

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Der Einfluss einer Calciumphosphat-Beschichtung
(BONIT®) auf das Proliferations- und
Differenzierungspotential von humanen
mesenchymalen Stromazellen in der frühen Phase
der Knochenheilung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Andy Eggert
2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Christoph Zilkens

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Timm J. Filler

Drittgutachter: Assoc. Prof. Dr. med. Philipp Funovics

Es ist gut, wenn man jemanden wählt, den man braucht.
Wie viel besser ist es, sich für jemanden zu entscheiden, den man nicht braucht?

.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Eggert A, Buhren BA, Schrumpf H, Haversath M, Ruppert M, Jäger M, Krauspe R, Zilkens C. Influence of a Calcium Phosphate Coating (BONIT®) on the Proliferation and Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stroma Cells in the Early Phase of Bone Healing. *Journal of Functional Biomaterials*. 2022; 13(4):176.

<https://doi.org/10.3390/jfb13040176>

Summary

Implants play an important role in the surgical treatment of a wide range of chronic and acute diseases and injuries. Not only the shape of implants, but also the surface finish contribute to long-term successful implantation. Bioactive surface finishes can positively influence osseointegration by stimulating the metabolism of involved cells. BONIT®, an electrochemically produced calcium phosphate (CaP) coating, has proven clinically effective. However, there are no *in vitro* studies investigating its influence at the molecular level, particularly on bone metabolism.

The aim of this work was to analyze the influence of BONIT® on the molecular and cellular effects of human mesenchymal stem cells (hMSCs). Cells from a total of ten donors were seeded separately on four different surfaces, cultured *in vitro* and their gene expression was compared using quantitative real-time polymerase chain reaction at three different time points. The proliferation behavior and differentiation potential of the hMSCs were evaluated using ten key differentiation markers.

Through the analyses, BONIT® was shown to have a probable effect on the early proliferation and differentiation behavior of hMSCs. It resulted in a defined mRNA expression pattern for the investigated factors: a tendency towards a higher expression level in the presence of coating could be observed for bone morphogenetic protein 2 (BMP2), osteopontin (OPN), osteocalcin (OC), receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). Similar or lower expression levels were found for runt-related transcription factor 2 (RUNX2), alpha-1 type I collagen (COL1A1), alkaline phosphatase (AP), osteonectin (ON), and insulin-like growth factor I (IGF1).

BONIT® was found to have a significant effect on the proliferation and differentiation behavior of human mesenchymal stromal cells. We assume that osseointegration is promoted by the calcium phosphate coating.

Zusammenfassung

Implantate spielen eine wichtige Rolle in der chirurgischen Versorgung von einer Vielzahl chronischer und akuter Erkrankungen und Verletzungen. Nicht nur die Form von Implantaten, sondern auch die Oberflächenbeschaffenheit tragen zu einer langfristig erfolgreichen Implantation bei. Bioaktive Oberflächenveredelungen können die Osseointegration positiv beeinflussen, indem der Stoffwechsel beteiligter Zellen gezielt angeregt wird. BONIT®, eine elektrochemisch hergestellte Calciumphosphat (CaP)-Beschichtung, hat sich klinisch bewährt, es gibt jedoch keine *in vitro*-Studien, die ihren Einfluss auf molekularer Ebene, insbesondere auf den Knochenstoffwechsel, untersuchen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von BONIT® auf die molekularen und zellulären Effekte von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) zu analysieren. Dazu wurden die Zellen von insgesamt zehn Spendern separat auf vier verschiedene Oberflächen ausgesät, *in vitro* kultiviert und deren Genexpression miteinander Mittels qRT-PCR zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen. Das Proliferationsverhalten und das Differenzierungspotenzial der hMSCs wurde anhand zehn wichtiger Differenzierungsmarkern beurteilt.

Durch die Analysen zeigte sich, dass BONIT® vermutlich einen Einfluss auf das frühe Proliferations- und Differenzierungsverhalten von hMSCs hat. Sie führte zu einem definierten mRNA-Expressionsmuster für die untersuchten Faktoren: eine Tendenz zu einer höheren Expressionsrate bei vorhandener Beschichtung konnte für bone morphogenetic protein 2 (BMP2), osteopontin (OPN), osteocalcin (OC), receptor Aktivator des NF- κ B-Liganden (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG). Eine ähnliche oder geringere Expressionsrate wurde für den runt-related transcription factor 2 (RUNX2), alpha-1 Typ I Kollagen (COL1A1), die alkalische Phosphatase (AP), Osteonectin (ON) und insulinähnlichen Wachstumsfaktor I (IGF1) festgestellt.

Es zeigte sich, dass BONIT® einen signifikanten Einfluss auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von humanen mesenchymalen Stromazellen hat. Wir gehen davon aus, dass die Osseointegration durch die CaP- Beschichtung gefördert wird.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AP	Alkalische Phosphatase
B	BONIT®
BGP	Bone γ-carboxylglutamic acid-containing protein
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
BrdU	Bromdesoxyuridin
CaP	Calcium Phosphat
cDNA	Complementary DNA
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL1A1	Alpha-1 type I collagen
CT	CELLTex®
DAPI	Diamidinophenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinacid
DT	DUOTex®
e.g.	For example / zum Beispiel
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESC	Endotheliale Stammzelle
EschG	Embryonenschutzgesetz
et al.	Et alii
FBS	Fetal bovine serum
g	Gramm
G1	Gap-1-Phase
G2	Gap-2-Phase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Hour / Stunde
HA	Hydroxyapatit/Hydroxylapatit

hMSC	Humane MSC
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IGF1	Insulin-like growth factor I
kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
M	Mitose-Phase
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MN	Minnesota
MO	Missouri
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MSC	Mesenchymale Stammzelle
no.	Number / Nummer
OC	Osteocalcin
ON	Osteonectin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
PCR	Polymerase chain reaction
PMMA	Polymethylmethacrylat
PSG	Penicillin/Streptomycin/L-glutamine
qRT-PCR	Quantitative real time PCR
Ra	Roughness
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
rpm	Revolutions per minute
RU	Relativ units
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
S	Synthese-Phase
SD	Standardabweichung
SEM	Standard error of the mean
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine
SZ	Stammzelle
USA	United States of America
USSCs	Unrestricted somatic stem cells

Inhaltsverzeichnis

Summary		I
Zusammenfassung		II
Abkürzungsverzeichnis		III
Inhaltsverzeichnis		V
1. Einleitung		1
1.1 Der menschliche Knochen		1
1.2 Die Zellen des Knochens und deren Funktion in der Osteogenese		3
1.3 Implantate		9
1.4 Ethikvotum		12
1.5 Ziele der Arbeit		12
2. Publiziertes Paper		
<i>Influence of a Calcium Phosphate Coating (BONIT®) on the Proliferation and Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stroma Cells in the Early Phase of Bone Healing, Eggert A, Buhren BA, Schrumpf H, Haversath M, Ruppert M, Jäger M, Krauspe R, Zilkens C.. Journal of Functional Biomaterials. 2022; 13(4):176.</i>		14
3. Diskussion		15
4. Literatur- und Quellenverzeichnis		27
5. Danksagung		

1. Einleitung

1.1 Der menschliche Knochen

Die Masse aller Knochen eines erwachsenen Menschen machen ca. fünf bis sieben kg des Körpergewichtes eines erwachsenen Menschen aus.¹ Die Anzahl der Knochen des erwachsenen menschlichen Skeletts variieren je nach angeborenen natürlichen Variationen. Die Anzahl schwankt in der Literatur zwischen 206 und 213 Knochen. Säuglinge haben sogar über 300 Knochen, bei denen einige im Wachstum miteinander verwachsen.²⁻⁴ Die gesamte skelettale Einheit erfüllt unterschiedliche lebenswichtige Funktionen. Ein Knochen ist durch seinen Aufbau elastisch und zugfest⁵, durch diese Stabilität werden viele innerer Organe vor äußeren Einflüssen geschützt. Knochen sind grundlegend mit für die Beweglichkeit (dazu zählen u.a. die Fortbewegung und das Tragen von Lasten) verantwortlich.⁶ Die meisten Knochen passen sich durch ständige Auf-, Ab- und Umbauprozesse der vorliegenden körperlichen Belastung an und besitzen die Fähigkeit sich zu regenerieren.⁷ Daher sind sie auch Speicherorgan für Mineralstoffe, ebenso spielen sie eine Rolle im Säure-Base Haushalt und bei der Blutbildung.⁶

Man kann die Knochen in unterschiedliche Kategorien einteilen: lange und kurze, sowie flache und unregelmäßige Knochen.⁷ Lange Knochen oder Röhrenknochen bestehen aus einer Diaphyse (Schaft) und den Epiphysen (Enden). Kurze Knochen finden sich in den Händen und Füßen. Flache Knochen sind beispielsweise die Schädelkalotte und die Rippen. Lassen sich die Knochen nicht den drei Formen zuordnen, gehören sie zu den unregelmäßigen Knochen.

8

Makroskopisch ist der Aufbau aller Knochen sehr ähnlich. Als Kompakta wird die feste äußere Schicht bezeichnet. Die inneren schwammartigen Strukturen werden Spongiosa genannt und stehen in direkter Verbindung mit dem Knochenmark.^{9,10} 50 % des Volumens und 70 % des Gewichts der Knochenzusammensetzung bestehen aus anorganischen Substanzen. Dabei macht eine modifizierte Form einer Kalziumphosphatverbindung (HA) neben weiteren Mineralien (Bruschit, Octocalciumphosphat) den Hauptbestandteil aus.

¹¹ Die organische Substanz macht ca. 20-40% der Masse aus und besteht aus

einer extrazellulären Matrix (ca. 90% Collagen, Osteocalcin, Sialoproteine, Proteoglykane und Osteonektin) und den zellulären Anteilen (ca. 1% der Gesamtmasse). Die restliche Masse wird durch Wasser gebildet.¹²⁻¹⁴

In der Mikroanatomie und Histologie zeigt sich, dass die Kompakta von zahlreichen Gefäßkanälchen, Havers'sche Kanälchen und Markkanälchen durchzogen wird.¹⁵ Während die außenliegenden Seiten von einer dünnen Knochenhaut (Periost) überzogen sind, sind sämtliche Kanälchen und die innenliegenden Strukturen ebenfalls mit einer dünnen Haut (Endost) ausgekleidet. Entlang des Endosts finden sich mesenchymale Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoklasten und Osteoblasten.¹⁰ Havers'sche Kanälchen bilden den zentralen Teil eines Osteons, der kleinsten funktionellen Knocheneinheit, und enthalten ein Havers-Gefäß.^{10,16} Über Volkmann-Kanäle stehen benachbarte Havers-Gefäße in Kontakt.¹⁷ Um ein Havers'sches Kanälchen sind konzentrisch und lammellenartig dünne Knochenplättchen angeordnet.¹⁸ Die ortsständigen Osteozyten sind von den Lamellen umgeben.¹⁹ Sie haben durch weitere Kanäle über Dentrizen Kontakt zum Havers-Gefäß und werden so versorgt.²⁰

Unter der Osteogenese versteht man die Knochenentwicklung. Es wird zwischen einer desmalen (direkte) und enchondralen (indirekte) Verknöcherung unterschieden.²¹ Ebenso kann man die Frakturheilung der Osteogenese zuordnen.²² Die desmale Verknöcherung beginnt in einem aus dem Mesoderm entstehenden mesenchymalem Zellverband, in dem eine hyaline Grundsubstanz, durch Einlagerung von Kollagen, gebildet wird. In dieser bilden sich Kristallisationskeime, die zur Ablagerung von Kalziumsalzen und so zur Bildung der Knochensubstanz führen. Die enchondrale Verknöcherung entsteht aus einer direkten knorpeligen Anlage.²³

Histologisch unterscheiden wir zwei Arten von Knochen: den Geflechtknochen, der Grundlage der Knochenentwicklung (Wachstums- oder Heilungsphase) ist und einen Lamellenknochen (sekundärer Knochen) der aus Umbauprozessen des Geflechtknochens entsteht.²⁴

Bei der Bildung, Heilung und bei Umbauprozessen des Knochens sind unterschiedliche Zellen beteiligt: Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und

deren Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen).²⁵ Der Osteoblast ist die knochenbildende Zelle und geht aus der mesenchymalen Stammzellen (MSC) hervor.¹⁴

1.2 Die Zellen des Knochens und deren Funktion in der Osteogenese

Bei der Heilung von Geweben spielen Stammzellen (SZ) eine wichtige Rolle. SZ sind undifferenzierte und unbegrenzt teilungsfähige Zellen, die sich wie folgend weiter einteilen lassen: bei totipotenten/omnipotenten SZ entstehen aus einer symmetrischen Teilung zwei neue SZ, deren Differenzierung weiter unbegrenzt ist. Bei pluripotenten SZ entstehen durch Teilung jeweils eine SZ und eine zur Differenzierung bestimmte Zelle (asymmetrische Teilung).^{26,27} Aus den pluripotenten SZ gehen i.d.R. multipotente SZ hervor, die wiederum in Langzeit- und Kurzzeit-SZ eingeteilt werden können und selbst Progenitorzellen (determinierte SZ) hervorbringen.²⁸ Diese besitzen nur noch beschränkte Selbstreproduktionsfähigkeit. Der Bestand ist von der Nachschaffung der Vorgängerzellen abhängig.²⁹

Bereits 1817 wurde beschrieben, dass die embryonale Entwicklung sich auf drei Keimblätter zurückführen lässt. In der dritten Woche nach Befruchtung der Eizelle entstehen insgesamt drei Keimblätter, aus denen unterschiedliche Gewebe und Organe entstehen.³⁰ Als primäre Keimblätter werden das Ektoderm und Entoderm, als sekundäres Keimblatt das Mesoderm beschrieben.³¹ Aus dem Ektoderm gehen zum Beispiel das Nervensystem und die Sinnesorgane hervor, aus dem Entoderm entwickeln sich Organeinheiten für den Stoffwechsel, und das Mesoderm bildet die Grundlage für sämtliche Bewegungsprozesse (Zirkulation, Muskulatur, Knochen, Sehnen).³²

Neben dem Differenzierungspotential können SZ auch nach ihrer Herkunft kategorisiert werden. Embryonale SZ werden direkt aus *in vitro* erzeugten Embryonen gewonnen. Dies ist ethisch eine Herausforderung und in der Bundesrepublik Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz (EschG) verboten.^{33,34} Im heranwachsenden und erwachsenen Organismus befinden

sich in mehreren Gewebetypen adulte SZ. Typische Ursprungsgewebe sind das KM, lymphatische Organe, das Fettgewebe, das Pankreas und das Epithel des Verdauungstraktes.³⁵

Für die vorliegende Arbeit sind die SZ des mesodermalen Ursprungs von Bedeutung. Es handelt sich dabei um ein Zellgemisch mit pluri-³⁶ und multipotenten SZ. Diese können in hämatopoetische (HSC), endotheliale (ESC) und mesenchymale SZ (MSC) unterschieden werden.³³ Mesenchymale SZ sind das erste Mal 1968 nachgewiesen worden.³⁷ Sie kommen hauptsächlich im KM, aber auch in geringen Mengen im Blut und Fettgewebe, sowie pränatal im Fruchtwasser, der Plazenta und in der Nabelschnur vor.^{36,38} Meist sind es inaktive ruhende Zellen, die bei Bedarf (z.B. Frakturen) mobilisiert werden.³⁸

Im KM machen MSC ca. 0,01% der dortigen Zellen aus.²⁰ Die Theorie, dass sich MSC ausschließlich in ausgereifte Zellen des mesodermalen Keimblattes differenzieren, ist wissenschaftlich nicht in Gänze geklärt.³⁶ Es wird beschrieben, dass MSC auch aus dem neuralen Ektoderm entstehen.³⁹ Ebenfalls ist strittig, welche Zellarten zu den MSC und deren Progenitorzellen zählen. Beispielsweise sind hier Perizyten zu erwähnen. Je nach Literatur sind diese den MSC direkt zuzuordnen⁴⁰ oder werden als separate Zellen mit ähnlichen Eigenschaften beschrieben.³⁶ Übersichtshalber wird in dieser Arbeit ausschließlich auf die Zellen der osteogenen Differenzierung eingegangen.

Die aus den MSC entstehenden Osteoprogenitorzellen oder auch Pre/Präosteoblasten spielen eine wesentliche Rolle in der Frakturheilung und im Wachstum⁴¹ und sind Vorläuferzellen der Osteoblasten.⁴² Im reifen Knochen liegen diese Zellen in Spindelform vor und können rasch rekrutiert werden.^{43,44} Zellen der Osteoblasten haben unterschiedliche Reifestadien (immature/mature Osteoblasten).²⁵ Osteoblasten machen 4-6% der Zellen des Knochens aus.⁴⁵ Osteoblasten haben eine sezernierende Funktion und bauen so den Knochen hauptsächlich auf. Sie haben direkten Einfluss auf die Osteoklasten,^{39,46} nicht nur über die Sezernierung von Signalmolekülen, sondern auch über Zell-Zellkontakte.^{47,48} Sie nehmen dadurch ebenfalls Einfluss auf den Knochenabbau.

Franz E. Weber und Bern Lethaus führen in einer Übersichtsarbeit auf, dass es unterschiedliche Formen reifer Osteoblasten gibt. Ist die Knochenbildung beendet, ruhen die Zellen als Belegzellen auf der Knochenoberfläche oder gehen in Apoptose. Die ruhende Form kann bei Bedarf erneut die Funktion von sekretorischen Osteoblasten übernehmen und in Kontakt mit Osteozyten stehen. Werden Osteoblasten von Knochensubstanz umgeben, differenzieren sie zu Osteozyten.^{20,49} Die Zellen sind zur Migration befähigt und können so aktiv ihr Zielgebiet erreichen.^{50,51} Aktive Osteoblasten sind 20-30µm groß, haben einen runden Zellkern und zahlreiche sekretionsaktive Organellen. Inaktive Osteoblasten sind dagegen spindelartig abgeflacht. Die der Knochenoberfläche zugewandte Seite besteht aus vielen Fortsätzen.¹⁶ Sie liegen immer den freien Oberflächen an.¹⁰ 90-95% der Osteoblasten sind im adulten Organismus inaktiv.

52

Osteozyten können als langlebige ehemalige Osteoblasten angesehen werden.²⁰ Innerhalb weniger Tage können Osteoblasten zu Osteozyten differenzieren.¹⁶ Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Knochenerneuerung.⁵³ So steuern sie die Knochenhomöostase durch Aktivierung von Osteoblasten und -klasten.⁵⁴ Sie sind der Zelltyp, der am häufigsten im Knochen vorkommt,⁵⁵ wobei ca. 40% in aktiver und ca. 55% in inaktiver Form vorliegen.⁵⁶

An dieser Stelle sind ebenfalls die für den Knochenstoffwechsel wichtigen Gegenspieler der Osteoblasten aufzuführen.⁵⁷ Diese entstehen allerdings aus der Monozyten/Makrophagen-Linie.⁵⁸ Vorstufen der Osteoklasten können miteinander verschmelzen, so dass es sich um mehrkernige große Zellen mit bis zu 60-100 Kernen handelt.^{16,59} Die Zellen sind sehr aktiv. In gleicher Zeit baut eine Zelle so viel Knochen ab, wie durch bis zu 150 Osteoblasten neu geschaffen werden kann.⁶⁰ Es wird zwischen ruhenden und aktiven Zellen unterschieden.¹⁶ Diese sind epithelähnliche Zellen mit lokal unterschiedlichen Zellmembranen, einer dem Knochen (apikale) und einer dem Gefäßstrom (basolaterale) zugewandte Membran, deren Beschaffenheit wichtig für eine ortsständige Knochenresorption ist.⁶¹

Die oben genannten Zellen haben wichtige lokale und generalisierte Funktionen im Organismus. Eine Kommunikation unter den Zellen ist dabei elementar. Dabei wird zwischen der endokrinen (Botenstoffe, die über das Blut

transportiert), parakrinen (Botenstoffe, die über Diffusion im Interzellularraum an die benachbarten Zellen übertragen werden), autokrinen (Botenstoffe, die zu einer Selbstbeeinflussung führen), synaptischen (elektrochemische Übertragung) und kontaktabhängigen (direkter Zell-Zell-Kontakt) Signalleitung unterschieden. ^{62,63} Die Zellkommunikation steuert die Aktivität der Zelle, aber auch das Bestreben zur Proliferation, Differenzierung und Apoptose. ⁶⁴ Signalmoleküle können entweder frei durch die Zellmembran diffundieren (kleine hydrophobe Moleküle) oder nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip an Rezeptoren binden (große hydrophile Moleküle) und so intrazellulär definierte Zellprogramme beeinflussen. ⁶³

Je nach Zellart und deren Aktivität werden unterschiedliche Signalmoleküle auch in Abhängigkeit der Umgebungseinflüsse transkribiert und sezerniert. ⁶⁵ Differenzierungsstufen sind durch das Vorhandensein bestimmter Marker beschrieben. ⁶⁶

Die qRT-PCR ist eine gängige Methode der Genexpressionsanalyse, um eine Ziel-DNA quantifizieren oder Boten-RNA (mRNA) und deren relative Konzentrationen (RU) zu bestimmen. ^{67–70} Signalmoleküle, die eine wichtige Rolle in der Proliferation und der Differenzierung von MSC, sowie deren nachfolgenden Zelltypen spielen ⁷¹ und in dieser Arbeit von Bedeutung sind:

RUNX2 ist für die Osteoblastendifferenzierung unersetzlich ⁷² und für die Vermehrung von Osteoprogenitoren erforderlich. ⁷³ Es ist ein Markerprotein für die osteogene Zelllinie und hat Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der MSC, Progenitorzellen und die Osteoblasten. ^{74–77} Während der Osteoblastendifferenzierung wird RUNX2 in den freien mesenchymalen Zellen nur gering gebildet, und in Präosteoblasten wird seine Expression hochreguliert. ⁷⁷

COL1A1 ist ein fibrilläres Kollagen und kommt hauptsächlich in der extrazellulären Matrix der Haut, in Sehnen, Faszien, Knochen, Bindegewebe, Gefäßen und Dentin vor. ^{78–80} Es spielt bei der Heilung von Knochen eine bedeutende Rolle ⁸¹ und wird von frühen Osteoprogenitorzellen sezerniert. ⁷⁴ In der Phase der Proliferation (durch Prä-Osteoblasten) ⁴⁹ und bei der Induktion der Differenzierung liegt es vermehrt vor. ⁶⁶ Es zeigt sich, dass COL1A1 die

Zellproliferation hemmt und die Differenzierung fördern kann. Es ist ein Marker für reife Osteoblasten.⁴⁹ COL1A1 beeinflusst die Expression von AP und ON.⁸² AP kommt hauptsächlich in der Leber und im Knochen vor,⁸³ wird bei osteoblastischer Aktivität vermehrt produziert und ist somit Marker für die Zelldifferenzierung.⁷⁴

ON ist ein Glykoprotein, das zu den nicht-kollagenen Matrixproteinen gehört.⁸⁴ Durch Bindung von Kalziumionen, HA und Kollagen ist es an der Entwicklung von Bindegewebe beteiligt und fördert die Differenzierung von Osteoblasten.^{85,86} Es verbindet die Phase, in der Kollagene gebildet werden mit der Phase der Mineralisierung.⁸⁷

IGF1 gehört zu den Wachstumsfaktoren und fördert das Knochenwachstum.^{88–90} IGF1 leitet die Differenzierung von Zellen ein und kann daher als ein früher Differenzierungsmarker interpretiert werden. Die Anzahl der IGF1-Rezeptoren nimmt während der Osteoblastendifferenzierung ab.⁹¹

BMP2 gehört zu der Familie der TGF- β -Proteine und ist ein wichtiges Zytokin, nicht nur bei der Knochenentwicklung.^{92,93} 1965 wurde es erstmals in Zusammenhang mit der Knochenentwicklung beschrieben,^{94,95} aber auch bei der Heilung ist es ein wichtiges Signalmolekül.^{96,97} Es wird vermehrt bei der Osteoblastendifferenzierung nachgewiesen^{98–101} und es fördert die Bildung von RUNX2.¹⁰²

OPN ist ein nicht-kollagenes Protein der extrazellulären Matrix^{103,104} und wird hauptsächlich von differenzierten Osteoblasten und Osteozyten gebildet.^{49,74,105} OPN kann HA binden und gilt als Promotor der Mineralisierung.^{106,107}

OC ist ein Peptidhormon und wird spezifisch von Osteoblasten oder Odontoblasten produziert.^{49,74,108} Seine Expression wird mit der Knochenbildung in Verbindung gebracht.⁶⁶ OC ist das zweithäufigste Protein der extrazellulären nicht-kollagenen Knochenmatrix.¹⁰⁹ Seine Messung erfolgt als Anhalt für den Knochenumsatz.¹¹⁰ OC hat eine hohe Bindungskapazität für HA und Kalzium und reguliert deren Kristallisation^{111,112}. Es hat hemmende Eigenschaften auf die Mineralisierung und schützt vor übermäßigem Knochenwachstum.^{113,114} Unter der Beteiligung von COL1A1 und OPN wird der Knochen stabiler ausgebildet.

