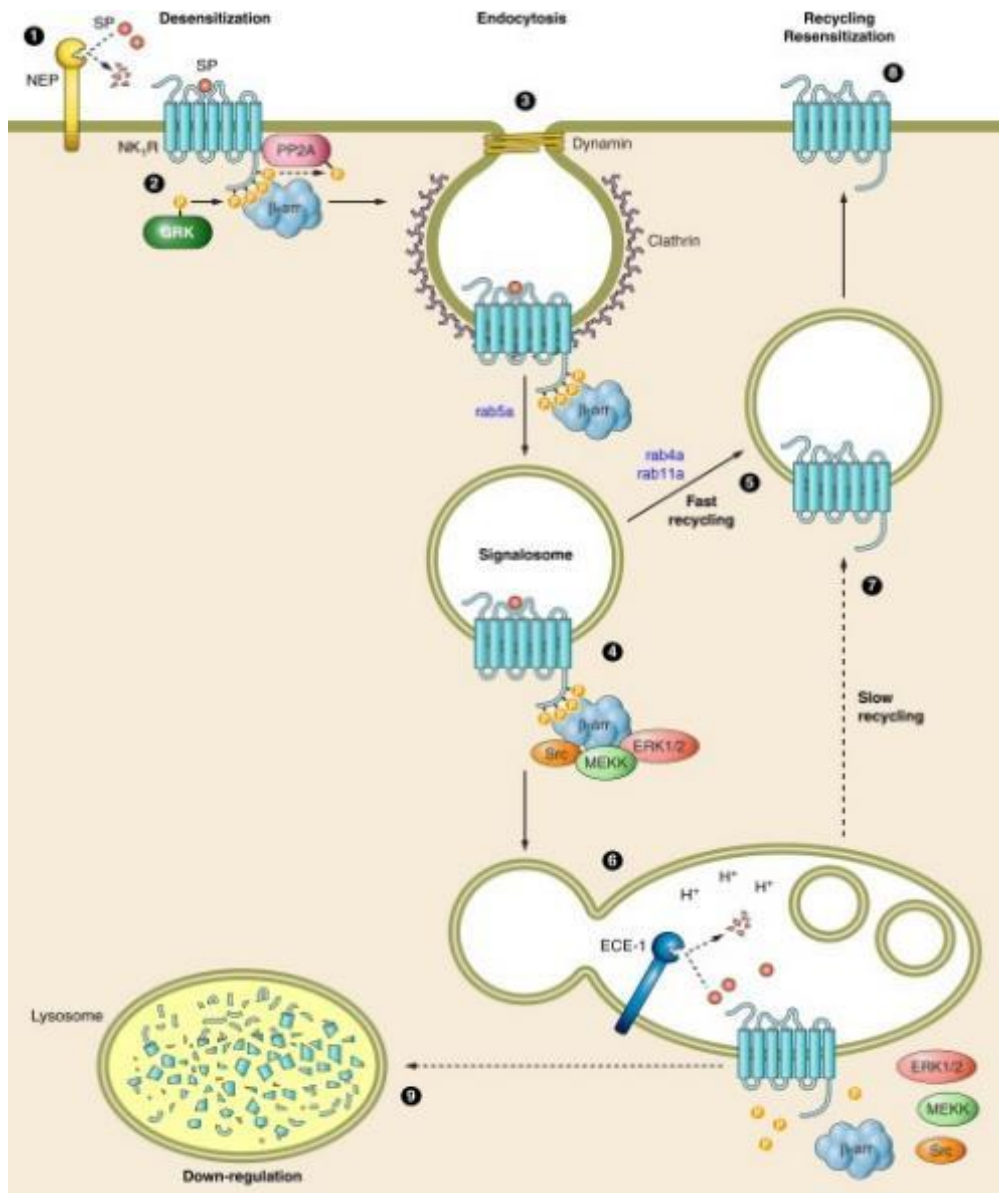
**Abbildung 5 Schematische Darstellung ausgewählter Signalwege nach Aktivierung des NK1R.**

(1) Gas aktiviert die Adenylatzyklase (AC), die ATP zu zyklischem AMP (cAMP) umwandelt, welches anschließend an die Proteinkinase A (PKA) bindet und die Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB in den Zellkern hemmt. (2) Die Aktivierung von Gai hemmt die AC und aktiviert gemeinsam mit den βγ-Untereinheiten Src, was die Transaktivierung von Tyrosinkinaserzeptoren (TKR) zur Folge hat. (3) Die Bindung von SP an den NK1R bewirkt einen Wechsel von GTP zu GDP an der Ga-Untereinheit, weshalb Gαq von Gβγ dissoziiert und verschiedene nachgeschaltete Regulatoren, wie Phospholipase C (PLC), aktiviert. PLC katalysiert die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu den second messengern Inositol-3-phosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG). IP3 bewirkt die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium (Ca<sup>2+</sup>), DAG die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC). PKC phosphoryliert weitere Proteine, wie die Proteinkinasen Raf und MAP-Kinase (MEK). Über die Proteinkinasen Src und Pyk2 kann PKC den Mitogen-activated protein kinases (MAPK) Signalweg oder Raf aktivieren, die beide über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die DNA-Synthese und Zellproliferation anstoßen. (4) Die Ga12/13-Untereinheit bewirkt die Aktivierung von Rho/Rock Kinasen, die direkt die Phosphorylierung der leichten Myosin-Ketten (myosin light chain, MLC) induzieren. Eine Phosphorylierung von MLC ist mit Zytoskelett-Restrukturierung und Zellmigration assoziiert. Die βγ-Untereinheit

*aktiviert verschiedene Proteine, wie Src, PI3K und PLC. Es existieren viele Interaktionen zwischen den Signalwegen und die exakten Reaktionsabfolgen variieren von Zelle zu Zelle.(adaptiert aus Garcia-Recio et al. (95))*

Die Inaktivierung durch Ligandenbindung und das anschließende Recycling beziehungsweise die Degradation des NK1R wurde unter anderem in postkapillären venösen Endothelzellen der Ratten-Trachea (97), enterischen Nervenzellen (98,99) und Spinalnerven (100) studiert. Die Bindung von SP an den NK1R führt zu einer Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes. Dieser wird in sauren Endosomen aufgespalten. Im Anschluss wird der Rezeptor durch Rezeptor-Recycling wieder an der Zelloberfläche präsentiert, während SP degradiert wird (98). Zur Internalisierung benötigt es neben der Bindung von SP an den NK1R außerdem zwei Proteine: G protein-coupled kinases (GRKs) und  $\beta$ -Arrestin (99). Eine Aktivierung des NK1R durch SP bewirkt die Translokation von GRKs aus dem Zytosol in die Plasmamembran, wo sie gezielt NK1R-SP Komplexe phosphorylieren (101) und  $\beta$ -Arrestin rekrutieren (102). Die GRKs binden dabei an die Serin- und Threoninbestandteile des langen C-Terminus des NK1R (102,103) (siehe Reviews (90,104)) (Abbildung 6).





**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Regulierung der Expression des NK1R durch SP**

(1) Die Peptidase Neprilysin (NEP) degradiert und inaktiviert SP in der extrazellulären Flüssigkeit und beendet dadurch die Signalübertragung am NK1R. (2) Sobald SP an den NK1R gebunden hat, kann die G protein-coupled receptor kinase (GRK) 2,3,5 an den Komplex binden und die Serin- und Threoninbestandteile des langen C-Terminus im NK1R phosphorylieren, was die Affinität für  $\beta$ -Arrestin ( $\beta$ arr) erhöht.  $\beta$ -Arrestin vermittelt das Ablösen des G-Proteins, die Internalisierung (Desensitization) des Rezeptors und die Rekrutierung von protein phosphatase 2A (PP2A). PP2A kann über Dephosphorylierung den Rezeptor schnell recyceln (Resensitization). (3)  $\beta$ -Arrestine sind Adapterproteine für Clathrin und AP2, wodurch sie die Dynamin-abhängige Endozytose von SP und NK1R ermöglichen. (4) Durch die Rekrutierung von Src, MEKK und Erk1/2 zu den Endosomen, bilden sich intrazelluläre  $\beta$ -Arrestin-vermittelte Signalosome, die trotz Internalisierung des Rezeptors weitere Signalwege aktivieren. (5) Der internalisierte NK1R kann via Rab4a und Rab11a schnell aus oberflächlich gelegenen Endosomen recycelt werden. (6) Alternativ wandert der NK1R zu perinuklear gelegenen Endosomen, welche ECE-1 enthalten. ECE-1 degradiert SP in sauren Endosomen und löst den Signalkomplex auf. (7) Auf diesem Weg wird

*der NK1R langsam recycelt. (9) Unter andauernder Stimulation mit hohen Konzentrationen von SP wird NK1R ubiquitinyliert und in Lysosomen abgebaut. (aus Steinhoff et al. (90))*

Immunhistochemische Untersuchungen von Goto et al. zeigten eine hohe Dichte des NK1R auf der Plasmamembran und im Cytoplasma von Osteoklasten, etwas weniger in Osteoblasten und Osteozyten (60). *In vitro* induzierte die Interaktion von SP und NK1R in Osteoblasten einen osteogenen Effekt, welcher zur Stimulierung der Knochenbildung führt (105,106). Und auch *in vivo* konnte eine Assoziation von SP mit der Regulation von Knochen und Knochenstruktur nach Belastung gezeigt werden (59,65,107). Nicolay et al. wiesen zum Beispiel eine Zunahme von SP-enthaltenden Axonen im Bereich des Kieferknochens nach Krafteinwirkung nach (107). Eine weitere Forschergruppe konnte in einem prä-klinischen Versuch mit Ratten zeigen, dass ein zusätzliches Blockieren des NK1R nach Denervierung der Hinterläufe der Tiere die Entstehung einer Osteoporose signifikant steigert, was einen osteoprotektiven Effekt des SP/NK1R-Systems vermuten lässt (108).

Weiterhin konnte in Mäusen, denen das Gen für SP deletiert wurde, eine reduzierte Anzahl an Osteoblasten, ein geringeres Schmerzempfinden und eine insgesamt mechanisch instabile Knochenstruktur mit reduzierter Knochenmasse und Trabekeln nachgewiesen werden (66). Es wurde außerdem gezeigt, dass durch die Bindung von SP an den NK1R Signalwege induziert werden, die dazu führen, dass die Proliferation von Stammzellen des Knochenmarks gefördert wird und die Differenzierung zu Osteoblasten und Osteoklasten unterstützt wird (109).

### **1.5.3.1 Isoformen des NK1R**

Der NK1R existiert in zwei Isoformen mit unterschiedlicher Affinität zu SP: Die Volllänge-Variante des Rezeptors (NK1R-F) hat 407 Aminosäuren und eine circa 10-fach höhere Affinität im Vergleich zu der verkürzten Variante (NK1R-T), die aus 311 Aminosäuren besteht. Die unterschiedliche Länge betrifft den C-Terminus des Rezeptors (96,110,111) (Abbildung 8). Der NK1R-F ist demnach um 96 Aminosäuren länger als der NK1R-T. Beide NK1R Formen werden zu unterschiedlichen Anteilen sowohl im ZNS (112,113), als auch in peripheren Geweben exprimiert (113), wobei eine vermehrte Expression von NK1R-T unter pathologischen Bedingungen beobachtet werden kann (114–117). Neben der unterschiedlichen Aminosäureanzahl, Affinität zu SP und Verteilung im Gewebe, unterscheiden sich die Rezeptorisoformen auch in ihrer Funktion: Der NK1R-F wird von GRKs und PKC, wie im vorausgegangenen Abschnitt ausführlicher beschrieben, an den Serin- und

Threoninbestandteilen des dritten intrazellulären Loops und des Carboxylrests phosphoryliert. Die Kinasen interagieren außerdem mit  $\beta$ -Arrestin, was die Internalisierung, Endozytose und das endosomale Signaling des NK1R-F bewirkt (118). Dem NK1R-T fehlt ein Großteil des Carboxylendes, weshalb er nicht phosphoryliert wird und auch nicht mit  $\beta$ -Arrestin interagiert. Der NK1R-T kann daher weder internalisiert werden (103,119) noch über Signalosomen, die von  $\beta$ -Arrestin rekrutiert werden, kommunizieren (119). Die Bindung von SP an den verkürzten Rezeptor induziert keine Expression von NF- $\kappa$ B und erst bei Stimulation mit sehr hohen SP-Konzentrationen erfolgt eine Freisetzung von Kalziumionen. NK1R-T reduziert außerdem die Phosphorylierung der PKC und die Sekretion von IL-8 (90,96,104). Unklar ist zum aktuellen Zeitpunkt noch durch welchen Mechanismus der NK1R-T Signale aufnimmt und weitergibt.

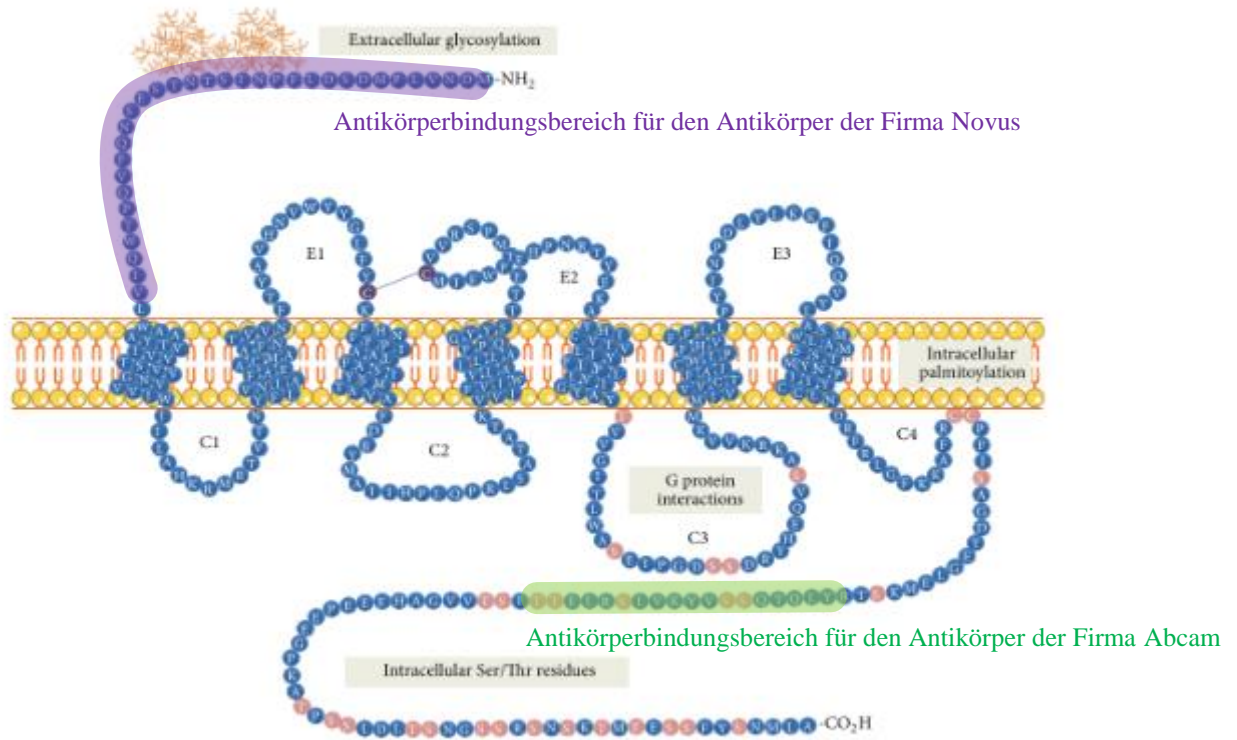
Beiden NK1R-Formen gemeinsam ist die Eigenschaft, im Bereich des N-Terminus, an den Stellen 14 und 18 der Aminosäuresequenz, glykosyliert werden. Eine Glykosylierung an beiden Stellen bewirkt eine höhere Bindungsaffinität des NK1R für SP und eine langsamere Internalisierung des Rezeptors verglichen mit NK1R, die nicht glykosyliert sind. Im Hinblick auf die Aktivierung von Signalwegen nach dem Binden von SP an glykosylierte oder nicht-glykosylierte NK1R konnte kein Unterschied festgestellt werden (120). Die Glykosylierung bewirkt eine Erhöhung des Molekulargewichts (MW) des Rezeptors, ein unterschiedliches Ausmaß der Glykosylierung kann ein unterschiedlich hohes MW bewirken. Diese Tatsache erklärt möglicherweise, neben der unterschiedlichen Aminosäurenlänge der Rezeptorformen des NK1R, zum Teil, weshalb für den NK1R verschiedene MWs gemessen werden können (38kD und 46kD in Brustkrebszellen (121), 31kD und 58kD in Lymphozyten (122), 75kD in T-Zellen (123)).

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel zu untersuchen, ob und in welchem Verhältnis die Rezeptorformen des NK1R, NK1R-F und NK1R-T, von MLO-Y4-Zellen unter bestimmten Bedingungen exprimiert werden. Dazu wurden Primer und Antikörper eingesetzt, die an verschiedenen Regionen des Genabschnitts, beziehungsweise Aminosäuren der Rezeptoren binden können. Im Falle der Antikörper wurde ein Antikörper der Firma Novus genutzt, der am N-Terminus zwischen den Aminosäuren 1 – 50 bindet, ein Bereich, den beide Rezeptorformen identisch besitzen. Ein anderer Antikörper der Firma Abcam erkennt Aminosäuren ab der 350sten Stelle im C-Terminus, den nur der NK1R-F besitzt. Durch die Verwendung beider Antikörper können entweder beide Isoformen (in der vorliegenden Arbeit daher als NK1R-T/F bezeichnet) oder nur die Volllänge-Variante NK1R-F des NK1R nachgewiesen werden. Der Nachweis der verkürzten Variante NK1R-T gelingt nur indirekt, indem eine Differenz gebildet

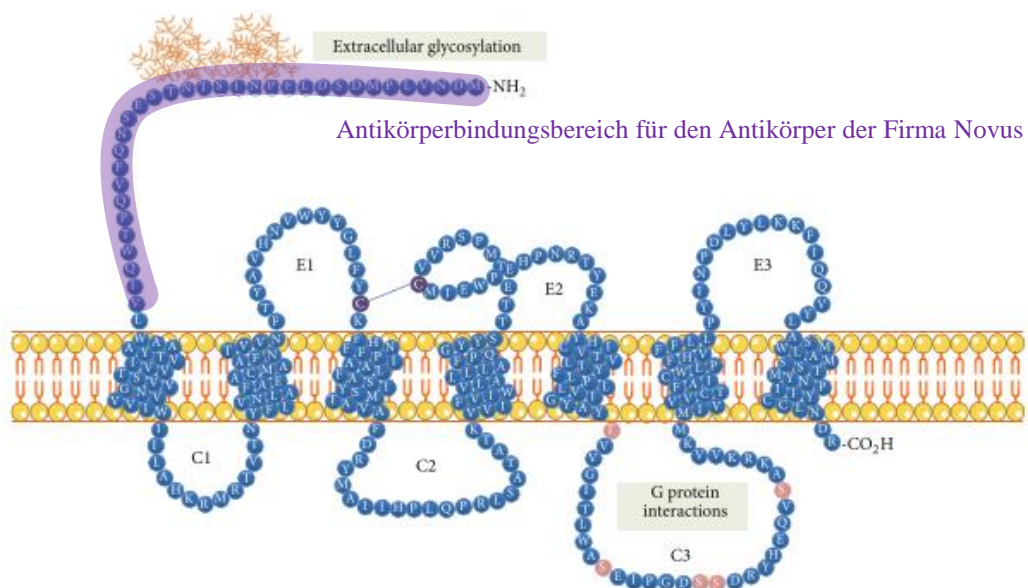
wird aus dem Nachweis des NK1R-T/F und dem NK1R-F. Die Bindungsstellen der Antikörper sind in nachfolgende Abbildung schematisch eingezeichnet (Abbildung 7).

Eine Gegenüberstellung der Eigenschaften beider Rezeptorisoformen zeigt Tabelle 1.

**a) Volllänge-Variante des NK1R (NK1R-F)**



**b) Verkürzte Variante des NK1R (NK1R-T)**



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der zwei Isoformen des NK1R, sowie der unterschiedlichen Antikörperbindungsgebiete.**

Beide Isoformen besitzen sieben Transmembrandomänen, drei extrazelluläre Loops (E1-3) und drei intrazelluläre Loops (C1-3). Beide Rezeptorisoformen können an den beiden Asparaginaminosäuren an Stelle 14 und 18 glykosyliert werden. Der Aminoterminal befindet sich extrazellulär. Die Isoformen haben ein unterschiedlich langes intrazelluläres Carboxylende, wodurch sich NK1R-F (a) und NK1R-T (b) unterscheiden. Dabei kann beim NK1R-F ein vierter intrazellulärer Loop (C4) durch Palmitoylierung von Cystein entstehen. Der lange intrazelluläre C-Terminus des NK1R-F beinhaltet Serine (Ser) und Threonine (Thr), die für die Internalisierung des Rezeptors notwendig sind. Die Antikörper der Firma Novus binden an Aminosäuren des Anfangsbereichs, der in beiden Rezeptorvarianten identisch vorhanden ist (violett schattierte Bereiche). Der Antikörper der Firma Abcam bindet an Aminosäuren im C-Terminus des NK1R-F und ist folglich auch nur hier nachweisbar (grün schattierter Bereich). (adaptiert aus Garcia-Recio et al. (95))

**Tabelle 1: Ausgewählte Eigenschaften der beiden Isoformen des NK1R im Vergleich:**

<b>Charakteristik</b>	<b>NK1R-F</b>	<b>NK1R-T</b>
Aminosäureanzahl	407	311
Affinität für SP	1	1/10*
Molekulargewicht (berechnet)	46kD	34kD
Internalisierung des Rezeptors	Ja	Nein
Interaktion mit $\beta$ -Arrestin	Ja	Nein
Kalziumfreisetzung	Ja	Gering
Phosphorylierung von PKC	Erhöht	Erniedrigt
Aktivierung von NF- $\kappa$ B	Ja	Nein
Sekretion von IL-8	Erhöht	Erniedrigt

\*bezogen auf die Bindungsaffinität von NK1R-F

## 2 Ziel der Arbeit

Es ist bekannt, dass eine Änderung in der Knochenbelastung eine Umstrukturierung des Knochens, im Sinne einer reaktiven Knochenneubildung oder eines Knochenumbaus mit Trabekelneuausrichtung zur Folge hat (4–6). Die mechanische Beanspruchung von Knochen bewirkt bewiesenermaßen eine Flussänderung im LCS, was dazu führt, dass Shear Stress auf die umspülten Osteozytenzellkörper und -dendriten einwirkt (6) (siehe Review (124)). Dies wird von den Osteozyten wahrgenommen und folgendermaßen prozessiert: Die Freisetzung katabol wirkender Moleküle wird reduziert und die Sekretion anaboler Mediatoren wird verstärkt (27). Nach wie vor unklar ist jedoch der Mechanismus über den die Osteozyten eine mechanische Belastung initial wahrnehmen, dazu wird eine Vielzahl an Möglichkeiten diskutiert (27,43).

Im vorliegenden Projekt wird die Rolle des NK1R in der Mechanorezeption und -transduktion nach FFSS-Belastung in der murinen Osteozyten-Zelllinie MLO-Y4 untersucht. Als Grundlage dienen Studien, die gezeigt haben, dass der NK1R sowohl in Chondrozyten als auch in Tenozyten als Mechanorezeptor fungiert und unter anderem die endogene Produktion von SP und die Zellproliferation beeinflussen kann (125,126). Außerdem ist bekannt, dass Osteozyten den NK1R exprimieren und es gibt Hinweise, dass er bei der Regulation der Knochenstruktur nach Belastung involviert ist (3,7). Dem sensiblen Neuropeptid  $\alpha$ CGRP und seinem Rezeptorkomplex CRLR/Ramp1 konnten ähnliche mechanoresponsive Eigenschaften in murinen Makrophagen nach Dehnungsstress nachgewiesen werden (65).

Um die Frage nach der Rolle des NK1R und des CRLR/Ramp1 in der Mechanorezeption und -transduktion in Osteozyten nach FFSS-Belastung beantworten zu können, musste zunächst ein geeigneter Versuchsaufbau etabliert werden, der es ermöglichte, MLO-Y4-Osteozyten unterschiedlichen FFSS-Belastungen auszusetzen. Anschließend wurden folgende Fragestellungen an den belasteten MLO-Y4-Osteozyten untersucht:

- 1) Wie beeinflussen unterschiedliche FFSS-Stärken die Genexpression der sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP sowie die ihrer Rezeptoren NK1R und CRLR/Ramp1?
- 2) Zeigen sich Unterschiede in der Genexpression der Isoformen des NK1R bei unterschiedlichen FFSS-Stärken?
- 3) Wie wirken sich unterschiedliche FFSS-Stärken auf die Genexpression verschiedener Modulatoren des Knochenremodelings in murinen Osteozyten aus?

Bei jeder Fragestellung in dieser Arbeit wurde der NK1R differenziert nach seinen Isoformen, also als NK1R-T und NK1R-F betrachtet, um zu untersuchen ob das vermehrte Auftreten einer der Rezeptorvarianten mit bestimmten Belastungszuständen assoziiert ist. Um die Unterschiede in der Expression noch deutlicher beurteilen zu können wurde in einem zweiten Schritt in MLO-Y4-Zellen jeweils eine der Rezeptorvarianten mit Hilfe eines lentiviralen Systems eingebracht. Dabei sollten Zellklone der MLO-Y4-Osteozyten etabliert werden, die jeweils eine der beiden Isoformen des NK1R überexprimieren. In künftigen Experimenten der AG Grässel können die überexprimierenden Zellen verschiedenen FFSS Belastungen ausgesetzt werden und die dabei gemessenen Daten mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten für die unveränderten MLO-Y4-Zellen verglichen werden. Möglicherweise zeigen die überexprimierenden Zellen deutliche Unterschiede in Reaktion auf diverse FFSS Belastung. Darüber hinaus können die Zellen eingesetzt werden um Effekte, die in Osteozyten über das NK1R/SP-System vermittelt werden, nach dem involvierten NK1R-Subtyp zu differenzieren.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Name	Firma, Ort
2100 Bioanalyzer Instrument	Agilent Technologies Incorporated (Inc.), Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika (USA)
Agagel Standard (Gelelektrophorese)	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland (D)
Analog Vortex Mixer (Vortexer)	VWR International, Radnor, USA
Analysenwaage 770-60	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, D
Camera Controller Digital Sight DS-U1	Nikon Corporation, Tokyo, Japan (J)
Cedex XS Cell Analyser	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz (CH)
Corning® 96 Well (#CLS3596)	Corning Inc., Corning, USA
Corning® 96 Well Black (#CLS3904)	Corning Inc., Corning, USA
Corning® Cell Culture Flask 175cm <sup>2</sup> (#CLS431080)	Corning Inc., Corning, USA
Corning® Cell Culture Flask 25cm <sup>2</sup> (#CLS430639)	Corning Inc., Corning, USA
Corning® Cell Culture Flask 75cm <sup>2</sup> (#CLS430641)	Corning Inc., Corning, USA
Corning® Centrifuge Tube PP 15ml (#CLS430791)	Corning Inc., Corning, USA
Corning® Centrifuge Tube PP 50ml (#CLS430829)	Corning Inc., Corning, USA
Corning® Stripettor™ Ultra Pipet Controller	Corning Inc., Corning, USA
Costar® 6 Well ( #CLS3516)	Corning Inc., Corning, USA
Costar® Stripette Serological Pipets 2ml (#CLS4486)	Corning Inc., Corning, USA
Costar® Stripette Serological Pipets 5ml (#CLS4487)	Corning Inc., Corning, USA
Costar® Stripette Serological Pipets 10ml (#CLS4488)	Corning Inc., Corning, USA
Costar® Stripette Serological Pipets 25ml (#CLS4489)	Corning Inc., Corning, USA



Costar® Stripette Serological Pipets 50ml (#CLS4490)	Corning Inc., Corning, USA
Duomax 1030 (Plattformschüttler)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Eclipse TE 2000-U (Mikroskop)	Nikon Corporation, Tokyo, J
Eppendorf Safe-Lock Tubes (diverse Größen)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr AG, Biberach an der Riß, D
Gefrierschrank -80 °C	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
Heraeus HERAcell® (CO <sub>2</sub> -Inkubator)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Heizplatte	Störk-Tronic, Stuttgart, D
HERAsafe® (Sicherheitswerkbank)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Hirschmann pipetus (Pipettierhilfe)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
Intas Gel Jet Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D
Kühlschrank 2-8 °C	Liebherr AG, Biberach an der Riß, D
Luer Plug Male (#10822)	ibidi GmbH, Gräfelfing, D
Luer-Schlauchverbinder ROTILABO® für Luer Lock weiblich (LLW) / Schlauch Ø innen 1,6mm (#CT58.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Luer-Schlauchverbinder ROTILABO® für Luer Lock männlich (LLM) / Schlauch Ø innen 1,6mm (#CT62.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Luer-Schlauchverbinder ROTILABO® für: LLW / Schlauch Ø innen 3,2mm (#CT60.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Luer-Schlauchverbinder ROTILABO® für LLM / Schlauch Ø innen 3,2mm (#CT64.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Luer-Stopfen ROTILABO® für LLW (#CT71.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Microplate Reader GENios F129004	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Mikrowelle 8022L	Privileg, Stuttgart, D
Mini-PROTEAN® Combs (#165336)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Mini-PROTEAN® Short Plates (#1653308)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA

Mini-PROTEAN® Spacer Plates (#1653312)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (#1658004)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA
MiniSpin (Tischzentrifuge)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Minizentrifuge Sprout	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Mx3005P qPCR System	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
peqTWIST (Vortexer)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
PerfectSpin 24 Plus (Zentrifuge)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Petrischale 94/16 MM (#632181)	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, A
pH-Meter pH211	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
qPCR Adhesive Seals (#4ti-0560)	4titude Limited, Wotton, Vereinigtes Königreich (UK)
qPCR-96-Well-Platten	4titude Limited, Wotton, Vereinigtes Königreich (UK)
Research (diverse Größen) (Pipetten)	Eppendorf AG, Hamburg, D
ROTANTA/P Zentrifuge Typ 3502	Hettich AG, Bäch, CH
Schlauchpumpe IP-N 24 ISM949	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, D
Schlauch, TYGON® S3™ E-3603 (#YL81.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Schlauch, TYGON® S3™ E-3603 (#YL83.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Schlauchverbinder ROTILABO® Mini gerade Form, für: Schlauch Ø innen 1,6mm (#CT33.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Schlauchverbinder ROTILABO® Mini gerade Form, für: Schlauch Ø innen 3,2mm (#CT35.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Sonoplus Ultraschall-Homogenisator HD 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D
Spektralphotometer NanoDrop ND-2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Standard Power Pack P25 (Netzteil)	Biometra GmbH, Göttingen, D
Systec V-95 (Autoklav)	Systec GmbH, Wettengel, D
T3000 Thermocycler T Gradient	Biometra GmbH, Göttingen, D
Thermomixer comfort (Heizblock)	Eppendorf AG, Hamburg, D

Wasserbad 1086	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
μ-Slide VI 0.1 (#80666)	ibidi GmbH, Gräfelfing, D
μ-Slide VI 0.4 (#80606)	ibidi GmbH, Gräfelfing, D
μ-Slide VI - Flat (#80626)	ibidi GmbH, Gräfelfing, D

### 3.1.2 Chemikalien

Name	Firma, Ort
Aceton (#9372.4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ammoniumpersulfat (#133375)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Biozym LE Agarose (#840004)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Bromphenolblaulösung (#B3269)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Buffer RLT Plus (#1053393)	Qiagen, Germantown, USA
Corning® Collagen I Rat Tail Natural 100mg (#354236)	Corning Inc., Corning, USA
Dithiothreitol (DTT) (#A1101)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
DNA Ladder 50 bp (#N3236)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
DNA Ladder 1kb (#SM0311)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
DNA Loading Dye & SDS Solution (6X) (#R1151)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Essigsäure (#6755.2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 100% (#32205)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (#X986.2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Gel Loading Dye, Purple (6X) (#B7025)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
Glycin (#7530.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
lysogen broth (LB)-Medium (Lennox) vegetal (#0155.2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl) (#3957.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Precision Plus Protein Dual Color Standards (#1610374)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Propanol 70% (#3889017)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

Protein Loading Buffer (5x) (#900216)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Methanol	Chemikalienausgabe Universität Regensburg, D
Mucosal® Flüssigkonzentrat (Universalreiniger) (#44005)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Natriumdodecylsulfat (SDS) ultra pure (#2326)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (#7024)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ROTIPHORESE®Gel 30% (Wässrige Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5: 1) (#3029.1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Puffer) (#5429.2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tris/HCl (pH 6,8) (#T3263)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin/EDTA (10x) (#T4174)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween20 (#P1379)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

### 3.1.3 Zellkulturmedien, Zusätze und Puffer

Name	Firma, Ort
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP) (#M0290)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
BamHI-HF(Restriktionsenzym) (#R3136)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
Blasticidin (#R210-01)	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA
Bovine Calf Serum (BCS) (#12133C)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CutSmart® Buffer (10x) (#B7204)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
Dimethyl sulfoxide (DMSO) (#A994.2)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), high glucose (#41965-039)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
D-MEM, high glucose, pyruvate, no glutamine (#21969035)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), low glucose (#31885-023)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM)/Nutrient Mixture F-12 Ham (#D8437)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (#D8537)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetal Bovine Serum (FBS) (#F7524)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Geneticin, 1:100 in Medium (G-418) (#04727894001)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
GlutaMAX™-I (100x) Supplement (#35050-038)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Lipofectamine™ 2000 (#11668-027)	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA
Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (#M8042)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MEM Non-Essential Amino Acids (NEAA) (50x) (#11130051)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Opti-MEM™ Reduced Serum Medium (#31985062)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin-Streptomycin (#4333)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polybrene Infection/Transfection Reagent (#TR-1003)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sodium Pyruvate Solution (#S8636)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
T4DNA Ligase (#M0202)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
XhoI (Restriktionsenzym) (#R0146)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D

### 3.1.4 Pufferliste

Name	Zusammensetzung
Laufpuffer (pH 8,3)	14,4g Glycin
	3,03g Tris
	1g SDS
	mit Aqua dest. aufgefüllt zu 1l
SDS-Ladepuffer, 5fach konzentriert	3,0ml Tris/HCl (pH 6,8)
	5ml Glycin
	1g SDS

	760mg Dithiothreitol (DTT)
	10µl 5% Bromphenolblaulösung
	mit Aqua dest. aufgefüllt zu 10ml
Transferpuffer nach Towbin (pH 8,3)	14,4g Glycin
	3,0g Tris
	100ml Methanol
	mit Aqua dest. aufgefüllt zu 1l
Tris-buffered saline with Tween20 (T-TBS) (pH 7,6)	2,42g Tris
	8,00g NaCl
	1ml Tween20
	mit Aqua dest. aufgefüllt zu 1l

### 3.1.5 Bakterienstämme und Vektoren

Name	Firma, Ort
E. coli K12 DH10B™ T1R (Bakterien)	GeneArt Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
NK1R-F (1236 bp) in pMA-RQ (AmpR)	GeneArt Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
NK1R-T (948 bp) in pMA-RQ (AmpR)	GeneArt Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
One Shot® Stbl3™ Chemically Competent E. coli (Bakterien) (#C737303)	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA
pLenti6/V5-D-TOPO (Überexpressionsvektor)	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA
pLenti6/V5-GW/LacZ	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA

### 3.1.6 Zelllinien

Name	Firma, Ort
293FT	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
MLO-Y4	Kerafast, Boston, USA
NIH 3T3	ATCC, Manassas, USA
RAW 264.7	ATCC, Manassas, USA

### 3.1.7 Kits

<b>Name</b>	<b>Firma, Ort</b>
AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (#600559)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
BCA Protein Assay Kit (#23255)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Bioanalyzer RNA 6000 Nano Assay (#5067-1511)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (#600828)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
MinElute PCR Purification Kit (#28004)	Qiagen, Germantown, USA
Pierce ECL Western Blotting Substrate (#32106)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pierce™ Fast Western Blot Kits, SuperSignal™ West Femto, Rabbit (#35081)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
QIAGEN Plasmid Purification Kit (#12125)	Qiagen Germantown, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit (#27104)	Qiagen Germantown, USA
QIAquick Gel Extraction Kit (#28704)	Qiagen Germantown, USA
Re-Blot Mild Plus (#2502)	Merck KGaA, Darmstadt, D
RNeasy Plus Micro Kit (#74034)	Qiagen Germantown, USA
ViraPower™ Lentiviral Expression System (#K495510)	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA

### 3.1.8 Software

<b>Name</b>	<b>Firma, Ort</b>
2100 Expert Software (Bioanalyzer Software)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Adobe® Photoshop® CS4 Extended	Adobe Systems Inc., San José, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MxPro – Mx3005P (qPCR Programm)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA

### 3.1.9 Primerliste

In der Arbeit verwendete Primer wurden mit Hilfe der Genomdatenbanken von OMIM ([www.omim.org](http://www.omim.org)) und NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide)) für bestimmte Zielsequenzen (Gene of interest) gesucht und unter Zuhilfenahme der Design-tools von NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)) und Roche ([www.lifescience.roche.com/en\\_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center](http://www.lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center)) erstellt. Die spezifischen Primer wurden anschließend bei der Firma Microsynth (Microsynth AG, Balgach, Schweiz) bestellt.

