

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

betreut am  
Zentrum der Chirurgie  
Klinik für Unfall-, Hand-und Wiederherstellungschirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. Ingo Marzi

**Inhibierung der MIR92A und MIR335  
Auswirkungen auf das osteogene und angiogene Potenzial von  
mononukleären Zellen des Knochenmarks (BMC) *in vitro***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Julia Rachor

Frankfurt am Main, 2017

Dekan: Prof. Dr. Josef Pfeilschifter  
Referent: Prof. Dr. Dirk Günter Henrich  
Korreferent: Prof. Dr. John Howard Barker  
Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2019

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis .....	8
1 Einleitung .....	10
1.1 Physiologische Knochenheilung .....	10
1.1.1 Primäre Knochenbruchheilung.....	10
1.1.2 Sekundäre Knochenbruchheilung .....	11
1.2 Knochendefekte kritischer Größe.....	12
1.2.1 Knochentransplantate .....	13
1.2.2 Knochenersatzmaterialien .....	14
1.3 Bone Tissue Engineering .....	16
1.3.1 Adjuvantien .....	16
1.3.2 Zellarten.....	17
1.4 MicroRNAs .....	20
1.4.1 Biogenese der miRNAs.....	21
1.4.2 MIR92A.....	22
1.4.3 MIR335 .....	24
1.5 Fragestellung .....	25
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Material .....	26
2.1.1 Geräte.....	26
2.1.2 Gebrauchswaren.....	27
2.1.3 Medien und Mediumszusätze .....	28
2.1.4 Antikörper .....	28
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	29

2.1.6	Sonstige Reagenzien und Chemikalien .....	30
2.1.7	PCR-Primer.....	30
2.1.8	Molekularbiologische Kits .....	31
2.1.9	EDV-Programme.....	31
2.2	Methoden: .....	32
2.2.1	Isolierung von BMC aus dem Knochenmark.....	32
2.2.2	Entwicklung und Optimierung des Transfektionsmodells.....	33
2.2.3	Lipotransfektion für das Hauptexperiment .....	35
2.2.4	Durchflusszytometrie .....	36
2.2.5	Nachweis der Herunterregulierung der Ziel-miRNAs und potentieller Target-Gene nach Transfektion mit antiMIR92A und antiMIR335.....	37
2.2.6	Lipotransfektion zur Überprüfung der Effekte der antiMIR .....	40
2.2.7	RNA-Isolierung mit nachfolgendem DNase Verdau.....	42
2.2.8	cDNA-Synthese .....	42
2.2.9	Realtime PCR (RT-PCR) .....	43
2.2.10	Analyse der CD51-Expression.....	43
2.2.11	Statistische Datenanalyse.....	45
3	Ergebnisse .....	46
3.1	Auswertung der Transfektionseffizienz zur Optimierung des Transfektionsmodells .....	46
3.2	Nachweis der erfolgreichen Transfektion mittels Durchflusszytometrie.....	50
3.3	Nachweis der miRNAs sowie deren Herunterregulierung nach Transfektion .....	52

3.4	Effekte der antiMIR auf die Genexpression ausgesuchter Zielgene ..	53
3.4.1	Auswirkungen der antiMIR92A.....	53
3.4.2	Auswirkungen der antiMIR335.....	56
3.5	Erhöhung der CD51- Expression nach Transfektion mit antiMIR92A.	59
4	Diskussion.....	62
5	Zusammenfassung.....	72
6	Summary.....	74
7	References.....	76
8	Lebenslauf.....	87
9	Danksagung.....	89
10	Schriftliche Erklärung .....	90

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Biogenese der miRNAs .....	21
<b>Abbildung 2:</b> Knochenmarkextraktion aus Femur.....	32
<b>Abbildung 3:</b> Gewinnung der BMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	33
<b>Abbildung 4:</b> Prinzip der Lipotransfektion .....	36
<b>Abbildung 5:</b> Aufteilung der Reagenzgläser .....	38
<b>Abbildung 6:</b> Aufteilung der 12-Well-Platten, beispielhaft für die Weiterbehandlung nach 48 h .....	44
<b>Abbildung 7:</b> Transfektionseffizienz anhand der <i>FACS</i> -Analyse .....	46
<b>Abbildung 8:</b> Transfizierte und defekte Monozyten nach 1 h, 2 h und 4 h Inkubation.....	48
<b>Abbildung 9:</b> Transfizierte und defekte Lymphozyten nach 1 h, 2 h und 4 h Inkubation.....	49
<b>Abbildung 10:</b> Transfektionseffizienz der HSC, MSC und Monozyten.....	51
<b>Abbildung 11:</b> Zelltypspezifische Transfektionseffizienz.....	52
<b>Abbildung 12:</b> Expression von antiMIR92A und antiMIR335 in Relation zur <i>Scramble</i> -RNA als 100 %-Expressionsniveau 24 h nach Transfektion. ....	53
<b>Abbildung 13:</b> Genexpression ITGA5 .....	54
<b>Abbildung 14:</b> Genexpression von VEGFA.....	55
<b>Abbildung 15:</b> Genexpression von RUNX2.....	57
<b>Abbildung 16:</b> Genexpression von BMP2 .....	58
<b>Abbildung 17:</b> Durchflusszytometrische Bestimmung der CD51 Oberflächenexpression auf BMCs 72 h nach Transfektion .....	60
<b>Abbildung 18:</b> Signifikante Erhöhung der CD51 Oberflächenexpression auf antiMIR92A behandelten BMCs nach 72 h .....	61

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verhältnis <i>Lipofectamin/BlockIT</i> für die Ansätze 1 - 17 .....	34
<b>Tabelle 2:</b> <i>BlockIT</i> Ansätze für n = 12.....	34
<b>Tabelle 3:</b> <i>Lipofectin</i> -Ansätze für n = 20 .....	34
<b>Tabelle 4:</b> Verteilung und Funktion der Antikörper zur Durchflusszytometrie ..	37
<b>Tabelle 5:</b> Aufteilung der 24-Well-Platte .....	41

## Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminoactinomycin D
BMC	<i>Bone marrow mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des Knochenmarks)
BMP-2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
°C	Grad Celcius
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Ct-Wert	<i>Cycle threshold-Wert</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
EPC	<i>Endothelial progenitor cell</i> (endotheliale Progenitorzelle)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FSC	<i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i> (hämatopoetische Stammzelle)
ITGA5	<i>Integrin alpha-V</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i> (mesenchymale Stammzelle)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PLGA	<i>Poly (lactide-co-glycolide) acid</i>
P/S	Penicillin Streptomycin
RLT	<i>Zell-Lysis Puffer</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
Rpm	Umdrehungen
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
RUNX2	<i>Runt-Related Transcription factor 2</i>
SSC	<i>Side scatter (Seitwärtsstreulicht)</i>
Scr	<i>Scrambel-RNA (Kontroll RNA)</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR-2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor-2</i>
$\mu$ l	Mikroliter

# 1 Einleitung

Frakturen sind die häufigsten traumatischen Organverletzungen des Menschen.<sup>1</sup> Der Knochenbruch ist definiert als eine, durch direkte oder indirekte Krafteinwirkung von außen entstehende, teilweise oder vollständige Kontinuitätsunterbrechung des Knochens. Bedingt durch die Art, Kraft und den Vektor der einwirkenden Gewalt sowie die qualitative Knochenstruktur führt sie zur Durchtrennung des Knochengewebes unter Bildung zweier oder mehrerer Fragmente. Ziel der Frakturbehandlung ist die Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion und Stabilität des Knochens. Abhängig von Größe und Lokalisation des Defekts sowie zusätzlicher Weichteilverletzungen soll durch verschiedene Methoden der Reposition und Fixation der Knochenbruchstücke eine knöcherne Konsolidierung erreicht werden. Um das therapeutische Eingreifen vor allem nach großen Knochendefekten optimieren zu können, muss die physiologische Frakturheilung molekularbiologisch entschlüsselt und verstanden sein.<sup>2</sup>

## 1.1 Physiologische Knochenheilung

Beim komplizierten Mechanismus der Frakturheilung wird der embryonale Prozess der Verknöcherung erneut durchlaufen. Hieraus resultiert eine vollwertige Wiederherstellung der anfänglichen Anatomie und Funktion des Knochens, im Gegensatz zur Narbenbildung bei Reparationsvorgängen anderer Organe. Gefördert wird die Knochenheilung durch das Ansteigen der lokalen Durchblutung auf das Zwei- bis Sechsfache des Ausgangswertes.<sup>3,4</sup>

### 1.1.1 Primäre Knochenbruchheilung

Neben der Durchblutung sind eine ausreichende Stabilität der Frakturfragmente durch Ruhigstellung und eine möglichst kleine Frakturspaltbreite wichtige Faktoren für eine problemlose primäre Knochenbruchheilung. Bei dieser sogenannten Kontaktheilung wird kein Kallusgewebe gebildet, wodurch kortikaler Knochen mit hoher Belastbarkeit entsteht. Primäre Frakturheilung kann beispielsweise nach stabiler Plattenosteosynthese erreicht werden.<sup>3</sup>

### 1.1.2 Sekundäre Knochenbruchheilung

Weitaus häufiger heilen Frakturen jedoch unter Bildung von Kallus indirekt aus, was als sekundäre Knochenbruchheilung bezeichnet wird. Diese entsteht meistens bei einem Frakturspalt größer 0,5 mm, geringer Fixation und ungenügender Adaption der Knochenfragmente. So tritt eine sekundäre Knochenbruchheilung zumeist bei größeren Knochendefekten wie beispielsweise bei Trümmerfrakturen auf. Der Prozess lässt sich anhand der mikroskopischen Struktur in drei bis fünf Phasen unterteilen.<sup>5</sup> Diese laufen jedoch nicht streng hintereinander ab, sondern greifen im Sinne eines kontinuierlichen Heilungsprozesses ineinander über.<sup>6</sup>

Der Zeitraum vom Eintritt der Gewalteinwirkung bis zum Frakturereignis wird als **Frakturphase** definiert. Durch die resultierende Krafteinwirkung kommt es neben der Zerstörung und Durchtrennung der Knochenstrukturen zu einem mehr oder minder stark ausgeprägten Weichteilschaden und zur Ausbildung eines Frakturhämatoms.<sup>4</sup>

Der vaskuläre Endothelschaden und die Gewebetrümmer führen in der 1- bis 3-tägigen **Entzündungsphase** zu einer inflammatorischen Reaktion.<sup>4</sup> Diese induziert neben der Degranulation von Thrombozyten die lokale Infiltration von Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten und Fibroblasten.<sup>7</sup> Durch die Ausschüttung diverser Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren wird die Angiogenese stimuliert und die Resorption des Frakturhämatoms durch die einwachsenden Gefäße eingeleitet.<sup>6</sup> Nekrotisches Knochengewebe wird durch Makrophagen und Osteoklasten beseitigt.<sup>8</sup>

Einige Wochen nach Fraktur, am Ende der sich anschließenden **Reparationsphase**, wird das Hämatom durch Kallusgewebe ersetzt. Dieser Teil des Heilungsprozesses beginnt schon während der Entzündungsphase mit der Bildung von Granulationsgewebe.<sup>9</sup> Die im Frakturhämatom befindlichen Fibrinfäden werden im Rahmen des bindegewebigen Umbaus von Makrophagen phagozytiert und durch von Fibroblasten und Chondrozyten gebildetes Kollagen ersetzt. Kennzeichnend sind des Weiteren eine erheblich gesteigerte Angiogenese und die Einwanderung multipotenter Stammzellen,

welche sich unter dem Einfluss einer Vielzahl von *bone morphogenic proteins* (BMP) zu Osteoblasten differenzieren. Diese produzieren durch intramembranöse Ossifikation subperiostalen Geflechtknochen, während das Kollagen vor allem zur primären Überbrückung des Frakturspaltes dient.<sup>10</sup> Der so entstandene **weiche Kallus** wird durch Chondrozyten mineralisiert und zu einer knorpeligen Matrix umgebaut. Das von Osteoblasten gebildete Osteoid sorgt für eine Verkalkung zum Faserknorpel, der letztendlich durch den Prozess der enchondralen Ossifikation ebenfalls zu Geflechtknochen und damit zum **harten Kallus** umgebaut wird.<sup>11</sup>

Die letzte Phase der Frakturheilung wird als **Remodeling** bezeichnet und ist durch den Umbau von Geflechtknochen in Lamellenknochen gekennzeichnet. Das von Osteoklasten resorbierte, irregulär angeordnete Knochengewebe<sup>4</sup> wird durch einsprossende Kapillaren und sekundäre Osteone ersetzt, deren Ausrichtung sich an der mechanischen Belastung orientiert. Die beschriebenen Umbauvorgänge und damit das Erreichen der zuvor bestehenden Stabilität und Belastbarkeit des Knochens sind bis circa 24 Monate nach Fraktur abgeschlossen.<sup>12</sup>

## 1.2 Knochendefekte kritischer Größe

Trotz des streng koordinierten und genau regulierten Ablaufs der Frakturheilung können Probleme wie Wundinfektionen, Bildung von Pseudarthrosen oder verzögerte, beziehungsweise verringerte Heilung auftreten.<sup>13</sup> Hierzu zählt auch der Knochendefekt kritischer Größe, der sogenannte *critical size defect*. Er ist definiert als der kleinstmögliche Gewebedefekt, der vom eigenen Körper nicht mehr regeneriert werden kann und daher ohne Intervention nicht verheilt.<sup>14</sup>

Diese großen Knochendefekte entstehen zum Beispiel aufgrund von Hochrasanztraumen, chronischen Osteomyelitiden, osteoporotischen Frakturen, Tumorresektionen sowie als Komplikation nach endoprothetischen Eingriffen und stellen weiterhin eine große Herausforderung für den Operateur und eine immense Belastung für die Patienten dar.<sup>15</sup> Die Heilung kann vor allem nach offenen Frakturen mit erheblicher Verletzung des Weichteilgewebes verlangsamt oder sogar mangelhaft ablaufen,<sup>16</sup> so dass es in bis zu 5 – 10 % der Fälle zu einer gestörten Knochenbruchheilung kommt.<sup>17</sup> Daher ist es

besonders wichtig die Therapie zu optimieren und den Knochen bei der Regeneration zu unterstützen. Hierfür werden zwei grundlegende Möglichkeiten unterschieden: die Verwendung von Knochentransplantaten oder der Einsatz von Knochenersatzmaterialien.

## **1.2.1 Knochentransplantate**

### **1.2.1.1 Autologes Transplantat**

Autologe Knochentransplantate stellen den aktuellen Goldstandard in der Therapie großer Knochendefekte dar. Dem Patienten wird zumeist körpereigene Spongiosa entnommen und in den Knochendefekt eingesetzt. Dabei dient das eingesetzte Gewebe als Füllmaterial, welches im Rahmen einer Entzündungsreaktion von Osteoklasten abgebaut und durch vitalen Knochen ersetzt wird. Im Vergleich zu kortikalem Knochen liegen die Vorteile von Spongiosatransplantaten in einer höheren osteogenen Potenz sowie einer verstärkten Gefäßeinsprossung.<sup>18</sup> Die bevorzugte Entnahmeregion stellt am *Os ileum* die *Crista iliaca anterior* oder *posterior* dar. Grund hierfür ist die einfache und schonende Operationstechnik, eine hohe Verfügbarkeit an Spongiosa und die hohe Festigkeit des gewonnenen Materials.<sup>19</sup>

Gegenüber anderen Transplantaten hat autologer Knochen zudem den Vorteil die drei für das Knochenwachstum wichtigen Faktoren der Osteogenität, Osteoinduktivität und Osteokonduktivität in sich zu vereinen.<sup>20</sup> Zusätzlich ist er im Vergleich zu Knochenersatzmaterialien widerstandsfähiger gegen Infektionen.<sup>21</sup> Des Weiteren werden Abstoßungsreaktionen durch das Immunsystem vermieden. Dennoch ist die Entnahme von autologem Knochen mit einer Reihe von Schwierigkeiten verbunden. Durch den Zweiteingriff kommt es zu Schmerzen an der Entnahmestelle, möglicherweise Wundheilungsstörungen sowie verlängerten Operations- und Genesungszeiten und damit verbundenen erhöhten Kosten. Zudem besteht eine, nicht für alle Knochendefekte ausreichende, Verfügbarkeit des autologen Materials.<sup>22</sup>

### **1.2.1.2 Allogene und Xenogene Transplantate**

Die genannten Donormorbiditäten können durch die Verwendung von allogenen oder xenogenen Transplantaten verhindert werden. Allerdings besitzen genetisch nicht identische Transplantate immunogene Aktivität, so dass es zu Transplantatabstoßungen kommen kann. Um diese schwerwiegende Komplikation zu vermeiden, kann allogener Knochen beispielsweise lyophilisiert werden. Bei diesem Verfahren werden die antigenen Attribute des Knochens durch Einfrieren bei -70 °C, Anlegen eines Vakuums und anschließender finaler Trocknung auf ein Minimum verringert.

Xenogener Knochenersatz wird bevorzugt von Rindern entnommen und mittels thermischer oder chemischer Verfahren vorbehandelt.<sup>23</sup> Die Ansteckungsgefahr durch die Übertragung von Erregern wird dadurch zusätzlich noch gesenkt.<sup>24,25</sup> Andererseits bedingt die Vorbehandlung eine Verringerung des osteoinduktiven Potenzials, so dass die allogenen und xenogenen Transplantate nur noch osteokonduktive Wirkungen im Sinne einer Leitschienenfunktion erzielen können.<sup>23</sup> Zusammengefasst stellen das Abstoßungs- und Infektionsrisiko die Nachteile, eine Verminderung der Operationszeit, ein verringerter Blutverlust sowie die Vermeidung von Morbiditäten an der Entnahmestelle die Vorteile von allogenen und xenogenen Transplantaten dar.<sup>26</sup>

### **1.2.2 Knochenersatzmaterialien**

Das ideale Knochensurrogat sollte osteogenetische, osteoinduktive und osteokonduktive Wirkungen sowie ein hohes angiogenes Potenzial in sich vereinen<sup>27</sup>. Des Weiteren sind eine unbegrenzte Disposition sowie eine hohe Verträglichkeit des Materials mit dem umgebenden Gewebe (Biokompatibilität) und ein geringes Infektionsrisiko von besonderem Interesse.<sup>28</sup> Zudem muss gewährleistet sein, dass in etwa die mechanische Stabilität und Festigkeit natürlichen Knochens erreicht wird.<sup>29</sup> Die Verwendungsmöglichkeiten von Knochenersatzmaterialien reichen von der Erweiterung vorhandener spongiöser Transplantate bis zum Ersetzen autologer Transplantate durch Kombination der Knochensurrogate mit osteoinduktiven Proteinen und osteogenetischen Zellen. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen

Knochenersatzmaterialien auf dem Markt, dazu gehören unter anderem aufbereiteter allogener Knochen oder auf Kalzium basierende Ersatzstoffe.<sup>27</sup>

### **1.2.2.1 Demineralisierte Knochenmatrix (DBM)**

Neben autologen, allogenen und xenogenen Transplantaten zählt auch die **demineralisierte Knochenmatrix** zu den biologischen Knochensurrogaten. Zur Herstellung wird allogener oder xenogener kortikaler Knochen dekalzifiziert und das darin befindliche Kollagen vom Typ I denaturiert.<sup>30</sup> Durch die Demineralisierung kommt es zu einer Anreicherung osteoinduktiver Faktoren, sodass ein erhöhtes Knochenwachstum ausgelöst wird.<sup>31</sup> Zusätzlich werden die antigenen Eigenschaften des allogenen Knochens<sup>32</sup> sowie das Risiko für die Übertragung infektiöser Viruserkrankungen verringert, aber nicht vollständig ausgeschlossen.<sup>33</sup> Neben der Transmission von Infektionen kann zu den Nachteilen der DMB die Variabilität des osteoinduktiven Potenzials in Abhängigkeit des Spendermaterials gezählt werden.<sup>34</sup>

### **1.2.2.2 Alloplastische Knochenersatzmaterialien**

Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten und Komplikationen bei der Gewinnung und Verwendung biologischer Transplante, wurden in den letzten Dekaden synthetische Knochenersatzmaterialien entwickelt,<sup>28</sup> die als Implantate oder zum Knochen *Tissue Engineering* benutzt werden können. Die Ersatzstoffe bestehen aus rein künstlichen Substanzen, wie Polymeren, z.B. PLGA und Silikaten,<sup>35</sup> oder aus natürlichen anorganischen Materialien, wie demineralisierter Knochenmatrix, Glaskeramiken oder Kalziumphosphaten.

Die letzte Gruppe wird bevorzugt in Form von **Hydroxylapatit (HA)** oder **beta-Tricalciumphosphat (TCP)** Keramiken eingesetzt.<sup>28</sup> Wie alle synthetischen Ersatzmaterialien wirken Kalziumphosphate osteokonduktiv, teilweise konnten zusätzlich osteoinduktive Effekte nachgewiesen werden.<sup>36</sup> Ein weiterer Vorteil von Kalziumphosphat-Keramiken liegt in einer hohen Biokompatibilität.<sup>37</sup>

Aufgrund ihrer spröden Eigenschaften bieten Kalziumphosphate allerdings nur eine geringe Stabilität, wobei sich HA als brüchiger erwiesen hat als TCP.