RANKL ist ein Protein, das zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF) gehört.¹¹⁷ Es wird vor allem von Osteoblasten und von Osteozyten sezerniert.^{54,118} RANK (Rezeptor für RANKL) befindet sich auf der Oberfläche von Osteoklastenvorläuferzellen und reifen Osteoklasten.^{119,120} Die Bindung von RANKL ist wesentlich für die Differenzierung von Osteoklasten verantwortlich.^{120,121} RANKL kann durch eine lösliche Form von OPG gehemmt werden.¹²² OPG ist ein Zytokinrezeptor und gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptoren.^{123,124} OPG wird von Osteoblasten gebildet.¹²⁵ Es ist ein lösliches Glykoprotein, kommt ebenfalls auf der Oberfläche von Osteoklasten vor und es bindet RANKL.^{126,127} Die Differenzierung und das Überleben von Osteoklasten werden durch OPG gehemmt und die Knochenresorption gemindert.¹²⁸

Knöcherne Verletzungen können beim erwachsenen Menschen organotypisch regenerieren. Die Frakturheilung ist dabei ähnlich der Osteogenese.¹²⁹ Die für diese Knochenbildung erforderlichen Osteoblasten stammen in erster Linie aus periostalen Osteoprogenitorzellen, können aber auch aus dem KM oder dem perivaskulären Raum stammen.⁵⁰ Bei Kontakt mit einem bioniertem Material kann es zu einer Kontaktosteogenese kommen. Die lokalen und zellulären Vorgänge sind die gleichen wie bei der Frakturheilung.¹³⁰ Viele, u.a. auch die oben genannten Zellen sind an der Heilung beteiligt.¹³¹ Nach Nefussi besteht der Knochenauf- und -umbau aus drei aufeinanderfolgenden Hauptprozessen.^{132–137} Der erste Prozess wird als zelluläre Kondensation beschrieben. Es kommt dabei zu einer Ansammlung und Reifung der zellulären Masse, aus der dann der Knochen gebildet und regeneriert wird. Bei der Fraktur kommt es zunächst zur Bildung eines Hämatoms mit zellulärer Infiltration. Das Einsprießen von Kapillaren ist wichtiger Bestandteil der Heilungsphase.¹³⁸ Bei Implantaten sorgen poröse Beschichtungen für eine bessere Bindung von Wachstumsfaktoren und Proteinen, die im Blut vorhanden sind. An diesen können auch Zellen anhaften.¹³⁰ Im zweiten Prozess werden Signalmoleküle aktiviert, und es findet eine u.a. zellgesteuerte Regulation von Genen statt, die die Differenzierung der Zellen fördert. Zuletzt folgt die Aktivierung der Gene für die Matrixbildung und deren Mineralisation. Beschichtungen von Implantaten

orientieren sich an der biogenen Mineralisation und bilden so gute Anhaftspunkte.¹³⁰

1.3 Implantate

Seitdem der Berliner Chirurg Themistocles Gluck 1890 ein künstliches Kniegelenk aus Elfenbein und Nickelstahl implantierte, entwickelte sich die Endoprothetik, ein wichtiger Bestandteil der heutigen Medizin.¹³⁹ Systematische Erfolge sind ab den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts zu verzeichnen.¹⁴⁰

Zunehmend wurden zunächst Materialien mit ausreichend langlebiger Stabilität entwickelt. Ausgehend von einem korrosionsbeständigem und eisenfreiem U-Boot-Stahl (1938) wurden diverse Legierungen, u.a. eine Kobalt-Chrom-Molybdän Legierung (1948) entwickelt. Eine form- und bruchstabile Legierung ist die Titanschmiedelegerung.¹⁴⁰ Das Material der Implantate muss bruchfest und über einen langen Zeitraum biokompatibel sein.¹⁴¹ Heutzutage müssen alle gängigen Implantatsysteme aus biokompatiblen Material gefertigt sein.¹⁴²

Der chirurgische Erfolg wird vor allem bei einer stetig steigenden Fallzahl an degenerativen Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems immer wichtiger.^{143,144}

Hauptursache für eine Revision eines Implantates ist bei ca. 75% die aseptische Lockerung. Weitere Ursachen liegen in Wundinfektionen, Dislokationen, Frakturen und technischem Versagen. Ermüdungsbrüche sind seit den 1960er Jahren Dank stabiler Materialien in diesem Vergleich die seltenste Komplikation.^{140,145} Daher liegt ein Schwerpunkt bei der Verbesserung der Versorgung in der Stabilisierung des Implantates. Die Implantationstechnik ist Grundlage für eine gute Einheilung des Implantats im Knochen.¹⁴⁶ Die optimale Fixation von Implantaten (Kleben, Pressen, Schrauben) wird als eine der Voraussetzungen für eine dauerhaft Stabilität von Implantaten angesehen.¹⁴⁷

1953 wurde erstmalig durch Haboush ein bioaktiver Kunststoff (Polymethylmethacrylat (PMMA)) zur Fixierung eines Implantates eingesetzt.¹⁴⁵ PMMA wird auch als Knochenzement bezeichnet. Der periimplantären Spalt

kann so überbrückt werden, und es kommt so zu einer stabilen mechanischen Fixierung.^{148,149}

Eine durchgehende Verbindung zwischen Implantat und Knochen führt zu einer Kraftverteilung über die gesamte Prothese. Die Stabilität wird hier durch Mikroverzahnungen erreicht.¹⁵⁰ Eine zementierte Fixierung wird eher bei älteren Patienten (>60 Jahre), eine zementfreie Fixierung bei jüngeren Patienten bevorzugt.¹⁵¹ Generell werden die zwei Varianten kontrovers diskutiert. Der Zement sorgt zwar für eine höhere Primärstabilität, eine bessere Osseointegration findet aber bei zementfreier Technik statt.¹⁵² Die Langzeitstabilität ist bei zementierten Implantaten geringer.¹⁵³ Außerhalb der Coronapandemie steigt die durchschnittliche Lebenserwartung stetig an.¹⁵⁴ Daher ist das Verfahren zur Einbringung von Implantaten auch eine individuelle Abwägung, die abhängig von der Langzeitstabilität mit dem Patienten zusammen getroffen werden sollte.

Zementfreie Techniken setzen voraus, dass eine primäre stabile Situation geschaffen werden kann. Ohne eine mechanisch stabile Situation wird ein Implantat nicht einwachsen (Sekundärstabilität) können.^{155,156}

Neben der chirurgischen Verankerung und dem Implantatmaterial, ist deren Oberflächenbeschaffenheit für ein gutes Einwachsverhalten des Knochens mitverantwortlich.^{157,158} Bionierte Metalle wie z.B. Titan werden nicht als körperfremd angesehen, und es entsteht eine Verbindung zwischen Metall und Knochen (Kontaktosteogenese).¹⁴²

Um den Verbund zwischen Knochen und Implantat zu verbessern, wurden bioaktive Beschichtungen entwickelt. Diese sind Bindeglied zwischen Grundmaterial und Knochengewebe.¹⁵⁵ Eine Beschichtung, die seit 1970 verwendet wird und die wissenschaftlich gut untersucht wurde, ist Hydroxylapatit, eine CaP-Keramik.^{141,159}

Aufgrund der Bestandteile und Zusammensetzung der Kalziumphosphate, die im Knochen selbst vorkommen, zeigen diese Beschichtungen eine ideale Biokompatibilität.¹⁶⁰ Darüber hinaus werden u.a. auch andere CaP-Keramiken, Oxidkeramiken und Glaskeramiken für die Oberflächenveredelung von Werkstoffen auf Titan- oder Edelstahlbasis verwendet.^{141,161,162} Generell werden Keramiken, die als Ersatz oder zur Unterstützung des Gewebewiederaufbaus verwendet werden, als Biokeramik bezeichnet. Diese

können nach Hench mit unterschiedlichen Eigenschaften versehen sein und lassen sich einteilen in bioinert (Aluminiumoxid, Zirkoniumdioxid), resorbierbar (Tricalciumphosphat), bioaktiv (Hydroxylapatit, bioaktive Gläser und Glaskeramik) oder porös (mit Hydroxylapatit beschichtete Metalle, Aluminiumoxid).¹⁶³ CaP-Beschichtungen können in unterschiedlicher Weise auf Implantate aufgebracht werden. Gängige Verfahren sind Plasmaspritz- und -sprühverfahren, elektrophoretische Abscheideverfahren, Sol-Gel-Abscheideverfahren, Laserabscheidungen, Abscheiden durch Zerstäuben (Sputtern) und elektrochemische Verfahren.¹⁶⁴ Durch die unterschiedlichen Verfahren entstehen auch diverse Oberflächenstrukturen. Es ist bekannt, dass Strukturen im Mikro-, Nano- und Subnanomaßstab einen starken Einfluss auf die im Knochen anhaftenden Zellen haben, insbesondere in der Frühphase.¹⁶⁵

Jüngere Behandlungsansätze aus dem Bereich des Tissue engineering u.a. auch für degenerative Erkrankungen befassen sich mit dem Ansatz, SZ auf Trägermaterialien zu züchten. In den letzten 35 Jahren wurden jährlich neue Erfolge erzielt.^{166,167} SZ werden bereits klinisch zur stammzellbasierten Knochenregeneration erfolgreich eingesetzt.¹⁶⁸ Die Entwicklung von komplexen Knochenstrukturen ist durch die Kombination aus biomimetischen CaP-Gerüsten, MSC und Wachstumsfaktoren (z.B. BMP2) vielversprechend.¹⁶⁹ 3D-Druckverfahren ermöglichen bereits komplexere Gerüststrukturen.¹⁷¹ Trotz der Erfolge ist die Endoprothetik weiter ein wichtiger Behandlungsschwerpunkt. Es ist davon auszugehen, dass Forschungsergebnisse in beiden Bereichen sich positiv aufeinander auswirken können.

Die hier untersuchte CaP-Beschichtung (BONIT® (B)) ist ein Medizinprodukt und wird seit 1995 zur Oberflächenveredelung von diversen Implantaten durch die DOT GmbH hergestellt.¹⁷² Eine dünne CaP-Schicht (Schichtdicke $20 \pm 10 \mu\text{m}$) wird hierbei durch ein elektrochemisches Abscheidungsverfahren aufgebracht.¹⁷³ Sie ist ein Komposit aus Brushit und HA mit einem Calcium zu Phosphat Verhältnis von $1,1 \pm 0,1$.^{174,175} Brushit wird schnell resorbiert, HA langsam über einen Zeitraum von 6 Wochen.¹⁷³ Hentschel weist in seiner Arbeit eine Oberflächenrauigkeit (Ra) für B von $1,23 \mu\text{m}$ nach.¹⁷⁶ Zahlreiche Testungen (Physikalische Versuche und im Tiermodell) zeigen Vorteile

gegenüber einer HA-Beschichtung, ebenfalls hat sich die Beschichtung klinisch bei mehr als 4,7 Millionen Implantaten bewährt.⁷¹ Es gibt allerdings keine Studien, die den Einfluss dieser elektrochemischen Abscheidung auf das zelluläre Verhalten auf molekularer Ebene untersuchten.

1.4 Ethikvotum

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der institutionellen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Protokollcode 5401, Datum der Genehmigung 04.03.2016).

1.5 Ziele der Arbeit

Das muskuloskelettale System übernimmt bei Säugetieren und dem Menschen unterschiedliche wichtige Funktionen. Unter anderem schützt es durch seine Stabilität lebenswichtige Organe und ermöglicht über Gelenke und gelenkähnliche Verbindungen ein hohes Ausmaß an Bewegung, sowie das Tragen von Lasten. Akute und chronische Erkrankungen, der bei Bewegung beteiligten Strukturen führen häufig zu Schmerzen, Funktionseinschränkungen und verhindern dadurch die Teilhabe am sozialen Leben. Vor allem degenerative Veränderungen der Knorpel- und Knochensubstanz haben bei einer immer älter werdenden Gesellschaft größte Bedeutung. Die Anzahl der Patienten hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten verdoppelt und deren operative Versorgung mittels künstlichem Gelenkersatz ist weltweit führend und dadurch eine finanzielle Belastung für die Gesundheitssysteme. Um den operativen Erfolg zu verbessern und die Revisionshäufigkeit zu reduzieren, sind nicht nur die Form, sondern auch die Oberflächenbeschaffenheit der verwendeten Implantate, sowie das operative Vorgehen stetig weiterentwickelt worden. Bioaktive Oberflächenveredelungen sollen direkten Einfluss auf die Knochensubstanz und deren Zellen nehmen und den Implantationserfolg durch eine bessere Osseointegration fördern. Bei der Einheilung von Implantaten spielen diverse Zellen eine wichtige Rolle. SZ sind eine wichtige Ressource für den Organismus, um Gewebeschäden heilen zu können.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer CaP-Beschichtung (BONIT®) auf die molekularen und zellulären Effekte von hMSCs zu analysieren. Dafür wurden hMSCs von insgesamt zehn unterschiedliche Zellspendern *in vitro* gezüchtet und mittels qRT-PCR auf insgesamt zehn wichtige Proliferations- und Differenzierungsmarker zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht.

2. Publiziertes Paper



Article

Influence of a Calcium Phosphate Coating (BONIT[®]) on the Proliferation and Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stroma Cells in the Early Phase of Bone Healing

Andy Eggert ^{1,*}, Bettina Alexandra Bühren ¹, Holger Schrumpf ¹, Marcel Haversath ², Martin Ruppert ¹, Marcus Jäger ^{3,4}, Rüdiger Krauspe ¹ and Christoph Zilkens ¹

¹ Clinic for Orthopaedic Surgery, Heinrich-Heine-University, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf, Germany

² Department of Arthroscopy and Endoprosthesis, Krankenhaus Nettetal GmbH, Sassenfelder Kirchweg 1, 41334 Nettetal, Germany

³ Clinic for Orthopaedic Surgery, St. Marien-Hospital Mülheim an der Ruhr, Kaiserstraße 50, 45468 Mülheim an der Ruhr, Germany

⁴ Orthopaedics, Trauma and Reconstructive Surgery, University of Duisburg-Essen, Forsthausweg 2, 47057 Duisburg, Germany

* Correspondence: andy.eggert@uni-duesseldorf.de

Abstract: When implanting osteosynthetic materials or orthopedic implants, the surface condition plays a decisive role for mid- to long-term osseointegration. BONIT[®], an electrochemically produced calcium phosphate (CaP) coating, has been used in the surface refinement of implants since 1995. More than 3.5 million coated implants have been successfully placed so far. BONIT[®] has thus been able to demonstrate clinical success. However, due to its surface properties and solubility, and the resulting difficulty in culturing cells, there are no in vitro studies investigating its influence at the molecular level, particularly on bone metabolism. In a first step, the cells from a total of ten donors were seeded separately on four different surfaces: 1. a pure corundum-blasted titanium surface (CELLTex[®], CT), 2. CT with additional BONIT[®] coating (CT + B), 3. a hydroxyapatite-blasted titanium surface (DUOTex[®], DT), 4. DT with additional BONIT[®] coating (DT + B). In a second step, the cells were grown for 48 h. The proliferation behavior and differentiation potential of hMSCs were investigated at three consecutive time points (12 h, 24 h and 48 h) by quantifying the mRNA expression of ten important differentiation markers using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). We were able to show that BONIT[®] has an influence on the early proliferation and differentiation behavior of hMSCs in patients of all age groups. The additional BONIT[®] coating on CELLTex[®] or DUOTex[®] led to a defined mRNA expression pattern for the investigated factors: a tendency towards a higher expression rate with coating present could be found for bone morphogenetic protein 2 (BMP2), osteopontin (OPN), osteocalcin (OC), receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). A similar or lower expression rate was detected for runt-related transcription factor 2 (RUNX2), alpha-1 type I collagen (COL1A1), alkaline phosphatase (AP), osteonectin (ON) and insulin-like growth factor I (IGF1). We have developed a new method that allows the cultivation of human mesenchymal stromal cells (hMSCs) on the soluble coating BONIT[®] for gene expression analysis. BONIT[®] has a significant influence on the proliferation and differentiation behavior of human mesenchymal stroma cells. This study describes a defined gene expression pattern of bone metabolism that may help to understand the influence of this CaP coating on the early phase of implant osseointegration.

Keywords: calcium phosphate; osseointegration; stem cells; bone metabolism; gene expression; orthopedic implants; surface



Citation: Eggert, A.; Bühren, B.A.; Schrumpf, H.; Haversath, M.; Ruppert, M.; Jäger, M.; Krauspe, R.; Zilkens, C. Influence of a Calcium Phosphate Coating (BONIT[®]) on the Proliferation and Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stroma Cells in the Early Phase of Bone Healing. *J. Funct. Biomater.* **2022**, *13*, 176. <https://doi.org/10.3390/jfb13040176>

Academic Editor: Chunming Wang

Received: 11 September 2022

Accepted: 25 September 2022

Published: 6 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Artificial joint replacement is a globally successful procedure for the treatment of degenerative joint diseases. The World Health Organization estimates that the number

of bone and joint diseases has doubled in the last 20 years and degenerative diseases are the global leader in this field [1,2]. Diseases of the musculoskeletal system are not only debilitating with regard to physical complaints, such as pain or functional restrictions; they also prevent participation in social life and are an increasing financial burden for the health care system [3–6]. The clinically successful procedure of artificial joint replacement restores the mobility of the joints and relieves the pain of the affected patients.

However, the survival rate of joint replacement is limited and the main causes for implant failure are still septic and aseptic loosening. The failure rate increases with time after primary surgery. Therefore, younger patients are at higher risk of undergoing revision of the implant based on their life expectancy alone [1,2]. The replacement of an implant is associated with additional pain and risks and may result in a reduction in quality of life. If the revision frequency can be reduced by 1%, costs of more than 430 million euros could be saved [7].

To overcome the limitation in durability, much effort has been directed toward material improvement in recent decades through the avoidance of wear or enhancement of the capability of osseointegration. Of course, the implantation technique forms the basis for good healing of the implant in the bone [7].

In cementless fixation of implants, a strong bond (press fit) between the bone and the implant is very important to promote stability through bone growth [8,9]. Different materials are used for manufacturing of prosthesis in order to fulfil this requirement [10,11]. The material of the implants must be fracture-resistant and biocompatible over a long period of time [12]. While the special shapes and materials of prostheses have proven their worth and have been well investigated, more and more work is being undertaken on surface structures that could enable faster and better bone ingrowth [13,14]. Hydroxyapatite, a calcium phosphate ceramic, has been one of the most common and best-analyzed surface coatings since 1970 [12,15]. Calcium phosphates have ideal biocompatibility due to their composition [16]. In addition, other calcium phosphate ceramics, oxide ceramics and glass ceramics are also used in the surface refinement of titanium or stainless steel-based materials [12,17,18].

A widely used process for the production of hydroxyapatite coatings is the plasma-spraying process [12]. Even if better osseointegration takes place under plasma-sprayed hydroxyapatite coatings [9,19], there are several disadvantages resulting from the extended manufacturing process. One example is the decomposition of hydroxyapatite (HA) by thermal treatment due to the catalytic effect of the base material. Robert B. Heimann assumes that this decomposition takes place up to the surface of the coating, resulting in poorer resistance [20].

BONIT[®] is a calcium phosphate (CaP) coating developed by the company DOT GmbH that has been used since 1995 in the surface refinement of implants [21]. The BONIT[®] coating involves the electrochemical deposition of a thin, bioactive calcium phosphate layer [22]. To date, more than 3.5 million implants have been implanted in patients of different ages with BONIT[®] [21]. As part of the approval process for medical devices, numerous physical tests and animal experiments have been carried out with BONIT[®] coatings. These tests have shown advantages over the conventional hydroxyapatite coating with regard to the capacity for osseointegration [22–30]. Furthermore, BONIT[®] has proven clinical efficiency [31,32]. Currently, there are no in vitro studies that have successfully investigated the influence of BONIT[®] at the molecular level, particularly at the level of gene expression of bone metabolism in the early phase of bone healing. Up to now, the cultivation of cells has only been possible to a limited extent. An in vitro study described how osteoblast cells applied to BONIT[®] are covered by a precipitate within 48 h [33]. Another in vitro study showed that proliferation of BONIT[®] does not occur during the first weeks. Hentschel investigated the proliferative impact of unrestricted somatic stem cells (USSCs) in relation to the surface roughness and chemical properties of BONIT[®] on cell proliferation [34]. There is still a gap in research on the in vitro behavior of cells seeded on this coating. Based on the present results, we developed a new technique for seeding and

growing hMSCs in vitro on test specimens and focused on the relative mRNA expression of their key differentiation markers in the early phase of bone healing.

2. Material and Methods

The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of Heinrich Heine University Düsseldorf in accordance with the Helsinki Declaration (Project identification code: 5401). Written informed consent to participate in this study was obtained from all patients prior to surgery. During elective surgery, bone marrow was removed from the femoral (five female and five male cell donors; average age was 45.89 years ($SD \pm 26.51$ years)).

Four different surface refinements were tested (all from DOT GmbH, 18059 Rostock, Germany): 1. CELLTex[®] (CT), a pure titanium surface generated through a corundum particle-blasting process and acid etching (roughness $3.0 \pm 1.5 \mu\text{m}$); 2. CELLTex[®] with additional BONIT[®] CaP-layer (CT + B); 3. DUOTex[®] (DT), a hydroxyapatite (HA)-blasted and double acid-etched subtractive surface (roughness $1.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$); and 4. DUOTex[®] with additional BONIT[®] CaP-layer (DT + B). BONIT has a layer thickness of $20 \pm 10 \mu\text{m}$. The rounded sample plates had dimensions of 11.5 mm in diameter and 2 mm in thickness (Figure 1). The total surface of each sample was 6.23 cm^2 .

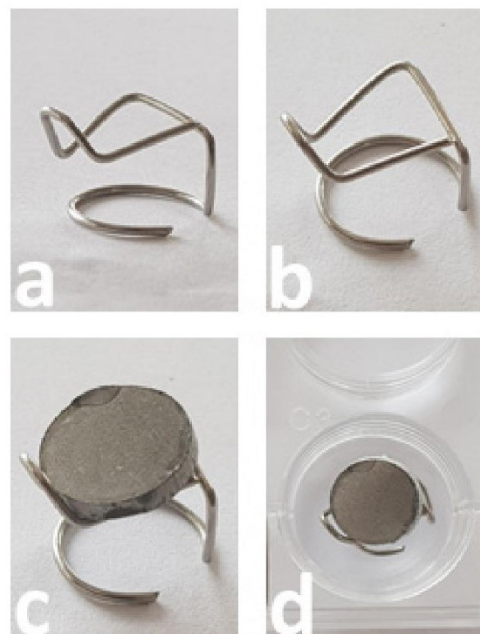


Figure 1. (a–d) Incubation aids bent from stainless steel wire (thickness 0.8 mm) and specially adapted to the sample plates. (a,b) The frame without plates. (c,d) The platelet (surface to be examined aligned to the ground) on the frame; the frame is located in a corrugated plate of 12 mm in diameter (d).