Gen-Name	Funktion	Primersequenz [5'→3']	Amplicon-größe [bp]
<b>Neuropeptide und Rezeptoren</b>			
<i>NK1R</i>	Rezeptor für Substanz P (Primer erkennt beide Rezeptorvarianten)	Fw: ATT GAG TGG CCA GAA CAT CC Rv: ACT GGC CCA CAG TGT AAT CC	135
<i>NK1R-F</i>	Rezeptor für Substanz P (Primer erkennt nur Volllänge)	Fw: GTT CCG TCT GGG CTT CAA Rv: TTC CAG CCC CTC ATA ATC AC	72
<i>CRLR</i>	Untereinheit des CGRP-Rezeptors	Fw: GCC AAT AAC CAG GCC TTA GTG Rv: GCC CAT CAG GTA GAG ATG GAT	77
<i>Ramp1</i>	Untereinheit des CGRP-Rezeptors	Fw: CCT GAC TAT GGG ACT CTC ATC C Rv: CGT GCT TGG TGC AGT AAG TG	138
<i>SP</i>	Sensibles Neuropeptid	Fw: GAT GAA GGA GCT GTC CAA GC Rv: GCA CAG GAG TCT CTG CTT CC	102
<i>αCGRP</i>	Sensibles Neuropeptid	Fw: TGC AGG ACT ATA TGC AGA TGA AA Rv: GGA TCT CTT CTG AGC AGT GAC A	91
<b>Osteoklasten-Differenzierungsfaktoren</b>			
<i>M-CSF</i>	Monozytendifferenzierungsfaktor	Fw: CGA GAC CCT CAG ACA TTG GA Rv: TGT GTG CCC AGC ATA GAA TC	117
<i>RANKL</i>	Hauptdifferenzierungsfaktor or für Osteoklasten	Fw: TGG AAG GCT CAT GGT TGG AT Rv: AGC AAA TGT TGG CGT ACA GG	224
<i>OPG</i>	Löslicher Rezeptor für RANKL	Fw: CGA GTG TGT GAG TGT GAG GAA Rv: TGT TTC GCT CTG GGG TTC	111
<b>Osteoblasteninhibitoren</b>			
<i>Dkk1</i>	Wnt5a/β-catenin-Signalweg-Inhibitor (inhibiert Zelldifferenzierung)	Fw: GTA ATG ACC ACA ACG CCG C Rv: ACG GAG CCT TCT TGT CCT TTG	94



<i>SOST</i>	Wnt5a/ $\beta$ -catenin-Signalweg-Inhibitor (inhibiert Zelldifferenzierung)	Fw: TGA CGC CAA AGA TGT GTC CG Rv: GAG CAC ACC AAC TCG GTG AC	108
<b>Endogene Kontrolle</b>			
<i>GAPDH</i>	endogene Kontrolle	Fw: AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG Rv: ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA	223

*Neurokinin1-Rezeptor (NK1R), Volllänge-Variante des Neurokinin1-Rezeptors (NK1R-F), Calcitonin receptor-like receptor (CRLR), Receptor activity-modifying protein 1 (Ramp1), Substanz P (SP), alpha-Calcitonin gene-related peptide ( $\alpha$ CGRP), Macrophage-colony-stimulating factor (MCSF), Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B Ligand (Rankl), Osteoprotegerin (OPG), Dickkopf-related protein1 (Dkk1), Sclerostin (SOST), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).*

### 3.1.10 Antikörperliste

Antigen	Host	Klonalität	Verdünnung	Molekulargewicht (MW) Antigen	Hersteller
<b>primäre Antikörper</b>					
<i>NK1R-F</i>	Kaninchen	monoklonal	1 : 20000	46 kD	Abcam (#ab183713)
<i>NK1R-T/F</i>	Kaninchen	polyklonal	1 : 500	36 kD (NK1R-T) 46 kD (NK1R-F)	Novus (#NB300-119SS)
<i>GAPDH</i>	Kaninchen	monoklonal	1 : 5000	37 kD	Abcam (#ab181602)
<b>sekundärer Antikörper</b>					
Esel Anti-Kaninchen Fc Meerrettichperoxidase-gekoppelt	Esel	polyklonal	1 : 10000		Jackson Immuno Research (#711-036-152)

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur**

#### **3.2.1.1 Murine Osteozyten-Zelllinie MLO-Y4**

Sowohl für die FFSS-Versuche, als auch zur Generierung von Zellklonen, die die NK1R-Isoformen überexprimieren, wurden MLO-Y4-Zellen, eine murine Osteozytenzelllinie hergestellt von Prof. Lynda Bonewald (127), verwendet.

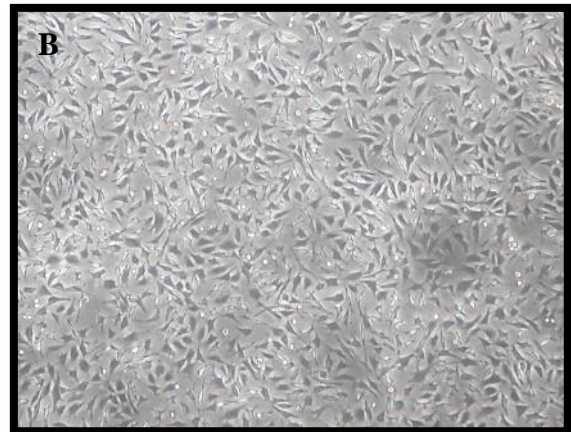
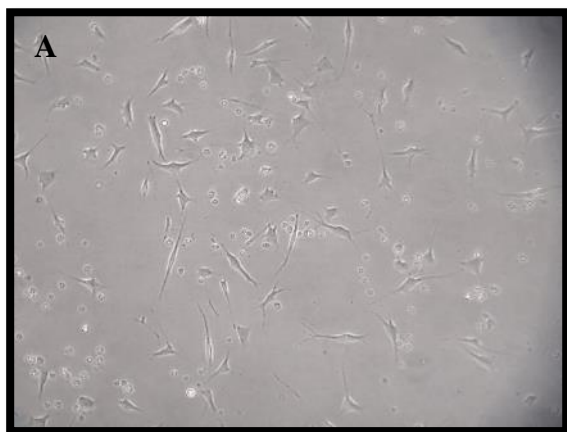
Die Zellen wurden nach Herstellerangaben kultiviert. Zellkulturflaschen und -platten wurden mit Kollagen Typ 1 in einer Endkonzentration von 0,15 mM beschichtet. Dazu wurde die zu beschichtende Oberfläche mit der Kollagenlösung (5ml für 75cm<sup>2</sup> Flasche) für 60 min bei Raumtemperatur unter sterilen Bedingungen inkubiert. Danach wurde der Kollagenüberstand abgenommen, die beschichtete Oberfläche zweimal mit PBS gewaschen und die Flaschen anschließend für die Zellaussaat verwendet. Wenn die beschichteten Flaschen nicht sofort genutzt wurden, wurden sie steril luftgetrocknet und bei 4°C bis zu einem Monat für spätere Zellaussaaten aufbewahrt. Initial wurden die Zellen in Medium mit höherer FBS-Konzentration (5%) ausgesät, um das Zellwachstum zu fördern. Am Folgetag fand ein Medienwechsel zum regulär verwendeten Nährmedium, mit niedrigerer FBS-Konzentration (2,5%) statt (Zusammensetzung der Medien siehe Auflistung nach diesem Absatz). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und alle drei bis vier Tage wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Zur Subkultivierung der Zellen wurde das Nährmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen, EDTA (1x) zur Zellablösung zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. EDTA wirkt dabei als Kalzium-Chelator und löst vor allem Zell-Zell-Verbindungen, während Trypsin, eine alkalische Pankreasprotease, die Zell-Matrix-Verbindungen andaut und sie vom Substrat löst („Detachment“), was durch Schwenken und sanftes Klopfen der Flaschen verstärkt wurde. Durch Zugabe von Nährmedium wurde die Wirkung des Trypsin/EDTA-Gemischs schließlich abgestoppt. Die Flüssigkeit wurde in ein Falcon überführt, bei 129x g für 5 min zentrifugiert, der Zellüberstand wurde verworfen und das zurückgebliebene Pellet in Nährmedium suspendiert. Mittels Cedex XS Cell Analyser wurde die Zellzahl in 10µl Medium gemessen und die gewünschte Zellzahl für die Neuaussaat errechnet. Bei einer Zellaussaat von etwa 2 x10<sup>6</sup> MLO-Y4-Osteozyten in eine 75cm<sup>2</sup> Flasche wurde die Zielkonfluenz von 60% bis 75% innerhalb von fünf Tagen erreicht.

MLO-Y4-Auftaumedium:

- MEM #M8042
- 5% FBS
- 2,5% BCS
- 1% Penicillin-Streptomycin
- 1% GlutaMAX

MLO-Y4-Nährmedium:

- MEM #M8042
- 2,5% FBS
- 2,5% BCS
- 1% Penicillin-Streptomycin
- 1% GlutaMAX



**Abbildung 8: Fotos von MLO-Y4-Osteozyten .**

(A) 1 Tag nach Aussaat, Vergrößerung 10fach; (B) 75% Konfluenz, Vergrößerung 4fach

### 3.2.1.2 293FT-Zellen

Die 293FT-Zelllinie wurde im Rahmen des Versuchs, in MLO-Y4-Zellen die NK1R-Isoformen über zu exprimieren, verwendet. Mit der 293FT-Zelllinie können große Mengen Viruspartikel produziert werden, die zur anschließenden Transduktion der Zielzellen (MLO-Y4) verwendet werden. Bei der Zelllinie handelt es sich um humane, embryonalen Nierenzellen, transduziert mit dem SV40 large T-Antigen, welches die Expression großer Proteinmengen aus Vektoren mit dem SV40-Ursprung ermöglicht (128).

#### 293FT-Nährmedium:

- DMEM, high glucose #41965-039
- 10% FCS
- 1% MEM NEAA
- 1% MEM Sodium Pyruvate
- 1% Penicillin-Streptomycin
- 1% GlutaMAX

Dem Medium wurde zusätzlich das Antibiotikum G-418 zugegeben (Endkonzentration 1%) gegen welches die 293FT-Zellen ein Resistenzgen besitzen. Die Zellen wurden dreimal passagiert bevor sie für die Transfektionsversuche genutzt wurden.

#### **3.2.1.3 NIH 3T3-Zellen**

Die NIH 3T3-Zelllinie stammt aus embryonalen Mausfibroblasten, die 1962 an der New York University School of Medicine isoliert wurden (129). Die Zellen wurden ebenfalls im Rahmen des Versuchs, in MLO-Y4-Zellen die NK1R-Isoformen über zu exprimieren, verwendet. NIH 3T3-Zellen eignen sich sehr gut für DNA-Transfektionsstudien und zur Virus-Transduktion (130), weshalb sie in dieser Dissertation zur Bestimmung der transduction units (TU) des neu generierten Virus genutzt wurden.

#### NIH 3T3-Nährmedium:

- D-MEM, high glucose, pyruvate, no glutamine #21969035
- 10% FCS
- 1% Penicillin-Streptomycin

#### **3.2.1.4 RAW 264.7-Zellen**

Bei RAW 264.7-Zellen handelt es sich um eine murine Makrophagen-Zelllinie, die in der AG Grassel bereits in einem anderen Projekt zum Thema „Sensory Neuropeptides and their Receptors Participate in Mechano-Regulation of Murine Macrophages“ (65), verwendet wurden. Im Rahmen dieses Projekts wurde die Expression des NK1R in den RAW 264.7-Zellen auf Proteinebene mittels Western Blot nachgewiesen (ebd.). Im vorliegenden Projekt wurden sie daher als Positivkontrollzellen im Rahmen der Überprüfung der Transduktion der NK1R-

Rezeptorformen in die MLO-Y4-Osteozyten, die auf Proteinebene durch Western Blot Verfahren durchgeführt wurde, genutzt. Es wurden bereits vorbereitete, gefrorene Zellpellets aus dem vorherigen Projekt für die Proteinisolation und den Proteinnachweis über SDS-PAGE sowie für den Western Blot verwendet.

### **3.2.2 Die Auswirkungen von Fluid Flow Shear Stress auf bestimmte Gene of interests in der murinen Osteozyten-Zelllinie MLO-Y4**

Die Flüssigkeit in den Hohlräumen des Knochens ist in ständiger Bewegung und bewirkt bei Flussänderungen (Stärke und Richtung) mechanische Scherkräfte auf die umspülten Knochenzellen (siehe Einleitung Abschnitt 1.3). In unserem Versuchsaufbau wurden Drücke unterschiedlicher Stärke auf Osteozyten der Zelllinie MLO-Y4 ausgeübt, um ein Spektrum über die gängigsten Annahmen zu den physiologischen Druckverhältnissen im Knochen abzubilden. Wir orientierten uns dabei an Angaben aus verschiedenen Publikationen (Tabelle 2). Die verwendeten FFSS entsprachen: 1 dyn/cm<sup>2</sup>, 10 dyn/cm<sup>2</sup> und 20 dyn/cm<sup>2</sup>. Nach der Belastung wurden die MLO-Y4-Osteozyten hinsichtlich der Expression bestimmter Genes of interests analysiert, um den Einfluss von FFSS zu untersuchen.

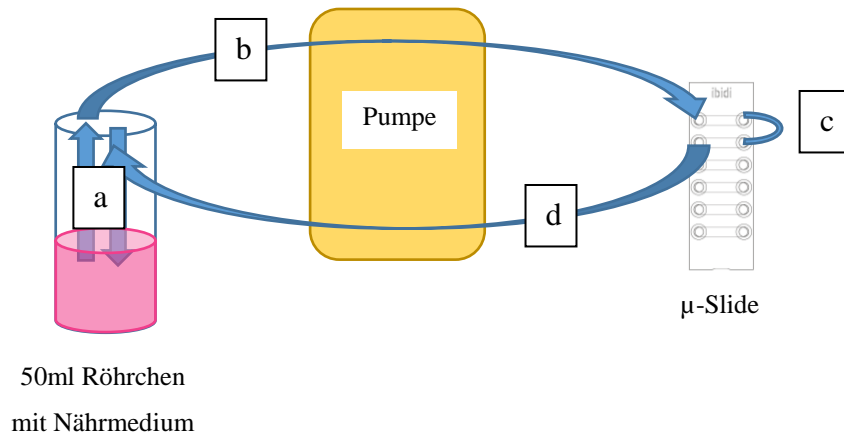
**Tabelle 2: Literaturangaben zu Druckstärken im Rahmen von Fluid Flow Shear Stress Versuchen**

<b>Publikation</b>	<b>Jahr</b>	<b>Fluid Flow Shear Stress (Spitzendruck)</b>
Lu et al. (33)	2012	20 dyn/cm <sup>2</sup>
Bonewald et al. (7)	2008	Konstante Flussrate: 0,5 bis 2 dyn/cm <sup>2</sup> ; Alternierende Komponente: 8 dyn/cm <sup>2</sup>
Mi et al. (131)	2005	18 dyn/cm <sup>2</sup>
Weinbaum et al. (29)	1994	8-30 dyn/cm <sup>2</sup>

#### **3.2.2.1 Versuchsaufbau**

Im Rahmen der FFSS-Versuche wurde 37°C temperiertes MLO-Y4-Zellmedium mit einer zuvor berechneten Flussgeschwindigkeit in einem geschlossenen Kreislauf, bestehend aus 50ml Röhren, diversen Schläuchen und den Gängen der  $\mu$ -Slides, gepumpt (Abbildung 9).

Durch die Kombination einer bestimmten Drehzahl der Pumpe, eines definierten Schlauchdurchmessers und der Ganghöhe der  $\mu$ -Slides wurde FFSS in den drei verschiedenen Stärken (1 dyn/cm<sup>2</sup>, 10 dyn/cm<sup>2</sup>, 20 dyn/cm<sup>2</sup>) erzeugt (siehe Berechnung Anhang Abschnitt 8.1). Der FFSS wirkte auf MLO-Y4-Osteozyten, welche am Tag vor dem Versuch in die Gänge der  $\mu$ -Slides ausgesät worden waren.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Kreislaufs im FFSS-Versuchsaufbau.**

Die blauen Pfeile/Bogen in der Abbildung zeigen die Verwendung der Schläuche innerhalb eines Kreislaufs im FFSS-Versuchsaufbau. „Kreislauf“ bezeichnet dabei ein geschlossenes Schlauchsystem bestehend aus Schläuchen, die in das beförderte Nährmedium eintauchen (a), Schläuchen die durch das Pumpsystem laufen (b) zwei Gänge eines  $\mu$ -Slides, die miteinander über einen Verbindungsschlauch (c) verbunden sind und einem Schlauch (d), der zurück in das 50ml Röhrchen führt.

### 3.2.2.2 Verwendetes Material

50ml Röhrchen befanden sich zum Wärmeerhalt in wärmeisolierten, wassergefüllten Erlenmayerkolben, die auf einer Heizplatte standen. Die Temperatur in den Erlenmayerkolben wurde kontinuierlich überwacht.

Um die Flüssigkeit aus und in die Röhrchen zu befördern, wurden in die Deckel der Röhrchen Löcher gebohrt. In diese wurden Schlauchverbindungen so gesteckt, dass ein luftdichter Verschluss sichergestellt werden konnte. Die verwendeten Schläuche wurden in unterschiedlichen Längen im Versuch genutzt (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Verwendetes Schlauchmaterial**

Schlauchtyp	Innen-durchmesser	Hersteller	Lokalisation im Versuch	Länge
TYGON S3TM E-3603 (#YL81.1)	1,52mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	Röhrchen innen Röhrchen – Gang Gang - Gang Gesamt:	10cm x 2 49cm x 2 3,5cm 121,5cm
TYGON S3TM E-3603 (#YL83.1)	3,2mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	Röhrchen innen Röhrchen – Gang Gang - Gang Gesamt:	10cm x 2 48cm x 2 10cm 126 cm

Die verwendete Schlauchpumpe IP-N 24 ISM949 wurde freundlicherweise von der AG Straub (Innere Medizin 1, Universitätsklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt. Mittels Planetenantrieb erzeugt die Pumpe einen gleichmäßigen Flüssigkeitsstrom mit minimaler Pulsation. Unmittelbar neben der Pumpe wurde eine Styroporplatte befestigt, die die Höhendifferenz zwischen Heizplatte, Pumpe und  $\mu$ -Slides und damit korrelierenden Differenzdrücken ausgleicht. Auf dieser Styroporplatte wurden, parallel zur Pumpe, die  $\mu$ -Slides der Firma ibidi in einer Reihe angeordnet. MLO-Y4-Zellen wurden in zwei unterschiedlichen  $\mu$ -Slide-Größen ( $\mu$ -Slide VI 0.4 mit 0.4mm Ganghöhe und  $\mu$ -Slide VI 0.1 mit 0.1mm Ganghöhe) ausgesät. Der Boden der  $\mu$ -Slides ist in etwa 180 $\mu$ m dick und besteht aus einem Polymer, das Gasdurchlässig ist. Der Kohlendioxid/Sauerstoff-Austausch der Zellen kann somit kontinuierlich gewährleistet werden (132).

Die folgenden Fotos zeigen den Versuchsaufbau während eines FFSS-Versuchs:



**Abbildung 10: Aufbau des Fluid Flow Shear Stress Versuchs.**

(A) Aufsicht auf den Versuchsaufbau. Oben im Bild stehen die mit MLO-Y4-Nährmedium befüllten Röhrcchen in Erlenmayerkolben auf der schwarzen Heizplatte; Mittig befindet sich die Pumpe; Unten sind die  $\mu$ -Slides in Reihe auf der Styroporplatte befestigt. (B) Sicht von vorne auf die  $\mu$ -Slides. Auf den zu- und abführenden Schläuchen sind schwarze Markierungen angebracht, um die Position der Schläuche in der Pumpe zu markieren. Die Kontrollen (K) wurden während der Laufzeit nicht belastet. (C) Blick auf die Heizplatte von vorne. Die mit MLO-Y4 Nährmedium gefüllten Röhrcchen stehen in mit 37°C warmen Wasser gefüllten und mit Aluminiumfolie ummantelten Erlenmayerkolben. Die Temperatur in den Kolben wird über ein Thermometer (mittig im Bild) überwacht.

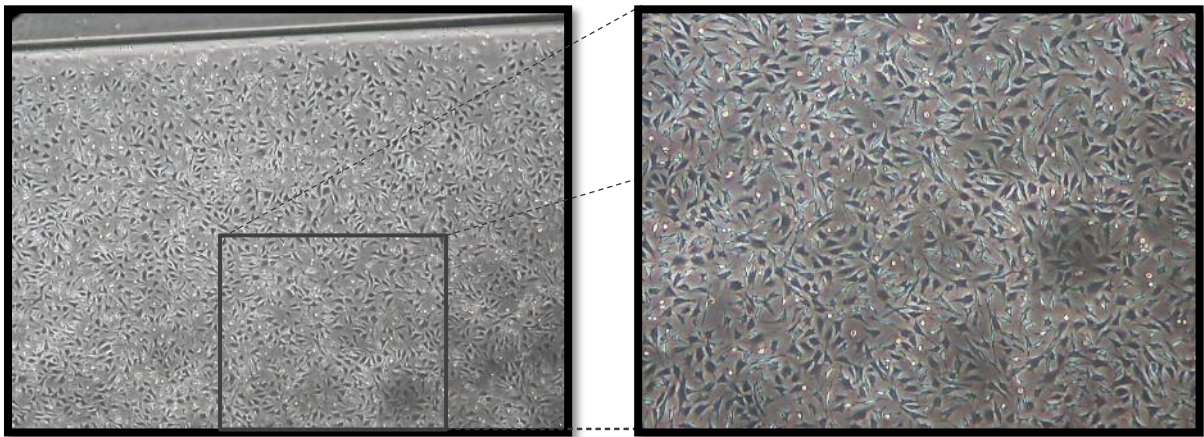
### 3.2.2.3 Versuchsablauf

Die Zellaussaat der MLO-Y4-Osteozyten in die  $\mu$ -Slides fand nachmittags statt (Tag 1), am Morgen des nächsten Tages (Tag 2) wurden die  $\mu$ -Slides an das Pumpensystem angeschlossen. Vor Aussaat der MLO-Y4-Osteozyten in die Gänge der  $\mu$ -Slides wurden diese mit Kollagen Typ 1 beschichtet. Nach Zellaussaat unter sterilen Bedingungen wurden die  $\mu$ -Slides 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich die Zellen absetzen konnten. Anschließend wurden die



Reservoirs, von denen sich je einer an den beiden Enden eines Ganges befinden, mit jeweils 60µl warmen Nährmedium gefüllt. Die µ-Slides wurden bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator gelagert, wobei sie mit einem Gasdurchlässigen Polymer-Deckel abgedeckt und in eine feuchte Kammer gesetzt wurden, da das Füllvolumen der Gänge mit 1,7µl für die kleineren µ-Slides und 30µl für die größeren, so gering ist, dass das Medium im Inkubator andernfalls rasch verdunstet wäre.

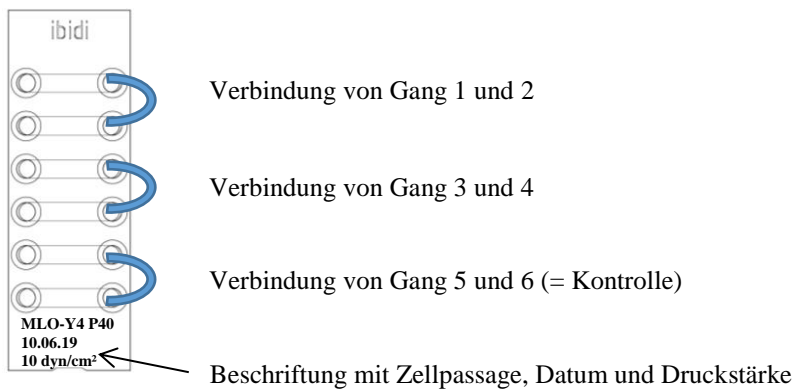
Die Zahl, in der die MLO-Y4-Osteozyten in die Gänge ausgesät wurden, betrug für die 0,4µm Ganghöhe 1200 Zellen/µl und für die 0,1µm Ganghöhe 2400 Zellen/µl. Es wurde darauf geachtet, dass die Zelldichte innerhalb der Gänge in etwa gleich war und am Versuchstag eine Zielkonfluenz von 60-75% erreicht wurde (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme von MLO-Y4-Osteozyten in einem µ-Slide VI 0.4.**

*MLO-Y4-Osteozyten mit einer Zelldichte von ~70% Konfluenz 2 Tage nach Aussaat. Vergrößerung 4fach.*

Je Versuchsansatz wurden drei µ-Slides mit MLO-Y4-Osteozyten dem FFSS ausgesetzt. Dabei wurden immer zwei benachbarte Gänge eines µ-Slides während des Versuchs über einen Schlauch verbunden und die Zellen dieser beiden Gänge im nächsten Schritt zusammengeführt, um eine höhere Zellzahl zu erreichen. Pro µ-Slide erhielt man so drei Zellproben, die miteinander verglichen werden konnten. Zwei Zellproben (die Zellen aus den Gängen eins zusammengeführt mit zwei und die Zellen aus den Gängen drei zusammengeführt mit vier) waren FFSS ausgesetzt, die dritte Zellprobe (die Zellen aus den Gängen fünf zusammengeführt mit sechs) diente als Kontrolle und wurde nicht belastet (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der  $\mu$ -Slidebelegung.**

*Der blaue Bogen in der Abbildung steht für die Verbindung zweier Gänge mittels Schlauchverbindung.*

Unter sterilen Bedingungen wurden je  $\mu$ -Slide drei 50ml Röhren mit 15ml 37°C temperierten Nährmedium gefüllt. Der konstante Wärmeerhalt des Mediums wurde während des Versuches sichergestellt und überwacht. Die  $\mu$ -Slides wurden am Versuchsort an die Schläuche angeschlossen. Nachdem alle Schläuche in die Pumpe eingespannt waren, wurden sie zunächst untereinander verbunden und mit maximaler Drehzahl befüllt. Dies war zum einen nötig, um vorhandene Luft aus dem System zu entfernen, zum anderen benötigen die Schläuche eine Einlaufzeit. Anschließend wurde die Pumpe ausgeschaltet und die Gänge der  $\mu$ -Slides zügig mit ihren jeweiligen Schläuchen verbunden. Sobald der Kreislauf zwischen den Röhren und  $\mu$ -Slides geschlossen war, wurde die Pumpe wieder eingeschaltet und die Expositionszeit (2h für die RNA-Isolierung) wurde gestartet. Nach Beendigung des Versuches wurden je 2ml des Mediums bei -80°C eingefroren und die Zellen in 350 $\mu$ l Zelllysepuffer (RLT-Puffer Plus) lysiert. Vor erneuter Verwendung wurden alle Teile gründlich gereinigt und bei 121°C autoklaviert.

### 3.2.3 Molekularbiologie

#### 3.2.3.1 Transduktion der NK1R-Isoformen NK1R-F und NK1R-T in MLO-Y4-Zellen

Zelleffekte, die durch Stimulation mit SP bewirkt werden, können über zwei Rezeptorvarianten des NK1R vermittelt werden, die sich, strukturell betrachtet hinsichtlich ihrer Aminosäurenlänge unterscheiden (siehe Einleitung Abschnitt 1.5.3.1). Der Volllänge-NK1R („fulllength“, NK1R-F, geschätztes MW 46kD) besitzt am cytoplasmatischen C-Terminus 96 Aminosäuren mehr als der Verkürzte-NK1R („truncated“, NK1R-T, geschätztes MW 34kD).

Durch Überexpression jeweils einer der beiden Varianten des NK1R in MLO-Y4-Zellen wurden Zellklone geschaffen, die es ermöglichen in zukünftigen Versuchen NK1R-vermittelte Effekte differenziert zu betrachten.

### **3.2.3.2 Informationen zu den verwendeten Plasmiden**

Initial wurden von der Firma GeneArt synthetische Konstrukte des Volllänge-NK1R (1236bp, NK1R-F) und der verkürzten Variante (948bp, NK1R-T), die in einen pMA-RQ-Vektor (pMA-NK1R-F und pMA-NK1R-T) kloniert worden waren, geordert. Die Plasmide enthielten den NK1R-Genabschnitt umfassende Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und XhoI (siehe Plasmid- und Vektorkarten sowie Gensequenzen Anhang Abschnitt 8.3). Sie wurden mittels Hitzeschocktransformation in *E. coli* „One Shot Stbl 3“ Bakterien eingebracht.

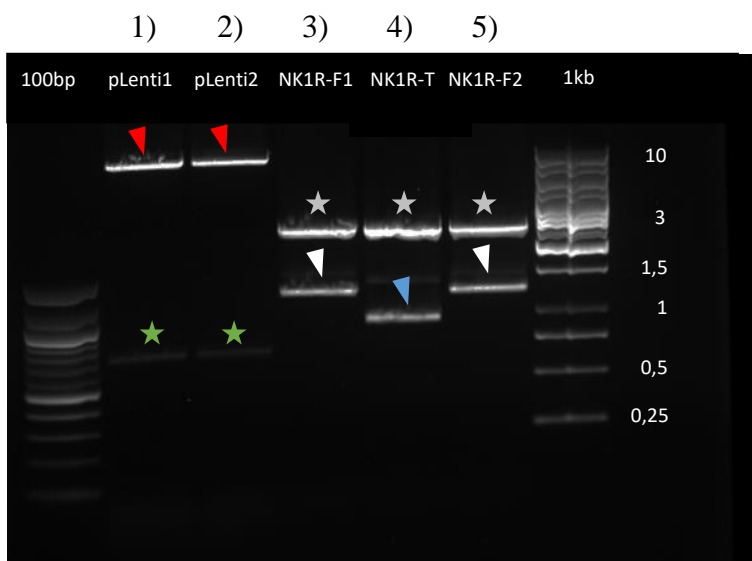
Der Zielvektor pLenti6/V5-D-TOPO, in den die NK1R-Gensequenzen zur Transfektion ligiert werden mussten, konnte aus einem anderen Projekt der Arbeitsgruppe genutzt werden. Er enthielt ein Insert für den tissue inhibitor 3 of metalloproteinases (TIMP3). Das Plasmid pLenti6/V5-D-TOPO-Timp3 war in *E. coli* „One Shot Stbl 3“ Bakterien transfiziert worden.