Dennoch konnte HA erfolgreicher bei der Behandlung großer Knochendefekte eingesetzt werden,<sup>38</sup> da TCP schneller zersetzt wird und dabei die Festigkeit zunehmend sinkt.<sup>20</sup> Da die Struktur von TCP spongiösem Knochen stark ähnelt, eignet sich aber auch dieser dreidimensionale Gerüststoff, insbesondere in Kombination mit Kollagen, für die Behandlung großer Knochendefekte.<sup>39</sup> Nachteile der beiden Keramiken sind Schwierigkeiten bei der Implantation sowie lange Zeiträume zur Integration und Ersetzung. Aus den genannten Gründen und dem Fehlen von Wachstumsfaktoren sind sie alleine nicht zur Behandlung schlecht heilender, großer Knochenbrüche geeignet.<sup>40</sup>

### **1.3 Bone Tissue Engineering**

Eine neue Möglichkeit zur Behandlung großer Knochendefekte stellt das zellbasierte Knochen *Tissue Engineering* dar. Bei dieser vielversprechenden Methode werden osteokonduktive Gerüststoffe (*Scaffolds*) mit regenerativen Zellen kombiniert, um die Vorteile der Biomaterialien mit denen der Zellbiologie zu vereinen.<sup>29</sup> Als *Scaffolds* können die oben beschriebenen synthetischen Knochenersatzmaterialien verwendet werden, da sie aus porösem, resorbierbarem Material bestehen und über eine hohe Biokompatibilität verfügen.<sup>41</sup> Zur Begünstigung der Zellinfiltration sind Gewebe mit großen, untereinander verbundenen Poren von Vorteil.<sup>42</sup> Im Idealfall werden die Gerüststoffe mit der Zeit abgebaut und vollständig durch neugebildetes Knochengewebe ersetzt. Ihre Aufgaben bestehen in der Wiederherstellung der mechanischen Stabilität<sup>41</sup> sowie in der Unterstützung der Zellorganisation, der Differenzierung und des Wachstums.<sup>43</sup>

#### **1.3.1 Adjuvantien**

Um diese Funktionen zu verbessern, können dem Gerüstmaterial Proteine und Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , BMP, IGF, oder VEGF beigefügt werden. Durch direkte Implantation in den Defekt potenzieren sie die osteogenen Effekte der *Scaffolds* und sorgen zusätzlich für eine erhöhte Vaskularisation.<sup>44</sup>

Denn gerade die Bildung neuer Blutgefäße ist entscheidend für die Regeneration des Knochens, vor allem im Hinblick auf den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen sowie das Einwandern von Stammzellen. **VEGF** spielt hierbei eine wichtige Rolle, da es die Entstehung neuen Endothels induziert. Zusätzlich erhöht es auch die Aktivität chondrogener und osteogener Zellen,<sup>45</sup> sodass die Bildung mineralisierten Knochengewebes gefördert wird.<sup>46</sup>

Aber auch die Erhöhung der Osteokonduktivität und zusätzliche osteoinduktive Wirkungen sind für die optimale Knochenbruchheilung von besonderem Interesse. So binden beispielsweise in die Gerüststoffe inkorporierte BMPs, besonders **BMP2**, an Membranrezeptoren, wodurch TGF- $\beta$  aktiviert wird.<sup>47</sup> Der ausgelöste Signalweg sorgt für eine Anlockung von Osteoprogenitorzellen sowie deren Proliferation und Differenzierung zu Osteoblasten, wodurch die Knochenbildung angeregt wird.<sup>48</sup>

### 1.3.2 Zellarten

Während die Gerüststoffe als Leitstruktur für die Bildung eines fibrösen Netzwerks dienen,<sup>49</sup> sind die Zellen hauptsächlich für die Angiogenese und Formierung neuen Knochengewebes verantwortlich. Als osteoinduktive Zellen kommen entweder primäre osteogene Zellen oder bindegewebige Vorläuferzellen, sogenannte *connectiv tissue progenitors*, in Frage. Aufgrund eingeschränkter Ausbreitungsmöglichkeiten der primären osteogenen Zellen, werden für das *Bone Tissue Engineering* hauptsächlich Stamm- oder Vorläuferzellen eingesetzt, welche unterschiedliche Gewebetypen, wie Knochen, Knorpel oder Fett bilden können. Hierbei kommen beispielsweise mesenchymale Stammzellen (MSC), endotheliale Progenitorzellen (EPC) oder *bone marrow derived mononuclear cells* (BMC) zur Anwendung. Die im Knochenmark befindlichen Zellen werden isoliert und *in vitro* aufgearbeitet, um anschließend gemeinsam mit dem Gerüststoff in den Knochendefekt eingesetzt zu werden. Der Vorteil in der Verwendung autologer Zellen liegt in der Verhinderung einer immunogenen Abstoßungsreaktion auf fremdes Gewebe.<sup>42,50</sup>

### **1.3.2.1 Mesenchymale Stammzellen (MSC)**

Diese multipotenten Zellen sind während der Embryogenese an der Knochenbildung beteiligt, da sie neben dem Potenzial zur unlimitierten Selbsterneuerung die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen, wie Chondrozyten, Adipozyten, Epithelzellen und Osteoblasten, besitzen.<sup>51</sup> Dies bietet einen interessanten Ansatz für die Forschung, da auch beim physiologischen Prozess der Knochenheilung unterschiedliche Zellarten zum Einsatz kommen. Aufgrund ihrer zunehmenden Relevanz wurden die MSC anhand ihrer Oberflächenproteine (*Cluster of differentiation*) genauer charakterisiert. So sind sie unter anderem CD29, CD73, CD90 und CD271 positiv sowie CD14, CD34 und CD45 negativ, was sie von den hämatopoetischen Stammzellen (HSC) unterscheidet. Zur Verwendung von MSC zum Knochen *Tissue Engineering* werden die Zellen aus Knochenmark Aspiraten isoliert und anschließend *in vitro* expandiert.<sup>52</sup> Während der Kultivierung werden die Zellen mittels spezifischer Wachstumsfaktoren zur Differenzierung in Chondrozyten oder Osteoblasten angeregt.<sup>53</sup> Da MSCs nur in relativ geringen Mengen im Knochenmark vorkommen, dauert die Anzucht zur Erreichung einer ausreichend hohen Zellzahl einige Wochen lang, was die chirurgische Versorgung großer Knochendefekte zeitlich deutlich verzögert. Zusätzlich sind die Auswirkungen der langen Anzucht im Reagenzglas bezüglich Entartungen und Krebsentwicklung noch nicht abschließend geklärt.<sup>54</sup> Ein weiterer Nachteil der *in vitro* Kultivierung ist die Verringerung der proliferativen Fähigkeiten sowie des Potenzials zur Differenzierung der MSCs.<sup>55</sup>

### **1.3.2.2 Endotheliale Progenitor Zellen (EPC)**

Diese aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen sind zur Entwicklung zu endothelialen Zellen sowie zur Einleitung der Angiogenese befähigt.<sup>56</sup> Daher kommt es nach Frakturereignis zur Aufnahme einer steigenden Zahl an Epithelzellen in die entstehenden Blutgefäße.<sup>57</sup> Da die Heilung großer Knochendefekte häufig durch eine mangelnde Einsprossung von Blutgefäßen verzögert wird, stellen die EPCs eine interessante Alternative zu den oben beschriebenen MSCs dar. In Abhängigkeit ihres Entwicklungsgrades exprimieren sie CD34, VEGFR-2, Von-Willebrand-Faktor

sowie CD133, ein Marker für hämatopoetische Stammzellen. Aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle können die Zellen mittels magnetischen Mikrokügelchen, die mit anti-CD133 oder anti-CD34 Antikörpern beschichtet sind, aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut isoliert werden. Kultivierung der EPCs zusammen mit VEGF führt zur Differenzierung zu epithelialen Zellen, wohingegen die Kultur in einem mit FCS angereicherten Medium die Entstehung von Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten fördert.<sup>58</sup> Aufgrund der genannten Eigenschaften konnten EPCs bereits erfolgreich zur Unterstützung der Frakturbehandlung mittels autologem Knochen beim Menschen eingesetzt werden.<sup>59</sup> Allerdings geht man davon aus, dass die Neovaskularisation nur in Kombination von EPCs mit proangiogenen Faktoren effektiv gefördert werden kann.<sup>60</sup> Zusätzlich müssen die EPCs mindestens fünf Tage kultiviert werden, um eine ausreichend hohe Zellzahl zu erreichen.

In Knochendefektmodellen am Rattenfemur konnte gezeigt werden, dass die Kombination von kultivierten MSCs und EPCs mit einem  $\beta$ -TCP-Gerüst zu einer relevanten Verstärkung von Gefäßneubildung, Knochenwachstum und -stabilität führt. Aufgrund der bereits angesprochenen Probleme, wie langen Kultivierungszeiten mit erhöhtem Risiko für Entartungen oder Kontaminationen und einer damit verbunden verzögerten chirurgischen Versorgung sowie den hohen Kosten, konnte sich diese Methode bisher nicht durchsetzen.<sup>15</sup>

### **1.3.2.3 Bone marrow derived mononuclear cells (BMC)**

Mononukleäre Zellen des Knochenmarks sind definiert als im Knochenmark vorkommende Zellen mit einem ungelappten, runden Zellkern. Aufgrund der resultierenden ähnlichen Eigenschaften in Größe und Dichte können sie mittels Dichtegradientenzentrifugation einfach von anderen Zellsorten, wie roten Blutkörperchen oder myeloischen Zellen, isoliert werden. Zu den BMCs zählen neben hämatopoetischen Vorläuferzellen, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, auch multipotente Stammzellen, beispielsweise HSCs, EPCs oder Vorläuferzellen von MSCs.<sup>61</sup> Durch die Vielzahl an unterschiedlichen Stammzellen, die die Möglichkeit zur vaskulären, osteogenen und adipozytären Differenzierung besitzen, bieten die BMCs durch das entstehende hohe

regenerative Potenzial optimale Voraussetzungen für das zellbasierte Knochen *Tissue Engineering*.

Des Weiteren können diese Zellen nach Isolation aus dem Knochenmark innerhalb weniger Stunden aufbereitet und dem Patienten während der selben Operation reimplantiert werden,<sup>15</sup> was die schnelle, definitive Frakturversorgung eindeutig erleichtert und zusätzlich die biologische Sicherheit erhöht. Im Rattenknochendefektmodell wurden BMCs mit einem beta-TCP-Gerüst in einen großen Knochendefekt implantiert und das Knochenwachstum 26 Wochen beobachtet. Bis zum Ende der Untersuchung konnten weder makroskopisch noch histologisch Tumorentstehungen nachgewiesen werden. Es wurde aber eine eindeutige Verbesserung der Knochenbildung und eine damit einhergehende erhöhte Stabilität des Knochens festgestellt, die in etwa der Behandlung des Knochendefekts mittels EPC/MSC auf einem  $\beta$ -TCP-Gerüst entspricht. Diese Ergebnisse sind besonders auf die durch BMCs ausgelöste verstärkte Vaskularisierung zurückzuführen.<sup>15</sup> Während der Aufarbeitung der Zellen muss auf die Separation der BMCs von roten Blutkörperchen geachtet werden, da diese die erwünschten Effekte verschlechtern können.<sup>62</sup> In der Kardiologie werden BMCs aufgrund des Potenzials zur Verbesserung der Durchblutung bereits erfolgreich zur Behandlung von Herzinfarkten beim Menschen eingesetzt.<sup>63</sup>

#### **1.4 MicroRNAs**

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, nichtcodierende RNAs, die im Allgemeinen eine Größe von 21 – 22 Nukleotiden aufweisen.<sup>64</sup> Sie sind an der Steuerung grundlegender biologischer Prozesse wie Zellproliferation und -differenzierung, Wachstum, Zelltod und Stressreaktionen beteiligt.<sup>65</sup> Neben der Regulation von physiologischen Abläufen spielen miRNAs auch bei der Pathogenese von Tumoren, neurodegenerativen Beschwerden oder viralen und metabolischen Krankheiten eine wichtige Rolle.<sup>66</sup> Die Wirkung von miRNAs beruht hauptsächlich auf dem posttranskriptionalen Eingreifen in die Genregulation.<sup>64</sup> Hierbei besteht ihre Aufgabe vor allem im sogenannten *Gen-Silencing*, also der Verminderung der Genexpression. Die miRNAs binden an die 3' untranslatierte

Region (3'-UTR) der mRNA ihrer Zielgene, welche je nach Komplementarität der Bindesequenz und der beteiligten Proteine entweder an der Translation gehemmt, oder durch Zerschneiden abgebaut werden.<sup>67</sup>

In einigen Studien wurde bereits gezeigt, dass miRNAs Chondrozyten-, Osteoblasten- und Osteoklastendifferenzierung regulieren, was deren wichtige Rolle im Prozess der Frakturheilung hervorhebt. Bis dato sind allerdings nur wenige Details über die genaue Bedeutung und Regulationsmechanismen von miRNAs bei Knochenbruchheilung bekannt. Deshalb gibt es noch keine Behandlungsansätze mit Verwendung von miRNAs oder deren Inhibitoren.<sup>68</sup>

### 1.4.1 Biogenese der miRNAs

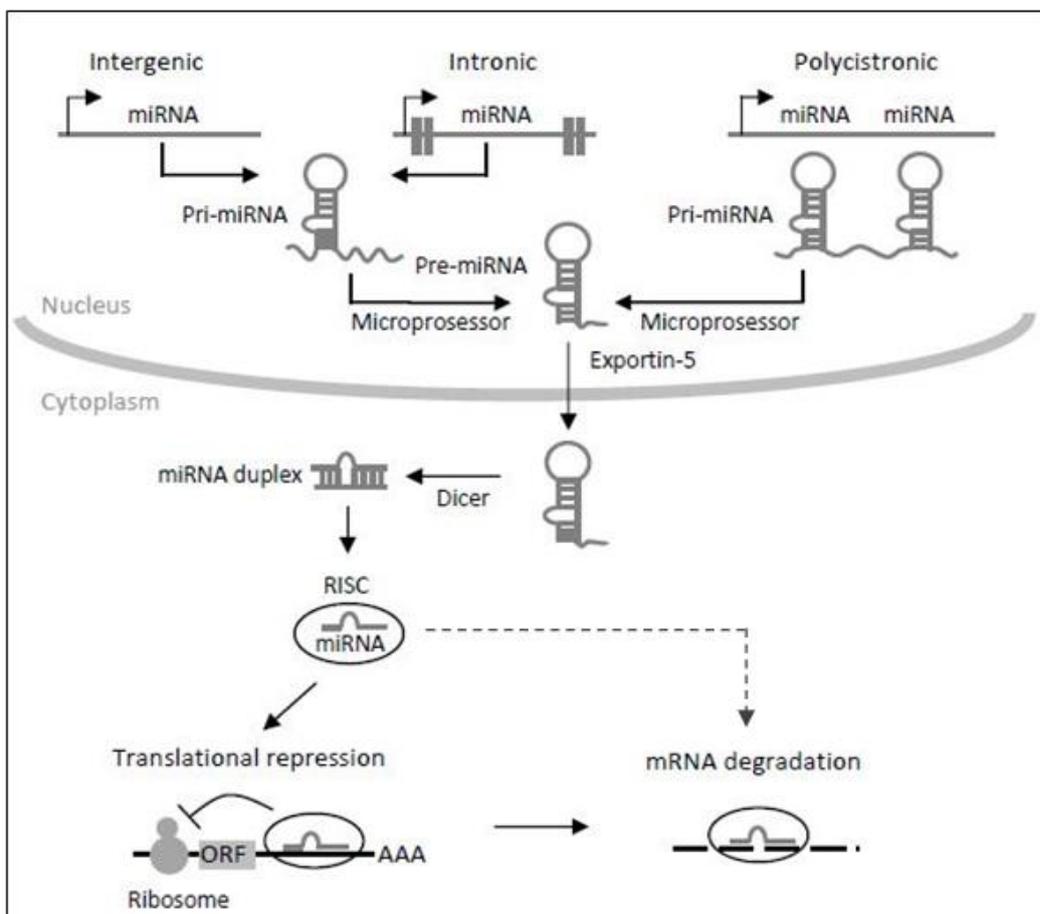


Abbildung 1: Biogenese der miRNAs (aus <sup>69</sup>)

MiRNAs, welche sich auf allen menschlichen Chromosomen befinden, sind im Genom kodiert. Innerhalb des Genoms sind die miRNA-*Precursor*-Sequenzen in Introns Protein-kodierender und nicht-kodierender Gene (*intronic*), in Exons nicht-kodierender Gene oder in Bereichen zwischen den Genen (*intergenic*) enthalten. Teilweise besitzen sie auch Sequenzen für mehrere unterschiedliche miRNAs, die als sog. Cluster kotranskribiert werden (*polycistronic*). Die Transkription beginnt mit der Herstellung des Primärtranskripts mittels RNA-Polymerase II oder III.<sup>70</sup> Die so entstandene *primary microRNA* (pri-miR) wird durch die RNase III *Drosha* und das dsRNA-Bindeprotein DGCR8 (*DiGeorge syndrom critical region 8*), die gemeinsam den sogenannten Microprocessor-Komplex bilden, zur *precursor microRNA* (pre-miRNA) prozessiert.<sup>71</sup> Die pre-miRNA wird durch Exportin-5 aus dem Kern in das Cytoplasma transportiert<sup>72</sup> und durch das RNase-III-Enzym *Dicer* in eine Duplex-miRNA geschnitten. Dieser Duplex wird letztlich durch die Helicase entwunden<sup>73</sup> und die reife, einzelsträngige miRNA wird in einen Ribonukleoproteinkomplex, den *RNA-induced silencing complex* (RISC), aufgenommen.<sup>74</sup> Durch diesen miRISC Komplex kann die Aktivität der Zielgene abhängig vom Grad der Komplementarität durch die zwei beschriebenen Methoden herunterreguliert werden. Neuere Studien zur Kinetik der Genregulation von miRNAs vermuten allerdings, dass bei den meisten Zielgenen sowohl die Repression der Translation als auch die mRNA Degradation zum Einsatz kommen. Man geht davon aus, dass die miRNAs zuerst die Translation ihrer Ziel-mRNA blockieren und anschließend deren Zerfall bewirken.<sup>75</sup>

#### **1.4.2 MIR92A**

Die Angiogenese ist eminent wichtig für die Knochenbruchheilung. Die Einsprossung von neuen Blutgefäße bewirkt eine höhere Sauerstoffsättigung und einen besseren Transport von Nährstoffen sowie inflammatorischen und mesenchymalen Zellen in den hoch aktiven, sich regenerierenden Kallus.<sup>76</sup>

Die MIR92A ist Teil des *Clusters* miR-17-92 und spielt eine Schlüsselrolle bei der Angiogenese.<sup>77</sup> In experimentellen Arbeiten zur Frakturheilung an Mäuseknochen konnte gezeigt werden, dass die forcierte Überexpression von

MIR92A zur Blockierung der Sprossbildung, zur Verhinderung der Bildung eines Gefäßnetzes, zur Verringerung der Migration endothelialer Zellen und zur Verschlechterung der Adhäsion endothelialer Zellen an Fibronectin führt.<sup>67</sup> Über diese verschiedenen Mechanismen inhibiert MIR92A dementsprechend die Angiogenese.

Es wird vermutet, dass antiangiogene Faktoren wie MIR92A eine überflüssige Angiogenese unterdrücken sollen. Sobald Gewebe verletzt wird, werden die Faktoren gehemmt und die Neovaskularisation eingeleitet.

Posttraumatisch geringere Plasmaspiegel der MIR92A unterstützen diese Annahme. Ab 24h nach Fraktur wird MIR92A physiologisch vermindert exprimiert, bis die Konzentrationen zum 21. Tag wieder ansteigen.<sup>78</sup> Dieser Effekt soll durch die Inhibierung von MIR92A (antiMIR92A) verstärkt werden. Das Verwenden der antiMIR92A führt nachweislich zu einem Anstieg der Sprossbildung<sup>67</sup> und einer erhöhten Expression von VEGF-A im Kallusgebiet. Zusätzlich wurde gezeigt, dass durch die systemische Injektion, aber auch durch lokale Applikation von antiMIR92A das enchondrale Knochenwachstum nach Femurfraktur gesteigert wird, was höchstwahrscheinlich auf die verbesserte vaskuläre Versorgung zurückzuführen ist. Allerdings hat die Hemmung der MIR92A keinen Einfluss auf die Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten.<sup>78</sup>

Die genannten Effekte vermittelt die MIR92A hauptsächlich über die Verringerung der Genexpression der alpha5 Untereinheit von Integrin (ITGA5), auch als CD51 bezeichnet.<sup>67</sup> Dieses Protein ist im aktiven Zustand als Oberflächenrezeptor auf Endothelzellen für die Bindung bestimmter extrazellulärer Matrixproteine sowie für die Verbesserung der Wanderung und des Überlebens der Endothelzellen verantwortlich.<sup>79</sup> Des Weiteren wird die Expression der endothelialen *NO-Synthase* (eNOS) verringert, vermutlich als Folge der Degradation der ITGA5 mRNA. Über die Regulation des Gefäßtonus wirkt die eNOS proangiogen.<sup>67</sup> MIR92A aktiviert zusätzlich den *Notch*-Signalweg. Dies gelingt durch Verringerung der Expression von *Sirtuin 1* (SIRT1), welches die intrazelluläre Domäne von *Notch* deacetyliert um es zu destabilisieren. Hierdurch wird die VEGF-induzierte Angiogenese blockiert.<sup>80</sup>

MIR92A führt somit zur verringerten Expression der Proteine ITGA5, eNOs und SIRT1 sowie deren mRNA.<sup>67</sup>

### 1.4.3 MIR335

Die MIR335 wird während der Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) herunterreguliert, was nahelegt, dass die MIR335 die Differenzierung, aber auch die Proliferation und Migration von hMSC vermindert. Passend hierzu resultiert eine Überexpression der MIR335 in einer verminderten proliferativen Aktivität von hMSC.

Eines der Hauptzielgene der MIR335 ist der Transkriptionsfaktor *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2), welcher eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung von hMSC zu osteogenen Zellen spielt.<sup>81</sup> Nur das Zusammenwirken des TGF $\beta$ /BMP2 und des RUNX2 Signalweges führt zu einer optimalen Bildung von mineralisiertem Knochen sowie hypertrophem Knorpel. Dabei ist die sogenannte *SMID*-Domäne von RUNX2 entscheidend für die Wirkungen von BMP2 auf die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten.<sup>82</sup>

In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass MIR335 die Proteinkonzentration von RUNX2 verringert, indem sie direkt an seine 3'UTR Region bindet. Eine Überexpression von MIR335 führt somit zu einer verminderten Expression von RUNX2 und damit zu einer geringeren Proliferation und Entwicklung von MSC zu osteogenen Zellen.<sup>81</sup> Auf dieser Studienlage beruht die Annahme, dass eine Inhibierung der MIR335 zu einer erhöhten Expression von RUNX2 und in Folge dessen zur vermehrten Differenzierung von hMSC zu osteogenen Zellen führt.

## 1.5 Fragestellung

Kardinales Ziel des Forschungsprojektes ist es, die BMC unterstützte Therapie von Knochendefekten zu optimieren, um die Prognose von *Critical size defects* zu verbessern und damit später möglicherweise den Patienten zusätzliche Schmerzen, Immobilisationen und Pseudarthrosen zu ersparen. Dieses Anliegen soll mittels Inhibierung von miRNAs, involviert in Osteogenese und Angiogenese, erreicht werden.