Cell isolation: We did not use a defined cell line. The source of our mesenchymal stem cells (hMSC) was a mixture of spongiosa and bone marrow. This individual mixture from each patient was used for the following cell separation and seeding procedure with all of the four different sample plates.

The mononuclear bone marrow cells were separated by density gradient centrifugation (Biocoll 1077 g/mL, Biochrom GmbH, Berlin, Germany) and converted to DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 20% fetal bovine serum (FBS, FBS Superior, Biochrom GmbH) and 1% penicillin/streptomycin/L-glutamine (PSG, Sigma-Aldrich) in a humid atmosphere at 37 °C and 5% CO₂ in tissue culture bottles (CELLSTAR®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). Non-adherent cells were removed after five days. The procedure fulfilled the first property of the minimal criteria to define hMSCs according to Dominici et al. [35]. Further characterization of the cells did not take place in this study. However, we refer to the successful use of this technique by our laboratory [36]. A medium change was performed alternately every three to four days. The cells were passed weekly using trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (trypsin-EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), re-sown and incubated at a density of 5000 cells per cm². All hMSC donor cells were counted in passage two and placed in a cryotube (CRYO.STM, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) into freezing medium (fetal bovine serum) with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and preserved in liquid nitrogen (MVE Cryosystem 4000, MVE Inc., 3505 Country Road, 42 W-Burnsville, MN 55306, USA).

Experimental setup: In this study, each surface group (1–4) was tested twice with the cells of every single patient. The investigated kinetic points were determined at 12, 24 and 48 h. A total of 75,000 donor cells were applied per test plate. The passage two cells were removed from the cryopreservation, defrosted and transferred into 50 mL fresh DMEM medium with 20% FBS and 1% penicillin/streptomycin/L-glutamine. The cells were centrifuged at 1800 rpm at room temperature for five minutes. The supernatant was decanted and discarded. The cell pellet was resuspended with 1 mL medium. The cell count was carried out using a Neubauer counting chamber. The sample plates were transferred sterile into the medium wells of a 24-well plate. The surfaces to be tested were aligned skyward. The outer corrugated chambers were filled with 1 mL medium to achieve sufficient humidity in the corrugated chambers and to compensate for temperature fluctuations. A total of 80 µL medium containing 75,000 cells was applied as a standing drop to the sample plates. The corrugated sheets were incubated for 90 min at 37 °C and 5% CO₂. We equipped eight wells of a 12-well plate with an incubation aid made of stainless steel wire (Figure 1) and flooded the wells with 4300 µL medium. The specimens were removed from the chambers of the 24-well plate with sterile forceps. The standing drop was poured off. The plates were turned while floating by 180° and placed on the incubation aid.

The surface to be tested with the adherent cells pointed towards the bottom of the corrugated plate and was laid completely in the medium. This was followed by incubation at 37 °C and 5% CO₂. The cells were incubated for a further 10.5 h (±0.5 h) for the 12 h kinetic point, 22.5 h (±0.5 h) for the 24 h kinetic point and 46.5 h (±0.5 h) for the 48 h kinetic point. The sample plates were removed from the incubation aid with sterile forceps, turned 180° and washed once in phosphate-buffered salt solution (PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After washing, the cells were taken up in 360 µL RLT buffer (Qiagen, Hilden, Germany) with 10 µL/mL 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and frozen at −80 °C. The cells were then stored in a freezer. Figure 2 shows the schematic sequence of the test series.

Quantitative real-time PCR: The mRNA of the ten donors was isolated according to a standardized procedure. The RNeasy Mini-Kit 250 and the RNase-free DNase set (both Qiagen, Hilden, Germany) were used for isolation. This was followed by a standardized transcription of the mRNA into cDNA. For this research, the QuantiTect® Reverse Transcription Kit from Qiagen was used for the synthesis of cDNA according to the instruction for use.

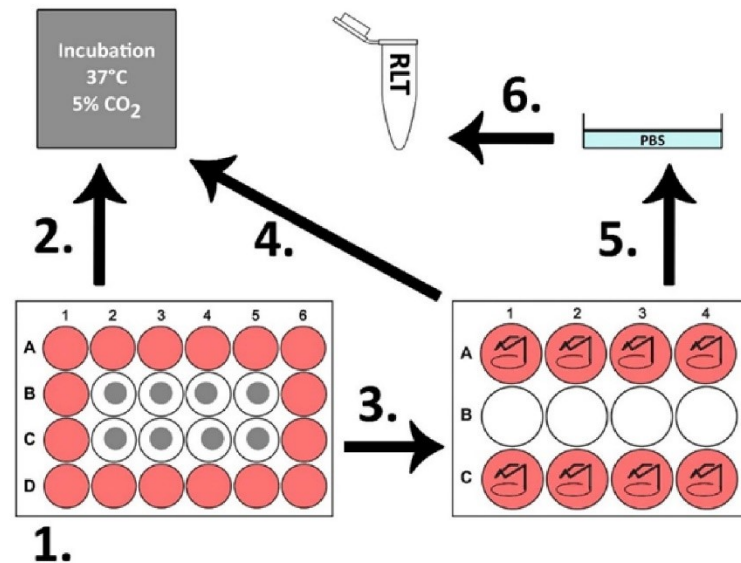


Figure 2. Schematic diagram of the experimental setup of the BONIT[®] study. Step 1 = application of the cells to the sample platelets; 2 = incubation for 90 min; 3 = transfer of the sample platelets to the incubation aid; 4 = incubation for 10.5 h, 22.5 h and 46.5 h; 5 = washing of the sample platelets in PBS; 6 = Dissolution of the cells and conservation in RLT buffer, then storage at -80°C .

Furthermore, a StepOne real-time PCR system (StepOne[™], software version 2.2.2) with SYBR[™] Green Master Mix (both from Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used for qRT-PCR. Gene expression analysis was performed after the addition of primers from Qiagen or Biolegio (Nijmegen, the Netherlands). Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) served as a reference control. The relative gene expression levels of bone morphogenetic protein-2 (BMP2), runt-related transcription factor 2 (RUNX2), alpha-1 type I collagen (COL1A1), alkaline phosphatase (AP), osteopontin (OPN), osteonectin/secreted protein acidic and rich in cysteine (ON), osteocalcin/bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein (OC), insulin-like growth factor 1 (IGF1), receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [37].

Statistical evaluation: The results were recorded and the relative units calculated using Excel Office 365 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). The statistical evaluation was carried out with GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

CELLTex[®] (CT) was compared with CELLTex[®] + BONIT[®] (CT + B) and DUOTex[®] (DT) with DUOTex[®] + BONIT[®] (CT + B), respectively. A Mann–Whitney U test was performed to compare the relative units (RU). A paired parametric *t*-test was performed to analyze the temporal course of gene expression on a coating. The following levels of significance were assigned to the figures: * $p \leq 0.05$ (significance), ** $p \leq 0.01$ (high significance) and *** $p \leq 0.001$ (very high significance).

3. Results

3.1. Genes with a Tendency for Decreased or Similar Expression with BONIT[®]

RUNX2: This key transcription factor associated with osteoblast differentiation could be detected at all kinetic time points and on all four surface structures. After 12 h of

incubation, the additional BONIT[®] CaP-Layer led to a significant reduction of RUNX2 expression compared to the non-refined CT or DT surfaces ($p \leq 0.05$; Figure 3a). This initially lower expression nearly and considerably approached the values of the CaP-untreated surfaces up to 48 h, with no more significant differences between 24 h and 48 h. The expression on both BONIT[®] surfaces increased significantly over time, while on the CaP-untreated surfaces (CT and DT) there was a relatively significant decrease from 12 h to 24 h ($p \leq 0.05$ for CT; $p \leq 0.01$ for DT) and then a slight increase again up to 48 h.

COL1A1: Expression of the protein-coding gene COL1A1 was found on all specimens. After 12 h of incubation, no significant differences in expression could be found when comparing the four different surfaces. However, after 24 h and 48 h, BONIT[®] resulted in a partially significant difference in terms of a lower expression rate compared to the untreated surfaces (CT vs. CT + B at 24 h, $p \leq 0.05$, and at 48 h, $p \leq 0.01$; DT vs. DT + B at 48 h, $p \leq 0.05$). The expression patterns over time on each surface showed relative increases of COL1A1, which were more evident for the non-layered CT and DT surfaces (Figure 3b).

AP: Alkaline phosphatase is a reliable marker for bone metabolism as it dephosphorylates compounds. The expression of the AP gene did not differ significantly after 12 h when comparing the four surfaces. However, between 12 and 24 h incubation time, a (highly) significant difference was found between the surfaces: with BONIT[®], the expression of AP was significantly lower than with the non-layered samples, and this applied to CT vs. CT + B, as well as DT vs. DT + B, respectively (after 48 h, $p \leq 0.01$). Comparing the expression of the gene over time, almost all surfaces showed a peak after 24 h, followed by a drop after 48 h (Figure 3c). The expression tended to be significantly higher with the untreated surfaces, as already described above.

ON: Osteonectin, also known as secreted protein acidic and rich in cysteine, initiates mineralization and promotes mineral crystal formation during bone formation. The gene expression analysis of ON showed exclusively lower values for both surfaces with BONIT[®] at all kinetic time points (Figure 3d). In the DT group, the expression of the cells on with added BONIT[®] coating was significantly lower at 12 h compared to DT alone ($p = 0.0355$). After 48 h of incubation time, the difference for the lower AP expression with BONIT[®] was highly significant in both comparisons: CT vs. CT + B ($p = 0.0015$) and DT vs. DT + B ($p = 0.0011$). Over time, the non-coated surfaces showed a steady increase in the expression of ON, while the samples with the BONIT[®] coating showed a peak at 24 h. With the control surfaces CT and DT, the expression of ON was significantly upregulated from 24 h to 48 h (CT: $p = 0.0041$; DT: $p = 0.0098$).

IGF1: The gene expression of the anabolic protein IGF1 showed similar values for all four surfaces at all time points (Figure 3e). On the other hand, the following picture emerged when looking at the time course with each individual surface: at 12 h, a very low expression rate was detectable, which increased sharply up to 24 h and then dropped again moderately. These differences were, for the most part, statistically significant: 1. the increase from 12 h to 24 h (CT, $p = 0.021$; CT + B, $p = 0.0188$; DT, $p = 0.0129$; DT + B, $p = 0.0069$), and 2. the decrease from 24 h to 48 h (CT + B, $p = 0.0451$; DT + B, $p = 0.0142$). After 48 h of incubation, the IGF1 expression was still significantly higher than at 12 h (CT, $p = 0.0003$; CT + B, $p = 0.0087$; DT, $p = 0.0007$; DT + B, $p = 0.0033$).

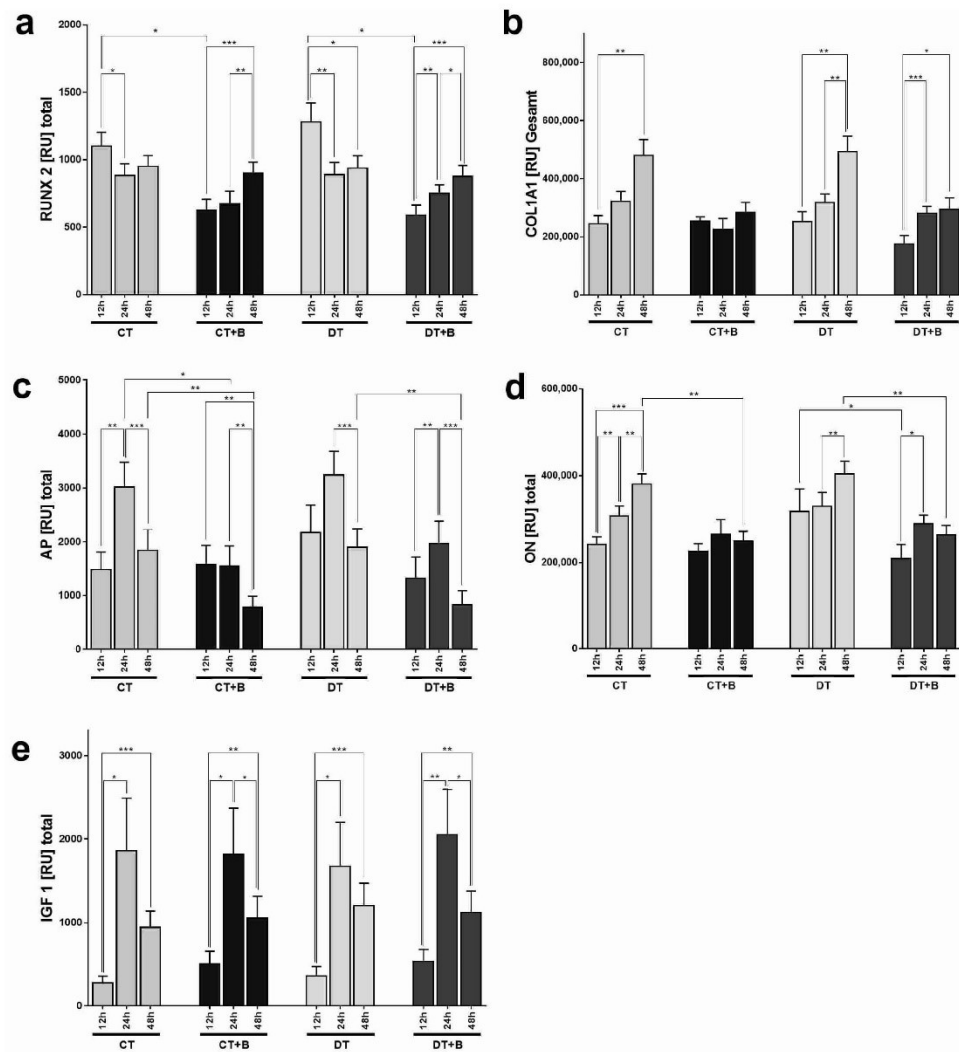


Figure 3. (a–e) The figures show the relative units (RU) from the gene expression analysis of runt-related transcription factor 2 (RUNX2), alpha-1 type I collagen (COL1A1), alkaline phosphatase (AP), osteonectin/secreted protein acidic and rich in cysteine (ON/SPARC) and insulin-like growth factor 1 (IGF1) for comparison of the surfaces. The figures show the mean values (+SEM, n = 10) of the expressions at three kinetic points (hours (h) = 12, 24 and 48) for the coatings CELLTex® (CT), CELLTex® + BONIT® (CT + B), DUOTex® (DT) and DUOTex® + BONIT® (DT + B). The levels of significance were as follows: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

3.2. Genes with a Tendency for Increased Expression with BONIT[®]

BMP2: The gene expression analysis of the bone formation inducing BMP2 showed major differences between the surfaces (Figure 4a). Cells on BONIT[®] showed higher expression of the BMP2 gene at all time points. Significant difference were observed from the 24 h time point (at 24 h: CT vs. CT + B, $p = 0.04$; DT vs. DT + B, $p = 0.04$; at 48 h: CT vs. CT + B, $p = 0.004$; DT vs. DT + B, $p = 0.0019$).

The highest values for BMP2 expression appeared at 12 h, which then dropped again continuously and significantly with all four surfaces over time. An overall higher level could be detected for the BONIT[®] surfaces. The decrease from hour 12 to hour 48 was highly significant in all cases (12 h vs. 48 h: CT, $p = 0.0055$; CT + B, $p = 0.005$; DT, $p = 0.0081$; DT + B, $p = 0.0016$).

OPN: Expression of the hydroxyapatite-binding matrix protein osteopontin was detected on all surfaces. Within the first 24 h, there were no significant differences in the expression of OPN between the surfaces (Figure 3b), whereas, at 48 h the kinetic point, a significant increase was found for the BONIT[®] surfaces compared to the native CELLTex and DUOTex surfaces (at 48 h: CT vs. CT + B, $p = 0.0115$; DT vs. DT + B, $p = 0.0052$). A similar time course over 48 h was observed for the expression of OPN for all surfaces. From hour 12 to hour 24, there was a similar expression of OPN at a low level, and CT even showed a significant decrease ($p = 0.0336$). From hour 24 to hour 48, the expression for all surfaces, including the BONIT[®]-coated surfaces, was significantly to highly significantly upregulated (24 h vs. 48 h: CT, $p = 0.0218$; CT + B, $p = 0.0016$; DT + B, $p = 0.0177$). This effect was less pronounced for the native DT surface.

OC: The gene expression of the matrix protein OC was found with every surface (Figure 4c). The expression pattern was similar to that of osteopontin. Within the first 24 h, only minor differences were observed, but, after 48 h, the average expression values for the BONIT[®] surfaces were more than twice as high. This difference was found to be very highly significant (at 48 h: CT vs. CT + B, $p = 0.0003$; DT vs. DT + B, $p = 0.0005$). The slight tendency toward higher OC expression with BONIT[®] at hours 12 and 24 was not significant. A similar time course over 48 h was observed for the expression of OC for all surfaces. From hour 12 to hour 24, no increase in expression was observed. From hour 24 to hour 48, the expression reached the highest values with all four surfaces. The BONIT[®] surfaces showed a particularly high increase (24 h vs. 48 h: CT + B, $p = 0.0020$; DT + B, $p = 0.0031$).

RANKL: The gene expression analysis of the osteoclast-regulating RANKL revealed higher values with BONIT[®] at all kinetic time points (Figure 4d). This difference was very pronounced after 48 h. The expression of RANKL with the CT + B surface was increased at 48 h compared to CT with a significance value of $p = 0.0039$, and this was similar to DT + B vs. DT with $p = 0.0185$, respectively. The time course showed a similar pattern with all surfaces, and generally (except with CT + B) a peak at 24 h was visible. Significant differences could only be detected with the BONIT[®] coatings. CT + B exhibited a significant upregulation of RANKL from hour 12 to hour 48 ($p = 0.0109$). For DT + B, a significant upregulation from 12 to 24 h ($p = 0.0164$) was observed.

OPG: The expression of the osteoclastogenesis inhibitory protein osteoprotegerin was detected for all surfaces (Figure 4e). More OPG was expressed with the BONIT[®]-refined surfaces: at hour 12, the level of significance for CT vs. CT + B was $p = 0.0039$, and for DT vs. DT + B, it was $p = 0.0288$, respectively. In relative comparison, the values between the high BONIT[®] and the low natives were farthest apart at the beginning, while they converged towards 48 h. However, even at hour 24, the difference in the higher OPG expression with BONIT[®] had a relevant significance level (CT vs. CT + B, $p = 0.0185$; DT vs. DT + B, $p = 0.0083$; the same was found at hour 48). A similar time course over 48 h was visible for all surfaces, with high expression at the beginning, a minimum at 24 h and, again, high expression at the end of the observation period. From hour 12 to hour 24, the expression rate decreased for all surfaces. Three conditions showed significant to very highly significant

decreases (12 h vs. 24 h: CT, $p = 0.0171$; CT + B, $p = 0.001$; DT + B, $p = 0.0053$). From hour 24 to hour 48, OPG expression increased significantly for DT ($p = 0.0355$).

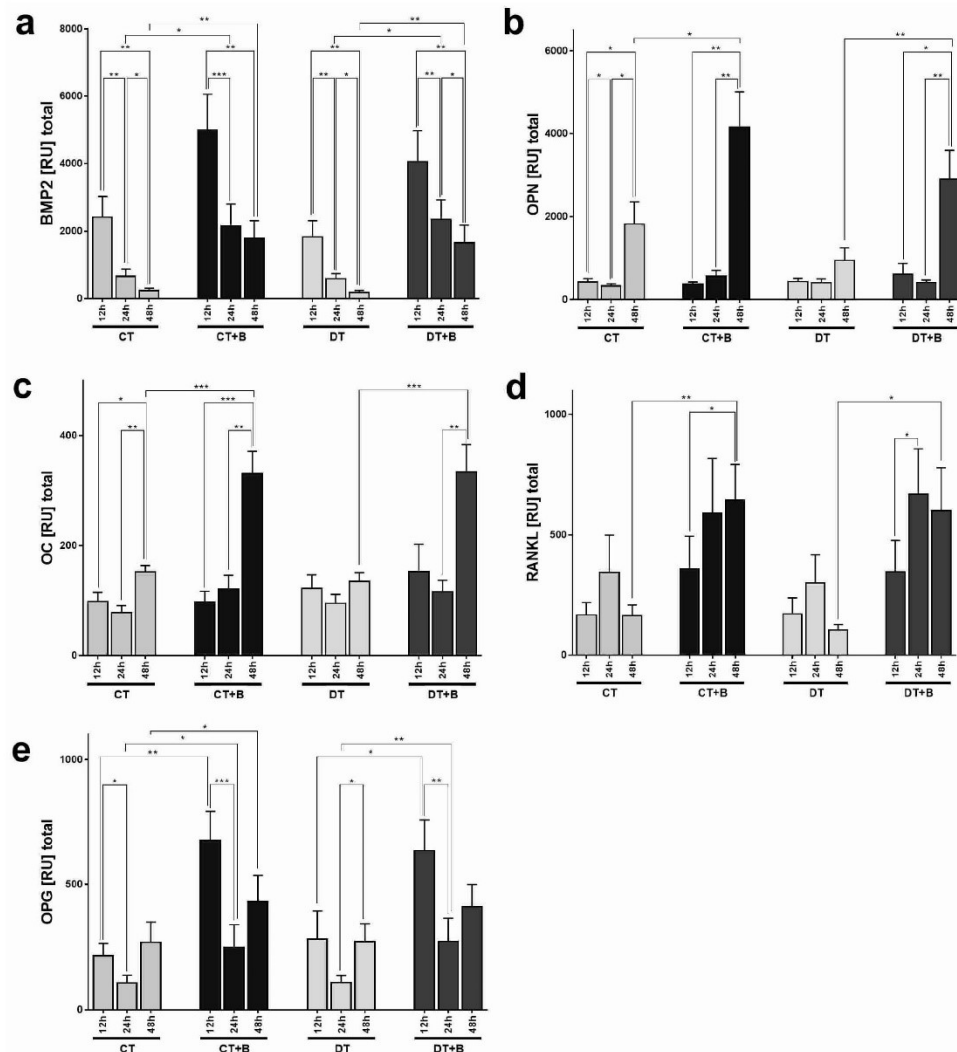


Figure 4. (a–e) The figures show the relative units (RU) from the gene expression analysis of bone morphogenetic protein 2 (BMP2), osteopontin (OPN), osteocalcin/bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein (OC/BGLAP), receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) for comparison of the surfaces. The figures show the mean values (+SEM, $n = 10$) of the expressions at three kinetic points (hours (h) = 12, 24 and 48) for the coatings CELLTex[®] (CT), CELLTex[®] + BONIT[®] (CT + B), DUOTex[®] (DT) and DUOTex[®] + BONIT[®] (DT + B). The levels of significance were as follows: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4. Discussion

The search for the ideal temporal expression of proteins for perfect, long-term, stable osseointegration of implants remains exciting. It is known that not only the implant material itself but also the surface structures at the micro-, nano- and sub-nano-scales have a strong influence on adherent cells in the bone, especially in the early phase [38]. Up to 50% by volume and 70% by weight of the composition of bone is comprised of a modified form of a calcium phosphate compound called hydroxyapatite [39]. Calcium phosphate compounds have been used successfully for many years as a bone substitute material in different forms, from granulat to fast-curing cements, all bioresorbable. It is therefore more than logical that, in the development and refinement of implant surfaces, attempts have been made to use substances similar to bone substance to improve the healing process after surgical implantation [40,41]. BONIT[®] is a successful attempt that has made it to market and beyond and has now been clinically used over 3.5 million times since 1995. The BONIT[®] coating is an electrochemical deposition of a thin, bioactive calcium phosphate layer and is a composite of brushite and hydroxyapatite, which is characterized by very good biocompatibility [23]. The molar ratio of calcium to phosphate is 1.1 ± 0.1 [24]. BONIT[®] already provides a high concentration of calcium and phosphate ions in the solution phase at the outset and it occurs as an intermediate in natural bone itself [42]. Proportionally, hydroxyapatite is slowly absorbed over a period of 6 weeks and continuously releases ions [22].