### **3.2.3.3 Plasmidisolation**

Auf allen verwendeten Plasmiden, sowohl auf denjenigen, die eine Isoform des NK1R, als auch auf denjenigen, die den Zielvektor pLenti6/V5-D-TOPO enthielten, war auch ein Antibiotikum-Resistenzgen für Ampicillin enthalten. Die Bakterien wurden daher auf Agarplatten mit 100µg/ml Ampicillin ausplattiert und so selektioniert. Nach circa 24 h wurden einzelne Kolonien gepickt und über Nacht in je 5ml LB -Medium mit Ampicillin (100µg/ml), bei 37°C auf einer Schüttelplatte inkubiert. Am folgenden Tag wurden jeweils 2ml des Mediums bei 659x g für 1 min zentrifugiert. Das sedimentierte Pellet wurde unter Zuhilfenahme des QIAprep Spin Miniprep Kits nach Anleitung aufgereinigt. Die Plasmide wurden aus den Bakterien nach dem Binden-Waschen-Eluieren Prinzip isoliert und abschließend in 50µl Elutionspuffer eluiert. Die in dem Kit inkludierten Säulchen enthalten eine Silikonmembran, die DNA in Gegenwart von chaotropen Salzen bindet und die Elution der aufgereinigten DNA in geringen Volumina ermöglicht (133).

### 3.2.3.4 Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese

In einem nächsten Schritt wurde der Zielvektor (pLenti6/V5-D-TOPO) aus dem Plasmid pLenti6/V5-D-TOPO-Timp3 und die Inserts (NK1R-F und NK1R-T) aus den Plasmiden pMA-NK1R-F und pMA-NK1R-T ausgeschnitten. Dazu wurden die Plasmide mit den Enzymen BamHI-HF und XhoI in einem Verhältnis Enzym zu Plasmid von 1:1 für 15 min bei 37°C in CutSmart Puffer verdaut. Anschließend wurden die Proben mit Gel Loading Dye Purple vermischt und auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Eine elektrische Spannung von 95V wurde an die Elektrophoresekammer angelegt, wodurch die negativ geladenen Proteine im Gel gerichtet wandern. Die kürzeren Insertteilstücke (NK1R-F, NK1R-T, Timp3) können das Agarosegel deutlich schneller durchwandern als die größeren Vektorteilstücke (pMA-RQ, pLenti6/V5-D-TOPO). Aus diesem Grund waren die DNA-Banden nach einer Laufzeit von 1,5 h auf unterschiedlichen Höhen detektierbar und eine Unterscheidung zwischen Insert beziehungsweise Vektor war möglich (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Restriktionsverdau von pLenti6/V5-D-TOPO-Timp3, pMA-NK1R-F und pMA-NK1R-T.**

*Proben: 1) pLenti6/V5-D-TOPO-Timp3, 2) pLenti6/V5-D-TOPO-Timp3, 3) pMA-NK1R-F, 4) pMA-NK1R-T, 5) pMA-NK1R-F*

*Nach einem Restriktionsenzymverdau mit BamHI-HF und XhoI wurden die Proben auf das Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die beiden äußeren Banden zeigen jeweils einen Größenmarker (links 100bp, rechts 1kb). Rote Pfeile zeigen Banden, die dem Vektor pLenti6/V5-D-TOPO (6,9 kb) entsprechen. Weiße Pfeile zeigen Banden, die der Volllänge-Variante des NK1R (NK1R-F, 1,2 kb) entsprechen. Der blaue Pfeil markiert eine Bande,*

*die der verkürzten Variante des NK1R (NK1R-T, 0,95kb) entspricht. Grüne Sterne zeigen Banden, die dem Insert TIMP3 entsprechen. Graue Sterne markieren die pMA-RQ Vektor Banden (2,3kb).*

Es kann davon ausgegangen werden, dass der Restriktionsverdau erfolgreich war. Die fünf mit Pfeilen markierten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten.

### **3.2.3.5 Fragmentisolation**

Die jeweiligen Banden des NK1R-F (1236bp), NK1R-T (948bp) und pLenti6/V5-D-TOPO (6963bp) wurden unter UV-Licht detektiert und aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Anschließend wurden die Gelstücke mit dem QIAquick Gel Extraction Kit, welches ebenfalls nach dem Binden-Waschen-Eluieren Prinzip funktioniert, aufbereitet. In Relation zu ihrem Gewicht werden dabei die aus dem Agarosegel ausgeschnittenen DNA-Banden in Lysepuffer bei 50°C gelöst. Die Flüssigkeit wird nach mehreren Arbeitsschritten, die die Reinheit der zu isolierenden DNA erhöhen, auf eine QIAquick Gel Extraction Säule gegeben, die die Nucleinsäuren über eine Silikonmembran bindet. Durch Waschschrte werden Verunreinigungen entfernt und die isolierte Plasmid-DNA zuletzt von der Säule eluiert.

### **3.2.3.6 Ligationsansatz**

Die Proben wurden im Anschluss mit alkalischer Phosphatase (CIP) verdaut, um eine Dephosphorylierung an den 5' und 3' DNA-Enden zu bewirken und so die Re-Ligation des Plasmids zu verhindern. Nach einer Reinigung mit dem MinElute PCR Purification Kit, der vorhandene Primer-, Nucleotid-, Enzym- und Salzurückstände entfernt, wurde jeweils eine der beiden NK1R-Isoformen (Insert) mit einem pLenti6/V5-D-TOPO Vektor im Verhältnis 1:3 gemischt und unter Verwendung von T4DNA-Ligase-Puffer, T4DNA-Ligase und Aqua dest. ligiert. Der Ligationsansatz wurde für 16 h bei 16°C inkubiert und abschließend für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

### **3.2.3.7 Hitzeschocktransformation in E. coli Bakterien**

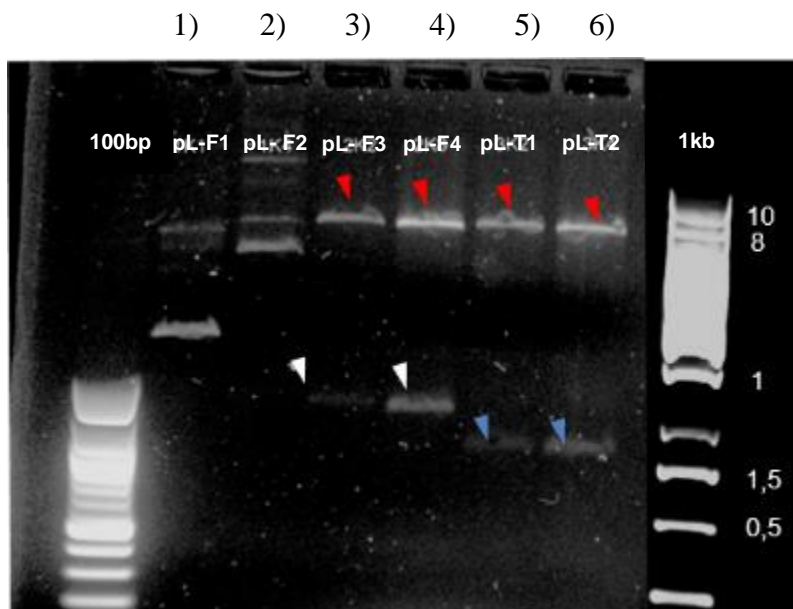
Die neu entstandenen Plasmide (Konstrukte pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F und pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T) und ein Kontrollplasmid (pLenti6/V5-GW/LacZ) wurden durch

Hitzeschocktransformation in „One Shot Stbl3 Chemically Competent“ E. coli eingebracht. Bei der angewandten Hitzeschock-Methode wird einerseits eine kalziumreiche Umgebung erzeugt, die dazu führt, dass die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen Plasmid-DNA und bakterieller Zellmembran aufgehoben werden. Andererseits entstehen durch den plötzlichen Temperaturanstieg Poren in der Bakterienzellmembran, durch welche die Plasmid-DNA in das Bakterium gelangt (134).

Die transformierten Bakterien wurden über eine Ampicillin-Resistenz selektioniert. Zur Sicherung der Plasmide wurden Plasmidstocks und Bakterienstocks angelegt und bei -80°C kryokonserviert.

### 3.2.3.8 Kontrolle der Ligation durch Restriktionsverdau, Gelelektrophorese und Sanger-Sequenzierung

Der Erfolg des Ligationsansatzes wurde durch Isolation der Konstrukte mittels QIAprep Spin Miniprep Kit und anschließendem Verdau des Plasmids mit den Restriktionsenzymen BamHI-HF und XhoI überprüft (Abbildung 14). Die Laufzeit der Gelelektrophorese betrug 2 h bei 93V, das Gel enthielt 1% Agarose.



**Abbildung 14: Restriktionsverdau von pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F und pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T.**

Proben: 1) pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F, 2) pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F, 3) pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F, 4) pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F, 5) pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T, 6) pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T

Nach einem Restriktionsenzymverdau mit BamHI-HF und XhoI wurden die Proben auf das Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die beiden äußeren Banden zeigen jeweils einen Größenmarker (links 100bp, rechts 1kb). Rote Pfeile zeigen Banden, die dem Vektor pLenti6/V5-D-TOPO (6,9 kb) entsprechen. Weiße Pfeile zeigen Banden, die der Volllänge-Variante des NK1R (NK1R-F, 1,2 kb) entsprechen. Die blauen Pfeile markieren Banden, die der verkürzten Variante des NK1R (NK1R-T, 0,95kb) entsprechen. Die Plasmidstücke der Proben pL-F3 und pL-F4 zeigen sowohl passende Banden für pLenti6/V5-D-TOPO (6,9 kb, roter Pfeil) als auch für NK1R-F (1,2 kb, weißer Pfeil). pL-T1 und pL-T2 zeigen Banden auf der Höhe von pLenti6/V5-D-TOPO (6,9 kb, roter Pfeil) und NK1R-T (950 kb, blauer Pfeil).

Es kann angenommen werden, dass die Ligation der Inserts (NK1R-T, NK1R-F) mit dem Zielvektor (pLenti6/V5-D-TOPO) für die Proben 3 – 6 erfolgreich war.

Von den Klonen mit der stärksten Plasmidexpression wurden für die nachfolgenden Experimente größere Bakterienkulturen in 50ml LB-Medium angesetzt und die DNA im Folgenden unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Purification Kit isoliert. Der Kit funktioniert über eine alkalische Lyse und im weiteren Verlauf über das Binden der Plasmid-DNA an Harze. Nach verschiedenen Waschschritten wird die DNA abschließend eluiert. Um auch auf DNA-Ebene den Erfolg der Ligation der NK1R-Isoformen mit dem Zielvektor pLenti6/V5-D-TOPO zu überprüfen, wurden Proben der isolierten Plasmide zur Sanger-Sequenzierung an die Firma Microsynth versandt (siehe Sequenzierungsergebnisse Anhang Abschnitt 8.3.4, 8.3.5).

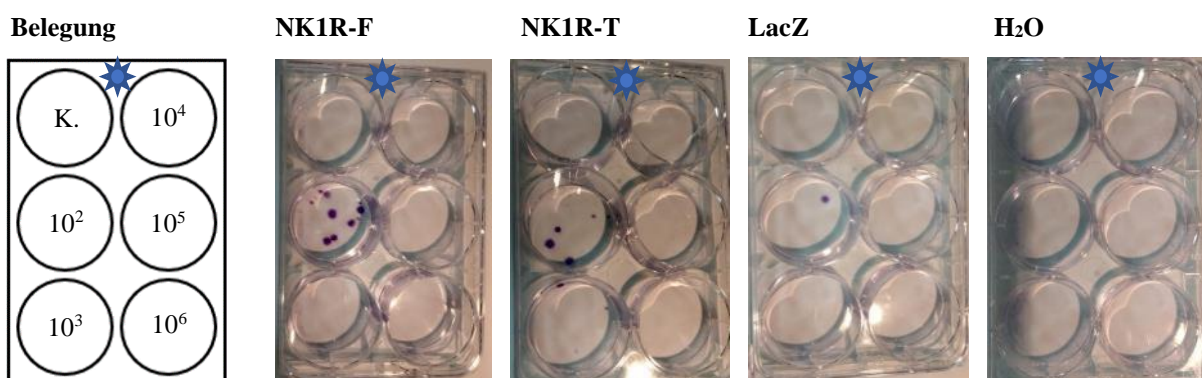
### **3.2.3.9 Transfektion in 293FT-Zellen und Virusproduktion**

Zum Zweck der Hochtiter-Virusproduktion wurden 293FT-Zellen mit Hilfe des ViraPower Lentiviral Expression System Kits mit den erstellten Plasmiden transfiziert und kultiviert. Je Ansatz (NK1R-F, NK1R-T, pLenti6/V5-GW/LacZ-Kontrolle, H<sub>2</sub>O-Kontrolle) wurden  $5 \times 10^6$  293FT-Zellen in eine 10 cm Petrischale ausgesät. Die Zellen wuchsen über Nacht bei 37°C in Nährmedium ohne Antibiotikumzusatz und hatten am Folgetag eine Konfluenz von etwa 95%. Am zweiten Tag der Transfektion wurde ein Medienwechsel durchgeführt und der DNA-Lipofectamin-Komplex auf die 293FT-Zellen gegeben. Darin enthalten war der ViraPowerPackaging Mix, das jeweilige Expressionsplasmid (pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F, pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T oder pLenti6/V5-GW/LacZ), Opti-MEM Reduced Serum

Medium und Lipofectamin 2000. Nachdem der Komplex tropfenweise zugegeben worden war, wurden die Petrischalen über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel mit Nährmedium ohne Antibiotikum durchgeführt und die Petrischalen weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Die Überstände, die große Mengen an Viren enthielten, wurden abgenommen, bei 554x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert, anschließend steril filtriert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 3.2.3.10 Transduktion des Virus in NIH3T3-Zellen und Berechnung der „transduction units“

Zur Bestimmung der Anzahl an infektiösen Partikeln je ml Virusüberstand werden transduction units (TU) berechnet. Dafür wurden  $1 \times 10^4$  NIH 3T3-Zellen pro Well einer 6-Well Platte ausgesät und unter Verwendung von Polybrene (2µg/ml, Steigerung der Transfektionseffizienz) mit unterschiedlichen Verdünnungen des jeweiligen Virusüberstandes (NK1R-F, NK1R-T, LacZ, Wasserkontrolle), transduziert. Über die Zugabe des Antibiotikums Blasticidin (5µg/ml) wurden die Zellen selektioniert. Nach 14 Tagen wurde das Medium der Zellen abgenommen. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 1% Glutaraldehyd fixiert, nochmals gewaschen und mit Kristallviolett gefärbt und anschließend die angefärbten Kolonien gezählt (Abbildung 15).





**Abbildung 15: Schematische Darstellung der 6-Well-Plattenbelegung und Fotos der 6-Well-Platten mit transduzierten NIH 3T3-Zellen nach Kristallviolettgefärbung zur Bestimmung der transduction units (TU).**

Die Blaue Sonne markiert jeweils den linken Rand der 6-Well Platten. Schema: In der Mitte der Kreise sind die jeweiligen Virusverdünnungsstufen angegeben. Auf jeder Platte befand sich eine Kontrolle (K) zu der kein Virus zugegeben wurde. Fotos: Die vier Platten zeigen die mit Kristallviolett gefärbten Kolonien (lila).

**Tabelle 4: Berechnung der TU/ml**

Virus mit Gen für:	Anzahl gefärbter Kolonien	Virus-Verdünnungsstufe						TU/ml
		K.	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	
H <sub>2</sub> O		0	0	0	0	0	0	0
LacZ		0	1	0	0	0	0	0,1*10 <sup>3</sup>
NK1R-F		0	13	2	0	0	1	344,4*10 <sup>3</sup>
NK1R-T		0	5	3	0	0	0	1,8*10 <sup>3</sup>

Volllänge-Variante des Neurokinin1-Rezeptors (NK1R-F), Verkürzte Variante des Neurokinin1-Rezeptors (NK1R-T), transduction unit (TU), Kontrolle (K)

Die TU werden nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{TU}{ml} = \frac{\sum n(\text{gefärbte Kolonien einer Verdünnung}) \times \text{Verdünnungsstufe}}{n(\text{Verdünnungsstufen})}$$

Die errechneten TU sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

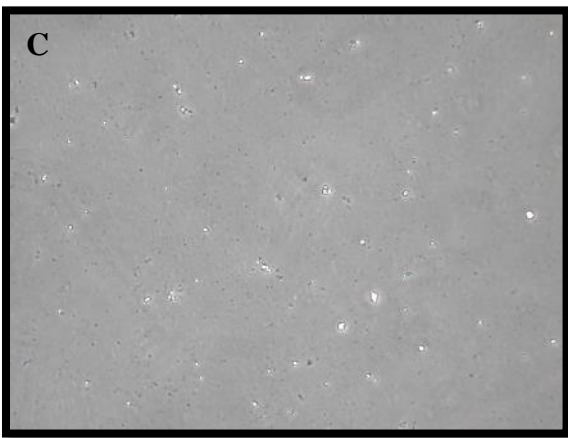
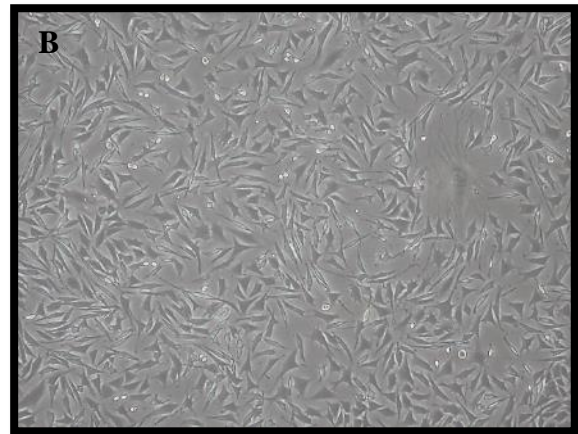
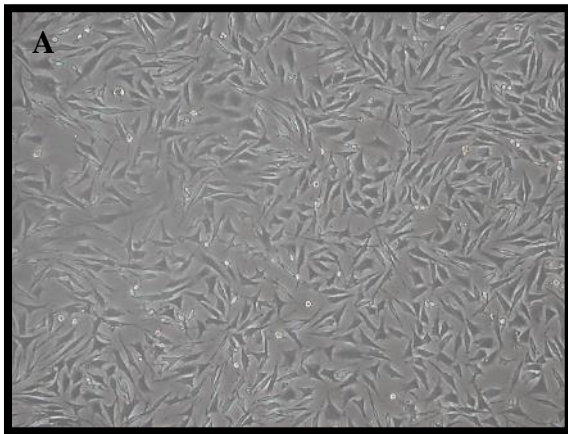
### 3.2.3.11 Transduktion des Virus in MLO-Y4-Zellen

Analog zur Virustransduktion in NIH 3T3-Zellen wurden die Zielzellen MLO-Y4 transduziert und selektioniert. Das Zellwachstum der transduzierten MLO-Y4-Osteozyten während der Blasticidinselektion war unterschiedlich schnell. Die, mit den NK1R-Rezeptorisofomen transduzierten MLO-Y4-Osteozyten, teilten sich schneller als die Kontrollzellen, in welche das Gen für LacZ transduziert wurde. Die neu entstandenen Zellklone, welche die NK1R-Rezeptorisofomen überexprimieren, wurden im Verlauf des Versuches grundsätzlich sowohl mit MLO-Y4-Zellen, in die das LacZ-Gen transduziert worden war, als auch mit unveränderten MLO-Y4-Zellen verglichen. Ein deutlicher Unterschied in der Rezeptorexpression der NK1R-

Isoformen gegenüber den Referenzzellen (unveränderte MLO-Y4-Osteozyten und Osteozyten, in die das Gen für LacZ transduziert worden war) sollte sich nach erfolgreicher Transduktion der MLO-Y4-Osteozyten mit NK1R-F und NK1R-T zeigen, auch unabhängig davon, ob die Transduktion mit LacZ in die MLO-Y4-Osteozyten erfolgreich und in ausreichender Zahl gelungen war. Aus Zeit- und Materialgründen wurden die entstandenen Zellklone daher trotz einer niedrigen Viruslast, vor allem für den Kontrollvektor LacZ, für die weiteren Versuche verwendet und auf eine Wiederholung der Transfektion zu diesem Zeitpunkt verzichtet. Ein gutes Zellwachstum unter Blasticidinselektion konnte für die MLO-Y4-Zellen, in die die NK1R-Rezeptorisoformen transduziert worden waren, nachgewiesen werden (Abbildung 16). Für die Transfektion wurden  $2 \times 10^4$  Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und der Virusüberstand in den Verdünnungen 1:2, 1:5, 1:10 und 1:50 auf die MLO-Y4-Zellen gegeben. Die Zellen wurden über drei Wochen selektioniert, alle zwei bis drei Tage fand ein Mediumwechsel mit Nährmedium und Blasticidin ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) statt. Ab einer Konfluenz von 70% wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA subkultiviert und ein Teil der Zellen bei  $-80^\circ\text{C}$  kryokonserviert.

Die erfolgreiche Transduktion der DNA für den NK1R-T-Rezeptor, den NK1R-F-Rezeptor und für den Kontrollvektor LacZ in die MLO-Y4-Zellen wurde auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR und auf Proteinebene durch Western Blot nachgewiesen.

Der neu entstandene MLO-Y4-Zellklon, der den NK1R-F überexprimiert, wurde fortan als MLO-Y4\_NK1R-F geführt. Analog verhielt es sich mit den Zellklonen, die die verkürzte Form des NK1R überexprimieren (MLO-Y4\_NK1R-T), beziehungsweise die Kontrolle LacZ enthalten (MLO-Y4\_LacZ).



**Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MLO-Y4-Zellen während der Blasticidinselektion (2µg/ml) am 13. Tag nach Virustransduktion.**

(A) Virus mit NK1R-T, Verdünnung 1:2, Vergrößerung 10fach, (B) Virus mit NK1R-F, Verdünnung 1:2, Vergrößerung 10fach, (C) Kontrolle ohne Virus.

### 3.2.3.12 RNA Isolation

Nach beiden Versuchsansätzen (Fluid Flow Shear Stress und Etablierung der Überexpressionsklone) wurde die RNA mit dem RNeasy Plus Micro Kit der Firma Qiagen isoliert. Das im RLT-Lysepuffer enthaltene Guanidin-Isothiocyanat denaturiert vorhandene RNasen und schützt so die RNA vor Abbau. Genomische DNA wird mittels einer im Kit enthaltenen spezifischen Säule entfernt. Nach Hinzugabe von Ethanol wird das Lysat auf eine RNA-bindende Silikonmembransäule gegeben. Nach mehreren Waschschritten wird zuletzt die gebundene RNA in 14µl RNase-freiem Wasser eluiert. Der RNA-Gehalt und die Reinheit der Proben wurden mittels Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Wellenlängenbereich 190 – 840 nm) bestimmt. Außerdem wurden aus jedem Versuch RNA-Stichproben mit dem Bioanalyser RNA 6000 Nano Assay auf ihre Reinheit geprüft (RNA integrity number (RIN)-Werte). Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

### 3.2.3.13 cDNA Synthese

Die RNA wurde unter Verwendung des AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit nach Anweisung des Herstellers in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben. Je Reaktionsansatz wurden 300ng RNA transkribiert. Die Proben wurden im T3000 Thermocycler in drei Schritten zu cDNA umgeschrieben: 1) Beim Annealing lagern sich Primer bei 25°C (5 min) an die RNA an. 2) Im Rahmen der Synthesereaktion, die bei 42°C abläuft, wird der komplementäre cDNA-Strang gebildet (15 min). 3) Zuletzt wird die Reaktion bei 95°C (5 min) abgestoppt. Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 3.2.3.14 qRT-PCR

Mittels qRT-PCR kann die Expressionsrate eines Gens ermittelt werden. Nach Vervielfältigung (PCR) des gewünschten Gens durch die Verwendung spezifischer Primer entsteht ein Doppelstrang, in den der Farbstoff SYBR-Green interkaliert. Durch Denaturierung wird aus dem Doppelstrang nach jedem Zyklus der eingelagerte SYBR-Green-Farbstoff wieder freigesetzt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität ist proportional zur Zunahme der PCR-Produkte und ermöglicht so eine Quantifizierung der Genexpression. Es wurde eine qRT-PCR-Maschine Mx3005P QPCR System von Agilent Technologies mit dem Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix mit ROX genutzt. Die Proben wurden in eine 96-Well-PCR-Platte als Duplikate aufgetragen.

qRT-PCR-Messungen wurden im Rahmen des FFSS Versuchs mit den MLO-Y4-Zellen, die mit unterschiedlich starkem FFSS belastet worden waren durchgeführt, um eine Regulation von ausgewählten anabolen und katabolen Stoffwechselfaktoren des Knochens zu untersuchen. Im Rahmen der Etablierung der Überexpressionsklone wurden qRT-PCR-Messungen gemacht, um eine erfolgreiche Transduktion der Überexpressionsplasmide pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F, beziehungsweise pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T in MLO-Y4-Zellen auf RNA-Ebene zu überprüfen.

Die gemessenen Ct-Werte wurden in Microsoft Excel übertragen und entweder nach der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, für die Ct-Werte, die im Rahmen des FFSS-Versuches erhoben wurden oder nach der  $\Delta\text{Ct}$ -Methode, für die Ergebnisse aus dem Nachweis der Transduktion der NK1R-Isoformen in die MLO-Y4-Zellen, ausgewertet. Die Ct-Werte wurden dabei entweder nur auf die gemessenen Ct-Werte von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (endogene

Kontrolle) normiert (für  $\Delta Ct$ ) oder zusätzlich auf unbelastete Kontrollzellen bezogen (Kalibrator) (für  $\Delta\Delta Ct$ ).

### **3.2.4 Proteinchemische Methoden**

Zum Nachweis, des Erfolgs der Transduktion der Überexpressionsplasmide NK1R-T, beziehungsweise NK1R-F, in die MLO-Y4-Zellen auf Proteinebene, wurden Western Blots (WB) mit Zelllysaten der entsprechenden Zellklone durchgeführt. Als Kontrolle dienten native MLO-Y4- und RAW 264.7-Zellen (murine Macrophagen-Zelllinie), für die der Nachweis einer Expression des NK1R auf Proteinebene mittels Western Blot bereits dokumentiert ist (65).

Der Nachweis erfolgt in mehreren Schritten: 1) Zunächst müssen die Proteine aus den Zellen gelöst werden (Proteinisolation). 2) Anschließend muss die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt (BCA Assay) und 3) eine gleich große Menge an Proteinproben auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine nach Größe getrennt werden (SDS-Gelelektrophorese). 4) Die aufgetrennten Proteine werden anschließend auf eine Membran übertragen (Western Blot) 5) und als letzter Schritt werden spezifische Proteinbanden durch Antikörpernachweis identifiziert (Detektion der Proteine).

#### **3.2.4.1 Proteinisolation aus MLO-Y4-Zellen**

Zur Isolation des Rezeptors aus der Zellmembran wurden Zellpellets mit je  $1-3 \times 10^6$  MLO-Y4-Osteozyten in  $100^\circ\text{C}$  Heat-Hot-Lysepuffer (Tris-HCl (10 mM) pH 8,0 und 1% SDS) suspendiert. Die Mischung wurde anschließend weitere 20 min bei  $100^\circ\text{C}$  erhitzt und dabei alle 5 min gevortext. Der NK1R ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben Membrandomänen und daher fest in der Zellmembran verankert. Die Arbeitsgruppe hatte aus Versuchen mit anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren bereits gute Erfahrungen mit der Proteinlyse dieser Rezeptoren durch Verwendung der Heat-Hot-Lysemethode. Um die Rezeptorextraktion aus der Zellmembran zu verstärken, folgte als nächster Schritt eine Ultraschallbehandlung mit dem Sonoplus Ultraschall-Homogenisator HD 2070 (2x 20 sec; 3 Zyklen, 40% Power) und die Zentrifugation der Proben mit  $14\,000 \times g$  bei  $4^\circ\text{C}$  für 20 min. Der klare Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und für die folgende Bicinchonic Acid (BCA) Analyse verwendet.

### 3.2.4.2 BCA-Assay

Um die Konzentration des isolierten Gesamtproteins im Überstand zu ermitteln, wurde der BCA Protein Assay Kit genutzt. Der Kit nutzt die Eigenschaft von Proteinen in alkalischer Umgebung  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduzieren zu können. Bei dieser Reduktionsreaktion entsteht ein freies Kupferkation, das mit dem zugesetzten BCA-Reagenz einen stabilen Lichtabsorbierenden Kupferkomplex bildet, was photometrisch gemessen werden kann und mit dem Proteingehalt einer Probe korreliert.

Die Überstände mit den isolierten Proteinen wurden 1:10 mit PBS verdünnt und je 25  $\mu\text{l}$  wurden am Boden einer 96-Well Platte vorgelegt. Ebenso wurden jeweils 25  $\mu\text{l}$  des BSA-Referenzstandards (0-1000  $\mu\text{g/ml}$ ) auf den Plattenboden pipettiert. Die belegten Wells wurden anschließend mit 200  $\mu\text{l}$  Working Reagenz des BCA Protein Assay Kits befüllt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C erfolgte die photometrische Messung der Proben bei 595nm in einem Photometer und die Auswertung der gemessenen Daten mit Microsoft Excel 2016.

### 3.2.4.3 SDS-Gelelektrophorese

20  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein wurden mit der entsprechenden Menge 5fach SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt.

Das stark negativ geladene SDS bindet an die Aminosäurenkette der Proteine, entfaltet sie dadurch und maskiert eventuelle Eigenladungen. Das im Ladepuffer enthaltene DTT zerstört mögliche Disulfidbrücken innerhalb der Proteine. Die Proteine werden hitzedenaturiert und proportional zur Proteinmasse negativ geladen. Das enthaltene Bromphenolblau färbt die Proben, sodass die Wanderung durch das Gel nachverfolgt werden kann. Glycin erhöht die Probendichte, sodass sie in die Geltaschen absinken. Im Rahmen der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dies wird erreicht, indem an die Gelelektrophoresekammer ein elektrisches Feld angelegt wird, das bewirkt, dass die denaturierten, negativ geladenen Proteine eine Polyacrylamid-Gelmatrix durchwandern. Jeweils ein Trenn- und ein Sammelgel bilden die Gelmatrix, wobei sie sich in ihrem Gehalt an Polyacrylamid und im pH-Wert unterscheiden. Sie bilden Poren von unterschiedlicher Größe, die wie ein Proteinsieb funktionieren. Je kleiner, beziehungsweise größer ein Protein, desto schneller, beziehungsweise langsamer ist die

Durchwanderung der Gele möglich, was letztlich zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe führt.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden Trenn- und Sammelgele mit folgender Zusammensetzung angefertigt:

Zusammensetzung für 2 Trenngele:

- 6,6ml Aqua dest.
- 8,0ml 30%-Acrylamid Mix
- 5,0ml Tris-Puffer (pH 8,8)
- 0,2ml SDS
- 0,2ml Ammoniumpersulfat
- 0,008ml TEMED

Zusammensetzung für 2 Sammelgele:

- 2,78ml Aqua dest.
- 0,83ml 30%-Acrylamid Mix
- 1,5ml Tris (pH 6,8)
- 0,05ml SDS
- 0,05ml Ammoniumpersulfat
- 0,005ml TEMED

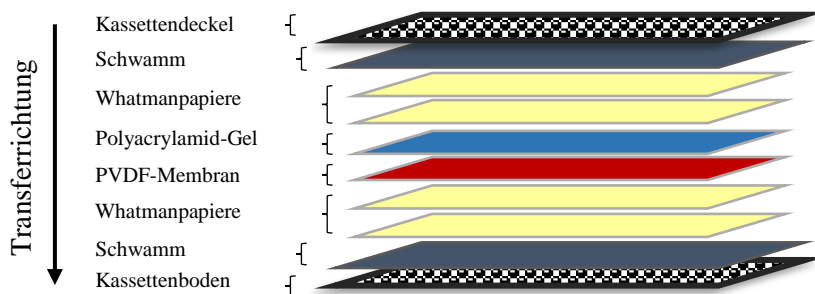
Bis die Proben die Gelgrenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatten, wurde eine Spannung von 80V angelegt. Anschließend wurde die Spannung für 2 h 30 min auf 120V erhöht.

#### **3.2.4.4 Western Blotting**

Die aufgetrennten Proteine werden nach Beendigung der SDS-PAGE in einem darauffolgenden Schritt aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Hierfür wurde das Tank-Blot-Verfahren verwendet.

Die Polyacrylamid-Gele werden von den Glasplatten gelöst und bei Raumtemperatur in Transferpuffer geschwenkt, um eventuelle Salzurückstände des Ladepuffers zu entfernen. Zwischenzeitlich werden Whatmanpapiere, Schwämme und die PVDF-Membran vorbereitet. Die Transferkassette wird anschließend wie im Schema dargestellt zusammengesetzt (Abbildung 17). Gemeinsam mit einem Eiseinsatz wird die Kassette in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt und auf Eis gestellt. An die Kammer wird ein elektrisches Feld angelegt, aufgrund dessen die Proteine aus dem Gel in die PVDF-Membran einwandern, wo sie mittels hydrophober und polarer Wechselwirkungen binden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 120mA für 2 h aus dem Gel auf die PVDF-Membran „geblottet“.



**Abbildung 17: Schematische Darstellung des Western Blot Transferkassettenaufbaus**

*Aufbau innerhalb der Transferkassette von oben nach unten (entspricht auch der Transferrichtung): Kassettendeckel, Schwamm, Whatmanpapiere, Polyacrylamid-Gel, PVDF-Membran, Whatmanpapiere, Schwamm und Kassettenboden*

### 3.2.4.5 Detektion der Proteine

Nachdem die Proteine auf die PVDF-Membran übertragen worden sind, sind spezifische Proteinnachweise möglich. Wir verwendeten als Nachweismethode eine indirekte Proteindetektion.