Aufgrund der erläuterten Erkenntnisse in Bezug auf die MIR92A und MIR335 werden die beiden folgenden Arbeitshypothesen formuliert:

1. Die Blockade der MIR92A in BMC mittels spezifischer antiMIR (komplementäre Sequenz) führt zu einer erhöhten Expression des Fibronectinrezeptors ITGA5 sowie weiterer proangiogener Faktoren, wie beispielsweise VEGF.
2. Die Blockade der MIR335 in BMC mittels spezifischer antiMIR führt zu einer erhöhten Expression des essentiellen, osteogenen Transkriptionsfaktors RUNX2 sowie weiterer, RUNX2 kontrollierter Faktoren, wie z.B. BMP2.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der Inhibierung der MIR92A (Angiogenese) und MIR335 (Osteogenese) auf das angiogene beziehungsweise osteogene Potenzial von BMC der Ratte *in vitro* zu analysieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Heracell 150i CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur Bedford, USA
Kühlschrank +4 °C bis -20 °C	Bosch AG Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus AG, Hanau, Deutschland
Inversmikroskop	Carl Zeiss AG Oberkochen, Deutschland
Spectrophotometer Nanovue	GE Healthcare Europe GmbH Freiburg, Deutschland
PCR Thermocycler Tpersonal	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Sterilbank Antares	Heraeus Hanau, Deutschland
Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Vortexer	Phoenix Instrument Garbsen, Deutschland
Wasserbad	Köttermann GmbH Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Hanau, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus Hanau, Deutschland
Bechergläser	Fisherbrand Schwerte, Deutschland

Chirurgische Pinzette	Scholz Instruments Neubiberg, Deutschland
Seitenschneider	Interlock Medizintechnik GmbH Lensahn, Deutschland
Neubauer- Zählkammer Improved	Biochrom GmbH C-Chip, Berlin, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Eppendorf-Pipette Reference (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, Deutschland; Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Working rack	Stratagene California, USA

### 2.1.2 Gebrauchswaren

Abdecktuch	Medline International GmbH, Kleve, Deutschland
Petrischalen	Corning Glass Works, (New York, USA)
Spritzen 10 ml	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Kanüle (BD Microlance 3)	Becton Dickinson GmbH Madrid, Spanien
Insulinspritzen	Becton Dickinson GmbH Madrid, Spanien
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pitpetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sigma-Aldrich Inc., New York, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland

Untersuchungshandschuhe	Hartmann international, Neudorf, Österreich
24-Well-Platte	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Cups (0,2 ml, 1,5 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Collection Tubes (2 ml)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Falcontubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PCR 8-Cap Strip	Biozym Scientific GmbH
PCR 8-Tube Strip	Oldendorf, Deutschland

### 2.1.3 Medien und Mediumszusätze

Dulbecco's phosphate buffered saline with calcium chloride and magnesium chloride (PBS <sup>+/+</sup> )	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	StemCell Technologies, Vancouver, USA

### 2.1.4 Antikörper

Rno-miR-92a miRNA inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc. (Ambion) Waltham, USA
hsa-miR-335 miRNA inhibitor	
Rno-miR-92a miRNA mimic	
Rat VEGF(564-RV)	R&D Systems
Rat BMP2 (355-BM/CF)	Minneapolis, USA

Anti rat-CD45 Anti rat-CD 34 Anti rat-CD271 7AAD	BD Biosciences, California, USA
Purified Mouse Anti-CD51	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Goat anti-Mouse (Murine) IgA, IgG, IgM Antibody	Antibodies-online.com Atlanta, USA

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Erythrozyten-Lysesolution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
RLT Lysepuffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiazol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
RWT Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
RPE Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Diethylen-Pyrocbonat -Wasser (DEPC)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Türkslösung	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Biocoll Separating Lösung (1,077 g/ml)	Biochrom Berlin, Deutschland

### 2.1.6 Sonstige Reagenzien und Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Ethanol, 100 % (EtOH)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Lipofectamine® RNAiMAX Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Aqua dest	Silgma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Chloroform	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd Lösung 36,5 %	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
10 <sup>-6</sup> M Dexamethason	
10 <sup>-5</sup> M Ascorbinsäure	
10 <sup>-2</sup> M beta-Glycerolphosphat	
P/S	

### 2.1.7 PCR-Primer

RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for rat GAPDH (PPR06557B-200)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for rat RUNX2 (PPR53039B-200)	
RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for rat BMP2 (PPR06531B-200)	
RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for rat ITGA5 (PPR54377A-200)	
RT <sup>2</sup> qPCR Primer Assay for rat VEGFA (PPR06748C-200)	

### 2.1.8 Molekularbiologische Kits

miRNeasy Mini Kit	Qiagen,
RNase-Free DNase Set	Hilden, Deutschland
AffinityScript QPCR cDNA Synthese Kit	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
RT <sup>2</sup> SYBR Green ROX™ qPCR Master-Mix	Qiagen, Hilden, Deutschland

### 2.1.9 EDV-Programme

Cell Quest Pro	BD-Biosciences, Bedford, MA, USA
Exel 2016	Microsoft (Redmont, WA, USA)
Power Point 2016	Microsoft (Redmont, WA, USA)
Word 2016	Microsoft (Redmont, WA, USA)
Bias 11.02	Epsilon (Darmstadt, Deutschland)

## 2.2 Methoden:

### 2.2.1 Isolierung von BMC aus dem Knochenmark

Zunächst musste das Knochenmark aus den Femora und Tibiae der Ratte gewonnen werden. Hierzu wurden die Knochen unterhalb der Condylen mittels Seitenschneider abgetrennt. Das Knochenmark wurde unter Verwendung einer 10 ml Spritze mit PBS aus dem Markraum herausgespült.



Abbildung 2: Knochenmarkextraktion aus Femur

Nach der mechanischen Zerkleinerung durch mehrmalige Resuspension in einer 10 ml Pipette wurde das Knochenmarkspirat bei 1500 rpm 8 min bei 22 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet, die verbliebenen Zellen mit 7 ml PBS verdünnt und mittels Dichtegradientenzentrifugation aus der Suspension isoliert. Durch vorsichtiges Übersichten der Knochenmarksuspension auf ein entsprechendes Volumen *Biocoll Separating* Lösung entstanden im 15 ml *Falcon* zwei voneinander getrennte Schichten (siehe Abbildung 1). Durch anschließende Zentrifugation bei 2100 rpm und RT für 20 min ohne Bremsfunktion konnten die mononukleären Zellen sowohl von den Erythrozyten und Granulozyten als auch von der *Biocoll Separating* Lösung (Dichte: 1,077 g/ml) getrennt werden, sodass nun die Interphase mit den darin befindlichen BMCs mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt werden konnte. Durch zweimaliges Resuspendieren in 40 ml PBS und anschließendem 10-minütigen Zentrifugieren bei 1500 rpm, konnten die BMCs vom restlichen *Ficoll* aufgereinigt werden.

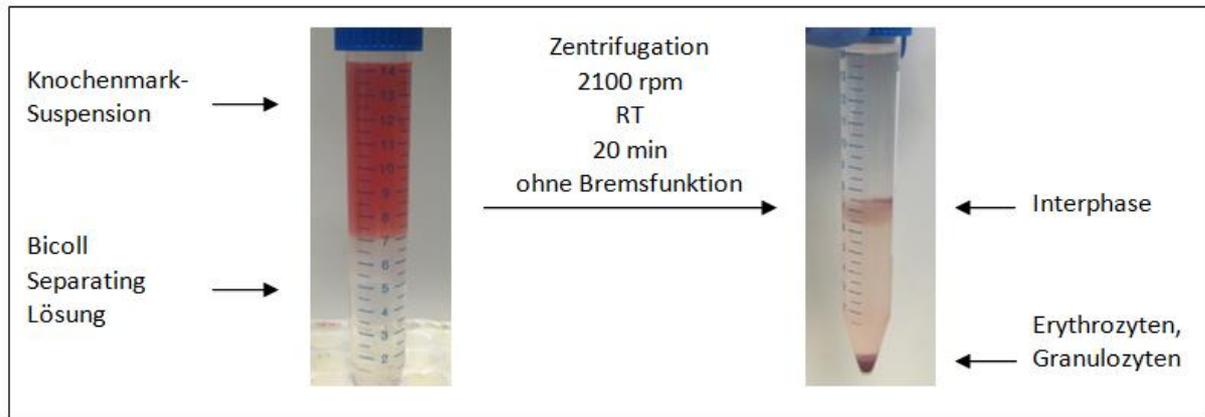


Abbildung 3: Gewinnung der BMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation

Für die Zellzählung wurde das so entstandene *Zellpellet* mit 10 ml PBS verdünnt. Zu 10 µl dieser Zellsuspension wurden 80 µl PBS und 10 µl *Türks Lösung* hinzugegeben und mittels Vortex vermischt. Anschließend wurden 10 µl entnommen und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen quadrantenweise gezählt und die absolute Zellzahl folgendermaßen berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert gezählter Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor (hier: 1:10)} * 10.000$$

### 2.2.2 Entwicklung und Optimierung des Transfektionsmodells

Zur Optimierung der Transfektion sollte das beste Verhältnis zwischen RNA/*Lipofectamin* und der Transfektionsdauer ermittelt werden, um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz sowie simultan einen niedrigen Anteil an defekten Zellen zu erhalten. Hierfür wurden unterschiedliche Mengen an *Lipofectamin* (Transfektions-Reagenz), *BlockIT-Stock-Solution* (fluoreszenzgekoppelte RNA) und dem Medium *OptiMem* nach folgenden Tabellen (Tab. 1-3) kombiniert:

Tabelle 1: Verhältnis *Lipofectamin/BlockIT* für die Ansätze 1 – 17

	<i>Lipofectamin</i> (µl)		
<i>BlockIT</i> (nM)	0,5	1,0	1,5
10	1	6	11
20	2	7	12
30	3	8	13
40	4	9	14
50	5	10	15
Kontroll-Ansätze: 16: 100 µl <i>OptiMem</i> 17: 100 µl <i>OptiMem</i> + 1,5 µl <i>Lipofectamin</i>			

Tabelle 2: *BlockIT* Ansätze für n = 12

	<i>Stock-Solution</i> (µl)	<i>OptiMem</i> (µl)
10 nM	3,6	596
20 nM	7,2	593
30 nM	10,8	589
40 nM	14,4	586
50 nM	18,0	582

Tabelle 3: *Lipofectin*-Ansätze für n = 20

	<i>Lipofectin</i> (µl)	<i>OptiMem</i> (µl)
0,5	10	990
1,0	20	980
1,5	30	970

Die Ansätze 1 – 17 wurden in dreifacher Ausführung hergestellt und jeweils für 10 – 20 min bei RT inkubiert. Anschließend Pipettieren von 200.000 Zellen in 500 µl DMEM + 10 % FCS gelöst zu allen *Tubes*. Im Folgenden unterschied sich das weitere Vorgehen bezüglich der Inkubationszeiten: jeweils 17 Ansätze über 1 h, 2 h oder 4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Im Anschluss wurden jeweils 2 ml PBS dazu pipettiert, die *Tubes* bei 1500 Umdrehungen 7 min lang bei RT zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 250 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde die so entstandene Zellsuspension mit 5 µl 7AAD versetzt. Durch diesen Schritt erfolgte eine Anfärbung der toten Zellen, um diese bei der folgenden *FACS*-Messung sichtbar zu machen. Hierdurch gelang es das optimale Verhältnis von *Lipofectamin* und *BlockIT-Solution* zu ermitteln, welches für die Hauptexperimente verwendet wurde.

### **2.2.3 Lipotransfektion für das Hauptexperiment**

Zur Durchführung der Lipotransfektion kam das bereits in der Forschungsabteilung der Unfallchirurgie der Uniklinik Frankfurt unter der Mitarbeit von Konstantin Dietz entwickelte Transfektionsmodell zur Anwendung (siehe 3.2.2). Zur Vorbereitung der Transfektion wurden zwei Ansätze hergestellt. In das erste Eppendorfgefäß wurden 48,5 µl *OptiMem* und 1,5 µl *BlockIT-Stock-Solution* – hierbei handelt es sich um eine fluoreszenzgekoppelte RNA – pipettiert. Im zweiten Ansatz befanden sich 0,5 µl *Lipofectamin* und 49,5 µl *OptiMem*. Die beiden Transfektionsansätze wurden zusammengeführt und wie im Protokoll oben beschrieben für 10 – 20 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit nahm das *Lipofectamin* die Nucleinsäuren auf. Im nächsten Schritt wurden 200.000 Zellen in 500 µl *DMEM* + 1 % *FCS* gelöst, zusammen mit dem Transfektionsansatz in ein 15 ml *Falcon* gegeben und 4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

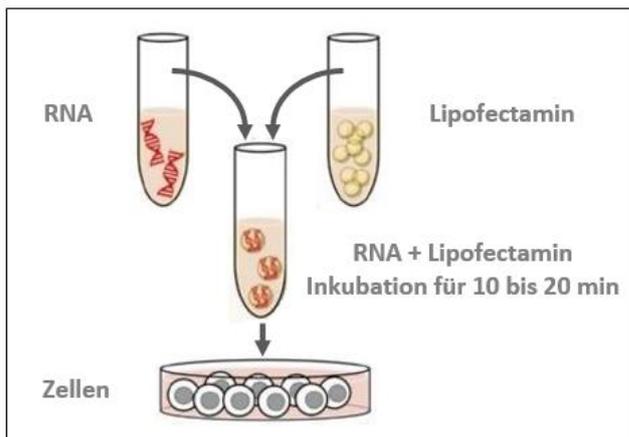


Abbildung 4: Prinzip der Lipotransfektion

#### 2.2.4 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der (zelltypspezifischen) Transfektionseffizienz der BMCs wurde die Durchflusszytometrie angewendet. Zur Vorbereitung der *FACS*-Analyse wurden die transfizierten Zellen erneut bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das *Pellet* in 300 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf drei *FACS*-Röhrchen mit unterschiedlichen Fluorchrom konjugierten Antikörpern verteilt. Der erste Ansatz diente zur Kontrolle, weshalb sich in diesem Röhrchen nur die Zellen befanden. Zum zweiten Ansatz wurden jeweils 5 µl CD34, CD45 und 7AAD zum Nachweis der CD34 und CD45 positiven HSC hinzugegeben. In das letzte Röhrchen wurde statt 5 µl CD34, 5 µl CD271 zur Darstellung der CD45 negativen und CD271 positiven Vorläuferzellen von mesenchymalen Stammzellen (im Folgenden nur noch als MSC bezeichnet), pipettiert (siehe Tabelle 4). Erneute 20-minütige Inkubation im Kühlschrank sowie Resuspendierung in 2 ml PBS, 5-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm und Resuspension in 250 µl PBS vervollständigten die Vorbereitungen zur *FACS*-Analyse.

Tabelle 4: Verteilung und Funktion der Antikörper zur Durchflusszytometrie

Ansatz	Volumen: $2 \times 10^5$ BMC in $\mu\text{l}$	Antikörper	Funktion
1	100	7-AAD	Nekrotische Zellen
2	100	7-AAD, CD34, CD45	Marker für HSC
3	100	7-AAD, CD271, CD45	Marker für MSC

Bei der anschließenden Messung wurden mindestens 30.000 mononukleäre Zellen durch eine Kapillare gesaugt und in der Durchflusszelle einzeln durch ein Laserlicht angeregt. Hierbei wurde zum einen die Lichtstreuung, zum anderen das emittierte Fluoreszenzlicht der Antikörper-gekoppelten Fluorochrome detektiert.

Die ungefärbten Zellen aus Ansatz 1 wurden anhand der Lichtstreuung charakterisiert. Hierbei hängt das Vorwärtsstreulicht (FSC) vom Volumen der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (SSC) unter anderem von der Granularität der Zelle sowie der Größe und Struktur des Zellkerns ab. So konnten die mononukleären Zellen identifiziert und in einem zweidimensionalen *Dotplot* dargestellt werden. Zur Auswertung von Ansatz 2 und 3, also der transfizierten Zellen, wurden die *Dotplots* durch unterschiedliche Fluoreszenzkombinationen differenziert, sodass der Anteil der jeweiligen Zellen durch eine Quadrantenanalyse bestimmt werden konnte. Hierdurch konnte der Prozentsatz der transfizierten, vitalen Zellen exakt berechnet werden.

### 2.2.5 Nachweis der Herunterregulierung der Ziel-miRNAs und potentieller *Target*-Gene nach Transfektion mit antiMIR92A und antiMIR335

Um die Effektivität der Antikörper gegen die miRNAs nachzuweisen, wurden die Zellen dreier Ratten, wie zuvor beschrieben, aus dem Knochenmark von Femora und Tibiae isoliert und pro Ratte jeweils  $3 \times 10^6$  Zellen auf zwei Ansätze aufgeteilt. Anschließend erfolgte die Lipotransfektion nach dem oben beschriebenen Modell (Punkt 2.2.3). Allerdings wurden statt der fluoreszenzgekoppelten RNA (*BlockIT-Stock-Solution*) die antiMIR92A, antiMIR335 sowie eine *nonsense* Kontroll-RNA (*Scramble-RNA*) verwendet. Die einzelnen Bestandteile des Transfektionsansatzes wurden, im selben Verhältnis

wie im Transfektionsprotokoll erläutert, vermengt: das bedeutet 6 µl *Lipofectamin* und 1134 µl *OptiMem* wurden mit jeweils 60 µl antiMIR92A, antiMIR335 oder Kontroll-RNA vermischt und mit den in 9 ml DMEM + 1 % FCS gelösten Zellen 4 h im Brutschrank inkubiert. Durch dieses Vorgehen entstanden für jede transfizierte RNA (*Scramble*, antiMIR92A und antiMIR335) zwei identische Ansätze (Abb.5). Diese wurden 8 min bei 1500 rpm und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene *Pellet* je nach Ansatz im Folgenden unterschiedlich verarbeitet.

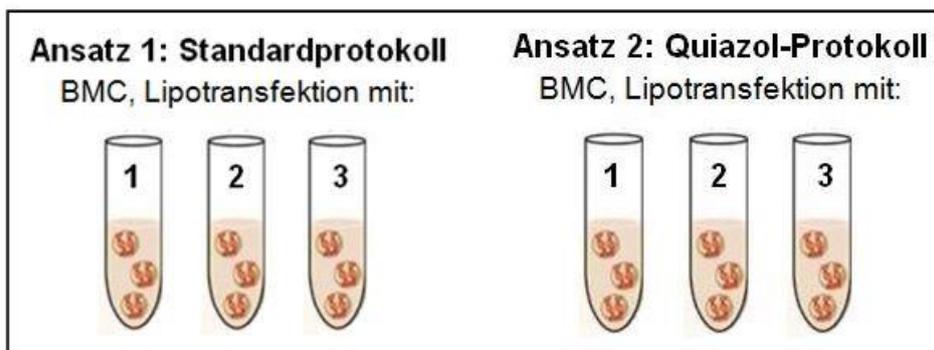


Abbildung 5: Aufteilung der Reagenzgläser

1 = *Scramble*-RNA, 2 = antiMIR92A, 3 = antiMIR335; (n = 3 pro Reagenzglas)

Der **erste Ansatz** wurde anhand des Standardprotokolls unter Verwendung des *RNeasy-Kit* aufbereitet. Dieses Protokoll wurde auch für die weiteren Versuche zur Lipotransfektion verwendet, weshalb es an dieser Stelle (siehe 2.2.6) ausführlich erläutert wird und hier nur eine grobe Schilderung des Ablaufes erfolgt. Zu Beginn wurde das *Zellpellet* mit 350 µl Lysepuffer versetzt und die DNA mittels Insulinspritze geschert, die RNA wurde isoliert (detaillierte Versuchsbeschreibung unter Punkt 2.2.7) und in cDNA umgewandelt (siehe 2.2.8). Abschließend wurde eine RT-PCR (siehe 2.2.9) für GAPDH durchgeführt.

Im Gegensatz hierzu wurden zum *Zellpellet* des **zweiten Ansatzes** 700 µl *Qiazol Lysis Reagent* hinzugegeben und die miRNA nach Herstellerangaben mittels *miRNeasy Mini Kit* (*Fa. Qiagen*) isoliert. Dieser Ansatz wurde für die Bestimmung des Expressionsniveaus von MIR92A und -335 verwendet. Als interne Standards wurden die Mir *SNORD* (SN) 68 und SN95 analysiert.

Für die miRNA-Isolierung wurde das *Zellpellet* durch 1-minütiges Vortexen mit dem Reagent vermischt und die DNA mit Hilfe einer Insulinspritze geschert. Zu diesem Zeitpunkt konnte die Probe bei -80 °C gelagert werden. Zur Fortsetzung der Versuche wurde das eingefrorene Homogenat kurz bei 37 °C im Wasserbad komplett aufgetaut. Anschließend folgte die Zugabe von 140 µl Chloroform und heftiges Schütteln für 15 s zur Durchmischung. Diese Lösung wurde für 2 – 3 min bei RT inkubiert, um danach für 15 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert zu werden. Hierdurch bildeten sich drei Phasen: eine rötliche organische Phase unten, mittig fand sich eine weiße Interphase und schließlich oben eine wässrige farblose Phase, in welcher sich die RNA befand. 320 µl dieser oberen Phase wurden in ein neues Sammelgefäß pipettiert, das 1,5-fache Volumen (480 µl) 100 %iges Ethanol dazugegeben und gut durchmischt. Die so entstandene Lösung wurde auf die Säule des *RNeasy Mini spin* gegeben und für 15 s bei 10.000 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Eluat verworfen und der Zentrifugationsschritt mit dem restlichen Probenmaterial wiederholt, da maximal 700 µl auf die Säule pipettiert werden durften. Darauf folgten drei Waschschrte. Der Erste bestand aus der Zugabe von 700 µl *RWT* Puffer, 15-sekündiger Zentrifugation bei 10.000 rpm und RT und Verwerfen des Eluats. Dieser Teil wurde wiederholt, allerdings unter Verwendung von 500 µl *RPE* Puffer. Auch beim letzten Schritt wurden 500 µl *RPE* Puffer dazu gegeben, allerdings für 2 min zentrifugiert. Die Säule wurde für die abschließende Zentrifugation auf ein neues Sammelgefäß gestellt und 30 µl *DEPC*-Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Nach der 1-minütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm und RT wurde das Eluat, in dem sich die RNA befand, in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Erfolgte die cDNA-Synthese direkt im Anschluss wurden die Proben auf Eis gelagert, ansonsten bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Für die cDNA-Synthese wurde das *miScript II RT Kit* (Fa. Qiagen) verwendet. Je Probe wurden 12 µl der zuvor hergestellten RNA mit 4 µl *HiSpec Buffer*, 2 µl *Nucleics Mix* und 2 µl *miScript RT* vermengt und bis zu 2400 rpm in der Epifuge anzentrifugiert. Danach wurden die Eppendorfgefäße im *Thermocycler* 60 min bei 37 °C und anschließend 5 min bei 95 °C inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt

war das Einfrieren bei -20 °C möglich, ansonsten erfolgte im Anschluss die PCR.

Die PCR wurde mit Hilfe des *RT<sup>2</sup> qPCR SYBR Green/ROX Master-Mix-24* und des *RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assays* von *Qiagen* durchgeführt. Der *Master-Mix* Ansatz bestand pro Probe aus 12,5 µl *2x QuantiTect SYBR Green Mix*, 2,5 µl *10x miScript Universal Primer*, 2,5 µl *RNase free water* und 2,5 µl des jeweiligen *Primer Assays*. Als *miScript Primer Assays* wurden die *SNORDs* SN68 und SN95 sowie die *MIR335* und *MIR92A* verwendet. Die cDNA wurde so verdünnt, dass sich 3ng cDNA in 2,5 µl *RNase free water* befanden. Diese wurden nochmals 1:1 mit 2,5 µl *RNase free water* verdünnt und zusammen mit dem *Master-Mix* Ansatz in die *8-strip cups* der PCR pipettiert. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 1000 g und RT wurde das thermale Profil der PCR wie folgt festgelegt: 15-minütige Inkubation bei 95°C zur Denaturierung, anschließend 40 Zyklen á 15 s bei 94 °C, gefolgt von 30 s bei 70 °C.

### **2.2.6 Lipotransfektion zur Überprüfung der Effekte der antiMIR**

Das Vorhandensein der miRNAs 92A und 335 in BMCs sowie die Effektivität der Transfektion waren somit nachgewiesen. Im Anschluss wurden die spezifischen Effekte der antiMIR92A und antiMIR335 auf die Genexpression ausgesuchter Zielgene überprüft. Zu diesem Zweck wurde die Lipotransfektion wie in Punkt 2.2.3 beschrieben, durchgeführt. Allerdings wurden statt der fluoreszenzgekoppelten RNA die antiMIR92A, antiMIR335 sowie eine Kontroll-RNA verwendet. Diese wurden in 4 Ansätzen, wie im Transfektionsprotokoll beschrieben, mit *Lipofectamine* und *OptiMem* für 20 min inkubiert.