The coating of dental implants, but also of orthopedic implants (e.g., shaft endoprotheses with the Hofheim model, intervertebral endoprotheses since 1998, Pressfit cups since 2004), is increasing. Negative feedback from post-market surveillance is not known [33]. Clinical observations, including femoral shaft arthroplasties, intervertebral arthroplasties, meta-short stem arthroplasties and press-fit cups coated with BONIT[®], show good and faster healing behavior in follow-up studies [43–46]. For example, Mockwitz et al. described an overall loosening rate of 1.4% and a HARRIS hip score of 88.53% for cementless femoral stem arthroplasty [43].

Szmukler-Moncler et al. showed in animal experiments that BONIT[®] has an osteoconductive effect, especially in the cancellous part of the bone, and suggested that this is also due to the rough, porous surface [22]. In his work, Hentschel demonstrates a surface roughness (Ra) for BONIT[®] of $1.23 \mu\text{m}$ [34]. In the established literature, it is known that surface roughness has a significant influence on cell behavior (adhesion, proliferation, differentiation). However, a direct comparison between the different studies is difficult because not only the surface roughness of the base material but also the chemical behavior, phase inventory, porosity, crystallinity, layer thicknesses and underlying cell line strongly influence the results. Furthermore, it has to be considered that an *in vitro* experiment represents a self-contained system.

In this *in vitro* study, we compared four different constellations with different properties. Here, CT exhibited a roughness (Ra) of $3.0 \pm 1.5 \mu\text{m}$ and DT a roughness (Ra) of $1.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$. In contrast to CT and DT, BONIT[®] itself dissolves in aqueous medium. It should be noted that, with soluble coatings, loss of cell material can occur not only during medium change but also during cell isolation. This may also have influenced the results in this study.

Hentschel showed that there were significantly fewer cells (USSCs) on the very rough surface of BONIT[®] than on the smoother comparison surfaces. However, the cell number increased with a decrease in roughness [34]. Toxic properties of the BONIT[®] coating could be excluded by the Bioservice Scientific Laboratories GmbH, 82152 Planegg, Germany (Study no. 101981.2010).

Another *in vitro* study, also published by DOT GmbH, dealt with the precipitation behavior of BONIT[®]. The osteoblast cell line MG-63 was cultured for 48 h on a BONIT[®] sample. It was found that raised cells were almost completely covered with a fine crystalline calcium phosphate precipitate after only 48 h [33]. This observation led us to attempt upside-down cultivation to make the cells accessible to gene expression. It is the material

and the surface of the implant that determine how the local cells in the bone react to the implant. Mesenchymal stromal cells play an important role in the regeneration and healing of tissues [47]. They are able to develop into different tissues [48]. Mesenchymal stromal cells (MSCs) can differentiate into osteoblasts under certain conditions [49]. The local environment of these cells has an influence on subsequent differentiation. Stromal cells from the periosteum increasingly differentiate into chondrocytes and osteoblasts, and cells from the medullary cavity increasingly strive for osteoblast differentiation [50].

A. Rutkovskiy et al. summarize osteogenic differentiation in their work and describe a three-stage process in which each stage is characterized by certain molecular markers. They describe how RUNX2 is essential for the proliferation and osteogenic differentiation of hMSCs. Stage two is characterized by exit from the cell cycle and serves to build up an extracellular bone matrix. In stage three, matrix mineralization occurs [51]. All these stages are mediated by expression of different proteins, 10 of which were examined in this study. These marker proteins play a crucial role in bone healing and osseointegration processes that occur after the insertion of an implant into the bone.

In order to better classify our results, we designed a schematic representation of proliferation and differentiation (Figure 5). In the following, we discuss the different marker genes examined in this paper. To enable a better understanding, we first discuss the early and then the late markers of osteoblast differentiation. The late markers were detected by us, but the temporal relationship in the early phase of bone healing must be considered. It should be noted that bone healing is a dynamic process and cellular functions take place in parallel.

RUNX 2: Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) is an important protein that is essential for osteoblast differentiation and irreplaceable in bone structure formation [52]. Isolated evaluation of the results for RUNX2 is more difficult due to the different effects during proliferation and differentiation. On the one hand, it serves as a marker for the osteogenic cell line and regulates cell differentiation [53,54]. On the other hand, it is known that RUNX2 inhibits the cell proliferation of osteoblast progenitor cells. Its expression is inversely proportional to the speed of osteoblast proliferation; therefore, RUNX2 is thought to play an important role in controlling cell proliferation [55]. While it controls the proliferation of stem cells, it also occurs in differentiated osteoblasts. It is abundant in calcified bone [56]. We could demonstrate that the expression of RUNX2 with CT and DT was significantly increased at the early kinetic points compared to BONIT[®]. This can be explained by the fact that RUNX2 inhibits proliferation to promote cell differentiation. In connection with the results for the other differentiation markers, we assumed that the cells in BONIT[®] were increasingly differentiated at the early stages, while the cells in the control plates initiated differentiation. This consideration is supported by the temporal course of the expression of RUNX2. In BONIT[®], the expression increased continuously over 48 h, a sign that further immature osteoblasts had already been formed. In the control plates, the expression of RUNX2 was significantly down-regulated from 12 to 24 h. The observation is consistent with the results of J. Pratap and M. Galindo et al., who observed that the expression of RUNX2 was down-regulated when stem cells re-entered cell proliferation [55]. From this, it can be deduced that the cells in the control coatings continued to proliferate, while the cells in BONIT[®] differentiated. The study by M. Hentschel (2013) entitled "Investigation of progenitor cells depending on decorated, as well as non-decorated implant surfaces as a growth substrate" should be critically questioned from our point of view, and we ourselves could not grow hMSC on BONIT[®] over a longer period of time according to his method in a first series of experiments, but Hentschel's observations support our theory of proliferation and differentiation. He was able to show that the number of cells in DT increased significantly over seven days compared to BONIT[®]. In BONIT[®], the number of cells remained constant [34]. RUNX2 has an effect on the formation of osteopontin, osteocalcin and COL1A1 [56,57]. This effect is important for assessing the expression patterns of our results.

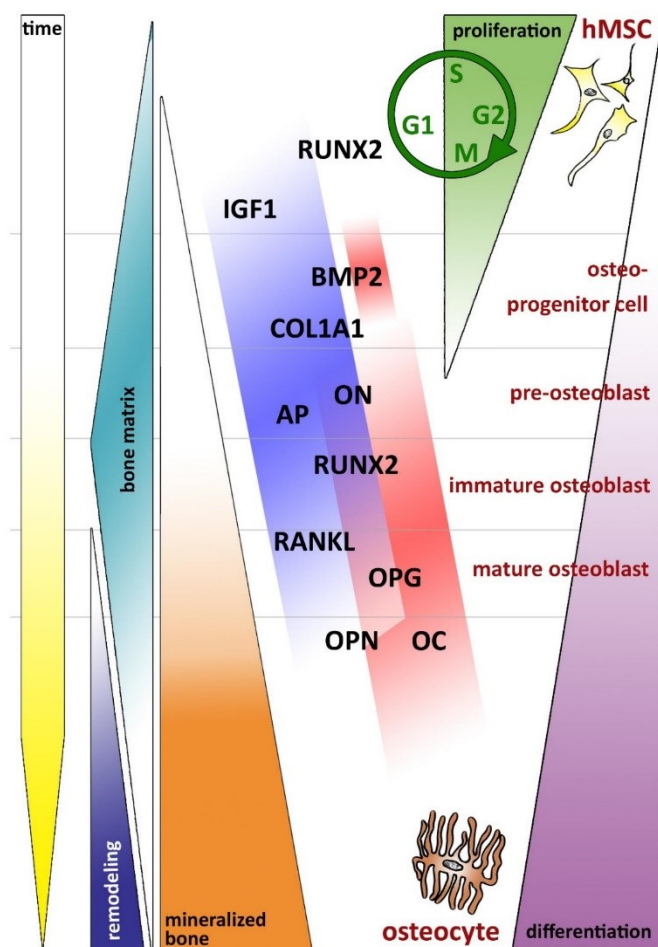


Figure 5. Schematic representation of proliferation and differentiation of hMSCs over time (adapted from Hentschel, M. [34]). The genes investigated in the BONIT[®] study were integrated into a model showing the proliferation and differentiation of hMSCs and the resulting bone formation, in addition to the time course. The yellow arrow on the left side of the figure shows the time course for differentiation, on the one hand, and for bone formation, on the other hand. It should be kept in mind that both progressions have different durations and cannot be equated. The dependence of proliferation (green triangle) and differentiation (purple triangle) is shown on the right side of the figure. Proliferation is characterized by mitotic activity. Differentiation of hMSCs to osteocytes occurs through several intermediate stages. Depending on how far differentiation has progressed, mineralized bone is formed via a bone matrix (turquoise pyramid) that is subject to constant remodeling (orange and blue triangles). We show an attempt to time the cells at hour 48 in the BONIT[®] coatings (= red) and in CT and DT (= royal blue).

COL1A1: Alpha-1 type I collagen, or collagen type 1, is a fibrillar collagen and occurs mainly in the skin, tendons, fascia, bones, connective tissue, vessels and dentin [58,59]. It is

the main component of the extracellular matrix and the most common type of collagen in the human organism [60]. We could prove that, after 48 h, more COL1A1 was formed in the control plates CT and DT. Since RUNX2 had an effect on the expression of COL1A1, it can be assumed that the increased expression at hour 12 had an effect on the expression levels of COL1A1 at the other kinetic points. The time course of the expression shows the increase in the expression in CT and DT. COL1A1 is increasingly secreted by early osteoprogenitor cells [53]. Our results can be explained by the fact that more precursor cells are present in CT and DT than in BONIT[®]. Collagen plays an important role in the healing of hard tissues [61]. We interpret the results in terms of increased collagenous bone matrix formation and classify the observation in the phases of proliferation and incipient differentiation where increased collagen formation is present [51]. Collagen influences the expression of alkaline phosphatase and osteonectin. This promotes mineralization. COL1A1 can inhibit cell proliferation and promote differentiation [62]. Even if the timing and the cell line were different, it should be noted that DOT GmbH published a cell differentiation study showing increased collagen synthesis at 10 days with an osteoblast cell line (hFOB1.19) [33]. Within the first 48 h, our studies with hMSC showed an opposite result.

Osseointegration is a direct connection between bone and the actual implant without intermediate connective tissue layers [63]. The formation of connective tissue is critically evaluated in implantology. Osseointegration occurs when the implant and bone are in direct contact [64]. The formation of a collagenous bone matrix may be reduced under BONIT[®].

AP: Alkaline phosphatase (AP) consists of a group of isoenzymes [65]. They occur ubiquitously in plants and living beings [66]. In the human organism, isoenzymes originate mainly from the bone and liver [67]. Their expression is increased in osteoblastic activity [53]. In BONIT[®], less AP was continuously produced over 48 h compared to the control plates. There was a similar temporal expression pattern as in the control coatings. The detection of expression serves as an early marker for the detection of cell differentiation [53]. M.P. Lynch et al. describe how the expression and activity of AP is promoted by collagen [62]. This observation is compatible with our results. It could be a sign that CT and DT are forming a collagenous bone matrix. These results could be explained by a faster differentiation of the cells in BONIT[®]. Taking other marker genes into account, the observation can be explained by a shorter osteoblastic-secretory phase in BONIT[®].

ON/SPARC: Osteonectin (ON), or secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), is a frequently occurring glycoprotein, which are non-collagen matrix proteins [68,69]. We were able to prove higher expression in CT and DT after 48 h. This observation also supports the formation of a bone matrix. ON can bind to calcium ions, hydroxyapatite and collagen. It is thus involved in the development of connective tissue and promotes the differentiation of osteoblasts [70]. ON is increasingly secreted at the beginning of osteoblast differentiation [71]. If our results are interpreted in the direction that differentiation in BONIT[®] is less advanced, this contradicts late differentiation markers. Other contexts, such as mineralization, needs to be discussed here. The expression of ON combines the phase in which collagen is formed with the phase of bone mineralization [72]. Our results indicate that mineralization was beginning to be controlled in BONIT[®]. This observation supports the consideration that the cells in BONIT[®] are subject to faster differentiation.

IGF1: Insulin-like growth factors (IGFs) are polypeptides [73]. IGF1 is similar to insulin [74]. It plays an important role in bone growth [75,76]. IGF1 initiates the differentiation of cells and can, therefore, be interpreted as an early differentiation marker [77]. We observed no significant difference in expression between the different coatings. The time course of the expression was the same for all tested coatings. IGF1 receptors decrease in favor of insulin receptors during osteoblast differentiation [77]. A study of insulin receptors would be interesting.

BMP2: Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) belongs to the family of TGF- β proteins and is an important cytokine [78,79]. It was first described in 1965 as an important factor

in the formation of bone tissue [80,81]. The expression of BMP2 is associated with bone healing [82,83]. We observed that BONIT[®] significantly influenced the expression of BMP2. At all times, significantly more BMP2 was expressed by the cells in the BONIT[®] sample platelets. This can be evaluated as a sign of higher differentiation activity. In an animal study, BONIT[®] was shown to have an effect similar to BMP2 [27]. The higher BMP2 expression under BONIT[®] influence may explain this observation. BMP2 is a key protein in the differentiation of osteoblasts [84–87]. The time course indicated that BONIT[®] already had an influence on differentiation in the early hours and stimulated differentiation more sustainably over 48 h. In the comparative coatings CT and DT, only up to one tenth of BMP2 was expressed after 48 h. The high difference was mainly due to the rapid decrease in BMP2 expression in the control plates. This observation supports our hypothesis that cell differentiation in CT and DT is reduced in favor of cell proliferation.

OPN: The expression analysis of osteopontin also suggested faster differentiation. Osteopontin (OPN), or sialoprotein I, is a non-collagen protein of the extracellular matrix [88,89]. It is part of the basic structure of the bone matrix and is mainly formed by differentiated osteoblasts and osteocytes [53,90]. The differentiation in BONIT[®] is further advanced. The expression increased massively after 48 h and was up to four times higher in BONIT[®] than in the control plates. OPN can bind hydroxyapatite and is considered a promoter of mineralization [91,92]. W. Huang et al. found that the expression was increased in late stages of differentiation [53]. This supports our hypothesis of faster differentiation.

OC (OCN): Osteocalcin (OC), or bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein (BGP), is a peptide hormone and is produced specifically by osteoblasts or odontoblasts [53,93]. Its expression is associated with bone formation [51]. OC is a component of and the second-most abundant protein in the extracellular non-collagenous bone matrix [56]. It can be measured to determine bone turnover [94]. A higher expression, which we were able to detect in BONIT[®] at later points in time, is associated with bone augmentation. OC has a high binding capacity for hydroxyapatite and calcium [95]. It regulates the maturation of hydroxyapatite crystals [96]. Matrix mineralization is inhibited by OC [97]. It protects against over-mineralization and excessive bone growth [98]. In combination with collagen and OPN, OC leads to more stable bone growth [99,100]. We interpret our results in such a way that under BONIT[®] there is a more stable expansion of the bone substance and there is already control over mineralization. According to A. Rutkovskiy et al., the constellation of gene expression speaks for the third phase of osteoblast differentiation [51].

RANKL: Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) is a protein belonging to the family of tumor necrosis factors (TNF) [101]. Primarily, it is secreted by osteoblasts [102]. When comparing the sample plates, RANKL was significantly more strongly expressed after 48 h in BONIT[®]. This was also an indication of widely differentiated osteoblasts and supports our theory that BONIT[®] influences differentiation. RANK (receptor for RANKL) is located on the surface of osteoclast precursor cells and mature osteoclasts [103,104]. The binding of RANKL is essential for the differentiation of osteoclasts [104,105]. In this context, the expression of RANKL can also be evaluated in connection with stimulation of the osteoclasts. The interaction of osteoblasts and osteoclasts is important for the remodeling of bone substance and follows bone mineralization. RANKL can be inhibited by a soluble form of OPG [106]. DOT GmbH published a study in which the mineralization of osteoblasts was stimulated by a BONIT[®]-extract. They were able to demonstrate by means of Kossa staining that dissolved BONIT[®] promotes mineralization [33].

OPG: Osteoprotegerin (OPG), or osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), is a cytokine receptor and belongs to the family of tumor necrosis factor (TNF) receptors [107,108]. OPG is formed by osteoblasts [109]. It is a soluble glycoprotein that can bind RANKL, and OPG is also found on the surface of osteoclasts [110,111]. The differentiation and survival of osteoclasts is inhibited by OPG, and bone resorption is suppressed [112]. Our expression analyses showed a significantly higher expression of OPG on BONIT[®]. In connection with the expression of RANKL, we interpret the results as indicating incipient control catabolic and anabolic processes in bone metabolism.

The limitations of this study include the fact that expression patterns may differ in vivo when other local proteins are present and may have different effects on the investigated cells. This is because, just two minutes after implantation of a titanium implant, more than 2800 different proteins are already detectable on the surface [113]. Moreover, only the short period of 48 h was observed, which does not cover the whole process of osteoblast differentiation that usually takes a minimum of 21 days [114]. The reader should, therefore, note that only the proliferative period and the initial matrix deposition were considered in this study.

5. Conclusions

We have developed a new method that allows the cultivation of human mesenchymal stromal cells (hMSCs) on the soluble coating BONIT[®] for gene expression analysis. This study describes a defined gene expression pattern of bone metabolism that may help in understanding the influence of this CaP coating on the early phase of implant osseointegration. BONIT[®] has a significant effect on the gene expression of hMSCs, even in the early hours. To summarize our results, it can be assumed that BONIT[®] already stimulates the differentiation behavior of hMSCs in the proliferation and matrix phase. Despite the short study period, the early development of osteocytes can be assumed.

Author Contributions: A.E.: helped to design the study, wrote the manuscript, performed experiments, analyzed, and interpreted the data. B.A.B.: helped to design the study, interpreted the data, H.S.: helped to design the study, interpreted the data, helped to write the manuscript. M.H.: contributed to interpreting the results, writing the manuscript. M.R.: contributed patient material. M.J.: contributed patient material, helped to write the manuscript. R.K.: contributed patient material. C.Z.: contributed patient material, designed the study, interpreted the data, helped to write the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committee of the Medical Faculty of Heinrich Heine University Düsseldorf (protocol code 5401, date of approval 04.03.2016).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy.

Acknowledgments: The authors thank S. Lensing-Höhn for her excellent technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. This research received no grant from a funding agency in the public, commercial or non-profit sector.

References

1. Santaguida, P.L.; Hawker, G.A.; Hudak, P.L.; Glazier, R.; Mahomed, N.N.; Kreder, H.J.; Coyte, P.C.; Wright, J.G. Patient characteristics affecting the prognosis of total hip and knee joint arthroplasty: A systematic review. *Can. J. Surg.* **2008**, *51*, 428.
2. Prokopetz, J.J.; Losina, E.; Bliss, R.L.; Wright, J.; Baron, J.A.; Katz, J.N. Risk factors for revision of primary total hip arthroplasty: A systematic review. *BioMed Cent.* **2012**, *13*, 251.
3. Al Maini, M.; Adelowo, F.; Al Saleh, J.; Al Weshahi, Y.; Burmester, G.R.; Cutolo, M.; Flood, J.; March, L.; McDonald-Blumer, H.; Pile, K.; et al. The global challenges and opportunities in the practice of rheumatology: White paper by the World Forum on Rheumatic and Musculoskeletal Diseases. *Clin. Rheumatol.* **2015**, *34*, 819–829. [CrossRef] [PubMed]
4. Hoy, D.G.; Smith, E.; Cross, M.; Sanchez-Riera, L.; Blyth, F.M.; Buchbinder, R.; Woolf, A.D.; Driscoll, T.; Brooks, P.; March, L.M. Reflecting on the global burden of musculoskeletal conditions: Lessons learnt from the Global Burden of Disease 2010 Study and the next steps forward. *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, *74*, 4–7. [CrossRef]
5. Krankheitskosten—Krankheitskosten Einrichtungen Deutschland. Available online: <http://www.gbe-bund.de> (accessed on 9 October 2019).
6. Institut für Sozialmedizin, Epidemiologie und Gesundheitssystemforschung, Hannover. *BARMER GEK Report Krankenhaus*; vol. Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse, Band 3; Asgard-Verlag: St. Augustin, FL, USA, 2010.
7. National Institute for Health and Care Excellence. *Total Hip Replacement and Resurfacing Arthroplasty for End-Stage Arthritis of the Hip/Technology Appraisal Guidance [TA304]*; NICE: Manchester, UK, 2014.
8. Pal, B.; Puthumanapully, P.K.; Amis, A.A. (ii) Biomechanics of implant fixation. *Orthop. Trauma* **2013**, *27*, 76–84.