Dazu werden zunächst unspezifische Bindungsstellen durch Schwenken der Membran in einer Milchpulverlösung (5% in T-TBS) blockiert. Anschließend wird die Lösung abgegossen und spezifische primäre Antikörper gegen die gesuchten Proteine werden, verdünnt in 5%iger Milchpulverlösung, über Nacht auf die Membran gegeben und bei 4°C inkubiert. Am Folgetag



wird die Milchpulver-Antikörper-Lösung abgekippt, die Membran mehrmals mit T-TBS gewaschen und anschließend ein sekundärer Antikörper, welcher den gebundenen Primärantikörper erkennt, verdünnt in 5%iger Milchpulverlösung bei Raumtemperatur zugegeben und für 1 h geschwenkt. Es folgt wiederum ein mehrmaliges Waschen der Membran mit T-TBS.

Mit Hilfe des Pierce ECL Western Blotting Substrats wird die PVDF-Membran entwickelt. Das Substrat enthält eine Peroxidase, die als Katalysator die Reaktion von Luminol oxidiert, wobei Lumineszenz entsteht, die wiederum in einem Chemilumineszenzgerät detektiert werden kann. Bei schwachen Proteinbanden wird zur Membranentwicklung der sensitivere Pierce™ Fast Western Blot Kit, SuperSignal™ West Femto genutzt.

Um verschiedene Proteine, deren Molekulargewicht und somit auch Proteinbanden auf der PVDF-Membran sehr nahe beieinanderliegen, gezielt nachweisen zu können, werden die spezifischen Primärantikörper getrennt voneinander zugegeben und die PVDF-Membran dazwischen mit dem Re-Blot Mild Plus von zuvor gebundenen Antikörpern gereinigt.

### **3.2.5 Statistik**

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden die Programme Microsoft Office Excel 2016 und GraphPad Prism 9 genutzt. Die Ergebnisse wurden als Boxplots dargestellt. Sie zeigen die Einzelwerte als Punkte, den Median und die Quartile, sowie Whiskers, die den Bereich zwischen Minimum und Maximum kennzeichnen. Als Signifikanztest wurde der Wilcoxon Vorzeichen-Rang Test verwendet. Der Hypothesenwert wurde auf 100%, beziehungsweise 1, gesetzt. Für alle Ergebnisse wurde das Signifikanzniveau mit  $p < 0.05$  festgelegt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Einfluss von Fluid Flow Shear Stress auf die Genexpression in MLO-Y4-Zellen**

Nach Applikation von FFSS wurde der Einfluss unterschiedlicher Flussraten auf die Expression verschiedener Gene analysiert. Zum einen wurden die sensiblen Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP mit den zugehörigen Rezeptoren (NK1R und CRLR/Ramp1) untersucht und zum anderen Faktoren, die die Osteoblasto- und Osteoklastogenese steuern (Primerliste Abschnitt 2.1.9). Die

absoluten Ct-Werte der Proben waren im Allgemeinen hoch, was einer niedrigen Genexpressionsrate entspricht (siehe absolute Ct-Werte Anhang Abschnitt 8.2). Daher kann nicht für alle untersuchten Gene eine Darstellung erfolgen, beziehungsweise ist die Anzahl der Einzelwerte (n) in den Graphen unterschiedlich.

Die Daten des FFSS-Versuchs werden als relative Genexpression RQ dargestellt. Sie zeigen die Expression eines Gene of interests (GOI) in den untersuchten Proben als Vielfaches der Genexpression in der Kontrolle (entspricht dem Kalibrator). Höhere Werte sprechen daher für eine n-fach höhere Expression des Gens in der Probe bezogen auf den Kalibrator.

Die Berechnung der relativen Genexpression RQ eines GOI ergibt sich nach folgender Formel:

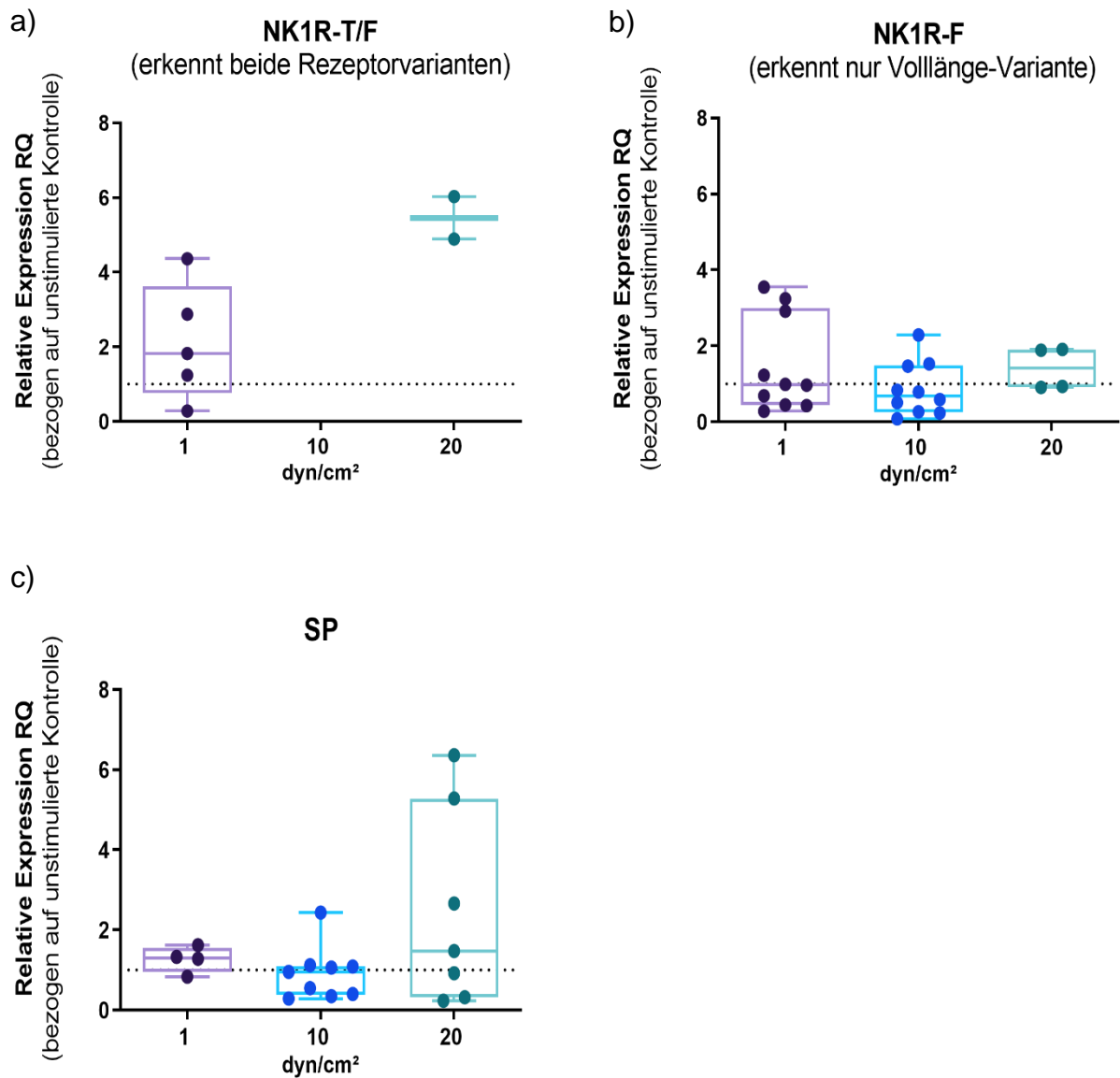
$$\begin{aligned}
 RQ &= 2^{-\Delta\Delta Ct} \\
 &= 2^{-[\Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}]} \\
 &= 2^{-[(Ct_{\text{GOI}} - Ct_{\text{Kalibrator}})_{\text{Probe}} - (Ct_{\text{GOI}} - Ct_{\text{Kalibrator}})_{\text{Kontrolle}}]} \\
 &= \frac{2^{(Ct_{\text{Kontrolle}} - Ct_{\text{Probe}})_{\text{GOI}}}}{2^{(Ct_{\text{Kontrolle}} - Ct_{\text{Probe}})_{\text{Kalibrator}}}}
 \end{aligned}$$

#### 4.1.1 Genexpression der Neuropeptidrezeptoren und Neuropeptide

##### 4.1.1.1 NK1R-F, NK1R-T und SP

Um die Expression der verschiedenen Isoformen des NK1R-Rezeptors zu detektieren, wurden Primer genutzt, die an die DNA-Sequenz vor der Deletion des C-Terminus binden und daher beide Isoformen (*NK1R-F* und *NK1R-T*) erkennen und Primer, die in dem Bereich der DNA des C-Terminus binden, die nur der *NK1R-F* aufweist. Da die N-terminalen Protein- und Nukleinsäuresequenzen von *NK1R-T* und *NK1R-F* identisch sind, ist eine gezielte Detektion und Unterscheidung des *NK1R-T* vom *NK1R-F* nicht möglich. Rückschlüsse auf die Expression der verkürzten Rezeptorvariante lassen sich daher nur aus der Differenz zwischen den Ergebnissen für die Volllänge-Variante (*NK1R-F*) und der Ergebnisse für beide Varianten (*NK1R-F* und *NK1R-T*) abschätzen. Werden Primer beziehungsweise Antikörper genutzt, die beide Rezeptorvarianten erkennen können, da sie im gemeinsamen N-terminalen Bereich binden, werden diese im Folgenden als NK1R-T/F bezeichnet. Kann aufgrund einer Bindung der Primer beziehungsweise Antikörper im verlängerten C-terminalen Bereich nur der *NK1R-F* erkannt werden, werden diese Primer respektive Antikörper als NK1R-F bezeichnet.

Die FFSS-Versuche wurden mit unveränderten MLO-Y4-Osteozyten durchgeführt. In zukünftigen Projekten können die Versuche mit den transduzierten MLO-Y4-Osteozyten durchgeführt werden und eventuelle Unterschiede in der Genexpression der GOI miteinander verglichen werden.



**Abbildung 18: Genexpression des Neurokinin1-Rezeptors und des zugehörigen Neuropeptids Substanz P nach FFSS.**

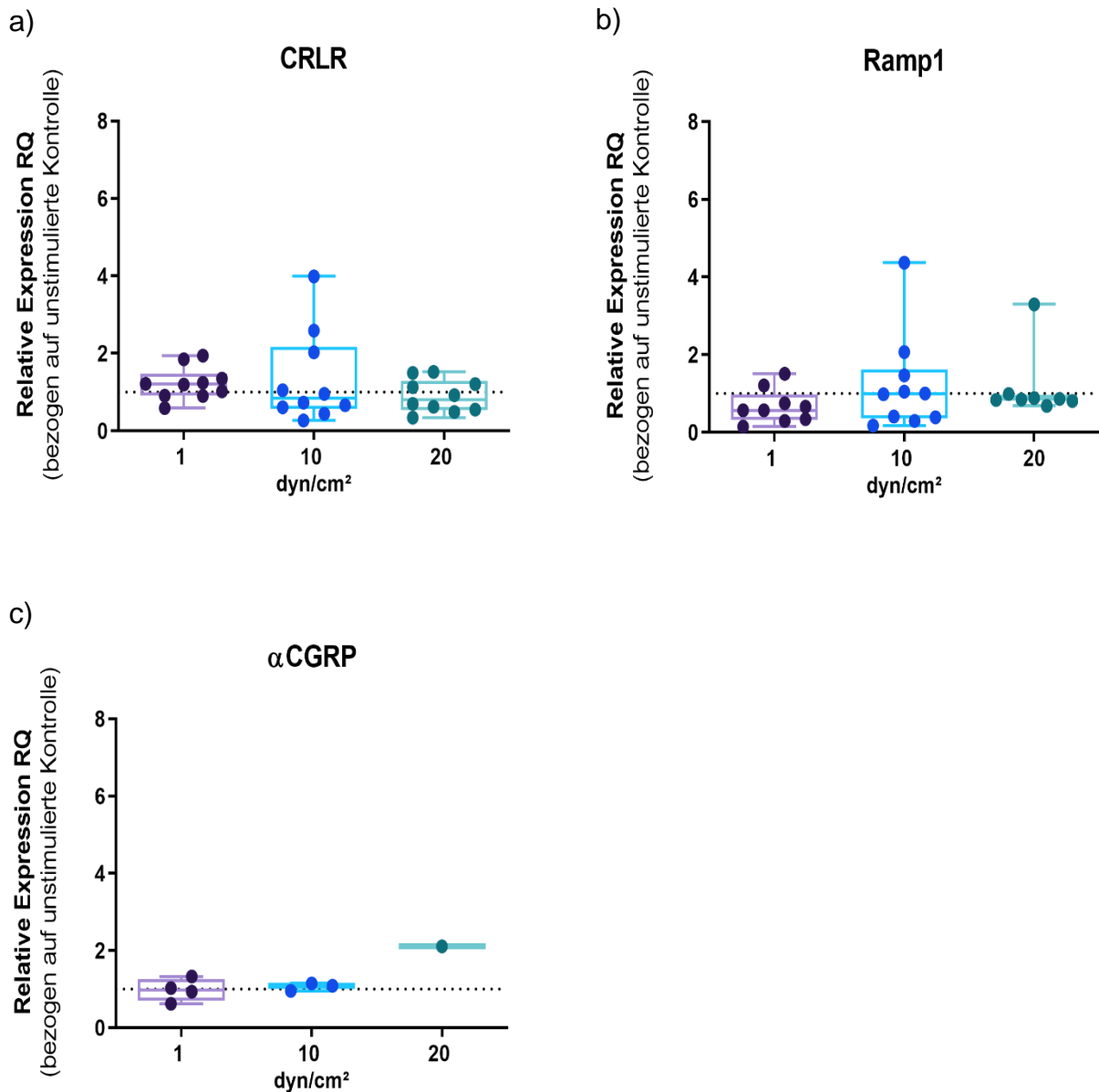
Einfluss von 2 Stunden 1 dyn/cm<sup>2</sup>, 10 dyn/cm<sup>2</sup> und 20 dyn/cm<sup>2</sup> FFSS auf die Genexpression des NK1R (a,b) und des Neuropeptids SP (c). Die Genexpression des NK1R wurde analysiert mit Primern, die beide Rezeptorvarianten erkennen (a) und Primern, die nur die Volllänge-Variante erkennen (b). Es konnten keine Werte für NK1R-T/F bei 10 dyn/cm<sup>2</sup> gemessen werden (no Cq), weshalb an dieser Stelle keine Daten abgebildet werden können. Darstellung

als relative Genexpression RQ mit Bezug auf unstimulierte MLO-Y4-Zellen (=1, Kalibrator, gestrichelte Linie) und die Genexpression der endogenen Kontrolle GAPDH als Normalizer. n = 2-10.

Die Applikation von FFSS in verschiedenen Druckstärken (1 dyn/cm<sup>2</sup>, 10 dyn/cm<sup>2</sup>, 20 dyn/cm<sup>2</sup>) hat nur einen geringen Einfluss auf die Genexpression beider *NK1R* Varianten (Abbildung 18 a), b)) sowie auf die Genexpression des Neuropeptids *SP* (c)). Ein starker FFSS (20 dyn/cm<sup>2</sup>) bewirkt eine etwas höhere Expression der mRNA des *NK1R-T/F* (a)). Tendenziell wird durch mittleren FFSS (10dyn/cm<sup>2</sup>) eine leicht verminderte Expression des *NK1R-T/F* induziert (a), b)).

#### **4.1.1.2 CRLR, Ramp1 und $\alpha$ CGRP**

Der Einfluss von FFSS auf die Genexpression der Untereinheiten des CGRP-Rezeptors, *CRLR* und *Ramp1*, und des Neuropeptids  $\alpha$ *CGRP* in der Osteozytenzelllinie MLO-Y4 wurde ebenfalls untersucht und erbrachte folgende Ergebnisse:



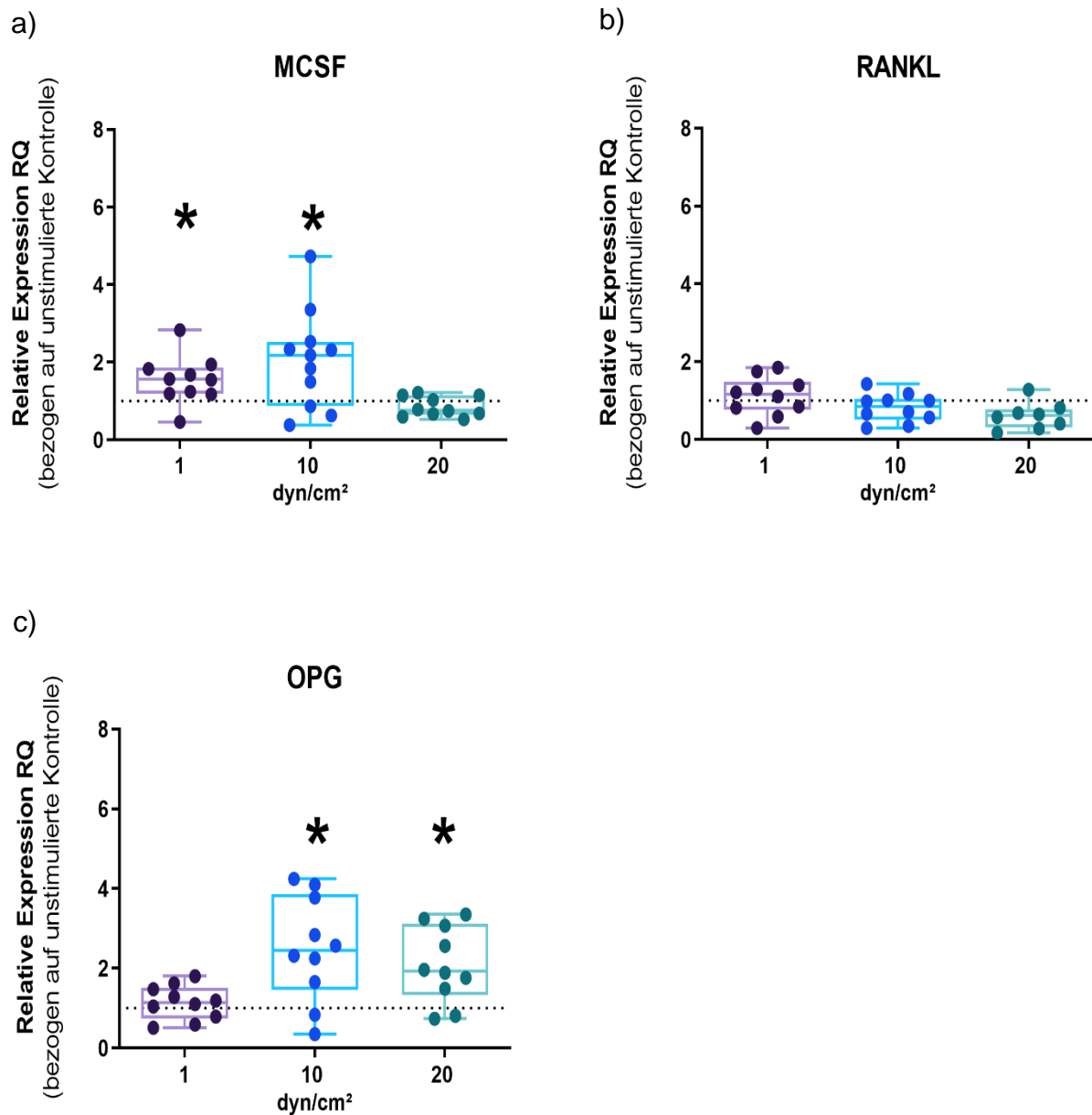
**Abbildung 19: Genexpression der Untereinheiten CRLR und Ramp1 des CGRP-Rezeptors und des Neuropeptids αCGRP nach FFSS.**

Der Einfluss von 2 Stunden 1 dyn/cm<sup>2</sup>, 10 dyn/cm<sup>2</sup> und 20 dyn/cm<sup>2</sup> FFSS auf die Genexpression der Untereinheiten des CGRP-Rezeptors und des Neuropeptids αCGRP. Die Genexpression der Untereinheiten CRLR (a) und des Ramp1 (b), welche gemeinsam den CGRP-Rezeptor bilden und des Neuropeptids αCGRP (c). Darstellung als relative Genexpression RQ mit Bezug auf unstimulierte MLO-Y4-Zellen (=1, Kalibrator, gestrichelte Linie) und die Genexpression der endogenen Kontrolle GAPDH als Normalizer. n = 1-10.

Die Genexpression der CGRP-Rezeptor Untereinheiten CRLR und Ramp1 wird durch die Applikation von FFSS kaum beeinflusst (Abbildung 19 a), b)). Starker FFSS (20 dyn/cm<sup>2</sup>) bewirkt eine tendenzielle Hochregulierung der mRNA des Neuropeptids αCGRP (c)).

#### **4.1.2 Genexpression von regulatorischen Proteine der Osteoklastogenese**

Osteozyten können durch differentielle Expression des Monozytendifferenzierungsfaktors *MCSF*, des Osteoklastendifferenzierungsmarkers *RankL* und des löslichen RankL-Rezeptors *OPG* steuernden Einfluss auf die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten nehmen. Der Einfluss von unterschiedlich starkem FFSS auf die Genexpression von *MCSF*, *RankL* und *OPG* in Osteozyten der MLO-Y4-Zelllinie zeigte folgende Ergebnisse:



**Abbildung 20: Genexpression von MCSF, RankL und OPG nach FFSS.**

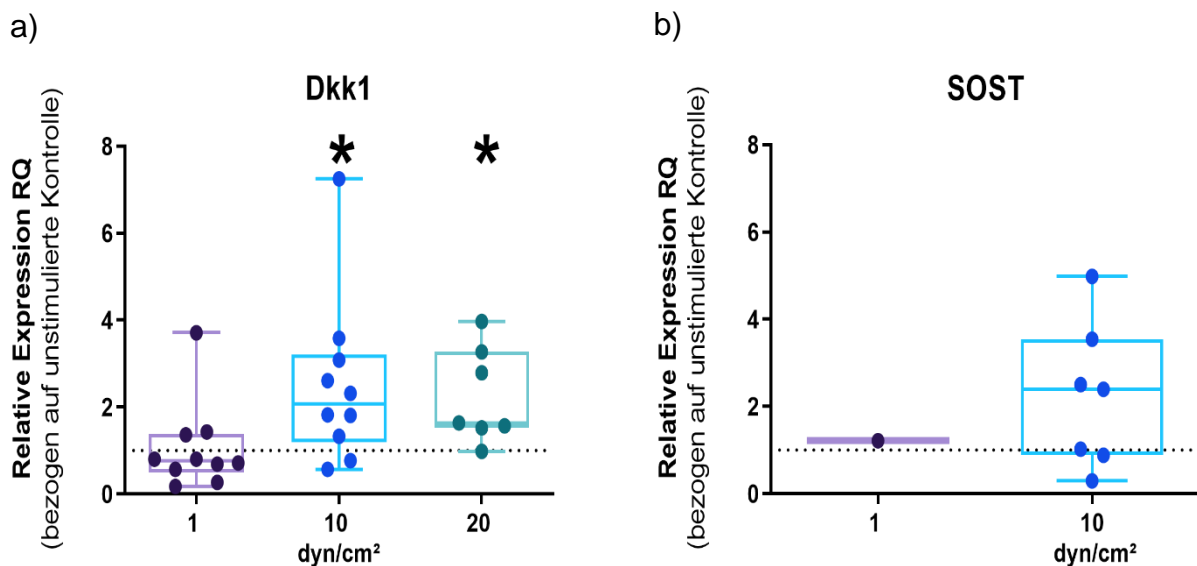
Der Einfluss von 2 Stunden 1 dyn/cm<sup>2</sup>, 10 dyn/cm<sup>2</sup> und 20 dyn/cm<sup>2</sup> FFSS auf die Genexpression von MCSF (a), sowie auf die Genexpression von RankL (b) und von OPG (c). Darstellung als relative Genexpression RQ mit Bezug auf unstimulierte MLO-Y4-Zellen (=1, Kalibrator, gestrichelte Linie) und die Genexpression der endogenen Kontrolle GAPDH als Normalizer. n = 8-11. \*p < 0,05 (Wilcoxon Vorzeichen-Rang Test).

FFSS in Stärke von 1 und 10 dyn/cm<sup>2</sup> bewirkt eine signifikante Hochregulierung der mRNA für den Monozytendifferenzierungsmarker *MCSF* (Abbildung 20 a)). Mit zunehmendem FFSS nimmt die Genexpression von *RankL* tendenziell ab, ein signifikanter Einfluss auf die

Expression von *RankL* wird jedoch nicht beobachtet (b)). Bei einem mittleren FFSS (10 dyn/cm<sup>2</sup>) und bei 20 dyn/cm<sup>2</sup> wird eine signifikante Hochregulierung der Genexpression des löslichen RankL-Rezeptors *OPG* beobachtet (c)).

#### 4.1.3 Genexpression von Osteogenese-Inhibitoren

Durch Expression der Wnt5a/β-catenin-Signalweg-Inhibitoren *Dkk1* und *SOST* nehmen Osteozyten regulierenden Einfluss auf die Osteoblastendifferenzierung und –aktivität und sind so in der Lage, den Knochenumbau zu steuern. Wir untersuchten den Einfluss von FFSS unterschiedlicher Stärke auf die Genexpression der Inhibitoren *Dkk1* und *SOST*.



**Abbildung 21: Genexpression von *Dkk1* und *SOST* nach FFSS.**

Der Einfluss von 2 Stunden 1 dyn/cm<sup>2</sup>, 10 dyn/cm<sup>2</sup> und 20 dyn/cm<sup>2</sup> FFSS auf die Genexpression der Wnt5a/β-catenin-Signalweg-Inhibitoren *Dkk1* (a) und *SOST* (b). Darstellung als relative Genexpression RQ mit Bezug auf unstimulierte MLO-Y4-Zellen (=1, Kalibrator, gestrichelte Linie) und die Genexpression der endogenen Kontrolle *GAPDH* als Normalizer. n = 1-10. \*p < 0,05 (Wilcoxon Vorzeichen-Rang Test).

Die Genexpression von *Dkk1* wird durch Applikation von mittelstarkem (10 dyn/cm<sup>2</sup>) und starkem (20 dyn/cm<sup>2</sup>) FFSS signifikant hochreguliert (Abbildung 21 a)). Die Ct-Werte für *SOST* sind in unstimulierten MLO-Y4-Zellen nicht detektierbar, wie in der Literatur für diese Zelllinie bereits beschrieben wurde (16). Die Anwendung von 10 dyn/cm<sup>2</sup> bewirkt eine Induktion der



Genexpression von *SOST* und impliziert eine FFSS sensitive Genexpression bei mittelstarkem Druck (b)). Bei sehr starkem FFSS (20 dyn/cm<sup>2</sup>) konnten keine Werte für *SOST* gemessen werden, weshalb keine Darstellung von Werten bei diesem Druck erfolgte.

## 4.2 Überprüfung der Transformation und Transduktion der NK1R-Isoformen in MLO-Y4-Zellen

Zur Überprüfung, ob die lentivirale Transduktion der NK1R-Isoformen in MLO-Y4-Osteozyten zum Zweck einer Überexpression der Rezeptoren erfolgreich war, wurden transduzierte Zellen auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR und auf Proteinebene mittels Western Blot (WB) untersucht.

### 4.2.1 Überprüfung auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR

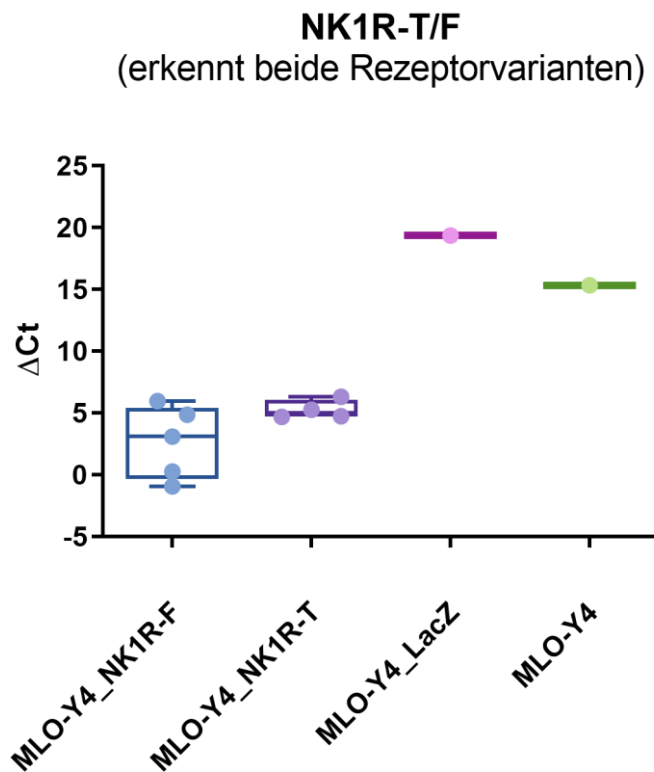
Für die qRT-PCR wurden Zellen mehrerer Passagen, die mit einer Virusverdünnung von 1:2 behandelt worden waren, getestet. Die  $\Delta$ Ct-Werte der NK1R-überexprimierenden MLO-Y4 Zellen (MLO-Y4\_NK1R-T oder MLO-Y4\_NK1R-F) wurden mit MLO-Y4-Zellen, denen der LacZ-Kontrollvektor transduziert worden war (MLO-Y4\_LacZ) und unbehandelten MLO-Y4-Zellen (MLO-Y4) verglichen. Die Expression der Rezeptorvarianten wurde analog zu den FFSS-Versuchen mit zweierlei Primern für den NK1R getestet: Der Primer NK1R-T/F bindet im Anfangsbereich der Gensequenzen, dem Bereich, in dem die Rezeptorisoformen übereinstimmen und erkennt daher auch beide Varianten. Der Primer NK1R-F bindet in dem C-terminalen Bereich, der nur für die Vollängen-Variante des Rezeptors codiert. *GAPDH* dient als endogene Expressionskontrolle (Primerliste Abschnitt 2.1.9).

Die Darstellung der Rezeptorgenexpression erfolgt als  $\Delta$ Ct-Wert bezogen auf die endogene Kontrolle. Ein niedriger Wert entspricht somit einer hohen Genexpression in den getesteten Proben. Die Berechnung ergibt sich aus folgender Formel:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Rezeptorgen}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$$

Auch hier waren die absoluten Ct-Werte hoch (siehe absolute Ct-Werte Anhang Abschnitt 8.4), insbesondere in den Kontrollproben (MLO-Y4\_LacZ und MLO-Y4), was einer niedrigen

Genexpressionsrate in diesen Proben entspricht. Es kann daher nicht für alle getesteten Proben eine Darstellung erfolgen und die Anzahl der Einzelwerte (n) in den Graphen variiert.

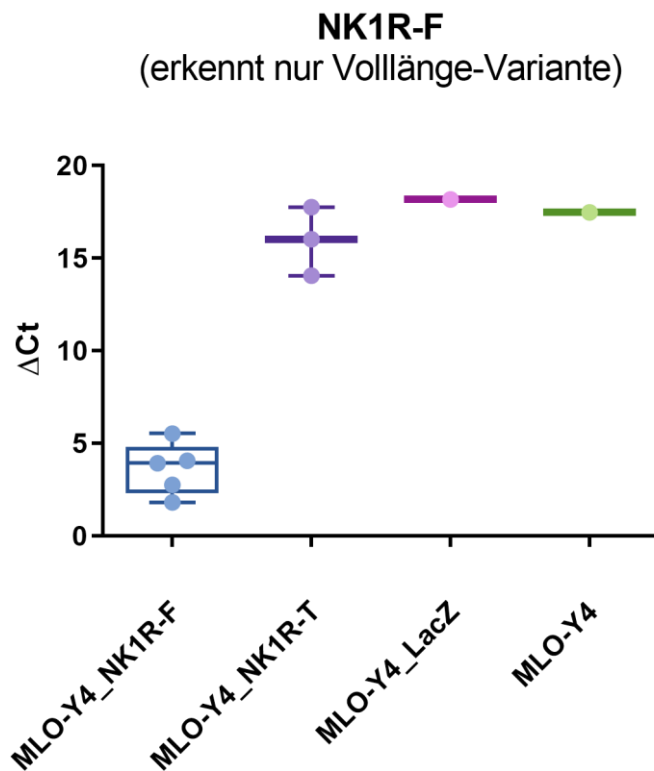


**Abbildung 22: Genexpressionsanalyse der NK1R Varianten in MLO-Y4-Zellen nach Transduktion mit pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F, pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T und dem Kontrollvektor pLenti6/V5-GW/LacZ.**

Vergleich der  $\Delta Ct$ -Werte der Genexpressionsanalyse von NK1R-T/F (erkennt die beiden Rezeptor-Varianten NK1R-T und NK1R-F). In die MLO-Y4-Zellen war das Überexpressionsplasmid der Volllänge-Variante des NK1R, pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F, mit Generierung der Zellen MLO-Y4\_NK1R-F, die verkürzte Variante des NK1R, pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T, mit Generierung der Zellen MLO-Y4\_NK1R-T oder der Kontrollvektor pLenti6/V5-GW/LacZ, mit Generierung der Zellen MLO-Y4\_LacZ transduziert worden. Ebenfalls dargestellt sind unbehandelten MLO-Y4-Zellen, in die kein Plasmid transduziert wurde (MLO-Y4). Die absoluten Ct-Werte für MLO-Y4\_LacZ und MLO-Y4 waren insgesamt sehr hoch oder nicht messbar (no Cq), was einer niedrigen Genexpressionsrate entspricht. Es konnte nur für jeweils einen Wert ein Messwert erhoben werden. Die  $\Delta Ct$ -Werte sind auf die Genexpression der endogenen Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen. n = 1-5.