Anschließend wurden  $4 \times 10^6$  Zellen in 12 ml DMEM + 1 % FCS gelöst und zu den 4 Ansätzen dazu pipettiert. Nach 4-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die transfizierten BMCs für die Aussaat vorbereitet. Der erste Schritt bestand aus einer 8-minütigen Zentrifugation bei 1500 rpm und 20 °C. Der Überstand wurde verworfen und das *Pellet* in 2 ml DMEM + 10 % FCS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, 20 °C) und Resuspension mit 4 ml DMEM + 10% FCS wurden die Zellen auf eine *24-Well-Platte* aufgeteilt. Es wurden pro *Well* 500 µl pipettiert, sodass sich in jedem *Well*

1x10<sup>6</sup> BMC befanden. Zusätzlich wurde zu einigen Ansätzen BMP2 und/oder VEGF dazugegeben. Hierbei wurden je 2,5 µl VEGF auf 500 µl DMEM + 10 % FCS pro *Well* pipettiert, sodass die Endkonzentration von VEGF bei 5 ng/ml lag. Um eine Endkonzentration von 100 ng/ml bei BMP2 zu erzeugen, wurde pro *Well* 1,0 µl auf 500 µl DMEM + 10 % FCS verwendet. Die Aufteilung ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Aufteilung der 24-*Well*-Platte

<b>Wellnummer</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Substanzen</b>	antiMIR92 A +Vehikel	antiMIR33 5 +Vehikel	Kontroll- RNA +Vehikel	antiMIR92A +VEGF	antiMIR335 +BMP2
<b>Wellnummer</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>Substanzen</b>	Kontroll- RNA +VEGF	Kontroll- RNA +BMP2	antiMIR92A +antiMIR33 5	antiMIR92A +antiMIR335 +VEGF +BMP2	Kontroll- RNA +VEGF +BMP2

Insgesamt wurden pro Ratte je drei 24-*Well*-Platten vorbereitet und unterschiedlich lange im Brutschrank inkubiert. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte nach 24 h, 48 h und 72 h.

Hierzu wurde der Überstand der einzelnen *Wells* jeweils in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert und 5 min bei 2000 rpm und RT zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde zu jedem *Well* 350 µl RNA Lysepuffer gegeben. Hierbei handelte es sich um *RLT* Puffer und β-Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1. Die 24-*Well*-Platte wurde anschließend für 10 min auf den *Rotamax* (Speed 4) gestellt. Der Überstand in den Eppendorfgefäßen wurde mittels Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und die Lösung aus den *Wells* wieder hinzugegeben. Abschließend wurde das Lysat mehrmals durch eine Insulinspritze gezogen, mit dem Ziel die DNA zu scheren. Zu diesem Zeitpunkt war das Einfrieren der Proben bei -80 °C möglich.

### 2.2.7 RNA-Isolierung mit nachfolgendem DNase Verdau

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des *RNeasy-Kit* (Fa. Qiagen). Das eingefrorene Lysat wurde mit einer äquivalenten Menge an 70 %igem Ethanol versetzt und auf die *RNeasy*-Säule pipettiert. Nach 15 s Zentrifugation bei 10.000 rpm wurde das Eluat verworfen und die RNA mit 350 µl *RW1* Puffer gewaschen. Hierzu wurde der Puffer auf die Säule gegeben und erneut 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Zum DNase Verdau wurde das DNase *Lyophilisat* in 550 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Von dieser DNase *Stock-Lösung* wurden je 10 µl mit 70 µl *RDD* Puffer versetzt, direkt auf die Mitte der *RNeasy silica-gel* Membran gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Wie im Schritt zuvor wurde die RNA mit 350 µl *RW1* Puffer gewaschen und das *RNeasy Mini spin* in ein neues Sammelgefäß gestellt. Der Waschvorgang wurde erneut wiederholt, dieses Mal allerdings mit 500 µl *RPE* Puffer. Als Nächstes erfolgte nach Zugabe von 500 µl *RPE* Puffer eine 2-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm. Zur Eluierung der RNA von der Säulenmembran wurden 25 µl *DEPC*-Wasser auf die Säulenmembran pipettiert und 2 min inkubiert. Abschließend wurde für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und das Eluat, in welchem sich die RNA befand, in ein steriles Eppendorfgefäß überführt.

Nach erfolgter Extraktion der RNA wurden die Konzentrationen der einzelnen Ansätze gemessen. Hierzu wurde der Spectrophotometer *Nanovue* verwendet. Für die Messungen wurden jeweils 2 µl Probenmaterial benötigt. Falls im direkten Anschluss die cDNA-Synthese erfolgte, wurden die Proben auf Eis gelagert, ansonsten wurden sie bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.8 cDNA-Synthese

Zur Durchführung der *First Strand c-DNA* Synthese wurde das *Affinity Script PCR cDNA Synthesis Kit* (*Stratagene*) verwendet. Hierfür wurden je 6 µl der vorab produzierten RNA mit 10 µl *Master-Mix*, 3 µl *Oligo DT Primer* und 1 µl *Affinity Script RT* vermischt und im *Thermocycler* inkubiert: 5 min bei 25 °C, 15 min bei 42 °C und abschließend 5 min bei 95 °C. Nach diesem Schritt war das

Einfrieren der Proben erneut möglich. Bei direkt folgender *Realtime*-PCR wurde die hergestellte cDNA auf Eis gelagert.

### **2.2.9 Realtime PCR (RT-PCR)**

Die RT-PCR erfolgte mittels *RT<sup>2</sup> qPCR SYBR Green/ROX Master-Mix-24* (Qiagen). Zur Messung der Genexpression wurden die *Primer* GAPDH, ITGA5, RUNX2, VEGF und BMP2 aus der Serie *RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assays* verwendet. Zur Durchführung wurden je 2 µl cDNA mit 3 µl *Aqua dest.* und 20 µl *Master-Mix* gemischt, in einen *Cup* eines *8-strip cups* pipettiert und in eine vorgekühlte Metall-*Well*-Platte gestellt. Dabei beinhaltet der *Master-Mix* Ansatz 12,5 µl *SYBR-Green-Mix*, 9,5 µl *Auqa dest.* und 1 µl des jeweiligen *Primer*. Zur Amplifikation der DNA wurden folgende PCR-Bedingungen festgelegt: einmaliger Zyklus von 10 min bei 95 °C zur Denaturierung, anschließend 40 Zyklen mit jeweils 15 s bei 95 °C zur erneuten Denaturierung und 1 min bei 60 °C zum Annealing.

Die Auswertung der Messung erfolgte über den sogenannten Ct-Wert. Dieser beschreibt die Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig sind, bis die Fluoreszenzintensität des zu bestimmenden DNA-Abschnittes erstmals einen Schwellenwert überschreitet und die PCR in die exponentielle Phase eintritt.

Die so gemessene Genexpression der gesuchten Zielgene wurde ins Verhältnis zur Genexpression eines sogenannten Referenzgens gesetzt. GAPDH erfüllte die Voraussetzungen eines solchen Kontroll-Gens, da es ubiquitär synthetisiert und vergleichsweise konstant exprimiert wird. Die Ct-Werte wurden mit Hilfe folgender Formel in Relation gesetzt:  $\text{Ratio} = 2^{-(Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ GAPDH})}$

### **2.2.10 Analyse der CD51-Expression**

Zur Analyse der CD51-Expression wurden die BMCs dreier Ratten nach Standardprotokoll isoliert und mit antiMIR92A beziehungsweise mit Kontroll-RNA transfiziert. Nach der 4-stündigen Inkubation im Brutschrank wurden die BMCs aufgearbeitet und auf drei 12-*Well*-Platten verteilt, welche nach 24 h,

48 h und 72 h weiterbearbeitet wurden. Hierbei wurden pro *Well* jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen pipettiert und nach folgendem Schema verteilt. (Abb. 6)

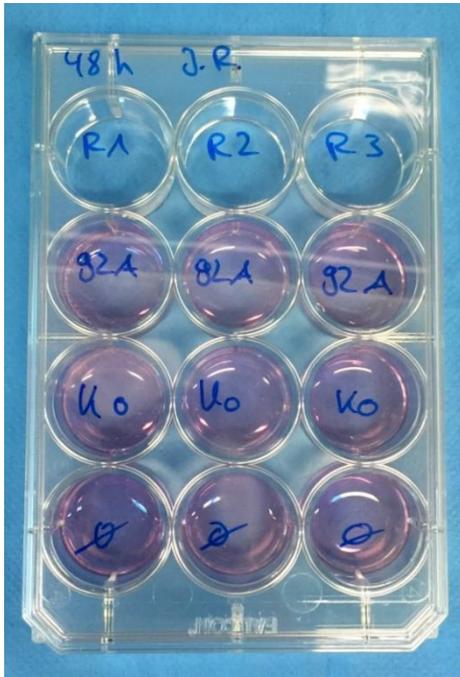


Abbildung 6: Aufteilung der 12-*Well*-Platten, beispielhaft für die Weiterbehandlung nach 48 h

(R1 – 3 = Ratte 1 – 3, 92A = antiMIR92A, Ko = Kontroll-RNA, Ø = unbehandelte Zellen)

Nach der Inkubation der Platten im Brutschrank für den jeweiligen Zeitraum folgte die Antikörper Färbung und die Vorbereitung der Zellen für die *FACS*-Analyse. Hierzu wurde zu jedem *Well* 1 ml PBS pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mittels Pipette mit dem PBS vermischt und in *FACS*-Röhrchen für 8 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das *Zellpellet* durch mehrmaliges Reiben über ein Gitter gelöst und in 200 µl PBS resuspendiert. Im Folgenden wurde in 9 leere *FACS*-Röhrchen jeweils 5 µl des Anti-CD51 Antikörpers pipettiert und 100 µl der zuvor hergestellten Zellsuspension auf die Röhrchen verteilt. Daraus ergaben sich 18 Röhrchen, 9 Isotyp-Röhrchen ohne Antikörper zur Kontrolle und 9 Röhrchen mit Antikörper. Diese wurden für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert und mit 2 ml PBS aufgefüllt. Im nächsten Schritt erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm und RT. Der Überstand wurde verworfen

und das *Pellet* erneut resuspendiert. Anschließend wurden alle Zellen, d.h. auch die Isotyp-Ansätze, mit jeweils 5 µl eines sekundären Antikörpers für die *FACS*-Analyse versetzt. Darauf folgte eine 15-minütige Inkubation im Dunkeln bei RT. Zugabe von 2 ml PBS und wiederholte Zentrifugation für 5 min bei 1500 rpm und RT. Der Überstand wurde verworfen, das *Zellpellet* in 1 ml 1 %iger Formaldehyd Lösung resuspendiert. Diese Mischung wurde für 10 min inkubiert und erneut mit 2 ml PBS aufgefüllt. Nach der abschließenden 5-minütigen Zentrifugation bei 1500 rpm, Verwerfen des Überstandes und Resuspendierung in 250 µl PBS waren die Zellen für die *FACS*-Analyse vorbereitet. Bei der anschließenden Messung wurden je Probe mindestens 2.000 mononukleäre Zellen detektiert und im zweidimensionalen *Dotblot* und einparametrischer Histogrammanalyse ausgewertet.

### **2.2.11 Statistische Datenanalyse**

Ergebnisse werden als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Signifikanzen wurden bei mehr als zwei Vergleichsgruppen unter Verwendung des nicht-parametrischen *Kruskal-Wallis-Test* mit *Bonferroni-Holm posthoc Analyse* bestimmt. Bei geringer n-Zahl und gleichzeitig hohem Aufkommen von Vergleichsgruppen wurden die Ergebnisse deskriptiv ausgewertet (Optimierung der Transfektionsbedingungen). Bei zwei Untersuchungsgruppen wurde der *Wilcoxon-Man-Whitney-U-Test* verwendet. Als Statistiksoftware wurde *Bias 11.02* (*Epsilon-Verlag*, Darmstadt) eingesetzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswertung der Transfektionseffizienz zur Optimierung des Transfektionsmodells

Zur Bestimmung des optimalen Verhältnisses von *Lipofectamin* zur *BlockIT-Stock-Solution* und zur Inkubationszeit wurden die *FACS*-Daten analysiert. Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, konnten die exakten Anteile der transfizierten vitalen Lymphozyten (Grafik C) sowie der Monozyten (Grafik D) im Verhältnis zu den defekten Zellen ermittelt werden.

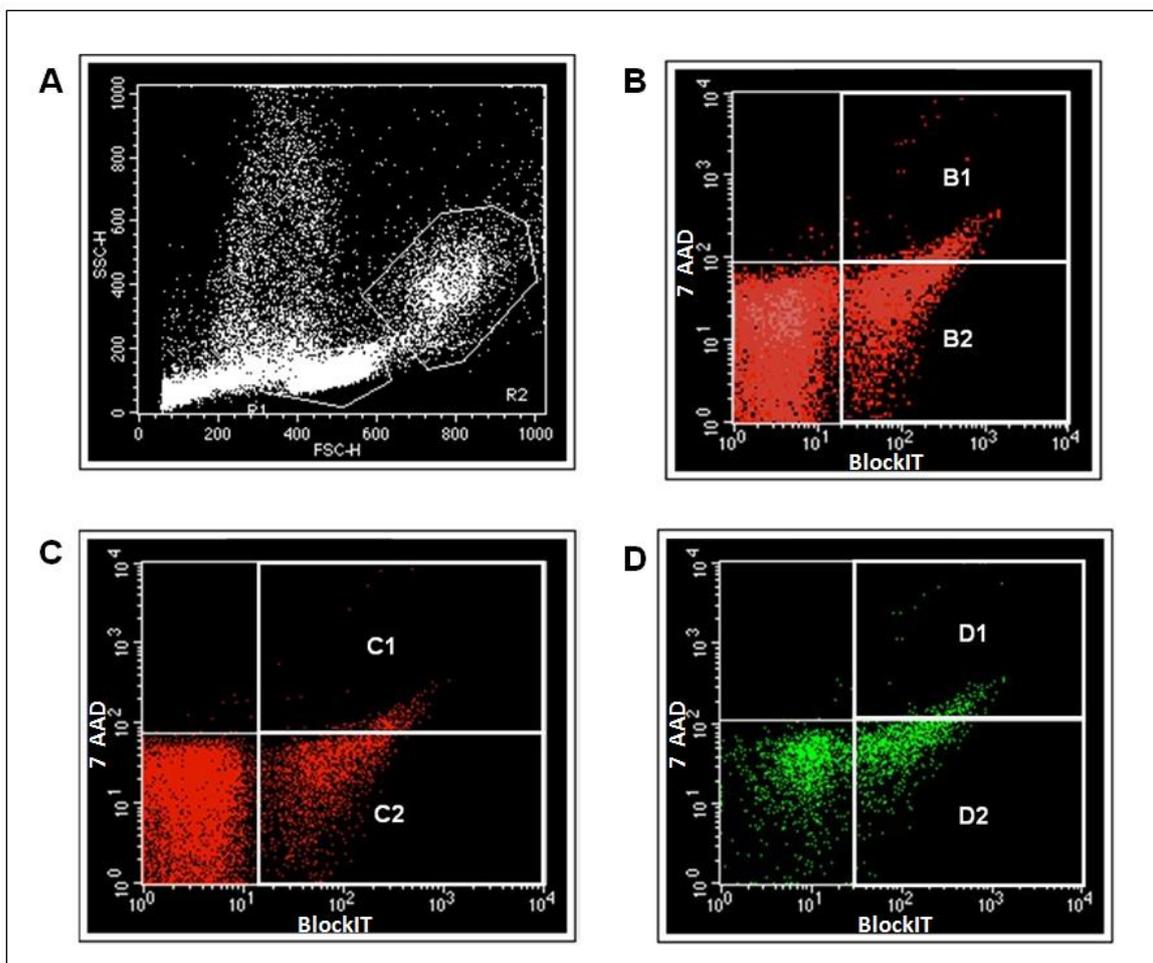


Abbildung 7: Transfektionseffizienz anhand der *FACS*-Analyse

**A:** Gesamtzahl der isolierten Zellen, **B:** BMCs, **C:** Lymphozyten, **D:** Monozyten; **B – D:** Die y-Achse beschreibt jeweils den Viabilitätsmarker 7AAD, auf der x-Achse ist die *BlockIT-Stock-Solution* dargestellt. Die Areale B1, C1, D1 markieren transfizierte defekte Zellen; die Quadranten B2, C2, D2 umfassen viabel transfizierten Zellen.

Diese Daten wurden zum Vergleich in den untenstehenden Diagrammen zusammengefasst (Abbildung 8 und 9). Es konnte gezeigt werden, dass bei **Ansatz 5 nach 4-stündiger Inkubation** die Anzahl viabler Zellen bei > 95 % lag, wobei gleichzeitig eine relativ konstant hohe Transfektion sowohl der Monozyten-, als auch der Lymphozytenfraktion erreicht wurde. Aufgrund der jedoch vergleichsweise geringen Versuchszahl (n = 3) erfolgte keine statistische Auswertung, sondern eine qualitative Bewertung. Daraus konnte abgeleitet werden, dass Ansatz 5 nach 4 h Inkubation die höchste Transfektionseffizienz erzielte. Somit wurden für die nachfolgenden Versuche zur Lipotransfektion jeweils äquivalente Mengen verwendet; dies entsprach 48,5 µl *OptiMem* und 1,5 µl *BlockIT-Stock-Solution* sowie 0,5 µl *Lipofectamin* und 49,5 µl *OptiMem* pro Ansatz.

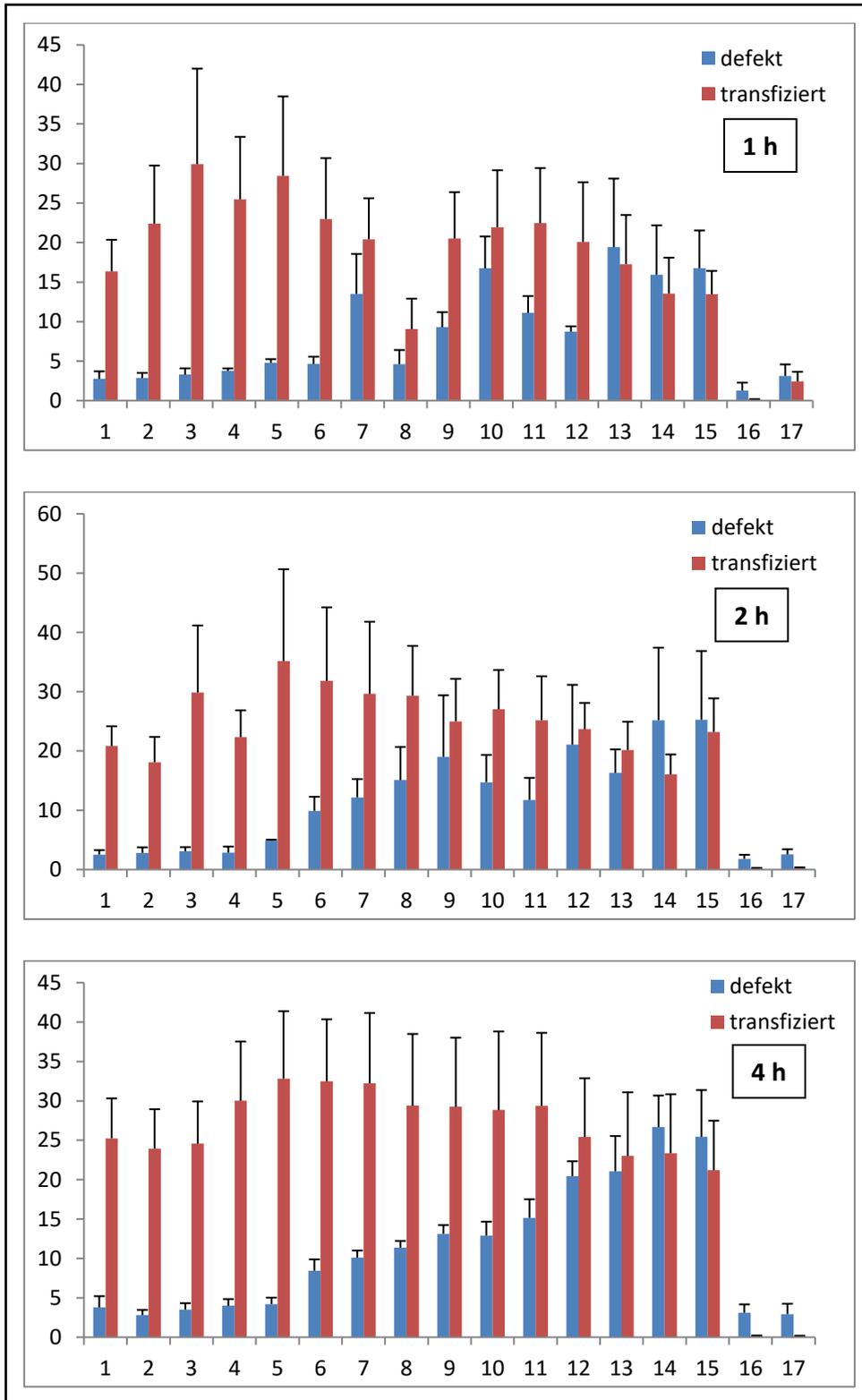


Abbildung 8: Transfizierte und defekte Monozyten nach 1h, 2h und 4h Inkubation

Die x-Achse bezeichnet die Probennummern entsprechend nebenstehender Tabelle (siehe auch Tabelle 1 unter Punkt 2.2.2). Auf der y-Achse ist der Prozentsatz defekter oder transfizierter Zellen aufgetragen.

	Lipofectamin (µl)		1h
BlockIT (nM)	0,5	1,0	1,5
10	1	6	11
20	2	7	12
30	3	8	13
40	4	9	14
50	5	10	15
Kontroll-Ansätze	16: 100 µl Optimem 17: 100 µl Optimem + 1,5 µl Lipofectamin		

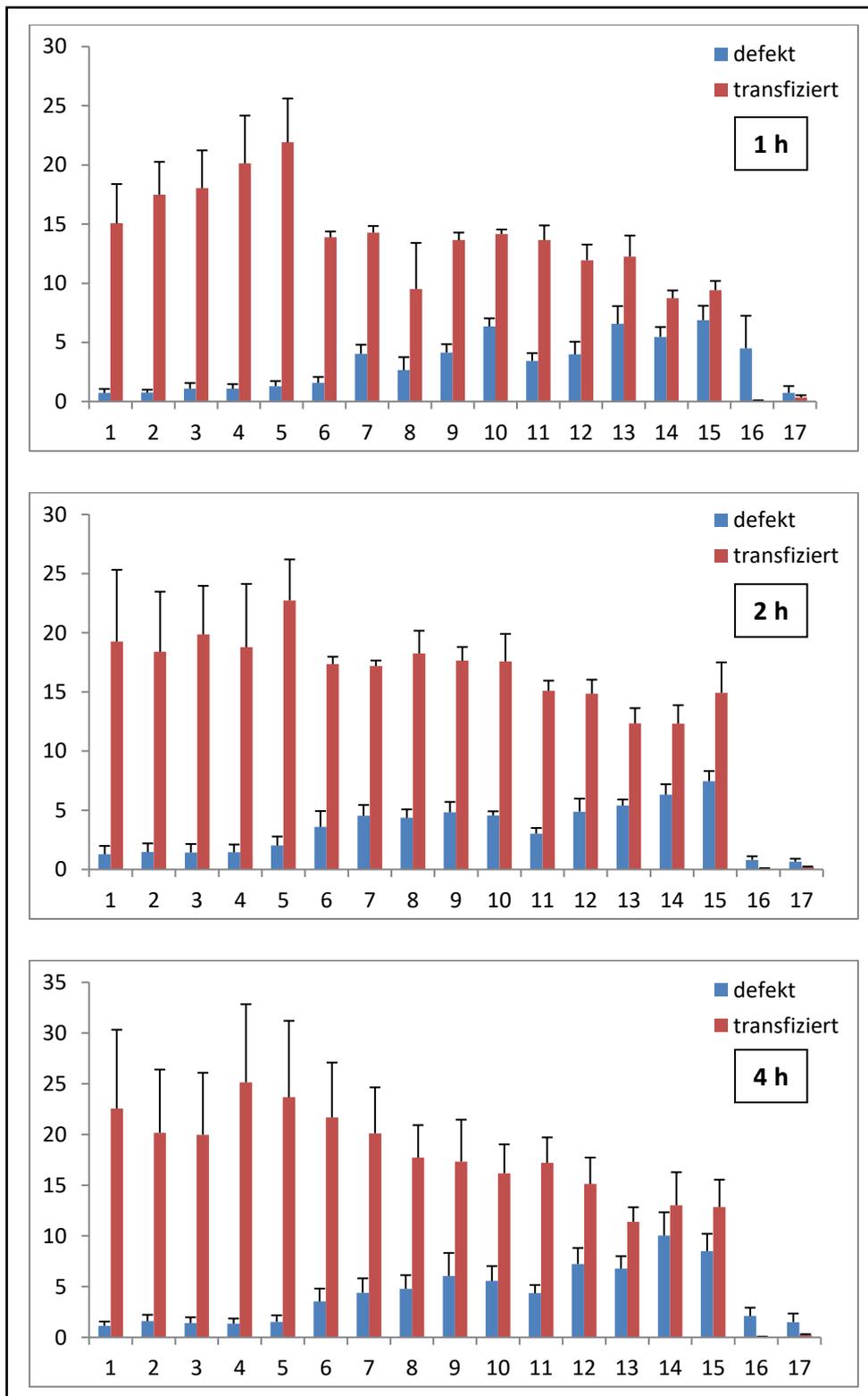


Abbildung 9: Transfizierte und defekte Lymphozyten nach 1h, 2h und 4h Inkubation

Die x-Achse bezeichnet die Probennummern entsprechend nebenstehender Tabelle (siehe auch Tabelle 1 unter Punkt 2.2.2). Auf der y-Achse ist der Prozentsatz defekter oder transfizierter Zellen aufgetragen.