9. Darimont, G.L.; Cloots, R.; Heinen, E.; Seidel, L.; Legrand, R. In vivo behaviour of hydroxyapatite coatings on titanium implants: A quantitative study in the rabbit. *Biomaterials* **2002**, *23*, 2569–2575. [CrossRef]
10. Claes, L.; Kirschner, P.; Perka, C.; Rudert, M. *AE-Manual der Endoprothetik/Hüfte und Hüftrevision*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012.
11. Wirtz, D.C. *AE-Manual der Endoprothetik/Knie*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011.
12. Wintermantel, E.; Ha, S.-W. *Medizintechnik: Life Science Engineering*; Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009.
13. Kastilan, S. Bioverträgliche Oberflächen für Implantate und Prothesen. *Die Welt* **2000**. Available online: <https://www.welt.de/print-welt/article530246/Biovertraegliche-Oberflaechen-fuer-Implantate-und-Prothesen.html> (accessed on 9 October 2019).
14. Heimann, R.B. Entwicklung biokeramischer Beschichtungen für Hüft-Endoprothesen (Teil 1). *TU Contact* **2004**, *15*, 44–47.
15. Nöbel, D. Untersuchungen zur Osteointegration und Resorbierbarkeit von Implantatbeschichtungen für den Knochenersatz—Eine histologische und histomorphometrische Studie am Tiermodell. Ph.D. Thesis, Leipzig University, Leipzig, Germany, 2007.
16. Osborn, J.F.; Newesely, H. The material science of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* **1980**, *1*, 108–111. [CrossRef]
17. Piconi, C.; Maccauro, G. Review: Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials* **1999**, *20*, 1–25. [CrossRef]
18. Hench, L.L.; Paschall, H.A. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J. Biomed. Mater. Res.* **1973**, *7*, 25–42.
19. Buser, D.; Schenk, R.K.; Steinemann, S.; Fiorellini, J.P.; Fox, C.H.; Stich, H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res.* **1991**, *25*, 889–902. [CrossRef] [PubMed]
20. Heimann, R.B. Entwicklung biokeramischer Beschichtungen für Hüftendoprothesen (Teil 2). *TU Contact* **2005**, *10*, 42–45.
21. DOT GmbH. Schnelleres Einheilen Durch Die Elektrochemische Calciumphosphat-Beschichtung BONIT (R). Available online: <https://www.dot-coating.de/images/pdf/beschichtungen/ortho/Elektrochemische-Calciumphosphat-Beschichtung-BONIT.pdf> (accessed on 9 November 2019).
22. Szmukler-Moncler, S.; Perrin, D.; Ahossi, V.; Pointaire, P. Evaluation of BONIT[®], a Fully Resorbable CaP Coating Obtained by Electrochemical Deposition, after 6 Weeks of Healing: A Pilot Study in the Pig Maxilla. *Key Eng. Mater.* **2001**, *192–195*, 395–398. [CrossRef]
23. Becker, P.; Zeggel, P.; Lüthen, F.; Nebe, B.; Rychly, J.; Neumann, H.G. Resorbable Calcium Phosphate Composite Coatings. *Key Eng. Mater.* **2001**, *218–220*, 653–656.
24. Hegenbarth, A. Modifizierung der Oberfläche von Implantaten zur Optimierung der Osseointegration—Charakterisierung von Herstellungsverfahren und Schichteigenschaften. Bachelor's Thesis, Fachhochschule Osnabrück, Fakultät Ingenieurwissenschaften und Informatik, Osnabrück, Germany, 2009.
25. Schwarz, M.L.; Kowarsch, M.; Rose, S.; Becker, K.; Lenz, T.; Brade, J.; Jani, L.; Feuerstack, M.; Herbig, J.; Scheller, G. The transcortical Göttingen Minipig model for testing osteointegration of implant surfaces and the influence of a soluble CaP coating on osteointegration. *J. Biomech.* **2006**, *39*, S10–S11. [CrossRef]
26. Schwarz, M.; Feuerstack, M.; Herbig, J.; Brade, J.; Becker, K.; Scheller, G. Effect of a resorbable CaP coating on bone-implant contact and density in a gap model after 4 weeks and 8 weeks. An experimental study in Göttinger Minipigs. *J. Biomech.* **2006**, *39* (Suppl. 1), S10–S11. [CrossRef]
27. Tschofen, S. Osseointegration von Nanokristallinen Diamantoberflächen, Zirkonoxid und Kalziumphosphat im Schafstibiarmmodell. Diploma Thesis, Medizinische Universität Innsbruck, Universitätsklinik für MKG-Chirurgie, Innsbruck, Austria, 2018.
28. Reigstad, O.; Johansson, C.; Stenport, V.; Wennerberg, A.; Reigstad, A.; Røkkum, M. Different patterns of bone fixation with hydroxyapatite and resorbable CaP coatings in the rabbit tibia at 6, 12, and 52 weeks. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2011**, *99B*, 14–20.
29. Kämmerer, T.A.; Palarie, V.; Schiegnitz, E.; Topalo, V.; Schröter, A.; Al-Nawas, B.; Kämmerer, P.W. A biphasic calcium phosphate coating for potential drug delivery affects early osseointegration of titanium implants. *J. Oral Pathol. Med.* **2017**, *46*, 61–66. [CrossRef] [PubMed]
30. Schiegnitz, E.; Palarie, V.; Nacu, V.; Al-Nawas, B.; Kämmerer, P.W. Vertical Osteoconductive Characteristics of Titanium Implants with Calcium-Phosphate-Coated Surfaces—A Pilot Study in Rabbits. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **2014**, *16*, 194–201.
31. Massei, G.; Trisi, P.; Malchioldi, L.; Szmukler-Moncler, S. Immediately Loaded FBR-Coated Pitt-Easy Bio-Oss Implants. A Histologic evaluation in 3 Patients after 8–12 Weeks of Function. In *Clinical Oral Implants Research*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2001; Volume 12, p. 409.
32. McAfee, P.; Fedder, I.; Saiedy, S.; Shucosky, E.; Cunningham, B. SB Charité Disc Replacement: Report of 60 Prospective Randomized Cases in a U.S. Center. *J. Spinal Disord. Tech.* **2003**, *16*, 424–433. [CrossRef]
33. DOT GmbH. *Schichtdossier BONIT(R) Orthopädische Anwendungen*; DOT GmbH: Rostock, Germany, 2015.
34. Hentschel, M. *Dissertation: Untersuchung von Vorläuferzellen in Abhängigkeit von Dekorierten, Sowie Nicht Dekorierten Implantatoberflächen als Wachstumsunterlage*; Ernst-Moritz-Arndt-Universität: Greifswald, Germany, 2013.
35. Dominici, M.L.B.K.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Krause, D.S.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [CrossRef] [PubMed]

36. Pilge, H.; Fröbel, J.; Mrotzek, S.J.; Fischer, J.C.; Proding, P.M.; Zilkens, C.; Bittersohl, B.; Krauspe, R. Effects of thromboprophylaxis on mesenchymal stromal cells during osteogenic differentiation: An in-vitro study comparing enoxaparin with rivaroxaban. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2016**, *17*, 108. [CrossRef] [PubMed]
37. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [CrossRef] [PubMed]
38. Bai, L.; Zhao, Y.; Chen, P.; Zhang, X.; Huang, X.; Du, Z.; Crawford, R.; Yao, X.; Tang, B.; Hang, R.; et al. Targeting Early Healing Phase with Titania Nanotube Arrays on Tunable Diameters to Accelerate Bone Regeneration and Osseointegration. *Small* **2021**, *17*, 2006287. [CrossRef] [PubMed]
39. Junqueira, L.C.; Jose, C. *Basic Histology: Text und Atlas*; McGraw-Hill/Appleton&Lang: New York, NY, USA, 2002.
40. Cook, S.D.; Thomas, K.A.; Kay, J.F.; Jarcho, M. Hydroxyapatite-coated titanium for orthopedic implant applications. *Clin. Orthop.* **1988**, *232*, 31.
41. Paital, S.R.; Dahotre, N.B. Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2009**, *66*, 1–70. [CrossRef]
42. Dorozhkin, S.V.; Epple, M. Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angew. Chem.* **2002**, *116*, 3260–3277. [CrossRef]
43. Jürgen, M. Ergebnisse nach zementfrei implantierten Femurschaftendoprothesen vom Modell Hofheim nach einer Laufzeit von 10 Jahren. *Orthopädische Prax.* **2002**, *38*, 260–267.
44. Pimenta, L.; McAfee, P.; Crookard, A.; Cappuccino, A.; Cunningham, B.; Orduz, R.D. Zervikaler Bandscheibenersatz. Die PCM-Zwischenwirbel-Endoprothese. *Jatros Orthopädie* **2005**, *1*, 16–18.
45. Bücking, P. Die Metha-Kurzschafprothese. *Jatros Orthop.* **2009**, *2*, 48–49.
46. Barth, R. 5-Jahres-Ergebnisse einer modernen Pressfit-Pfanne. *Jatros Orthopädie Rheumatol.* **2010**, *5*, 72–74.
47. Pittenger, M.F.; Mackay, A.M.; Beck, S.C.; Jaiswal, R.K.; Douglas, R.; Mosca, J.D.; Moorman, M.A.; Simonetti, D.W.; Craig, S.; Marshak, D.R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* **1999**, *284*, 143–147. [CrossRef] [PubMed]
48. Jiang, Y.; Jahagirdar, B.N.; Reinhardt, R.L.; Schwartz, R.E.; Keene, C.D.; Ortiz-Gonzalez, X.R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M.; et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **2002**, *418*, 41–49. [PubMed]
49. Canalis, E. Notch signaling in osteoblasts. *Sci. Signal.* **2008**, *1*, pe17. [PubMed]
50. Yu, Y.Y.; Lieu, S.; Lu, C.; Colnot, C. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone* **2010**, *47*, 65–73. [CrossRef] [PubMed]
51. Rutkovskiy, A.; Stenslokken, K.-O.; Vaage, I.J. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **2016**, *22*, 95–106. [CrossRef]
52. Otto, F.; Thornell, A.P.; Crompton, T.; Denzel, A.; Gilmour, K.C.; Rosewell, I.R.; Stamp, G.W.; Beddington, R.S.; Mundlos, S.; Olsen, B.R.; et al. Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell* **1997**, *89*, 765–771.
53. Huang, W.; Yang, S.; Shao, J.; Li, Y.-P. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2007**, *12*, 3068–3092.
54. Ducy, P.; Zhang, R.; Geoffroy, V.; Ridall, A.L.; Karsenty, G. Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **1997**, *89*, 747–754.
55. Pratap, J.; Galindo, M.; Zaidi, S.K.; Vradii, D.; Bhat, B.M.; Robinson, J.A.; Choi, J.Y.; Komori, T.; Stein, J.L.; Lian, J.B.; et al. Cell Growth Regulatory Role of Runx2 during Proliferative Expansion of Preosteoblasts. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5357–5362.
56. Komori, T.; Yagi, H.; Nomura, S.; Yamaguchi, A.; Sasaki, K.; Deguchi, K.; Shimizu, Y.; Bronson, R.T.; Gao, Y.H.; Inada, M.; et al. Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. *Cell* **1997**, *89*, 755–764. [CrossRef]
57. Kern, B.; Shen, J.; Starbuck, M.; Karsenty, G. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7101–7107. [PubMed]
58. COL1A1 Collagen Type I alpha 1 Chain [Homo Sapiens (Human)]-Gene-NCBI. NCBI. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1277> (accessed on 14 September 2019).
59. Prockop, D.J.; Kivirikko, K.I. Collagens: Molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 403–434. [CrossRef] [PubMed]
60. Vuorio, E.; de Crombrughe, B. The family of collagen genes. *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 837–872. [PubMed]
61. Oryan, A.; Monazzah, S.; Bigham-Sadeh, A. Bone Injury and Fracture Healing Biology. *Biomed. Environ. Sci.* **2015**, *28*, 57–71.
62. Lynch, M.P.; Stein, J.L.; Stein, G.S.; Lian, J.B. The Influence of Type I Collagen on the Development and Maintenance of the Osteoblast Phenotype in Primary and Passaged Rat Calvarial Osteoblasts: Modification of Expression of Genes Supporting Cell Growth, Adhesion, and Extracellular Matrix Mineralization. *Exp. Cell Res.* **1995**, *216*, 35–45.
63. Brånemark, P.-I. Osseointegration and its experimental background. *J. Prosthet. Dent.* **1983**, *50*, 399–410.
64. Albrektsson, T.; Brånemark, P.I.; Hansson, H.-A.; Lindström, J. Osseointegrated Titanium Implants: Requirements for Ensuring a Long-Lasting, Direct Bone-to-Implant Anchorage in Man. *Acta Orthop. Scand.* **1981**, *52*, 155–170.
65. Moss, D.W. Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin. Chem.* **1992**, *38*, 2486–2492. [CrossRef]
66. Herries, D.G. *Alkaline Phosphatase*; McComb, R.B., Bowers, G.N., Jr., Posen, S., Eds.; Plenum Press: New York, NY, USA; London, UK, 1979; p. 986. ISBN 0-306-40214-9.

67. Harris, H. The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta* **1990**, *186*, 133–150. [\[CrossRef\]](#)
68. Bradshaw, A.D. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 480–488. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Murphy-Ullrich, J.E.; Sage, E.H. Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2014**, *37*, 1–14. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Delany, A.M.; Hankenson, K.D. Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling. *J. Cell Commun. Signal.* **2009**, *3*, 227–238. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Barker, T.H.; Baneyx, G.; Cardó-Vila, M.; Workman, G.A.; Weaver, M.; Menon, P.M.; Dedhar, S.; Rempel, S.A.; Arap, W.; Pasqualini, R.; et al. SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36483–36493. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Termine, J.D.; Kleinman, H.K.; Whitson, S.W.; Conn, K.M.; McGarvey, M.L.; Martin, G.R. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* **1981**, *26*, 99–105. [\[CrossRef\]](#)
73. Jansen, M.; Van Schaik, F.M.A.; Ricker, A.T.; Bullock, B.; Woods, D.E.; Gabbay, K.H.; Nussbaum, A.L.; Sussenbach, J.S.; Van den Brande, J.L. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature* **1983**, *306*, 609–611. [\[CrossRef\]](#)
74. Entingh-Pearsall, A.; Kahn, C.R. Differential roles of the insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors in response to insulin and IGF-I. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 38016–38024. [\[CrossRef\]](#)
75. Thrall, K.M.; Lumpkin, C.K.; Bunn, R.C.; Kemp, S.F.; Fowlkes, J.L. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2005**, *289*, E735–E745. [\[CrossRef\]](#)
76. Evans, P.R. Leprechaunism. *Arch. Dis. Child.* **1955**, *30*, 479–483. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Zhang, W.; Shen, X.; Wan, C.; Zhao, Q.; Zhang, L.; Zhou, Q.; Deng, L. Effects of insulin and insulin-like growth factor 1 on osteoblast proliferation and differentiation: Differential signalling via Akt and ERK. *Cell Biochem. Funct.* **2012**, *30*, 297–302. [\[CrossRef\]](#)
78. Ozkaynak, E.; Rueger, D.C.; Drier, E.A.; Corbett, C.; Ridge, R.J.; Sampath, T.K.; Oppermann, H. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *EMBO J.* **1990**, *9*, 2085–2093. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
79. Wozney, J.M.; Rosen, V.; Celeste, A.J.; Mitscock, L.M.; Whitters, M.J.; Kriz, R.W.; Hewick, R.M.; Wang, E.A. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* **1988**, *242*, 1528–1534. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
80. Urist, M.R. Bone: Formation by Autoinduction. *Science* **1965**, *150*, 893–899. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Urist, M.R.; Strates, B.S. Bone Morphogenetic Protein. *J. Dent. Res.* **1971**, *50*, 1392–1406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Meyer, R.A.; Meyer, M.H.; Phieffer, L.S.; Banks, D.M. Delayed union of femoral fractures in older rats: decreased gene expression. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2001**, *2*, 2. [\[CrossRef\]](#)
83. Phillips, A.M. Overview of the fracture healing cascade. *Injury* **2005**, *36*, S5–S7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Yuasa, T.; Kataoka, H.; Kinto, N.; Iwamoto, M.; Enomoto-Iwamoto, M.; Iemura, S.I.; Ueno, N.; Shibata, Y.; Kurosawa, H.; Yamaguchi, A. Sonic hedgehog is involved in osteoblast differentiation by cooperating with BMP-2. *J. Cell. Physiol.* **2002**, *193*, 225–232. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Groppe, J.; Greenwald, J.; Wiater, E.; Rodriguez-Leon, J.; Economides, A.N.; Kwiatkowski, W.; Affolter, M.; Vale, W.W.; Belmonte, J.C.I.; Choe, S. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* **2002**, *420*, 636–642. [\[CrossRef\]](#)
86. Katagiri, T.; Yamaguchi, A.; Komaki, M.; Abe, E.; Takahashi, N.; Ikeda, T.; Rosen, V.; Wozney, J.M.; Fujisawa-Sehara, A.; Suda, T. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* **1994**, *127*, 1755–1766. [\[CrossRef\]](#)
87. Dijke, P.; Fu, J.; Schaap, P.; Roelen, B. Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J. Bone Jt. Surg.-Am.* **2003**, *85*, 34–38. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Denhardt, D.T.; Guo, X. Osteopontin: A protein with diverse functions. *FASEB J.* **1993**, *7*, 1475–1482. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Rodan, G.A. Osteopontin overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**, *760*, 1–5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
90. Morinobu, M.; Ishijima, M.; Rittling, S.R.; Tsuji, K.; Yamamoto, H.; Nifuji, A.; Denhardt, D.T.; Noda, M. Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *J. Bone Miner. Res.* **2003**, *18*, 1706–1715. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
91. Hunter, G.K. Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation. *Calcif. Tissue Int.* **2013**, *93*, 348–354. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Boskey, A.L.; Maresca, M.; Ullrich, W.; Doty, S.B.; Butler, W.T.; Prince, C.W. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: Inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner.* **1993**, *22*, 147–159. [\[CrossRef\]](#)
93. Bidlingmaier, M. Osteocalcin. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*; Gressner, A.M., Arndt, T., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019; pp. 1797–1798. [\[CrossRef\]](#)
94. Gundberg, C.M.; Hauschka, P.V.; Lian, J.B.; Gallop, P.M. Osteocalcin: Isolation, characterization, and detection. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1984; Volume 107, pp. 516–544.
95. Hauschka, P.V.; Wians, F.H. Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *Anat. Rec.* **1989**, *224*, 180–188. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

96. Boskey, A.L.; Gadaleta, S.; Gundberg, C.; Doty, S.B.; Ducey, P.; Karsenty, G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* **1998**, *23*, 187–196. [\[CrossRef\]](#)
97. van de Loo, P.G.; Soute, B.A.; van Haarlem, L.J.; Vermeer, C. The effect of Gla-containing proteins on the precipitation of insoluble salts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *142*, 113–119. [\[CrossRef\]](#)
98. Price, P.A.; Williamson, M.K.; Haba, T.; Dell, R.B.; Jee, W.S. Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 7734–7738. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
99. Poundarik, A.A.; Diab, T.; Sroga, G.E.; Ural, A.; Boskey, A.L.; Gundberg, C.M.; Vashishth, D. Dilatational band formation in bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 19178–19183. [\[CrossRef\]](#)
100. Nickel, O.; Laurencin, D.; McCallum, S.A.; Gundberg, C.M.; Vashishth, D. NMR investigation of the role of osteocalcin and osteopontin at the organic-inorganic interface in bone. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2013**, *29*, 13873–13882. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
101. Anderson, D.M.; Maraskovsky, E.; Billingsley, W.L.; Dougall, W.C.; Tometsko, M.E.; Roux, E.R.; Teepe, M.C.; DuBose, R.F.; Cosman, D.; Galibert, L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* **1997**, *390*, 175–179. [\[CrossRef\]](#)
102. Hofbauer, L.C.; Schoppet, M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* **2004**, *292*, 490–495. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
103. Mosheimer, B.A.; Kaneider, N.C.; Feistritz, C.; Djanani, A.M.; Stum, D.H.; Patsch, J.R.; Wiedermann, C.J. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 2964–2971. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Kong, Y.Y.; Yoshida, H.; Sarosi, I.; Tan, H.L.; Timms, E.; Capparelli, C.; Morony, S.; Oliveira-dos-Santos, A.J.; Van, G.; Itie, A.; et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **1999**, *397*, 315–323. [\[CrossRef\]](#)
105. Takayanagi, H.; Kim, S.; Koga, T.; Nishina, H.; Ishiki, M.; Yoshida, H.; Saiura, A.; Isobe, M.; Yokochi, T.; Inoue, J.I.; et al. Induction and Activation of the Transcription Factor NFATc1 (NFAT2) Integrate RANKL Signaling in Terminal Differentiation of Osteoclasts. *Dev. Cell* **2002**, *3*, 889–901. [\[CrossRef\]](#)
106. Mizuno, A.; Amizuka, N.; Irie, K.; Murakami, A.; Fujise, N.; Kanno, T.; Sato, Y.; Nakagawa, N.; Yasuda, H.; Mochizuki, S.I.; et al. Severe Osteoporosis in Mice Lacking Osteoclastogenesis Inhibitory Factor/Osteoprotegerin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *247*, 610–615. [\[CrossRef\]](#)
107. Osteoprotegerin. Available online: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/osteoprotegerin/48455> (accessed on 15 September 2019).
108. Tan, K.B.; Harrop, J.; Reddy, M.; Young, P.; Terrett, J.; Emery, J.; Moore, G.; Truneh, A. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* **1997**, *204*, 35–46. [\[CrossRef\]](#)
109. Yasuda, H.; Shima, N.; Nakagawa, N.; Yamaguchi, K.; Kinosaki, M.; Mochizuki, S.I.; Tomoyasu, A.; Yano, K.; Goto, M.; Murakami, A.; et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 3597–3602. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
110. Woo, K.M.; Choi, Y.; Ko, S.H.; Ko, J.S.; Oh, K.O.; Kim, K.K. Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones. *Exp. Mol. Med.* **2002**, *34*, 347–352. [\[CrossRef\]](#)
111. Wright, H.L.; McCarthy, H.S.; Middleton, J.; Marshall, M.J. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.* **2009**, *2*, 56–64. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
112. Kong, Y.Y.; Boyle, W.J.; Penninger, J.M. Osteoprotegerin ligand: A regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol. Today* **2000**, *21*, 495–502. [\[CrossRef\]](#)
113. Jäger, M.; Jennissen, H.P.; Haversath, M.; Busch, A.; Grupp, T.; Sowislok, A.; Herten, M. Intrasturgical Protein Layer on Titanium Arthroplasty Explants: From the Big Twelve to the Implant Proteome. *Proteomics Clin. Appl.* **2019**, *13*, e1800168. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
114. Beck, G.R., Jr.; Zerler, B.; Moran, E. Gene Array Analysis of Osteoblast Differentiation. *Cell Growth Differ.* **2001**, *12*, 61–83. Available online: <http://cgd.aacrjournals.org/cgi/content/full/12/2/61> (accessed on 5 April 2021).

3. Diskussion

Im wässrigen Medium schnell lösliche Oberflächenbeschichtungen sind eine große Herausforderung in der wissenschaftlichen Untersuchung. Viele etablierte Verfahren wie z.B. die *in vitro*-Kultivierung von Zellen oder das Färbeverfahren für eine Immunfluoreszenzmikroskopie (z.B. DAPI-, BrdU-, Alizerin-, Phalloidin-Färbungen) werden durch die Produkteigenschaften des zu untersuchenden Materials limitiert und sind, wenn überhaupt, nur sehr schwierig durchzuführen. Das primäre Studiendesign, das dieser Arbeit zugrunde lag, wurde aufgrund fortlaufender Erkenntnisse notwendigerweise angepasst.

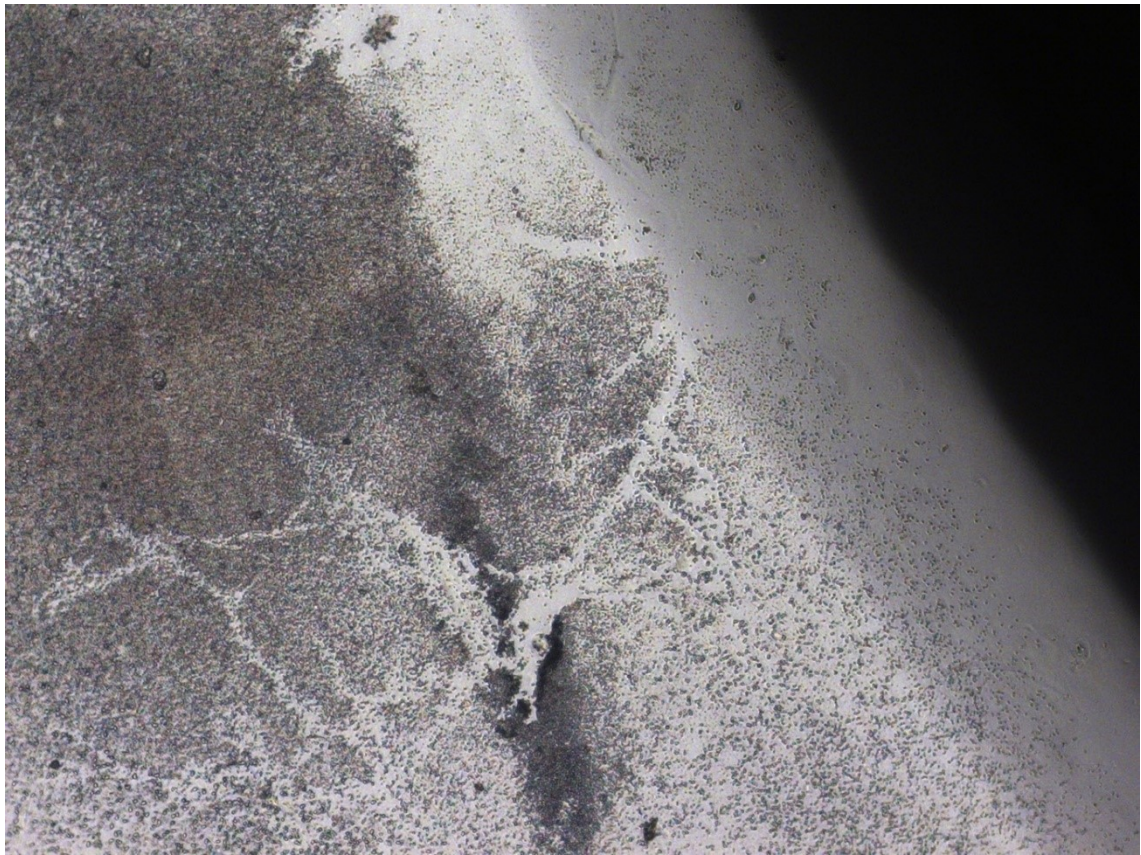


Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Well-Kammerbodens mit einem BONIT® beschichteten Probekörper an Tag 3 der Inkubation. Der oben rechts im Bild entstandene Schatten ist bedingt durch den intransparenten Probekörper aus Titan. Die feinkörnige Struktur (a.e. ein Präzipitat) im linken Bildabschnitt bedeckt den Boden der Wellkammer. Zwischen Präzipitat und Probekörper besteht, bedingt durch die Bewegung des Probekörpers, eine freie nichtbedeckte Fläche.

Während der Kultivierung der MSC zeigte sich bei den Probekörpern, die zusätzlich mit B beschichtet waren, eine nach wenigen Tagen bereits großflächig vorhandene Präzipitatschicht auf dem Boden der Well-Kammern.