Die  $\Delta Ct$ -Werte der Überexpressionsklone MLO-Y4\_NK1R-F und der MLO-Y4\_NK1R-T sind niedriger als der NK1R  $\Delta Ct$ -Wert der Kontrolle MLO-Y4\_LacZ und der unbehandelten

Kontrolle MLO-Y4 (wesentlich höhere  $\Delta Ct$ -Werte oder kein Wert messbar) (Abbildung 22). Das bedeutet, dass beide Rezeptorvarianten erfolgreich überexprimiert werden.



**Abbildung 23: Genexpressionsanalyse von NK1R-F in MLO-Y4-Zellen nach Transduktion mit pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F, pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T und dem Kontrollvektor pLenti6/V5-GW/LacZ.**

Vergleich der  $\Delta Ct$ -Werte der Genexpressionsanalyse von NK1R-F (erkennt nur NK1R-F). In die getesteten MLO-Y4-Zellen war das Überexpressionsplasmid der Volllänge-Variante des NK1R, pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F, mit Generierung der Zellen MLO-Y4\_NK1R-F, die verkürzte Variante des NK1R, pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T, mit Generierung der Zellen MLO-Y4\_NK1R-T oder der Kontrollvektor pLenti6/V5-GW/LacZ, mit Generierung der Zellen MLO-Y4\_LacZ eingebracht worden. Ebenfalls dargestellt sind unbehandelten MLO-Y4-Zellen, in die kein Plasmid transduziert wurde (MLO-Y4). Die absoluten Ct-Werte für MLO-Y4\_LacZ und MLO-Y4 waren insgesamt sehr hoch oder nicht messbar (no Cq), was einer niedrigen Genexpressionsrate entspricht. Es konnte nur für jeweils einen Wert ein Messwert erhoben werden. Die  $\Delta Ct$ -Werte sind auf die Genexpression der endogenen Kontrolle GAPDH (Normalizer) bezogen.  $n = 1-5$ .

Die  $\Delta Ct$ -Werte der MLO-Y4-Osteozyten, die mit der verkürzten Variante des NK1R (MLO-Y4\_NK1R-T), dem Kontrollvektor pLenti6/V5-GW/LacZ (MLO-Y4\_LacZ) transduziert wurden oder ohne Überexpressionsplasmid (MLO-Y4) verblieben sind, sind deutlich höher als

die  $\Delta$ Ct-Werte der MLO-Y4 mit dem transduzierten NK1R-F (MLO-Y4\_NK1R-F) oder überhaupt nicht detektierbar (Abbildung 23). Dies entspricht einer höheren Genexpression des *NK1R-F* im transduzierten Klon verglichen mit dem Kontrollklon (MLO-Y4\_LacZ) und den unbehandelten Kontrollen. Da der Primer die *NK1R-T* Variante nicht erkennt, kann man von einer erfolgreichen Überexpression des *NK1R-F* ausgehen.

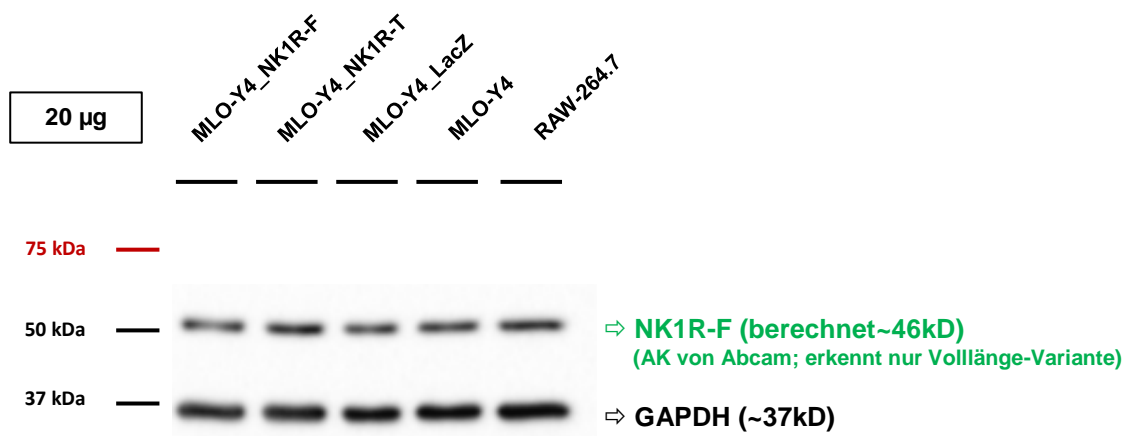
#### 4.2.2 Überprüfung der Expression der Rezeptorvarianten auf Proteinebene mittels

##### Western Blot

Zur Überprüfung der Rezeptortransduktion auf Proteinebene wurden mittels Western Blot je 20  $\mu$ g Protein von unterschiedlichen Zelltypen/-klonen auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern, welche beide (NK1R-T/F, Antikörper der Firma Novus) oder nur eine (NK1R-F, Antikörper der Firma Abcam) Rezeptorisofom detektieren können, behandelt (siehe Abbildung 8 Einleitung). Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um MLO-Y4-Osteozyten, in die eine Variante des *NK1R* transduziert worden war (MLO-Y4\_NK1R-F oder MLO-Y4\_NK1R-T), beziehungsweise der *LacZ*-Kontrollvektor (MLO-Y4\_LacZ). Außerdem werden zum Vergleich noch unbehandelte MLO-Y4-Osteozyten (MLO-Y4) und eine murine Makrophagen-Zelllinie (RAW 264.7), die den NK1R nachgewiesenermaßen exprimieren (65), aufgetragen. Die Detektion von GAPDH dient als endogene Ladekontrolle (Antikörperliste Abschnitt 2.1.10). Eine erfolgreiche Überexpression der Neurokinin1-Rezeptoren in den transduzierten Zellen sollte sich optisch als intensiver gefärbte Bande, im Vergleich zu MLO-Y4\_LacZ-Zellen und unbehandelten MLO-Y4-Zellen, zeigen.

Abgebildet ist zweimal dieselbe Membran. Sie wurde, um die verschiedenen NK1R-Rezeptoren eindeutig zu zeigen, nach der ersten Zugabe der Primärantikörper (Antikörper gegen NK1R-F und GAPDH) mit dem Re-Blot Mild Plus Kit von allen zuvor gebundenen Antikörpern gereinigt und anschließend mit dem Primärantikörper gegen den NK1R, der beide Varianten erkennt (Antikörper gegen NK1R-T/F von Novus) inkubiert. Die Suche nach einem geeigneten Antikörper, welcher den NK1R-T/F nachweist, gestaltete sich als schwierig. In allen ausgetesteten Antikörpern zeigten sich mehrere unspezifische Banden in den Blots. Mögliche Gründe hierfür werden im Abschnitt 5.2.7 diskutiert. Ein spezifischer Nachweis des NK1R-F mit dem Antikörper der Firma Abcam gelang in den Antikörper-Etablierungsblots. Wir entschieden uns in der Konsequenz für ein „zweizeitiges“ Vorgehen mit Anwendung des Re-Blot Mild Plus Kits und getrennter Inkubation der PVDF-Membran mit den NK1R-

Antikörpern. Trotz der Verwendung eines suboptimalen Antikörpers für NK1R-T/F und dem möglicherweise Auftreten mehrerer unspezifischer Banden sollte so eine eindeutige Zuordnung der NK1R-F- Banden möglich sein. Eine Überlagerung von unspezifischen Banden unter Verwendung des Antikörpers von Novus (erkennt NK1R-T und NK1R-F) mit den spezifischen Banden für den NK1R-F (Antikörper von Abcam) wird so verhindert. Der Nachweis für eine identische Proteinkonzentration in den aufgetragenen Proben, die durch eine identische intensive Färbung der GAPDH-Bande in allen dargestellten Proben sichtbar ist, gilt, da es sich um dieselbe Membran handelt, für beide Abbildungen (Abbildung 24 und 25).



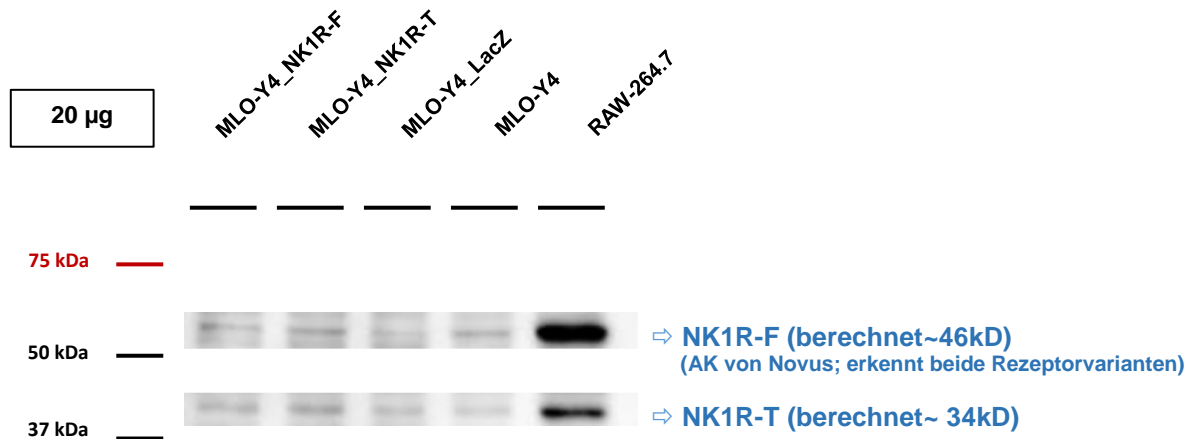
entwickelt: **Pierce ECL normal: 33,8 sec**

**Abbildung 24: Rezeptorprotein-Expressionsanalyse von NK1R-T/F in MLO-Y4-Zellen nach Transduktion mit pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F, pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T und dem Kontrollvektor pLenti6/V5-GW/LacZ im Vergleich zu unbehandelten Zellen (MLO-Y4) und murinen Makrophagen (RAW-264.7).**

Vergleich der Intensität der detektierten Proteinbanden von NK1R-F (erkennt nur NK1R-F) und GAPDH als Normalizer in je 20 µg Proteinmenge aus verschiedenen Zellklonen / -typen. In die getesteten MLO-Y4-Zellen war das Überexpressionsplasmid der Volllänge-Variante des NK1R (MLO-Y4\_NK1R-F), die verkürzte Variante des NK1R (MLO-Y4\_NK1R-T) oder der Kontrollvektor pLenti6/V5-GW/LacZ (MLO-Y4\_LacZ) eingebracht worden. Ebenfalls dargestellt sind unbehandelten MLO-Y4-Zellen, in die kein Plasmid transduziert wurde (MLO-Y4), sowie murine Makrophagen (RAW-264.7), die als positiv Kontrolle für den NK1R fungieren. Die Intensität der gefärbten Proteinbanden ist in Relation zu der Intensität der endogenen Kontrolle GAPDH (Normalizer) zu werten. Das Bild wurde unter Zuhilfenahme des Pierce ECL Kits 33,8 Sekunden entwickelt.

Die Proteinbanden, die auf Höhe des NK1R-F liegen (ca. 46 kD) sind in allen aufgetragenen Proben deutlich zu sehen. Eine ausgeprägte Mehrfärbung einer Bande im Vergleich zu den

anderen lässt sich nicht festhalten. Die Abbildung von GAPDH als endogene Kontrolle und Nachweis einer gleich aufgetragenen Proteinmenge ist ebenfalls in allen Proben deutlich sichtbar und gleich intensiv (Abbildung 24).



entwickelt: Pierce ECL femto: 122,8 sec

**Abbildung 25: Rezeptorproteinexpressionsanalyse von NK1R-T/F in MLO-Y4-Zellen nach Transduktion mit pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F, pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T und dem Kontrollvektor pLenti6/V5-GW/LacZ im Vergleich zu unbehandelten Zellen (MLO-Y4) und murinen Makrophagen (RAW-264.7).**

Vergleich der Intensität der detektierten Proteinbanden von NK1R-T/F in je 20 µg Gesamtproteinmenge aus verschiedenen Zellklonen/-typen. In die getesteten MLO-Y4-Zellen war das Überexpressionsplasmid der Volllänge-Variante des NK1R (MLO-Y4\_NK1R-F), die verkürzte Variante des NK1R (MLO-Y4\_NK1R-T) oder der Kontrollvektor pLenti6/V5-GW/LacZ (MLO-Y4\_LacZ) transduziert worden. Ebenfalls dargestellt sind unbehandelten MLO-Y4-Zellen, in die kein Plasmid transduziert wurde (MLO-Y4), sowie murine Makrophagen (RAW-264.7), die als positive Kontrolle für den NK1R fungieren. Die Intensität der gefärbten Proteinbanden ist in Relation zu der Intensität der endogenen Kontrolle GAPDH (Normalizer) zu werten. Das Bild wurde unter Zuhilfenahme des Pierce ECL femto Kits 122,8 Sekunden entwickelt.

Im dargestellten Blotbild sind Proteinbanden auf Höhe des NK1R (ca 46 kD) in allen MLO-Y4 Proben nur schwach zu erkennen, am wenigsten intensiv für die Probe aus den MLO-Y4\_LacZ-Zellen. Eine sehr deutliche Bande, passend für den Neurokinin1-Rezeptor in seinen beiden Varianten, zeigt sich in den RAW 264.7-Zellen. Insgesamt besitzt das Blotbild viel Hintergrund und unspezifische Banden in allen aufgetragenen Proben. Die Blotentwicklung wurde mit

einem sehr sensitiven Kit (Pierce ECL femto) und langer Entwicklungsdauer (122, 8 Sekunden) durchgeführt (Abbildung 25).

## **5 Diskussion**

### **5.1 Eignung und Limitationen des FFSS-Versuchs**

Mechanische Belastung bewirkt eine Flussänderung im LCS und damit einhergehend wird Shear Stress auf die umspülten Dendriten von Osteozyten ausgeübt (6) (siehe Review (124)). Um die Auswirkungen von unterschiedlich starkem FFSS auf die murinen MLO-Y4-Osteozyten zu testen, musste zunächst eine geeignete Methode etabliert werden. Wir nutzten ein Pumpensystem und  $\mu$ -Slides, um FFSS unterschiedlicher Stärke zu generieren. Im Versuchsaufbau ergaben sich folgende Limitationen:

#### **5.1.1 Fluid Flow Shear Stress Stärke**

Zum aktuellen Zeitpunkt der Forschung herrscht noch Uneinigkeit über die exakte Stärke des vorherrschenden FFSS *in vivo*, weshalb verschiedene Angaben dazu in der Literatur gefunden werden können (siehe Tabelle 2, Abschnitt 3.2.2).

In unserem Versuch nutzten wir eine FFSS-Druckstärke von 1 dyn/cm<sup>2</sup>, 10 dyn/cm<sup>2</sup> und 20 dyn/cm<sup>2</sup>, um sowohl einen geringen FFSS von 1 dyn/cm<sup>2</sup>, der laut Bonewald et al. (7) mit Bezug auf die Berechnungen von Wang et al. (135) als Druckstärke des ständigen Grundflusses angegeben wird, als auch stärkere FFSS (10 dyn/cm<sup>2</sup> und 20 dyn/cm<sup>2</sup>), die nach mechanischer Belastung von Knochen angenommen werden: Eins der älteren mathematischen Modelle zur Berechnung des FFSS im LCS stammt von Weinbaum et al. (29). In dieser Publikation gehen die Forscher davon aus, dass im Knochen nach Belastung ein FFSS-Spitzenruck von 8 bis zu 30 dyn/cm<sup>2</sup> entsteht, abhängig vom Ausmaß der Knochendeformation. Mi et al. berechneten für den Flüssigkeitsstrom in Truthahnknochen nach mechanischer Belastung in Form von Knochendeformation und axialer Stauchung einen Spitzenruck von 18 dyn/cm<sup>2</sup> (136). Lu et al. nutzten in ihrer Studie zur Untersuchung der Kalziumantwort in MLO-Y4-Zellen nach einem Stimulus der Zellen durch FFSS, ebenso wie wir, einen Spitzenruck von 20 dyn/cm<sup>2</sup> (33).

Wir beschränkten uns in unserem Versuchsaufbau auf die drei angeführten Druckstärken, zum einen deshalb, weil wir davon ausgehen, damit in dem tatsächlichen *in vivo* vorherrschenden Druckbereich zu liegen, da nur Weinbaum et al. von stärkeren Drücken als 20 dyn/cm<sup>2</sup> ausgehen (29). Zum anderen mussten auch Limitationen seitens des verwendeten Schlauch-, Pumpen-, und  $\mu$ -Slidematerials bedacht werden (siehe Berechnung Anhang Abschnitt 8.1). Es besteht die Möglichkeit, dass durch die verwendeten Druckstärken die tatsächlich vorherrschenden Druckverhältnisse nicht erfasst werden. Eine differenziertere Betrachtung durch Verwendung weiterer Druckstärken, die auch zwischen den hier erhobenen liegen, könnte für zukünftige Versuche sinnvoll sein, um eventuelle Tendenzen in der Regulation diverser Faktoren nach FFSS-Belastung genauer zu erfassen.

### 5.1.2 Verwendete Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von FFSS auf eine Osteozyten-Zelllinie betrachtet. Hierfür verwendeten wir MLO-Y4-Zellen, die dem Differenzierungsstadium von frühen murinen Osteozyten entsprechen (137). Aufgrund ihrer Charakteristik sind MLO-Y4-Zellen sehr gut geeignet, um mechanische Effekte auf Osteozyten *in vitro* zu analysieren. So bilden MLO-Y4-Osteozyten beispielsweise Dendriten aus, die sich auch zwischen den Zellen über „Gap Junctions“ verbinden. Sie reagieren auf FFSS unter anderem mit der Freisetzung von Prostaglandinen, einer Hochregulierung von Gap Junction-Komponenten, der Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -catenin-Signaltransduktionswegs und der Öffnung von Hemi-Kanälen. Sie können Einfluss auf Osteoklasten nehmen und besitzen ein primäres Cilium. Eine entscheidende Limitation der MLO-Y4-Zellen besteht darin, dass sie sich in einem frühen Osteozytenentwicklungsstadium befinden und eine Aussage über das Verhalten reifer Osteozyten aus den Ergebnissen somit nur eingeschränkt möglich ist (siehe Review (16)). Ebenso organisieren sich die Zellen nicht wie *in vivo* in Osteonen, sondern wachsen nur in einer Ebene. Auch kann die Komplexität des Knochenaufbaus, die neben Osteozyten auch Osteoklasten, -blasten, Blut- und Nervengefäße, sowie zahlreiche weitere Faktoren umfasst, nur bedingt durch das verwendete Modell abgebildet werden. Diese Einschränkung gilt allerdings für alle *in vitro* Zellkultur-Modelle.



### 5.1.3 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau zur Belastung von MLO-Y4-Zellen mit FFSS nutzte eine Heizplatte und Wärmebäder (mit Alufolie ummantelte und mit 37°C temperierten Wasser gefüllten Erlenmayerkolben) zum Wärmeerhalt des durch das Schlauchsystem gepumpten Nährmediums. Aufgrund der Tatsache, dass der Versuch am Laborplatz durchgeführt wurde, waren sowohl die Schläuche, als auch die Zellen enthaltenden  $\mu$ -Slides während des Versuchs der Umgebungstemperatur (Raumtemperatur) ausgesetzt. Ein geringes Abkühlen des Nährmediums während des Versuchs innerhalb des Schlauchsystems ist aus diesem Grund nicht auszuschließen, wobei das Medium insgesamt nur eine kurze Zeit zum Durchlauf des Versuchsaufbaus benötigte (längstens 8,49 min (20 dyn/cm<sup>2</sup>), kürzestens 1,29 min (10 dyn/cm<sup>2</sup>)) (siehe Berechnung Tabelle 5 Anhang Abschnitt 8.1.1). Die unterschiedlichen Zeiten ergeben sich durch die verschiedenen zu verwendenden Kombinationen aus Drehzahl der Pumpe und Schlauch- und  $\mu$ -Slidegröße, um die erwünschten Druckstärken erzeugen zu können. Die Gesamtlaufzeit für die RNA-Versuche betrug insgesamt nur 2 Stunden, eine relativ konstante Temperatur über diesen kurzen Zeitraum ist daher anzunehmen. Je  $\mu$ -Slide wurden zwei der Gänge keinem FFSS ausgesetzt, sie dienten als unbelastete Kontrolle. Die verwendeten  $\mu$ -Slides der Firma ibidi bestehen aus Gasdurchlässigen Polymer, es bestand daher zu jeder Zeit ein CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Austausch der Zellen. Mittels pH Indikatorpapier wurde zudem keine Veränderung des pH-Wertes in dem Zellkulturüberstand der unbelasteten Zellen, deren Gänge für die Dauer des Versuchs mit Polymer-Deckeln abgedeckt wurden, gegenüber dem pH des Zellkulturüberstands zu Beginn der Belastung und dem pH des Zellkulturüberstands aus den belasteten Zellen festgestellt.

Es wurde während des Versuchs darauf geachtet, dass die Schläuche spannungsfrei in der Pumpe lagen. Außerdem wurden die  $\mu$ -Slides auf einer Styroporplatte befestigt, die die Höhe der Heizplatte hatte, um einem Höhenunterschied innerhalb des Kreislaufs vorzubeugen. Nichtsdestotrotz ergab sich durch die Höhe der Erlenmayerkolben ein geringer (etwa 3cm) Höhenunterschied, der jedoch zu vernachlässigen ist.

Der Anschluss der  $\mu$ -Slides an die Schlauchverbindungen zu Beginn eines Versuchsdurchlaufs, sowie die weitere Verarbeitung der Proben nach dem Durchlauf erfolgte umgehend.

## 5.2 Genexpression der sensiblen Neuropeptide und ihrer Rezeptoren

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht inwieweit eine Regulation der Genexpression der Neuropeptide *SP* und  $\alpha$ *CGRP* sowie ihrer Rezeptoren *NK1R* in beiden Isoformen und *CRLR/Ramp1* nach FFSS in unterschiedlichen Stärken in MLO-Y4-Osteozyten erfolgt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche an unveränderten (das heißt an MLO-Y4-Zellen ohne Gentransduktion von *NK1R*-Isoformen) durchgeführt.

### 5.2.1 *NK1R-T/F*, *NK1R-F* und *NK1R-T* und *SP*

Backman et al. beobachteten in ihrer Studie mit primären Tenozyten, die Dehnungsstress ausgesetzt worden waren, eine Zunahme der *SP*-mRNA nach mechanischer Belastung und eine Abnahme der Expression des *NK1R* (138). Ytteborg et al. betrachteten in ihren Versuchen die Auswirkung mechanischer Belastung in Form von erhöhter Schwimmaktivität auf die Expression des *NK1R* und *SP* in Osteozyten und Osteoblasten des Seelachs' (139). Dabei zeigte sich eine erhöhte Expression von *SP* und dem *NK1R* nach mechanischer Belastung. Übereinstimmend mit der Literatur konnten auch wir eine geringe Hochregulierung der *SP* mRNA unter starkem FFSS feststellen. Für den *NK1R* zeigten unsere Ergebnisse allerdings weder eine Ab- noch Zunahme der Expression, sondern vielmehr eine stabile Genexpression über die verschiedenen FFSS-Druckstärken. Die unterschiedlichen Ergebnisse können zum einen darin begründet sein, dass unterschiedliche Zelltypen untersucht wurden (z.B.: Tenozyten), zum anderen wurde in unserer Studie eine Osteozyten-Zelllinie *in vitro* getestet, während Ytteborg et al. *in vivo* Experimente in einer anderen Spezies durchgeführt haben. Darüber hinaus betrachteten wir den *NK1R* in seinen beiden Isoformen *NK1R-F* und *NK1R-T*, was in den beiden hier angeführten Vergleichsstudien nicht berücksichtigt wurde. Veränderungen in der Genexpression, die nur eine der beiden Rezeptorformen betreffen, können aus diesem Grund nur bedingt mit anderen Studien, die keine Unterscheidung der *NK1R*-Varianten machen, verglichen werden.

Maximaler FFSS (20 dyn/cm<sup>2</sup>) zeigte in unseren Versuchen eine Zunahme der Genexpression des *NK1R-T/F* sowie eine geringere Zunahme der Expression des *NK1R-F*. Da die beiden Isoformen des *NK1R* bis auf die Deletion des C-Terminus identisch aufgebaut sind, ist eine gezielte Detektion ausschließlich des *NK1R-T* nicht möglich. Bei der Auswertung der Ergebnisse für den *NK1R-T/F*, in welche die Ergebnisse für beide Isoformen eingehen, muss daher eine Regulation des *NK1R-T* und damit eine Beeinflussung des Gesamtergebnisses

bedacht werden. Rückschlüsse auf eine mögliche veränderte Expression des *NK1R-T* können aus dem Vergleich des *NK1R-T/F* mit den Werten für den *NK1R-F* gezogen werden. Im vorliegenden Fall zeigt sich ein deutlicher Unterschied bei einer Belastung von 20 dyn/cm<sup>2</sup>. Die Genexpression des *NK1R-T/F* ist in etwa dreimal höher als die Genexpression des *NK1R-F*. Möglicherweise wird also bei sehr starkem FFSS, möglicherweise sogar pathologisch hoch, die Genexpression des *NK1R-T* induziert. Für die These, dass unter pathologischen Umständen mehr *NK1R-T* gebildet wird, sprechen die Beobachtungen in mehreren publizierten Studien mit unterschiedlichen Zelltypen: Eine starke Hochregulation des *NK1R-T* wird beispielsweise in einer Studie von Gillespie et al. in Kolonkarzinomzellen beobachtet (116). Dabei zeigt sich eine Erhöhung der *NK1R-T* Expression in Relation zu dem Dysplasiegrad der Kolonkarzinomzellen. In Brustkrebszellen (140) und in Blutzellen der akuten myeloischen Leukämie konnten ebenfalls Korrelationen zwischen der Expression des *NK1R-T* und dem Grad der Malignität hergestellt werden (141). Eine eindeutige Aussage, ob die *NK1R-T* Bildung mit der Stärke des FFSS in Zusammenhang gebracht werden kann, ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse jedoch schwierig, da die Genexpression des *NK1R-T/F* insgesamt niedrig war (Ct-Werte zwischen 34,37 und 39,97, siehe absolute Ct-Werte Anhang Abschnitt 8.2). Soweit wir wissen, gibt es neben unserer Studie aktuell keine weitere, die eine Regulation des *NK1R-T* nach mechanischer Belastung, wie Dehnung, Druck oder Shear Stress, untersucht hat. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet werden helfen zu klären, welche Rolle speziell der *NK1R-T* unter pathologisch starken FFSS Belastungen spielt. Um in Zukunft den Einfluss von FFSS auf die Neuropeptidrezeptoren besser beurteilen zu können, wurden in einem weiteren Teil dieser Arbeit die *NK1R*-Isoformen integriert in Überexpressionsplasmide in MLO-Y4-Osteozyten transduziert.

### **5.2.2 CRLR, Ramp1 und $\alpha$ CGRP**

Die Expression von *CRLR* und *Ramp1*, die zwei Untereinheiten (UE), die zusammen den Rezeptor für das Neuropeptid  $\alpha$ CGRP bilden, zeigte eine stabile Geneexpression über die verschiedenen FFSS-Druckstärken hinweg. Vergleichbar verhielt es sich mit der  $\alpha$ CGRP Genexpression, die unter starkem FFSS tendenziell abnahm. Für den Spitzendruck von 20 dyn/cm<sup>2</sup> konnte nur ein Wert gemessen werden, die weiteren Werte bei dieser Druckstärke lagen außerhalb des Messbereichs (no Cq). Insgesamt war die Genexpression für  $\alpha$ CGRP über alle FFSS-Druckstärken hinweg niedrig (Ct-Werte zwischen 35,96 und 38,83, siehe absolute Ct-Werte Anhang Abschnitt 8.2), die Werte sind daher mit Vorsicht zu betrachten. Muschter et

al. maßen in ihren Versuchen mit murinen Makrophagen nach Zelldehnungsbelastung ebenfalls nur geringe Genexpressionswerte für  $\alpha$ CGRP, konnten allerdings im Gegensatz zu unseren Beobachtungen ein Hochregulierung des Gens nach Belastung feststellen, ebenso wie eine Hochregulierung der mRNA für die *CRLR* Untereinheit (65). Auch Sample et al. stellten eine Mehrexpression von  $\alpha$ CGRP nach mechanischer Belastung fest (84). Der Unterschied dieser Ergebnisse zu unseren Beobachtungen liegt vor allem darin, dass andere Zelltypen (primäre Makrophagen, beziehungsweise Knochengewebe *in vivo*) untersucht wurden, die außerdem mit anderen Arten von mechanischem Druck belastet wurden. Auf Grundlage unserer Ergebnisse gehen wir nicht davon aus, dass FFSS einen wesentlichen regulierenden Effekt auf die Expression von *CRLR/Ramp1* oder  $\alpha$ CGRP in Osteozyten der Zelllinie MLO-Y4 hat.

### 5.2.3 Genexpression regulatorischer Proteine der Osteoklastogenese

Durch die Expression von *M-CSF*, *RankL* und *OPG* nehmen Osteozyten Einfluss auf die Aktivität von Osteoklasten (25,142). *M-CSF* bewirkt die Bildung und Ausreifung von Osteoklasten (6). Durch Binden von *RankL* an seinen Rezeptor wird ebenfalls die Reifung von Osteoklasten gefördert, durch Binden an den löslichen Decoy-Rezeptor *OPG* wird dies verhindert und der Knochenabbau inhibiert (siehe Review (9)). Eine Regulation dieser Knochenstoffwechselregulatoren nach mechanischer Belastung von Osteozyten konnte zum Teil bereits nachgewiesen werden (siehe Review (16)).

Unter niedrigem FFSS (1 dyn/cm<sup>2</sup>) und einem FFSS in Stärke von 10 dyn/cm<sup>2</sup> konnten wir eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Hochregulierung von *M-CSF* mRNA in den MLO-Y4-Zellen beobachten, wobei der höchste Wert für 10 dyn/cm<sup>2</sup> erreicht wurde. Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen mit primären murinen Makrophagen, die Dehnungsstress ausgesetzt wurden. In dieser Studie von Muschter et al. wurde kein Einfluss der mechanischen Belastung auf die Expression von *M-CSF* gefunden, wobei berücksichtigt werden muss, dass verschiedene Zelltypen betrachtet werden (65).

Für das Verhältnis von *OPG* zu *RankL* konnte eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Zunahme bei stärkerem FFSS (10 dyn/cm<sup>2</sup> und 20 dyn/cm<sup>2</sup>) festgestellt werden, wobei eine minimale Abnahme in der Genexpression von *RankL* und eine starke Zunahme in der Genexpression von *OPG* beobachtet wurde. Einen erhöhten *OPG/RankL* mRNA Quotient nach mechanischer Belastung zeigte sich auch in Studien von Malone et al. (142) und Yan et al. (143) mit MLO-Y4-Zellen.

Die Daten deuten möglicherweise darauf hin, dass bei geringem FFSS via *M-CSF* Expression durch Osteozyten die Osteoklastenbildung und –differenzierung, beispielweise im Rahmen des Knochenremodelings (siehe Review (26)), gefördert wird. Stärkerer FFSS bewirkt zunehmend eine Hochregulierung des, die Differenzierung von Osteoklasten hemmenden, *OPG*. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen protektiven Mechanismus, der den Knochen bei starker Druckbelastung vor zusätzlicher Osteolyse schützt und die Neubildung von Knochensubstanz ermöglicht.

#### **5.2.4 Genexpression von Osteoblastogenese-Inhibitoren**

Die Bildung und Funktion von Osteoblasten wird durch die Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg-Inhibitoren *Dkk1* und Sklerostin beeinflusst (siehe Review (27)). Eine Überexpression von *Dkk1* beispielsweise führte in Tierversuchen zu massiver Osteopenie und einem Verlust an funktionsfähigen Osteoblasten (28). Niedrige Level an *SOST*, dem Sklerostin Gen, werden mit osteogenen Effekten assoziiert (144).

Die Daten aus unserem Versuch zeigten für *Dkk1* eine signifikante Mehrexpression ( $p < 0.05$ ) nach einer FFSS-Belastung der MLO-Y4-Zellen mit 10 dyn/cm<sup>2</sup> und 20 dyn/cm<sup>2</sup>. Yan et al. bemerkten in ihrer Studie mit MLO-Y4-Zellen, die ebenfalls einem FFSS von 10 dyn/cm<sup>2</sup> ausgesetzt worden waren, gleichsam einen leichten Anstieg in der *Dkk1* Genexpression unmittelbar nach der zweistündigen FFSS-Belastung. Nach drei Stunden zeigte sich in derselben Studie jedoch eine signifikante Reduktion in der Genexpression des *Dkk1*, verglichen mit unbelasteten Kontrollen. Nach sechs Stunden konnte ein erneuter Anstieg in der *Dkk1* Expression beobachtet werden (143). Eine ähnliche Schwankung in der *Dkk1* Genexpression wurde in einer *in vivo* Studie mit unterschiedlich alten Mäusen, deren rechte Tibia mechanischer Belastung ausgesetzt worden war, beobachtet. Die Messungen der *Dkk1* Genexpression fanden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Belastung statt. Auch in dieser Studie zeigte sich zunächst ein Rückgang der Genexpression nach drei Stunden und ein Anstieg im weiteren zeitlichen Verlauf (145). Möglicherweise reagieren belastete Osteozyten initial mit einer Mehrexpression des *Dkk1* und erst im zeitlichen Verlauf mit der Reduktion der Genexpression von *Dkk1*. Da unsere Messungen nur zu einem Zeitpunkt, unmittelbar nach der FFSS Belastung, stattfanden, kann keine Aussage über eventuelle Veränderungen der Genexpression im weiteren zeitlichen Verlauf getroffen werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der angeführten Studien ist es daher schwierig, aus der beobachteten Mehrexpression des *Dkk1* Gens nach

Belastung eine eindeutige Aussage hinsichtlich der Regulation des Gens nach FFSS zu treffen. Eine initiale Hochregulierung, vor allem bei moderaten und starken Drücken (10 dyn/cm<sup>2</sup> und 20 dyn/cm<sup>2</sup>) scheint aber wahrscheinlich. Möglicherweise wird durch die Belastung zunächst ein Reiz gesetzt, der dazu führt, dass Knochenmasse abgebaut wird und erst im weiteren zeitlichen Verlauf wird über die Reduktion der Genexpression des *Dkk1* ein Knochenaufbau induziert, beides im Sinne eines Remodelings nach Belastung.