	Lipofectamin (µl)		1h
BlockIT (nM)	0,5	1,0	1,5
10	1	6	11
20	2	7	12
30	3	8	13
40	4	9	14
50	5	10	15
Kontroll-Ansätze	16: 100 µl Optimem		17: 100 µl Optimem + 1,5 µl Lipofectamin

### 3.2 Nachweis der erfolgreichen Transfektion mittels

#### Durchflusszytometrie

Der Erfolg der Transfektion wurde mit Hilfe der *FACS*-Analyse nachgewiesen. In Abbildung 10 sind in **Grafik A** die Zellen, genauer gesagt die BMCs, anhand ihrer Granularität und Größe aufgetrennt, wodurch sich die Monozyten von lymphozytären Zellen separieren lassen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sich im isolierten Knochenmark ausreichend BMCs sowie im Speziellen Monozyten befanden. In **Grafik B** wurden die Zellen anhand ihrer Vitalität mithilfe des Viabilitätsmarkers 7AAD aufgeteilt. Dieser Farbstoff gelangt selektiv nur in defekte Zellen. Die umkreiste Fläche spiegelt die defekten Zellen wider, hierbei waren maximal 5 % der Zellen durch die Transfektion zu Grunde gegangen, was eine gute Voraussetzung für die spätere Verwendung des Protokolls für die weiteren Experimente darstellte. Zusätzlich wurden die Zellen anhand des Leukozytenmarkers CD45-APC in Leukozyten beziehungsweise Leukozytenvorläuferzellen und in mesenchymale Stammzellen aufgetrennt. Mittels CD34 Färbung konnten in **Grafik C** die transfizierten vitalen CD45<sup>+</sup> und CD34<sup>+</sup> Zellen (HSC) ermittelt werden, somit erfolgte bei 38 % der HSC eine erfolgreiche Transfektion. Aus **Grafik D** lässt sich berechnen, dass 69 % der CD45<sup>-</sup> und CD271<sup>+</sup> MSC wirksam transfiziert wurden. In **Grafik E** sind die transfizierten, vitalen Monozyten in der umkreisten Fläche abgebildet, dies entsprach 40 % der monozytären Zellen.

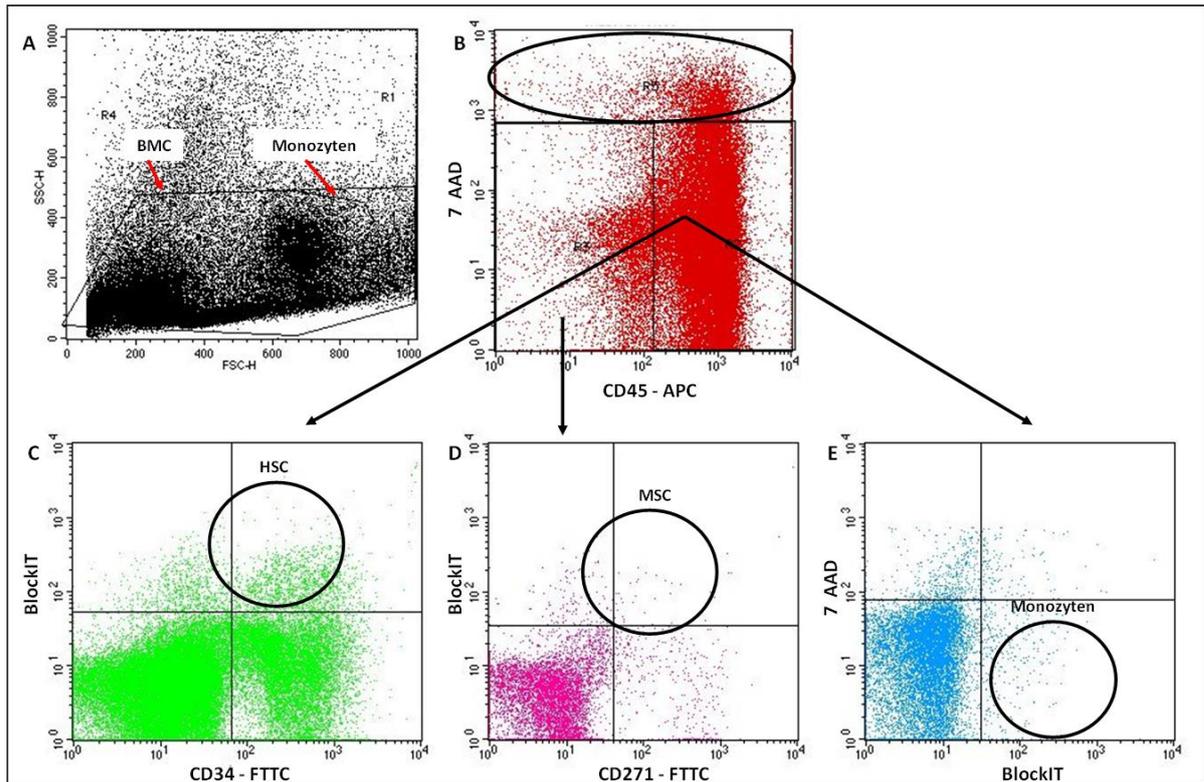


Abbildung 10: Transfektionseffizienz der HSC, MSC und Monozyten

**A:** Gesamtzahl der isolierten BMCs; **B:** Auftrennung anhand des Viabilitätsmarkers 7AAD (y-Achse) und des Gesamtleukozytenmarkers CD45-APC (x-Achse); **C:** HSC → Auftrennung anhand der Transfektionseffizienz (y-Achse) und des Oberflächenmarkers CD34 (x-Achse); **D:** MSC → Auftrennung anhand der Transfektionseffizienz (y-Achse) und des Oberflächenmarkers CD271 (x-Achse); **E:** Monozyten → Auftrennung anhand des Viabilitätsmarkers 7AAD (y-Achse) und der Transfektionseffizienz der Monozyten (x-Achse).

Die so ermittelte zelltypspezifische Transfektionseffizienz bei  $n = 5$  BMC-Präparationen ist in nachfolgendem Diagramm noch einmal dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Vorläuferzellen der mesenchymalen Stammzellen die höchste Transfektionseffizienz aufwiesen, aber auch bei den Monozyten und hämatopoetischen Stammzellen wurden zufriedenstellende Ergebnisse erzielt.

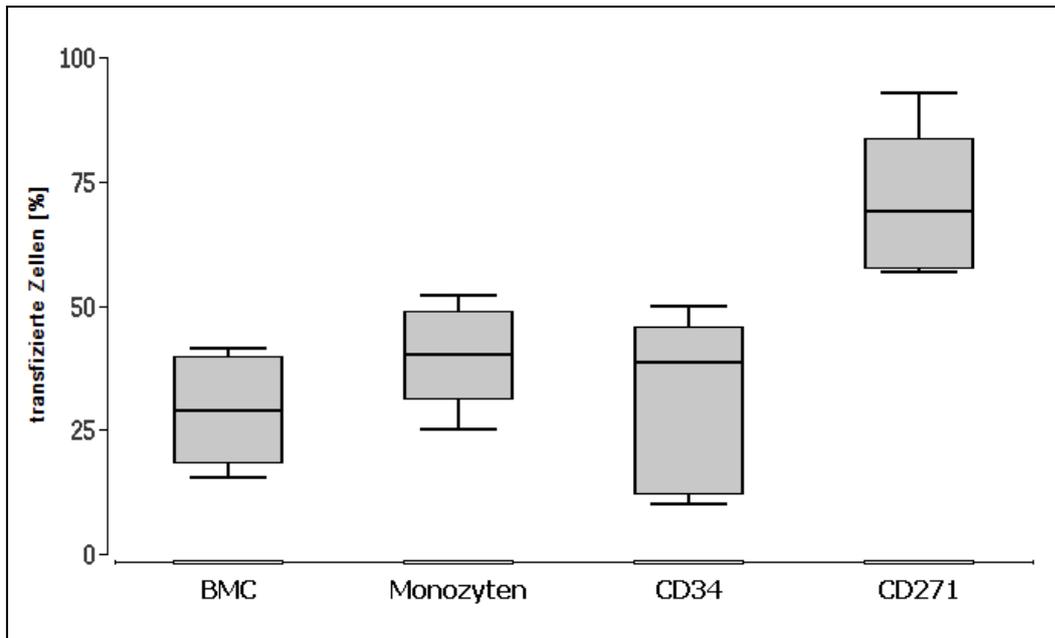


Abbildung 11: Zelltypspezifische Transfektionseffizienz

Transfektionseffizienz **BMC**: 30 %, **Monozyten**: 40 %, **HSC (CD34+)**: 38 %, **MSC-Vorläufer (CD271+)**: 69 %. Auf der x-Achse sind die jeweiligen Zelltypen, auf der y-Achse ist der Prozentanteil der erfolgreich transfizierten, vitalen Zellen aufgetragen. (n = 5)

### 3.3 Nachweis der miRNAs sowie deren Herunterregulierung nach Transfektion

Nach Transfektion der BMCs mit Kontroll-RNA (*Scramble*), antiMIR92A und antiMIR335 und entsprechender Aufbereitung wurde die Expression der betreffenden miRNAs nach 24 h mittels qPCR bestimmt. Als Referenz-miRNA diente SN68. In Abbildung 12 wird die Kontroll-RNA als 100 %-Expressionsniveau verwendet, um die Expression von antiMIR92A und antiMIR335 optimal vergleichen zu können. Es wird deutlich, dass die Transfektion mit antiMIRs gegen die MiRNAs nach 24 h jeweils zu einem signifikanten Rückgang der *Target*-miRNA-Konzentrationen führt. Für MIR92A konnte eine Verminderung um -58 %, für MIR335 um -64 % nachgewiesen werden.

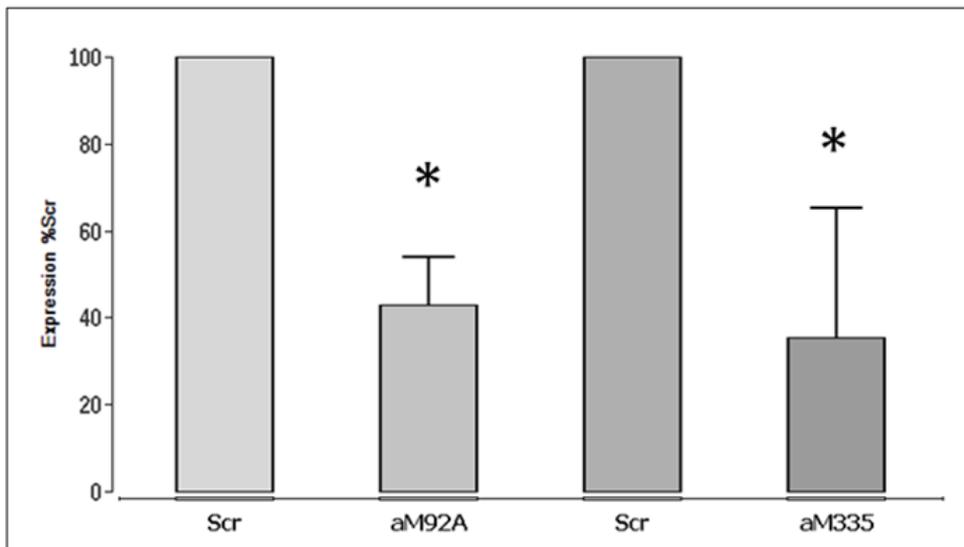


Abbildung 12: Expression von antiMIR92A und antiMIR335 in Relation zur *Scramble*-RNA als 100%-Expressionsniveau 24 h nach Transfektion.

Signifikanter Rückgang der *Target*-miRNA-Konzentrationen: MIR92A: -58 %, MIR335: -64 %. Auf der x-Achse sind die jeweiligen Bezeichnungen der RNAs aufgeführt (Scr = *Scramble*, aM = antiMIR). Auf der y-Achse wird die Scr-RNA als 100 %-Expressionsniveau verwendet. (n = 3), \* = p < 0.05.

### 3.4 Effekte der antiMIR auf die Genexpression ausgesuchter Zielgene

Im Hauptteil dieser Arbeit wurde die Genexpression ausgesuchter Zielgene nach Lipotransfektion mit den entsprechenden antiMIR nach 24 h, 48 h und 72 h untersucht.

#### 3.4.1 Auswirkungen der antiMIR92A

Physiologisch supprimiert die MIR92A unter anderem die Genexpression von ITGA5 und hat somit einen antiangiogenen Effekt. Durch den Einsatz eines spezifischen antiMIRs wurde MIR92A gehemmt, was zu einem Anstieg der Konzentration von ITGA5 führte und somit die Gefäßneubildung positiv beeinflusste. Mit Hilfe der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass es besonders 72 h nach Transfektion mit antiMIR92A zu einer Erhöhung der Genexpression von ITGA5 um das 3,8-fache kommt. Der p-Wert liegt hierbei bei 0,1, das Ergebnis kann somit als Trend gewertet werden.

(Abb. 13 A)

Des Weiteren wurden die Effekte auf die Genexpression von ITGA5 bei zusätzlicher Gabe von VEGFA untersucht. Wie in Abbildung 13 B erkennbar, konnten 48 h nach Transfektion im Median höhere Werte gefunden werden, die sich aber statistisch nicht absichern ließen. Im weiteren Verlauf wurde nach 72 h ein Rückgang der ITGA5 Expression im Vergleich zu 48 h beobachtet.

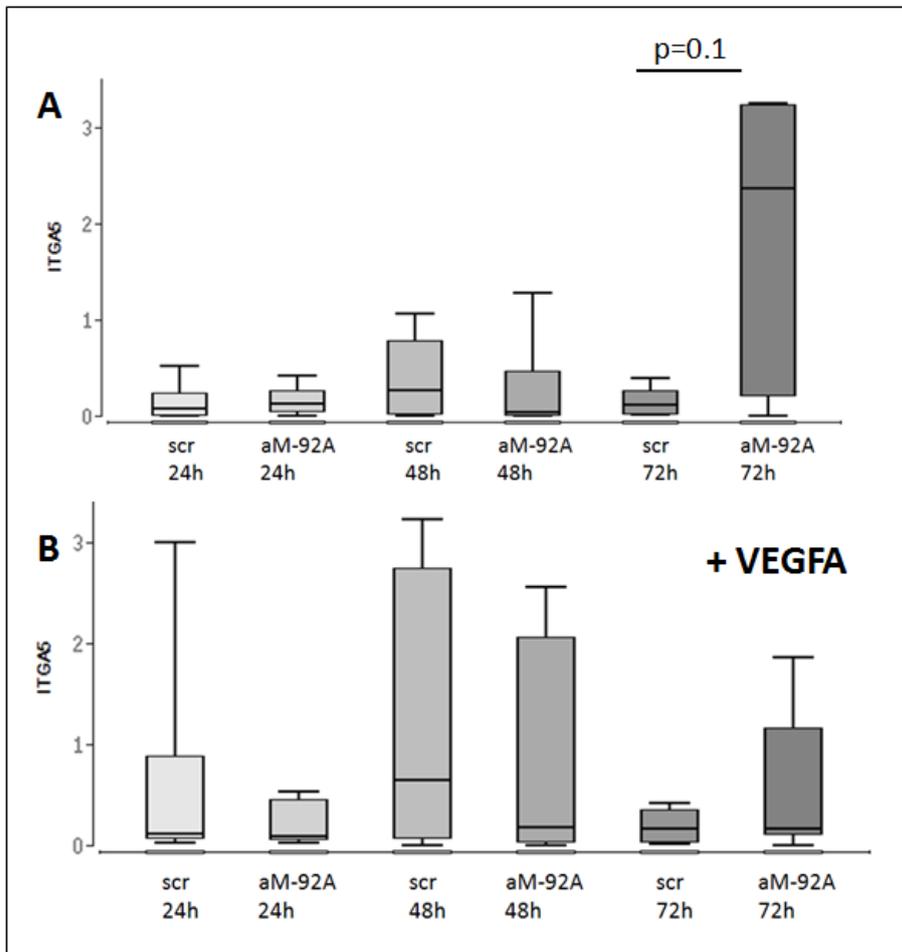


Abbildung 13: Genexpression ITGA5

Auf der x-Achse sind die jeweiligen RNAs mit Zeit nach Transfektion dargestellt, die y-Achse spiegelt die Expression von ITGA5 als Vielfaches der GAPDH Genexpression wider. (scr = *Scramble*-RNA, aM-92A = antiMIR92A); (n = 5)

**Grafik A:** Transfektion mit Scr-RNA oder antiMIR92A Die erhöhte Aktivität von ITGA5 72 h nach Suppression der MIR92A wird deutlich ( $p = 0,1$ ); **Grafik B:** Transfektion mit scr-RNA der antiMIR92A plus zusätzliche Gabe von VEGF führt zu keiner signifikanten Erhöhung der Genexpression von ITGA5 ( $p = 0,52$ ).

Zudem wurden auch die Effekte der antiMIR92A auf die Genexpression von VEGFA untersucht. Dieser Wachstumsfaktor spielt eine entscheidende Rolle

bei der Angiogenese, indem er die Bildung neuen Endothels induziert. Durch die Hemmung der MIR92A konnte 72 h nach Transfektion eine deutliche Erhöhung der Genexpression von VEGFA dokumentiert werden. (Abb. 14A)

Das Hinzufügen von VEGFA während der Inkubationszeit führte ebenfalls 48 h nach Transfektion im Median zu einer erhöhten Gesamtexpression von VEGFA, wohingegen 24 h später ein erneuter Rückgang der Werte beobachtet werden konnte (Abb.14B).

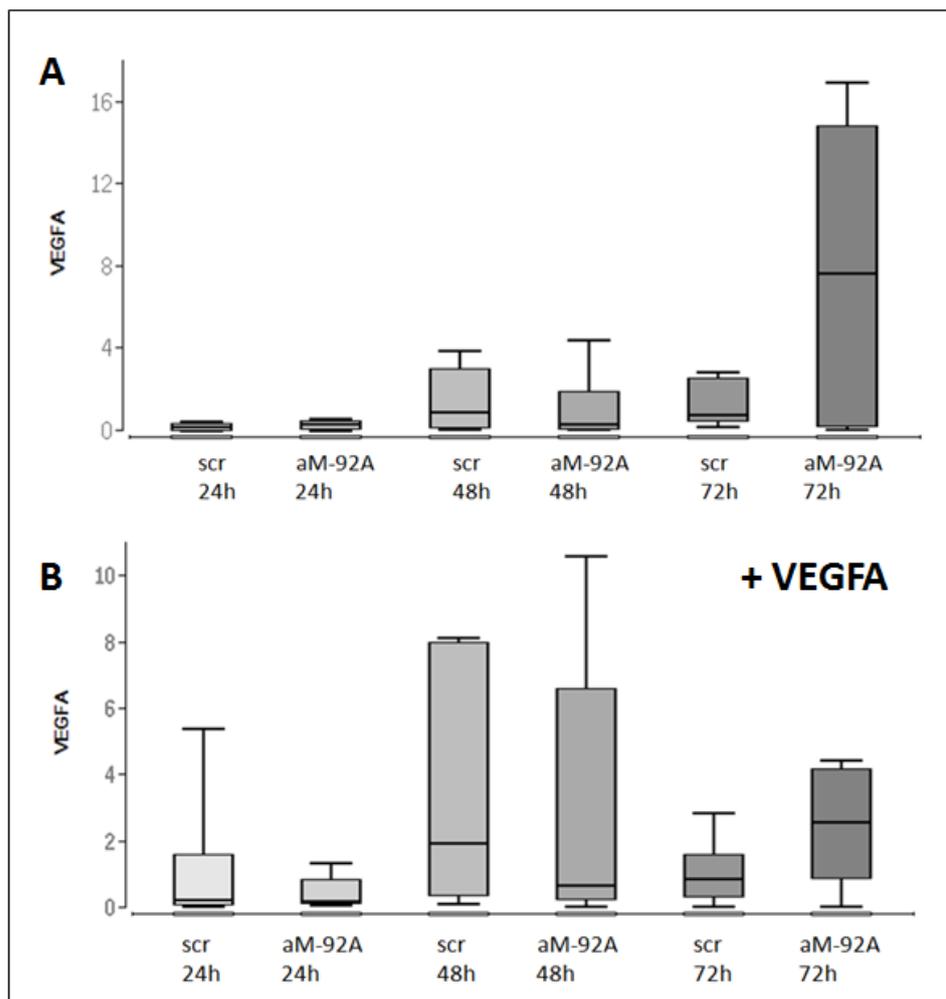


Abbildung 14: Genexpression von VEGFA

Auf der x-Achse sind die jeweiligen RNAs mit Zeit nach Transfektion dargestellt (scr = *Scramble*-RNA; aM-92A = antiMIR92A), die y-Achse spiegelt die Expression von VEGFA als Vielfaches der GAPDH Genexpression wider. (n = 5)

**Grafik A:** Transfektion mit scr-RNA oder antiMIR92A, Expression von VEGFA nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation. **Grafik B:** Transfektion mit scr-RNA oder antiMIR-92A, Expression von VEGFA nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation bei zusätzlicher Gabe von VEGFA.

### **3.4.2 Auswirkungen der antiMIR335**

MIR335 inhibiert die Osteogenese unter anderem durch verringerte Genexpression von RUNX2. Durch die gezielte Hemmung von MIR335 mittels spezifischer antiMIR konnte die Konzentration von RUNX2 und damit der positive osteogene Effekt gesteigert werden. In Abbildung 15A ist der Trend einer erhöhten Genexpression von RUNX2 72 h nach Transfektion deutlich zu erkennen. Hierbei wurde die Bildung des Transkriptionsfaktors um das 1,8-fache gesteigert.