(siehe Abb.1) B weist bereits in der Lösungsphase eine hohe Konzentration an Calcium- und Phosphationen auf, ¹⁷⁷ die eine Präzipitation begünstigen können. Wir gehen davon aus, dass diese Schicht ebenfalls auf den Probekörpern vorhanden ist und die darauffolgenden Versuche limitiert hat. Eine durch die DOT GmbH veröffentlichte *in vitro*-Studie befasste sich mit dem Ausfällungsverhalten von B. Die Osteoblasten-Zelllinie MG-63 wurde für 48 h auf einer B-Probe kultiviert. Es zeigte sich, dass die Zellen bereits nach 48 h fast vollständig mit einem feinkristallinen CaP-Präzipitat bedeckt waren. ¹⁷² Dies unterstützt unsere Theorie, dass das Präzipitat in der gesamten Wellkammer und auf dem Probekörper vorzufinden ist.

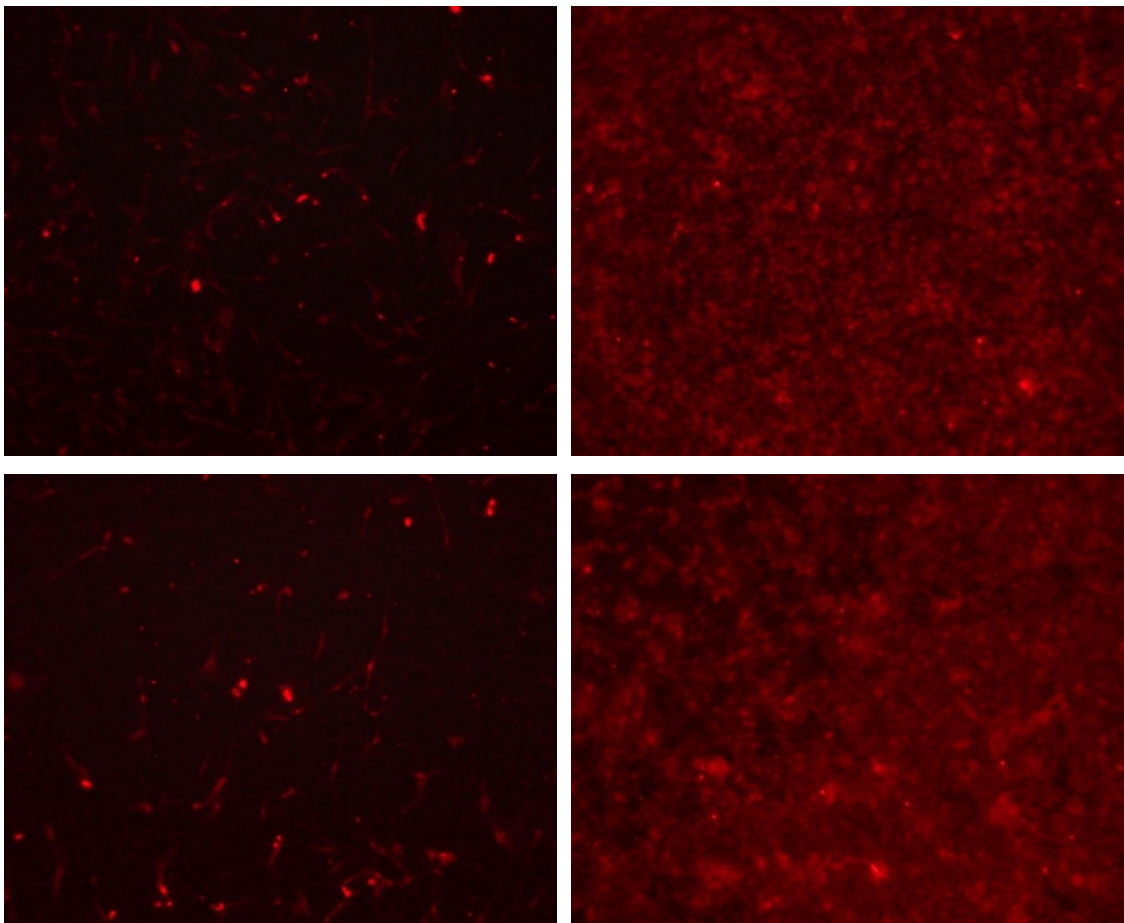


Abb. 2: Alizarin-Immunfluoreszenzmikroskopie der Probeplättchen zum Tag 14. Oben links CT, oben rechts CT+B, unten links DT, unten rechts DT+B. Die Probekörper mit B imponieren im direkten Vergleich mit deren Kontrollkörper deutlich kräftiger in der Färbung. Wir beobachteten, dass die B-Beschichtung auch ohne vorherige *in vitro*-Kultivierung ein ähnliches Bild in der Immunfluoreszenzmikroskopie hat.

Die Untersuchung der Probekörper mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte zunächst vielversprechende Ergebnisse. Bspw. zeigt Abb. 2 Aufnahmen aller

vier Probekörper zum Kinetikzeitpunkt Tag 14 nach Alizarin-Färbung. Die B-Probekörper sind deutlich kräftiger und in ihrer Fläche nahezu vollständig eingefärbt. Das Erscheinungsbild wäre mit unseren PCR-Ergebnissen gut zu interpretieren, allerdings zeigt sich, dass die B-Beschichtung aufgrund ihrer Calciumphosphate auch ohne eine Kultivierung mit MSC eine stark ausgeprägte Fluoreszenz besitzt und sich so nicht vergleichend auswerten lässt. Eine Einfärbung mit Phalloidin, um die Aktinstruktur der Zellen darzustellen, zeigte ähnliches Färbeverhalten. Um proliferative Zellen darzustellen, versuchten wir eine BrdU-Färbung zu etablieren.¹⁷⁸ Im Rahmen der Anfärbung wurden pH-saure Lösungen verwendet, die bereits beim Färbeprozess makroskopisch sichtbare Veränderungen auslösten. Grundsätzlich sind CaP-Beschichtungen säurelöslich.¹⁷⁹ Um Zellkerne darzustellen, wurde zeitgleich eine DAPI-Färbung vorgenommen.¹⁸⁰

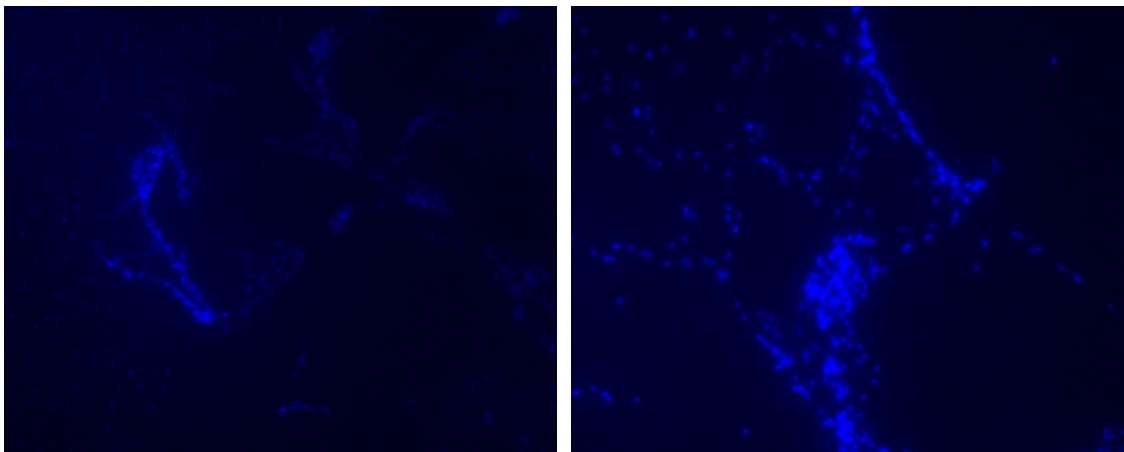


Abb. 3: DAPI-Immunfluoreszenzmikroskopie eines B-Probekörper zum Kinetikpunkt Tag 14 nach zeitgleicher BrdU-Einfärbung. Zu sehen sind die blau fluoreszierenden Zellkerne und scharf abgrenzbare zellfreie Bereiche.

Auf den B-beschichteten Probekörpern konnte kein einheitliches Bild über mehrere Versuchsreihen erzielt werden. Der größte Anteil der Probekörper zeigte keine Zellen, in wenigen Abschnitten sahen wir Phänomene, wie sie in Abb. 3. zu sehen sind. Einerseits wäre dies durch eine Ablösung der Zellen oder der löslichen CaP-Beschichtung, andererseits aber auch durch eine Präzipitationsschicht zu erklären, unter der eine Anfärbung nicht erfolgen kann. Toxische Eigenschaften der B Beschichtung konnten durch die Bioservice Scientific Laboratories GmbH, ausgeschlossen werden (Studien-Nr. 101981.2010). Daher schließen wir ein Zellsterben für die Ursache aus. Eine

weitere Anfärbung erfolgte, bedingt durch einen Mangel an Probeplättchen und Spenderzellen, nicht. Es wäre aber durchaus interessant gewesen, um o.g. Phänomene besser zu verstehen. Andere Arbeiten zeigen, dass eine Anzucht und Färbungen auf CaP-Beschichtungen grundsätzlich möglich sind.^{181 182 183} Zu beachten ist aber, dass unterschiedliche Zusammensetzungen (CaP-Verhältnis) und das Beschichtungsverfahren und das Trägermaterial zu unterschiedlichen Löslichkeiten der Beschichtung führten.

CaP kann die Osteointegration mit natürlichem Knochen durch die Bildung einer Apatitschicht erleichtern.¹⁸⁴ Es bleibt zu klären, ob die Präzipitatschicht aus CaP ebenfalls eine induktive Wirkung hat. Allein unsere Beobachtung klärt nicht, wie sich die Präzipitatschicht auf die durchgeführten Versuche ausgewirkt hat.

Schließlich etablierten wir aufgrund dieser Ergebnisse allerdings eine neue Form in der *in vitro*-Kultivierung, indem wir auf die Probekörper zunächst Zellen aufbrachten, diese dann „auf dem Kopf“ (upside-down) kultivierten und die Kinetikpunkte auf max. 48 Stunden festlegten. Somit konnte sich keine Präzipitatschicht auf den Zellen niederlegen. Wir konnten die Zellen für die Genexpressionsanalyse zugänglich machen. Die Zugänglichkeit war bisher erschwert, die Problemlösung war ein wichtiger Schwerpunkt dieser Arbeit. MSZ verhalten sich je nach Einsatz und Behandlung unterschiedlich.¹⁸⁵ Ob die Upside-down Methode zusätzlich einen signifikanten Unterschied im Zellverhalten ausmacht, bleibt ebenfalls unklar.

Die erhobenen Daten in dieser Arbeit beziehen sich auf MSC, die nicht auf eine definierte Zelllinie zurückzuführen sind. Es handelt sich um eine heterogene Population von Zellen, die ursprünglich aus einer Mischung aus Spongiosa und dem KM stammen. Es können darin MSC und Osteoprogenitorzellen enthalten sein, die standardisiert in unserem Forschungslabor aufgearbeitet wurden. Primär erfüllen wir die erste Eigenschaft der Minimalkriterien zur Definition von hMSCs nach Dominici et al., indem nur plastikadhärente Zellen verwendet wurden.¹⁸⁶ Die Technik ist erprobt und wurde bereits erfolgreich durch die Mitarbeiter der Forschungslabors umgesetzt.¹⁸⁷ Aufgrund der oben genannten Präzipitatschicht waren die Zellen zunächst keiner weiteren Bestimmung der Oberflächenproteine mittels Durchflusszytometrie zugänglich. Limitiert durch die Spenderzellen und Probekörper musste auf eine weitere

Klassifikation verzichtet werden. Das sollte ein Leser dieser Dissertation wissen. Unsere Genexpressionsanalyse weist auf eine osteogene Differenzierung hin. Die Suche nach der idealen zeitlichen Expression von Proteinen für eine perfekte, langfristig stabile Osseointegration von Implantaten bleibt herausfordernd. In der Literatur gibt es kontroverse Aussagen zum Einfluss der CaP-Beschichtungen. Einerseits wird geäußert, dass CaP selbst die Proliferation und osteogene Differenzierung beeinflusst,¹⁸⁸ andererseits wird der osteoinduktive Effekt ausschließlich auf die Oberflächenbeschaffenheit des CaP zurückgeführt.¹⁸⁹ Es ist bekannt, dass nicht nur das Implantatmaterial selbst, sondern auch die Oberflächenstrukturen im Mikro-, Nano- und Subnanomaßstab einen starken Einfluss auf die im Knochen anhaftenden Zellen haben, insbesondere in der Frühphase der Osteogenese.¹⁶⁵ Hentschel zeigte, dass auf der sehr rauen Oberfläche von B deutlich weniger Zellen (USSCs) vorhanden waren als auf den glatteren Vergleichsflächen. Die Zellzahl stieg jedoch mit abnehmender Rauheit an.¹⁷⁶

Unsere Ergebnisse der Genexpressionsanalyse können die Theorie, dass primär auch in diesem Fall eine Differenzierung zu Gunsten einer Zellproliferation stattgefunden hat, indizieren.

Ohne auf die einzelnen Gene einzugehen, zeigt sich in der Übersicht, dass die Probekörper CT und DT nahezu gleiche Expressionsmuster aufweisen. Auch die Proben CT+B und DT+B zeigen sich in allen Expressionen sehr ähnlich. Im Vergleich von CT und DT mit CT+B und DT+B gibt es diverse signifikante Unterschiede, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Dass RUNX2 eine entscheidende und wesentliche Schlüsselrolle in der Differenzierung von Osteoblasten spielt, wurde mehrfach nachgewiesen.^{190,191} RUNX2 spielt auch eine Rolle in der Steigerung der Proliferation von MSC.⁷⁷ Ich konnte zeigen, dass die Expression von RUNX2 durch Zellen auf CT und DT an den frühen kinetischen Punkten im Vergleich zu B deutlich erhöht war. Ob dadurch eher die Proliferation oder die Differenzierung angeregt wurde, kann ich in Gänze nicht beantworten. Unter Kenntnis des Expressionsmusters der weiteren Gene würden wir die Konstellation so bewerten, dass auf CT und

DT eine Tendenz zur Proliferation und auf B eine Differenzierung eingeleitet wurde. RUNX2 wird durch die Zellen der osteogenen Differenzierung gebildet.¹⁹² Es bestimmt vor allem die Differenzierung von MSC in Präosteoblasten. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass auf B ein signifikanter Anstieg von RUNX2 und auf CT und DT eine signifikante geminderte Expression stattfand. Dieser Unterschied kann unsere Theorie weiter festigen. J. Pratap und M. Galindo et al. beschreiben eine ähnliche Beobachtung. Sie wiesen nach, dass RUNX2 herunterreguliert wurde, wenn Stammzellen wieder in die Zellproliferation eintraten.⁷⁶ Mit der in der Literatur beschriebenen Beobachtung lässt sich ableiten, dass die Zellen auf den Kontrollbeschichtungen zunächst eine Proliferation einleiteten, während die Zellen auf B eine Differenzierung einleiteten. Die Adipozyten- und Chondrocytendifferenzierung wird durch RUNX unterdrückt,¹⁹³ wobei letzteres kontrovers gesehen wird.⁷⁷ Da in dieser Studie keine Bestimmung der CD-Oberflächenproteine stattgefunden hat, kann dazu keine Stellung bezogen werden. Ferner spielt RUNX2 in der gesamten Knochenbildung eine große Rolle.¹⁹⁴ Seine Konzentration nimmt von der MSZ zum unreifen Osteoblasten zu, danach wieder ab.⁷⁷ Da wir nur die ersten 48 Stunden nach dem Ausbringen der Zellen untersuchten, eine Zelldifferenzierung hin zum Osteozyten aber deutlich länger braucht, wäre eine weitere Untersuchung mit Ausweitung der Kinetikpunkte interessant. Die Expression von RUNX2 wird durch BMP2 induziert.¹⁹⁵ Der zeitliche Verlauf beider Genexpressionen zeigt ein gegenläufiges Muster. Dies und auch die Eigenschaft, dass RUNX2 *in vitro* COL1A1 fördert,⁷⁷ wird unter den entsprechenden Absätzen zu den einzelnen Genen genauer diskutiert.

COL1A1 ist einer der ersten Marker der osteogenen Differenzierung, zeitgleich zeigt sich auch eine vermehrte Expression von AP, einige Tage später folgt OC.¹⁹⁶ Die Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Expression dieser Marker passt zu unserer Theorie. Unter CT und DT ist der Anstieg von COL1A1 über die Zeit zwar signifikant, eine signifikant höhere Expression von OC ist aber unter B gegeben. Der Unterschied zu den Kontrollen war bei COL1A1 nicht signifikant. Der Unterschied bei OC hingegen zeigte einen höchst signifikanten Unterschied. Auf die Expression von OC folgt die Mineralisierungsphase.¹⁹⁶ Es

ist davon auszugehen, dass eine Mineralisierung unter B früher eintritt. Dieser Effekt könnte eine direkte Kontaktosteogenese verbessern, wenn es zu einer früheren Mineralisierung der Matrix kommt. Dazu wären weitere Untersuchungen notwendig. Eine frühere Mineralisierung verhindert zwar eine weitere Zellmigration, aber es findet eine höhere osteogene Aktivität statt.¹⁹⁷ Bei Brenden et al. zeigte sich darunter ebenfalls eine höhere Expression von OC. Die extrazelluläre Matrix steuert die Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen. Dabei spielt COL1A1 sicher eine wichtige Rolle, ist alleine für sich aber nicht ausreichend, um MSC in die osteoblastische Linie zu lenken.¹⁹⁸ Die Rolle von Kollagen ist in der Kombination mit HA zukunftsweisend und kann im Tissue engineering von großer Bedeutung sein.¹⁹⁹ Ausreichend CaP-Ionen und HA finden sich bei B, dies macht die Beschichtung weiter interessant. Diese Kombination kann zu dem Effekt einer früheren Mineralisierungsbestrebung und so zur früheren Einleitung der Differenzierung von MSC führen.

Da RUNX2 einen Einfluss auf die Expression von COL1A1 hatte, gehen wir davon aus, dass die erhöhte Expression in Stunde 12 einen höheren Einfluss auf die Expressionsniveaus von COL1A1 zu den anderen kinetischen Zeitpunkten hatte. Der Zeitverlauf der Expression zeigt den Anstieg der Expression in CT und DT. Der Anstieg der COL1A1 Expression ist unter CT und DT signifikanter ausgeprägt als auf B, bei der nur eine Kontrollgruppe das Signifikanzniveau erreichte. Da COL1A1 zunehmend von frühen Osteoprogenitorzellen sezerniert wird,⁷⁴ gehen wir davon aus, dass sich auf CT und DT mehr Vorläuferzellen befinden als auf B.

Auch wenn der Zeitpunkt und die Zelllinie unterschiedlich waren, ist anzumerken, dass die DOT GmbH eine Zelldifferenzierungsstudie veröffentlicht hat, die eine erhöhte Kollagensynthese nach 10 Tagen mit einer Osteoblasten-Zelllinie (hFOB1.19) zeigte.¹⁷² Innerhalb der ersten 48 Stunden zeigte unsere Genexpressionsanalyse mit MSC ein gegenteiliges Ergebnis.

Die AP wird in der Literatur als ein wichtiger Marker der osteogenen Differenzierung genannt. Sie fördert die Mineralisierung.²⁰⁰ Unter B wurde im Vergleich zu den Kontrollplatten durchgehend und zur 48. Stunde signifikant

weniger AP produziert. Es zeigte sich allerdings ein ähnliches zeitliches Expressionsmuster wie bei den Kontrollbeschichtungen. Lynch et al. beschreiben, wie die Expression und Aktivität von AP durch Kollagen gefördert wird.⁸² Diese Beobachtung ist mit unseren Ergebnissen vereinbar. Sie könnte ein Zeichen dafür sein, dass CT und DT eine kollagene Knochenmatrix fördern. Diese Ergebnisse könnten durch eine schnellere Differenzierung der Zellen auf B erklärt werden. Unter Berücksichtigung anderer Markergene lässt sich die Beobachtung durch eine kürzere osteoblastisch-sekretorische Phase auf B erklären. Generell ist die AP aber ein Enzym, das zwar während der gesamten Heilungsphase nachweisbar ist, aber besonders in der Phase der Mineralisierung auftritt (nach 14 Tagen).²⁰¹ Da wir die ersten 48 Stunden betrachten, kann der Zeitpunkt für eine erhöhte AP-Phase zu kurz sein. Wir wiesen aber auch vermehrt OPN und OC, zwei Marker einer späten Phase, nach. Daher würde ich eine erhöhte AP hier eigentlich auch erwarten.

ON ist ein nicht-kollagenes Matrixprotein und steht in enger Verbindung zu Kollagen.⁸⁴ Somit ist es ein wichtiger Bestandteil des Bindegewebes.²⁰² Dass deren Expression unter CT und DT erhöht war, kann für die vermehrte Bildung einer kollagenen Knochenmatrix sprechen. Zumindest ist das Expressionsmuster der Kontrollplättchen ähnlich der COL1A1-Expression, so dass hier ein direkter Zusammenhang zu vermuten ist. Eine signifikante Erhöhung unter B zeigte sich nach 48 Stunden nicht. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich eine signifikant geringere Expression. Bei Abwesenheit von ON wird eine geringere Kollagenmatrix aufgebaut, zu viel ON führt zu einer übermäßigen Kollagenablagerung.²⁰³ Es ist denkbar, dass eine geringere Expression einen positiven Einfluss in der Kontaktosteogenese hat, so dass der originale Knochen ohne bindegewebige Strukturen sich direkt mit dem Implantat verbinden kann. Weiter gibt es in der Literatur Hinweise, dass bei der *in vitro*-Kultivierung von matrixbildenden Osteoblasten durchgehend konstante mRNA-Konzentrationen gemessen wurden.²⁰⁴ Dies kann bei der Interpretation der Daten aber nicht nur für die B-Beschichtung gültig sein und müsste auf alle Probekörper angewendet werden.

Die Rolle von IGF1 während der frühen Differenzierung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Koch et al. postulieren, dass jüngere Erkenntnisse einer nicht ausreichenden Messtechnik geschuldet seien.²⁰⁵ Sie widerlegen die Behauptung von Walsh et al., dass IGF1 keinen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von MSC habe.²⁰⁶ So zeigen sie mittels qRT-PCR, dass IGF1 die Expression von COL1A1, RUNX2 und AP in MSC hochreguliert und daher einen Einfluss auf die frühe osteogene Differenzierung besitzt.²⁰⁵

Wir konnten keinen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen den verschiedenen Beschichtungen feststellen. Der zeitliche Verlauf der Expression war bei allen getesteten Beschichtungen gleich. Walsh et al. beobachteten in ihrer Studie, dass IGF1 keinen Einfluss auf die Expression von AP hatte.²⁰⁶ Das durch uns per qRT-PCR gemessene Expressionsmuster von IGF1 ist dem der AP gleich. Ob nun die AP die IGF1- oder die IGF1 die AP-Expression beeinflusst, bleibt hier ungeklärt, scheint aufgrund der Ergebnisse aber auch weniger relevant zu sein. Es gibt zudem ausreichend Studien, die aufzeigen, dass IGF1 wichtig für die Zellproliferation und Differenzierung ist.²⁰⁷ und der IGF1-Spiegel mit der Knochenmasse korreliert.²⁰⁸ Da in dieser Studie die frühe Phase betrachtet wird, wäre eine weitere Untersuchung mit längeren Kinetikzeiten interessant.