In unseren Versuchen konnten für *SOST* nur niedrige Genexpressionswerte gemessen werden, ein bereits bekanntes Charakteristikum der verwendeten MLO-Y4-Zelllinie, da es sich bei der Zelllinie um Osteozyten in einem frühen Reifestadium handelt (siehe Review (16)). Eine Beurteilung über die Regulation von Faktoren, die vor allem reife Osteozyten exprimieren (Sklerostin als Proteinprodukt des *SOST*-Gens wird als Marker für reife Osteozyten genutzt), ist somit nur eingeschränkt möglich. Wir konnten dennoch einen Anstieg der *SOST* mRNA bei einem FFSS von 10 dyn/cm<sup>2</sup> feststellen, was für einen vermehrten Knochenabbau, möglicherweise im Sinne eines Remodelings, sprechen könnte und zu den beobachteten Tendenzen in der Regulation der Osteoklastogenese-Faktoren passen würde. Unsere Ergebnisse der vermehrten Expression von *SOST* nach mechanischer Belastung widersprechen allerdings den Beobachtungen von Robling et al. (144) und Yan et al. (143) die nach Krafteinwirkung auf Knochen *in vivo*, beziehungsweise nach FFSS in MLO-Y4-Zellen eine verminderte Expression von *SOST* in Osteozyten registrierten. Die Studie von Yan et al. betrachtete allerdings nur den Einfluss von 10 dyn/cm<sup>2</sup> auf die Osteozytenzelllinie zu verschiedenen Zeitpunkten. Darüber hinaus wurde eine andere Pumpe verwendet, die im Unterschied zu der von uns verwendeten, keinen gleichmäßigen, sondern peristaltischen Druck auf die Zellen ausübte.

### **5.2.5 Überprüfung der Transduktion der NK1R-Isoformen in MLO-Y4-Zellen**

Um die Einflüsse von FFSS auf die NK1R-Isoformen in MLO-Y4-Zellen bei insgesamt niedrig gemessener Expression des NK1R in Zukunft besser beurteilen zu können, wurde versucht mittels Gentransduktion der beiden Rezeptorisoformen in MLO-Y4-Zellen eine Überexpression des NK1R-F beziehungsweise NK1R-T zu bewirken. Zur Überprüfung der erfolgreichen Gentransduktion in die Zellen wurden qRT-PCRs und Western Blots durchgeführt. Die gewonnenen Daten werden nachfolgend diskutiert.

## 5.2.6 Überprüfung der NK1R-T/F und NK1R-F Expression auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR

Die  $\Delta$ Ct-Werte des *NK1R-T/F* sind in den MLO-Y4-Zellen, in die eine der beiden Rezeptorvarianten transduziert wurde (MLO-Y4\_NK1R-F oder MLO-Y4\_NK1R-T), deutlich niedriger, als in den Referenzzellen (MLO-Y4\_LacZ und MLO-Y4). Dieses Ergebnis spricht für eine deutliche Mehrexpression auf mRNA Ebene von *NK1R-F* und/oder *NK1R-T* im Vergleich zu den Referenzproben. Die absolut gemessenen Ct-Werte der Vergleichsproben MLO-Y4\_LacZ und MLO-Y4 sind sehr hoch (34,00 und 36,45) und waren in der Mehrzahl der Proben nicht mehr messbar (no Cq). In der Abbildung können daher nur n=1  $\Delta$ Ct-Werte für die *NK1R-T/F* und *NK1R-F* der MLO-Y4-Zellen und MLO-Y4\_LacZ-Zellen wiedergegeben werden.

Bei der Verwendung der Primer, welche nur die Volllänge-Variante des *NK1R* (*NK1R-F*) erkennen können, zeigen sich deutlich niedrigere  $\Delta$ Ct-Werte für diejenigen MLO-Y4-Zellklone, in die die Volllänge-Variante (MLO-Y4\_NK1R-F) transduziert worden war, als in den Klonen, in die der *NK1R-T*, *LacZ* oder kein Plasmid transduziert worden war. Letztere zeigen absolute Ct-Werte, die deutlich über 30 liegen (minimal 32,81) und zum Teil auch nicht messbare Werte (no Cq), weshalb nicht alle gemessenen Werte dargestellt werden können. Die Transduktion der MLO-Y4-Zellen mit dem pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F scheint daher auf mRNA-Ebene erfolgreich zu sein.

Eine gezielte ausschließliche Darstellung des NK1R-T ist aus bereits dargestellten Gründen nicht möglich. Es zeigen sich jedoch deutlich niedrigere  $\Delta$ Ct-Werte für die MLO-Y4\_NK1R-T unter Verwendung der Primer für *NK1R-T/F* (absolute Ct-Werte um 26), verglichen zu den  $\Delta$ Ct-Werten unter Verwendung der Primer für den *NK1R-F* (absolute Ct-Werte über 35, zum Teil nicht messbar). Diese deutliche Differenz weist auf die erfolgreiche Transduktion des pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T in MLO-Y4-Zellen hin, da bei Verwendung der Primer NK1R-T/F die *NK1R-T* Form miterfasst wird, bei Verwendung der Primer für den NK1R-F jedoch nur der *NK1R-F* erkannt werden kann.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse für eine erfolgreiche Transduktion der Vektoren pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F und pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T auf mRNA Ebene in MLO-Y4-Zellen (siehe absolute Ct-Werte Anhang Abschnitt 8.4).

### 5.2.7 Überprüfung der verschiedenen Zellklone auf Proteinebene mittels Western Blot

Um die Mehrexpression, die durch die Transduktion der *NK1R*-Isoformen in die MLO-Y4-Osteozyten generiert werden sollte, auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden Western Blots durchgeführt. Dabei zeigt der Western Blot, in dem ein Antikörper genutzt wurde, der nur die Volllänge-Variante (NK1R-F) erkennen kann, zwar deutliche Proteinbanden im zu erwartenden Bereich für den NK1R-F, allerdings gibt es keinen offensichtlichen Unterschied in der Ausprägung zwischen den transduzierten Zellen (MLO-Y4\_NK1R-F, MLO-Y4\_NK1R-T, MLO-Y4\_LacZ) und den Kontrollzellen (MLO-Y4 als unbehandelte Kontrolle und RAW-264.7 als Positivkontrolle). Die Ausprägung der GAPDH Proteinbande als interne Ladekontrolle ist in allen Proben relativ identisch, sodass von einer Auftragung gleicher Proteinmengen ausgegangen werden kann. Das Ergebnis zeigt, dass der NK1R-F in allen aufgetrennten Proben vorhanden ist. Eine Mehrexpression des Rezeptors lässt sich jedoch auf Proteinebene nicht bestätigen. Wir gehen davon aus, dass, auch in Zusammenschau mit den qRT-PCR Ergebnissen und auf Grund der erfolgreichen Selektion der Klone mit Blasticidin, die getesteten Zellklone den transduzierten Überexpressionsvektor in ihr Genom integriert haben, allerdings die Virusmenge (siehe Tabelle 4 Abschnitt 3.2.3.9) für die Zellen zu gering war, sodass eine deutliche Mehrexpression der NK1R auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden konnte. Ein anderer Grund für die Diskrepanz zwischen qRT-PCR-Ergebnis und WB-Ergebnis könnte sein, dass das transduzierte Plasmid nicht gezielt, sondern an einer zufälligen Stelle in das Wirtsgenom integriert wird, ein Einbau des Genabschnitts in eine Region, in der der Genabschnitt „abgeschaltet“ und nachfolgend nicht abgelesen wird. Um ersteres Problem zu lösen müsste der Virusstock höher konzentriert werden oder neu in höherer Menge produziert werden. Im Falle der zweiten Option könnte versucht werden, im Rahmen der Selektion einzelne Kolonien zu entnehmen und zu kultivieren, in der Annahme, dass das Transdukt an verschiedenen Stellen im Genom integriert wurde (146). Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass in den 20µg Gesamtprotein, die für die Western Blots genutzt wurden, gegebenenfalls nur ein geringer Anteil an Protein von dem, aus der Membran gelöst, NK1R stammt. Eine höhere Gesamtproteinzahl oder eine Erhöhung der Konzentration des NK1R in der Proteinmenge könnten die Ergebnisse mutmaßlich verbessern. Denkbar wäre außerdem eine Sekretion des NK1R in den Zellkulturüberstand. Eine Überprüfung des Überstands auf den Rezeptor hin wäre diesbezüglich aufschlussreich.



Zur Detektion des NK1R-T/F, also beider Rezeptorvarianten, wurde ein Antikörper der Firma Novus verwendet. Mehrere geeignete Antikörper gegen NK1R-T/F wurden im Vorfeld ausgetestet, wobei sich eine saubere Detektion der Banden als schwierig erwies. Dabei muss einerseits berücksichtigt werden, dass beide, NK1R-T und NK1R-F detektiert werden, da der Antikörper am identischen N-Terminus der Rezeptorvarianten bindet. Aufgrund der annähernd gleichen MW des NK1R-T (~34kD) und GAPDH (~ 37kD), sowie einer gegebenenfalls „doppelten“ Detektion des NK1R-F bei gleichzeitiger Verwendung des Antikörpers gegen NK1R-T/F von Novus und dem Antikörper nur gegen NK1R-F von Abcam, wurde dieselbe Membran zweimal genutzt, aber zwischen der Verwendung der Primärantikörper gegen die NK1R-Varianten von den zuvor gebundenen Antikörpern gereinigt. Der Nachweis von GAPDH als interne Kontrolle (Abbildung 18) gilt daher auch für die nachfolgende Darstellung (Abbildung 19). Es zeigen sich bei viel Hintergrund insgesamt schwache Proteinbanden für den NK1R-F und NK1R-T unter Verwendung des Antikörpers von Novus gegen den NK1R-T/F. Die Positivkontrolle des RAW-264.7-Zelllysates zeigt eine sehr deutliche Bande für den NK1R-F und den NK1R-T, jedoch ebenfalls viel Hintergrund. Eine sichere Aussage über die Mehrexpression des NK1R-Gesamt ist aufgrund des vorliegenden Western Blots nicht zu treffen. Ein deutlicher Unterschied zwischen den MLO-Y4\_NK1R-F, MLO-Y4\_NK1R-T und MLO-Y4 besteht nicht. Die Gründe dafür sind analog zu den bereits angeführten.

Dass die Proteinbanden für den NK1R-T und NK1R-F in den Blots insgesamt bei einem höheren MW liegen als berechnet (berechnet für den NK1R-T 34kD, für den NK1R-F 46kD) könnte durch eine Variation der Glykosylierung der Rezeptoren begründet sein (siehe Einleitung 1.5.3.1) (95). Dieses Phänomen wurde auch von Morelli et al. in ihrem Versuch mit murinen T-Zellen beobachtet (123). Die Forschergruppe verwendete zum Nachweis des NK1R-T und NK1R-F wie auch wir den Antikörper der Firma Novus. Ebenso nutzten Zhou et al. den Antikörper zur Detektion der beiden NK1R-Varianten (121). Bei beiden Forschergruppen zeigten die Blots ebenso wie bei uns verhältnismäßig viel Hintergrund. Eine eindeutige Detektion, vor allem von geringer ausgeprägten Proteinbanden, ist dadurch erschwert. Möglicherweise könnte man in zukünftigen Versuchen weitere Antikörper anderer Firmen zur Detektion des NK1R-T/F austesten und nutzen, sowie die bereits oben genannten Verbesserungen wie die Erhöhung der Proteinkonzentration berücksichtigen und dadurch bessere Ergebnisse erzielen.

## 6 Ausblick

Die, in dieser Arbeit dargestellten und diskutierten Ergebnisse, lassen einen Einfluss von FFSS auf einige Regulatoren und Faktoren des Knochenstoffwechsels vermuten. Um diese Beobachtungen zu verifizieren, sollten die Versuche wiederholt und mit einer größeren Probenanzahl durchgeführt werden. Außerdem könnten weitere FFSS-Stärken ausgetestet werden, die die bisher verwendeten ergänzen und möglicherweise weitere Erkenntnisse über die Regulation der GOIs bei verschiedenen starken FFSS liefern. Eine Ausweitung auch in Hinblick auf die betrachteten GOIs könnte aufschlussreich sein. Da unsere Ergebnisse vor allem eine Regulation knochenabbauender Faktoren, wie RANKL, M-CSF, OPG, Dkk1 und SOST nahelegen, erscheint es sinnvoll, in weiteren Projekten ergänzend auch die Regulation von Knochenaufbauenden Faktoren, wie Beispielsweise PGE2, IGF1, ATP und NO zu betrachten. Die Erfassung dieser Faktoren wäre noch aus einem weiteren Grund interessant: Die Mediatoren bewirken nicht nur die vermehrte Bildung von Osteoblasten (27), sondern werden nachweislich auch nach mechanischem Reiz freigesetzt (13,33,36). Ob sich eine Regulation dieser Faktoren und auch der anderen GOIs nach FFSS beobachten lässt, wäre besonders unter Verwendung der unterschiedlichen MLO-Y4-Osteozytenklone (unveränderte und NK1R-Überexprimierende Zellklone) interessant. Spielt die NK1R-Isoform eine Rolle in der Vermittlung des FFSS in Osteozyten? Es wäre weiterhin interessant zu erforschen, ob sich für Knochenstoffwechselregulatoren auch eine Veränderung in der Genexpression im zeitlichen Verlauf nach Applikation des FFSS zeigt, so wie es bereits andere Forschergruppen für *Dkk1* beobachten konnten (145).

Bezüglich der Überexpression der NK1R-Isoformen in MLO-Y4-Osteozyten sollte in weiteren Projekten nochmals versucht werden, MLO-Y4-Zellen mit den erzeugten, oder ggf. mit neu generierten, Viren zu transfizieren. Ein Nachweis der stabilen Mehrexpression der Rezeptoren NK1R-T oder NK1R-F, vor allem auf Proteinebene, wäre für weitere Versuche nötig. Wenn es gelingt MLO-Y4-Zellen zu generieren, die den NK1R-T oder NK1R-F deutlich überexprimieren, wäre es von Interesse, diese Zellklone FFSS unterschiedlicher Stärke auszusetzen und eventuelle Rezeptorassoziierte Effekte (in Hinblick auf die bereits genannten und auch bereits in dieser Arbeit betrachteten GOIs) zu erfassen.

## 7 Zusammenfassung

Die Frage, über welchen Mechanismus Knochenzellen eine Änderung in mechanischen Belastungen wahrnehmen, um darauf mit einem Umbau der Knochenstruktur zu reagieren, ist nach wie vor Gegenstand der Forschung. Dass der Fluss durch das Lakunocanalikuläre System, vorbei an den Osteozyten (147), dabei eine tragende Rolle spielt, wurde inzwischen entsprechend publiziert (33,34). Ebenso unbestritten ist die Anwesenheit von Fasern des sensiblen Nervensystem im Knochen und in knochennahen Geweben, wie Periost und Synovia (53,54) sowie die Expression verschiedener Neurotransmitterrezeptoren auf Knochenzellen (siehe Review (57)). Diverse Studien konnten darüber hinaus zeigen, wie essentiell das Vorhandensein eines intakten sensiblen Nervensystems für eine gesunde Knochenhomöostase (61–63), Frakturheilung (66) und Wachstum (58,59) des Knochens ist. In Chondrozyten und auch in Tenozyten zeigte sich, dass der NK1R als zentraler Mechanorezeptor fungiert und unter anderem auch wesentlich die endogene Produktion von SP und die Zellproliferation beeinflussen kann (125,126). Ebenfalls bekannt ist, dass Osteozyten den NK1R exprimieren und es gibt Hinweise, dass er an der Regulation der Knochenstruktur nach Belastung beteiligt ist (3,7). Bezüglich des sensiblen Neuropeptids  $\alpha$ CGRP und seines Rezeptorkomplex CRLR/Ramp1 konnten ähnliche mechanoresponsive Eigenschaften in murinen RAW264.7 Makrophagen und primären Knochenmarksmakrophagen nach Dehnungsstress beobachtet werden (65).

Um die Effekte, die durch FFSS in Osteozyten bewirkt werden analysieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst eine Methode entwickelt, die es ermöglichte, Zellen der murinen Osteozytenzelllinie MLO-Y4 einem FFSS auszusetzen. Dazu wurde ein Pumpensystem etabliert und die Zellen einem FFSS über einen Zeitraum von 2 Stunden ausgesetzt. Anschließend wurde mittels qRT-PCR untersucht, wie Osteozyten nach FFSS Belastung die Genexpression bestimmter anaboler und kataboler Modulatoren des Knochenremodelings regulieren und welchen Einfluss die Stärke des FFSS auf die Expression der Neuropeptide SP und  $\alpha$ CGRP sowie der dazugehörigen Rezeptoren hat. Die Ergebnisse zeigten für den NK1R insgesamt eine stabile Genexpression bei niedrigen und moderat starken FFSS Belastungen. Eine deutliche Zunahme in der Genexpression des NK1R-T/F, sowie einer im Vergleich dazu nur minimalen Zunahme des NK1R-F bei sehr starkem FFSS deutet möglicherweise auf eine starke Hochregulation des NK1R-T bei großer FFSS-Belastung hin. Ein Unterschied in der Genexpression des Neuropeptids SP konnte nicht gefunden werden, die Werte blieben über alle Belastungen hinweg auf niedrigem Level stabil. Wir gehen daher nicht

davon aus, dass durch unterschiedlich starken FFSS die Synthese von SP in Osteozyten reguliert wird.

Bezüglich des sensiblen Neuropeptides  $\alpha$ CGRP und seines Rezeptors, bestehend aus den Untereinheiten CRLR und Ramp1, konnten ebenfalls keine wesentlichen Veränderungen in der Genexpression über die verschiedenen FFSS-Belastungsstärken festgestellt werden. Eine Regulation in der Genexpression induziert durch FFSS, scheint daher auch hier eher unwahrscheinlich.

Unsere Messungen zeigten einen signifikanten Einfluss von FFSS auf die Genexpression von regulatorischen Proteinen der Osteoklastogenese. Moderater und leichter FFSS bewirkte eine Mehrexpression des Osteoklastenstimulierenden M-CSF. Bei stärkerem FFSS hingegen konnte eine signifikante Induktion der Genexpression des Osteoklastogenese-hemmenden Proteins OPG beobachtet werden. Zusammengenommen kann man hier möglicherweise von einem regulatorischen Mechanismus ausgehen, der bei geringem FFSS den Knochenabbau fördert, während starker FFSS eher den Abbau des Knochens zu verhindern scheint.

Eine signifikante Mehrexpression konnte auch für die Dkk1 mRNA vor allem nach der Applikation von moderaten und starken Drücken, beobachtet werden. FFSS bewirkt möglicherweise unmittelbar nach der Belastung einen vermehrten Abbau von Knochenmasse. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von Dkk1 nach einem initialen Anstieg im zeitlichen Verlauf nach mechanischer Belastung reduziert wird, was dann den Knochenaufbau fördert (143,145). Die beobachtete Schwankung in der Dkk1 Genexpression bildet möglicherweise die komplexen Vorgänge des Remodelings ab, welches eventuell durch Belastung vermehrt initiiert wird.

Aufgrund der Limitierung, die sich aus der Verwendung der Osteozytenzelllinie MLO-Y4 mit den Eigenschaften früher Osteozyten ergab, nämlich die geringe Expression von SOST, welches als Marker reifer Osteozyten definiert wird, kann nur eine eingeschränkte Aussage bezüglich der Regulation von SOST nach FFSS getroffen werden. Ein leichter Anstieg der SOST mRNA nach einem FFSS von 10 dyn/cm<sup>2</sup> deutet möglicherweise auf einen vermehrten Knochenabbau nach dieser Druckbelastung hin, eventuell ebenfalls im Sinne eines Remodelings.

In Vorbereitung für zukünftige Forschungsprojekte der Arbeitsgruppe wurde versucht zwei Zellklone von MLO-Y4-Osteozyten zu generieren, die jeweils eine der NK1R-Isoformen (NK1R-F oder NK1R-T) überexprimieren, sodass in zukünftigen Projekten Rezeptoreffekte

differenziert nach der Unterart des Rezeptors betrachtet werden können. Wir nutzten ein Lentivirales-System, um die Zielzellen zu transduzieren. Die Ergebnisse für die Überprüfung der Transduktion auf Genebene zeigen eine deutliche Mehrexpression für die jeweils transduzierten Genabschnitte, sodass von einer erfolgreichen Transduktion des Gens in die MLO-Y4-Zellen ausgegangen werden kann. Bei Überprüfung der Mehrexpression auf Proteinebene mittels Western Blot zeigten sich keine eindeutigen Ergebnisse, die für eine vermehrte Bildung der NK1R-Rezeptor-Isoformen sprechen würden. Möglicherweise liegt dies in einer zu geringen Virusmenge oder einer ungünstigen Integration des Plasmids im Wirtsgenom oder in einem der anderen, bereits oben (siehe Abschnitt 5.2.7) angeführten Gründe, begründet.

## 8 Anhang

### 8.1 Berechnungen für den Fluid Flow Shear Stress-Versuch

Materialdaten:

<b>μ-Slides</b>			
<b>μ-Slidetyp</b>	ibidi μ-Slide	VI 0.4	VI 0.1
<b>Kanalanzahl</b>		6	6
<b>Kanalhöhe [mm]</b>		0,4	0,1
<b>Kanalweite [mm]</b>		3,8	1,0
<b>Kanallänge [mm]</b>		17	17
<b>Kanalvolumen [μl]</b>		30	1,7

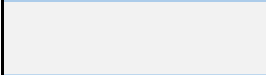

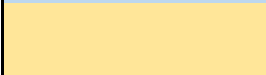

<b>Schläuche</b>			
<b>Schlauchtyp</b>	YGON® S3™ E-3603	YL81.1	YL83.1
<b>Schlauch ID [mm]</b>		1,52	3,2
<i>ID = Innendurchmesser</i>			

<b>Pumpe</b>			
<b>Pumpentyp</b>		IP-N ISM949	
<b>Pumpleistung</b>		<b>Drehzahl</b> [1/min] = [rpm]	<b>Flussrate</b> [ml/min]
<b>Schlauch ID [mm]</b>		<b>1,52</b>	<b>3,2</b>
min		0,11	0,03
max		11,25	3

<b>Berechnung für μ-Slide VI 0.4</b>			
<b>Fluid Flow Shear Stress</b>	<b>Flussrate</b>	<b>Drehzahl</b> <b>Schlauch ID 1,52mm</b>	<b>Drehzahl</b> <b>Schlauch ID 3,2mm</b>
Umrechnung:	= Shear Stress* <b>0,79</b>	= Flussrate/ <b>0,267</b>	= Flussrate/ <b>0,988</b>
[dyn/cm <sup>2</sup> ]	[ml/min]	[1/min] = [rpm]	[1/min] = [rpm]
1	0,79	2,96	0,80

2	1,58	5,92	1,60
3	2,37	8,88	2,40
4	3,16	11,84	3,20
5	3,95	14,79	4,00
6	4,74	17,75	4,80
7	5,53	20,71	5,60
8	6,32	23,67	6,40
9	7,11	26,63	7,20
10	7,9	29,59	8,00
11	8,69		8,80
12	9,48		9,60
13	10,27		10,39
14	11,06		11,19
15	11,85		11,99

Berechnung für $\mu$ -Slide VI 0.1			
Fluid Flow Shear Stress	Flussrate	Drehzahl Schlauch ID 1,52mm	Drehzahl Schlauch ID 3,2mm
Umrechnung:	= Shear Stress* <b>12,98</b> /1000	= Flussrate/ <b>0,267</b>	= Flussrate/ <b>0,988</b>
[dyn/cm <sup>2</sup> ]	[ml/min]	[1/min] = [rpm]	[1/min] = [rpm]
10	0,1298	0,49	0,13
11	0,14278	0,53	0,14
12	0,15576	0,58	0,16
13	0,16874	0,63	0,17
14	0,18172	0,68	0,18
15	0,1947	0,73	0,20
16	0,20768	0,78	0,21
17	0,22066	0,83	0,22
18	0,23364	0,88	0,24
19	0,24662	0,92	0,25
20	0,2596	0,97	0,26

LEGENDE	
	Maximalwerte der Pumpleistung
	Verwendete Drehzahl für Fluid Flow Shear Stress von 1dyn/cm <sup>2</sup>
	Verwendete Drehzahl für Fluid Flow Shear Stress von 10dyn/cm <sup>2</sup>
	Verwendete Drehzahl für Fluid Flow Shear Stress von 20dyn/cm <sup>2</sup>
<b>Umrechnungsfaktor</b>	Flussrate zu rpm aus den Unterlagen der Pumpe
<b>Umrechnungsfaktor</b>	Fluid Flow Shear Stress zu Flussrate aus ibidi Channels Data Sheet für Viskosität = 0,0072dyn*s/cm <sup>2</sup>

### 8.1.1 Berechnung der Zeit zum Durchlauf eines Kreislaufs im Schlauchsystem

Im Rahmen der FFSS-Versuche wurde 37°C temperiertes Medium mit einer gewissen Flussrate (siehe Tabelle 5) durch einen Kreislauf gepumpt, mit dem Ziel, eine bestimmte FFSS-Druckstärke auf MLO-Y4, die in den  $\mu$ -Slide-Gängen ausgesät waren, auszuüben. „Kreislauf“ bezeichnet dabei ein geschlossenes Schlauchsystem bestehend aus Schläuchen, die in das beförderte Nährmedium eintauchen, Schläuchen die durch das Pumpsystem laufen, zwei Gängen eines  $\mu$ -Slides, die miteinander über einen Verbindungsschlauch verbunden sind und einem Schlauch, der zurück in das 50ml Röhrchen führt (siehe Abbildung 9 Abschnitt 3.2.2.1). Die Zeit, die das Medium für den einmaligen Durchlauf eines Kreislaufs benötigt, ist in der folgenden Tabelle (Tabelle 5) berechnet.

**Tabelle 5: Berechnung der Dauer, die benötigt wird um einen Kreislauf einmalig zu durchlaufen**

FFSS	Schlauchdaten	$\mu$ -Slide-Daten	Volumen in einem Kreislauf	Flussrate	Dauer eines Durchlaufs
			$V_{ges.} = V_{Schlauch} + 2 * V_{Gang}$ $= r^2 * l * \pi + 2 * V_{Gang} =$ $= (ID/2)^2 * GL * \pi + 2 * V_{Gang}$		$t = V_{ges.} / \text{Flussrate}$
1 dyn/cm <sup>2</sup>	GL: 121,5cm ID: 1,52mm	Art: VI 0.4 GV: 30 $\mu$ l	$V_{ges.} = 2,265\text{ml}$	0,79 ml/min	$t = 2,87\text{min}$
10 dyn/cm <sup>2</sup>	GL: 126cm ID: 3,2mm	Art: VI 0.4 GV: 30 $\mu$ l	$V_{ges.} = 10,194\text{ml}$	7,9 ml/min	$t = 1,29\text{min}$
20 dyn/cm <sup>2</sup>	GL: 121,5cm ID: 1,52mm	Art: VI 0.1 GV: 1,7 $\mu$ l	$V_{ges.} = 2,208\text{ml}$	0,26 ml/min	$t = 8,49\text{min}$



Gesamtlänge (GL) des Schlauchsystems in einem Kreislauf, Innendurchmesser (ID) des Schlauches, Gangvolumen (GV) eines  $\mu$ -Slide-Gangs, Zeit (t), die benötigt wird um den Kreislauf eines Schlauchsystems einmal zu durchlaufen.

## 8.2 Überblick über absolute Ct-Werte gemessen im Fluid Flow Shear Stress-Versuch

Nach Beendigung des FFSS wurde die RNA aus den belasteten MLO-Y4-Osteozyten und den unbelasteten Kontroll-MLO-Y4-Osteozyten gewonnen und in mehreren Schritten in cDNA umgeschrieben. Mit diesen Proben wurden anschließend qRT-PCRs zur Analyse der Genexpression durchgeführt. Der hier dargestellte Überblick (Tabelle 6) zeigt den spätesten (minimal) und den frühesten (maximal) gemessenen absoluten Ct-Wert des jeweiligen GOIs, um die Bandbreite, in denen sich die Genexpressionswerte bei unterschiedlich großen FFSS befanden, abzubilden.

**Tabelle 6: Überblick über absolute Ct-Werte gemessen im FFSS-Versuch.**

		1dyn/cm <sup>2</sup>	10dyn/cm <sup>2</sup>	20dyn/cm <sup>2</sup>
<b>Gen:</b>				
<i><math>\alpha</math>CGRP</i>	min	38,46	38,83	37,85
	max	36,69	36,96	35,96
<i>SP</i>	min	38,92	38,97	39,57
	max	36,52	36,37	36,90
<i>Dkk1</i>	min	38,36	36,10	38,62
	max	34,95	32,48	35,02
<i>OPG</i>	min	36,39	36,97	39,60
	max	33,35	33,53	35,18
<i>NK1R-T/F</i>	min	37,96	39,97	38,33
	max	34,37	35,25	35,74
<i>NK1R-F</i>	min	38,66	39,42	38,59
	max	35,35	34,45	36,09
<i>Ramp1</i>	min	37,43	38,24	36,94
	max	34,60	32,22	33,78
<i>SOST</i>	min	39,81	38,12	39,81
	max	38,01	24,17	39,81
	min	19,42	19,62	20,28

<i>GAPDH</i>	max	17,07	17,22	16,75
	min	29,18	27,73	27,79
<i>CRLR</i>	max	27,47	24,85	24,72
	min	28,99	29,94	28,92
<i>Rankl</i>	max	25,68	24,17	26,12
	min	23,86	24,78	24,96
<i>MCSF</i>	max	21,92	20,16	22,03

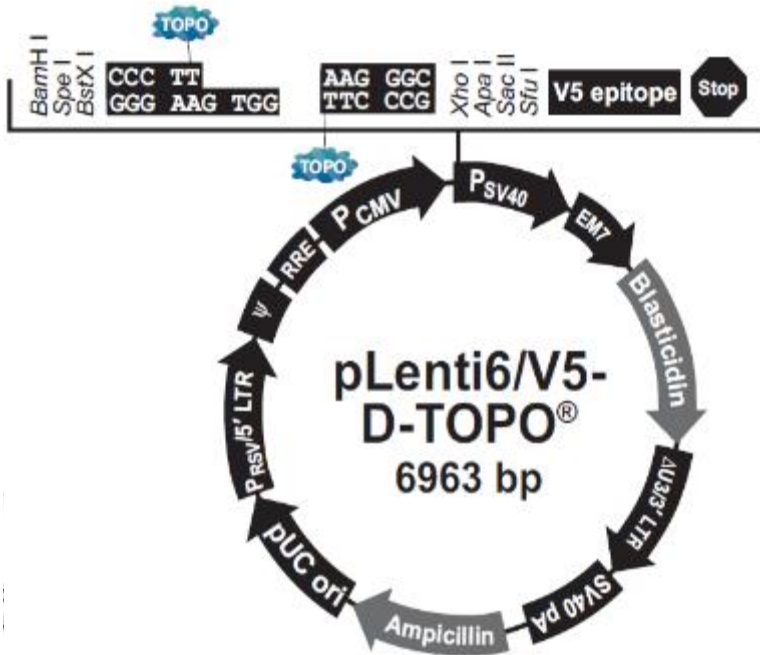
Minimaler (*min*) und maximaler (*max*) absoluter Ct-Wert der Mittelwerte eines Gene of Interests (*GOI*).

*Neurokinin1-Rezeptor (NK1R)*, *Volllänge-Variante des Neurokinin1-Rezeptors (NK1R-F)*, *Calcitonin receptor-like receptor (CRLR)*, *Receptor activity-modifying protein 1 (Ramp1)*, *Substanz P (SP)*, *alpha-Calcitonin gene-related peptide ( $\alpha$ CGRP)*, *Macrophage-colony-stimulating factor (MCSF)*, *Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B Ligand (Rankl)*, *Osteoprotegerin (OPG)*, *Dickkopf-related protein1 (Dkk1)*, *Sclerostin (SOST)*, *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)*.

### 8.3 Plasmidkarten und Gensequenzen im Rahmen des Überexpressionsversuchs

Um neue MLO-Y4-Zellklone zu generieren, welche den NK1R in seinen Isoformen (NK1R-F oder NK1R-T) überexprimieren, mussten entsprechende Plasmide in die MLO-Y4 Zellen eingebracht werden. Diese Plasmide mussten unter Verwendung von Restriktionsenzymen aus einem geeigneten Vektor (pLenti-6/V5-D-TOPO) und dem jeweiligen Insert (*NK1R-F* oder *NK1R-T*) zusammengefügt werden. Als Ausgangsmaterial wurden die Plasmide pLenti-6/V5-D-TOPO, 18AFGMLC\_NK1R-F\_pMA-RQ\_(AmpR) und 18AFGMMC\_NK1R-T\_pMA-RQ\_(AmpR) genutzt (Plasmidkarten und Gensequenzen 6.3.1 – 6.3.3). Die neu kreierten Überexpressionsplasmide pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F und pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T wurden sequenziert (Sequenziererergebnisse 6.3.4 – 6.3.5).