Auch bei diesem Versuchsteil wurde die Wirksamkeit der zusätzlichen Gabe von BMP2 untersucht. Es konnten ähnliche Ergebnisse wie schon bei der Verwendung von antiMIR92A und VEGF verzeichnet werden: die ergänzende Verwendung von BMP2 führte nach 72 h eher zu einer Verringerung der Genexpression von RUNX2, nach 24 h konnte jedoch ein leicht positiver Effekt beobachtet werden. (Abb. 15B)

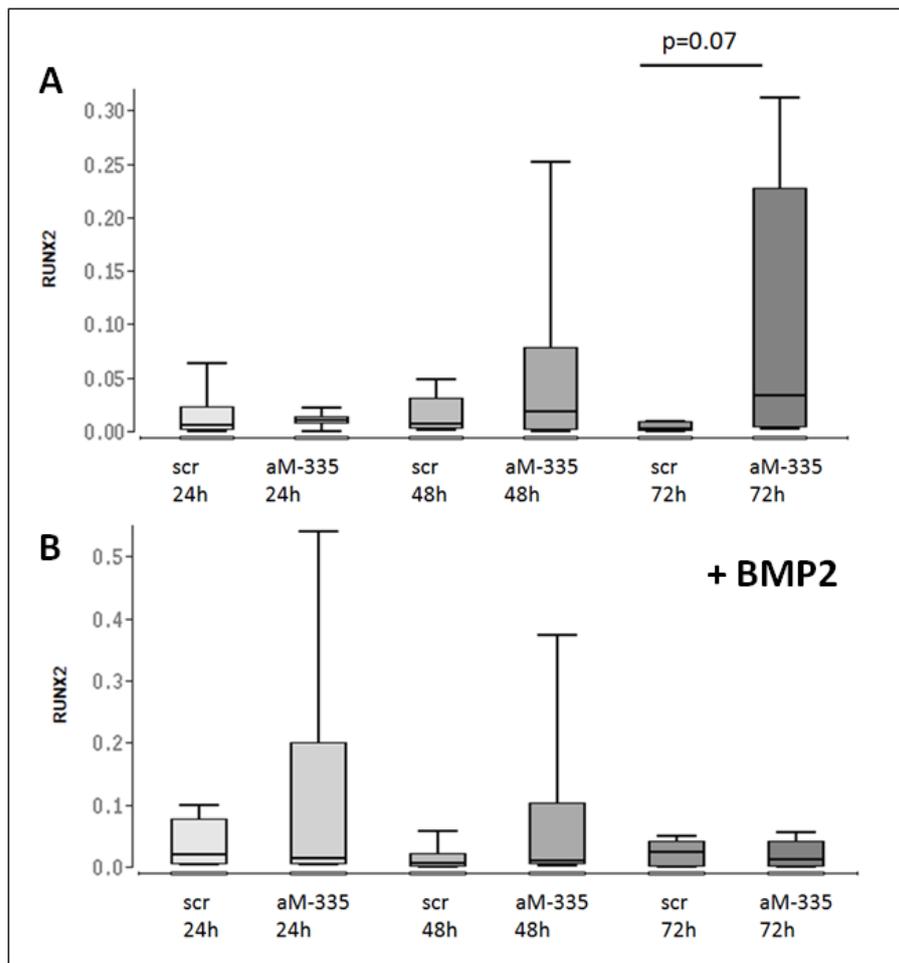


Abbildung 15: Genexpression von RUNX2

Auf der x-Achse sind die jeweiligen RNAs mit Zeit nach Transfektion dargestellt, die y-Achse spiegelt die Expression von RUNX2 als Vielfaches der GAPDH Genexpression wider. (scr = *Scramble*-RNA; aM-335 = antiMir335); (n = 5)

**Grafik A:** Transfektion mit scr-RNA oder antiMIR335: Die erhöhte Aktivität von ITGA5 72 h nach Suppression der MIR335 wird deutlich ( $p = 0,07$ ); **Grafik B:** Transfektion mit scr-RNA oder antiMIR335 plus zusätzliche Gabe von BMP2 führt zu einer verminderten Genexpression von RUNX2 nach 72 h.

Neben den Effekten auf die Genexpression von RUNX2 wurde auch untersucht, wie sich die Expressierung von BMP2 durch den Einsatz von antiMIR335 verändert. Als Ergebnis zeigte sich die Tendenz zur erhöhten Expression von BMP2 48 h sowie 72 h nach Transfektion. (Abb. 16A)

Der additional Gebrauch von BMP2 während der Inkubationszeit führte nach 48 h zu leicht erhöhten Werten, nach 72 h Inkubation wurde eine verminderte Genexpression von BMP2 verzeichnet. (Abb. 16B)

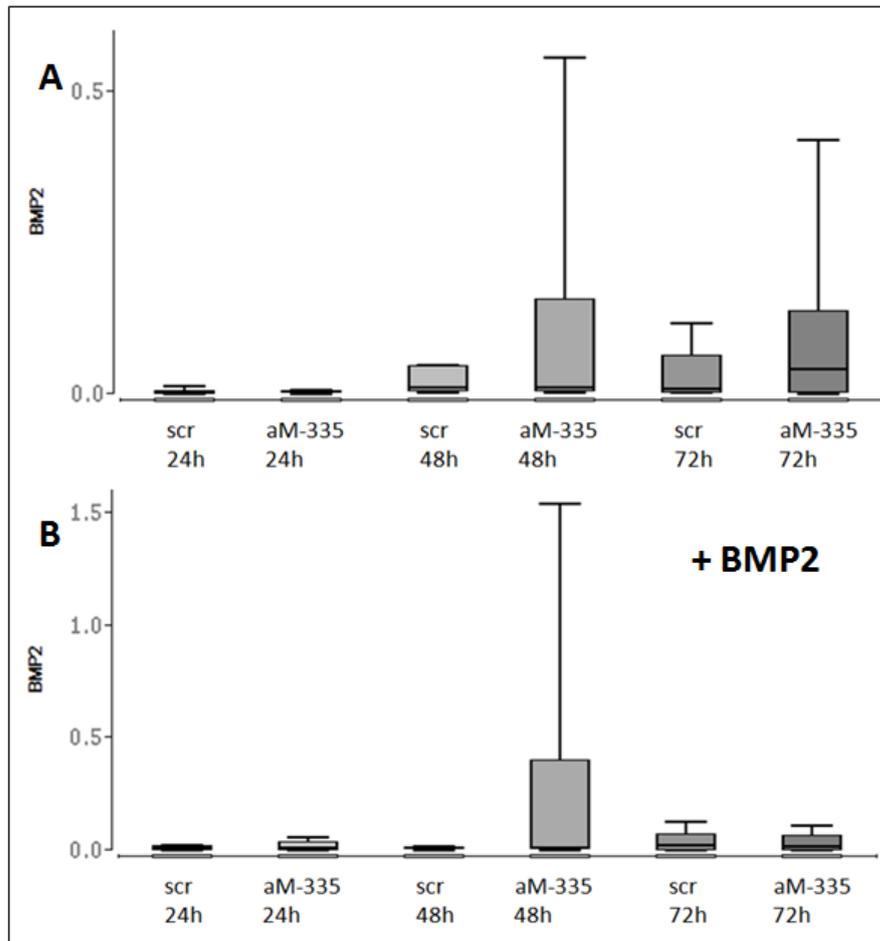


Abbildung 16: Genexpression von BMP2

Auf der x-Achse sind die jeweiligen RNAs mit Zeit nach Transfektion dargestellt, die y-Achse spiegelt die Expression von BMP2 als Vielfaches der GAPDH Genexpression wider. (scr = Scramble-RNA, aM-335 = antiMIR335); (n = 5)

**Grafik A:** Transfektion mit scr-RNA oder antiMIR335: Tendenz zu erhöhter BMP2-Expression 48 h und 72 h nach Suppression der miRNA335. **Grafik B:** Transfektion mit scr-RNA oder antiMIR335 plus zusätzliche Gabe von BMP2 führte zu einer verminderten Genexpression von BMP2 nach 72 h.

Zusammenfassend konnte also 72 h nach Transfektion ein Anstieg der *Target*-Genexpressionen von ITGA5 und RUNX2 festgestellt werden. Der supplementäre Einsatz von Wachstums- oder Transkriptionsfaktoren führte 72 h nach Transfektion nicht zu einer Erhöhung der Genexpressionen, jedoch konnten 48 h nach Zugabe von VEGFA verstärkte Expressionen von ITGA5 und VEGFA dokumentiert werden.

### 3.5 Erhöhung der CD51- Expression nach Transfektion mit antiMIR92A

Nach der Isolierung, Aufbereitung, Transfektion mit antiMIR92A und Inkubation der BMCs über einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h konnte die CD51-Oberflächenexpression auf den behandelten Zellen mittels Antikörperfärbung in der Durchflusszytometrie dargestellt werden. In Abb.17A wird die Häufigkeitsverteilung der Mess-Signale in einem Histogramm abgebildet. Hierbei spiegelt die y-Achse die Intensität der Einzelmessungen wider, wobei die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Zahl der verfügbaren Bindungsstellen ist. Daraus ließ sich ableiten: eine hohe Anzahl an CD51-Oberflächen Rezeptoren führten bei der Zellfärbung mittels Antikörpern zu einer erhöhten Fluoreszenz der Zelle. In der dargestellten Abbildung weist die violette Population mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von 38,65 die höchste CD51-Dichte auf. Hierbei handelte es sich um den Ansatz, der mit antiMIR92A transfiziert und nach 72 h ausgewertet wurde. Die grüne Population repräsentiert mit einer MFI von 30,52 die *Scramble*-RNA nach 72 h. Die Isotyp-Kontrolle wird in der Abbildung rosa dargestellt.

In Grafik 17B wird die CD51-Oberflächenexpression auf antiMIR92A (violetter Peak) und *Scramble*-RNA (grüne Linie) behandelten BMCs in der eindimensionalen Histogrammdarstellung abgebildet. Nach 72 h Inkubation im Brutschrank konnte eine signifikant erhöhte Expression bei BMCs, die mit antiMIR92A transfiziert wurden, festgestellt werden, der p-Wert lag bei 0,001.

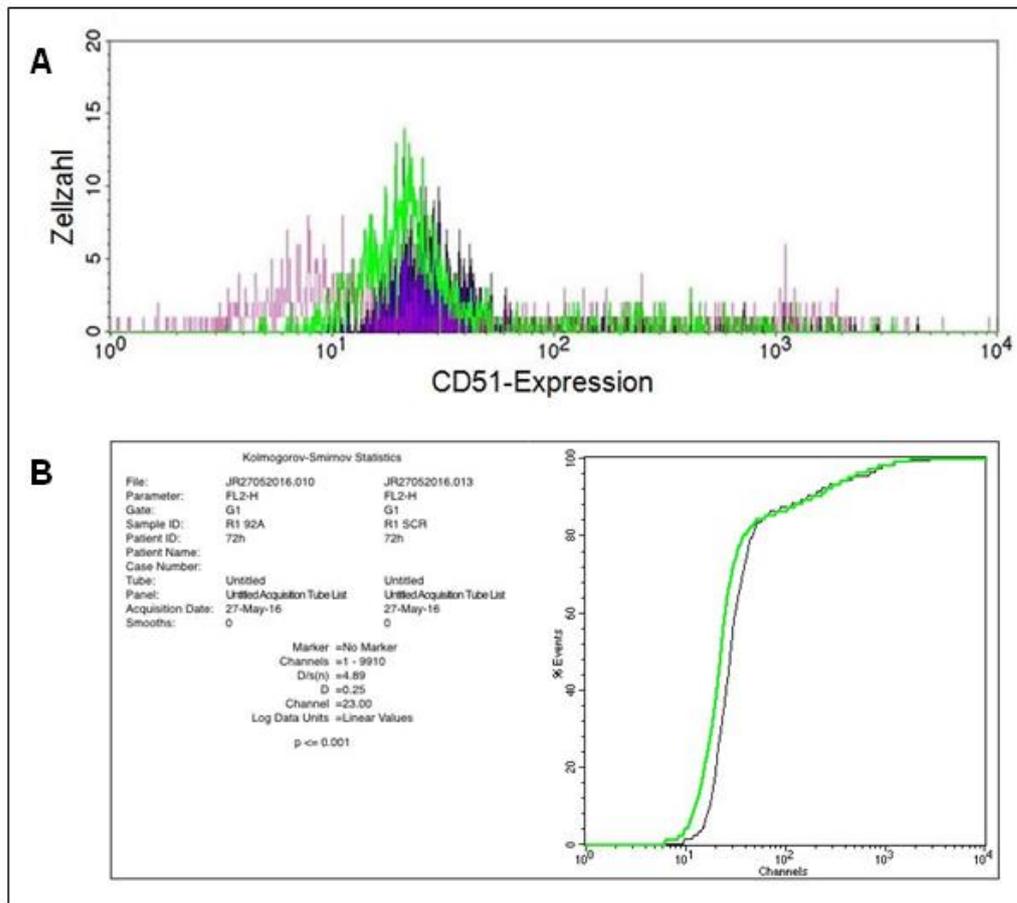


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD51-Oberflächenexpression auf BMCs 72 h nach Transfektion

Signifikant erhöhte CD51-Expression auf antiMIR92A behandelten BMCs. Die x-Achse repräsentiert jeweils die CD51 Expression, die y-Achse die Zellzahl. ( $p = 0,001$ ;  $n = 3$ ) (violett: MIR92A, grün: *Scramble*-RNA, rosa: Isotyp-Kontrolle)

Analog zu den gerade erläuterten Ergebnissen, ist die Auswertung der *Dotblots* in untenstehender Graphik (Abb. 18) veranschaulicht. Dabei beziehen sich die Werte jeweils auf die tagesaktuelle *Scramble*-RNA-Kontrolle. Beim Vergleich der 24 h- und 72 h-Werte wurde ebenfalls eine signifikante Erhöhung der CD51-Oberflächenexpression deutlich.

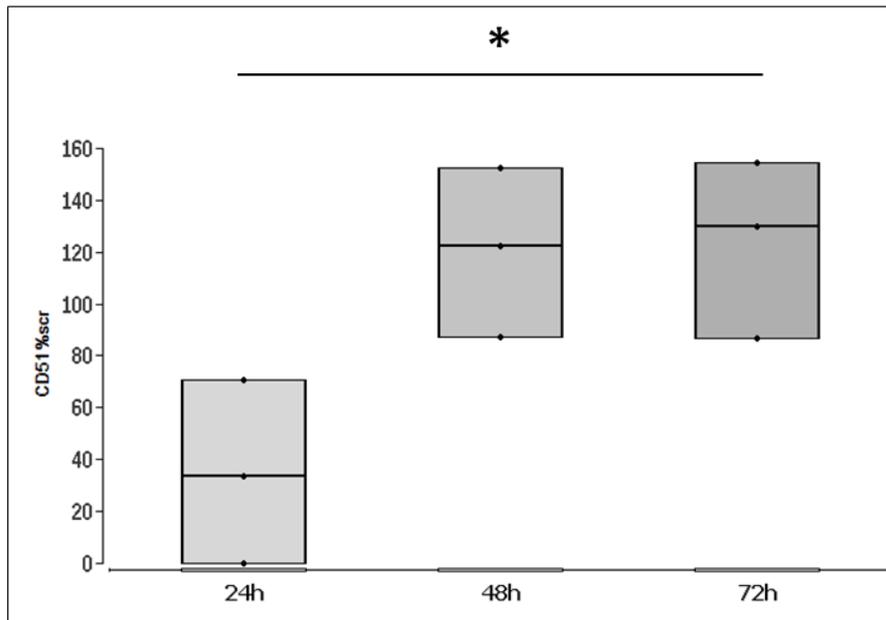


Abbildung 18: Signifikante Erhöhung der CD51-Oberflächenexpression auf antiMIR92A behandelten BMCs nach 72 h.

Auf der x-Achse ist der zeitliche Verlauf, auf der y-Achse der prozentuale Wert der CD51-Expression im Vergleich zur tagesaktuellen *Scramble*-RNA abgebildet. ( $p = 0,03$ ; korrigierter  $p$ -Wert =  $0,11$  bei  $n = 3$ )

Die Integrin alpha-V Untereinheit, auch CD51 genannt, ist ein Oberflächenprotein aus der Familie der Integrine und kann mit Integrin beta-3 (CD61) einen heterodimeren Komplex bilden. Als sogenannter *Vitronectin* Rezeptor spielt es eine wichtige Rolle bei der durch Osteoklasten vermittelten Knochenresorption sowie bei der Angiogenese.<sup>83</sup> Zusätzlich erhöht der CD51-Rezeptor auf Endothelzellen deren Wanderung, Überleben und Differenzierung.<sup>79</sup>

Der positive Einfluss von antiMIR92A auf die Oberflächenexpression des entsprechenden Rezeptors, zu dessen Bestandteilen ITGA5 gehört, konnte durch den beschriebenen Versuchsaufbau mittels Antikörper Färbung nachgewiesen werden. Durch die verstärkte CD51-Expression ist dementsprechend davon auszugehen, dass die beschriebenen Effekte potenziert werden und somit das Knochenwachstum verbessert und beschleunigt werden kann.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Validierung eines Protokolls zur Transfektion von BMCs aus der Ratte mit antiMIRen gegen MIR92A und MIR335.

Hierzu wurden Transfektionsbedingungen soweit variiert, um optimale Transfektionseffizienzen der relevanten Zellpopulationen innerhalb der BMCs zu erreichen. Darüber hinaus wurde der Einfluss der antiMIR92A und -335 auf die Konzentration der jeweiligen *Target*-miRNA sowie des Expressionsniveaus der jeweiligen mutmaßlichen *Target*-Gene - sowohl unter Kontroll- als auch unter proangiogenen und proosteogenen Bedingungen - *in vitro* analysiert. Dieser Ansatz könnte geeignet sein, erwünschte Funktionen von BMCs zu verstärken und somit die BMC-gestützte Therapie großer Knochendefekte zu verbessern.

Nach Auswertung aller Versuche und Analyse der Ergebnisse, konnten die vermuteten Effekte beider antiMIR bestätigt werden. Die Blockade der MIR92A in BMCs führte zu einer erhöhten Expression des Fibronektinrezeptors ITGA5 sowie weiterer proangiogener Faktoren, wie beispielsweise VEGF, wodurch die Angiogenese beschleunigt und verbessert werden könnte. Des Weiteren führte die Neutralisierung der MIR335 zu einer erhöhten Expression des essentiellen, osteogenen Transkriptionsfaktors RUNX2 sowie weiterer, RUNX2 kontrollierter Faktoren, wie z.B. BMP2, was sich positiv auf die Osteogenese auswirken könnte.

Die Verbesserung der Knochenbruchheilung nach großen Defekten ist seit Langem Gegenstand vieler Forschungsarbeiten, was die Wichtigkeit dieses Themas unterstreicht. Beim *Bone Tissue Engineering* wurden bereits unterschiedlichste Kombinationen von *Scaffolds* und regenerativen Zellen getestet. Um das Knochenwachstum zu stärken, kamen beispielsweise immunmodulierte Chondrozyten<sup>84</sup> oder *in vitro* expandierte Osteoblasten<sup>85</sup> zum Einsatz. Allerdings erwiesen sich Stammzellen aufgrund ihres hohen Differenzierungspotenzials zu unterschiedlichen Zelltypen als vorteilhafter gegenüber den genannten primär osteogenen Zellen. Wie bereits erläutert (siehe 1.3.2) wurden als reparativ wirkende Zellen unter anderem MSCs, EPCs

und BMCs untersucht, wobei BMCs auf einem  $\beta$ -TCP Gerüst ähnlich gute Ergebnisse wie die Kombination von MSCs und EPCs auf selbigem *Scaffold* erzielten. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass BMCs deutlich besser an  $\beta$ -TCP oder demineralisierter Knochenmatrix hafteten und so die metabolische Aktivität der Zellen im Vergleich zur Verwendung von boviner Spongiosa als Gerüststoff erhöht werden konnte.<sup>86</sup> Aufgrund dieser Forschungsergebnisse konnten BMCs auf einem  $\beta$ -TCP-Gerüst in Kombination mit winkelstabilen Platten bereits bei menschlichen Oberarmfrakturen erfolgreich zur Behandlung des Knochendefekts eingesetzt werden. Hierbei wurden am Tag vor der definitiven Frakturversorgung 50 ml Knochenmark entnommen, aus welchem die BMCs isoliert und anschließend aufgearbeitet wurden. Seebach et al. (2016) bewiesen die Sicherheit und unproblematische Durchführbarkeit sowie die Effektivität dieses Verfahrens.<sup>87</sup>

Trotz der Erfolge der letzten Jahre im Bereich des *Tissue Engineerings* stellt die geringe Überlebensfähigkeit der implantierten Zellen weiterhin eines der großen Probleme dar. Das frühzeitige Absterben der Zellen, besonders der sich im Zentrum des Implantats befindlichen, kann zu einer fehlenden Einbindung in das umliegende Gewebe bis hin zum Transplantatversagen führen. Diese Schwierigkeiten werden zu einem großen Teil auf eine geringe Einsprossung von Blutgefäßen zurückgeführt, weshalb versucht wird, die Angiogenese durch verschiedene Strategien zu fördern.<sup>88</sup> Zu den untersuchten Methoden gehören die Modifikation der chemischen Zusammensetzung und Architektur des Gerüststoffes, das Einbauen von Adjuvantien in die *Scaffolds*, beispielsweise den Wachstumsfaktor VEGF, oder die Mobilisierung von körpereigenen Stammzellen des Empfängers.<sup>89</sup> Hierzu kann SDF-1, ein chemotaktisch wirkendes Zytokin, in den Gerüststoff eingesetzt werden, was dazu führt, dass Stammzellen mobilisiert und angelockt werden, am Implantat akkumulieren und die Angiogenese verstärken.<sup>90</sup>

Zusätzlich besteht die auch bei der gegenwärtigen Arbeit untersuchte Möglichkeit, Stammzellen als regenerative Zellen beim Knochen *Tissue Engineering* einzusetzen. Schuhmann et al. (2014) konnten unter Verwendung

der Kombination aus PLGA-Gerüststoff und vorbehandelten mesenchymalen Stammzellen in einem Meniskusdefektmodell der Maus eine deutlich beschleunigte Blutgefäßeinsprossung beobachten.<sup>91</sup> Dieser Effekt wurde vermutlich vor allem durch die vermehrte Bildung von VEGF hervorgerufen.<sup>91</sup>

Weiterhin kann die Inhibierung spezieller miRNAs zur Unterstützung der Angiogenese verwendet werden.