Dass BMP2 eine Schlüsselrolle in der osteogenen Differenzierung von MSC einnimmt, ist nicht mehr zu bestreiten und klinisch von relevanter Bedeutung. Im Tissue engineering wird BMP2 vielfältig als Wachstumsfaktor für die Neubildung von Knochen verwendet.²⁰⁹ Es steigert die Knochenbildungsrate.²¹⁰ Wir beobachteten, dass B die Expression von BMP2 signifikant beeinflusste. Zu jedem Zeitpunkt wurde deutlich mehr BMP2 von den Zellen auf den B Probenplättchen exprimiert. Dies kann als ein Zeichen für eine höhere Differenzierungsaktivität gewertet werden. BMP2 fördert ebenfalls die Angiogenese,²¹¹ ein in der Knochenbildung und Heilung wichtiger Prozess. Der Zeitverlauf deutet darauf hin, dass B bereits in den ersten Stunden einen Einfluss auf die Differenzierung hat und die Differenzierung über 48 h nachhaltiger stimuliert. Die alleinige Anwesenheit von BMP2 fördert bereits die osteogene Differenzierung.²¹² Daher sprechen wir dieser Genexpression hohe Bedeutung zu. Auf den Vergleichsschichten CT und DT wurde nach 48 h nur

noch bis zu einem Zehntel BMP2 exprimiert. Der hohe Unterschied ist vor allem auf den schnellen Rückgang der BMP2-Expression in den Kontrollplatten zurückzuführen. Eine Expression geht ebenfalls mit einer erhöhten Mineralisierung einher.²¹³ BMP2 fördert die Osteoblastenproliferation in den ersten Tagen stärker als Kollagen.²¹³ Dies bestärkt unsere Theorie, dass unter B eine Differenzierung und Mineralisierung eingeleitet wird. Die Knochenresorption wird durch BMP2 angeregt.²¹⁴ Es ist vorstellbar, dass die schnell lösliche Phase (Bruskit) der CaP-Beschichtung mit dafür verantwortlich ist und die Zellen bestrebt sind, das Überangebot von CaP frühzeitig zu nutzen. Da die zeitliche Expression bei allen Probesträttchen ähnlich ist, gehen wir davon aus, dass mehrere Faktoren die erhöhte Expression unter B verursachten.

Die Genexpressionsanalyse von OPN ist sehr eindrucksvoll. Von Stunde 24 auf Stunde 48 kam es zu einem hoch signifikanten Anstieg auf den B Beschichtungen. Der Unterschied zu den Kontrollen zeigte ebenfalls eine signifikant höhere Expression. Es wird beschrieben, dass OPN ein wichtiger Marker für die osteogene Differenzierung ist²¹⁵ und eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung einnimmt.²¹⁶ Das durch uns beschriebene Expressionsmuster passt zu der Theorie, dass unter B eine frühere Mineralisierung initiiert wurde. Die in der Literatur beschriebene biphasische Expression, zunächst während der Differenzierung und dann bei der Matrixbildung,^{217 218} konnten wir nicht nachweisen, allerdings ist dabei unser kurzer Untersuchungszeitraum zu berücksichtigen. OPN steuert die Bildung und das Wachstum der Knochenmatrix.²¹⁹ Dabei gibt es auch Hinweise, dass die Reifung von Osteoklasten gefördert wird.²²⁰ Osteoblasten synthetisieren dabei RANKL und OPG und tragen damit zur Regulierung der osteoklastischen Aktivitäten bei der Knochenresorption bei.²²¹ Dieser Aspekt ist für einen Knochen in der Phase des Remodeling von Bedeutung und würde weiter unsere Theorie unterstützen.

Während der *in vitro*-Kultivierung haben wir die Probestkörper „upside-down“ kultiviert. Es wird beschrieben, dass OPN unterschiedliche Osteoblastenreaktionen unter mechanischem Stress reduziert.²²² Ob die Form der Kultivierung für die Zellen ein Stressfaktor ist, bleibt unklar und müsste separat untersucht werden.

Aktuelle Forschungsarbeiten beschreiben für das speziell in Osteoblasten gebildete ²²³ OC die Funktion, dass es an der Regulierung der Knochenqualität beteiligt ist, indem es biologisches Apatit parallel zu den Kollagenfibrillen ausrichtet. ²²⁴ Es wird ein Knochen mit höherer Festigkeit gebildet. ²²⁵

Im Vergleich zu den durch uns untersuchten Genexpressionen, zeigte die der OC auf B einen höchst signifikanten Unterschied zu den Kontrollbeschichtungen. Keine andere Expression hatte zur Stunde 48 ein so hohes Signifikanzniveau erreicht. OC wird durch die Expression von RUNX2 gesteuert. ⁷⁷ Unsere Untersuchung zeigten für RUNX2 ein ansteigendes Expressionsmuster. Dies könnte die deutlich höhere Expression von OC auf B erklären. Aber auch das Vorhandensein von einem Überangebot an CaP-Ionen durch die schnell lösliche Phase der B Beschichtung (Bruschit), muss in Betracht gezogen werden, da OC eine hohe Affinität zu Calcium und HA hat. ¹¹¹ Es ist ein Marker der osteoblastären Funktion. Daher gehen wir davon aus, dass die Differenzierung auf B früher eingeleitet wurde, um das Angebot an CaP für eine Matrixmineralisierung zu nutzen. Ob OC direkten Einfluss auf die Mineraldichte hat, ist wissenschaftlich nicht in Gänze geklärt. Es gibt hierzu gegenteilige Meinungen. ²²⁴

Hickey stellt in seiner Arbeit fest, dass höhere Kalziumablagerungen die Kontaktosteogenese durch Stimulierung einer beschleunigten Zementlinienbildung aus undifferenzierten Osteoprogenitorzellen fördern. ¹⁸¹ Es ist vorstellbar, dass unter B und die vorliegende Bindung von Calcium durch OC die Kontaktosteogenese ebenfalls gefördert wird.

RANKL ist eines der wichtigsten Steuerelemente der Osteoblasten und -klasten. Das RANKL/RANK/OPG-System ist von großer Bedeutung für den Knochenerhalt. Dabei sind RANKL und RANK bindende Partner bei Signalübertragungen, durch deren Interaktion ein bidirektionales Signal zur Steuerung der Osteoklasten und Osteoblasten übertragen wird. ²²⁶ RANKL kann durch eine lösliche Form von OPG gehemmt werden. ¹²² Ohne OPG verstärkt sich die durch RANKL/RANK ausgelöste Osteoklasto- und Osteoblastogenese. ²²⁶ Über 48 Stunden zeigt sich ein interessantes Bild beider Marker. Während RANKL zur Stunde 24 (nur auf einer Probe signifikant) zugenommen hatte, zeigte sich bei OPG eine signifikante Abnahme. Weiter

lagen eine nicht signifikante, aber dennoch deutliche Abnahme von RANKL zur Stunde 48 und ein signifikanter Anstieg von OPG vor. Der Knochenabbau und -aufbau sind über RANK/RANKL/OPG miteinander gekoppelt. Auf eine Abbauphase folgt eine Aufbauphase.²²⁷ Wir betrachteten in unserer Studie die ersten 48 Stunden. Eine zeitliche Beschreibung findet sich zu den Phasen nicht. Das Expressionsmuster kann sich aber durch diese Theorie erklären lassen. Die signifikant höhere Expression von RANKL unter B kann weiter die Theorie der früheren Differenzierung unterstützen, da auch in frühen Phasen die Expression von RANKL die Zellen der osteoblastären Vorläufer fördert.²²⁸ Die Interaktion von Osteoblasten und Osteoklasten ist wichtig für katabole und anabole Prozesse im Knochenstoffwechsel.

Zu den Einschränkungen dieser Studie gehört die Tatsache, dass sich die Expressionsmuster in vivo unterscheiden können, wenn andere lokale Proteine vorhanden sind und unterschiedliche Auswirkungen auf die untersuchten Zellen haben können. Dies liegt daran, dass bereits zwei Minuten nach der Implantation eines Titanimplantats mehr als 2800 verschiedene Proteine auf der Oberfläche nachweisbar sind.²²⁹ Außerdem wurde nur der kurze Zeitraum von 48 Stunden beobachtet, der nicht den gesamten Prozess der Osteoblastendifferenzierung abdeckt, welcher normalerweise mindestens 21 Tage dauert.²³⁰

Der Leser sollte daher beachten, dass in dieser Studie nur die proliferative Phase und die anfängliche Matrixablagerung berücksichtigt wurden.

Der Gesundheitszustand und das Alter von Patienten und -innen haben Einfluss auf die Qualität und Wirksamkeit von Stammzellen.²³¹ Es wäre interessant zu wissen, ob das hier beschriebene Genexpressionsmuster auch bei älteren Patienten und -innen vorliegt. Es könnte Entscheidungshilfe für die Auswahl bei der klinischen Versorgung mit Implantaten sein.

Wir haben eine neue Methode entwickelt, die die Kultivierung von humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSCs) auf der löslichen Beschichtung BONIT® für die Genexpressionsanalyse ermöglicht. CaP-Beschichtungen

wirken sich in ihrer Weise (Rauigkeit, Angebot von CaP-Ionen) multifaktoriell auf MSC und dessen Proliferations- und Differenzierungsverhalten aus. Sie sind mit ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften Multitalente in der Implantologie.

Diese Studie beschreibt ein definiertes Genexpressionsmuster des Knochenstoffwechsels, das zum Verständnis des Einflusses dieser CaP-Beschichtung auf die frühe Phase der Osseointegration beiträgt. BONIT® ist in seiner Gesamtheit zu bewerten.

Ob nun die Löslichkeit der Beschichtung, als Quelle für CaP-Ionen, oder die vergrößerte Oberfläche, die sämtliche Stoffe binden kann und in direktem Kontakt mit den Zellen steht, für das Expressionsmuster der aufgeführten Marker verantwortlich ist, bleibt weiter unklar.

BONIT® hat aber eine signifikante Wirkung auf die Genexpression von hMSCs, sogar wenige Stunden nach Zellkontakt.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass BONIT® das Differenzierungsverhalten von hMSCs bereits in der Proliferations- und Matrixphase stimuliert. Trotz des kurzen Untersuchungszeitraums in unserer *in vitro*-Studie kann so von einer frühen Entwicklung von Osteozyten ausgegangen werden.

4. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Wie funktionieren die Knochen? gesundheitsinformation.de. Accessed February 1, 2023. <https://www.gesundheitsinformation.de/wie-funktionieren-die-knochen.html>
2. Chiras DD. *Human Body Systems: Structure, Function, and Environment*. Jones & Bartlett Publishers; 2013.
3. Rainer Flindt. *Amazing Numbers in Biology*. Springer Science & Business Media; 2006.
4. Driscoll P. Gray's Anatomy, 39th Edition. *Emerg Med J*. 2006;23(6):492. doi:10.1136/emj.2005.027847
5. Buckwalter JA, Cooper RR. Bone structure and function. *Instr Course Lect*. 1987;36:27-48.
6. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005;105(7):2631-2639. doi:10.1182/blood-2004-06-2480
7. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(Suppl 3):S131-S139. doi:10.2215/CJN.04151206
8. Palastanga N, Soames R. *Anatomie und menschliche Bewegung: Strukturen und Funktionen*. Elsevier, Urban&Fischer Verlag; 2014.
9. Kugler P. *Der menschliche Körper: Anatomie Physiologie Pathologie*. Elsevier Health Sciences; 2021.
10. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen*. Georg Thieme Verlag; 2006.
11. Luis Carlos Junqueira, Jose Carneiro. *Basic Histology: Text Und Atlas*,. 10th ed. McGraw-Hill/Appleton⟪ 2002.
12. Kirchner H, Mühlhäußer J. *Basics Biochemie*. Elsevier Health Sciences; 2009.
13. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Springer-Verlag; 2007.
14. Kassem M, Abdallah BM, Saeed H. Osteoblastic cells: Differentiation and trans-differentiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008;473(2):183-187. doi:10.1016/j.abb.2008.03.028
15. Krause CFT. *Handbuch der menschlichen Anatomie v. 1, 1876*. Hahn'sche Buchhandlung; 1876.
16. Liebich HG. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. Schattauer Verlag; 2004.
17. Krause WJ. *The Art of Examining and Interpreting Histologic Preparations: A Laboratory Manual and Study Guide for Histology*. Universal-Publishers; 2004.
18. Eroschenko VP. *DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
19. Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. *Funktionelle Histologie: kurzgefaßtes Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen nach funktionellen Gesichtspunkten ; mit 24 Tabellen*. Schattauer Verlag; 2000.
20. Gruber R, Stadlinger B. *Kommunikation der Zellen: Zellatlas – Visualisierte Biologie in der oralen Medizin*. Quintessenz Verlag; 2022.
21. Schünke M. *Funktionelle Anatomie - Topographie und Funktion des Bewegungssystems*. Georg Thieme Verlag; 2000.
22. Baur R. *CompactLehrbuch Anatomie: in 4 Bänden*. Schattauer Verlag; 2004.
23. Drews U. *Taschenatlas der Embryologie*. Georg Thieme Verlag; 2006.
24. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. Springer-Verlag; 2013.
25. Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP, McNamara LM. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater*. 2012;23:13-27. doi:10.22203/ecm.v023a02
26. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 265th ed. De Gruyter; 2013.

27. Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler: 74 Tabellen*. Georg Thieme Verlag; 2006.
28. Heinemann T. *Klonieren beim Menschen: Analyse des Methodenspektrums und internationaler Vergleich der ethischen Bewertungskriterien*. Walter de Gruyter; 2012.
29. Gerok W. *Die innere Medizin : Referenzwerk für den Facharzt*. Schattauer Verlag; 2007.
30. Moore KL, Persaud TVN. *Embryologie: Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik*. Elsevier, Urban&Fischer Verlag; 2007.
31. Fioroni P. *Allgemeine und vergleichende Embryologie der Tiere*. Springer-Verlag; 2013.
32. Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. *Funktionelle Embryologie: die Entwicklung der Funktionssysteme des menschlichen Organismus ; mit 9 Tabellen*. Schattauer Verlag; 2006.
33. Krukemeyer MG. *Chirurgische Forschung*. Georg Thieme Verlag; 2005.
34. ESchG - Gesetz zum Schutz von Embryonen. Accessed February 2, 2023. <https://www.gesetze-im-internet.de/eschg/BJNR027460990.html>
35. Jäger M, Sager M, Knipper A, et al. In-vitro- und In-vivo-Knochenregenerierung durch mesenchymale Stammzellen aus dem Nabelschnurblut. *Der Orthopäde*. 2004;33(12):1361-1372.
36. Krampera M, Franchini M, Pizzolo G, Aprili G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfus*. 2007;5(3):120-129. doi:10.2450/2007.0029-07
37. Friedenstein AJ, Ivanov-Smolenski AA, Chajlakjan RK, et al. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Experimental Hematology*. 1978;6(5):440-444.
38. Baunach M. *Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen und Applikation in der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis*. Cuvillier Verlag; 2014.
39. Henry JP, Bordoni B. Histology, Osteoblasts. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2022. Accessed February 2, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557792/>
40. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell*. 2007;131(2):324-336. doi:10.1016/j.cell.2007.08.025
41. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*. 1987;20(3):263-272. doi:10.1111/j.1365-2184.1987.tb01309.x
42. Nahian A, Davis DD. Histology, Osteoprogenitor Cells. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2022. Accessed February 2, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559160/>
43. Xu J, Wang Y, Hsu CY, et al. Human perivascular stem cell-derived extracellular vesicles mediate bone repair. *Elife*. 2019;8:e48191. doi:10.7554/eLife.48191
44. Clines GA. Prospects for osteoprogenitor stem cells in fracture repair and osteoporosis. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(1):73-78. doi:10.1097/MOT.0b013e328333d52c
45. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:3-12. doi:10.1016/j.abb.2014.05.003
46. Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(3):325-328. doi:10.2174/1568010054022015
47. Ottewell PD. The role of osteoblasts in bone metastasis. *J Bone Oncol*. 2016;5(3):124-127. doi:10.1016/j.jbo.2016.03.007
48. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):201-209. doi:10.1016/j.abb.2008.03.027
49. Roeder E, Matthews BG, Kalajzic I. Visual reporters for study of the osteoblast lineage. *Bone*. 2016;92:189-195. doi:10.1016/j.bone.2016.09.004

50. Thiel A, Reumann MK, Boskey A, Wischmann J, von Eisenhart-Rothe R, Mayer-Kuckuk P. Osteoblast migration in vertebrate bone. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2018;93(1):350-363. doi:10.1111/brv.12345
51. Jones SJ, Boyde A. The migration of osteoblasts. *Cell Tissue Res.* 1977;184(2):179-193. doi:10.1007/BF00223067
52. Berg F van den. *Angewandte Physiologie*. Georg Thieme Verlag; 2003.
53. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(1):5-24. doi:10.1007/s00223-013-9790-y
54. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011;17(10):1231-1234. doi:10.1038/nm.2452
55. Goldring SR. The osteocyte: key player in regulating bone turnover. *RMD Open.* 2015;1(Suppl 1):e000049. doi:10.1136/rmdopen-2015-000049
56. Kurth A, Lange U. *Fachwissen Osteologie*. Elsevier Health Sciences; 2018.
57. Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A. The Great Beauty of the osteoclast. *Arch Biochem Biophys.* 2014;558:70-78. doi:10.1016/j.abb.2014.06.017
58. Ono T, Nakashima T. Recent advances in osteoclast biology. *Histochem Cell Biol.* 2018;149(4):325-341. doi:10.1007/s00418-018-1636-2
59. Minuth WW, Strehl R, Schumacher K. *Zukunftstechnologie Tissue Engineering: Von Der Zellbiologie Zum Künstlichen Gewebe*. John Wiley & Sons; 2012.
60. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie: Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Springer-Verlag; 2013.
61. Baron R. Polarity and Membrane Transport in Osteoclasts. *Connective Tissue Research.* 1989;20(1-4):109-120. doi:10.3109/03008208909023879
62. *Endspurt Vorklinik: Biologie: Die Skripten fürs Physikum*. Georg Thieme Verlag; 2015.
63. Buselmaier W. *Biologie für Mediziner*. Springer-Verlag; 2006.
64. Brochhausen C, Lehmann M, Zehbe R, et al. [Tissue engineering of cartilage and bone : growth factors and signaling molecules]. *Orthopäde.* 2009;38(11):1053-1062. doi:10.1007/s00132-009-1496-5
65. Brochhausen C, Lehmann M, Zehbe R, et al. Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle zur Anwendung im „Tissue Engineering“. *Orthopäde.* 2009;38(11):1053. doi:10.1007/s00132-009-1496-5
66. Rutkovskiy A, Stenslækken KO, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med Sci Monit Basic Res.* 2016;22:95-106. doi:10.12659/MSMBR.901142
67. Singh C, Roy-Chowdhuri S. Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods Mol Biol.* 2016;1392:161-176. doi:10.1007/978-1-4939-3360-0_15
68. Green MR, Sambrook J. Analysis and Normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experimental Data. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(10). doi:10.1101/pdb.top095000
69. Harshitha R, Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem Mol Biol Educ.* 2021;49(5):800-812. doi:10.1002/bmb.21552
70. Jozefczuk J, Adjaye J. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. *Methods Enzymol.* 2011;500:99-109. doi:10.1016/B978-0-12-385118-5.00006-2
71. Eggert A, Bühren BA, Schrupp H, et al. Influence of a Calcium Phosphate Coating (BONIT®) on the Proliferation and Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stroma Cells in the Early Phase of Bone Healing. *J Funct Biomater.* 2022;13(4):176. doi:10.3390/jfb13040176
72. Otto F, Thornell AP, Crompton T, et al. Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell.* 1997;89(5):765-771. doi:10.1016/S0092-8674(00)80259-7
73. Komori T. Molecular Mechanism of Runx2-Dependent Bone Development. *Mol Cells.* 2020;43(2):168-175. doi:10.14348/molcells.2019.0244

74. Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci.* 2007;12:3068-3092.
75. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997;89(5):747-754. doi:10.1016/s0092-8674(00)80257-3
76. Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, et al. Cell Growth Regulatory Role of Runx2 during Proliferative Expansion of Preosteoblasts. *Cancer Res.* 2003;63(17):5357-5362.
77. Komori T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):1694. doi:10.3390/ijms20071694
78. COL1A1 collagen type I alpha 1 chain [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Accessed September 14, 2019.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&dopt=default&rn=1&list_uids=1277
79. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:403-434. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.002155
80. Vuorio E, de Crombrughe B. The family of collagen genes. *Annu Rev Biochem.* 1990;59:837-872. doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.004201
81. Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone Injury and Fracture Healing Biology. *Biomedical and Environmental Sciences.* 2015;28(1):57-71. doi:10.3967/bes2015.006
82. Lynch MP, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The Influence of Type I Collagen on the Development and Maintenance of the Osteoblast Phenotype in Primary and Passaged Rat Calvarial Osteoblasts: Modification of Expression of Genes Supporting Cell Growth, Adhesion, and Extracellular Matrix Mineralization. *Experimental Cell Research.* 1995;216(1):35-45. doi:10.1006/excr.1995.1005
83. Harris H. The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. *Clinica Chimica Acta.* 1990;186(2):133-150. doi:10.1016/0009-8981(90)90031-M
84. Bradshaw AD. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(3):480-488. doi:10.1016/j.biocel.2011.12.021
85. Delany AM, Hankenson KD. Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling. *J Cell Commun Signal.* 2009;3(3-4):227-238. doi:10.1007/s12079-009-0076-0
86. Barker TH, Baneyx G, Cardó-Vila M, et al. SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity. *J Biol Chem.* 2005;280(43):36483-36493. doi:10.1074/jbc.M504663200
87. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1981;26(1 Pt 1):99-105. doi:10.1016/0092-8674(81)90037-4
88. Jansen M, Schaik FMA van, Ricker AT, et al. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature.* 1983;306(5943):609-611. doi:10.1038/306609a0
89. Thrailkill KM, Lumpkin CK, Bunn RC, Kemp SF, Fowlkes JL. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289(5):E735-745. doi:10.1152/ajpendo.00159.2005
90. Evans PR. Leprechaunism. *Arch Dis Child.* 1955;30(154):479-483. doi:10.1136/adsc.30.154.479
91. Zhang W, Shen X, Wan C, et al. Effects of insulin and insulin-like growth factor 1 on osteoblast proliferation and differentiation: differential signalling via Akt and ERK. *Cell Biochemistry and Function.* 2012;30(4):297-302. doi:10.1002/cbf.2801
92. Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, et al. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *The EMBO Journal.* 1990;9(7):2085-2093. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb07376.x
93. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988;242(4885):1528-1534. doi:10.1126/science.3201241

94. Urist MR. Bone: Formation by Autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-899. doi:10.1126/science.150.3698.893
95. Urist MR, Strates BS. Bone Morphogenetic Protein. *J Dent Res*. 1971;50(6):1392-1406. doi:10.1177/00220345710500060601
96. Meyer RA, Meyer MH, Phieffer LS, Banks DM. Delayed union of femoral fractures in older rats: decreased gene expression. *BMC Musculoskelet Disord*. 2001;2(1):2. doi:10.1186/1471-2474-2-2
97. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*. 2005;36(3):S5-S7. doi:10.1016/j.injury.2005.07.027
98. Yuasa T, Kataoka H, Kinto N, et al. Sonic hedgehog is involved in osteoblast differentiation by cooperating with BMP-2. *Journal of Cellular Physiology*. 2002;193(2):225-232. doi:10.1002/jcp.10166
99. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, et al. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature*. 2002;420(6916):636-642. doi:10.1038/nature01245
100. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *The Journal of Cell Biology*. 1994;127(6):1755-1766. doi:10.1083/jcb.127.6.1755
101. Dijke P, Fu J, Schaap P, Roelen B. SIGNAL TRANSDUCTION OF BONE MORPHOGENETIC PROTEINS IN OSTEOBLAST DIFFERENTIATION. *The Journal of Bone and Joint Surgery-american Volume*. 2003;85:34-38.
102. James AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica*. 2013;2013:e684736. doi:10.1155/2013/684736
103. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J*. 1993;7(15):1475-1482.
104. Rodan GA. Osteopontin overview. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;760:1-5. doi:10.1111/j.1749-6632.1995.tb44614.x
105. Morinobu M, Ishijima M, Rittling SR, et al. Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *J Bone Miner Res*. 2003;18(9):1706-1715. doi:10.1359/jbmr.2003.18.9.1706
106. Hunter GK. Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation. *Calcif Tissue Int*. 2013;93(4):348-354. doi:10.1007/s00223-013-9698-6
107. Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner*. 1993;22(2):147-159.
108. Bidlingmaier M. Osteocalcin. In: Gressner AM, Arndt T, eds. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Reference Medizin. Springer Berlin Heidelberg; 2019:1797-1798. doi:10.1007/978-3-662-48986-4_2318
109. Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. *Cell*. 1997;89(5):755-764. doi:10.1016/S0092-8674(00)80258-5
110. Gundberg CM, Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Osteocalcin: Isolation, characterization, and detection. In: *Methods in Enzymology*. Vol 107. Posttranslational Modifications Part B. Academic Press; 1984:516-544. doi:10.1016/0076-6879(84)07036-1
111. Hauschka PV, Wians FH. Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *The Anatomical Record*. 1989;224(2):180-188. doi:10.1002/ar.1092240208
112. Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone*. 1998;23(3):187-196. doi:10.1016/s8756-3282(98)00092-1