### 8.3.1 Plasmidkarte und Gensequenz von pLenti-6/V5-D-TOPO



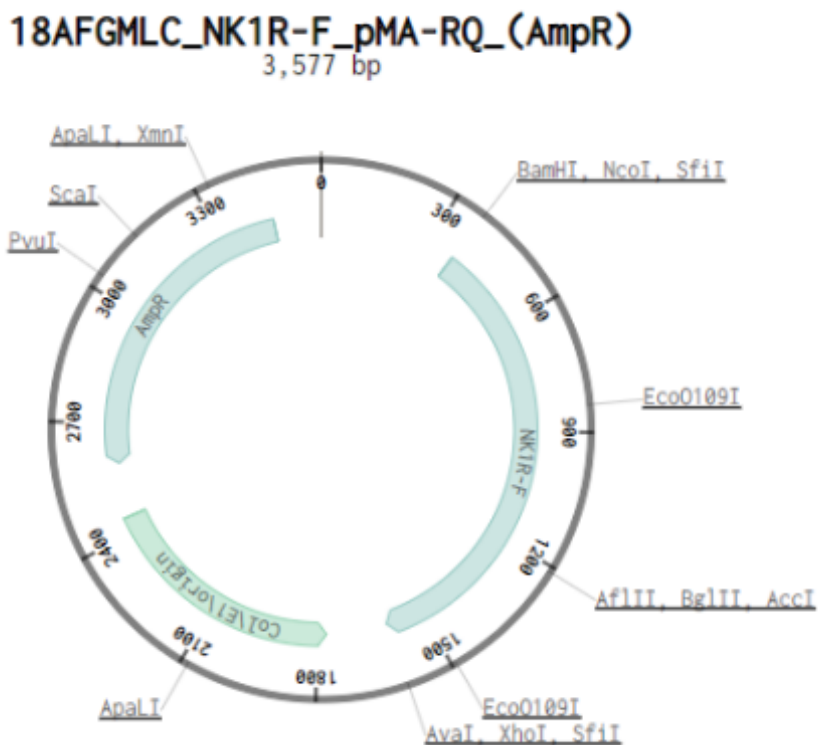
#### Gensequenz:

5' ...TCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCC  
CGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATC  
CATTGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGATAAGCTTGGGAGTTCCGCGTTACATAACTTAC  
GGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATGACGTCAATAATGACGTATGT  
TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGC  
CCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA  
ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAC  
GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGG  
TTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAA  
ATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTG  
TACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATC  
CACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGACTCTAGAGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAAT  
TGATCCCTTACCAAGGGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGGTTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCC  
TCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTTAGTAATGAGTTTGAATTAATTCTGTGGAATGTGT  
GTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTC  
AATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCAT  
GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCC  
AGTCCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCT  
CTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTTGCAAAAAGC

TCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAG  
TA... 3'

Gelb markiert sind die Anfangs- und Endbereiche der pLenti-6/V5-D-TOPO Vektorgensequenz, die in den neuen Plasmiden mit den Inserts NK1R-F und NK1R-T nachgewiesen werden konnten. Cyan markiert ist die Genschnittstelle des Restriktionsenzym *Bam*HI und in dunklerem Türkis ist die Gensequenz der Genschnittstelle des Restriktionsenzym *Xho*I gekennzeichnet. Der blaue Pfeil markiert den Bereich des pLenti-6/V5-D-TOPO Vektors, der an die Gensequenz des NK1R-F anknüpft (siehe Abschnitt 8.3.4). Die roten Pfeile markieren die Bereiche des pLenti-6/V5-D-TOPO Vektors, die die Gensequenz des NK1R-T umgeben (siehe Abschnitt 8.3.5).

### 8.3.2 Plasmidkarte und Gensequenz von 18AFGMLC\_NK1R-F\_pMA-RQ\_(AmpR)



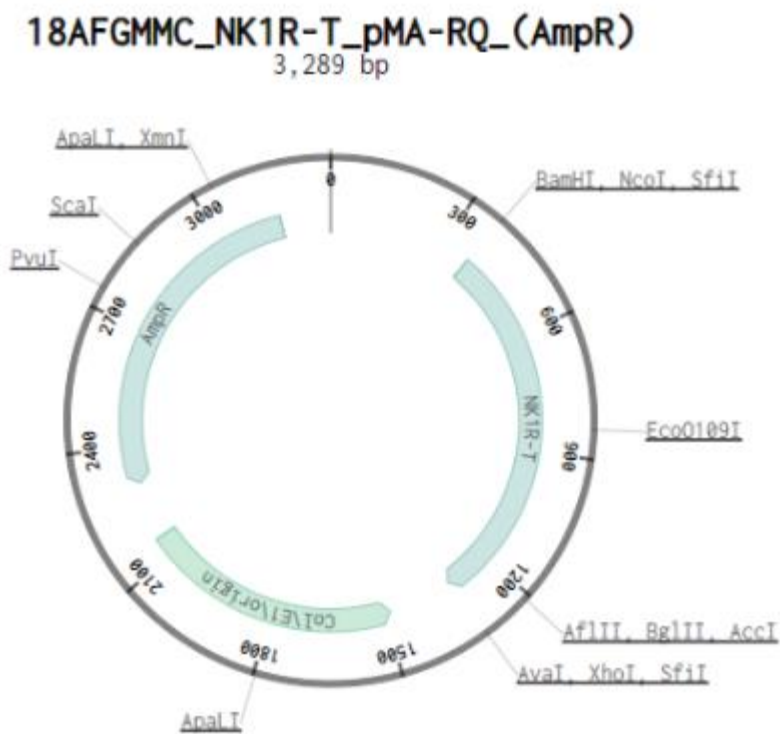
#### Gensequenz:

5'...AAGGCCGCATGGATCCATGGATAACGTCCTTCCTGTGGACTCTGATCTCTTCCCAACACCTCC  
ACCAACACTTCTGAGTCTAACCAGTTTGTGCAACCTACCTGGCAAATTGTCCTTTGGGCAGCCGCCT  
ATACGGTCATCGTGGTGACTTCCGTGGTGGGCAACGTAGTGGTGATATGGATCATTTTGGCCACA  
AGAGAATGAGGACAGTGACCAATTATTCCTGGTGAACCTGGCCTTCGCTGAGGCCTGCATGGCTG  
CATTCAATACAGTGGTGAACCTCACCTACGCAGTCCACAACGTGTGGTACTACGGCCTCTTTACTG  
CAAGTTTCACAACCTTCTCCCATTTGCTGCTCTCTTCGCCAGTATCTACTCCATGACAGCTGTGGCCT  
TTGACAGATACATGGCCATCATCCACCCTTTCAGCCCCGGCTGTCGGCCACTGCTACCAAAGTGG  
TCATCTTTGTCATCTGGGTCTGGCTCTCCTGCTGGCCTTCCACAGGGCTACTACTCCACCACAGA

GACCATGCCAGCAGAGTAGTGTGCATGATTGAGTGGCCAGAACATCCCAACAGGACTTACGAGA  
AAGCGTACCACATCTGTGTGACTGTGCTGATCTACTTCCTGCCTCTGCTGGTGATTGGCTATGCATA  
CACTGTGGTAGGGATTACACTGTGGGCCAGTGAGATCCCCGGTGACTCCTCTGACCGTTACCATGA  
GCAAGTCTCTGCCAAGCGCAAGGTGGTCAAAAATGATGATCGTGGTTGTGTGTACCTTCGCCATCTG  
CTGGCTGCCCTTCCACATCTTCTTCTCCTGCCCTACATCAACCCAGATCTCTACCTTAAGAAGTTC  
ATCCAGCAGGTCTACCTGGCCAGCATGTGGCTGGCCATGAGTTCTACCATGTACAACCCCATCATC  
TACTGCTGCCTCAATGACAGGTTCCGTCTGGGCTTCAAGCATGCCTTTTCGCTGCTGCCCTTTCATCA  
GTGCTGGTGATTATGAGGGGCTGAAAATGAAATCCACCCGATACCTCCAGACCCAGAGCAGCGTGT  
ACAAGGTCAGCCGCCTGGAGACCACCATCTCCACTGTGGTGGGAGCCCATGAAGATGAGCCAGAG  
GAAGGTCCCAAGGCCACACCTTCATCCTTGGATCTCACCTCCAATGGCTCCTCTCGAAGCAACTCG  
AAGACCATGACAGAAAGCTCCAGCTTCTACTCTAACATGCTGGCCTAACTCGAGCTGGG...3‘

Der hellgraue Bereich kennzeichnet die Gensequenz des NK1R-T/F. Der dunkelgraue Genabschnitt zeigt den verlängerten C-Terminus, welchen nur der NK1R-F besitzt. Cyan markiert ist die Genschnittstelle des Restriktionsenzym *Bam*HI und in dunklerem Türkis ist am Ende der Gensequenz die Genschnittstelle des Restriktionsenzym *Xho*I gekennzeichnet. Die blauen Pfeile kennzeichnen den Beginn und das Ende der Gensequenz des NK1R-F, die in dem neuen Überexpressionsplasmid nachgewiesen werden konnte (siehe Gensequenz in Abschnitt 8.3.4).

### 8.3.3 Plasmidkarte und Gensequenz von 18AFGMMC\_NK1R-T\_pMA-RQ\_(AmpR)



### Gensequenz:

5'...AATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCGCATGGATCCATGGATAACGTCCTTCCTGTGGACTCTGA  
TCTCTTCCCAACACCTCCACCAACACTTCTGAGTCTAACCAGTTTGTGCAACCTACCTGGCAAATT  
GTCCTTTGGGCAGCCGCTATACGGTCATCGTGGTGACTTCCGTGGTGGGCAACGTAGTGGTGATA  
TGGATCATTTTGGCCACAAGAGAATGAGGACAGTGACCAATTATTTCTGGTGAACCTGGCCTTC  
GCTGAGGCCTGCATGGCTGCATTCAATACAGTGGTGAAC TTCACCTACGCAGTCCACAACGTGTGG  
TACTACGGCCTCTTTACTGCAAGTTTCACAAC TTTCCCCATTGCTGCTCTCTTCGCCAGTATCTA  
CTCCATGACAGCTGTGGCCTTTGACAGATACATGGCCATCATCCACCTCTTCAGCCCCGGCTGTCC  
GCCACTGCTACCAAAGTGGTCATCTTTGT CATCTGGGTCTGGCTCTCCTGCTGGCCTTCCCACAGG  
GCTACTACTCCACCACAGAGACCATGCCAGCAGAGTAGTGTGCATGATTGAGTGGCCAGAACATC  
CCAACAGGACTTACGAGAAAGCGTACCACATCTGTGTGACTGTGCTGATCTACTTCCTGCCTCTGCT  
GGTGATTGGCTATGCATACACTGTGGTAGGGATTACACTGTGGGCCAGTGAGATCCCCGGTGACTC  
CTCTGACCGTTACCATGAGCAAGTCTCTGCCAAGCGCAAGGTGGTCAA AATGATGATCGTGGTTGT  
GTGTACCTTCGCCATCTGCTGGCTGCCCTTCCACATCTTCTTCCTCCTGCCCTACATCAACCCAGATC  
TCTACCTTAAGAAGTTCATCCAGCAGGTCTACCTGGCCAGCATGTGGCTGGCCATGAGTTCTACCAT  
GTACAACCCCATCATCTACTGCTGCCTCAATGACAGGTAACTCGAGCTGGGCCTCATGGGCCTTCC  
GCTCACTGCCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAACA...3'

*Der hellgraue Bereich kennzeichnet die Gensequenz des NK1R-T. Cyan markiert ist die Genschnittstelle des Restriktionsenzym *Bam*HI und in dunklerem Türkis ist am Ende der Gensequenz die Genschnittstelle des Restriktionsenzym *Xho*I gekennzeichnet. Die pinken Pfeile kennzeichnen den Beginn und das Ende der Gensequenz des NK1R-T, die in dem neuen Überexpressionsplasmid nachgewiesen werden konnte (siehe Gensequenz in Abschnitt 8.3.5).*

### 8.3.4 Sequenzierergebnis von pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F

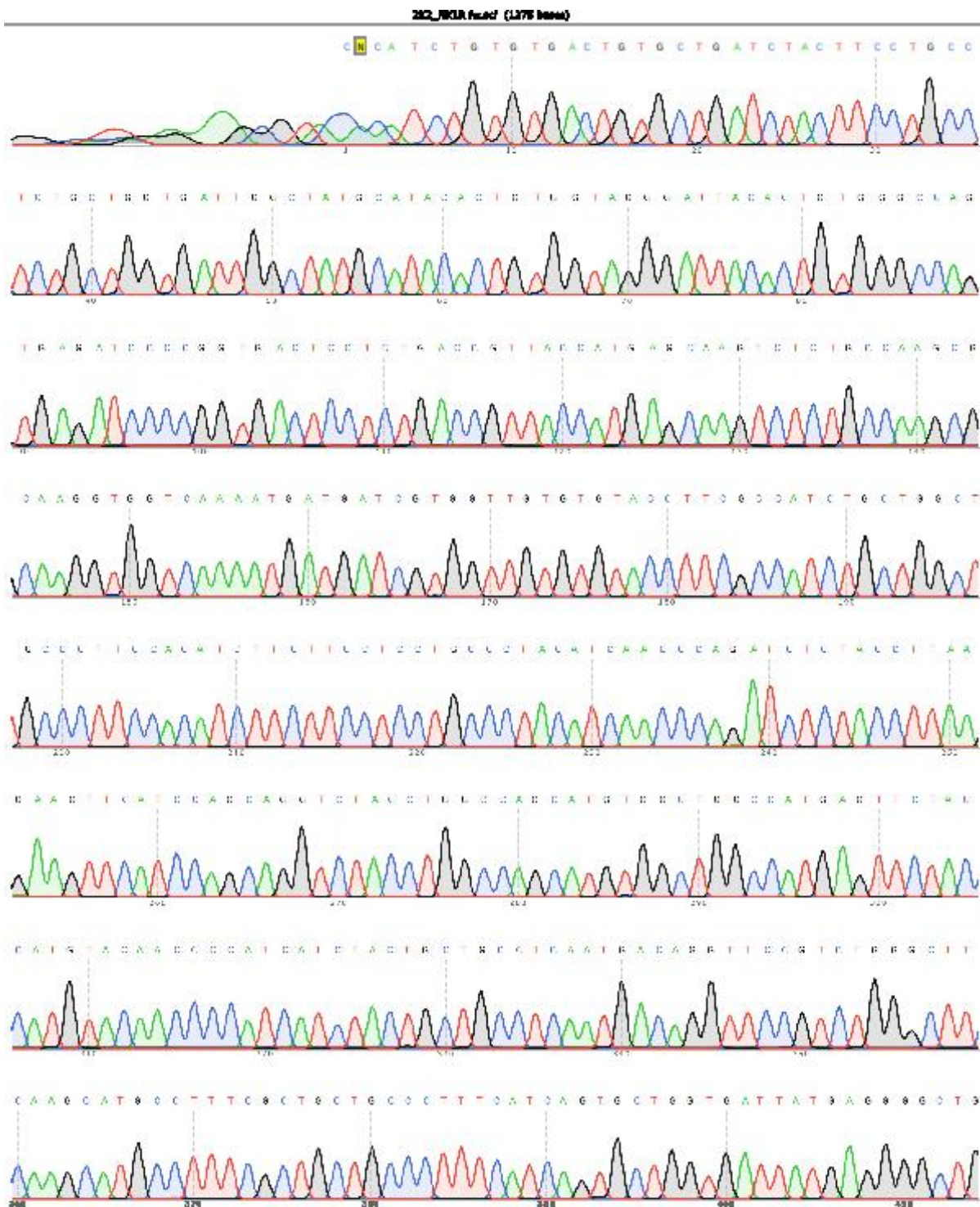


Abbildung 20: Auszug aus dem Sequenzierungsergebnis des pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-F

#### Gensequenz:

5'...CNCATCTGTGTGACTGTGCTGATCTACTTCCTGCCTCTGCTGGTGGATTGGCTATGCATACACTGT  
 GGTAGGGATTACACTGTGGGCCAGTGAGATCCCCGGTGACTCCTCTGACCGTTACCATGAGCAAGT  
 CTCTGCCAAGCGCAAGGTGGTCAAAATGATGATCGTGGTGTGTGTACCTTCGCCATCTGCTGGCT  
 GCCCTCCACATCTTCTTCCTCCTGCCCTACATCAACCCAGATCTCTACCTTAAGAAGTTCATCCAG  
 CAGGTCTACCTGGCCAGCATGTGGCTGGCCATGAGTTCTACCATGTACAACCCATCATCTACTGCT  
 GCCTCAATGACAGGTTCCGTCTGGGCTTCAAGCATGCCTTTCGCTGCTGCCCTTTCATCAGTGCTGG  
 TGATTATGAGGGGCTGGAAATGAAATCCACCCGATACCTCCAGACCCAGAGCAGCGTGTACAAGG  
 TCAGCCGCCTGGAGACCACCATCTCCACTGTGGTGGGAGCCCATGAAGATGAGCCAGAGGAAGGT  
 CCAAGGCCACACCTTCATCCTTGGATCTACCTCCAATGGCTCCTCTCGAAGCAACTCGAAGACC  
 ATGACAGAAAGCTCCAGCTTCTACTCTAACATGCTGGCCTAACTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGGTT  
 CGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTTAGTAATGAGTT  
 TGGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCA  
 GAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAG  
 CAGGC...3'

Der hellgrau markierte Bereich zeigt einen Ausschnitt der Gensequenz des NK1R, der dunkelgraue Bereich zeigt die Gensequenz des C-Terminus, die einzigartig für den NK1R-F ist. Die blauen Pfeile markieren Anfang und Ende der Gensequenz des NK1R-F, der im neuen Klon nachgewiesen wurde und so auch im ursprünglichen Plasmid zu finden ist (Stellen dort identisch markiert, siehe Abschnitt 8.3.2). Gelb markiert und mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet ist der Teil des pLenti-6/V5-D-TOPO-Vektors, der in der dargestellten Gensequenz identifiziert werden kann und so auch im ursprünglichen Vektor vorkommt (Stelle dort identisch markiert siehe Abschnitt 8.3.1).



### 8.3.5 Sequenzierergebnis von pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T

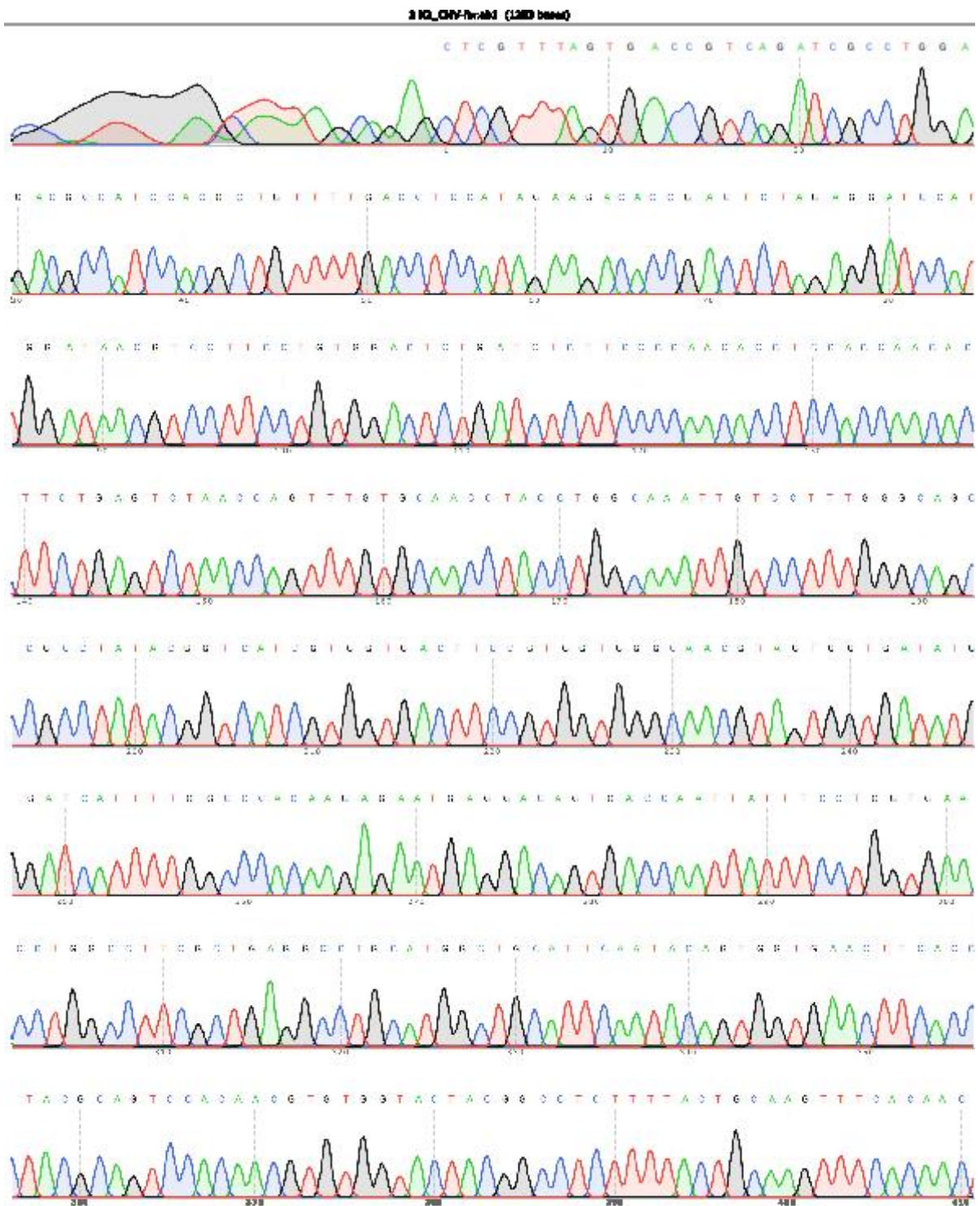


Abbildung 21: Auszug aus dem Sequenzierungsergebnis des pLenti6/V5-D-TOPO-NK1R-T

**Gensequenz:**

5'...CTCGTTTAGTGACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGA  
CACCGACTCTAGAGGATCCATGGATAACGTCCTTCCTGTGGACTCTGATCTCTTCCCCAACACCTCC  
ACCAACACTTCTGAGTCTAACCAGTTTGTCGAACCTACCTGGCAAATTGTCCTTTGGGCAGCCGCCT  
ATACGGTCATCGTGGTGACTTCCGTGGTGGGCAACGTAGTGGTGATATGGATCATTTTGGCCACA  
AGAGAATGAGGACAGTGACCAATTATTTCTGGTGAACCTGGCCTTCGCTGAGGCCTGCATGGCTG  
CATTCAATACAGTGGTGAACCTCACCTACGCAGTCCACAACGTGTGGTACTACGGCCTCTTTACTG  
CAAGTTTCACAACTTCTTCCCCATTGCTGCTCTCTTCGCCAGTATCTACTCCATGACAGCTGTGGCCT  
TTGACAGATACATGGCCATCATCCACCCTCTTCAGCCCCGGCTGTCGGCCACTGCTACCAAAGTGG  
TCATCTTTGTCATCTGGGTCCTGGCTCTCCTGCTGGCCTTCCCACAGGGCTACTACTCCACCACAGA  
GACCATGCCCAGCAGAGTAGTGTGCATGATTGAGTGGCCAGAACATCCCAACAGGACTTACGAGA  
AAGCGTACCACATCTGTGTGACTGTGCTGATCTACTTCCCTGCTGCTGGTGATTGGCTATGCATA  
CACTGTGGTAGGGATTACACTGTGGGCCAGTGAGATCCCCGGTGACTCCTCTGACCGTTACCATGA  
GCAAGTCTCTGCCAAGCGCAAGGTGGTCAAATGATGATCGTGGTTGTGTGTACCTTCGCCATCTG  
CTGGCTGCCCTTCCACATCTTCTTCTCCTGCCCTACATCAACCCAGATCTCTACCTTAAGAAGTTC  
ATCCAGCAGGTCTACCTGGCCAGCATGTGGCTGGCCATGAGTTTACCATGTACAACCCCATCATC  
TACTGCTGCCTCAATGACAGGTAACTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGGTTTCAAGGTAAGCCTATCCC  
TAACCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCTACCGGTTAGTAATGAGTTTGAATTAATTCTGTGGA  
ATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATG  
CATCTCATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGC...3'

*Der hellgrau markierte Bereich zeigt die Gensequenz des NK1R-T. Die pinken Pfeile markieren Anfang und Ende der Gensequenz des NK1R-T. Es zeigt sich ein Nachweis der Gensequenz im neuen Überexpressionsplasmid. Die Sequenz des NK1R-T ist so auch im ursprünglichen Plasmid zu finden (Stellen dort identisch markiert, siehe Abschnitt 8.3.2). Gelb markiert und mit roten Pfeilen gekennzeichnet sind die Teile des pLenti-6/V5-D-TOPO-Vektors, die den NK1R-T umgeben und die in der dargestellten Gensequenz identifiziert werden können. Sie kommen auch im ursprünglichen pLenti-6/V5-D-TOPO-Vektor vor (Stelle dort identisch markiert siehe Abschnitt 8.3.1).*

#### 8.4 Überblick über die absoluten Ct-Werte nach Überexpression

Zur Überprüfung der erfolgten Transduktion von MLO-Y4-Zellen mit den beiden Isotypvarianten des NK1R (NK1R-F und NK1R-T) auf mRNA-Ebene wurden qRT-PCRs durchgeführt. Die nachfolgend dargestellte Übersicht (Tabelle 7) zeigt den spätesten (minimal) und den frühesten (maximal) gemessenen absoluten Ct-Wert des jeweiligen GOIs, um die Bandbreite, in denen sich die Genexpressionswerte befanden, abzubilden.

**Tabelle 7: Überblick über absolute Ct-Werte gemessen im Überexpressionsversuch**

	<b>Gen: NK1R-T/F (erkennt beide Rezeptorvarianten)</b>	
<b>Probe:</b>		
MLO-Y4_NK1R-F	min	29,11
	max	26,62
MLO-Y4_NK1R-T	min	27,03
	max	25,78
MLO-Y4_LacZ	min	no Cq
	max	34,00
MLO-Y4	min	no Cq
	max	36,45

*Minimaler (min) und maximaler (max) absoluter Ct-Wert der Mittelwerte des Gene of Interests NK1R-T/F in den verschiedenen Zellklonen/-typen MLO-Y4\_NK1R-F, MLO-Y4\_NK1R-T, MLO-Y4\_LacZ, MLO-Y4 im Rahmen der Überprüfung der Transduktionsergebnisse der NK1R-Isoformen in murine Osteozyten der Zelllinie MLO-Y4.*

	<b>Gen: NK1R-F (erkennt nur Volllänge-Variante)</b>	
<b>Probe:</b>		
MLO-Y4_NK1R-F	min	29,93
	max	29,26
MLO-Y4_NK1R-T	min	no Cq
	max	35,10
MLO-Y4_LacZ	min	no Cq
	max	32,81
MLO-Y4	min	no Cq
	max	32,91

*Minimaler (min) und maximaler (max) absoluter Ct-Wert der Mittelwerte des Gene of Interests (GOI) NK1R-F in den verschiedenen Zellklonen/-typen MLO-Y4\_NK1R-F, MLO-Y4\_NK1R-T, MLO-Y4\_LacZ, MLO-Y4 im Rahmen der Überprüfung der Transduktionsergebnisse der NK1R-Isoformen in murine Osteozyten der Zelllinie MLO-Y4.*

## 9 Abkürzungsverzeichnis

Auflistung der in der Arbeit verwendeten Abkürzungen.

%	Prozent
()	Klammern
/	pro
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
αCGRP	<i>Alpha Calcitonin-gene related peptide</i>
A	Ampere
AT	Österreich
AG	Arbeitsgemeinschaft
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
β-Arr	β-Arrestin
BCA	Bicinchoninsäure
BCS	<i>bovine calf serum</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
ca	<i>circa</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
CH	Schweiz
CIP	alkalischer Phosphatase, <i>Calf Intestinal</i>
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRLR	<i>Calcitonin receptor-like receptor</i>
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
Cq	<i>Quantification Cycle</i>
D	Deutschland
DAG	Diacylglycerin
dest.	destilliert

Dkk1	<i>Dickkopf-related protein1</i>
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor:in
DTT	Dithiothreitol
dyn	Einheit der Kraft (1dyn entspricht $10^{-5}$ N)
EB	<i>elution buffer</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ET	<i>endothelin</i>
et al.	und andere
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FFSS	<i>Fluid Flow Shear Stress</i>
Fz	<i>Frizzled</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
ggf	gegebenenfalls
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HSC	haematopoietische Stammzelle
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IL-6	Interleukin-6
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
J	Japan
K	Kontrolle
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LB	<i>lysogen broth</i>
Lrp	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
mA	Milliampere

MAPK	<i>Mitogen-activated protein Kinasen</i>
MCSF	<i>Macrophage-colony-stimulating factor</i>
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MLO-Y4	<i>Murine Osteocyte-like cell line</i>
mm	Millimeter
mM	Millimol/Liter
mmol	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mol	Molekulargewicht
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSC	mesenchymale Stammzellen
MT1	Membran Typ 1
MTA	Medizinisch-technische Assistentin
N	Einheit der Kraft, Newton
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	<i>Non-Essential Amino Acids</i>
NF-κB	<i>nuclear factor Kappa B</i>
ng	Nanogramm
NK1R	Neurokinin1-Rezeptor
NK1R-F	Neurokinin1-Rezeptor <i>fulllength</i>
NK1R-T	Neurokinin1-Rezeptor <i>truncated</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthese
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphat-Salz-Puffer
pH	pH-Wert
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PK	Proteinkinase
PNS	peripheries Nervensystem
PVDF	Polyvinylidenfluorid

qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RAMP1	<i>receptor activity modifying protein 1</i>
RANK	<i>Receptor Activator of NF-<math>\kappa</math>B</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-<math>\kappa</math>B Ligand</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotation pro Minute
Prof.	Professor:in
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrilamid-Gelelektrophorese
SOST	<i>Sclerostin</i>
SP	Substanz P
TAC1	<i>Tachykinin Precursor 1</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TIMP3	<i>tissue inhibitor 3 of metalloproteinases</i>
T-TBS	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TU	<i>transduction unit</i>
UE	Untereinheit
UK	Vereinigtes Königreich
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
Wnt	<i>Wingless-int</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

## 10 Literaturverzeichnis

1. Currey JD. Bone strength: what are we trying to measure? *Calcif Tissue Int.* 2001;68(4):205–10. doi:10.1007/s002230020040 Cited in: PubMed; PMID 11353945.
2. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2012. 680 p. ger.
3. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000;21(2):115–37. doi:10.1210/edrv.21.2.0395 Cited in: PubMed; PMID 10782361.
4. Wolff J, Wessinghage D, Mittelmeier H, editors. *Das Gesetz der Transformation der Knochen.* 1892nd ed. Stuttgart: Schattauer; 1991. 151 p. (Reihe; vol. 4). ger.
5. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:455–98. doi:10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095721 Cited in: PubMed; PMID 16834564.
6. Robling AG, Turner CH. Mechanical Signaling for Bone Modeling and Remodeling. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(4):319–38. Cited in: PubMed; PMID 19817708.
7. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, Mechanosensing and Wnt Signaling. *Bone.* 2008;42(4):606–15. doi:10.1016/j.bone.2007.12.224 Cited in: PubMed; PMID 18280232.
8. Rucci N. Molecular biology of bone remodelling. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2008;5(1):49–56. Cited in: PubMed; PMID 22460846.
9. Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology.* 2001;142(12):5050–5. doi:10.1210/endo.142.12.8536 Cited in: PubMed; PMID 11713196.
10. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337–42. doi:10.1038/nature01658 Cited in: PubMed; PMID 12748652.
11. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol.* 1988;106(6):2139–51. Cited in: PubMed; PMID 3384856.
12. Almalki SG, Agrawal DK. Key Transcription Factors in the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Differentiation.* 2016;92(1-2):41–51. doi:10.1016/j.diff.2016.02.005 Cited in: PubMed; PMID 27012163.
13. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2017;26(6). doi:10.1111/ecc.12740 Cited in: PubMed; PMID 28786518.
14. Dallas SL, Bonewald LF. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1192:437–43. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05246.x Cited in: PubMed; PMID 20392270.
15. Gusmão CVBd, Belangero WD. HOW DO BONE CELLS SENSE MECHANICAL LOADING? *Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition).* 2009;44(4):299–305. doi:10.1016/S2255-4971(15)30157-9
16. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev.* 2013;34(5):658–90. doi:10.1210/er.2012-1026 Cited in: PubMed; PMID 23612223.
17. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* 2006;235(1):176–90. doi:10.1002/dvdy.20603 Cited in: PubMed; PMID 16258960.
18. Chen H, Senda T, Kubo K-y. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Med Mol Morphol.* 2015;48(2):61–8. doi:10.1007/s00795-015-0099-y Cited in: PubMed; PMID 25791218.
19. Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billingham RC, Wu W, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H, Poole AR. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 1):147–56. doi:10.1242/jcs.01581 Cited in: PubMed; PMID 15601659.
20. Liu M, Kurimoto P, Zhang J, Niu QT, Stolina M, Dechow PC, Feng JQ, Hesterman J, Silva MD, Ominsky MS, Richards WG, Ke H, Kostenuik PJ. Sclerostin and DKK1 Inhibition Preserves and Augments Alveolar Bone Volume and Architecture in Rats with Alveolar Bone Loss. *J Dent Res.* 2018;97(9):1031–8. doi:10.1177/0022034518766874 Cited in: PubMed; PMID 29617179.
21. Ott SM. Sclerostin and Wnt signaling--the pathway to bone strength. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12):6741–3. doi:10.1210/jc.2005-2370 Cited in: PubMed; PMID 16330810.