Die MIR92A und deren Inhibierung gelangte erstmals 2009 durch die Arbeit von Bonauer et. al (2009) in den Fokus wissenschaftlichen Interesses. Im Rahmen dieser Studie konnte die Bedeutung der MIR92A als endogener Repressor der Angiogenese in endothelialen Zellen aufgezeigt werden.<sup>67</sup> Im Mausmodell führte die Suppression der MIR92A zur verbesserten Regeneration ischämischen Gewebes, was auf die erhöhte Neovaskularisation zurückgeführt wurde. Diese resultierte unter anderem aus der gesteigerten Expression der Zielgene ITGA5 und der endothelialen *NO-Synthase*. Die Integrin-Untereinheit alpha 5 ist als Oberflächenrezeptor auf Endothelzellen maßgeblich für deren Migration und Überleben verantwortlich.<sup>67</sup>

Basierend auf dieser Datenlage erforschten Murata et al. (2014) die Wirkungen von antiMIR92A am Femurdefektmodell der Maus.<sup>78</sup> Auch hier ließen die Resultate erkennen, dass die Inhibierung der MIR92A zur Förderung der Angiogenese führte, wodurch eine verbesserte Frakturheilung erzielt werden konnte. Daher wird in antiMIR92A ein großes therapeutisches Potenzial für die Optimierung der Knochenbruchheilung gesehen.<sup>78</sup>

Die Hemmung von miRNAs zu therapeutischen Zwecken rückt mehr und mehr ins Zentrum wissenschaftlicher Arbeiten und wird auch in anderen Fachbereichen detailliert untersucht. So zeigten Sharfi et al. (2013), dass die Inhibierung der MIR92A zu einer signifikanten Reduktion der Überlebensfähigkeit von Tumorzellen bei akuter promyeloischer Leukämie führte.<sup>92</sup> Hier konnte, wie auch in unseren Experimenten, nachgewiesen werden, dass der größte Effekt 72 h nach Transfektion mit antiMIR92A erzielt wurde.<sup>92</sup> Hinkel et al. (2013) dokumentierten bei der Inhibierung der MIR92A nach Herzinfarkten eine Verringerung der Infarktgröße und des postischämischen Funktionsverlustes.<sup>93</sup> Die Hemmung der MIR92A wird als

neues therapeutisches Instrument bezeichnet, welches zellprotektiv, gefäßbildungsfördernd und antientzündlich wirkt.<sup>93</sup>

Jedoch stellt die Förderung der Angiogenese laut Laschke et al. (2012) nur eine limitierte Maßnahme dar, um auch im Zentrum sehr großer Implantate den Zelltod effektiv zu verhindern und somit eine optimale Knochenbruchheilung sicherzustellen.<sup>89</sup> Das Hauptproblem liegt darin, dass die Neubildung von Gefäßen einen zeitaufwändigen Prozess darstellt, der durch die genannten Methoden nur in einem bestimmten Ausmaß beschleunigt werden kann. Eine Alternative, um dennoch eine ausreichende Blutversorgung des Implantats gewährleisten zu können, stellt die sogenannte *Inosculation* dar. Hierbei werden in den Gerüststoff vorgeformte Blutgefäße inkorporiert, welche nach Einsetzen in das Empfängergewebe durch die Verbindungen mit bereits bestehenden Gefäßen recht schnell durchblutet werden können. Trotz dieses vielversprechenden Ansatzes konnte in experimentellen Studien, vor allem in den ersten kritischen Tagen nach Implantation, die Blutversorgung nicht ausreichend sichergestellt werden. Ursache hierfür war, dass auch die *Inosculation* auf die Aktivierung angiogenetischer Prozesse angewiesen ist.<sup>89</sup> Ein möglicher Ansatz, um die in dieser Arbeit bereits erzielten Ergebnisse weiter zu verbessern, könnte daher eine Kombination aus den hier durchgeführten Behandlungsansätzen und der *Inosculation* darstellen.

Neben der MIR92A wurden auch die Funktionen und Bedeutungen der MIR335 bereits nähergehend untersucht. Es wird davon ausgegangen, dass sie gemeinsam mit weiteren miRNAs für die Regulation von *Osterix* und *RUNX2* verantwortlich ist, wodurch es zu einer Blockade der Osteoblastendifferenzierung und -funktion kommen kann.<sup>94</sup> In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von MIR335 mit einer verminderten Expression von *RUNX2* und damit einer geringeren Proliferation und Entwicklung von MSC zu osteogenen Zellen einhergeht, was in einer verschlechterten osteogenen Differenzierung resultiert.<sup>81</sup> Darauf basierte die Hypothese, dass die Suppression der MIR335 zu einer Verbesserung der Osteoblasten vermittelten Knochenbildung führt. Allerdings gibt es bis dato wenig Erfahrung mit der gezielten Inhibierung der MIR335. Die Verwendung von antiMIR335 wurde hauptsächlich im Bereich der Onkologie

untersucht, beispielsweise beim nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom<sup>95</sup> oder bei malignen Astrozytomen. Hier spielt die MIR335 vermutlich eine Rolle als Onkogen, weshalb ihre Neutralisation zu einer Verminderung von Wachstum, Einwanderung und Metastasierung der malignen Zellen führt.<sup>96</sup> Im Bereich der Knochenbruchheilung gibt es bis jetzt noch keine Arbeiten, die die Inhibierung der MIR335 untersuchten, weshalb kein direkter Literaturvergleich möglich ist.

Im ersten Teil der Versuche wurde das Prinzip der Lipotransfektion optimiert und die Transfektionseffizienz der BMCs bestimmt. Bei diesem Prozess verbindet sich ein kationisches Lipid mit der zu transfizierenden Nucleinsäure. Die hierdurch positiv geladene Zelloberfläche vereinfacht die Verschmelzung der Nucleinsäure mit der negativ geladenen Zelloberfläche der BMCs, der Transfektionskomplex wird dementsprechend mittels Endozytose in das Zellinnere aufgenommen. Im Zytoplasma angekommen erleichtern die kationischen Lipide zusätzlich das Eindringen der Nucleinsäuren in den Zellkern zur Beeinflussung der Genexpression.<sup>97</sup> Dieses Prinzip wurde in den beschriebenen Versuchen optimiert und nahezu maximal ausgeschöpft. Hierdurch wurden in Abhängigkeit der Zellsorte folgende Transfektionseffizienzen erreicht: BMC gesamt: 30 %, Monozyten: 40 %, HSC: 38 %, MSC-Vorläufer: 69 %. Bei der Beurteilung dieser Resultate ist zu beachten, dass es sich um die Transfektion einer heterogenen Zellmischung handelt. Hierbei ist es im Vergleich zu einer einzelnen Zellsorte wesentlich schwieriger die Transfektionsbedingungen den verschiedenen Eigenschaften der Zellen anzupassen und somit eine hohe Transfektionseffizienz zu erzielen. Dodds et al. (1998) erreichten bei der Transfektion der C2C12 Zelllinie von Mausmuskelzellen mit *Lipofectamin* Transfektionseffizienzen zwischen 33 % und 41 %.<sup>98</sup> Bei der Transfektion von Zellen des Zebrafisches mittels *Lipofectamin* wurden sogar nur Effizienzen von 25 % dokumentiert.<sup>99</sup> Im Vergleich zu diesen Literaturangaben liegen die von uns erzielten Ergebnisse in einem akzeptablen Bereich.

Unserer Einschätzung nach würden weitere Verbesserungen dieser Methode vermutlich nicht zu einer wesentlich erhöhten Transfektionseffizienz führen,

ohne im Gegenzug zu einer verminderten Zellviabilität zu führen. Daher könnten weitere Experimenten dazu dienen, andere Transfektionsverfahren zu erproben.

Hierbei könnte beispielsweise die **virale Transduktion** zur Anwendung kommen. Bei der Virus-vermittelten Transfektion wird mittels Genklonierung ein rekombinantes Virus hergestellt. Gängige virale Vektoren sind beispielsweise *Adenoviren*, *Retroviren* oder *Lentiviren*. Sie werden unter Verwendung einer nicht viralen Transfektionsmethode in sogenannten Verpackungszelllinien vervielfältigt und isoliert. Anschließend werden die Zielzellen mit dem viralen Vektor, welcher mit dem zu transferierenden Gen versehen ist, infiziert. Der Vorteil dieser Methode liegt in der beeindruckenden Transduktionseffizienz von 90 % - 100 % in primären Zelllinien. Jedoch birgt dieses Verfahren auch die Gefahren der immunogenen Aktivität sowie der Zelltoxizität. Außerdem ist die virale Transduktion aufgrund der vorgeschriebenen biologischen Sicherheitsvorkehrungen mit hohen Kosten verbunden.<sup>100</sup>

Einen anderen Ansatz könnte die **Elektroporation** darstellen. Bei diesem Verfahren wird ein starkes elektrisches Feld erzeugt, um die Membranpermeabilität zu erhöhen und somit DNA in Zellen einführen zu können. Die Vorteile dieser Methode liegen in einer hohen, beständigen Erfolgsrate bei der Einbringung der DNA sowie bei der Beeinflussung der Genexpression. Des Weiteren ist die Technik für fast alle Zelltypen geeignet, jedoch variiert die Transformationsfrequenz abhängig von der Zellart, dem Gewebe, dem zu exprimierenden Protein sowie der Plasmidgröße.<sup>101</sup>

Dies stellt einen interessanten Ansatz für weitere Untersuchungen dar, um die Eignung der beschriebenen Verfahren in Bezug auf die Beeinflussung von BMCs mittels antiMIR92A und antiMIR335 zu verifizieren.

Nach der Optimierung des Lipotransfektionsprozesses wurden im zweiten Teil der Experimente die spezifischen Effekte der antiMIR auf die Zielgene überprüft. Durch den Einsatz der antiMIR92A sowie der antiMIR335 konnte 24 h nach Transfektion ein signifikanter Rückgang der Expression der *Target*-miRNAs nachgewiesen werden. Weitere 48 h später, also 72 h nach Transfektion, wurde eine erhöhte Genexpression von ITGA5 sowie RUNX2

gezeigt. Die erzielten Ergebnisse waren nicht eindeutig signifikant, es konnten aber Trends in die erwartete Richtung erkannt werden.

Dies könnte unter anderem auf die hohe Variabilität der Transfektionseffizienz bei heterogenen Zellmischungen zurückzuführen sein. Wie oben bereits erläutert, gestaltet es sich daher schwierig konstante Veränderungen der Genexpression nachzuweisen. Bei einer durchschnittlichen Transfektionseffizienz von 30 % ist anzunehmen, dass die ITGA5-Expression in den transfizierten Zellen deutlich erhöht wurde, dieses Resultat aber durch die 70 % nicht transfizierter Zellen relativiert worden ist.

Zusätzlich ist die niedrige Versuchstieranzahl zu beachten. In diesem Zusammenhang sollte jedoch das im Tierschutzgesetz verankerte 3R-Prinzip erwähnt werden. Zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere sollten die drei Grundsätze *Replacement*, *Reduction* sowie *Refinement* eingehalten werden. In den hier durchgeführten Experimenten wurde daher versucht das Prinzip der *Reduction*, also die Verminderung der eingesetzten Versuchstiere, so gut wie möglich umzusetzen.<sup>102</sup> Basierend auf den Ergebnissen wäre eine Erhöhung der Tierzahl pro Versuch auf  $n = 10$  notwendig, um Signifikanzen zu berechnen, wie eine entsprechend durchgeführte Fallzahlberechnung ergeben hat.

Im Rahmen dieses Projekts wurden in unserem Forschungslabor nicht nur die *in vitro* Analysen durchgeführt, sondern auch tierexperimentell die Auswirkungen der Behandlung von Knochendefekten mit antiMIR getestet. Hierfür wurde Spendertieren Knochenmark entnommen, BMCs isoliert und die Lipotransfektion nach dem hier etablierten Protokoll durchgeführt. Anschließend wurden die bearbeiteten Zellen auf einem  $\beta$ -TCP Gerüst in einen zuvor induzierten Knochenbruch implantiert und nach 8 Wochen die Kallusbildung, die Bruchlast und die Vaskularisierung untersucht. Hierbei konnte eine signifikante Erhöhung der Bruchlast sowie eine Verbesserung der Knochenbildung in mit antiMIR335 behandelten Femurdefekten festgestellt werden. Zusätzlich konnte ein Trend zu erhöhter Vaskularisierung in der Bruchzone dokumentiert werden, wenn die transplantierten BMCs mit antiMIR92A transfiziert wurden.<sup>103</sup> Diese

Ergebnisse lassen vermuten, dass die gewünschten Effekte eventuell noch über andere Mechanismen als die Erhöhung der Genexpression von ITGA5, VEGFA, RUNX2 und BMP2 vermittelt werden und daher in den vorliegenden *in vitro* Versuchen nicht vollständig erfasst werden konnten. Die Resultate zeigen jedoch bereits zum jetzigen Zeitpunkt, dass die Inhibierung der MIR92A und MIR335 eine vielversprechende Möglichkeit bietet, das BMC gestützte Knochen *Tissue Engineering* weiter zu optimieren.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde zudem untersucht, in wie weit die Gabe von VEGFA beziehungsweise BMP2 einen zusätzlichen Nutzen birgt.

VEGFA wurde zugegeben, um die Expression von ITGA5 zu stimulieren und somit idealerweise einen besseren Effekt der MIR92A-Inhibierung festzustellen. Die BMP2-Stimulierung sollte über die erhöhte Expression von RUNX2, dem *Target-Gen* der MIR335, zu entsprechenden Erfolgen führen.

Beim Knochen *Tissue Engineering* konnte die Inkorporation von VEGF-sezernierenden Zellen in die Gerüststoffe bereits nachweislich zu einer Erhöhung der Angiogenese sowie der Ossifikation führen.<sup>104</sup> Bei den für die aktuelle Studie durchgeführten Versuchen wurde überprüft, ob die zusätzliche Gabe von VEGF zu den transfizierten Zellen die ITGA5- und VEGF-Expression verstärkt. Dies wurde angestrebt, um den Messbereich zu vergrößern, um so die Expressionsinhibierung durch antiMIR92A besser studieren zu können. Die VEGF-Konzentration wurde basierend auf früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe an sogenannten *early* EPCs gewählt, wodurch in den vorliegenden Experimenten eine Tendenz zu einer erhöhten Expression der beiden Zielgene 48 h nach Transfektion beobachtet werden konnte.<sup>105</sup> Die Befähigung von BMCs zur VEGF-Synthese wurde ebenfalls in einer früheren Arbeit nachgewiesen. Hierbei wurden zwei Tage nach Aussaat von BMCs auf diversen Gerüststoffen eine erhöhte VEGF mRNA-Synthese sowie VEGF-Sekretion festgestellt.<sup>15,86</sup> Die eigenständige Produktion von VEGF durch BMCs, wie auch die erhöhte ITGA5 Expression nach Supplementierung von VEGF spielen sich somit im gleichen zeitlichen Rahmen ab. Diese kurze Phase

erhöhter VEGF-Synthese könnte ausreichend sein, um die Angiogenese anzuregen und zu unterstützen.<sup>86</sup>

Jedoch ist zu überlegen, wie die erzielten Effekte weiter verbessert werden können. Eine mögliche Option könnte die Verwendung höherer oder niedrigerer Konzentrationen von VEGF darstellen. Wie oben erläutert wurde allerdings in den beschriebenen Versuchen auf Konzentrationen zurückgegriffen, die in der Literatur bereits signifikante Resultate erreichen konnten. Henrich et al. (2004) beobachteten durch die exogene Zufuhr von VEGF im Konzentrationsbereich von 0,1 ng/ml bis 10 ng/ml eine erhöhte Differenzierung von EPCs.<sup>105</sup> Die hier eingesetzten VEGF-Konzentrationen lagen mit 5 ng/ml somit im Mittelfeld der zuvor dokumentierten und erfolgreich angewandten Mengen.

Die Wirkung der additiven VEGF-Gabe ist von den verwendeten Zellen und den darauf exprimierten VEGF-Rezeptoren abhängig. Der vaskuläre Wachstumsfaktor A steuert die Angiogenese durch die Aktivierung der zwei Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2. Die Affinität von VEGFA zum VEGF-Rezeptor 1 ist zwar höher, der Hauptanteil des proangiogenen Signals wird allerdings über die Aktivierung des VEGF-Rezeptors 2 vermittelt. Beide Rezeptoren werden auf vaskulären Endothelzellen exprimiert, VEGFR-1 findet man zusätzlich auf Makrophagen<sup>106</sup> und Monozyten. Durch die Ligandenbindung an den VEGFR-1 auf Monozyten, wird eine Verbesserung der Migration dieser Zellen beobachtet,<sup>107</sup> jedoch nur eine geringe Optimierung der Angiogenese. Da sich unter den BMCs eine nicht unwesentliche Quote an Monozyten befindet und zusätzlich auch ein hoher Anteil der betreffenden Zellen erfolgreich transfiziert wurde, könnte dies eine Erklärung liefern, warum die ergänzende Gabe von VEGF zu keiner signifikanten Expressionssteigerung von ITGA5 und VEGFA führte.

Bei der Kultivierung mesenchymaler Stammzellen sind spezifische Stimuli nötig, wie beispielsweise *Bone morphogenic protein 2*, um die Differenzierung zu Osteoblasten anzuregen. Meinel et al. (2006) konnten nachweisen, dass die exogene Zufuhr von BMP2 zu einer erhöhten Expression von osteogenen Markern sowie zu einer Steigerung der Mineralisation führte.<sup>108</sup> Auf dieser

Datenlage basierend wurde in der gegenwärtigen Arbeit BMP2 supplementiert, um die Genexpression von RUNX2 sowie BMP2 anzuheben. Dies wurde angestrebt, um den Messbereich zu vergrößern, um so Expressionsinhibierung durch antiMIR335 besser analysieren zu können. Hierbei konnte jedoch nur eine Tendenz zu erhöhter Genexpression 48 h nach Transfektion beobachtet werden.

Ursächlich könnte die vergleichsweise niedrige Zellzahl an MSC-Vorläuferzellen in der heterogenen Zellmischung der BMCs sein. Bei der Charakterisierung von BMCs dokumentierten Henrich et al. (2015) einen Anteil von 0,06 % an CD271+ sowie CD45- Zellen.<sup>86</sup> Unter der Annahme, dass die zusätzliche Gabe von BMP2 zu einer erhöhten osteogenen Differenzierung von MSCs geführt hat, konnte der erzielte Effekt vermutlich aufgrund der geringen Anzahl der MSCs unter dem Gesamtanteil der transfizierten Zellen nicht sicher nachgewiesen werden.

Abschließend kann als Resümee dieser Studie und den weiteren Ergebnissen unseres Forschungsprojekts festgehalten werden, dass die Transfektion von BMCs mit komplementären Sequenzen gegen zelleigene miRNAs, die gegen Schlüsselkomponenten der angiogenen und osteogenen Differenzierung gerichtet sind, ein vielversprechendes neues Konzept darstellt, um das Knochen *Tissue Engineering* weiter zu verbessern. Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigten erhöhte ITGA5- sowie VEGFA Genexpressionen und eine gesteigerte CD51-Oberflächenexpression 72 h nach Transfektion mit antiMIR92A. Die zusätzliche Gabe von VEGFA während der Inkubationszeit führte nach 48 h zur erhöhten Expression von ITGA5 und VEGFA.

Abschließend konnte demonstriert werden, dass die Behandlung von BMCs mit antiMIR335 zu einer erhöhten Expression der für die osteogene Differenzierung entscheidenden Indikatoren BMP2 und RUNX2 führte.

## 5 Zusammenfassung

Bei Knochendefekten kritischer Größe gestaltet sich die selbstständige Regeneration als nahezu unmöglich, weshalb es nötig ist die Therapie zu optimieren. Die Verwendung autologer Spongiosatransplantate stellt den aktuellen Goldstandard dar, was jedoch mit einer Reihe von Komplikationen, beispielsweise Schmerzen an der Entnahmestelle oder Wundheilungsstörungen verbunden ist. Das Knochen *Tissue Engineering* repräsentiert eine aussichtsreiche Alternative. Die Kombination eines osteokonduktiven Gerüststoffes mit regenerativen Zellen, wie zum Beispiel mononukleäre Zellen des Knochenmarks (BMC), stellt einen vielversprechenden Ansatz dar. Die BMCs haben im Vergleich zu anderen verwendbaren Zelltypen, z.B. mesenchymale Stammzellen (MSCs) oder endothelialen Vorläuferzellen (EPCs), den entscheidenden Vorteil einer kurzen Aufbereitungszeit, wodurch die definitive Frakturversorgung beschleunigt wird.

Mittels Inhibierung von MicroRNAs (miRNAs) mit Einfluss auf das osteogene und angiogene Potenzial der BMCs soll dieses System weiter verbessert werden. MiRNAs umfassen eine Gruppe kurzer, nicht-codierender RNAs die an der Steuerung grundlegender biologischer Prozesse beteiligt sind. Im Rahmen dieser Studie sind die MIR92A sowie MIR335 von besonderem Interesse. MIR92A blockiert die Angiogenese durch Verringerung der Expression des pro-angiogenen Proteins Integrin alpha 5 (ITGA5, CD51) sowie durch die Aktivierung des *Notch*-Signalweges um die *Vascular endothelial growth factor* (VEGF)-induzierte Blutgefäßbildung zu reduzieren. MIR335 hemmt über die Verringerung der Proteinkonzentration des *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) die Proliferation und Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) zu osteogenen Zellen. Aufgrund der erläuterten Erkenntnisse sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob die Neutralisation von MIR92A (Vaskularisierung) und MIR335 (osteogene Differenzierung) in BMCs mittels spezifischer antiMIR zu einer weiteren Verbesserung der BMC gestützten Therapie großer Knochendefekte führt.

Im ersten Teil der Versuche wurde das Prinzip der Lipotransfektion, zur Einbringung der Antikörper gegen die miRNAs in BMCs, optimiert und die Transfektionseffizienz bestimmt. In Abhängigkeit von der Zellsorte wurden mit

30 % - 69 % ausreichend hohe Transfektionseffizienzen erzielt, um jeweils 24 h nach Transfektion einen signifikanten Rückgang der *Target*-miRNA-Konzentrationen zu erreichen.

Nachdem die Wirksamkeit der Transfektion nachgewiesen war, wurden im zweiten Teil der Experimente die spezifischen Effekte der antiMIR auf die Zielgene überprüft. Der Einsatz von antiMIR92A führte nach 72 h zu einer erhöhten Genexpression von ITGA5 sowie VEGFA, zwei für die Angiogenese entscheidende Proteine. Zusätzlich konnte mittels *FACS*-Analyse eine signifikant gesteigerte CD51-Oberflächenexpression dokumentiert werden. Bei der Verwendung von antiMIR335 konnte eine verstärkte Expression der für die osteogene Differenzierung entscheidenden Indikatoren RUNX2 und BMP2 nachgewiesen werden. Die zusätzliche Gabe von VEGFA (MIR92A) oder BMP2 (MIR335) konnte nach 48 h einen Trend zu verstärkter ITGA5 und VEGFA, beziehungsweise RUNX2 und BMP2 Expression erkennen lassen.

Zusammenfassend hat diese Studie verdeutlicht, dass die Inhibierung der MIR92A und MIR335 eine vielversprechende Möglichkeit bietet, das BMC gestützte Knochen *Tissue Engineering* weiter zu optimieren.

## 6 Summary

Regeneration of critical size bone defects without intervention is quite impossible, thus it's important to optimize the therapy. Using autologous spongiosa transplants depicts the current gold standard but is associated with various complications such as donor-site pain and impairment of wound healing. Bone Tissue Engineering represents a promising alternative. The combination of an osteoconductive scaffold with regenerative cells, for example bone marrow mononuclear cells (BMC), offers an auspicious approach. In comparison to other suitable cell types like mesenchymal stem cells (MSC) or endothelial progenitor cells (EPC), BMCs have the crucial advantage of a short preparation time, which accelerates definite fracture treatment.

Inhibition of MicroRNAs (miRNAs) with influence on osteogenic and angiogenic potential of BMCs should further improve this system. MiRNAs comprise a class of small non-coding RNAs, which are involved in numerous biological processes. The particular interest of this study lays in MIR92A as well as MIR335. MIR92A blocks angiogenesis by repressing pro-angiogenic alpha 5 integrin protein expression (ITGA5, CD51) and may also activate Notch signalling to block vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced angiogenesis. MIR335 inhibits proliferation and differentiation of humane mesenchymal stem cells (hMSCs) to osteogenic cells by reducing protein concentration of *runt-related transcription factor 2* (RUNX2). Due to the elucidated knowledge, this work should evaluate if the neutralization of MIR92A (vascularization) and MIR335 (osteogenic differentiation) in BMCs with specific antiMIRs leads to a further improvement of the BMC supported therapy of large bone defects.