113. van de Loo PG, Soute BA, van Haarlem LJ, Vermeer C. The effect of Gla-containing proteins on the precipitation of insoluble salts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;142(1):113-119. doi:10.1016/0006-291x(87)90458-x
114. Price PA, Williamson MK, Haba T, Dell RB, Jee WS. Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79(24):7734-7738. doi:10.1073/pnas.79.24.7734
115. Poundarik AA, Diab T, Sroga GE, et al. Dilatational band formation in bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(47):19178-19183. doi:10.1073/pnas.1201513109
116. Nikel O, Laurencin D, McCallum SA, Gundberg CM, Vashishth D. NMR investigation of the role of osteocalcin and osteopontin at the organic-inorganic interface in bone. *Langmuir*. 2013;29(45):13873-13882. doi:10.1021/la403203w
117. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997;390(6656):175-179. doi:10.1038/36593
118. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*. 2004;292(4):490-495. doi:10.1001/jama.292.4.490
119. Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, et al. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(5):2964-2971. doi:10.1210/jc.2004-1895
120. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397(6717):315-323. doi:10.1038/16852
121. Takayanagi H, Kim S, Koga T, et al. Induction and Activation of the Transcription Factor NFATc1 (NFAT2) Integrate RANKL Signaling in Terminal Differentiation of Osteoclasts. *Developmental Cell*. 2002;3(6):889-901. doi:10.1016/S1534-5807(02)00369-6
122. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, et al. Severe Osteoporosis in Mice Lacking Osteoclastogenesis Inhibitory Factor/Osteoprotegerin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;247(3):610-615. doi:10.1006/bbrc.1998.8697
123. Osteoprotegerin. Accessed September 15, 2019. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/osteoprotegerin/48455>
124. Tan KB, Harrop J, Reddy M, et al. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene*. 1997;204(1-2):35-46. doi:10.1016/s0378-1119(97)00509-x
125. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(7):3597-3602. doi:10.1073/pnas.95.7.3597
126. Woo KM, Choi Y, Ko SH, Ko JS, Oh KO, Kim KK. Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones. *Exp Mol Med*. 2002;34(5):347-352. doi:10.1038/emmm.2002.51
127. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2009;2(1):56-64. doi:10.1007/s12178-009-9046-7
128. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today*. 2000;21(10):495-502.
129. Jerosch J, Bader A, Uhr G. *Knochen: Curasan-Taschenatlas spezial*. Georg Thieme Verlag; 2002.
130. Jerosch J. *Kurzschaffendoprothesen an der Hüfte*. Springer-Verlag; 2016.
131. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(355 Suppl):S7-21. doi:10.1097/00003086-199810001-00003

132. Khoury F. *Augmentative Verfahren in der Implantologie*. Quintessenz Verlag; 2019.
133. Nefussi JR, Pouchelet M, Collin P, Sautier JM, Develay G, Forest N. Microcinematographic and autoradiographic kinetic studies of bone cell differentiation in vitro: matrix formation and mineralization. *Bone*. 1989;10(5):345-352. doi:10.1016/8756-3282(89)90131-2
134. Nefussi JR, Bami G, Modrowski D, Oboeuf M, Forest N. Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. *J Histochem Cytochem*. 1997;45(4):493-503. doi:10.1177/002215549704500402
135. Nefussi JR, Boy-Lefevre ML, Boulekbache H, Forest N. Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion. *Differentiation*. 1985;29(2):160-168. doi:10.1111/j.1432-0436.1985.tb00310.x
136. Nefussi JR, Casamajor P, Serfaty R, Bolle M, Hugly C, Forest N. Activated adult human alveolar bone cells: a new model of matrix mineralization. *Eur J Oral Sci*. 1998;106 Suppl 1:424-428. doi:10.1111/j.1600-0722.1998.tb02209.x
137. Nefussi JR, Sautier JM, Forest N. [Cell culture model and concept of bone surface]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1993;187(5):620-632.
138. Buenzli PR, Jeon J, Pivonka P, Smith DW, Cummings PT. Investigation of bone resorption within a cortical basic multicellular unit using a lattice-based computational model. *Bone*. 2012;50(1):378-389. doi:10.1016/j.bone.2011.10.021
139. D. Wessinghage. Themistocles Gluck - 100 Jahre künstlicher Gelenkersatz. *Z Orthop Unfall*. 1991;129(5):383-388.
140. Krukemeyer MG, Möllenhoff G. *Endoprothetik: Ein Leitfaden für den Praktiker*. Walter de Gruyter; 2011.
141. Wintermantel E, Ha SW. *Medizintechnik: Life Science Engineering*. Springer Science & Business Media; 2009.
142. *Biokompatibilität*. 2014th ed. Thieme Verlag; 2014. doi:10.1055/b-0034-97442
143. Santaguida PL, Hawker GA, Hudak PL, et al. Patient characteristics affecting the prognosis of total hip and knee joint arthroplasty: a systematic review. *Canadian Journal of Surgery*. 2008;51(6):428.
144. Julian JZ Prokopetz, Elena Losina, Robin L Bliss, John Wright, John A Baron, Jeffrey N Katz. Risk factors for revision of primary total hip arthroplasty: a systematic review. (*BMC*). Published online December 15, 2012. Accessed September 11, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3541060/pdf/1471-2474-13-251.pdf>
145. Claes L, Kirschner P, Perka C, Rudert M. *AE-Manual Der Endoprothetik / Hüfte Und Hüftrevision*. Springer; 2012.
146. National Institute for Health and Care Excellence. *Total Hip Replacement and Resurfacing Arthroplasty for End-Stage Arthritis of the Hip / Technology Appraisal Guidance [TA304]*. NICE; 2014.
147. Aigner RM. *Orthopädie und orthopädische Chirurgie: Becken, Hüfte : 114 Tabellen / hrsg. von Christian Tauschner. Mit Beitr. von R. M. Aigner* Georg Thieme Verlag; 2004.
148. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ*. 2003;67(8):932-949.
149. Kuzyk PRT, Schemitsch EH. The basic science of peri-implant bone healing. *IJOO*. 2011;45(2):108-115. doi:10.4103/0019-5413.77129
150. Berdel P. *Orthopädie und Unfallchirurgie*. Georg Thieme Verlag; 2010.
151. Kluba T. *Taschenlehrbuch Orthopädie und Unfallchirurgie*. Georg Thieme Verlag; 2010.
152. Krukemeyer MG, Möllenhoff G. *Endoprothetik: Ein Leitfaden für den Praktiker*. Walter de Gruyter; 2012.
153. Bram M. *Pulvermetallurgische Herstellung von porösem Titan und von NiTi-Legierungen für biomedizinische Anwendungen*. Forschungszentrum Jülich; 2013.

154. Statistisches Bundesamt Deutschland - GENESIS-Online. Published February 4, 2023. Accessed February 4, 2023. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=12621-0002&zeitscheiben=16&sachmerkmal=ALT577&sachschluessel=ALTVOLL000,ALTVOLL020,ALTVOLL040,ALTVOLL060,ALTVOLL065,ALTVOLL080#abreadcrumb>
155. Grading R, Gollwitzer H. *Ossäre Integration*. Springer Science & Business Media; 2006.
156. Peters KM, König DP, Roth A. *Fortbildung Osteologie 4*. Springer-Verlag; 2018.
157. Kastilan S. Bioverträgliche Oberflächen für Implantate und Prothesen. *Die Welt*. <https://www.welt.de/print-welt/article530246/Biovertraegliche-Oberflaechen-fuer-Implantate-und-Prothesen.html>. Published August 25, 2000. Accessed September 11, 2019.
158. Robert B. Heimann. Entwicklung biokeramischer Beschichtungen für Hüft-Endoprothesen (Teil 1). *TU Contact*. 2004;Teil 1. Accessed September 11, 2019. http://www.gbv.de/dms/clausthal/H_BIB/TUContact/tu_contact/h-15-2004-03.pdf
159. Nöbel D. Untersuchungen zur Osteointegration und Resorbierbarkeit von Implantatbeschichtungen für den Knochenersatz-Eine histologische und histomorphometrische Studie am Tiermodell. Published online 2006.
160. Osborn JF, Newesely H. The material science of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*. 1980;1(2):108-111. doi:10.1016/0142-9612(80)90009-5
161. Piconi, C., Maccauro, G. Review: Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*. 1999;20:1-25.
162. Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1973;7(3):25-42. doi:10.1002/jbm.820070304
163. Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*. 1991;74(7):1487-1510. doi:10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x
164. Wang X, Ito A, Li X, Sogo Y, Oyane A. Signal molecules-calcium phosphate coprecipitation and its biomedical application as a functional coating. *Biofabrication*. 2011;3(2):022001. doi:10.1088/1758-5082/3/2/022001
165. Bai L, Zhao Y, Chen P, et al. Targeting Early Healing Phase with Titania Nanotube Arrays on Tunable Diameters to Accelerate Bone Regeneration and Osseointegration. *Small*. 2021;17(4):2006287. doi:<https://doi.org/10.1002/sml.202006287>
166. Langer R, Vacanti J. Advances in Tissue Engineering. *J Pediatr Surg*. 2016;51(1):8-12. doi:10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022
167. Pearson RG, Bhandari R, Quirk RA, Shakesheff KM. Recent Advances in Tissue Engineering. *J Long Term Eff Med Implants*. 2017;27(2-4):199-231. doi:10.1615/JLongTermEffMedImplants.v27.i2-4.70
168. Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther*. 2010;21(9):1045-1056. doi:10.1089/hum.2010.115
169. Zhao L, Weir MD, Xu HHK. An injectable calcium phosphate-alginate hydrogel-umbilical cord mesenchymal stem cell paste for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;31(25):6502-6510. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.017
170. Sun H, Yang HL. Calcium phosphate scaffolds combined with bone morphogenetic proteins or mesenchymal stem cells in bone tissue engineering. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(8):1121-1127. doi:10.4103/0366-6999.155121
171. Kim HD, Amirthalingam S, Kim SL, Lee SS, Rangasamy J, Hwang NS. Biomimetic Materials and Fabrication Approaches for Bone Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(23). doi:10.1002/adhm.201700612
172. DOT GmbH. Schnelleres Einheilen durch die elektrochemische Calciumphosphat-Beschichtung BONIT (R). Accessed September 11, 2019. <https://www.dot-coating.de/images/pdf/beschichtungen/ortho/Elektrochemische-Calciumphosphat-Beschichtung-BONIT.pdf>

173. Szmukler-Moncler, Serge, Perrin D, Ahossi V, Pointaire P. Evaluation of BONIT®, a Fully Resorbable CaP Coating Obtained by Electrochemical Deposition, After 6 Weeks of Healing: A Pilot Study in the Pig Maxilla. *Key Engineering Materials - KEY ENG MAT*. 2001;192-195:395-398. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.192-195.395
174. Becker P, Zeggel P, Lüthen F, Nebe B, Rychly J, Neumann HG. Resorbable Calcium Phosphate Composite Coatings. *KEM*. 2001;218-220:653-656. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.218-220.653
175. Hegenbarth, A. *Modifizierung Der Oberfläche von Implantaten Zur Optimierung Der Osseointegration - Charakterisierung von Herstellungsverfahren Und Schichteigenschaften. (Bacheloarbeit)*. Fachhochschule Osnabrück, Fakultät Ingenieurwissenschaften und Informatik; 2009.
176. Michael Hentschel. *Untersuchung von Vorläuferzellen in Abhängigkeit von Dekorierten, Sowie Nicht Dekorierten Implantatoberflächen Als Wachstumsunterlage*. Ernst-Moritz-Arndt-Universität; 2013. Accessed September 12, 2019. https://epub.ub.uni-greifswald.de/frontdoor/deliver/index/docId/1364/file/Diss_Hentschel_Michael_Bibliothek_FV_UV.pdf
177. Dr. Sergey V. Dorozkhin, Prof. Dr. Matthias Eppele. Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. 2002;Angewandte Chemie 116(116):3260-3277.
178. Matatall KA, Kadmon CS, King KY. Detecting Hematopoietic Stem Cell Proliferation Using BrdU Incorporation. *Methods Mol Biol*. 2018;1686:91-103. doi:10.1007/978-1-4939-7371-2_7
179. Eppele M. *Biomaterialien und Biomineralisation: Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure*. Springer-Verlag; 2013.
180. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem*. 1995;70(5):220-233. doi:10.3109/10520299509108199
181. Hickey DJ, Lorman B, Fedder IL. Improved response of osteoprogenitor cells to titanium plasma-sprayed PEEK surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;175:509-516. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.12.037
182. He W, Andersson M, de Souza PPC, et al. Osteogenesis-inducing calcium phosphate nanoparticle precursors applied to titanium surfaces. *Biomed Mater*. 2013;8(3):035007. doi:10.1088/1748-6041/8/3/035007
183. Dubus M, Rammal H, Alem H, et al. Boosting mesenchymal stem cells regenerative activities on biopolymers-calcium phosphate functionalized collagen membrane. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;181:671-679. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.06.021
184. Alves Cardoso D, Jansen JA, Leeuwenburgh SCG. Synthesis and application of nanostructured calcium phosphate ceramics for bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(8):2316-2326. doi:10.1002/jbm.b.32794
185. Caplan AI. Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem Cells Int*. 2015;2015:628767. doi:10.1155/2015/628767
186. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
187. Pilge H, Fröbel J, Mrotzek SJ, et al. Effects of thromboprophylaxis on mesenchymal stromal cells during osteogenic differentiation: an in-vitro study comparing enoxaparin with rivaroxaban. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2016;17(1):108. doi:10.1186/s12891-016-0966-2
188. Wang P, Zhao L, Liu J, Weir MD, Zhou X, Xu HHK. Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells. *Bone Res*. 2014;2:14017. doi:10.1038/boneres.2014.17
189. Xiao D, Zhang J, Zhang C, et al. The role of calcium phosphate surface structure in osteogenesis and the mechanisms involved. *Acta Biomater*. 2020;106:22-33. doi:10.1016/j.actbio.2019.12.034

190. Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Hum Gene Ther.* 2010;21(10):1226-1238. doi:10.1089/hum.2010.173
191. Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation.* 2016;92(1-2):41-51. doi:10.1016/j.diff.2016.02.005
192. Pokrovskaya LA, Nadezhdin SV, Zubareva EV, Burda YE, Gnezdyukova ES. Expression of RUNX2 and Osterix in Rat Mesenchymal Stem Cells during Culturing in Osteogenic-Conditioned Medium. *Bull Exp Biol Med.* 2020;169(4):571-575. doi:10.1007/s10517-020-04931-5
193. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 2006;99(5):1233-1239. doi:10.1002/jcb.20958
194. Zhao Z, Zhao M, Xiao G, Franceschi RT. Gene transfer of the Runx2 transcription factor enhances osteogenic activity of bone marrow stromal cells in vitro and in vivo. *Mol Ther.* 2005;12(2):247-253. doi:10.1016/j.ymthe.2005.03.009
195. Fujii M, Takeda K, Imamura T, et al. Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell.* 1999;10(11):3801-3813. doi:10.1091/mbc.10.11.3801
196. Dacic S, Kalajzic I, Visnjic D, Lichtler AC, Rowe DW. Col1a1-driven transgenic markers of osteoblast lineage progression. *J Bone Miner Res.* 2001;16(7):1228-1236. doi:10.1359/jbmr.2001.16.7.1228
197. Grue BH, Veres SP. Effect of increasing mineralization on pre-osteoblast response to native collagen fibril scaffolds for bone tissue repair and regeneration. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2022;20:22808000221104000. doi:10.1177/22808000221104000
198. Shi S, Kirk M, Kahn AJ. The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res.* 1996;11(8):1139-1145. doi:10.1002/jbmr.5650110813
199. Jones GL, Walton R, Czernuszka J, Griffiths SL, El Haj AJ, Cartmell SH. Primary human osteoblast culture on 3D porous collagen-hydroxyapatite scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2010;94(4):1244-1250. doi:10.1002/jbm.a.32805
200. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene.* 2020;754:144855. doi:10.1016/j.gene.2020.144855
201. Rodrigues WC, Fabris AL da S, Hassumi JS, Gonçalves A, Sonoda CK, Okamoto R. Kinetics of gene expression of alkaline phosphatase during healing of alveolar bone in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2016;54(5):531-535. doi:10.1016/j.bjoms.2016.02.018
202. Ralph A, Bradshaw, Philip D. Stahl. *Encyclopedia of Cell Biology.* Academic Press; 2015.
203. Trombetta-Esila J, Bradshaw AD. The Function of SPARC as a Mediator of Fibrosis. *Open Rheumatol J.* 2012;6:146-155. doi:10.2174/1874312901206010146
204. Delany AM, Kalajzic I, Bradshaw AD, Sage EH, Canalis E. Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology.* 2003;144(6):2588-2596. doi:10.1210/en.2002-221044
205. Koch H, Jadowiec JA, Campbell PG. Insulin-like Growth Factor-I Induces Early Osteoblast Gene Expression in Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development.* 2005;14(6):621-631. doi:10.1089/scd.2005.14.621
206. Walsh S, Jefferiss CM, Stewart K, Beresford JN. IGF-I does not affect the proliferation or early osteogenic differentiation of human marrow stromal cells. *Bone.* 2003;33(1):80-89. doi:10.1016/s8756-3282(03)00165-0
207. Okazaki K, Jingushi S, Ikenoue T, Urabe K, Sakai H, Iwamoto Y. Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor I during rat fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research.* 2003;21(3):511-520. doi:10.1016/S0736-0266(02)00161-4
208. Crane JL, Zhao L, Frye JS, Xian L, Qiu T, Cao X. IGF-1 Signaling is Essential for Differentiation of Mesenchymal Stem Cells for Peak Bone Mass. *Bone Res.* 2013;1(1):186-194. doi:10.4248/BR201302007

209. Garg P, Mazur MM, Buck AC, Wandtke ME, Liu J, Ebraheim NA. Prospective Review of Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Osteoblasts. *Orthop Surg.* 2017;9(1):13-19. doi:10.1111/os.12304
210. Yang W, Guo D, Harris MA, et al. Bmp2 in osteoblasts of periosteum and trabecular bone links bone formation to vascularization and mesenchymal stem cells. *J Cell Sci.* 2013;126(18):4085-4098. doi:10.1242/jcs.118596
211. Matsubara H, Hogan DE, Morgan EF, Mortlock DP, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Vascular tissues are a primary source of BMP2 expression during bone formation induced by distraction osteogenesis. *Bone.* 2012;51(1):168-180. doi:10.1016/j.bone.2012.02.017
212. Lin Z, Wang JS, Lin L, et al. Effects of BMP2 and VEGF165 on the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med.* 2014;7(3):625-629. doi:10.3892/etm.2013.1464
213. Miron RJ, Saulacic N, Buser D, Iizuka T, Sculean A. Osteoblast proliferation and differentiation on a barrier membrane in combination with BMP2 and TGF β 1. *Clin Oral Investig.* 2013;17(3):981-988. doi:10.1007/s00784-012-0764-7
214. Vukicevic S, Oppermann H, Verbanac D, et al. The clinical use of bone morphogenetic proteins revisited: a novel biocompatible carrier device OSTEOGROW for bone healing. *Int Orthop.* 2014;38(3):635-647. doi:10.1007/s00264-013-2201-1
215. Kruger TE, Miller AH, Godwin AK, Wang J. Bone sialoprotein and osteopontin in bone metastasis of osteotropic cancers. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014;89(2):330-341. doi:10.1016/j.critrevonc.2013.08.013
216. Staines KA, MacRae VE, Farquharson C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *J Endocrinol.* 2012;214(3):241-255. doi:10.1530/JOE-12-0143
217. McKee MD, Nanci A. Postembedding colloidal-gold immunocytochemistry of noncollagenous extracellular matrix proteins in mineralized tissues. *Microsc Res Tech.* 1995;31(1):44-62. doi:10.1002/jemt.1070310105
218. Sodek J, Chen J, Nagata T, et al. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;760:223-241. doi:10.1111/j.1749-6632.1995.tb44633.x
219. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):279-303. doi:10.1177/10454411000110030101
220. Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield EM, et al. Recognition of osteopontin and related peptides by an α v β 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem.* 1991;266(30):20369-20374.
221. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol.* 2014;5:511. doi:10.3389/fimmu.2014.00511
222. Kusuyama J, Bandow K, Ohnishi T, et al. Osteopontin inhibits osteoblast responsiveness through the down-regulation of focal adhesion kinase mediated by the induction of low-molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Mol Biol Cell.* 2017;28(10):1326-1336. doi:10.1091/mbc.E16-10-0716
223. Komori T. What is the function of osteocalcin? *J Oral Biosci.* 2020;62(3):223-227. doi:10.1016/j.job.2020.05.004
224. Komori T. Functions of Osteocalcin in Bone, Pancreas, Testis, and Muscle. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7513. doi:10.3390/ijms21207513
225. Ducy P, Desbois C, Boyce B, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature.* 1996;382(6590):448-452. doi:10.1038/382448a0
226. Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system. *J Bone Miner Metab.* 2021;39(1):2-11. doi:10.1007/s00774-020-01175-1
227. Mödder UI, Khosla S. Skeletal stem/osteoprogenitor cells: current concepts, alternate hypotheses, and relationship to the bone remodeling compartment. *J Cell Biochem.* 2008;103(2):393-400. doi:10.1002/jcb.21423

- 228. Martin TJ, Sims NA. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev Endocr Metab Disord.* 2015;16(2):131-139. doi:10.1007/s11154-014-9308-6
- 229. Jäger M, Jennissen HP, Haversath M, et al. Intrasurgical Protein Layer on Titanium Arthroplasty Explants: From the Big Twelve to the Implant Proteome. *Proteomics Clin Appl.* 2019;13(2):e1800168. doi:10.1002/prca.201800168
- 230. Beck et al. Gene Array Analysis of Osteoblast Differentiation - Cell Growth & Differentiation -12 (2): 61. Accessed April 5, 2021.
<http://cgd.aacrjournals.org/cgi/content/full/12/2/61>
- 231. Bianco P, Robey PG, Saggio I, Riminucci M. "Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *Hum Gene Ther.* 2010;21(9):1057-1066. doi:10.1089/hum.2010.136

5. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger Krauspe und Herrn Prof. Dr. med, Joachim Windolf danke ich für die Möglichkeit der Promotion. Herrn Prof. Dr. med. Christoph Zilkens danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung. Herrn Prof. Dr. med. Marcus Jäger danke ich für die zahlreichen guten Gespräche.

Einen Dank möchte ich auch an das wissenschaftliche Team des Forschungslabor der orthopädischen Klink, insbesondere an Dr. rer. nat. Dr. med. Bettina Alexandra Buhren, Dr. rer. nat. Holger Schrumpf und an Frau Sabine Lensing Höhn richten, die mir immer mit ihrer Expertise bei der Planung von Versuchsreihen, bei der experimentellen Umsetzung und bei der analytischen Auswertung zur Seite standen.

In Vertretung für die Firma DOT GmbH möchte ich meinen Dank an Frau Dr. rer. nat. Petra Christine Hückel und Frau Andrea Schröter richten, die mir bei Fragen zu den Beschichtungen zur Seite standen.

Zuletzt geht der größte Dank an meine Familie, die auch aufgrund dieser wissenschaftlichen Arbeit neben dem Studium und meiner beruflichen Tätigkeit sehr häufig auf mich verzichten mussten und mich dennoch stets unterstützt hat.