22. Zhao S, Zhang YKY, Harris S, Ahuja SS, Bonewald LF. MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res.* 2002;17(11):2068–79. doi:10.1359/jbmr.2002.17.11.2068 Cited in: PubMed; PMID 12412815.
23. Baylink D, Sipe J, Wergedal J, Whittemore OJ. Vitamin D-enhanced osteocytic and osteoclastic bone resorption. *Am J Physiol.* 1973;224(6):1345–57. doi:10.1152/ajplegacy.1973.224.6.1345 Cited in: PubMed; PMID 4712149.
24. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med.* 2011;17(10):1235–41. doi:10.1038/nm.2448 Cited in: PubMed; PMID 21909103.
25. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011;17(10):1231–4. doi:10.1038/nm.2452 Cited in: PubMed; PMID 21909105.
26. Parfitt AM. The coupling of bone formation to bone resorption: A critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metabolic Bone Disease and Related Research.* 1982;4(1):1–6. doi:10.1016/0221-8747(82)90002-9
27. Robling AG, Bonewald LF. The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol.* 2020;82:485–506. doi:10.1146/annurev-physiol-021119-034332 Cited in: PubMed; PMID 32040934.
28. Li J, Sarosi I, Cattley RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M, Morony S, Adamu S, Geng Z, Qiu W, Kostenuik P, Lacey DL, Simonet WS, Bolon B, Qian X, Shalhoub V, Ominsky MS, Zhu Ke H, Li X, Richards WG. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone.* 2006;39(4):754–66. doi:10.1016/j.bone.2006.03.017 Cited in: PubMed; PMID 16730481.
29. Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *Journal of Biomechanics.* 1994;27(3):339–60. doi:10.1016/0021-9290(94)90010-8
30. Hillsley MV, Frangos JA. Bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow. *Biotechnol Bioeng.* 1994;43(7):573–81. doi:10.1002/bit.260430706 Cited in: PubMed; PMID 11540959.
31. Buenzli PR, Sims NA. Quantifying the osteocyte network in the human skeleton. *Bone.* 2015;75:144–50. doi:10.1016/j.bone.2015.02.016 Cited in: PubMed; PMID 25708054.
32. Bonewald LF. The Role of the Osteocyte in Bone and Nonbone Disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2017;46(1):1–18.
33. Lu XL, Huo B, Park M, Guo XE. Calcium response in osteocytic networks under steady and oscillatory fluid flow. *Bone.* 2012;51(3):466–73. doi:10.1016/j.bone.2012.05.021 Cited in: PubMed; PMID 22750013.
34. Price C, Zhou X, Li W, Wang L. Real-time measurement of solute transport within the lacunar-canalicular system of mechanically loaded bone: direct evidence for load-induced fluid flow. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):277–85. doi:10.1002/jbmr.211 Cited in: PubMed; PMID 20715178.
35. Hemmatian H, Bakker AD, Klein-Nulend J, van Lenthe GH. Aging, Osteocytes, and Mechanotransduction. *Curr Osteoporos Rep.* 2017;15(5):401–11. doi:10.1007/s11914-017-0402-z Cited in: PubMed; PMID 28891009.
36. Siller-Jackson AJ, Burra S, Gu S, Xia X, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX. Adaptation of connexin 43-hemichannel prostaglandin release to mechanical loading. *J Biol Chem.* 2008;283(39):26374–82. doi:10.1074/jbc.M803136200 Cited in: PubMed; PMID 18676366.
37. Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell.* 2005;16(7):3100–6. doi:10.1091/mbc.e04-10-0912 Cited in: PubMed; PMID 15843434.
38. Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, Kharode Y, Sauter L, Babij P, Brown EL, Hill AA, Akhter MP, Johnson ML, Recker RR, Komm BS, Bex FJ. Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem.* 2006;281(42):31720–8. doi:10.1074/jbc.M602308200 Cited in: PubMed; PMID 16908522.
39. Santos A, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, Semeins CM, Klein-Nulend J. Pulsating fluid flow modulates gene expression of proteins involved in Wnt signaling pathways in osteocytes. *J Orthop Res.* 2009;27(10):1280–7. doi:10.1002/jor.20888 Cited in: PubMed; PMID 19353691.
40. Kulkarni RN, Bakker AD, Everts V, Klein-Nulend J. Inhibition of osteoclastogenesis by mechanically loaded osteocytes: involvement of MEPE. *Calcif Tissue Int.* 2010;87(5):461–8. doi:10.1007/s00223-010-9407-7 Cited in: PubMed; PMID 20725825.

41. Gluhak-Heinrich J, Ye L, Bonewald LF, Feng JQ, MacDougall M, Harris SE, Pavlin D. Mechanical loading stimulates dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res.* 2003;18(5):807–17. doi:10.1359/jbmr.2003.18.5.807 Cited in: PubMed; PMID 12733719.
42. Yang W, Lu Y, Kalajzic I, Guo D, Harris MA, Gluhak-Heinrich J, Kotha S, Bonewald LF, Feng JQ, Rowe DW, Turner CH, Robling AG, Harris SE. Dentin matrix protein 1 gene cis-regulation: use in osteocytes to characterize local responses to mechanical loading in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2005;280(21):20680–90. doi:10.1074/jbc.M500104200 Cited in: PubMed; PMID 15728181.
43. Klein-Nulend J, Bakker AD, Bacabac RG, Vatsa A, Weinbaum S. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone.* 2013;54(2):182–90. doi:10.1016/j.bone.2012.10.013 Cited in: PubMed; PMID 23085083.
44. Duan P, Bonewald LF. The role of the wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2016;77(Pt A):23–9. doi:10.1016/j.biocel.2016.05.015 Cited in: PubMed; PMID 27210503.
45. Batra N, Burra S, Siller-Jackson AJ, Gu S, Xia X, Weber GF, DeSimone D, Bonewald LF, Lafer EM, Sprague E, Schwartz MA, Jiang JX. Mechanical stress-activated integrin  $\alpha 5\beta 1$  induces opening of connexin 43 hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(9):3359–64. doi:10.1073/pnas.1115967109 Cited in: PubMed; PMID 22331870.
46. Burra S, Nicoletta DP, Francis WL, Freitas CJ, Mueschke NJ, Poole K, Jiang JX. Dendritic processes of osteocytes are mechanotransducers that induce the opening of hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(31):13648–53. doi:10.1073/pnas.1009382107 Cited in: PubMed; PMID 20643964.
47. Palumbo C, Ferretti M, Marotti G. Osteocyte dendrogenesis in static and dynamic bone formation: an ultrastructural study. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;278(1):474–80. doi:10.1002/ar.a.20032 Cited in: PubMed; PMID 15103743.
48. Bonewald LF. Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision.* 2006;3(10):7–15. doi:10.1138/20060233 Cited in: PubMed; PMID 17415409.
49. Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, Feng JQ, Bonewald LF, Kneissel M. Osteocyte Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2010;30(12):3071–85. doi:10.1128/MCB.01428-09 Cited in: PubMed; PMID 20404086.
50. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229–38. doi:10.1002/jbmr.320 Cited in: PubMed; PMID 21254230.
51. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Prometheus Lernatlas - Kopf, Hals und Neuroanatomie. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2015. (Thieme eRef). ger.
52. Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. Physiologie. 8th ed. Stuttgart: Thieme; 2018. ger.
53. Hukkanen M, Kontinen YT, Rees RG, Santavirta S, Terenghi G, Polak JM. Distribution of nerve endings and sensory neuropeptides in rat synovium, meniscus and bone. *Int J Tissue React.* 1992;14(1):1–10. Cited in: PubMed; PMID 1383167.
54. Madsen JE, Hukkanen M, Aune AK, Basran I, Møller JF, Polak JM, Nordsletten L. Fracture healing and callus innervation after peripheral nerve resection in rats. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;(351):230–40. Cited in: PubMed; PMID 9646767.
55. Jones KB, Mollano AV, Morcuende JA, Cooper RR, Saltzman CL. Bone and Brain: A Review of Neural, Hormonal, and Musculoskeletal Connections. *Iowa Orthop J.* 2004;24:123–32. Cited in: PubMed; PMID 15296219.
56. Cooper RR. Nerves in cortical bone. *Science.* 1968;160(3825):327–8. doi:10.1126/science.160.3825.327 Cited in: PubMed; PMID 5641266.
57. Grässel S. The role of peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in cartilage and bone physiology and pathophysiology. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(6). doi:10.1186/s13075-014-0485-1 Cited in: PubMed; PMID 25789373.
58. Norevall LI, Matsson L, Forsgren S. Main sensory neuropeptides, but not VIP and NPY, are involved in bone remodeling during orthodontic tooth movement in the rat. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;865:353–9. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb11195.x Cited in: PubMed; PMID 9928029.
59. Norevall LI, Forsgren S, Matsson L. Expression of neuropeptides (CGRP, substance P) during and after orthodontic tooth movement in the rat. *Eur J Orthod.* 1995;17(4):311–25. doi:10.1093/ejo/17.4.311 Cited in: PubMed; PMID 8521925.
60. Goto T, Tanaka T. Tachykinins and tachykinin receptors in bone. *Microsc Res Tech.* 2002;58(2):91–7. doi:10.1002/jemt.10123 Cited in: PubMed; PMID 12203708.

61. FELL WA. The effect of sympathectomy on the size of haversian canals in the cat. *J Anat.* 1949;83(Pt 1):67. Cited in: PubMed; PMID 1811955.
62. Sherman BE, Chole RA. Effect of pharmacological sympathectomy on osteoclastic activity in the gerbilline auditory bulla in vivo. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1999;108(11 Pt 1):1078–87. doi:10.1177/000348949910801110 Cited in: PubMed; PMID 10579236.
63. Sherman BE, Chole RA. A mechanism for sympathectomy-induced bone resorption in the middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;113(5):569–81. doi:10.1177/019459989511300508 Cited in: PubMed; PMID 7478647.
64. Millward-Sadler SJ, Mackenzie A, Wright MO, Lee H-S, Elliot K, Gerrard L, Fiskerstrand CE, Salter DM, Quinn JP. Tachykinin expression in cartilage and function in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Arthritis Rheum.* 2003;48(1):146–56. doi:10.1002/art.10711 Cited in: PubMed; PMID 12528114.
65. Muschter D, Beiderbeck A-S, Späth T, Kirschneck C, Schröder A, Grässel S. Sensory Neuropeptides and their Receptors Participate in Mechano-Regulation of Murine Macrophages. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3). doi:10.3390/ijms20030503 Cited in: PubMed; PMID 30682804.
66. Niedermair T, Kuhn V, Doranehgard F, Stange R, Wieskötter B, Beckmann J, Salmen P, Springorum H-R, Straub RH, Zimmer A, Grifka J, Grässel S. Absence of substance P and the sympathetic nervous system impact on bone structure and chondrocyte differentiation in an adult model of endochondral ossification. *Matrix Biol.* 2014;3822–35. doi:10.1016/j.matbio.2014.06.007 Cited in: PubMed; PMID 25063231.
67. Naot D, Cornish J. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone.* 2008;43(5):813–8. doi:10.1016/j.bone.2008.07.003 Cited in: PubMed; PMID 18687416.
68. Hilairt S, Bélanger C, Bertrand J, Laperrière A, Foord SM, Bouvier M. Agonist-promoted internalization of a ternary complex between calcitonin receptor-like receptor, receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and beta-arrestin. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42182–90. doi:10.1074/jbc.M107323200 Cited in: PubMed; PMID 11535606.
69. Cottrell GS, Padilla B, Pikiros S, Roosterman D, Steinhoff M, Grady EF, Bunnett NW. Post-endocytic sorting of calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 1. *J Biol Chem.* 2007;282(16):12260–71. doi:10.1074/jbc.M606338200 Cited in: PubMed; PMID 17310067.
70. Manoukian R, Sun H, Miller S, Di Shi, Chan B, Xu C. Effects of monoclonal antagonist antibodies on calcitonin gene-related peptide receptor function and trafficking. *J Headache Pain.* 2019;20(1):44. doi:10.1186/s10194-019-0992-1 Cited in: PubMed; PMID 31039731.
71. Nelson MT, Huang Y, Brayden JE, Hescheler J, Standen NB. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K<sup>+</sup> channels. *Nature.* 1990;344(6268):770–3. doi:10.1038/344770a0 Cited in: PubMed; PMID 2109832.
72. Russell FA, King R, Smillie S-J, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1099–142. doi:10.1152/physrev.00034.2013 Cited in: PubMed; PMID 25287861.
73. van ROSSUM D, HANISCH U-K, Quirion R. Neuroanatomical Localization, Pharmacological Characterization and Functions of CGRP, Related Peptides and Their Receptors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 1997;21(5):649–78. doi:10.1016/S0149-7634(96)00023-1
74. Hill EL, Elde R. Calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerve fibers in mandibular periosteum of rat: Evidence for primary afferent origin. *Neuroscience Letters.* 1988;85(2):172–8. doi:10.1016/0304-3940(88)90347-3
75. Hukkanen M, Konttinen YT, Rees RG, Gibson SJ, Santavirta S, Polak JM. Innervation of bone from healthy and arthritic rats by substance P and calcitonin gene related peptide containing sensory fibers. *J Rheumatol.* 1992;19(8):1252–9. Cited in: PubMed; PMID 1383542.
76. Bjurholm A, Kreicbergs A, Brodin E, Schultzberg M. Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides.* 1988;9(1):165–71. doi:10.1016/0196-9781(88)90023-X
77. Imai S, Matsusue Y. Neuronal regulation of bone metabolism and anabolism: calcitonin gene-related peptide-, substance P-, and tyrosine hydroxylase-containing nerves and the bone. *Microsc Res Tech.* 2002;58(2):61–9. doi:10.1002/jemt.10119 Cited in: PubMed; PMID 12203704.
78. Granholm S, Lundberg P, Lerner UH. Expression of the calcitonin receptor, calcitonin receptor-like receptor, and receptor activity modifying proteins during osteoclast differentiation. *J Cell Biochem.* 2008;104(3):920–33. doi:10.1002/jcb.21674 Cited in: PubMed; PMID 18384073.

79. Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest.* 1986;78(2):355–60. doi:10.1172/JCI112584 Cited in: PubMed; PMID 3016026.
80. Vignery A, McCarthy TL. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide stimulates insulin-like growth factor I production by primary fetal rat osteoblasts. *Bone.* 1996;18(4):331–5. doi:10.1016/8756-3282(96)00017-8
81. Sakagami Y, Girasole G, Yu XP, Boswell HS, Manolagas SC. Stimulation of interleukin-6 production by either calcitonin gene-related peptide or parathyroid hormone in two phenotypically distinct bone marrow-derived murine stromal cell lines. *J Bone Miner Res.* 1993;8(7):811–6. doi:10.1002/jbmr.5650080706 Cited in: PubMed; PMID 8394639.
82. Millet I, Vignery A. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide inhibits TNF-alpha but poorly induces IL-6 production by fetal rat osteoblasts. *Cytokine.* 1997;9(12):999–1007. doi:10.1006/cyto.1997.0245 Cited in: PubMed; PMID 9417811.
83. Zaidi M, Chambers TJ, Gaines Das RE, Morris HR, MacIntyre I. A direct action of human calcitonin gene-related peptide on isolated osteoclasts. *J Endocrinol.* 1987;115(3):511–8. doi:10.1677/joe.0.1150511 Cited in: PubMed; PMID 3502132.
84. Sample SJ, Hao Z, Wilson AP, Muir P. Role of calcitonin gene-related peptide in bone repair after cyclic fatigue loading. *PLoS ONE.* 2011;6(6):e20386. doi:10.1371/journal.pone.0020386 Cited in: PubMed; PMID 21694766.
85. Shih C, Bernard GW. Calcitonin gene related peptide enhances bone colony development in vitro. *Clin Orthop Relat Res.* 1997;(334):335–44. Cited in: PubMed; PMID 9005931.
86. Niedermair T, Schirner S, Lasheras MG, Straub RH, Grassel S. Absence of  $\alpha$ -calcitonin gene-related peptide modulates bone remodeling properties of murine osteoblasts and osteoclasts in an age-dependent way. *Mech Ageing Dev.* 2020;189111265. doi:10.1016/j.mad.2020.111265 Cited in: PubMed; PMID 32446790.
87. Irie K, Hara-Irie F, Ozawa H, Yajima T. Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerve fibers in bone tissue and their involvement in bone remodeling. *Microsc Res Tech.* 2002;58(2):85–90. doi:10.1002/jemt.10122 Cited in: PubMed; PMID 12203707.
88. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nature New Biol.* 1971;232(29):86–7. doi:10.1038/newbio232086a0 Cited in: PubMed; PMID 5285346.
89. Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci.* 2004;74(12):1445–63. doi:10.1016/j.lfs.2003.09.039 Cited in: PubMed; PMID 14729395.
90. Steinhoff MS, Mentzer B v., Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW. Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. *Physiol Rev.* 2014;94(1):265–301. doi:10.1152/physrev.00031.2013 Cited in: PubMed; PMID 24382888.
91. Severini C, Improta G, Falconieri-Ersamer G, Salvadori S, Ersamer V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):285–322. doi:10.1124/pr.54.2.285 Cited in: PubMed; PMID 12037144.
92. Muñoz M, Coveñas R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. *Amino Acids.* 2014;46(7):1727–50. doi:10.1007/s00726-014-1736-9 Cited in: PubMed; PMID 24705689.
93. Douglas SD, Leeman SE. Neurokinin-1 receptor: functional significance in the immune system in reference to selected infections and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;121783–95. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05826.x Cited in: PubMed; PMID 21091716.
94. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol.* 2004;201(2):167–80. doi:10.1002/jcp.20061 Cited in: PubMed; PMID 15334652.
95. Garcia-Recio S, Gascón P. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. *Biomed Res Int.* 2015;2015495704. doi:10.1155/2015/495704 Cited in: PubMed; PMID 26421291.
96. Lai J-P, Lai S, Tuluc F, Tansky MF, Kilpatrick LE, Leeman SE, Douglas SD. Differences in the length of the carboxyl terminus mediate functional properties of neurokinin-1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(34):12605–10. doi:10.1073/pnas.0806632105 Cited in: PubMed; PMID 18713853.
97. Bowden JJ, Garland AM, Baluk P, Lefevre P, Grady EF, Vigna SR, Bunnett NW, McDonald DM. Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptors at sites of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(19):8964–8. doi:10.1073/pnas.91.19.8964 Cited in: PubMed; PMID 7522326.

98. Grady EF, Garland AM, Gamp PD, Lovett M, Payan DG, Bunnett NW. Delineation of the endocytic pathway of substance P and its seven-transmembrane domain NK1 receptor. *Mol Biol Cell*. 1995;6(5):509–24. doi:10.1091/mbc.6.5.509 Cited in: PubMed; PMID 7545030.
99. McConalogue K, Corvera CU, Gamp PD, Grady EF, Bunnett NW. Desensitization of the neurokinin-1 receptor (NK1-R) in neurons: effects of substance P on the distribution of NK1-R, Galphaq/11, G-protein receptor kinase-2/3, and beta-arrestin-1/2. *Mol Biol Cell*. 1998;9(8):2305–24. doi:10.1091/mbc.9.8.2305 Cited in: PubMed; PMID 9693383.
100. Mantyh PW, DeMaster E, Malhotra A, Ghilardi JR, Rogers SD, Mantyh CR, Liu H, Basbaum AI, Vigna SR, Maggio JE. Receptor endocytosis and dendrite reshaping in spinal neurons after somatosensory stimulation. *Science*. 1995;268(5217):1629–32. doi:10.1126/science.7539937 Cited in: PubMed; PMID 7539937.
101. Nishimura K, Warabi K, Roush ED, Frederick J, Schwinn DA, Kwatra MM. Characterization of GRK2-catalyzed phosphorylation of the human substance P receptor in Sf9 membranes. *Biochemistry*. 1998;37(5):1192–8. doi:10.1021/bi972302s Cited in: PubMed; PMID 9477943.
102. Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17(4):159–65. doi:10.1016/j.tem.2006.03.008 Cited in: PubMed; PMID 16595179.
103. DeFea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, Nishijima D, Déry O, Bunnett NW. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(20):11086–91. doi:10.1073/pnas.190276697 Cited in: PubMed; PMID 10995467.
104. Spitsin S, Pappa V, Douglas SD. Truncation of neurokinin-1 receptor-Negative regulation of substance P signaling. *J Leukoc Biol*. 2018. doi:10.1002/JLB.3MIR0817-348R Cited in: PubMed; PMID 29345372.
105. Shih C, Bernard GW. Neurogenic Substance P Stimulates Osteogenesis In Vitro. *Peptides*. 1997;18(2):323–6. doi:10.1016/S0196-9781(96)00280-X
106. Goto T, Nakao K, Gunjigake KK, Kido MA, Kobayashi S, Tanaka T. Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors. *Neuropeptides*. 2007;41(1):25–31. doi:10.1016/j.npep.2006.11.002 Cited in: PubMed; PMID 17204323.
107. Nicolay OF, Davidovitch Z, Shanfeld JL, Alley K. Substance P immunoreactivity in periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *Bone and Mineral*. 1990;11(1):19–29. doi:10.1016/0169-6009(90)90012-5
108. Kingery WS, Offley SC, Guo T-Z, Davies MF, Clark JD, Jacobs CR. A substance P receptor (NK1) antagonist enhances the widespread osteoporotic effects of sciatic nerve section. *Bone*. 2003;33(6):927–36. doi:10.1016/j.bone.2003.07.003 Cited in: PubMed; PMID 14678852.
109. Wang L, Zhao R, Shi X, Wei T, Halloran BP, Clark DJ, Jacobs CR, Kingery WS. Substance P stimulates bone marrow stromal cell osteogenic activity, osteoclast differentiation, and resorption activity in vitro. *Bone*. 2009;45(2):309–20. doi:10.1016/j.bone.2009.04.203 Cited in: PubMed; PMID 19379851.
110. Lai J-P, Ho WZ, Kilpatrick LE, Wang X, Tuluc F, Korchak HM, Douglas SD. Full-length and truncated neurokinin-1 receptor expression and function during monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(20):7771–6. doi:10.1073/pnas.0602563103 Cited in: PubMed; PMID 16675550.
111. Fong TM, Anderson SA, Yu H, Huang RR, Strader CD. Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor. *Mol Pharmacol*. 1992;41(1):24–30. Cited in: PubMed; PMID 1310144.
112. Lai J-P, Cnaan A, Zhao H, Douglas SD. Detection of full-length and truncated neurokinin-1 receptor mRNA expression in human brain regions. *J Neurosci Methods*. 2008;168(1):127–33. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.10.004 Cited in: PubMed; PMID 18035424.
113. Caberlotto L, Hurd YL, Murdock P, Wahlin JP, Melotto S, Corsi M, Carletti R. Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain. *Eur J Neurosci*. 2003;17(9):1736–46. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02600.x Cited in: PubMed; PMID 12752772.
114. Garnier A, Ilmer M, Becker K, Häberle B, Schweinitz D v., Kappler R, Berger M. Truncated neurokinin-1 receptor is an ubiquitous antitumor target in hepatoblastoma, and its expression is independent of tumor biology and stage. *Oncol Lett*. 2016;11(1):870–8. doi:10.3892/ol.2015.3951 Cited in: PubMed; PMID 26870298.
115. Pohl A, Kappler R, Mühling J, Schweinitz D v., Berger M. Expression of Truncated Neurokinin-1 Receptor in Childhood Neuroblastoma is Independent of Tumor Biology and Stage. *Anticancer Res*. 2017;37(11):6079–85. doi:10.21873/anticancer.12056 Cited in: PubMed; PMID 29061788.

116. Gillespie E, Leeman SE, Watts LA, Coukos JA, O'Brien MJ, Cerda SR, Farraye FA, Stucchi AF, Becker JM. Truncated neurokinin-1 receptor is increased in colonic epithelial cells from patients with colitis-associated cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(42):17420–5. doi:10.1073/pnas.1114275108 Cited in: PubMed; PMID 21969570.
117. Gao X, Wang Z. Difference in expression of two neurokinin-1 receptors in adenoma and carcinoma from patients that underwent radical surgery for colorectal carcinoma. *Oncol Lett*. 2017;14(3):3729–33. doi:10.3892/ol.2017.6588 Cited in: PubMed; PMID 28927139.
118. DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Déry O, Mullins RD, Bunnett NW. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol*. 2000;148(6):1267–81. doi:10.1083/jcb.148.6.1267 Cited in: PubMed; PMID 10725339.
119. Li H, Leeman SE, Slack BE, Hauser G, Saltsman WS, Krause JE, Blusztajn JK, Boyd ND. A substance P (neurokinin-1) receptor mutant carboxyl-terminally truncated to resemble a naturally occurring receptor isoform displays enhanced responsiveness and resistance to desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(17):9475–80. doi:10.1073/pnas.94.17.9475 Cited in: PubMed; PMID 9256507.
120. Tansky MF, Pothoulakis C, Leeman SE. Functional consequences of alteration of N-linked glycosylation sites on the neurokinin 1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(25):10691–6. doi:10.1073/pnas.0703394104
121. Zhou Y, Wang M, Tong Y, Liu X, Zhang L, Dong D, Shao J, Zhou Y. miR-206 Promotes Cancer Progression by Targeting Full-Length Neurokinin-1 Receptor in Breast Cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2019;18153303381987516. doi:10.1177/1533033819875168
122. McGillis JP, Mitsuhashi M, Payan DG. Immunomodulation by tachykinin neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;59485–94. doi:10.1111/j.1749-6632.1990.tb40470.x Cited in: PubMed; PMID 1696081.
123. Morelli AE, Sumpter TL, Rojas-Canales DM, Bandyopadhyay M, Chen Z, Tkacheva O, Shufesky WJ, Wallace CT, Watkins SC, Berger A, Paige CJ, Falo LD, Larregina AT. Neurokinin-1 Receptor Signaling Is Required for Efficient Ca<sup>2+</sup> Flux in T-Cell-Receptor-Activated T Cells. *Cell Reports*. 2020;30(10):3448–3465.e8. doi:10.1016/j.celrep.2020.02.054 Cited in: PubMed; PMID 32160549.
124. Knothe Tate ML. “Whither flows the fluid in bone?” An osteocyte's perspective. *Journal of Biomechanics*. 2003;36(10):1409–24. doi:10.1016/S0021-9290(03)00123-4
125. Fristad I, Vandevska-Radunovic V, Fjeld K, Wimalawansa SJ, Hals Kvinnsland I. NK1, NK2, NK3 and CGRP1 receptors identified in rat oral soft tissues, and in bone and dental hard tissue cells. *Cell Tissue Res*. 2003;311(3):383–91. doi:10.1007/s00441-002-0691-z Cited in: PubMed; PMID 12658446.
126. Chen S, Qin J, Mu T, Le Wang, Jiang S, Zhao P, Pei G. Effect of tissue engineered bone implantation with vascular bundle and sensory nerve bundle on expression of neurokinin 1 receptor and vasoactive intestinal peptide type 1 receptor in vivo. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2010;24(7):785–91. chi. Cited in: PubMed; PMID 20695372.
127. Kato Y, Windle JJ, Koop BA, Mundy GR, Bonewald LF. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res*. 1997;12(12):2014–23. doi:10.1359/jbmr.1997.12.12.2014 Cited in: PubMed; PMID 9421234.
128. ThermoFisher Scientific. 293FT Zellreihe: (Bestellseite und Erläuterungen zur Zellreihe) [Internet].
129. NIH3T3 Cell Line Transfection, Expression and Culture [Internet] [cited 2019 Jul 18]. Available from: <http://www.nih3t3.com/>
130. NIH/3T3 ATCC® CRL-1658™ [Internet] [cited 2019 Jul 18]. Available from: [https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1658.aspx?geo\\_country=de#generalinformation](https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1658.aspx?geo_country=de#generalinformation)
131. Mi LY, Basu M, Fritton SP, Cowin SC. Analysis of avian bone response to mechanical loading. Part two: Development of a computational connected cellular network to study bone intercellular communication. *Biomech Model Mechanobiol*. 2005;4(2-3):132–46. doi:10.1007/s10237-004-0066-3 Cited in: PubMed; PMID 16365733.
132. ibidi.  $\mu$ -Slide VI 0.1 | Channel Slide for Parallel Flow Assays | ibidi [Internet]. 2020 [updated 2020 Oct 21; cited 2020 Oct 21]. Available from: <https://ibidi.com/channel-slides/56--slide-vi-01.html>
133. QIAGEN. <https://www.qiagen.com/us/products/top-sellers/qiaprep-spin-miniprep-kit/#productdetails> [Internet] [cited 2019 Jul 17]. Available from: undefined
134. JoVE, Cambridge, MA, (2019). Grundlegende Methoden in der Zell- und Molekularbiologie. Transformation von Bakterien: die Hitzeschock-Methode. [Internet] [cited 2019 Jul 17]. Available from: <https://www.jove.com/science-education/5059/transformation-von-bakterien-die-hitzeschock-methode?language=German>

135. Wang L, Cowin SC, Weinbaum S, Fritton SP. Modeling tracer transport in an osteon under cyclic loading. *Ann Biomed Eng.* 2000;28(10):1200–9. Cited in: PubMed; PMID 11144981.
136. Mi LY, Fritton SP, Basu M, Cowin SC. Analysis of avian bone response to mechanical loading-Part one: Distribution of bone fluid shear stress induced by bending and axial loading. *Biomech Model Mechanobiol.* 2005;4(2-3):118–31. doi:10.1007/s10237-004-0065-4 Cited in: PubMed; PMID 16254728.
137. Bonewald LF. Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Metab.* 1999;17(1):61–5. doi:10.1007/s007740050066 Cited in: PubMed; PMID 10084404.
138. Backman LJ, Fong G, Andersson G, Scott A, Danielson P. Substance P is a mechanoresponsive, autocrine regulator of human tenocyte proliferation. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e27209. doi:10.1371/journal.pone.0027209 Cited in: PubMed; PMID 22069500.
139. Ytteborg E, Torgersen JS, Pedersen ME, Helland SJ, Gridale-Helland B, Takle H. Exercise induced mechano-sensing and substance P mediated bone modeling in Atlantic salmon. *Bone.* 2013;53(1):259–68. doi:10.1016/j.bone.2012.11.025 Cited in: PubMed; PMID 23219942.
140. Zhou Y, Zhao L, Xiong T, Chen X, Zhang Y, Yu M, Yang J, Yao Z. Roles of full-length and truncated neurokinin-1 receptors on tumor progression and distant metastasis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;140(1):49–61. doi:10.1007/s10549-013-2599-6 Cited in: PubMed; PMID 23807418.
141. Muñoz M, Coveñas R. The Neurokinin-1 Receptor Antagonist Aprepitant, a New Drug for the Treatment of Hematological Malignancies: Focus on Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med.* 2020;9(6). doi:10.3390/jcm9061659 Cited in: PubMed; PMID 32492831.
142. Malone AMD, Anderson CT, Tummala P, Kwon RY, Johnston TR, Stearns T, Jacobs CR. Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(33):13325–30. doi:10.1073/pnas.0700636104 Cited in: PubMed; PMID 17673554.
143. Yan Z, Wang P, Wu J, Feng X, Cai J, Zhai M, Li J, Liu X, Jiang M, Luo E, Jing D. Fluid shear stress improves morphology, cytoskeleton architecture, viability, and regulates cytokine expression in a time-dependent manner in MLO-Y4 cells. *Cell Biol Int.* 2018;42(10):1410–22. doi:10.1002/cbin.11032 Cited in: PubMed; PMID 30022568.
144. Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE, Turner CH. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem.* 2008;283(9):5866–75. doi:10.1074/jbc.M705092200 Cited in: PubMed; PMID 18089564.
145. Pflanz D, Birkhold AI, Albiol L, Thiele T, Julien C, Seliger A, Thomson E, Kramer I, Kneissel M, Duda GN, Kornak U, Checa S, Willie BM. Sost deficiency led to a greater cortical bone formation response to mechanical loading and altered gene expression. *Sci Rep.* 2017;7(1):9435. doi:10.1038/s41598-017-09653-9 Cited in: PubMed; PMID 28842678.
146. ViraPower Lentiviral Expression Systems | Thermo Fisher Scientific - DE [Internet]. 2021 [updated 2021 May 22; cited 2021 May 22].
147. Buenzli PR, Sims NA. Quantifying the osteocyte network in the human skeleton. *Bone.* 2015;75:144–50. doi:10.1016/j.bone.2015.02.016 Cited in: PubMed; PMID 25708054.

## **11 Danksagung**

Dass diese Arbeit zu Stande gekommen ist verdanke ich nicht zuletzt vielen helfenden Händen, Ermutigern und Wegbegleitern. An dieser Stelle möchte ich mich gerne dafür bedanken:

Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Prof. Dr. Susanne Grässel, für ihre Großzügigkeit, das entgegengebrachte Vertrauen und die sehr gute Betreuung bedanken. Ebenso gilt mein Dank Dr. Dominique Muschter für die hervorragende Betreuung und Begleitung.

Ein großes Dankeschön gilt auch Prof. Dr. Joachim Grifka, der als Direktor der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universität Regensburg diese Arbeit ermöglichte.

Kaum in Worte zu fassen ist der Dank, der den großartigen MTAs der Arbeitsgruppe gebührt. Ich danke euch allen für eure Unterstützung, Geduld und Gemeinschaft, ihr seid wunderbar. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Tanja Späth und Anja Pasoldt, ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Sehr dankbar bin ich auch für meine beiden Kollegen und Mitstreiter, Christoph Lukas und Dominik Eder. Männer, es war mir ein Privileg gemeinsam mit euch zu forschen und auch manchen Tiefpunkt zu überwinden.

Dank gilt auch meinen lieben Freunden, Geschwistern und Eltern, die mich immer wieder ermutigt haben und mir ihre offenen Ohren geliehen haben.

Und nicht zuletzt gilt mein tiefster Dank Gott, denn alles was ich bin und habe kommt von ihm.





## **12 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.