The first part of the study optimized the principle of lipotransfection by improving the introduction of antibodies against miRNAs into BMCs, and defined the transfection efficiency. Depending on the cell type adequate high transfection efficiencies of 30 % - 69 % were achieved to induce a significant decline of target-miRNA-concentration 24 h after transfection.

After the experiments proofed transfection efficiency, the second part of this work evaluates the specific effects of antiMIRs on their target genes. The application of antiMIR92A led 72 h after transfection to an increased ITGA5 and VEGFA gene expression, two key proteins for angiogenesis. By means of *FACS*-analysis we could additionally document a significant enhanced surface expression of CD51. Reinforced expression of RUNX2 as well as BMP2, both pivotal indicators of osteogenic differentiation, could be proofed by using antiMIR335. The exogenous supply of VEGFA (MIR92A) or BMP2 (MIR335) indicated the trend to enhanced ITGA5 and VEGFA, respectively RUNX2 and BMP2 expression after 48 h.

In summary, this study illustrates that inhibition of MIR92A and MIR335 offers a promising opportunity for optimizing BMC supported bone tissue engineering.

## 7 References

1. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):45-54.  
doi:10.1038/nrrheum.2014.164.
2. Jauch K-W, Mutschler W, Hoffmann JN, Kanz K-G. *Chirurgie Basisweiterbildung: In 100 Schritten durch den Common Trunk.* 2. Aufl. 2013. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-23804-8>.
3. Bartl R. *Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie ; 12 Tabellen.* 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2011.  
<http://dx.doi.org/10.1055/b-001-1073>.
4. Braun W, Ruter A. Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects. *Unfallchirurg.* 1996;99(1):59-67.
5. Klaushofer K, Peterlik M. Pathophysiology of fracture healing. *Radiologe.* 1994;34(12):709-714.
6. Remedios A. Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1999;29(5):1029-44, v.
7. Lieberman JR, Friedlaender GE, eds. *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications.* Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2005.  
<http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10181771>.
8. Bucher O. *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen: Mit Berücksichtigung der Histophysiologie und der mikroskopischen Diagnostik.* Nachdr. der 10., durchges. Aufl. Bern: Huber; 1985.
9. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br.* 1978;60-B(2):150-162.
10. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011;42(6):551-555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031.
11. Willenegger H, Perren SM, Schenk R. Primary and secondary healing of bone fractures. *Chirurg.* 1971;42(6):241-252.
12. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res.* 1989;(248):283-293.

13. Jerosch J, Bader A, Uhr G. *Knochen: Curasan Taschenatlas spezial*. Stuttgart: Thieme; 2002.
14. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986;(205):299-308.
15. Seebach C, Henrich D, Schaible A, et al. Cell-based therapy by implanted human bone marrow-derived mononuclear cells improved bone healing of large bone defects in rats. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(9-10):1565-1578. doi:10.1089/ten.TEA.2014.0410.
16. Herfarth C, Hartel W. *Vielfalt und Einheit der Chirurgie Humanität und Wissenschaft: 115. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 28. April-2. Mai 1998, Berlin*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer; 1998. Langenbecks Archiv für Chirurgie, Gegründet 1860 Kongreßorgan der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie; 1998.
17. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77(6):940-956.
18. Lentrodt J, C.U. Fritzemeier and I. Bethmann. Osteoplastic reconstruction of the mandible. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir*. 1985;9(1):5-19.
19. Kohn D, Pohlemann T, Fritsch E, Kohn-Pohlemann. *Operationsatlas für die orthopädisch-unfallchirurgische Weiterbildung*. 2., überarb. und erw. Aufl. Berlin: Springer Medizin; 2014.
20. Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *Injury*. 2011;42 Suppl 2:S56-63. doi:10.1016/j.injury.2011.06.011.
21. Imhoff A, Linke R, Baumgartner R. *Checkliste Orthopädie*. 3. Aufl. s.l.: Georg Thieme Verlag KG; 2014. <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-101350>.
22. Gruskay JA, Basques BA, Bohl DD, Webb ML, Grauer JN. Short-term adverse events, length of stay, and readmission after iliac crest bone graft for spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014;39(20):1718-1724. doi:10.1097/BRS.0000000000000476.
23. Neukam FW, Wichmann M, Wiltfang J. *Zahnärztliche Implantologie unter schwierigen Umständen*. 1. Auflage. s.l.: Thieme; 2007. <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-39783>.

24. Chapman PG, Villar RN. The bacteriology of bone allografts. *J Bone Joint Surg Br.* 1992;74(3):398-399.
25. Kakaiya R, Miller WV, Gudino MD. Tissue transplant-transmitted infections. *Transfusion.* 1991;31(3):277-284.
26. Putzier M, Strube P, Funk JF, et al. Allogenic versus autologous cancellous bone in lumbar segmental spondylodesis: a randomized prospective study. *Eur Spine J.* 2009;18(5):687-695. doi:10.1007/s00586-008-0875-7.
27. Ergenc N, Buyuktimkin S, Capan G, Baktir G, Rollas S. Quinazolinones. 19. Communication 1: synthesis and evaluation of some CNS depressant properties of 3-(2-(5-aryl-1,3,4-oxadiazole-2-yl)aminoacetamido)-2-methyl-4 (3H)-quinazolinones. *Pharmazie.* 1991;46(4):290-291.
28. van der Stok J, Van Lieshout, Esther M M, El-Massoudi Y, van Kralingen GH, Patka P. Bone substitutes in the Netherlands - a systematic literature review. *Acta Biomater.* 2011;7(2):739-750. doi:10.1016/j.actbio.2010.07.035.
29. Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobnic M, Vunjak-Novakovic G. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2008;3(4):254-264.
30. Tuli SM, Singh AD. The osteoinductive property of decalcified bone matrix. An experimental study. *J Bone Joint Surg Br.* 1978;60(1):116-123.
31. Habal MB, Reddi AH. *Bone grafts & bone substitutes.* Philadelphia: Saunders; 1992.
32. Bolander ME, Balian G. The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. *J Bone Joint Surg Am.* 1986;68(8):1264-1274.
33. Scarborough NL, White EM, Hughes JV, Manrique AJ, Poser JW. Allograft safety: viral inactivation with bone demineralization. *Contemp Orthop.* 1995;31(4):257-261.
34. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84-A(3):454-464.
35. Yablon I. The effect of methylmethacrylate on fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1976;(114):358-363.

36. Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V. Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in metaphyseal defects. A histometric study. *J Bone Joint Surg Am.* 1986;68(6):904-911.
37. D. Predoi, R.A. Vatasescu-Balcan, I. Pasuk, R. Trusca, M. Costache. Calcium phosphate ceramics for biomedical applications. *Journal of optoelectronics and advanced materials.* 2008;10(8):2151-2155.  
[https://www.researchgate.net/publication/230737049\\_Calcium\\_phosphate\\_ceramics\\_for\\_biomedical\\_applications](https://www.researchgate.net/publication/230737049_Calcium_phosphate_ceramics_for_biomedical_applications).
38. Whitehouse MR, Dacombe PJ, Webb JCJ, Blom AW. Impaction grafting of the acetabulum with ceramic bone graft substitute: high survivorship in 43 patients with a mean follow-up period of 4 years. *Acta Orthop.* 2013;84(4):371-376. doi:10.3109/17453674.2013.824801.
39. Guyton GP, Miller SD. Stem cells in bone grafting: Trinity allograft with stem cells and collagen/beta-tricalcium phosphate with concentrated bone marrow aspirate. *Foot Ankle Clin.* 2010;15(4):611-619. doi:10.1016/j.fcl.2010.09.003.
40. De Long, William G Jr, Einhorn TA, Koval K, et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89(3):649-658. doi:10.2106/JBJS.F.00465.
41. Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90 Suppl 1:36-42. doi:10.2106/JBJS.G.01260.
42. Marolt D, Knezevic M, Novakovic GV. Bone tissue engineering with human stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(2):10. doi:10.1186/scrt10.
43. Walgenbach KJ, Voigt M, Riabikhin AW, et al. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anat Rec.* 2001;263(4):372-378.
44. Cao H, Kuboyama N. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering. *Bone.* 2010;46(2):386-395. doi:10.1016/j.bone.2009.09.031.
45. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature.* 2005;438(7070):937-945. doi:10.1038/nature04479.
46. Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ. Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis. *J Dent Res.* 2004;83(3):204-210.

47. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*. 2007;8:70. doi:10.1186/1471-2164-8-70.
48. Welch RD, Jones AL, Bucholz RW, et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J Bone Miner Res*. 1998;13(9):1483-1490. doi:10.1359/jbmr.1998.13.9.1483.
49. Cipitria A, Lange C, Schell H, et al. Porous scaffold architecture guides tissue formation. *J Bone Miner Res*. 2012;27(6):1275-1288. doi:10.1002/jbmr.1589.
50. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am*. 2004;86-A(7):1541-1558.
51. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
52. Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, et al. Bone regeneration and stem cells. *J Cell Mol Med*. 2011;15(4):718-746. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01224.x.
53. Harada N, Watanabe Y, Sato K, et al. Bone regeneration in a massive rat femur defect through endochondral ossification achieved with chondrogenically differentiated MSCs in a degradable scaffold. *Biomaterials*. 2014;35(27):7800-7810. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.05.052.
54. Wang Y, Han Z-B, Song Y-P, Han ZC. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. *Stem Cells Int*. 2012;2012:652034. doi:10.1155/2012/652034.
55. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng*. 2005;11(5-6):787-802. doi:10.1089/ten.2005.11.787.
56. Atesok K, Matsumoto T, Karlsson J, et al. An emerging cell-based strategy in orthopaedics: endothelial progenitor cells. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012;20(7):1366-1377. doi:10.1007/s00167-012-1940-7.
57. Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A, et al. Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J Cell Physiol*. 2008;215(1):234-242. doi:10.1002/jcp.21309.

58. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(7):1185-1189. doi:10.1161/01.ATV.0000073832.49290.B5.
59. Kuroda R, Matsumoto T, Miwa M, et al. Local transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in a patient with tibial nonunion: a case report. *Cell Transplant.* 2011;20(9):1491-1496. doi:10.3727/096368910x550189.
60. Li R, Nauth A, Li C, Qamirani E, Atesok K, Schemitsch EH. Expression of VEGF gene isoforms in a rat segmental bone defect model treated with EPCs. *J Orthop Trauma.* 2012;26(12):689-692. doi:10.1097/BOT.0b013e318266eb7e.
61. Cuende N, Rico L, Herrera C. Concise review: bone marrow mononuclear cells for the treatment of ischemic syndromes: medicinal product or cell transplantation? *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(5):403-408. doi:10.5966/sctm.2011-0064.
62. Assmus B, Tonn T, Seeger FH, et al. Red Blood Cell Contamination of the Final Cell Product Impairs the Efficacy of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Therapy. *Journal of the American College of Cardiology.* 2010;55(13):1385-1394. doi:10.1016/j.jacc.2009.10.059.
63. Schachinger V, Assmus B, Erbs S, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial. *Eur J Heart Fail.* 2009;11(10):973-979. doi:10.1093/eurjhf/hfp113.
64. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431(7006):350-355. doi:10.1038/nature02871.
65. Kloosterman WP, Plasterk RHA. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell.* 2006;11(4):441-450. doi:10.1016/j.devcel.2006.09.009.
66. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell.* 2012;148(6):1172-1187. doi:10.1016/j.cell.2012.02.005.
67. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, et al. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science.* 2009;324(5935):1710-1713. doi:10.1126/science.1174381.

68. Dong S, Yang B, Guo H, Kang F. MicroRNAs regulate osteogenesis and chondrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418(4):587-591. doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.075.
69. Laine S. *MicroRNAs as novel regulators of skeletal homeostasis*. 2013. <http://core.ac.uk/download/pdf/39955506.pdf>.
70. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004;10(12):1957-1966. doi:10.1261/rna.7135204.
71. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004;18(24):3016-3027. doi:10.1101/gad.1262504.
72. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10(2):185-191.
73. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 2001;106(1):23-34.
74. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003;115(2):209-216.
75. Bazzini AA, Lee MT, Giraldez AJ. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science*. 2012;336(6078):233-237. doi:10.1126/science.1215704.
76. Kanczler JM, Oreffo ROC. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 2008;15:100-114.
77. Ventura A, Young AG, Winslow MM, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*. 2008;132(5):875-886. doi:10.1016/j.cell.2008.02.019.
78. Murata K, Ito H, Yoshitomi H, et al. Inhibition of miR-92a enhances fracture healing via promoting angiogenesis in a model of stabilized fracture in young mice. *J Bone Miner Res*. 2014;29(2):316-326. doi:10.1002/jbmr.2040.
79. Graef T, Steidl U, Nedbal W, et al. Use of RNA interference to inhibit integrin subunit  $\alpha$ V-mediated angiogenesis. *Angiogenesis*. 2005;8(4):361-372. doi:10.1007/s10456-005-9026-5.

80. Herbert SP, Stainier DYR. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(9):551-564. doi:10.1038/nrm3176.
81. Tome M, Lopez-Romero P, Albo C, et al. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 2011;18(6):985-995. doi:10.1038/cdd.2010.167.
82. Afzal F, Pratap J, Ito K, et al. Smad function and intranuclear targeting share a Runx2 motif required for osteogenic lineage induction and BMP2 responsive transcription. *J Cell Physiol.* 2005;204(1):63-72. doi:10.1002/jcp.20258.
83. Wilder RL. Integrin alpha V beta 3 as a target for treatment of rheumatoid arthritis and related rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(suppl 2):ii96-ii99. doi:10.1136/ard.61.suppl\_2.ii96.
84. Haisch A, Wanjura F, Radke C, et al. Immunomodulation of tissue-engineered transplants: in vivo bone generation from methylprednisolone-stimulated chondrocytes. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004;261(4):216-224. doi:10.1007/s00405-003-0646-3.
85. Stangenberg L, Schaefer DJ, Buettner O, et al. Differentiation of osteoblasts in three-dimensional culture in processed cancellous bone matrix: quantitative analysis of gene expression based on real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Tissue Eng.* 2005;11(5-6):855-864. doi:10.1089/ten.2005.11.855.
86. Henrich D, Verboket R, Schaible A, et al. Characterization of bone marrow mononuclear cells on biomaterials for bone tissue engineering in vitro. *Biomed Res Int.* 2015;2015:762407. doi:10.1155/2015/762407.
87. Seebach C, Henrich D, Meier S, Nau C, Bonig H, Marzi I. Safety and feasibility of cell-based therapy of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in plate-stabilized proximal humeral fractures in humans. *J Transl Med.* 2016;14(1):314. doi:10.1186/s12967-016-1066-7.
88. Liu Y, Chan JKY, Teoh S-H. Review of vascularised bone tissue-engineering strategies with a focus on co-culture systems. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;9(2):85-105. doi:10.1002/term.1617.

89. Laschke MW, Menger MD. Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation. *Eur Surg Res.* 2012;48(2):85-92. doi:10.1159/000336876.
90. Schantz J-T, Chim H, Whiteman M. Cell guidance in tissue engineering: SDF-1 mediates site-directed homing of mesenchymal stem cells within three-dimensional polycaprolactone scaffolds. *Tissue Eng.* 2007;13(11):2615-2624. doi:10.1089/ten.2006.0438.
91. Schumann P, Lindhorst D, See C von, et al. Accelerating the early angiogenesis of tissue engineering constructs in vivo by the use of stem cells cultured in matrigel. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(6):1652-1662. doi:10.1002/jbm.a.34826.
92. Sharifi M, Salehi R, Gheisari Y, Kazemi M. Inhibition of MicroRNA miR-92a Inhibits Cell Proliferation in Human Acute Promyelocytic Leukemia. *Turk J Haematol.* 2013;30(2):157-162. doi:10.4274/Tjh.2012.0171.
93. Hinkel R, Penzkofer D, Zuhlke S, et al. Inhibition of microRNA-92a protects against ischemia/reperfusion injury in a large-animal model. *Circulation.* 2013;128(10):1066-1075. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001904.
94. Plummer J, Park M, Perodin F, Horowitz MC, Hens JR. Methionine-Restricted Diet Increases miRNAs That Can Target RUNX2 Expression and Alters Bone Structure in Young Mice. *J Cell Biochem.* 2017;118(1):31-42. doi:10.1002/jcb.25604.
95. Wang H, Liu Z, Wang Z. Effect of MicroRNA-335 on the Metastasis, Invasion and Proliferation of Cells in Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of International Translational Medicine.* 2013;1(4):210-214. <http://www.jitm.hk/EN/abstract/abstract93.shtml>.
96. Shu M, Zheng X, Wu S, et al. Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of malignant astrocytoma cells. *Mol Cancer.* 2011;10:59. doi:10.1186/1476-4598-10-59.
97. Thermo Fisher Scientific. How Cationic Lipid Mediated Transfection works. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/gene-delivery-technologies/cationic-lipid-mediated-delivery/how-cationic-lipid-mediated-transfection-works.html>. Accessed January 20, 2017.

98. Dodds E, Dunckley MG, Naujoks K, Michaelis U, Dickson G. Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER. *Gene Ther.* 1998;5(4):542-551. doi:10.1038/sj.gt.3300604.
99. Ouyang S-D, Pei Y-Y, Weng S-P, Lu L, Yu X-Q, He J-G. Effective polyethyleneimine-mediated gene transfer into zebrafish cells. *Zebrafish.* 2009;6(3):245-251. doi:10.1089/zeb.2009.0589.
100. Thermo Fisher Scientific. Viral Transfection. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/gene-delivery-technologies/viral-delivery.html>. Accessed January 22, 2017.
101. Potter H, Heller R. Transfection by Electroporation. *Curr Protoc Mol Biol.* 2003;CHAPTER:Unit-9.3. doi:10.1002/0471142727.mb0903s62.
102. Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch. 3R Prinzip. [http://www.bfr.bund.de/de/3r\\_prinzip-193970.html](http://www.bfr.bund.de/de/3r_prinzip-193970.html). Accessed January 22, 2017.
103. Maren Janko. Transfektion von mononukleären Knochenmarkzellen (BMC) mit antagoMiR-92A und antagoMiR-335 verbessert die Knochenheilung im langstreckigen Femurdefektmodell der Ratte; October 25, 2016; Messe Berlin. [www.dkou.de](http://www.dkou.de).
104. Feng L, Wu H, E L, et al. Effects of vascular endothelial growth factor 165 on bone tissue engineering. *PLOS ONE.* 2013;8(12):e82945. doi:10.1371/journal.pone.0082945.
105. Henrich D, Hahn P, Wahl M, et al. Serum derived from multiple trauma patients promotes the differentiation of endothelial progenitor cells in vitro: possible role of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor165. *Shock.* 2004;21(1):13-16. doi:10.1097/01.shk.0000101669.49265.50.
106. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer.* 2011;2(12):1097-1105. doi:10.1177/1947601911423031.
107. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth

factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996;87(8):3336-3343.

108. Meinel L, Hofmann S, Betz O, et al. Osteogenesis by human mesenchymal stem cells cultured on silk biomaterials: comparison of adenovirus mediated gene transfer and protein delivery of BMP-2. *Biomaterials*. 2006;27(28):4993-5002.  
doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.021.

## 8 Lebenslauf

### ■ Persönliche Daten

<b>Kurzprofil</b>	Medizinstudentin, 23 Jahre
Name	Julia Rachor
Anschrift	Nibelungenstraße 16, 63868 Großwallstadt
Geboren am / in	11.09.1994 / Erlenbach
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Dr. med. Mario Rachor, Facharzt für Innere und Allgemeinmedizin Sabine Rachor, geb. Giegerich, Dipl. Betriebswirtin

### ■ Schulischer Werdegang

09.2000 – 07.2004	Kardinal-Döpfner-Volksschule, Großwallstadt
09.2004 – 06.2012	Hermann-Staudinger-Gymnasium, Erlenbach
06.2012	Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,0)
07.2012	Absolvierung der Prüfung nach Art.5 des Bayerischen Eliteförderungsgesetzes (BayEFG)

### ■ Studium

10.2012 - heute	Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Studiengang: Medizin, 9. Semester
10. 2012 - 07. 2013	Deutschlandstipendium der Universität Frankfurt
08. 2014	1. Staatsexamen (Note: 2,0)
10.2014 - 07. 2015	Deutschlandstipendium der Universität Frankfurt

## ■ Praktika

02.07.2012 – 31.08.2012	Krankenhaus Erlenbach am Main Krankenpflegepraktikum
23.07.2013 - 21.08.2013	Krankenhaus Erlenbach am Main Krankenpflegepraktikum
22.09.2014 - 19.10.2014	Gemeinschaftspraxis Pfeifer/ Dr. Rachor, Kleinwallstadt, Famulatur
29.06.2015 - 14.07.2015	Krankenhaus Aschaffenburg Unfallchirurgie, Famulatur
10.08.2015 - 23.08.2015	Krankenhaus Aschaffenburg Neurologie, Famulatur
10.02.2016 - 11.03.2016	Gemeinschaftspraxis Dr. Deist/ Banaie, Köln Orthopädie, Famulatur
27.02.2017 - 27.03.2017	Cho Ray Hospital, Ho Chi Minh City, Vietnam Verbrennungschirurgie, Famulatur

## ■ Sprachkenntnisse

Englisch, Niveaustufe B2+/ C1  
(Auslandsaufenthalt)  
Französisch, Niveaustufe B1+/B2  
(Auslandsaufenthalt)

## ■ Sonstige Tätigkeiten während der Schulzeit

2016 – heute	Tutorin eines Sonographie-Kurses an der Universitätsklinik Frankfurt
1.08.2011-05.08.2011	Teilnahme am unterfränkischen Ferienseminar für besonders begabte und interessierte Schülerinnen und Schüler

Frankfurt, den 23.11.2017

---

Julia Rachor

## 9 Danksagung

Hiermit möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Ingo Marzi für die freundliche Aufnahme in sein Institut und die Überlassung des Dissertationsthemas danken.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dirk Henrich für die tatkräftige Unterstützung in jederlei Hinsicht. Seine fachlich kompetente Beratung erleichterte mir sowohl die Arbeit im Labor, als auch die Auswertung der Experimente. Mit viel Geduld bei der Beantwortung unzähliger Fragen und mit konstruktiver Kritik gab er mir immer wieder neue Motivation. Zusätzlich konnten im wöchentlichen unfallchirurgischen Forschungsseminar unter Leitung von Prof. Henrich hilfreiche Themen zusammen erarbeitet und diskutiert werden.

Desweiteren möchte ich auch meiner Betreuerin Frau Dr. Maren Janko für das stets offene Ohr, die ermutigenden Worte und die wertvollen Tipps danken.

Ein weiterer Dank geht an Frau Kerstin Konradowitz und Frau Katrin Jurida für die fachliche Einarbeitung in die Labortechniken und das Bedienen der Geräte, sowie das Bestellen der verschiedenen Antikörper und die freundliche Unterstützung.

Herrn Alexander Schaible möchte ich ganz besonders für das Präparieren der Knochen danken. Mein Dank gilt auch allen übrigen Mitarbeitern der Fachklinik und der Zentralen Forschungseinrichtung für die Aufzucht und Pflege der Tiere.

Abschließend möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden für die liebevolle Unterstützung und die hilfreichen Anmerkungen danken.

## 10 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Inhibierung der MIR92A und MIR335  
Auswirkungen auf das osteogene und angiogene Potenzial von  
mononukleären Zellen des Knochenmarks (BMC) *in vitro***

in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dirk Henrich mit Unterstützung durch Frau Dr. Maren Janko ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt, den 23.11.2017

---

Julia Rachor